



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	リン酸化プルランを用いた新しいインプラント表面改質の検討
Author(s)	長本, 香菜子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15024号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15024
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94509
Type	doctoral thesis
File Information	Nagamoto_kanako.pdf



博 士 論 文

リン酸化プルランを用いた新しいインプラント
表面改質の検討

令和 4 年 3 月 申請

北海道大学
大学院歯学研究院口腔医学専攻

長本 香菜子

目次

1. 抄録	2
2. 緒言	3
3. 材料と方法	4
4. 結果	8
5. 考察	21
6. 結論	24
7. 謝辞	25
8. 参考文献	26

抄録

インプラント治療において良好なオッセオインテグレーションの獲得のため様々なインプラント表面性状の開発が進められてきたが、未だインプラント治療を断念しなければならない症例や埋入後オッセオインテグレーションが得られず脱落する症例が存在する。そこで、チタンと骨に対する接着性、高い生体親和性、早期に骨へ置換される性質があるリン酸化プルランに着目した。

本研究では、リン酸化プルランを用いた新しい表面処理法の開発に向けて、リン酸化プルランに対する骨関連細胞の応答を評価した。細胞には **Saos-2** (ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞), **MC3T3-E1** (マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞), **RAW264.7** (マウス由来マクロファージ細胞様細胞) を用いた。細胞応答の評価としてリン酸化プルランを培養液に添加し細胞増殖試験, 石灰化誘導試験を行った。また, リン酸化プルランを **Ti disk** に接着させその上面における細胞の増殖と石灰化物の形成を評価した。さらに **Ti disk** 上での石灰化誘導においては骨形成因子である **Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)** を用いリン酸化プルランの薬物担体としての評価も行った。

リン酸化プルランを接着した **Ti disk** 上面において骨芽細胞様細胞の増殖, および石灰化物形成を促進する傾向が示された。そして, リン酸化プルランに **BMP-2** を担持すると石灰化はさらに促進することが示唆された。また, リン酸化プルランは破骨細胞様細胞の形成を抑制した。これはリン酸化プルランがチタンに接着する性質と, 薬物担持機能に起因するためと考えられる。以上より, リン酸化プルランはチタン基材のインプラントにコーティングすることで骨再生を促進する効果があることが示唆され, インプラント表面性状の改善に有用であることが示された。

緒言

ブローネマルクが骨とチタンにおいてオッセオインテグレーションを報告¹⁾して以来、現在までに良好なオッセオインテグレーションを追い求め様々な改良がされてきた^{2,3)}。インプラントの表面処理もその一つである⁴⁾。表面処理には陽極酸化、酸エッチング、機械研磨、サンドブラストやハイドロキシアパタイトコーティングなどがあり⁵⁾、これらはすでに製品として臨床応用されている。しかし、未だ十分な骨接合が得られずインプラントが早期に脱落してしまう症例も少なくない。また、ハイドロキシアパタイトコーティングでは埋入後コーティングの剥離や、感染によりインプラント周囲炎が進行しやすいなど、それぞれ問題点を残している^{5,6)}。さらに、現在の技術では全身的风险ファクターでは糖尿病、骨粗鬆症、ステロイド服用、喫煙など、局所的风险ファクターでは歯周病、ブラキシズム、骨量不足などによりオッセオインテグレーションの獲得が困難でありインプラント治療を断念しなければならない症例も多数存在する^{7,8)}。そのため、これらのリスクファクターが存在する場合でも十分なオッセオインテグレーションを獲得でき、チタンと骨との高い接着性、高い生体親和性、コーティング材料としては早期に骨置換される性質を兼ね添えたインプラント表面性状の改良が求められている^{9,10)}。

プルランは生体安全性¹¹⁾や接着性に優れた特徴を持ち、食品や医薬品などさまざまな場面で用いられている。このプルランをリン酸化したリン酸化プルランは生体親和性に優れ、骨再生を促進する特性があるとされており、薬物担体としての役割を担うとされている¹²⁾。また動物に応用した報告もあり、インプラントにリン酸化プルランをコーティングしミニブタの頭蓋骨に埋入すると良好なオッセオインテグレーションが得られることや¹³⁾、リン酸化プルランをコーティングした Ti disk をウサギの脛骨に埋入した実験においても同様に骨形成が促進されることが報告されている¹⁴⁾。このように動物実験において、リン酸化プルランはオッセオインテグレーションに対し優れた結果を示しているがリン酸化プルランの骨関連細胞に与える影響を細胞実験において調査した報告は少ない。

本研究ではリン酸化プルランを用いた新しいインプラントの表面処理法の開発を目的に、リン酸化プルランを培養液に添加もしくは、チタン上に接着させ、細胞の増殖、分化誘導を評価した。また骨形成因子をリン酸化プルランに担持し、石灰化物の形成について評価した。

材料と方法

1. リン酸化プルランの作製

プルラン（株式会社林原，平均分子量 322,916）を水酸化ナトリウム水溶液に溶解させ，1 晩，20℃で攪拌した．0℃に冷却した後，塩化ホスホリルを添加し，0℃で 6 時間攪拌した．得られた溶液を透析し副生成物のリン酸ナトリウムと塩化ナトリウムを取り除いた．濃縮後，凍結乾燥しリン酸化プルラン（Bio ARC 株式会社，平均分子量 617,515）を合成した．（Fig.1）

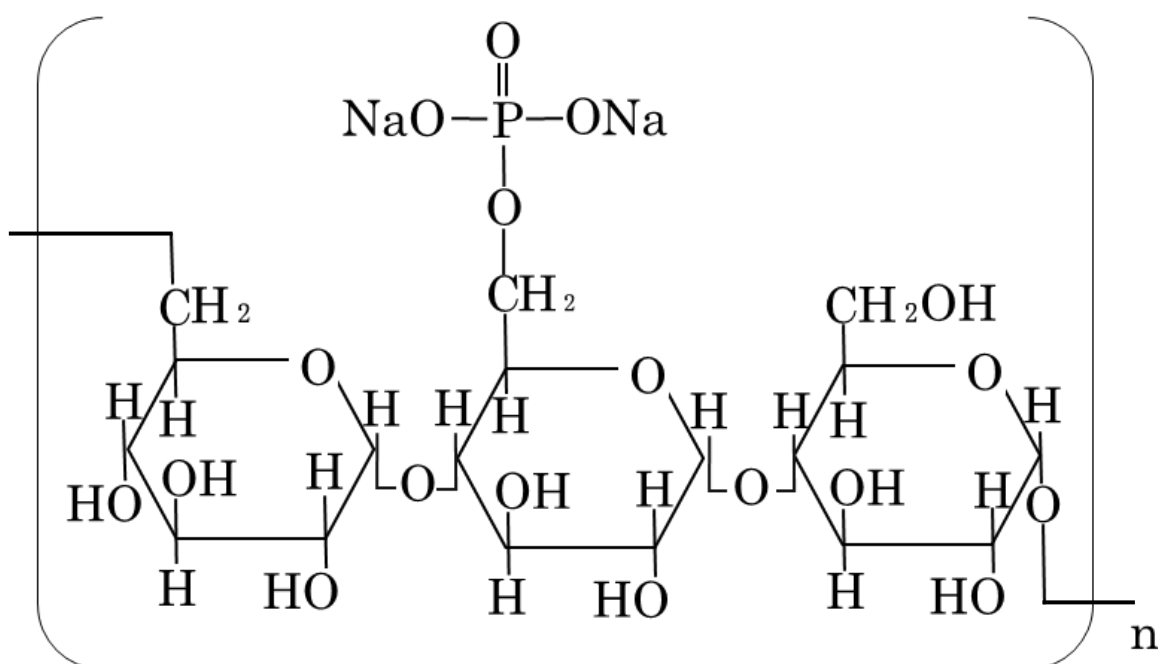


Fig.1 リン酸化プルラン構造図

α 1-4, α 1-6 でグリコシド結合したグルカンの 6 位の炭素にリン酸基が結合しプルランが生成された．

2. Ti disk 表面へのリン酸化プルラン処理

(1) Ti disk の観察

Ti disk（JIS 規格第 2 種純チタン，株式会社ジーシー）を 5 cm 四方#400 の耐水研磨紙を用いて 4 分間ランダムに研磨した．（以下，研磨は同様の方法を用いた．）

