

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名	高 山 洋 彰
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 533 号
学位授与年月日	令和6年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 専 攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目	Influence of fibronectin immobilization on the orientation of collagen bundles in soft tissue around zirconia implants (ジルコニアインプラント周囲軟組織のコラーゲン線維束配向に及ぼすフィブロネクチン固定化の影響) Journal of Hard Tissue Biology 第33巻, 第1号, 31頁～38頁掲載, 2024年1月発行
論 文 審 査 委 員	主査 教授 松 本 直 行 副査 教授 五 味 一 博 副査 教授 大 久 保 力 廣

内 容 の 要 旨

【緒 言】

イットリア添加正方晶部分安定化ジルコニア (Y-TZP) は、優れた審美性およびアレルギー発症の危険性がないことからチタンに代わるインプラント素材として注目されている。ジルコニアインプラントの骨適合性に関しては多くの報告があるが、軟組織適合性に関する報告は数少ない。ジルコニアはチタンに比較してプラークとの付着が少なく、周囲軟組織における炎症性細胞浸潤が軽微であると報告されている。

そこで、本研究では Y-TZP 表面と歯肉軟組織との適合性の向上を目指し、細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチンをトレシルクロリド法にて Y-TZP 表面に固定化し、その効果についてラット上顎大白歯抜歯窩へのインプラント埋入実験によって評価した。また、軟組織付着の基礎的な解明を目的に、水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance: QCM) 法を用いてジルコニア表面へのコラーゲンの吸着に関するフィブロネクチンの影響についても調べた。

【材料と方法】

インプラント試料は、イットリア添加正方晶部分安定化ジルコニア (Y-TZP: Aadvia Zirconia ディスク ST, GC) を CAD/CAM システムにて、シリンダー状 (上径 0.9 mm, 下径 1.1 mm, 長さ 4.0 mm) にテーパーを付与したものを使用した。コントロールには SLA 処理、実験群には SLA 処理後にフィブロネクチン (Fn: Human Plasma Fibronectin, END Millipore Corp, Massachusetts, USA) の固定化を行った。SLA 処理は、平均粒径 180 μ m のアルミナ粒子を 0.5 MPa の空気で 20 mm の距離から Y-TZP 表面にサンドブラストし、46% フッ化水素酸 (HF) を用いて酸処理を施した後、エタノールおよび蒸留水で超音波洗浄した (SLA/Y-TZP)。Fn の固定化はトレシルクロリド法にて行った。まず、トレシルクロリド ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$, 2, 2, 2-トリフルオロエタンスルホニルクロリド: ALDRICH) を SLA/Y-TZP 試料表面全体を覆うように塗布し、37℃ のデシケーター内で 2 日間反応させた。その後、トレシル処理した試料を 0.5 mg/ml の Fn 水溶液に浸漬し、37℃ で 7 日間反応させ、Fn の固定化を行った (Fn/Y-TZP)。

動物実験は鶴見大学歯学部動物実験委員会の承認を受け遂行した (承認番号: 21A042, 22A007, 23A020)。6 週齢の Wistar 系ラット (雄) にケタミン塩酸塩により全身麻酔を行った後、上顎第一大臼歯を抜歯し、滅菌した各インプラント試料をプレスフィットで抜歯窩に埋入した。咬合圧が付与されないように対合歯は抜歯した。インプラント埋入 3 週後に、周囲組織とともに試料を採取し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で 7 日間固定した。その後、アルコール系列による脱水処理

を行い、メチルメタクリレートレジンにより包埋した。レジン重合後、EXAKT 精密切断機および研磨機を用いて、口蓋頬側方向に切断し、約 70 ～ 80 μm の非脱灰薄切研磨標本を製作した。

インプラントと軟組織の付着状態を観察するため、偏光顕微鏡を用いて周囲コラーゲン線維束の配向状態を観察した。その後、塩基性フクシン・メチレンブルー重染色を施し、光学顕微鏡を用いてインプラント周囲組織の観察を行った。また、画像解析ソフト (WinRoof) を用いて垂直配向コラーゲン線維束率、垂直配向コラーゲン線維束面積率および、上皮 - 線維性結合組織率を算出し、定量的評価を行った。

QCM 解析には、ジルコニアセンサーを装着した周波数 27 MHz の QCM 装置 (AFFINIX QN μ , ULVAC) を用い、ジルコニア表面へのコラーゲン吸着に関する Fn (Fn: Harbor BioProducts) の影響について調べた。pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液を用いて、濃度 0.5 mg/ml のコラーゲン (Col: AteloCell IPC-50, Koken) 溶液および Fn 溶液を調整した。まず、センサーセル内に 500 μl の PBS を加え、振動数が安定した後に、以下の 2 通りの方法で Col の吸着をモニターした。① Col 溶液 5 μl を注入し、注入から 60 分間の振動数の減少を測定した。② Fn 溶液 5 μl を注入し、60 分間の振動数の減少を測定した後、Col 溶液 5 μl を注入し、さらに 60 分間の振動数の減少を測定した (Fn-Col 二重吸着)。センサーへのタンパク質の吸着量は、Sauerbrey の式を用いて算出した。また、振動数減衰曲線のカーブフィッティングから、タンパク質注入直後 10 分間のみかけの反応速度 k_{obs} を求めた。

