

氏名・(本籍)	廣瀬 由紀人 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第12号
学位授与の日付	平成4年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	パルス電磁場刺激がインプラント材料表面の骨原性細胞株MC3T3-E1に与える影響
論文審査委員	主査 教授 坂口 邦彦 副査 教授 賀 來 亨 副査 教授 馬 場 久 衛

論文内容の要旨

I 緒 言

口腔インプラントの治療で、人工歯根の固定期間の短縮のために、積極的な治癒促進処置で補綴物装着までの期間を短縮させることができれば、補綴学的意義も大きいと思われる。そこで著者は、人工歯根の固定期間を短縮するために、整形外科領域で難治性の骨折の治療に臨床応用され、その有効性が確認されているパルス電磁場刺激法の歯科領域への応用を考えた。しかし、パルス電磁場刺激が骨原性細胞に与える影響とインプラント材料との関係について検討している報告はみられない。本研究は、パルス電磁場刺激法が人工歯根埋入後の固定期間の短縮に応用できるかどうかを検索するため、単結晶ならびに多結晶酸化アルミニウム、および純チタニウムの3種インプラント材料表面上の培養骨原性細胞株MC3T3-E1にパルス電磁場刺激を与えて、その刺激が細胞の増殖および分化に与える影響について定量的に検討した。

II 材料および方法

実験に用いたインプラント材料は、直径10mm、厚さ1mmの円板状に成形した単結晶

酸化アルミニウム (以下 SAL)、多結晶酸化アルミニウム (以下 PAL)、純チタニウム (以下 Ti) である。用いた細胞は、骨原性細胞株 MC3T3-E1 である。パルス電磁場刺激には理研式パルス電磁場発生装置を用いた。

実験は、インプラント材料表面に 6×10^3 個の細胞を植え込み、電磁場の刺激を与えない対照群と電磁場で刺激した実験群を比較検討した。実験群は、磁場強度 3 Gauss、周波数 100 Hz、パルス幅 25 μ sec のパルス電磁場刺激を連続的に与え、以下の一連の分析を行った。

1. DNA の定量は、培養 5, 7, 9 日目の試料を Kapuscinski and Skoczylas の方法に準じて蛍光分析した。
 2. ALPase 活性の測定は、培養 7 日目の試料を Lowry らの方法に準じて分光分析した。
 3. タンパクの定量は、ALPase 活性の測定に用いたサンプルの一部を Bradford の方法に準じて分光分析した。
 4. ヒドロキシプロリンの定量は、培養 9 日目の試料を加水分解し、Woessner の方法に準じて分光分析した。
 5. 倒立位相差顕微鏡によりインプラント材料上の細胞の形態および密度を観察した。
- 統計処理は、実験群と対照群は例数 5 とし、Duncan の多範囲検定を行った。

Ⅲ 結 果

1. パルス電磁場刺激がインプラント材料表面上の細胞増殖に与える影響

1) DNA 量について

5 日間の細胞の DNA 量は、3 種の材料で対照群に比べ、実験群でいずれも 1.31 倍増加し、統計的に有意な差があった。7 日間の細胞では、Ti が対照群に比べて 1.40 倍増加と最も DNA 量の増加が多く、ついで SAL の 1.34 倍、PAL の 1.28 倍の順となった。また 9 日間の細胞では、やはり Ti が対照群に比べて 1.40 倍の DNA 量の増加を示し、ついで SAL の 1.35 倍、PAL の 1.26 倍の順となった。培養 5 日間では、3 種のインプラント材料間で DNA 量の増加に差がみられなかったが、7 日間ならびに 9 日間の培養では、Ti、SAL、PAL の順になった。しかし統計的に有意な差とはならなかった。

2) 総タンパク量について

上記の実験で DNA 量の増加が最も多かった 7 日間培養した細胞の総タンパク量を測定した。電磁場刺激を与えなかった対照群の間で、Ti が SAL と PAL に比べて 1.12 倍総タンパク量が多かった。また、実験群では対照群に比べ、SAL で 1.25 倍、Ti で 1.18 倍、

PALで1.15倍多い総タンパク量となり、両者の差はいずれも統計的に有意となった。

3) 倒立位相差顕微鏡所見

SAL上で5日間培養した細胞を倒立位相差顕微鏡で観察した。肉眼的に観察した結果でもインプラント材料上の細胞密度は、対照群に比較して実験群が高く、実験群では紡錘形の細胞が充実性、束状に配列していた。

以上の結果から、実験群の細胞の増殖は、対照群より活発であることが判明した。また、DNA量と総タンパク量から推測したインプラント材料別の増殖の程度はTiが最も多く、ついでSALさらにPALの順に細胞の増殖が促進される傾向がみられた。