研磨後の Ti disk を走査型電子顕微鏡（S4800，日立製作所），形状測定レーザー顕微鏡（VK-X200，KEYENCE）にて観察した．

(2) Ti disk におけるリン酸化プルラン接着の確認

Ti disk を研磨し、99.5%アセトンに 1 時間浸漬後、99 %エタノールに 30 分間浸した。それを 3 回繰り返した。次に脱イオン水で 10 分間 3 回にわたり超音波洗浄した。MilliQ を溶媒にした 1%リン酸化プルランに 24 時間浸漬した後、脱イオン水で 10 分間超音波洗浄しそれを 3 回繰り返した。コントロールは MilliQ に 24 時間浸漬し同様に洗浄した。

Ti disk へのリン酸化プルランの接着を確認するため、軟 X 線を disk に照射し、被照射体の表面数 nm にある元素のイオン化に伴い放出される光電子のエネルギーを分析する X 線光電子分光法 (XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy)にて定性分析した。分析には XPS 装置 (Axis-Ultra, Kratos-Shimadzu) を用いた。

(3) リン酸化プルラン処理した Ti disk 表面における細胞の観察

研磨した Ti disk を 99.5%アセトン、99%エタノール、0.5%塩酸の順に浸けて各 10 分間超音波で洗浄した。その後、脱イオン水で 10 分間 2 回超音波洗浄した。滅菌はオートクレーブにて行った。MilliQ を溶媒にした 1%リン酸化プルランに 24 時間浸漬後、disk を脱イオン水で 3 回洗浄した。リン酸化プルラン処理した Ti disk を 24 well plate に静置した後、Saos-2 を 3.5×10^4 個/well の濃度で播種した。培地には 1%ペニシリン・ストレプトマイシン・アムホテリシン B を添加した 10%FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose (DMEM) (SIGMA-ALDRICH Co.) を用い 37°C, 5%CO₂ 気相下で 30 分培養した。

30 分後に洗浄し、disk 全体を 1%グルタルアルデヒドへと浸して細胞の固定を行った。次いで、アルコール系列(50, 60, 70, 80, 90, 95, 99.5 100%)を用いて脱水し、臨界点乾燥を行った。イオンスパッタ装置 (E1030, 日立製作所) を用いて、Pt-Pd による導電化前処理を行った。試料は走査型電子顕微鏡 (S4800) にて加圧電圧 10 kV で観察した。

3. 細胞増殖試験

(1) リン酸化プルランを培養液へと添加した場合

細胞は MC3T3-E1 (マウス由来骨芽細胞様細胞) を用い、10%FBS 含有 MEM- α (Wako) に、1%ペニシリン・ストレプトマイシン・アムホテリシン B を添加した培地を用いた。MC3T3-E1 を 1×10^3 個/well の濃度で 96 well plate に播種し、37°C, 5%CO₂ 気相下にて 1 日培養した。その後、培養液を吸引し、0.01%, 0.1%, 0.5%, 1%, 3%の濃度でリン酸化プルランを添加した培地へと交換して、2 日培養した。なお、リン酸化プルランを添加していない条件をコントロールとした。WST8 (Cell Counting Kit-8) 溶液を各 well へ 10 μ L 加え培養後、マイクロプレートリーダー (Spectra Max Paradigm, Thermo Fisher

Scientific) を用いて 450 nm での吸光度を測定し、細胞数を間接的に評価した。

(2) リン酸化プルラン処理した Ti disk を用いた場合

研磨した Ti disk を 99.5%アセトンに 1 時間浸漬後、99%エタノールに 30 分間浸した。それを 3 回繰り返した。次に脱イオン水で 10 分間 3 回にわたり超音波洗浄した。MilliQ を溶媒にした 1%リン酸化プルランに 24 時間浸漬した。脱イオン水で 10 分間超音波洗浄しそれを 3 回繰り返した。コントロールは MilliQ に 24 時間浸漬し同様に洗浄した。その後、Ti disk をオートクレーブで滅菌した。得られたリン酸化プルラン処理した Ti disk とコントロール Ti disk を 24 well plate に静置し、MC3T3-E1 を 1×10^4 個/well の濃度で播種した。項目 3 (1) と同様の条件下で 2 日間培養した。細胞数を評価するため、Ti disk に直接当たらないように PBS で 1 回洗浄した後、新しい培地を満たした別の plate に Ti disk を移した。その際に各 well へ WST8 (Cell Counting Kit-8) 溶液を 50 μ L 添加し培養した。その後、培養液をマイクロプレートリーダー (Spectra Max Paradigm) を用いて 450 nm での吸光度を測定し細胞数を評価した。2 条件間における統計処理は Student's t-test を用い、統計的有意差を $P < 0.05$ とした。以下、同様の検定を用いた。

4. リン酸化プルランが石灰化誘導に与える影響の検討

(1) リン酸化プルランを培養液へと添加した場合

Saos-2 を 2.3×10^4 個/well の濃度で 24 well plate に播種し、項目 2 (3) と同様の条件下で 5 日間培養した。その後、培養液を次のように 3 条件にして 1 週間培養した。条件として、石灰化誘導培地、リン酸化プルラン濃度が 1%になるように混合した石灰化誘導培地、およびコントロールとして、DMEM 培地を用いて培養を行った。石灰化誘導培地にはサプリメントを添加した DMEM 培地を用いた。サプリメントは終濃度が 10 nM dexamethasone, 50 μ g/mL ascorbic acid, 5 mM β -glycerophosphate になるように培地へ添加した。培養は 37°C, 5%CO₂ 気相下で行った。3 日もしくは 4 日で培地交換とした。培養後、各 well を PBS にて洗浄した。細胞をメタノールで固定し、再度洗浄した。その後、アリザリンレッド溶液で染色し、最後に脱イオン水で数回洗浄した。

(2) リン酸化プルラン処理した Ti disk を用いた場合

研磨した Ti disk を項目 2 (3) と同様の方法で処理した。なおコントロール Ti disk においては 1%リン酸化プルランの代わりに MilliQ へ 24 時間浸漬し同様に洗浄した。リン酸化プルラン処理した Ti disk とコントロール Ti disk を 24 well plate に静置し、Saos-2 を 6.48×10^4 個/well の濃度で播種した。3 日間、項目 2 (3) と同様の条件下で培養した。石灰化誘導培地を 0.5 mL/well 満たし

た新しい plate へと Ti disk を移し、項目 4 (1) と同様の方法で 2 週間石灰化誘導し、洗浄、固定、染色を行った。

5. リン酸化プルラン処理による BMP-2 担持効果の検討

研磨した Ti disk を項目 2 (3) の方法で滅菌まで行った。Ti disk を 0.2 µg/mL BMP-2 + 1% リン酸化プルランの溶液、0.2 µg/mL BMP-2 の溶液、および MilliQ (コントロール) に 1 日浸漬した。その後、各 disk を 3 回洗浄し、新しい plate へ移した。Saos-2 を 1×10^5 個/well 播種し、項目 2 (3) と同様の条件で 3 日間培養した。新しい plate へ disk を移動し、石灰化誘導培地へ交換した。石灰化誘導培地に添加するサプリメントの濃度を 10 mM β -glycerophosphate に調整した後 (その他のサプリメント dexamethasone, ascorbic acid の濃度は変えず) 項目 4 (1) と同様の方法で、4 日間培養し石灰化誘導を行い、洗浄、細胞の固定、染色を行った。

6. リン酸化プルラン添加による破骨細胞様細胞の形成に対する影響

RAW264.7 (マウス由来マクロファージ細胞様細胞) を使用した。RAW264.7 細胞を 5,000 個/cm² の密度で 24 well plate に播種し数日間増殖を行った。培地は 1% ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B を添加した 10% FBS 含有 MEM- α (Wako) を使用した。37°C, 5% CO₂ 気相下にて培養した。RANKL (sRANKL, Oriental Yeast Co.) 50 ng/mL とリン酸化プルランを 0 %, 0.1 %, 1 %, 3 % の割合で混合した培地へと、各々交換し、37°C, 5% CO₂ 気相下で 6 日間培養した。培地交換は 2 日ごとに実施した。培養後、PBS で洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (富士フィルム和光純薬株式会社) で固定、蒸留水で洗浄した後、TRAP 染色キット (コスモバイオ株式会社) を用いて破骨細胞様細胞を染色した。三核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞様細胞とし、観察と計測を行った。計測は 20 視野でランダムに破骨細胞様細胞をカウントした。

