

〔学位論文〕

IGF-1を用いた化学修飾法によるジルコニア表面の生体活性化

伊藤 大輔

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

Biological activation of the zirconia surface
by chemical modification method using IGF-1

Daisuke ITO

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Key words : ジルコニア, IGF-1, ヒト歯肉上皮細胞

緒 言

口腔インプラント治療は、フィクスチャーとアバットメントにチタン系の材料が使用されるようになってから、欠損補綴における有用な治療オプションとして広く普及するに至っている。口腔インプラントを長期間にわたって機能させるためには、アバットメントの表面に上皮が強固に付着し、感染を防止する必要がある。しかし、インプラント周囲接合上皮では、天然歯の付着上皮と比較して、内側基板およびヘミデスマゾームが部分的に欠落しており、インプラント／上皮接合界面の感染に対する防御機構は脆弱であると報告されている (Ikeda H et al., 2002)。そこで本研究では、生体機能性分子をアバットメント表面に化学修飾させ、上皮を強固に付着させることによって、インプラント周囲炎のリスクを低減化することを目的とした。具体的には、チタンよりも耐摩耗性が高く審美性に優れたイットリア安定化正方晶ジルコニア多結晶体 (Y-TZP) をアバットメント用材料として使用し、上皮細胞のlaminin-5の発現を高め、その付着・遊走能を向上させることが報告されているインスリン様成長因子1 (IGF-1) をY-TZP試料表面に固定化し、ヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) の初期付着細胞数、細胞接着能、細胞形態およびintegrin β 4m-RNAおよびlaminin-5m-RNAの遺伝子発現を調べた。また、IGF-1を固定化したY-TZP試料を用いて、タンパク質に結合すると言われる初期プラーク形成菌の*Streptococcus gor-*

donii (*S.gordonii*) を用いて細菌付着性について検討することとした。

方 法

(1) 試料と試料表面の分析

表面を鏡面に仕上げたY-TZP試料 ($\phi 15 \times 3$ mm) をコントロールとした。実験群として、研磨したY-TZP試料を1% p-Vinylbenzoic acid (pVBA) 溶液に室温で2時間浸漬し、その後、IGF-1を脱水縮合反応によってY-TZP試料表面に固定化した試料を用いた。

Y-TZP試料表面におけるpVBAの結合はフーリエ変換赤外分光分析により調べた。また、pVBAとIGF-1の固定化は、X線光電子分光分析法 (XPS) を用いて調べた。

(2) HGECの細胞適合性評価

各Y-TZP試料表面における細胞適合性は、HGECを用いて初期付着細胞数の計測および細胞接着能の測定、SEMと共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞の形態観察により行った。初期付着細胞数の計測は、各Y-TZP試料表面上でHGECを3時間培養し、付着していないHGECをPBSで洗浄・除去し、付着したHGECはトリプシンにて剥離し、血球計算盤にて付着細胞数を計測した。

細胞接着能の評価は、各Y-TZP試料表面上でHGECを3時間、72時間培養し、培養後、付着していないHGECをPBSで洗浄・除去し、化学的剥離力としてトリプシンを一定時間作用させて付着したHGECの一部を剥離し、剥離した後も各Y-TZP試料表面に残存したHGECと表面

から離れたHGECの蛍光強度をそれぞれ測定し、それらの蛍光強度からY-TZP試料表面に残存したHGECの割合を求めた。

HGECの形態は、SEM (HITACHI S-3500 N) と共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon TE 2000E) を用いて観察した。SEM観察用試料はHGECを3時間、72時間培養し、付着したHGECを2.5%グルタルアルデヒドで固定した後、上昇系エタノールで脱水し臨界点乾燥、Auコーティングして作製した。共焦点レーザー顕微鏡観察用の試料は、HGECを3時間、72時間培養し、付着したHGECを10%ホルマリンで固定し、0.5% TritonX-100にて透過処理した後、Rhodamin phalloidin (Actin filament) にて染色して作製した。