2. パルス電磁場刺激がインプラント材料表面上の細胞の分化に与える影響

1) ALPase 活性について

7日間培養を行った細胞のALPase活性を測定した。Tiは対照群に比べて、1.12倍、SALは1.10倍、PALは1.09倍のALPase活性の上昇がみられ、これらはいずれも統計的に有意な差であった。

2) コラーゲン産生について

9日間培養した細胞の産生コラーゲン量は対照群に対して、実験群ではSALで1.14倍、PALとTiともに1.10倍のヒドロキシプロリンの増加を示し、対照群と実験群の差は統計的に有意であった。

以上の結果から実験群の細胞の分化は、対照群より促進傾向が認められた。また、インプラント材料間では統計的に有意な差はなかったが、ALPase活性とヒドロキシプロリン量から推測したインプラント材料別の分化の程度はTiがSALやPALより細胞の分化が促進される傾向がみられた。

IV 考 察

パルス電磁場刺激には骨の細胞に対する直接作用と、微小環境内の変化などによる間接作用があると考えられる。本研究では生体という種々の因子が関与する複雑な環境下で、インプラント材料に密接する組織におよぼすパルス電磁場刺激の影響を検討する以前に株化された細胞を用いて実験を行い、定量的に刺激の直接作用を検討することを試みた。

V 結 論

1. 単結晶ならびに多結晶酸化アルミニウム、および純チタニウム材料表面上のMC3T3-E1

細胞にパルス電磁場刺激を与えると、与えない対照群に比べDNA量および総タンパク量は増加し、パルス電磁場刺激は細胞の増殖促進に効果があることが示された。

2. 上の結果からこの3種のインプラント材料は、パルス電磁場刺激の細胞増殖促進には抑制的に作用しないことが示された。
3. 3種のインプラント材料上のMC3T3-E1細胞は、パルス電磁場刺激によりアルカリホスファターゼ活性とヒドロキシプロリン量がともに増加した。このことにより、パルス電磁場の刺激によってインプラント材料上の細胞の分化も促進することが示された。
4. 3種のインプラント材料間では、電気伝導体であるチタニウム材料が電気絶縁体である単結晶および多結晶酸化アルミニウムよりも細胞の増殖、分化を促進させる傾向を示した。

以上の結果から、インプラント材料上の骨原性細胞株MC3T3-E1に磁場強度3 Gauss, 周波数100 Hz, およびパルス幅25 μ secのパルス電磁場刺激を与えると、細胞の増殖と分化が促進されることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、単結晶および多結晶酸化アルミニウム、チタニウムの3種インプラント材料表面上の骨原性細胞株MC3T3-E1をパルス電磁場で刺激し、その細胞動態について定量的に検討を加え、インプラント材料表面上の細胞の増殖と分化をパルス電磁場刺激が促進させることを論じた歯科領域で最初のものである。

広瀬君は、整形外科領域において、難治性の骨折部をパルス電磁場で刺激して骨の癒合を促進させる方法に着目し、これを口腔インプラントの治療に応用することを考えた。しかし、これまでのパルス電磁場刺激についての研究報告は、定量的に評価した報告は少なく、さらに、パルス電磁場刺激が細胞に与える影響とインプラント材料との関係について検討している報告はみられない。そこで、本論文ではインプラント材料上でパルス電磁場の刺激を与えて細胞培養を行い、刺激の作用を細胞のDNA量、タンパク量、アルカリホスファターゼ活性、ヒドロキシプロリン量で生化学的に分析している。

その結果、本研究者は、磁場強度3 Gauss、周波数100 Hz、パルス幅25 μ secのパルス電磁場で3種の材料表面上のMC3T3-E1細胞を刺激すると、刺激をしない対照群に比べDNA量と総タンパク量がともに増加を示し、上記の刺激が細胞の増殖促進に効果があることを明らかにした。一方、刺激によりアルカリホスファターゼ活性とヒドロキシプロリン量もともに増加を示し、パルス電磁場の刺激はインプラント材料上の細胞の分化も促進させることを明らかにした。また、上の結果から、用いたこの3種のインプラント材料は、パルス電磁場刺激の細胞の増殖促進には抑制的に作用しないこと、さらに、3種のインプラント材料間では、電気伝導体であるチタニウムが電気絶縁体である単結晶および多結晶酸化アルミニウムよりも細胞の増殖、分化を促進させる傾向を示すことを明らかにした。

この知見は、骨の細胞に対するパルス電磁場刺激の作用を定量的に検討することで、パルス電磁場の細胞の増殖と分化に対する促進効果が客観的に追究されており、価値ある内容の研究である。よつて、本論文は歯学博士の学位を授与するに価すると判定した。