結果

1. Ti disk へのリン酸化プルラン処理

(1) Ti disk の観察

走査型電子顕微鏡 (SEM)

5 cm 四方の #400 耐水研磨紙にてランダムな方向に研磨した Ti disk の表面を SEM で観察したところ、大きなキズが目立つことなく、全面が均一に研磨されていた。(Fig. 2)

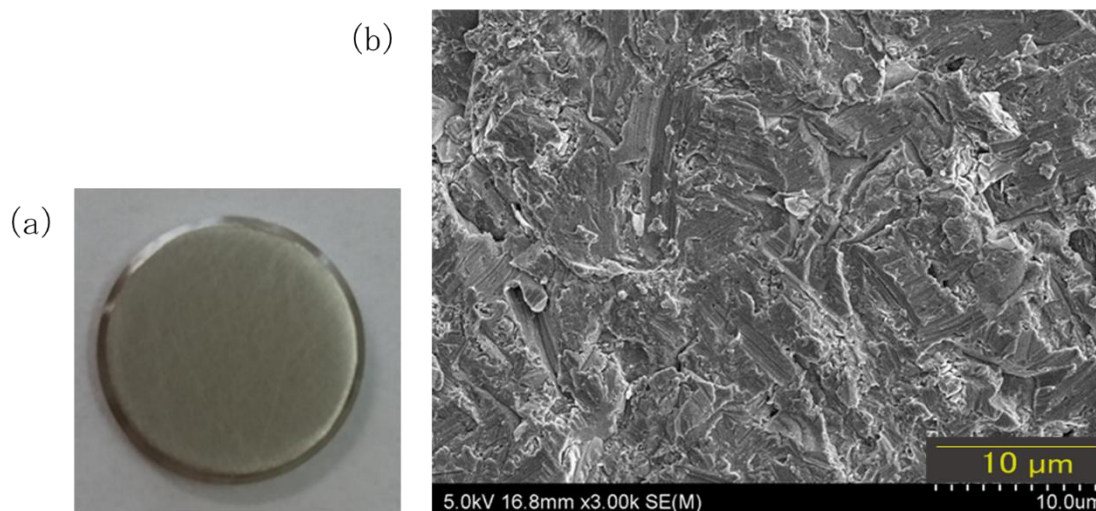


Fig.2 研磨後の Ti disk 表面の観察

(a) #400 耐水研磨紙で研磨した Ti disk の画像

(b) #400 まで研磨した Ti disk 表面の SEM 像

形状測定レーザー顕微鏡

次いで、鏡面研磨した平滑な上面の disk と #400 耐水研磨紙で研磨した disk を、レーザー顕微鏡を用いて比較した。(鏡面研磨した平滑な上面の disk は #400, #800, #1200, #2000, #4000, Diamond paste の順に徐々に耐水研磨紙の粒度を上げて研磨した。なお、粒度を上げるごとに Ti disk を超音波洗浄し、粗い砥粒が残らないように留意した。) 表面粗さは鏡面研磨した disk では $0.30 \pm 0.14 \mu\text{m}$ であり、#400 耐水研磨紙で研磨した disk は $0.47 \pm 0.04 \mu\text{m}$ となった。3D 画像からは、鏡面研磨した disk の上面はほとんど凹凸なく青い色(高さ $2 \mu\text{m}$ 以下)を示した一方で、#400 耐水研磨紙で研磨した disk は高低差 ($7.4 \mu\text{m}$) があることが示された。(Fig. 3)

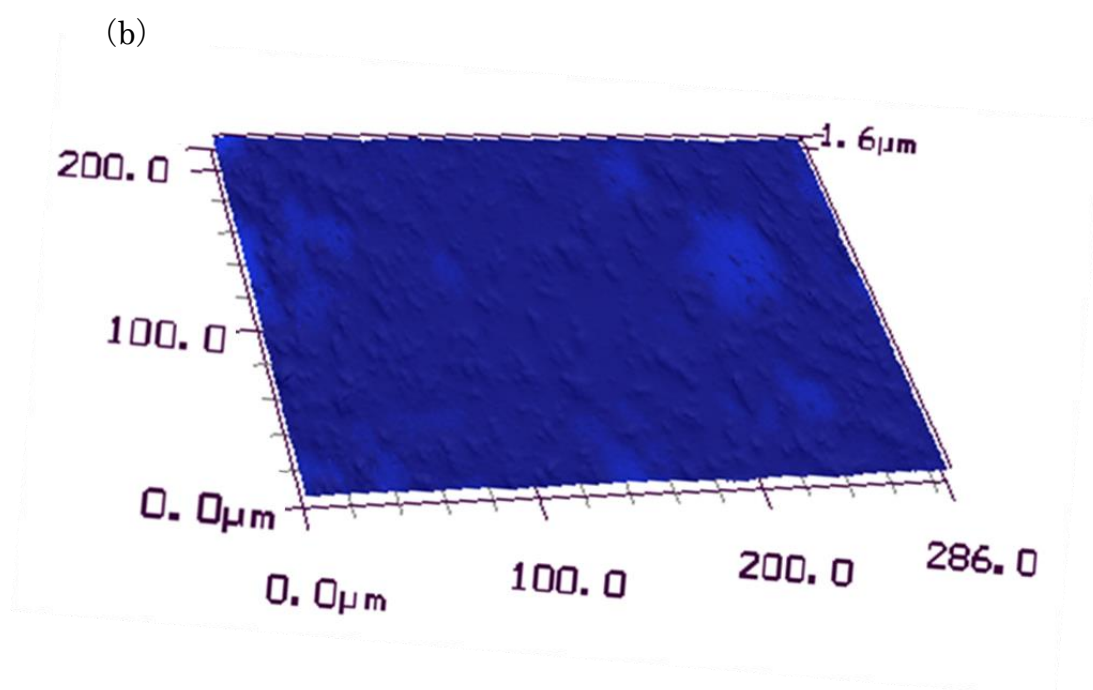
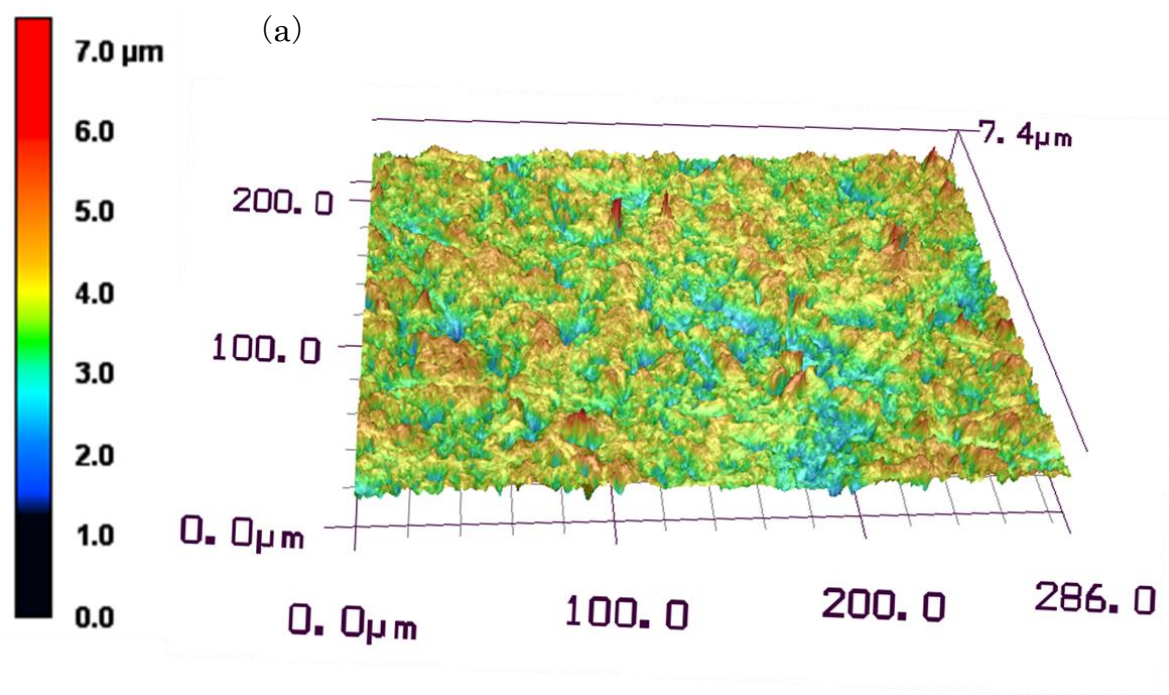


Fig.3 研磨後の Ti disk 表面のレーザー顕微鏡観察結果

(ヒートマップは高さを 5 倍にして視覚化したグラフを表示.)

