

# 学位論文内容の要旨

論文提出者	石樽 大嗣
論文審査委員	(主査) 朝日大学歯学部 教授 二階堂 徹 (副査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫 (副査) 朝日大学歯学部 教授 柏俣 正典
論文題目	S-PRG フィラー由来成分がヒト歯髄由来幹細胞の機能活性に及ぼす影響
論文内容の要旨	<p><b>【目的】</b></p> <p>近年、修復材料の高機能化を目指して様々な材料が開発されている。S-PRG (Surface Pre-Reacted Glass ionomer) フィラーは、ガラスイオノマーセメント技術をベースに開発されたバイオアクティブなフィラーであり、表面改質層からはフッ素イオン (F<sup>-</sup>) をはじめ、ストロンチウムイオン (Sr<sup>2+</sup>)、ナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>)、アルミニウムイオン (Al<sup>3+</sup>)、ホウ酸イオン (BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>)、ケイ酸イオン (SiO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) 等の種々のイオンを徐放する特性を有する。一方、S-PRG フィラーを浸漬攪拌して S-PRG 抽出液を作製した場合、抽出液から徐放される各イオン量は、加えた蒸留水の量によって変化することが報告されている。しかし、S-PRG フィラーから徐放する各種イオンの挙動や生体応答性については不明な点が多い。そこで本研究では、蒸留水及び培地の配合量を変化させて作製した S-PRG フィラー抽出液に対する徐放イオン量の挙動とそれらを含む各培地に対するヒト歯髄由来幹細胞 (hDPSC) に対する作用について解析した。</p> <p><b>【材料および方法】</b></p> <p>1. S-PRG フィラー抽出液とフィラー由来成分を含む培地の作製</p> <p>S-PRG フィラー (Lot. 041501) および S-PRG 抽出液 (W-I) は松風より提供を受けた。S-PRG フィラー抽出液の作製方法は、フィラーと蒸留水 (DW) を重量比 1/1 で室温にて 24 時間攪拌し抽出したものである。この方法に従い、フィラー / 蒸留水の比率を 1/10, 1/100, 1/1000 として S-PRG フィラー抽出液を作製し、各々 W-II, W-III, W-IV とした。同様に、溶媒を <math>\alpha</math>-MEM に代えて、フィラー / <math>\alpha</math>-MEM の重量比が 1/100, 1/1000 となるように抽出液を作製し、各々 M-III, M-IV とした。</p> <p>2. S-PRG フィラー抽出液を含む培地の作製</p> <p>1 で作製した抽出液を用いて、以下の 3 通りの実験培地群を作製した。</p> <p>1) 抽出液 W-I を <math>\alpha</math>-MEM で 1/2 から順に段階希釈した W-I 段階希釈系列培地</p> <p>2) W-I 段階希釈系列培地中の 1/512 希釈培地に相当する、実験培地 E(W-I) と、これを 1/2, 1/5, 1/10 に <math>\alpha</math>-MEM で希釈した E(W-I) 系列培地および、ホウ素以外の成分の溶出量増加を目的とした改変型抽出液 W-IV を E(W-I) 系列培地と同様に希釈した E(W-IV) 系列培地を作製した。</p>

3) 溶出成分をさまざまな濃度で含む培地を作製するため、①で作製した抽出液 W-I, 改変型抽出液 W-II, および M-III, M-IV を  $\alpha$ -MEM で適宜希釈したものと、M-IV をそのまま培地としたものを作製し 5 種の実験培地 (E-1, 2, 3, 4, E-4\_1/2) とした。

### 3. S-PRG フィラー由来成分の定量

作製した S-PRG 抽出液中の成分のうち, Sr, Na, Al, B, Si は ICP 発光分析装置を用いて測定し, F はイオン電極を用いて測定した。

### 4. S-PRG フィラー由来成分含有培地の細胞毒性評価

ヒト歯髄由来幹細胞 (hDPSC) を各種 S-PRG フィラーの溶出成分を含む培地で培養し, 乳酸脱水素酵素 (LDH) の漏出を LDH Cytotoxicity Detection Kit を用い測定した。

### 5. S-PRG フィラー由来成分含有培地を用いた細胞増殖評価

細胞増殖の評価は WST-1 キットまたは, Alamar Blue 試薬を用い評価した。

### 6. アルカリホスファターゼ活性染色

培養 7 日後の細胞を 4% PFA 含有リン酸緩衝生理食塩水で固定し, トリス緩衝液 (pH 9.0) で洗浄後 BCIP-NBT 溶液キットを用いて染色した。

### 7. 統計学的分析

得られたすべての値は一元配置分散分析と多重比較検定 (scheffé) にて有意差 ( $p < 0.05$ ) を求めた。

## 【結果】

S-PRG フィラー抽出液 W-I を各種濃度で含む培地を用いた検討で, W-I を 1/32 容量以下の培地で, 有意な細胞毒性が認められなかった。また, 細胞増殖では 1/128 容量以上含む培地で有意な細胞増殖抑制が認められた。そこで, B を多く含む実験培地 E (W-I) とその希釈培地および, F, Sr を多く含む実験培地 E (W-IV) とその希釈培地を評価したところ, B を多く含む培地では細胞増殖に変化は見られなかったが, F, Sr を多く含む培地では細胞増殖を有意に促進した。一方, 培養 7 日後の ALP 活性は, B の多い培地で顕著に上昇した。次いで, 実験培地 E-1~4, E-4\_1/2 を用いて, 培養 2 日後の細胞増殖を評価したところ, B が多い 2 種の培地では増殖に変化は見られなかったが, Sr が多い 3 種の培地では増殖が有意に促進され, とくに F, Sr が最も多い培地で顕著であった。一方で培養 7 日後の ALP 活性は, B の多い培地で顕著に上昇した。

## 【考察】

hDPSC の増殖を促進した培地は, S-PRG フィラー溶出成分のうち Sr の含有量が最も高い培地であり, ALP 活性の上昇が認められたのは B の含有量が最も高い培地であった。このことから, 培地中の複数の成分の相互作用も考えられるが, S-PRG フィラーから溶出する, F および Sr が hDPSC の増殖に関与し, B が ALP 活性の上昇に関与している可能性が示唆された。

## 【結論】

S-PRG フィラーから徐放する各種イオンは, ヒト歯髄由来幹細胞の応答性に影響を及ぼし, とくにフッ化物イオンとストロンチウムイオンが hDPSC の増殖に, ホウ酸イオンが ALP 活性の上昇に関与していることが示唆された。