

【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モ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 試料における細菌付着性について、初期プラーク形成菌の *Streptococcus gordonii* (*S.gordonii*) を用いて検討を行った。

【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 ($\phi 15 \times 3 \text{mm}$) 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 と表面から離した 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 m-RNA および laminin-5 m-RNA 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 mRAN 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

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】

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った。

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なった ($p < 0.05$)。

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 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。

【考察】

Y-TZP 試料表面の改質において、EDC は水溶液中で脱水縮合剤として作用し、カルボキシ基とアミノ基の間のペプチド結合形成を促進することが知られている (Timkovich, 1977)。インプラントの表面改質法は数多く提案されているが (Buser et al., 1991 ; Yoshinari et al., 2001 ; Rupp et al., 2006), 今回の研究に応用された生体機能性分子をインプラント表面に吸着あるいは固定化する生化学的手法は、直接的に細胞の付着, 伸展, 増殖および分化に影響を与える可能性が高く, 機能性を有する口腔インプラントの開発に有効な手法であると考えられる。

Y-TZP 試料表面に対する HGEC の付着・伸展および接着能において、上皮細胞の付着・伸展には integrin β 4 および laminin-5 が重要であるとされている。本研究では、IGF-1 固定により HGEC が産生する integrin β 4 および laminin-5 の発現が促進していたことから、それに伴い細胞同士の接触が増加し、細胞の伸展と接着能が亢進したことが考えられる。

今回の結果では、IGF-1 を固定化した Y-TZP 試料表面における細菌付着の影響について、鏡面研磨した Y-TZP 試料と IGF-1 を固定化した試料の間で、付着した *S.gordonii* の量に差はみられなかった。しかしながら、金属表面への IGF-1 固定の細菌付着の影響を明らかにするには、固定化した IGF-1 の濃度、表面に固定化された IGF-1 の量、そして細菌の種類や株について、さらに検討する必要があると考えられる。

【文献】

Ikeda H, Shiraiwa M, Yamaza T, Yoshinari M, Kido MA, Ayukawa Y, Inoue T, Koyano K & Tanaka T. Difference in penetration of horseradish peroxidase tracer as a foreign substance into the peri-implant or junctional epithelium of rat gingivae. Clin Oral Implants Res 13: 243-251, 2002.

Timkovich R. Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. Anal Biochem 79: 135-143, 1977.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH & Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. J Biomed Mater Res 25: 889-902, 1991.

Yoshinari M, Oda Y, Kato T & Okuda K. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. Biomaterials 22: 2043-2048, 2001.

Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M & Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. J Biomed Mater Res A 76: 323-334, 2006.