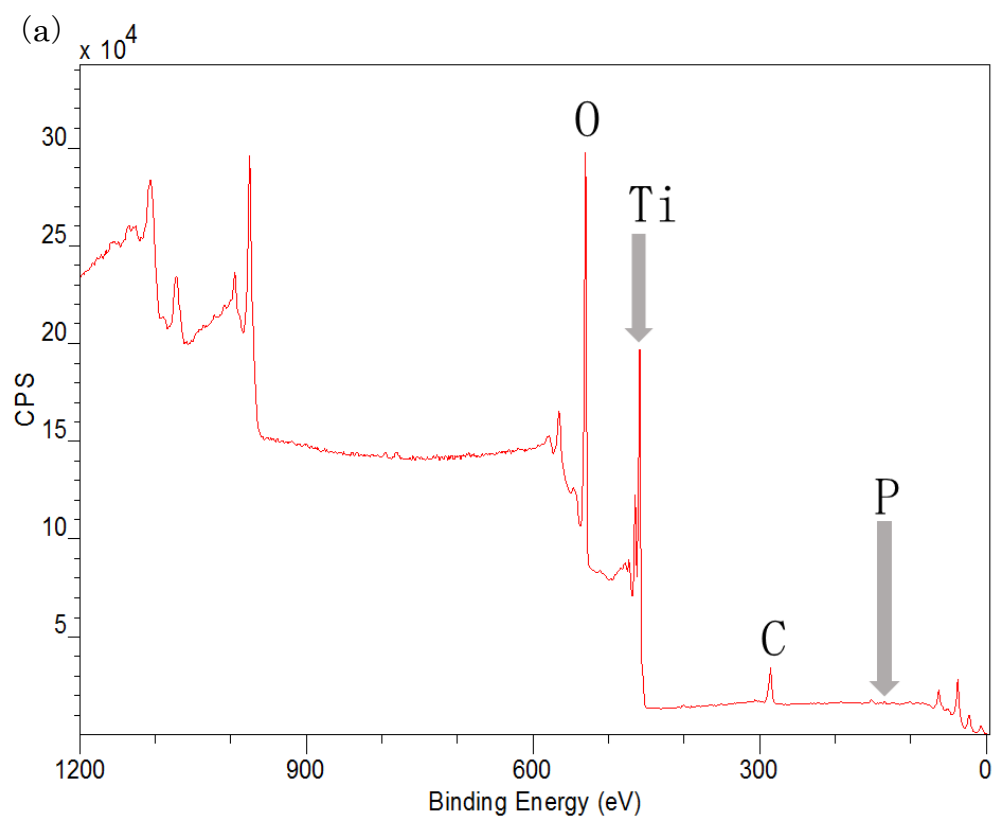
(a) #400 耐水研磨紙で研磨した Ti disk. R_a は $0.47 \pm 0.04 \mu\text{m}$ を示した.

(b) 鏡面に近い状態まで研磨した Ti disk. R_a は $0.30 \pm 0.14 \mu\text{m}$ を示した.

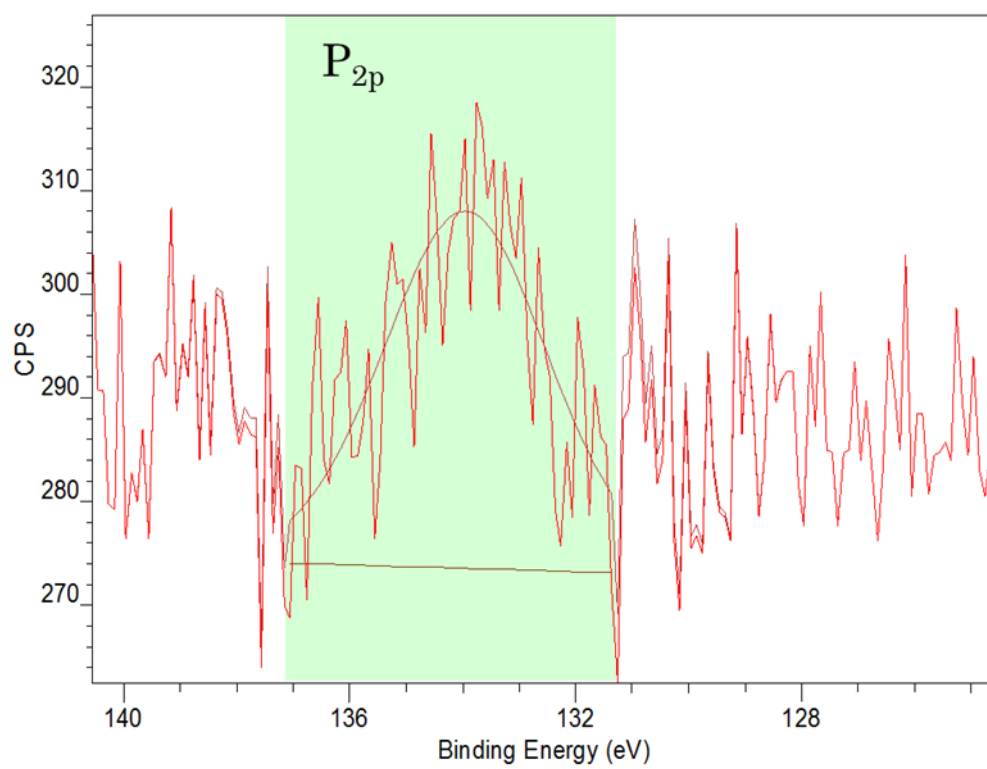
(2) Ti disk におけるリン酸化プルラン接着の確認

X線光電子分光法 (XPS)

リン酸化プルラン処理した Ti disk の表面を XPS を用いて分析したところ、134 eV 付近にピークが確認された。これはリン元素(P_{2p})由来の信号であり、この結果から、Ti disk 表面におけるリン酸化プルラン由来のリン酸基の存在が確認された。よって Ti disk 表面にはリン酸化プルランが接着していることが示された。(Fig.4)



(b)



(c)

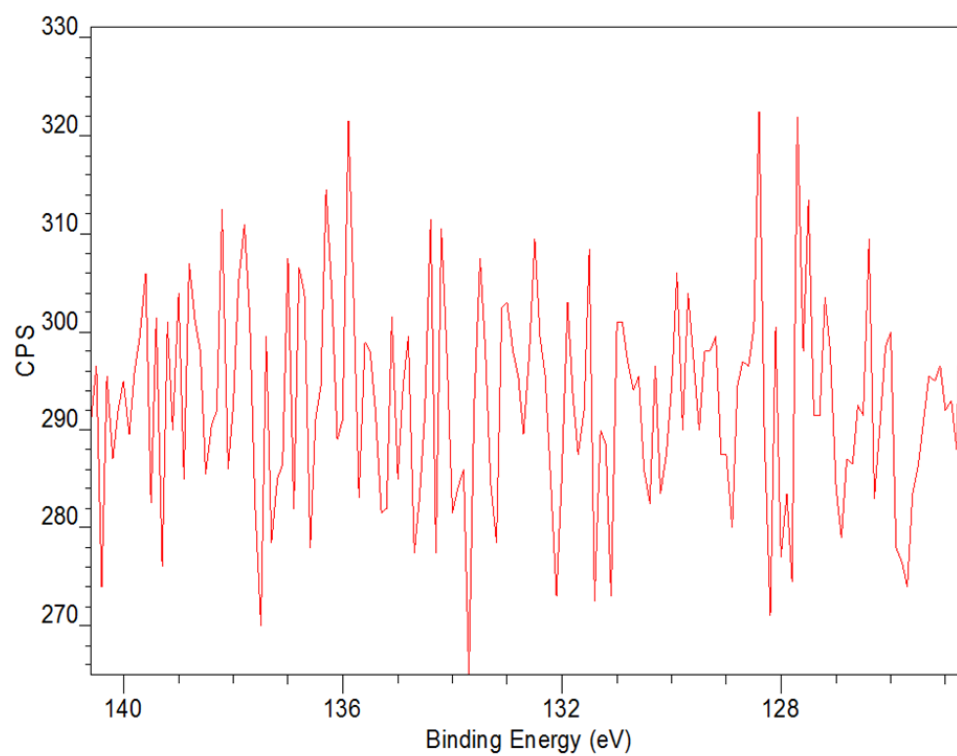


Fig.4 Ti disk 表面の XPS 測定

(a) , (b) はリン酸化プルラン処理した Ti disk.

