

学 位 論 文 題 名

Evaluation of adhesion between material and epithelium using a three-dimensional human epidermal model

(ヒト上皮3次元培養組織モデルを用いた材料-軟組織間の封鎖性評価)

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯は骨と口腔粘膜という内部組織から口腔という外部へ貫通している。他の部位には観られないこの特異的な構造より、内部組織を守る役割を果たしているのが、ヘミデスモゾームを介して歯と緊密に接着している付着上皮である。

天然歯の場合は付着上皮による上皮封鎖が存在するが、デンタルインプラントと周囲上皮の結合はなく、現在のインプラントにおける原理的な欠陥として未解決の課題のままである。

これまで、材料と上皮組織の接着性評価は、主に動物実験によって研究されてきたが、倫理的問題や実験の煩瑣性、種差などの様々な問題がある。動物愛護の観点からも批判が世界的に高まっており、現に欧州連合では 2009 年に化粧品等の皮膚感作性試験への適用が禁止された。細胞や組織の培養技術の発展と共に、動物実験代替法を使用すべきであるというコンセンサスが高まってきている。

本研究では *in vitro* で材料-上皮組織間の封鎖性を簡便に調べるために、ヒト上皮 3 次元培養組織モデルを用い、上皮封鎖のシミュレーション試験を行った。評価する材料として、ナノアパタイト修飾材料を使用し、ジルコニア、チタンについても比較検討した。また、ナノアパタイト添加効果を調べるために線維芽細胞 NIH-3T3 を用いた評価試験も行った。

【材料と方法】

(1) 材料

試料として、粒径 40nm のナノアパタイト微粒子 SHAp® (ソフセラ社)(nHAp)を表面に修飾した Φ13.5mm のポリエチレンテレフタレート(PET)ディスクを使用した。nHAp の修飾には、PET 表面をコロナ放電にて、反応開始点(ラジカル)を導入し、アクリル酸(カルボキシル基を有するモノマー)をグラフト重合可能な条件で反応させた。次に足場としてのグラフト鎖を導入し、そのカルボキシル基とナノアパタイト表面のカルシウムイオンをイオン結

合し、ナノアパタイトを固定させた。

比較対象として純チタン板(JIS2 種)(KOBELCO 社)、ジルコニアブロック(セルコンベース ⑧, デグデント社)をディスク状に成形加工、研磨(コアマスター⑧, 松風)し使用した。

材料学的評価のために、PET表面のnHApをSEM観察し、また、粉末X線回折分析(XRD)にて結晶性を調べ、湿式法で精製された日本ケミカル製ハイドロキシアパタイトと比較した。

(2) 細胞接着能及び増殖能評価

NIH Swiss マウス胚細胞由来の線維芽細胞 NIH-3T3 を使用し、培地として 10%FBS を添加した高グルコース DMEM を用いた。nHAp が修飾された PET (nHAp/PET) 上に $3\sim 5\times 10^3$ cells/cm² で細胞を播種し、SEM 観察等を行い細胞接着性を評価した。

また、72 時間までの細胞増殖率を MTT の改良法である WST8 (Cell Counting Kit-8, 同仁化学) を用いて評価した。

(3) ヒト 3 次元培養組織モデルを用いた材料-上皮組織間の接着性評価

ヒト表皮 3 次元モデルの構築には CELLnTEC 社の Epidermal 3D Culture system を応用した。培養は無抗菌薬下で行った。まず、新生児表皮角化前駆細胞を CNT-57⑧ 培地を用いて増殖させ、次に Millicell-PCF 膜インサートディッシュ(Millipore 社)(インサート)中に細胞を播種・培養を行い、PCF 膜上の細胞の単層コンフルエント状態達成後、Ca 濃度 1.2 mM の CnT-02-3DPI⑧培地に置き換え、3 次元分化誘導を行った。この際、インサート中に nHAp/PET、PET、チタン、ジルコニアディスクの最下部が PCF 膜上に接するように、それぞれ垂直に挿入し、気液界面下で 12~15 日間の培養を行った。培養終了後、インサートを 4% パラホルムアルデヒド 4℃にて固定、通法に従って脱水、パラフィン標本及び樹脂包埋を作製し、H E 染色を施し、光学顕微鏡(Nikon 社 ECLIPSE 80i)にて組織学的観察を行った。

