

論 文 要 旨

細菌汚染された粗面の
チタン表面に対する除染法と
生物学的成長因子を用いた
骨再生の検討

令和5年度
北海道医療大学大学院歯学研究科

仲川 碩

要 旨

【緒論】

近年、インプラント周囲炎が問題視されている一方、その治療法は未だ確立されていない。2009年のRenvertらの報告によると、実験的インプラント周囲炎モデルに対して行った治療法で得られた再オッセオインテグレーション率は、実験間で1~84%と大きく差があったことが報告されている。この原因として予知性の高い表面除染法が確立されていないことが考えられている。しかし2019年のIchiokaらの報告によると、平滑面の細菌汚染されたチタン表面において、エアフロー処理に続くアルカリ性電解水(AEW)処理による有機窒素化合物分解効果により、新品のチタン表面に近い状態にまで除染することで細胞親和性を回復させることが報告されている。現在、早期のオッセオインテグレーションの獲得を目的としてインプラントの表面性状は粗面であることが多く、平滑面と比較し、除染効果が低いことが報告されている。さらには、インプラント周囲炎に対する再生療法の報告は数が少なく、まだ手法は確立されていない。

従って、本研究の目的は細菌性バイオフィームによって汚染された粗面のチタン表面に対して、エアフロー処理に続くAEW、過酸化水素を用いた機械的・化学的除染法の効果を評価すること、除染後のチタンディスク表面と生物学的成長因子が骨分化能に与える影響を評価することである。

【材料と方法】

〈チタン試料〉

JIS第2種純チタンディスク(直径15.0mm, 厚さ3mm及び直径5.0mm, 厚さ1.5mm)を鏡面研磨まで行い、研磨したディスクを8%フッ酸によるエッチング後、73.5%硫酸と21.6%塩酸の混合酸によりエッチングを行った。その後、表面粗さ計を使用し算術平均粗さ(Ra)=1.0~2.0 μ mとなっていることを確認した。

〈細菌の培養条件〉

S. gordonii ATCC 10558^TをTY寒天培地を用いて37°Cの嫌氣的条件で3日間培養した。

〈化学的除染剤〉

本研究では、生理食塩水(0.9% NaCl溶液)、0.05%AEW、及び過酸化水素水(3% H₂O₂)を用いた。すべての溶液は40°Cに調整した。

〈チタンディスク状でのバイオフィーム形成〉

*S. gordonii*の単一コロニーを、TY寒天培地からTY液体培地に移動し、菌液を濁度OD₆₆₀=0.5(0.5 \times 10⁸CFU/mL)となるように測定した。細菌混濁液をチ

タンディスクを含む 24 穴プレートに滴下し、37°Cで嫌氣的に 24 時間培養した。
〈チタン表面の除染法〉

チタンディスクをエリスリトールパウダーを用いたエアフローシステムにより最大出力で使用した。10 秒間の除染後、NaCl 溶液、AEW または H₂O₂に 60 秒間浸漬させ、それぞれ NaCl 群、H₂O₂群、または AEW 群とした。コントロール群には細菌汚染も表面除染も行っていないエッチング直後の Pristine のチタン表面を用いた (Pristine 群)。

〈マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) の培養〉

細胞は 10 cm のポリスチレン培養ディッシュ上で 10%ウシ胎児血清 (FBS)、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した α -MEM を使用して培養した。細胞は 37°C、5%CO₂の環境下で培養した。

〈表面化学特性の解析〉

X 線光電子分光分析装置により Ti 2p, N 1s のスペクトルを測定した。さらに、チタンに対する窒素の相対濃度 (C_N / C_{Ti}) を算出した。

〈チタン表面の初期付着細胞数〉

24 穴プレートにチタンディスクを入れ、 6.0×10^4 cells / cm²で MC3T3E-1 を播種した。4 時間培養後の細胞を、自動セルカウンターを用いて細胞数を計測した。