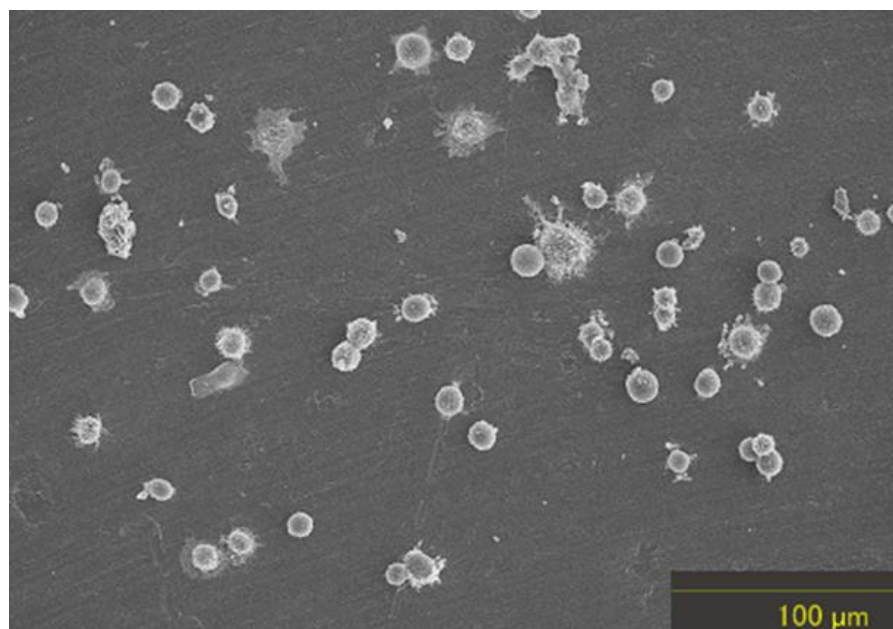
(c) はコントロール Ti disk を示す.

(3) リン酸化プルラン処理した Ti disk 表面における細胞の観察

リン酸化プルラン処理をした Ti disk 上で 30 分間培養した Saos-2 を SEM にて観察したところ、(a) では細胞が Ti disk 表面で伸展し、付着する様子がみられた。(b) の強拡大した画像では細胞体の移動に働く葉状仮足と、周辺の環境を探索するための糸状仮足¹⁴⁾が細胞から延びていることが確認された。

(Fig.5)

(a)



(b)

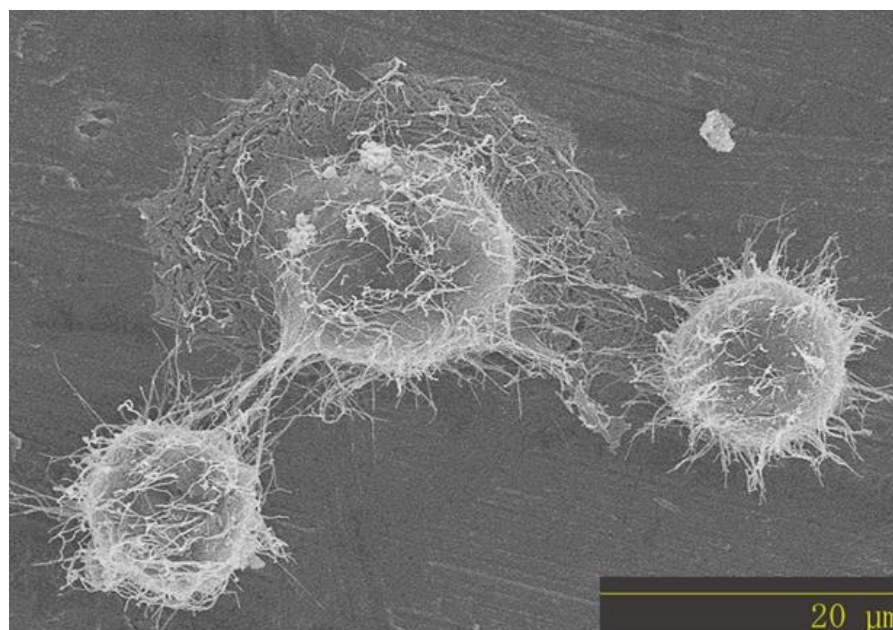


Fig.5 リン酸化プルラン処理した Ti disk に付着する Saos-2 を示す SEM 像

(a) 弱拡大図 (倍率×300), スケールバーは 100 μm

(b) 強拡大図 (倍率×2,000), スケールバーは 20 μm

2. 細胞増殖試験

(1) 培養液にリン酸化プルランを添加した場合

リン酸化プルランを培養液に直接添加すると、コントロールと比較して0.5%, 1%, 3%リン酸化プルラン溶解培地において有意に増殖が抑制されることが示唆された. (Fig.6)

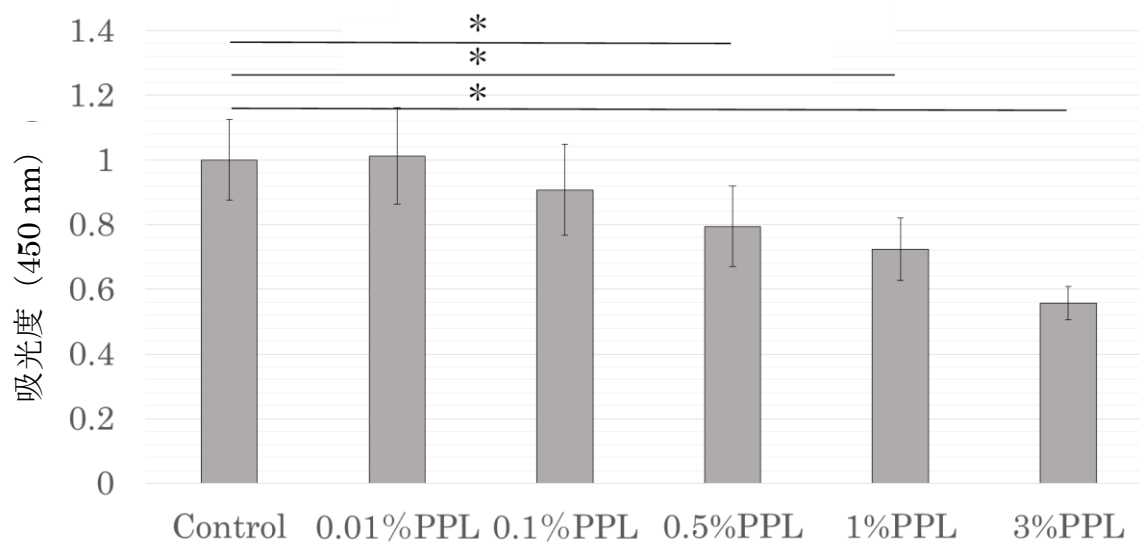


Fig.6 リン酸化プルランを添加した培地を用いた細胞増殖試験
(細胞数を評価, 細胞: MC3T3-E1)

有意差検定 * $P < 0.05$

Control はリン酸化プルラン未添加の条件を示す.
PPL はリン酸化プルランを添加した条件を示す.