HGECのintegrin β 4 mRNAおよびlaminin-5 mRNAの遺伝子発現は、リアルタイムPCR法を用いた。各Y-TZP試料上でHGECを72時間培養し、付着していないHGECをPBSで洗浄・除去し、全mRNAを抽出した後、integrin β 4, laminin-5プライマーを用いて発現解析を行った。なお、ハウスキーピング遺伝子としてGAPDHを用いた。

(3) IGF-1を固定化したY-TZP試料に対する細菌付着性

IGF-1を固定化した各Y-TZP試料表面に対する細菌付着性評価は、被験菌株として *Streptococcus gordonii* ATCC10558 (*S.gordonii*) を用いた。試料を菌液 (1×10^9 cfu/ml) 中で2時間培養後、0.1%クリスタルバイオレット染色、エタノール脱色後のOD₅₉₅を測定することにより細菌付着量を評価した。

結果および考察

pVBAを結合させたY-TZP試料表面では、pVBAに由来するメチレン基、ベンゼン環およびカルボキシル基による吸収のピークが、FT-IR-RASにより観察された。またXPSを用いて試料表面のN 1sスペクトルを測定した結果、コントロールとして用いた鏡面研磨Y-TZP試料表面からは痕跡程度のピークしかみられなかったが、pVBAを結合させたY-TZP試料表面からは、超音波洗浄後においてもpVBA分子に由来するN 1sスペクトルのピークが400.2 eVに明瞭にみられた。また、IGF-1を表面に結合させた表面では、N 1sスペクトルのピーク強度が著しく高くなった。これらの結果から、IGF-1がY-TZP試料表面にpVBAによって架橋され、固定化されていることが確かめられた。

HGECの各Y-TZP試料表面に対する初期付着細胞数を計測したところ、コントロールとIGF-1を固定化した試料の間で付着した細胞数に有意な差は認められなかつ

た。

SEMおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いてHGECの形態を調べた結果、培養3時間後ではコントロールとIGF-1を固定化した試料で細胞の形態に顕著な差はみられなかった。しかし、培養72時間後では、コントロールと比較してIGF-1を固定化した試料上ではHGECが有意に伸展していることがわかった ($p < 0.05$)。

リアルタイムPCR法を用いてHGECの遺伝子発現を調べたところ、培養72時間後においてIGF-1を固定化した試料ではコントロールと比較して、integrin β 4 mRNAとlaminin-5 mRNAの発現が有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

細胞剥離試験の結果、培養3時間後ではコントロール試料とIGF-1を固定化した試料の間で、表面に残存したHGECの数に有意な差はみられなかった。しかし、培養72時間後においてトリプシン処理後も残存する細胞数は、コントロールと比較してIGF-1を固定化した試料では、約1.3倍多いことが明らかにされた ($p < 0.05$)。

これらの結果から、IGF-1の固定化はHGECの初期細胞付着や培養3時間後における細胞の形態ならびに細胞接着能に影響は及ぼさないが、培養72時間後においては細胞の伸展を促進し、細胞接着分子のmRNA発現量を上昇させる効果が示された。

IGF-1を固定化した各Y-TZP試料表面に対する細菌付着性を調べたところ、IGF-1を固定化した試料、コントロール試料それぞれの間で、付着した*S.gordonii*の量に有意な差は認められなかった。

結 論

pVBAを架橋剤として用いて、Y-TZP試料表面にIGF-1をその機能を失うことなく簡便に固定化できることが明らかとなった。IGF-1を固定化した試料とコントロール試料の間で、初期付着細胞数に差はみられなかったが、培養72時間後においては、(1) HGECの伸展および接着能が亢進すること、(2) integrin β 4 mRNAおよびlaminin-5 mRNAの発現が有意に上昇することが明らかとなった。また、IGF-1を固定化したY-TZP試料とコントロール試料との間で付着した*S.gordonii*の量に差がないことが明らかとなった。

本研究の結果から、IGF-1をY-TZP試料製アバットメントの表面に固定化することによって、上皮を強固に付着させた安定な界面を形成し、感染のリスクを低減化できる可能性が示唆された。



伊藤 大輔

平成21年 3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業
平成26年 3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了
平成26年 4月 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系
歯周歯内治療学分野 任期制助手