【結果と考察】

nHAp は XRD から高い結晶性を有する水酸化アパタイトであること、PET 表面の SEM 像から 40-100nm の等方性の nHAp で均一に修飾されていることが確認された。

NIH3T3 を用いた細胞接着能試験においては、SEM 像より nHAp/PET 上での細胞の活発な伸展、及び細胞表面の微絨毛や、仮足の活発な発達を確認された。nHAp がアクチンフィラメントと糸状・葉状仮足などの細胞突起の形成を促進させていることが示唆された。また、nHAp/PET 表面では伸展した細胞突起とナノ粒子に結合し、nHAp/PET ディスクと強く結合していた。

増殖能試験では、3 日後、PET に比べあきらかな向上が認められ、nHAp が細胞増殖のための足場材料として有効あることが確認された。

ヒト上皮 3 次元培養組織モデルを用いた試験では、プレート-組織の断面像より nHAp/PET、PET プレートは培養組織の非角化層にて接触していた。特に nHAp/PET では角化層を含む全層にわたり緊密に接触しており、界面に厚い重層扁平様上皮が確認され、上皮細胞の旺盛な分化、及び増殖が示唆された。

培養、固定後にプレートを抜去した組織像では、PET の場合、界面組織が無変形なままであるのに対して、nHAp/PET では外反・変形と引裂した像が観察され、nHAp/PET と上皮の強い接着性が推測された。

また、抜去後 nHAp/PET 表面 SEM 像では基底細胞から角質までの全層の細胞と組織の付着が観察され、上皮の接着が確認された。特に非角化細胞の棘細胞の付着が多数見られ、構築された重層扁平上皮の有棘細胞層での強い接着が推察された。

ジルコニアの抜去後組織像では、界面周囲の組織の外反・変形など nHAp/PET と類似した組織像が得られたが、組織の引裂は観察されなかった。ジルコニアは接着性タンパク質を介して上皮細胞が接着するという報告があり、今回の結果でも、非角化細胞、特に有棘細胞での接着が示唆された。

Ti プレート直下には多層化した薄い、培養上皮が形成されるのみで、上皮との接着性は認められなかった。この培養上皮に角質が形成されているが、角化した上皮には一般的に接着能はないことから、接着能は弱いものと推察された。

デンタルインプラントの封鎖性評価には、本来は口腔粘膜細胞由来の上皮モデルが理想的であるが、今回は培養技術が確立しており、また入手が容易で同じ外胚葉由来の皮膚細胞を用いた上皮モデルを用いた。この 3 次元上皮モデルは免疫応答細胞である樹状細胞は含まれておらず、in vivo と比べ、その機能は限定的であるが、材料のスクリーニング検査にはきわめて簡便で有効であると考えられる。

【結論】

生体活性の高いナノハイドロキシアパタイトを修飾することにより、生体内不活性(PET)の物質に bioactive な性質を付加することが可能となった。基材となる高分子、金属等のすぐれた機械的特性を保持したまま、高い生体活性を付与した材料開発に応用が期待される。

本研究の 3 次元上皮モデルにより、いままで動物実験で行われてきたデンタルインプラントと口腔粘膜との接着・封鎖性の評価をより簡便に、in vitro 下で行うことが可能となり、軟組織親和性の高い材料の開発や処理条件の最適化のためのスクリーニング検査として有用であると示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	北 川 善 政
副 査	特任教授	亘 理 文 夫
副 査	教 授	土 門 卓 文

学 位 論 文 題 名

Evaluation of adhesion between material and epithelium using a three-dimensional human epidermal model

(ヒト上皮3次元培養組織モデルを用いた材料-軟組織間の封鎖性評価)

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。まず申請者に提出論文の概要の説明を求め、次いでその内容および関連分野について試問を行った。

審査論文の概要は以下の通りである。

【緒言】デンタルインプラントでは口腔粘膜との接着は一般的になく、現在のインプラントの原理的な欠陥として、未解決なままである。これまで、材料と上皮組織の接着性評価は主に動物実験によって研究されてきたが、本研究では、*in vitro* 下で材料-上皮組織間の封鎖性を評価する方法としてヒト上皮 3 次元培養組織モデルを利用し、シミュレーション試験を行った。

