

ふりがな氏名	しん えいりん 刑 鶴琳
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 740 号
学位授与の日付	平成 26 年 6 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Osteogenic activity of titanium surfaces with nanonetwork structures (ナノスケールでのネットワーク構造を付与した純チタン金属表面上における骨形成活性について)
学位論文掲載誌	International Journal of Nanomedicine 第 9 巻 平成 26 年 4 月 5 日
論文調査委員	主査 岡崎 定司 教授 副査 小正 裕 教授 副査 梅田 誠 教授

### 論文内容要旨

本研究では純チタン金属への浸漬アルカリ濃度の変化がラット骨髄細胞の初期接着および硬組織分化誘導に与える影響について比較，検討を行った。

対照群として #2000 まで研磨した JIS 規格 2 級の純チタン金属を使用した。実験群としては室温で 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 M の水酸化ナトリウム水溶液に同チタンを 24 時間浸漬し，イオン交換水にて導電率が  $5 \mu\text{S}/\text{cm}$  以下になるまで洗浄を行った後，自然乾燥にてチタン金属表面に TNS を析出させたものを用いた。各群の純チタン金属表面は SEM, SPM にて観察を行った後，表面の蒸留水の接触角を VSA 2500 XE にて測定し，さらにウシ血清アルブミンを用いたタンパク質の吸着試験を行った。次に，実験動物として生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から骨髄間葉細胞を採取後，初代培養を確立しその 3 代目を実験に供した。すなわち，細胞を両群に 1 穴あたり  $4 \times 10^4$  個ずつ各試料上に播種し，培養 30 分，1, 3 時間，1, 3, 7 日後の細胞接着数の比較を CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay Kit を用いて行った。また，各種プレートを骨分化誘導培地に置換し，培養開始後 7, 14 日の ALP 活性，培養開始 21, 28 日のオステオカルシン量およびカルシウム析出量を測定した。さらに，培養開始 21, 28 日後の BSP mRNA, Osteonectin mRNA, Runx2 mRNA および COL-1 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて分析した。統計学的解析には，各測定値に一元配置分散分析を行った後，有意差を認めた場合 Student-Newman-Keuls 法を用いて検定を行った。有意水準は 5% とした。

SEM の所見では，浸漬濃度の上昇とともにネットワーク構造が形成され，10 M で構造が均一化し，12.5 M への浸漬では不均一な構造となった。SPM の所見では，ノジュールのスケールが濃度の上昇とともに小さくなり，10 M では Ra が 13 nm を示し，12.5 M では 16 nm と高い値を示した。接触角の値

は実験群で対照群より有意に低い値を示し、10 Mで最も低い値を示した。タンパク質の吸着量は10 Mで最も高い値を示した。また、細胞接着数の比較では、全ての計測時間において実験群で対照群より有意に高い値を示し、10 Mの浸漬で最も高い値を示した。ALP活性、オステオカルシン産生量、カルシウム析出量および全ての遺伝子マーカーは全計測時間において実験群で対照群より有意に高い値を示し、10 Mの浸漬で最も高い値を示した。

以上の結果より、純チタン金属を10 M水酸化ナトリウム水溶液へ浸漬することによってラット骨髄細胞の初期接着および硬組織分化誘導の向上が大いにはかれることが明らかとなった。

### 論文審査結果要旨

室温中での濃アルカリ修飾によって純チタン金属表面上にナノシート構造（以下TNS）とよばれる構造が析出し、それが骨髄細胞の増殖能や硬組織分化誘導能の向上に有効であることがすでに明らかになっている。さらに本研究ではTNSの生成条件を規定するため、浸漬アルカリ濃度の変化がTNSに与える影響について検討した。

実験材料として実験群として2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 Mの水酸化ナトリウム水溶液に同チタンを24時間浸漬しTNSを析出させた純チタン板、対照群として研磨したのみの純チタン板を使用し、板上でラットから採取した骨髄間葉細胞を培養した。その後、ウシ血清アルブミンの吸着、細胞の初期接着能、ALP活性、Ca析出量、OC産生量からみた硬組織分化誘導能の評価、硬組織分化誘導の関与する遺伝子評価を行ったところ、全ての計測時間で実験群が対照群と比較し、有意に高い値を示し、10Mで最も高い値を示すことがわかった。

以上、TNSの生成条件が10Mでの水酸化ナトリウム水溶液への浸漬が最も有効であることを証明した点において、本論文は博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。