



Title	マイクロナノパターンの表面形状がヒト歯根膜線維芽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)	工藤, 円
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15489号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89523">https://hdl.handle.net/2115/89523</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Tsubura_Kudo_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 工藤 円

学位論文題名  
マイクロナノパターンの表面形状がヒト歯根膜線維芽細胞に  
与える影響について

キーワード（5つ） ナノインプリント、マイクロナノパターン、歯根膜線維芽細胞、シクロオレフィンポリマー（COP）フィルム、コラーゲン

歯を喪失した場合に用いられる歯科治療の選択肢として、義歯、ブリッジ、および歯科インプラントが挙げられる。歯科インプラントは違和感が少なく、機能回復に優れることから、欠損に対する補綴歯科治療として広く普及しつつある。歯科インプラント成功には、オッセオインテグレーションの獲得が必須である。しかし、オッセオインテグレーションが成立したインプラント表面には、歯根膜がないため、感覚、緩衝能力等の問題の他にも、上皮ならびに結合組織による封鎖性が脆弱であることから、細菌感染が生じやすい。天然歯における歯根膜、すなわち結合組織性付着に類似した構造をインプラント体表面に獲得することができれば、臨床において大きな問題となっているインプラント周囲炎予防につながると期待できる。現在、オッセオインテグレーションや結合組織性付着を獲得することを目的として、ナノインプリント法やナノリソグラフィーにより製作した規格化された均一な微細構造を用いて、細胞の接着、増殖、移動、分化等に関してさまざまな研究がなされている。先行研究の結果は、マイクロ/ナノスケールのグループ、ピラー、ホール等の表面形

状やサイズが、骨芽細胞や線維芽細胞の細胞接着や増殖に影響を与えることを示唆している。しかしながら、グループ、ピラー、さらにはホールという異なる3種のパターンを同条件で比較検討した研究はなく、歯根膜細胞に関する報告もない。歯根膜の再生、さらには歯根膜を有する歯科インプラントの開発には、歯根膜細胞の表面性状による増殖や配向の制御は重要である。本研究では、材料の表面性状（形態とサイズ）が、歯根膜細胞に与える影響を明らかにすることを目的にした。

材料として転写性に優れ精密成形が可能であり、無極性な材質であるため細胞への影響も少なく、吸水性が低く、寸法安定性に優れている特徴を有している cycloolefin polymer（以下 COP）フィルムを使用した。ナノインプリント法にて製作した様々な形態とサイズを有するパターンを COP フィルム表面に形成し、パターン上でヒト歯根膜線維芽細胞の接着、増殖、ならびにコラーゲン産生について検討した。加えて、各種パターンをラット頭部および背部皮下に埋入し、材料表面における組織反応について検討した。

各種パターンを付与してあるマスターモールドに、COP フィルムを被せ、小型熱プレス機を使用し、それぞれ、幅または直径 1 $\mu$ m, 10 $\mu$ m, 5 $\mu$ m, 50 $\mu$ m, 高さ 5 $\mu$ m のサイズの異なるグループ（溝状構造）、ピラー（柱状構造）、ホール（穴状構造）の3種類の形態を付与し、試料を製作した。得られたパターンの表面形状を評価するため、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。COP は疎水性であり、試料を親水化するため、卓上真空プラズマ装置を使用し、プラズマ処理を行った。各サンプル表面の接触角は、接触角計を用いて測定した。

製作した様々な形態とサイズを有するパターン上で、ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDLF) を 30 分培養し、DAPI 染色後、蛍光顕微鏡にて観察、撮影した。撮影した画像を用いて解析、各パターン上の接着細胞数を計測した。細胞の形態は、SEM にて観察した。また、hPDLF をパターン上にて 1 週間および 2 週間培養後、接着細胞数測定と同様の方法で増殖細胞数を計測した。産生コラーゲン量は、hPDLF をパターン上で 2 週間培養培養後、シリウスレッド溶液を用いてコラーゲンを染色し、マイクロプレートリーダーにて測定した。歯根膜細胞の細胞骨格と接着斑形成は、ビンキュリン、F-アクチン、核を検出するため、Alexa Fluor 488 ラベル Anti-Vinculin, Acti-stain 555 Phalloidin, DAPI 溶液を用いて染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

動物埋入試験は、10 週齢雄性ウイスター系ラットを実験動物として使用し、各種パターンを付与された COP フィルムを、比較的固定されやすい頭頂部皮下と動きが生じる背部皮下に埋入し、1 および 4 週間後に灌流固定後、超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察を行った。

ナノインプリント法にて製作した試料を SEM にて観察した結果、モールド上のパターンは COP フィルムへ正確に転写されることが示された。親水化処理により、いずれのパターンの接触角も減少した。親水化処理後の接着細胞数は、パターンサイズにより差異が認められ、いずれのパターンでも 1 $\mu\text{m}$  は、他のサイズならびにコントロールに対して有意に高い値を示した。SEM 観察では、ピラー 5 $\mu\text{m}$ 、1 $\mu\text{m}$  では、細胞がピラーおよびグループに沿

って隣接するパターンへ仮足を伸展させていた。ホールでは  $5\mu\text{m}$  ,  $1\mu\text{m}$  とともに、仮足がホール内に伸展しているのが観察された。2週培養後の増殖細胞数については、形状、サイズによる差は認められなかった。培養2週間後のコラーゲン量については、いずれのパターンにおいてもサイズが小さくなるに従い、コラーゲン量は増加し、 $1\mu\text{m}$  のサイズは、他のサイズに比較して有意に多かった。形状とサイズの異なる COP フィルムをラット皮下組織に埋入した結果、1週後では全てのパターン形状、サイズにおいて、パターン上部にマクロファージ様の細胞の集積が認められた。1週では、明確なコラーゲン線維はパターン上には認められなかったが、4週では  $5\mu\text{m}$  のグループでは、パターン間に太いコラーゲン線維束が観察された。

以上から、パターンの形状と大きさは、歯根膜線維芽細胞の接着と分化に影響を与えること、皮下組織の反応に影響を与えることが明らかとなった。