

学位論文題名

アナターゼ型二酸化チタンが光処理機能化と
骨髄由来間葉系幹細胞親和性に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

【緒言】

チタンインプラントは、喪失した歯列の回復だけでなく人工関節などの整形外科領域においても重要な役割を果たしている。チタンインプラントが生体内で機能圧を負担するためには、オッセオインテグレーションが必要である。強固なオッセオインテグレーションの早期獲得には、インプラント表面に接着した間葉系幹細胞が増殖し、骨芽細胞へと分化し骨を形成するという一連の現象に要する時間を短縮することが重要である。一般的に rough surface は smooth surface と比較し、早期に骨の形成が起こることが報告されており、rough surface を有するチタンインプラントは臨床の現場において現在の主流となっている。しかしながら、in vitro の実験系では骨髄由来間葉系幹細胞は、rough surface と比べて smooth surface 上において、より高い初期細胞接着と細胞増殖を示すことが知られている。

紫外線(UV)照射を応用した表面改質では、チタンなどの骨芽細胞親和性および骨親和性が向上すると報告されており、UV照射に伴う光触媒作用が一因として考えられている。酸化チタンにUVを照射すると、活性酸素種を生じ、有機物質を構成するC-C結合、C-H結合、C-N結合、C-O結合、O-H結合、N-O結合を切断する。光触媒に使用される二酸化チタンはアナターゼ型とルチル型に分けられ、アナターゼ型は、活性酸素種の生成量が多いことから光触媒作用が効率的に起こり、主に用いられている。今回、チタン表面の光触媒活性を高めることで光処理機能化に伴う骨芽細胞親和性が増強されるという仮説を立てて、アナターゼ型結晶体を付与することにより、光触媒活性を高めたチタン表面を作製し、表面特性の分析を行なうとともに、新規チタン表面でのラット骨髄由来間葉系幹細胞(Bone marrow derived mesenchymal stem cell, BMSC)の挙動を調べることにした。

【材料と方法】

JIS規格第Ⅱ種チタンディスクに対して、1) Polished (Pol);コロイダルシリカを用いて鏡面仕上げとした試料、2) Acid-etched (AE); Polを、19%フッ化水素酸(HF)および66.6%濃硫酸(H₂SO₄)にて処理した試料、3) Anatase-coated (An); AE表面に光触媒コーティング剤(ST-K211, 石原産業)を塗布、乾燥する工程を10回繰り返す、AE表面に二酸化チタン結晶を被膜化した試料を用意した。各試料は暗所保管期間を0から4週間設定し、実験に用いた。さらに、4週経過した試料に殺菌灯を用いて紫外線ピーク波長250±20 nm (2.0 mW/cm²)を照射した試料を用意した。

各試料は、X線回折装置(XRD)および顕微ラマン分光装置(RAMAN)を用いて結晶構造の評価を行なうとともにメチレンブルー分解試験により光触媒活性の評価を行なった。水酸基は無水トリフルオロ酢酸(TFAA)にて誘導体化し、X線光電子分光装置(XPS)を用いて表面元素分析を行なった。試料表面の表面ぬれ性の評価として、4 μlの水を滴下し、水滴接触角を計測した。ラット大腿骨から採取したBMSCを通法に従い分離、初代継代培養し、各試料表面に播種密度が2×10⁴ cells/cm²となるように細胞を播種し、4時間培養後の初期接着細胞数の評価と、細胞骨格の制御に關与する Cell division control protein

42(Cdc42), Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1(Rac1), Ras homolog gene family, member A(Rho A) および Vinculin の cDNA の増幅産物を定量し、その相対比を比較検討した。

【結果】

XRD および RAMAN では、An のみアナターゼ型のピークが認められ、チタン表面にアナターゼ型結晶が形成されていることが確認された。メチレンブルー分解試験では、An の経時的なメチレンブルー試験液の吸光度低下が認められ、照射開始 6 時間後にはメチレンブルーがほぼ分解された。

