



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	in vitroおよびin vivoにおけるマイクロパターンの表面性状が骨系細胞に与える影響について [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	沼本, 真一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第14999号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85296
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shinichiro_Numamoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 沼本 真一郎

学位論文題名

in vitro および *in vivo* におけるマイクロパターンの
表面性状が骨系細胞に与える影響について

キーワード（5つ） マイクロパターン、骨形成、ピラー、ホール、骨芽細胞

デンタルインプラントは、形態、機能ならびに審美性の回復に優れること、さらには高い予知性から、欠損補綴方法の一つとして広く臨床で使用されている。インプラント治療の成功には、オッセオインテグレーションの確立が必須であり、早期のオッセオインテグレーションの獲得を目的に、インプラントには様々な表面処理がなされている。しかし、現在臨床で応用されている表面処理方法では規格化された均一な表面性状が得られておらず、表面性状における形態や大きさなど、どの要因が材料表面における骨形成に有効であるかは、明確にされていない。*in vitro* の研究においては、形態や大きさを規格化した均一な微細構造を用いた研究もなされているが、*in vivo* での反応についての報告は少なく、不明なことが多い。

本研究では、材料の表面性状（形態とサイズ）が、骨形成に与える影響を明らかにすることを目的に、材料として生体内で安定であるシクロオレフィンポリマー（cycloolefin polymer 以下 COP）フィルムを使用し、ナノインプリント法にて様々な形態とサイズ（大きさ）を有するパターンを製作し、骨芽細胞様細胞の接着、増殖、ならびに石灰化について検討するとともに、ラット大腿骨骨髓内に埋入し、材料表面での骨形成を観察した。

材料として、COP フィルム（ZEONOR®、日本ゼオン株式会社）を使用し、小型熱プレス機を用いて、モールド上の各種パターンを COP フィルム上に転写するナノインプリント法により試料を製作した。付与するパターンとしてピラー（柱状構造）とホール（穴状構造）を選択した。サイズ（大きさ）は、細胞培養実験用としてピラー（直径：0.5, 1.0, 2.0 μm 高さ：1.0 μm ）、とホール（直径：0.5, 1.0, 2.0 μm 深さ：1.0 μm ）を、動物実験用としてピラー（直径：1.0, 5.0 μm ）

高さ：5.0 μm)とホール(直径：1.0, 5.0 μm 深さ：5.0 μm)を製作した。パターン表面を走査型電子顕微鏡で観察した。また、COP フィルムは疎水性であるため、各種試験に際して親水化処理を行った。

骨芽細胞様細胞 Saos-2 を使用して、接着、増殖ならびに石灰化試験を行うとともに走査型電子顕微鏡にて観察し、骨芽細胞の培養特性に与える影響を検討した。また、実験動物として雄性ウィスター系ラットを使用し、各パターンを大腿骨内に埋入した。埋入 1 および 4 週間後に大腿骨を摘出し、脱灰し、光学顕微鏡にて観察した。一部の試料については、透過型電子顕微鏡(TEM)にて観察した。

ナノインプリント法により、COP フィルムにパターンの正確な転写が可能であった。パターンの付与により接触角は増加する傾向を示したが、親水化処理により接触角は減少した。

親水化処理により接着細胞数は増加し、ピラー0.5 μm では有意に増加した。増殖試験においては、親水化処理ピラー0.5 μm の細胞数と親水化処理ホール1 μm 以外のパターンの細胞数の間に有意差が認められ、親水化処理ホール1 μm の細胞数と親水化処理ホール2 μm の間にも有意差が認められた。また、親水化処理によりパターンを付与していないプレーンを除き、石灰化が亢進した。ピラーでは、同じサイズ間では、親水化の有無により有意差が認められた。親水化されていない群では、プレーンと比較して0.5 μm 、1 μm のピラーは有意に低い値を示した。

埋入 1 週後、ピラー1 μm ではピラー表面に骨芽細胞様の細胞の配列が観察された。ピラー5 μm では周囲に線維芽細胞や骨芽細胞が観察されたが、一部のピラー間隙には細胞が認められた。4 週後ではピラー1 μm はパターンの多く部分に骨組織が直接接して認められた。ピラー5 μm では多くの部分で線維性組織がパターンに接しており、一部で骨組織がパターンに直接接していた。4 週の標本の TEM 観察では、ピラー1 μm においてはピラー上に骨細胞が観察され、骨組織がピラーに直接接している像がみとめられた。一部のピラーにはミトコンドリアや空胞に富む破骨細胞が認められ、ピラーに接して明帯が観察された。ホールにおいては、5 μm ではパターン周囲に線維芽細胞が認められ、一部のホール内部には細胞が観察された。4 週ではホール1 μm 、5 μm ともにパターン表面の多くの部分で骨組織が直接接していた。4 週の標本の TEM 観察では、ホール1 μm ではホール内外に骨組織が観察された。ホール内のコラーゲン線維はホール側壁に平行に配列していた。ホール5 μm では骨組織がパターンに接して観察され、ホール内部にも認められたが、ホール底面までは達しておらず、コラーゲン線維は、ランダムな配列を示した。

親水化処理された0.5 μm の小さいピラーは、Saos-2 の接着に対し有利なこと

が示唆された。小さいピラーという物理的構造に細胞がトラップされやすく、接触角が小さいことから細胞が基材に接触し易くなるため、細胞接着に有利に働くと考えられた。また、Saos-2は親水化後の0.5 μm のピラー上で最も高い増殖を示したが、単位面積あたりのピラーが多いことが、原因として推察された。石灰化に関しては、有意差は認められなかったが、親水化処理、パターンの形状やサイズなどが影響を与えうる可能性が示唆された。

埋入1週および4週のピラー1 μm 、5 μm の光学顕微鏡の組織像から、小さいサイズである1 μm のほうが骨形成に優れることが示された。また、ホール5 μm とピラー5 μm の結果から、パターンにおけるスペースの広さが細胞の侵入、骨形成にも関係すると推察された。TEM観察において1 μm と5 μm のホールのコラーゲン線維の配向状態の違いからスペースの狭いパターンが、骨形成に適していることが示唆された。*in vivo*での研究結果から1 μm のホールが最も骨形成に効果的であることが示唆され、パターンのサイズ、形状の違いが骨形成に影響を与えることが示された。また骨形成においてパターン間の間隙が重要な因子の一つであることが示唆された。

COPフィルムにサイズの異なるピラーとホールの2種類の形態を付与し、*in vitro*ならびに*in vivo*で骨形成への影響について検討した。*in vitro*においては、接着、増殖においてパターンの形状や大きさの影響を受け、0.5 μm の小さいピラーが有利であることが示された。また、親水化処理は、接着や増殖に有効であり、ピラーは石灰化において親水化処理の影響を大きく受けることが示唆された。*in vivo*では、パターンの形態やサイズが骨形成に影響を与え、特に小さいサイズのホールのパターンが骨形成に有利であることが示唆された。