(2) リン酸化プルラン処理した Ti disk を用いた場合

1 日目ではそれぞれ細胞数に変化は認められなかったが、2 日目において未処理の Ti disk と比較して、リン酸化プルラン処理した Ti disk において細胞数の増加傾向がみられた。(Fig.7)

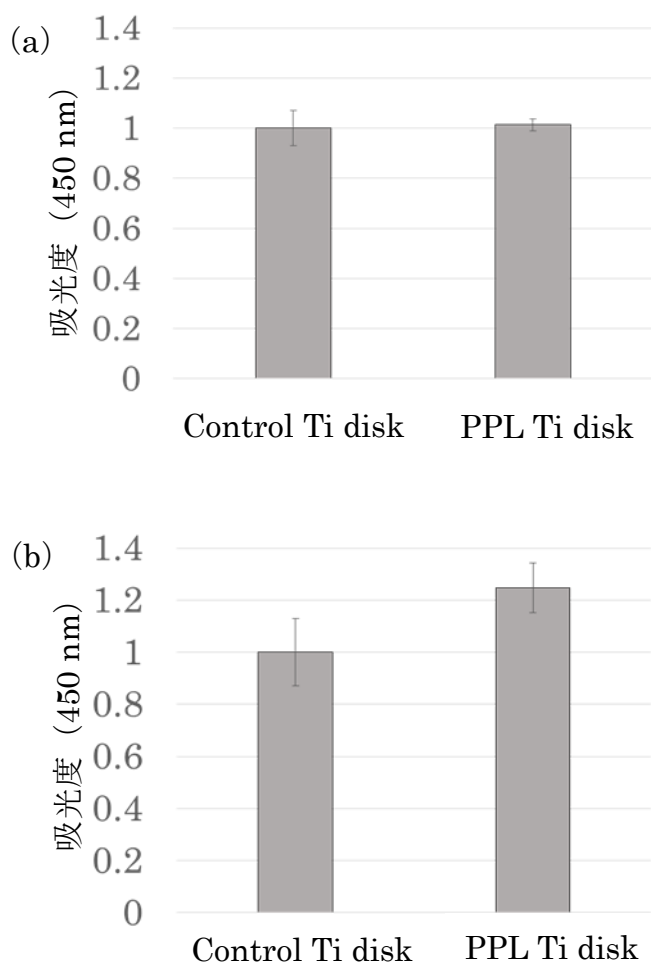


Fig.7 Ti disk 表面での細胞増殖試験
(細胞数を評価, 細胞 : MC3T3-E1)

(a) 増殖試験 1 日目 (b) 増殖試験 2 日目

3. 骨芽細胞様細胞の石灰化誘導に対する影響

(1) 培養液にリン酸化プルランを添加した場合

石灰化誘導培地にて培養した群では石灰化形成物が認められた. DMEM 培地群, 1%リン酸化プルラン混合の石灰化誘導培地群では石灰化物の沈着がみられなかった. (Fig.8)

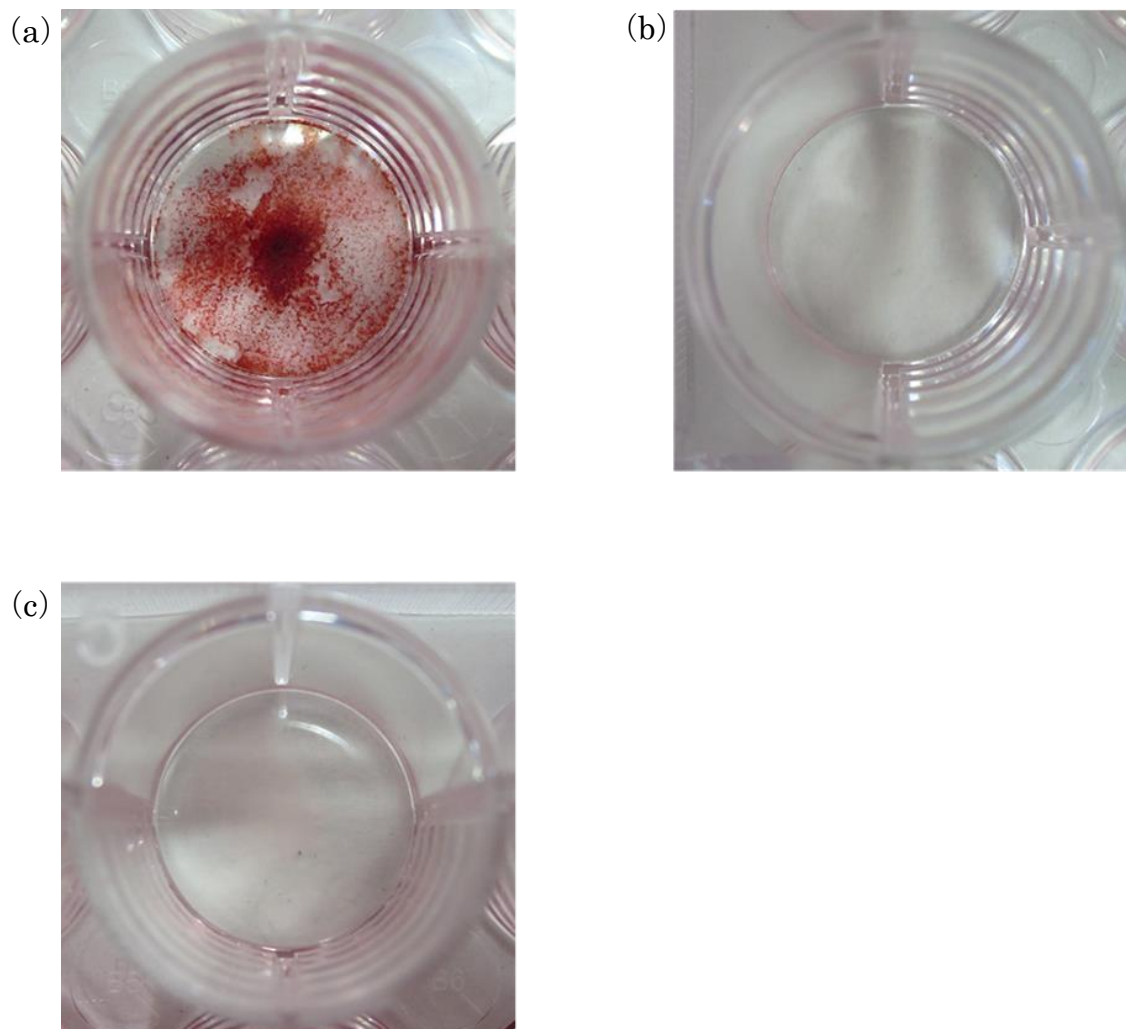


Fig.8 リン酸化プルランを添加した培地を用いた石灰化誘導の様子
(細胞 : Saos-2)

(a) 石灰化誘導培地

(b) 1%リン酸化プルランを添加した石灰化誘導培地

(c) DMEM 培地

(2) リン酸化プルラン処理した Ti disk を用いた場合

未処理の Ti disk と比較して,リン酸化プルラン処理した Ti disk 表面では, disk 全面に広がる, 密な石灰化物の沈着が認められ, 石灰化の促進が示唆された. (Fig.9)

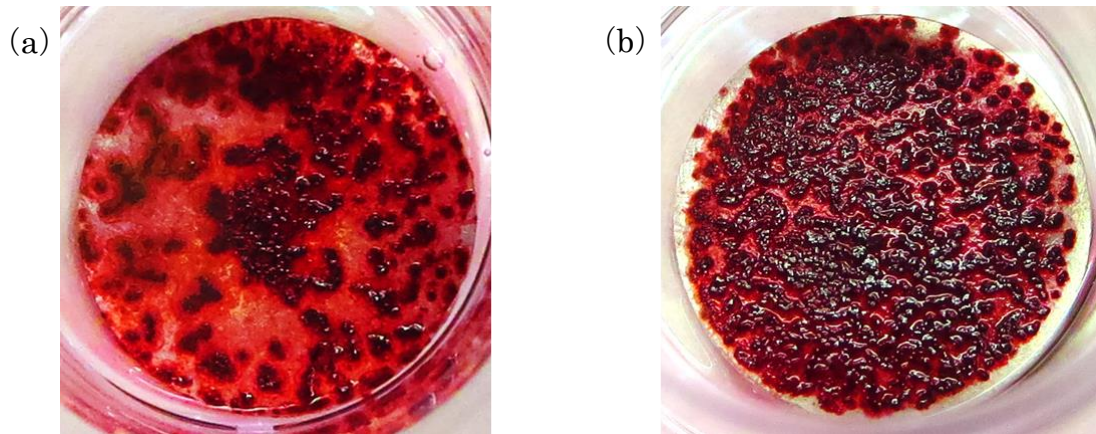


Fig.9 リン酸化プルラン処理した Ti disk 表面での石灰化誘導試験

(細胞 : Saos-2)