〈免疫蛍光染色〉

24 穴プレートにチタンディスクを入れ、5700 cells / cm²で MC3T3-E1 を播種した。2 時間の培養後、蛍光色素 Rhodamine Phalloidin 及び 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて染色し、細胞面積と初期付着細胞数を、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて評価した。解析は Image J ソフトウェアを用いて行った。

〈アルカリフォスファターゼ (ALP) 発現〉

ALP 発現の解析は、24 穴プレートに各チタンディスクを入れ、 1.0×10^5 cells / cm²で MC3T3E-1 を播種した。1 日間の培養後、各群に骨分化培地、骨分化培地 + エナメルマトリックスタンパク質 (EMD)、骨分化培地 + 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を加え 7 日間の培養後、ALP 染色を行った。実体顕微鏡を使用して観察し、染色部位の面積は Image J ソフトウェアを用いて定量化した。

〈統計解析〉

Tukey の検定による分散分析 (ANOVA) を用いて評価した。 $p < 0.05$ を統計的に有意差ありとした。

【結果】

XPS 分析の結果では、除染後のチタン表面の N 1s スペクトルを測定したところ、NaCl 群及び H₂O₂ 群と比較して AEW 群においては、低いピークが検出された。得られた N 1s スペクトルから、 C_N / C_{Ti} を算出したところ、NaCl 群及

び H₂O₂ 群と比較して AEW 群は約 1/4 倍と有意に低い値を示した。また、AEW による除染後のチタン表面から得られた N 1s スペクトルのピークは、Pristine 群と同程度であり、C_N/C_{Ti} においても、AEW 群と Pristine 群の間に有意差は認められなかった。初期付着細胞数計測の結果では、NaCl 群と比較して AEW 群では、約 1.7 倍多く細胞が付着していた。また、H₂O₂群と比較しても AEW 群は有意に細胞付着数が増加していた。これは、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた DAPI 染色によるチタンディスク表面上の初期付着細胞数の計測でも、同様の結果が得られた。細胞面積の評価の結果では、AEW 群のチタン表面の細胞は、NaCl 群のチタン表面の細胞と比較して 2.8 倍伸展していた。また、AEW 群のチタン表面の細胞は、H₂O₂群のチタン表面の細胞と比較して約 2.3 倍伸展しており、Pristine 群と同等であった。ALP 発現の結果では、AEW 群は Pristine 群と同程度の ALP 発現が確認された。一方、NaCl 群では Pristine 群と比較して ALP 発現が減少した。また EMD, FGF-2 投与群は全群で ALP 発現が減少する結果となった。

【考察】

XPS 分析の結果から、粗面のチタンディスクにおいても、エアーフロー処理に続く AEW 処理が表面にわずかに残存している有機窒素化合物を分解・除去し、新品のチタン表面に近い状態にまで復元させることが明らかとなった。また、初期付着細胞数の計測及び付着細胞面積の計測の結果から、AEW の有機窒素化合物分解効果によりチタンディスク表面に細胞接着タンパク質が付着しやすくなったことから、新品のチタンディスクと同様の状態まで細胞親和性が回復されることが明らかとなった。さらに ALP 発現の結果から、AEW の原子レベルでの有機化合物の十分な除染は、MC3T3-E1 の骨分化能に対しても、細菌汚染前のチタンディスクと同様の状態にまで回復できる可能性が示唆された。

本研究の結果から、エアーフロー処理後の AEW 処理は粗面のチタン表面における除染法として有効である可能性が示唆された。また、EMD, FGF-2 は MC3T3-E1 の骨分化に追加的な効果が期待できない可能性が示唆された。

【結論】

エアーフロー処理後の AEW による除染は、汚染された粗面のチタン表面に残存している有機窒素化合物を分解・除去し、新品のチタンディスクに近い状態にまでチタン表面を回復させることが明らかとなった。また、エアーフロー処理後の AEW による除染は、新品のチタンディスクと同様の状態にまで細胞親和性と骨分化能を回復することが示唆された。FGF-2 及び EMD は、MC3T3-E1 の分化に追加的な有効性を示さない可能性が示唆された。