各試料の誘導体化後の XPS による測定結果では、UV 照射により、表面の炭化水素が減少し、O1s スペクトルにおいて Pol, AE は照射前とは異なる 532.5eV 付近に水酸基が検出されたが、An は UV 照射前から同部位において水酸基が検出された。作製直後の各試料の接触角は超親水性を示し、Pol, AE は 4 週間経過後には疎水性へと変化したが、An では超親水性を維持した。さらに、4 週経過後の各試料に UV を照射したところ、水滴接触角は再び超親水性となることも確認した。

すべての試料で試料作製からの時間経過に伴い、初期接着細胞数が減少する傾向が認められたが、An は 19% の減少であり、接着数はいずれの時点においても Pol, AE よりも大きく、さらに、UV 照射によって作製直後よりも 30 % 増加した。各遺伝子発現は An で経時的に減少し、UV 照射によって Rho A は 40% 程度の発現量の増加が認められた。また、UV 照射による遺伝子発現の増加が認められた。

【考察】

チタン表面への炭化水素の吸着は、表面水酸基量の減少、タンパク質の吸着および細胞の接着を阻害すると考えられる。このチタン表面に吸着した炭化水素を除去する効果的な方法として、UV 照射処理がある。これは、光触媒作用だけでなく、直接的分解作用によっても起こると考えられ、チタン表面に吸着した炭化水素を除去するだけでなく、濡れ性の向上や表面電荷の移動も相乗的に関連し、強固なオッセオインテグレーションの早期獲得が期待されているが、メカニズムについては明らかでない。本研究では、アナターゼ型二酸化チタンに着目し、光触媒活性を高めた試料の上での間葉系幹細胞の挙動について検討した。本研究で用いたコーティング材を塗布した結果、XRD および RAMAN ともにアナターゼ型のピークが検出され、メチレンブルーがほぼ透明の状態にまで分解されていることも確認でき、非常に高い光触媒活性を有することが示された。また、表面水酸基量の変化はピークの出現した波長から表面吸着水と考えられ、これにより親水性の維持と表面の炭化水素の吸着が改善されたと推察される。初期接着細胞数は Pol, AE と比較し多く、UV 照射で試料作製直後以上の接着が認められた。アナターゼ型結晶によって炭化水素の分解は進行し、光触媒作用が活性化された結果、An では、試料作製直後よりも初期細胞接着に有効であることが示唆された。被膜のアナターゼ型二酸化チタンの含有量は 13 % 程度であり、光触媒作用には十分なアナターゼ型二酸化チタン含有量ではあるが、試料表面に付着した細胞の接着・伸展においては細胞骨格関連遺伝子の発現においても抑制的であり、必ずしも表面水酸基量の維持、超親水性の維持が初期細胞接着における必要条件でないことが推察された。しかしながら、UV 照射による遺伝子発現量の回復および増加から、An が光処理機能化において優位に作用する可能性がある。チタンインプラントは製造から埋入までに一定期間がかかり、この間にも表面の生物学的エイジングは進行する。光処理機能化はチタンインプラントの生物学的エイジングを解消する有効な手段であり、作製したアナターゼ型二酸化チタン結晶を含む試料は、チタンの生物学的エイジングの進行を抑制させるだけでなく、光処理機能化がより効果的に起こると考えられることから、より細胞親和性の高い新規チタン表面の開発に応用できる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 畑 昇
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 亘 理 文 夫

学位論文題名

アナターゼ型二酸化チタンが光処理機能化と 骨髄由来間葉系幹細胞親和性に及ぼす影響

審査は審査担当者が一同に会して約二時間かけて行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、口頭試問形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

【緒言】

チタンインプラントが生体内で機能圧を負担するためには、オッセオインテグレーションが必要である。強固なオッセオインテグレーションの早期獲得には、インプラント表面に接着した間葉系幹細胞が増殖し、骨芽細胞へと分化し骨を形成するという一連の現象に要する時間を短縮することが重要である。