(a) 未処理 Ti disk (コントロール) (b) 1%リン酸化プルラン処理した Ti disk

4. リン酸化プルランの骨形成因子担持機能

未処理 Ti disk (MilliQ へと浸漬, コントロール) や $0.2\ \mu\text{g/mL}$ BMP-2 溶液に浸漬した Ti disk と比較して, $0.2\ \mu\text{g/mL}$ BMP-2 添加 1%リン酸化プルラン溶液に浸漬した Ti disk 表面では, 石灰化物の形成が増加し, 広がりのある沈着がみられた. (Fig.10)

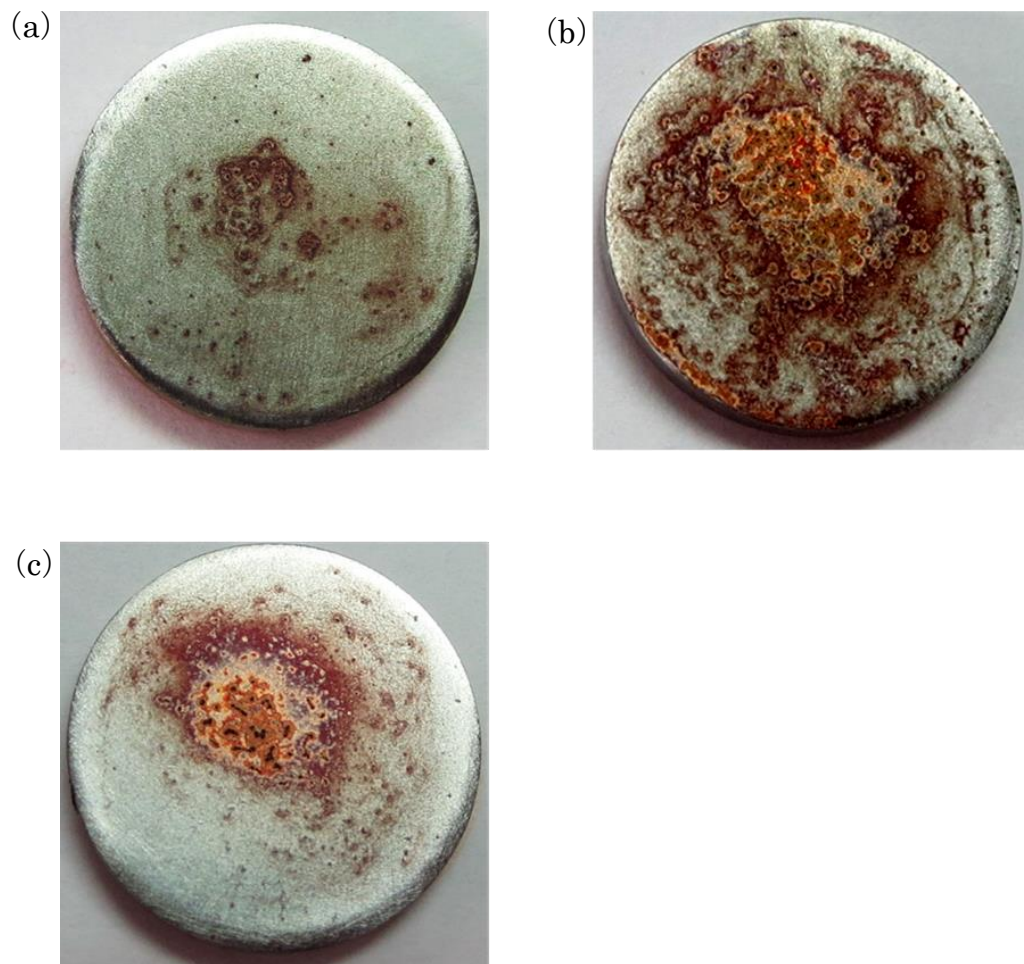


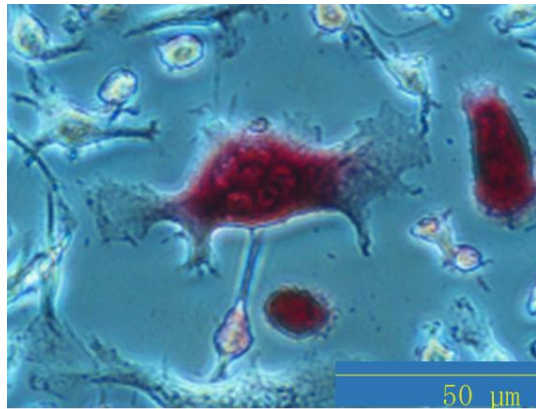
Fig.10 リン酸化プルラン処理した Ti disk 表面における BMP-2 担持効果
(細胞 : Saos-2)

- (a) 未処理 Ti disk (MilliQ へと浸漬, コントロール)
- (b) $0.2\ \text{mg/mL}$ BMP-2 + 1%リン酸化プルラン溶液に浸漬した Ti disk
- (c) $0.2\ \text{mg/mL}$ BMP-2 溶液に浸漬した Ti disk

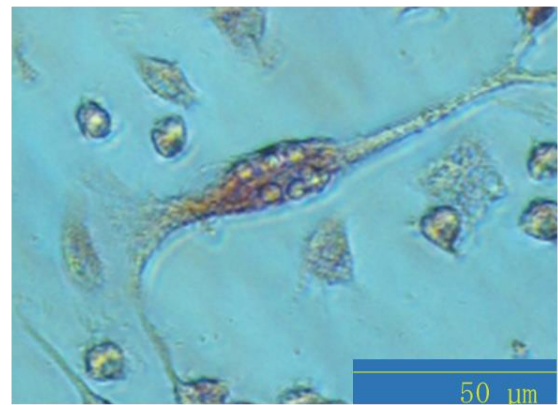
5. 破骨細胞様細胞の形成に対する影響

光学顕微鏡で観察したところ、コントロール（リン酸化プルラン未添加）群では三核以上の **TRAP** 陽性細胞が多数観察され、多核巨細胞は大きく丸い形態をしていた。リン酸化プルランを培養液に添加する濃度が高くなるにつれて、多核巨細胞は、核の数が減少し、細く小さな形態を示した。

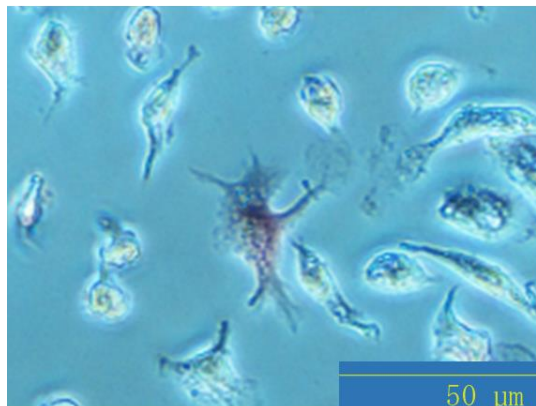
破骨細胞様細胞数は、0.1 %，1%，3%のリン酸化プルランを含む培地において、コントロール群と比較して、濃度依存的に有意に減少した。（Fig.11）



