

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	尾上 一平
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 永原 國央 (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 玉置 幸道
論文題目	
ラット骨髄由来細胞の増殖・分化に及ぼす炭酸含有アパタイト基材の焼成温度の影響	
論文内容の要旨	
<p>【目的】</p> <p>今日、歯の喪失に対する欠損補綴治療において歯科インプラント治療はきわめて有効な治療法として欠かせないものとなっている。そして、インプラント埋入部の骨量が治療の成否の重要なファクターであることから骨量不足を補うための骨補填材の需要も増している。このような背景から、骨アパタイトと同等の炭酸イオンを含み骨と同等の酸溶解性を示す新たな骨補填材として炭酸含有アパタイト(CA)が土井らによって開発された。そしてCAが骨伝導能を有し、既存の人工骨補填材である水酸化アパタイト(HA)や、β-リン酸三カルシウム(β-TCP)と比較して、破骨細胞による吸収が迅速であることが動物モデルにより示されてきた。本研究ではCAの炭酸含有量に着目し、焼成温度を変えることによって残存炭酸量が増えることから3種の異なる焼成温度のCA上で骨髄由来細胞を培養して細胞応答について検討を行った。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>① ラット骨髄由来間質細胞(rBMSC)の採取と培養： 朝日大学動物実験倫理委員会の承認を得た後、6週齢の雄性SLC:Wistar/stラット脛骨・大腿骨より骨髄を採取し、10%牛胎児血清を添加したD-MEM培地にて培養した。継代により増殖能を持つ接着細胞を選別し、実験には6回継代したrBMSCを用いた。</p> <p>② CAの合成および焼成： 土井ら(1993年)の方法に従ってCAを合成し、乾燥、粉碎した後106μm以下に整粒して200MPaの静水圧にて予備加圧を行い、400$^{\circ}$C、550$^{\circ}$C、700$^{\circ}$Cにてそれぞれ1時間焼成した。</p> <p>③ 骨補填材上でのrBMSCの増殖・接着評価： 38~74μmに整粒した400$^{\circ}$C仮焼CA(CA400)、550$^{\circ}$C仮焼CA(CA550)、700$^{\circ}$C焼結CA(CA700)、HA、β-TCPを4mg/cm²でコーティングした培養器を作製し、無コーティングの培養器をコントロール(NC)としてrBMSCの増殖と接着についてPico Green dsDNA assay Kit (Invitrogen)を用いて検討した。</p>	

- ④ 骨補填材上での rBMSC の分化評価： 5 種の基材上，または NC で rBMSC を 2 週間培養した後，4% PFA-PBS にて固定し ALP 染色，アリザリンレッド染色を行った．同様に培養した rBMSC の細胞懸濁液より ALP 活性を測定した．
- ⑤ 骨髄懸濁液の混合培養： ①で採取した骨髄液を用いて，5 種の基材上または NC で 7 日間混合培養を行った．培養には 10^{-8} M 活性型ビタミン D₃ 含有 D-MEM 培地を用い，7 日後に 4 % PFA-PBS にて固定し，Magic Red Cathepsin K assay Kit を用いてカテプシン K の蛍光基質染色を行い，カテプシン K 活性陽性の破骨細胞様細胞を検出した．

【結果】

CA は他の材料と比較し，rBMSC の増殖を統計学的に有意に促進した．そしてその効果は CA400 が最も高かった．一方，HA， β -TCP は rBMSC の増殖を抑制した．細胞の初期接着では HA， β -TCP が rBMSC の接着を阻害するのに対し，CA は 3 種とも培養用プラスチック容器と同等の細胞接着性を示した．次に，実験材料上で分化誘導培地を用いずに 2 週間培養した結果，CA および HA では ALP 活性の上昇が顕著にみられ，骨芽細胞への分化誘導が促進されていた．そしてその効果は CA 700 が最も高かった．また，CA 上では石灰化が顕著にみとめられ，特に CA 400 で顕著であった．さらに，骨髄懸濁液を活性型ビタミン D₃ 含有培地で 7 日間培養した混合培養系でカテプシン K 活性陽性細胞を検出したところ，CA では多数のカテプシン K 陽性細胞がみられ，中でも CA 700 では細胞数あたりの陽性細胞率が高いことが示された．

【考察】

本研究で焼成温度の違いにより細胞の応答性が異なることが示された．そして，細胞増殖と石灰化に有利な 400°C で焼成した CA と，骨芽細胞，破骨細胞分化に有利な 700°C 焼結 CA の混合材，あるいは，いずれも中程度の効果を示す 550°C で焼成した CA を用いた動物実験での検証を要するが，今後さらに様々な焼成温度による CA の物理化学的特性と細胞動態との関係を解明することにより，骨補填材としてより有用な CA を作製することが可能と考えられる．歯科医療の現場ではインプラント治療の前処置として骨増生術が必要な症例は今後ますます増加すると予測され，そのような症例への CA の応用が期待される．

【結論】

CA が焼成温度によらず既存の骨補填材料である HA および β -TCP と比較して，細胞の接着性，増殖，石灰化，骨芽細胞および破骨細胞様細胞の分化において優れており，本材料が口腔インプラント治療における骨増生等に有用な材料であることが示唆された．