動物へのインプラント埋入実験および QCM 測定で得られた各データは、対応のない T 検定を用い、危険率 5% で統計処理 (SPSS version 25, IBM) を行った。

【結 果】

偏光顕微鏡によりコラーゲン線維束の走行を観察した結果、SLA/Y-TZP ではほとんどがインプラントに対して並行に走行するコラーゲン線維束であった。一方、Fn/Y-TZP では、インプラントに対して長く垂直に配向したコラーゲン線維束が多量に認められた。垂直配向コラーゲン線維束率は、口蓋側歯肉および頬側 + 口蓋側歯肉において、SLA/Y-TZP と比較して Fn/Y-TZP で有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。また、垂直配向コラーゲン線維束面積率は、頬側歯肉、および頬側 + 口蓋側歯肉において SLA/Y-TZP と比較して Fn/Y-TZP で有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。一方、上皮 - 線維性結合組織率の測定では、頬側歯肉、口蓋側歯肉および頬側 + 口蓋側歯肉のいずれにおいても統計学的に有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

QCM による各解析では、いずれもタンパク質注入直後から振動数の減少が認められた。①と比較し②では、①の Col 吸着量が有意に高くなった ($p < 0.05$)。一方、 k_{obs} では、①と比較し②では、Col の k_{obs} に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。

【考 察】

本研究において、SLA/Y-TZP では、インプラントに対し並行なコラーゲン線維束が観察されたのに対し、Fn/Y-TZP では天然歯に類似したインプラントに対し垂直なコラーゲン線維束をより多く認めることが、画像解析による定量的な評価により明らかとなった。これらは、Y-TZP に固定化した Fn の細胞接着性タンパク質としての特徴である RGD 配列や、コラーゲン、プロテオグリカン、ヘパリンなどに対するさまざまな結合ドメインがインテグリンを介しコラーゲンとの結合や成長を促進したことによる影響であると考えられる。また、Fn の代表的な特徴として細胞移動や分化も挙げられる。これらの効果もコラーゲン線維を豊富に発現し、垂直でかつ長い走行に影響を及ぼしたのではないかと考察する。

一方、QCM 測定では、動物実験の結果から、ジルコニアセンサー上への Col の吸着は Fn の吸着を介することで増加すると考えられたが、本研究では Fn 吸着後のセンサーを介するより、ジルコニアセンサーに対しての Col の吸着量の方が有意に低かった。今回の実験では、pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液を用いて実験を行ったが、インプラント埋入においては、炎症反応による酸性環境での生体反応があるため、pH の違いが吸着に影響を及ぼしたのではないかと考えられる。Fn と Col の接着については、QCM 測定では明らかにならなかったが、SLA 処理とトレシルクロリド法による Fn の固定により、歯肉線維配向には明らかな影響を及ぼすことがわかった。

【結 論】

ジルコニアインプラントへの細胞接着タンパク質であるフィブロネクチンの固定は、インプラント周囲のコラーゲン線維束をインプラントに対し垂直に配向させることが明らかとなった。

審査の結果の要旨

イットリア添加正方晶部分安定化ジルコニア (Y-TZP) は優れた審美性と生体親和性からチタンに代わるインプラント材

料として注目されており、骨組織との親和性について研究報告が散見されるが、軟組織との親和性に関する報告は少ない。本研究では細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチン (Fn) を Y-TZP 表面へ固定化し、Y-TZP 表面と歯肉軟組織との適合性に与える影響をラット上顎大臼歯抜歯窩へのインプラント埋入実験により検討し、下記の結果を得た。

1. 歯肉コラーゲン線維束

コラーゲン線維束の配向はコントロール群 (SLA/Y-TZP) ではインプラントに対して並行に、実験群 (Fn/Y-TZP) ではインプラントに対して長く垂直に配向していた。垂直配向コラーゲン線維束率は、口蓋側歯肉および頬側+口蓋側歯肉において Fn/Y-TZP 群で有意に高値を示した。また、垂直配向コラーゲン線維束面積率は、頬側歯肉および頬側+口蓋側歯肉において Fn/Y-TZP 群で有意に高値を示した。

2. 上皮-線維性結合組織率

いずれの条件・部位においても統計学的に有意差は認めなかった。

3. 水晶振動子マイクロバランス (quartz crystal microbalance : QCM)

QCM によりジルコニアセンサー表面へのアテロコラーゲン吸着を検討したところ、センサー表面にフィブロネクチン処理を施した群では対照群に比べてアテロコラーゲンの吸着量が有意に低値であったが、その反応速度 (k_{obs}) に有意差はみられなかった。

以上、本研究は Y-TZP に対するフィブロネクチン固定化処理は歯肉線維束を天然歯と同様の垂直に配向させることを明らかにし、ジルコニアインプラントの臨床応用に向けて重要な知見をもたらした。本論文は博士 (歯学) の学位論文として十分な価値を有すると判断した。