【材料と方法】材料として粒径約 40nm のナノアパタイト微粒子 (nHAp) が表面に修飾された PET 板 (nHAp/PET)、比較対象として未処理 PET、純 Ti、ジルコニアを使用した。nHAp に関しては SEM、XRD 等を用いて材料学的評価を行った。

予備実験として線維芽細胞 NIH-3T3 を使用し、nHAp/PET 上に細胞を播種し、WST8 による細胞増殖能試験及び試料表面の SEM 観察を行った。

次に、本実験の主要目的である材料-上皮組織間の接着性評価をヒト上皮 3 次元培養組織モデルで行った。新生児表皮角化前駆細胞を Millicell® PCF 膜インサートディッシュに播種し、カルシウム濃度 (1.2mM) 培地にて、3 次元分化誘導を行った。その後、nHAp/PET、PET、純 Ti、ジルコニアプレートを PCF 膜に対して接するように垂直に挿入し、気液界面下で 12~15 日間の培養を行い、3 次元上皮モデルを構築した。培養終了後、固定、通法に従って脱水、パラフィン包埋及び樹脂包埋を施行し標本作製し、HE 染色を施し、光学顕微鏡にて組織学的観察を行った。

【結果と考察】nHAp は SEM 像より 40-100nm の等方性の分散粒子であり、XRD から高い

結晶性を有する水酸化アパタイトであった。

NIH3T3 を用いた細胞接着能試験においては、SEM 像より nHAp/PET 上での細胞の活発な伸展、仮足形成とナノ粒子への細胞突起の進展、結合が確認され、また、増殖能試験では PET に比べ明らかな向上が認められ、nHAp が細胞増殖のための足場材料として有効であることが確認された。

ヒト3次元上皮モデルを用いた試験では、培養上皮は nHAp/PET、PET、ジルコニアに緊密に接触していたが、特に nHAp/PET と上皮の界面では細胞の旺盛な分化が確認され、界面に厚い重層扁平様上皮が確認された。また、固定後にプレートを抜去した組織像では、界面にて組織が外力により外反及び変形している像が観察された。これは nHAp と上皮が強く結合していたためと考えられ、抜去プレートの SEM 像では基底細胞から角質までの全層の付着が観察され、nHAp/PET と上皮の接着が確認された。ジルコニアの抜去後組織像では、界面周囲の組織の外反など nHAp/PET と類似した組織像が得られたが、組織の引裂は観察されず、nHAp/PET と比べ弱い接着性を有することが示唆された。ジルコニアには接着性タンパク質を介して上皮細胞が接着するという報告があり、今回の結果と一致している。

Ti プレート直下には多層化した薄い、培養上皮が形成されるのみで、上皮との接着性は認められなかった。この培養上皮には角質が形成され、角化した上皮には一般的に接着能はないことから、接着能は弱いものと推察された。

【結論】3次元上皮モデルにより、いままで動物実験で行われてきたインプラントと口腔粘膜との接着・封鎖性の評価をより簡便に、in vitro 下で行うことが可能となり、軟組織親和性の高い材料の開発や処理条件の最適化のためのスクリーニング検査として有用であると示唆された。

口頭試問では、本論分の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、1) コロナ放電について、2) 固定液として低浸透圧の2%グルタルアルデヒド (PBS) を用いた際の細胞形態に及ぼす影響について、3) ナノアパタイトに対する細胞の接着機構について、4) 正常ヒト上皮組織と比較し、本実験の3次元上皮モデルで要した角質形成時間(ターンオーバー)について、5) ジルコニアの表面粗さが細胞接着に及ぼす影響について、6) チタンプレート直下に発生した3次元上皮モデルが示した錯角化の傾向について、7) 今後の展開について: TEM観察によるヘミデスモゾーム及び基底板の発現の確認など

以上の質問に対して申請者から適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答をとおして、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており、幅広い知識を有していることが明らかになり、本研究のさらなる発展・今後の研究が期待された。

以上のことから、審査担当者全員が本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与する十分な学識・資質を有しているものと認めた。