紫外線 (UV) 照射を応用した表面改質では、チタンなどの骨芽細胞親和性および骨親和性が向上すると報告されており、UV 照射に伴う光触媒作用が一因として考えられている。光触媒に使用される二酸化チタンはアナターゼ型とルチル型に分けられ、アナターゼ型は、活性酸素種の生成量が多いことから光触媒作用が効率的に起こり、工業製品などに主に用いられている。今回、チタン表面の光触媒活性を高めることで光処理機能化に伴う骨芽細胞親和性が増強されるという仮説を立てて、光触媒活性を高めたチタン表面を作製し、表面特性の分析を行なうとともに、新規チタン表面でのラット骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow derived mesenchymal stem cell, BMSC) の挙動を調べることにした。

【材料と方法】

1) Pol, 2) AE, 3) An の 3 種類の試料を用意し、X 線回折装置 (XRD) および顕微ラマン分光装置 (RAMAN) を用いて結晶構造の評価を行なうとともにメチレンブルー分解試験により光触媒活性の評価を行なった。水酸基は無水トリフルオロ酢酸 (TFAA) にて誘導体化し、X 線光電子分光装置 (XPS) を用いて表面元素分析を行なった。試料表面の表面ぬれ性の評価として水滴接触角を計測した。ラット大腿骨から採取した BMSC を初代継代培養し、各試料表面に播種し、4 時間培養後の初期接着細胞数の評価と、細胞骨格の制御に関与する Cdc42, Rac1, Rho A および Vinculin の cDNA の増幅産物を定量し、その相対比を比較検討した。

【結果・考察】

作製した試料 An には、チタン表面にアナターゼ型結晶が形成され、また、光触媒作用を有することが確認された。XPS による測定結果では、UV 照射による表面の炭化水素の減少と、長期間におよぶ水酸基量の維持が確認された。水滴接触角は Po1, AE で経時的に増大し疎水性へと変化した。An ではほぼ 0° の超親水性を維持した。初期接着細胞数は試料作製からの時間経過に伴い、減少する傾向が認められたが、接着数はいずれの時点においても Po1, AE と比較し An に多く、UV 照射で試料作製直後の 30 % 以上の細胞数を示した。遺伝子発現は経時的に減少し、UV 照射によって Rho A は 40% 程度の発現量の増加が認められた。また、UV 照射による遺伝子発現の増加が認められた。

チタン表面への炭化水素の吸着は、細胞の接着を阻害すると考えられ、吸着した炭化水素を除去する効果的な方法として、UV 照射処理がある。UV による光触媒作用と直接的分解作用によって、濡れ性の向上や表面電荷の移動も相乗的に関連し、強固なオッセオインテグレーションの早期獲得が期待されている。形成された被膜のアナターゼ型二酸化チタンの含有量は 13 % 程度であったが、光触媒作用が活性化された結果、親水性の維持と表面の炭化水素の吸着の改善が見られたと推察される。しかしながら、細胞骨格に関連する遺伝子の発現は経時的に減少したことから、必ずしも表面水酸基量の維持、超親水性の維持が初期細胞接着における必要条件でないことが推察された。

チタンインプラントは製造から埋入までに一定期間がかかり、この間にも表面の生物学的エイジングは進行する。光処理機能化は生物学的エイジングを解消する有効な手段であり、作製した試料は、光処理機能化がより効果的に起こると考えられることから、より細胞親和性の高い新規チタン表面の開発に応用できる可能性が示唆された。

各審査委員が行った主な質問は、以下の通りである。

- 1) 光処理機能化の臨床での応用について。
- 2) 初期細胞接着および遺伝子発現の評価に設定した培養時間の意味について
- 3) 表面特性および初期細胞接着と遺伝子発現の相関性について
- 4) BMSC 以外での細胞反応の違い及び有用性について
- 5) 本研究の今後の方向性について。

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答と説明が得られ、さらに今後の研究の発展性についても明確な計画を持っていると判定した。審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が歯学博士の学位を授与される資格を有するものと認めた。