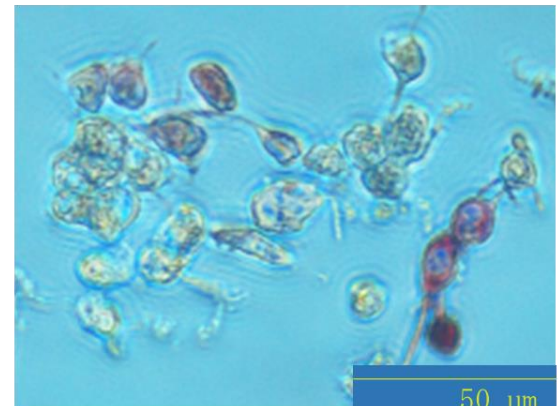
0%PPL



0.01%PPL



1%PPL



3%PPL

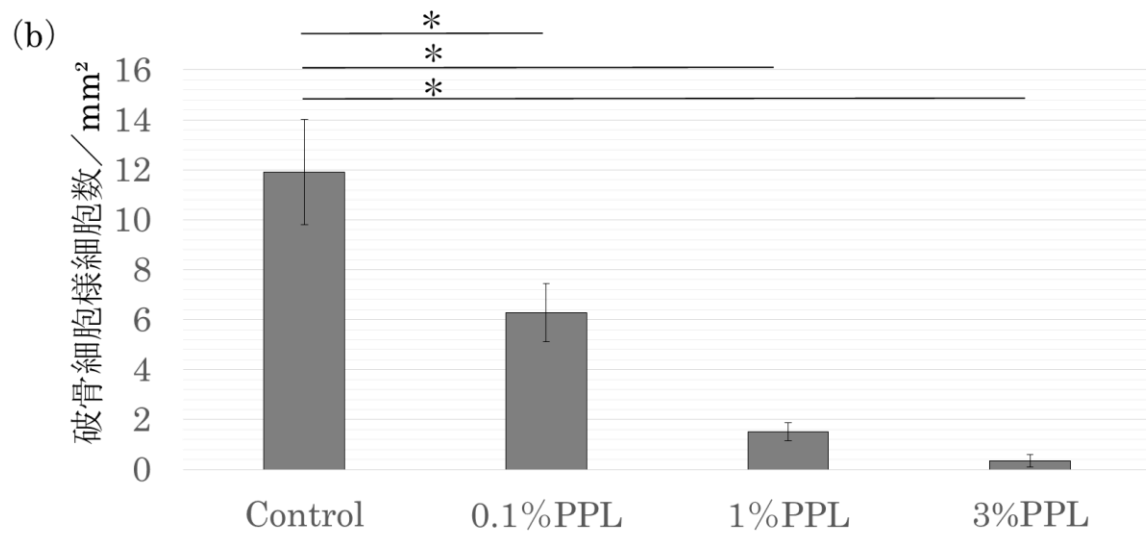


Fig.11 リン酸化プルラン添加による破骨細胞様細胞の形成に対する影響
(細胞 : RAW264.7)

(a) 光学顕微鏡による観察 (培養液中のリン酸化プルランの割合を表記した.)

(b) 破骨細胞様細胞の計測

有意差検定 * $P < 0.05$

考察

Ti disk 表面で細胞培養を行うにあたり、Ti disk 表面の粗さは細胞の動態に影響を与えるため、まず表面性状を検討する必要がある。表面粗さが大きいほうが高い接着率を示す傾向がある^{16,17)}。細胞増殖と細胞分化においては表面粗さが大きいと効果的であるという報告がある一方で、細胞伸展の妨げとなるという報告もある^{18,19)}。#400 耐水研磨紙の使用は、細胞の接着と増殖・分化において、どちらにも大きな影響をもたらさない、中間的な粗さとして選択した。また、チタンは研磨が難しい金属であることも報告されている²⁰⁾。そこで Ti disk の研磨方法に disk を SEM で観察した際に disk 表面に大きなキズがなく、全面が均一に研磨可能な方法を用いた。

さらに、一度チタン表面へと接着したリン酸化プルランは、超音波による物理的な強い洗浄力が働いても剥がれることなく強固に接着していることが、XPS 測定の結果 (Fig.4) から示唆された。リン元素若しくはリン酸基の存在を検出する方法としては、XPS の他にも、FT-IR 測定、³¹P NMR 測定、リン-モリブデン法などが挙げられるが、いずれも最表面の検出感度が弱いため、Ti 表面に吸着したリン酸化プルランの分析には、XPS は非常に有効な手段である。チタンは大気中において酸素と結合し容易に酸化チタンに変化し、不動態被膜を形成する性質がある²¹⁾。このため耐食性が非常に高く、インプラント材料として優れているといえる。酸化チタンの零電荷点は 6.7 であり²²⁾、さらにリン酸化プルラン水溶液では表面が正に帯電していることが予測される。そのため、リン酸化プルランが持つリン酸基との静電気的な結合が起こったと考えられる。酸化チタン水和物とリン酸イオンが吸着する報告があり、pH が大きく影響することを明らかにしている²³⁾。pH やその他の条件の詳細な検討を行うことにより、Ti disk 表面へと接着するリン酸化プルランの被膜をより厚くすることができる可能性がある。またリン酸基は同様に pH に影響して酸化チタンと共有結合する報告もあり²⁴⁾、リン酸化プルランがチタン表面に静電気的な結合に加えさらに共有結合のような結合力のある接着をしている可能性が考えられる。酸化チタンとリン酸基の接着機構については今後さらなる解析をする必要がある。

細胞増殖試験において培養液にリン酸化プルランを添加した場合、細胞増殖がわずかに減少した。一方、リン酸化プルランをあらかじめ Ti disk 表面に接着した場合は、コントロールと比較し細胞数の増加がみられた。これは、リン酸化プルランによる分子やイオンの吸着に起因すると考えられる。Ti disk 表面に接着したリン酸化プルランは、この特性により培養液中における細胞に作用する分子である炭水化物、脂質、アミノ酸、ビタミン²⁵⁾や様々な因子を化学的もしくは物理的に吸着させた後、Ti disk 表面に付着した細胞へと継続的に高濃度で

供給したことにより、細胞増殖が促進されたと考えられる。一方で、リン酸化プルランを培養液に直接添加した場合は、上述した培養液中における細胞に作用する分子が培養液中に浮遊するリン酸化プルランへと吸着されるため、培養皿底面に付着した細胞への供給量が低減したと推察される。その結果、リン酸化プルランの濃度上昇に伴い、細胞の増殖が徐々に減少したと考えられる。

石灰化誘導試験や破骨細胞様細胞の形成に関しても、同様の機序が推察される。培養液に浮遊しているリン酸化プルランにより石灰化に必要な **Dexamethasone, Ascorbic acid, β -glycerophosphate** や破骨細胞様細胞の形成に必要な **RANKL** が吸着されたため、培養皿の底面に付着した細胞まで届かず、細胞に十分な誘導が起こらなかった。その結果、石灰化物形成の抑制や破骨細胞様細胞数の減少が起きたと考えられる。一方、リン酸化プルラン処理した **Ti disk** の場合、リン酸化プルランによって吸着された **Dexamethasone, Ascorbic acid, β -glycerophosphate** が **Ti disk** 表面に付着した細胞へと継続的に高濃度で供給されたことにより、石灰化が促進したと考えられる。リン酸化プルランにアリザリンレッドが吸着されたため、リン酸化プルラン処理した **Ti disk** が染色されたことも考えられるが、アリザリンレッドの構造は 3 個のベンゼン環に官能基のヒドロキシル基が 2 個結合する構造をしているため、ヒドロキシル基が水溶液中では負に帯電すると考えられる。リン酸化プルランと同じ電荷となり反発するためアリザリンとリン酸化プルランが吸着する可能性は低いと推測される。

以上よりリン酸化プルランを、**Ti disk** などの作用させたい部位へと選択的に接着させることにより、リン酸化プルランが培養液中における細胞に作用する分子や石灰化に必要な物質などを吸着し引き寄せることで、これらを細胞へと直接的かつ継続的に作用させると期待される。

さらにインプラント表面性状の改変は、骨再生の 3 つの要素である足場、細胞、成長因子のうち、足場へのアプローチ²⁶⁾と言えるが、もう一つの要素である成長因子へのアプローチもインプラント治療を成功させる良好な改善策になると考えられる。骨の成長因子の 1 つとして **BMP-2** がある。しかし **BMP-2** 単独では **Ti disk** 表面に維持されにくいため、それを生体に応用する場合、生分解性・徐放性・易成形性を持つ担体が必要である²⁷⁾。そこで着目したのが、リン酸化プルランのリン酸基は水溶液中で負に帯電するため、陽イオンと容易に化学結合することが予想される点である。この性質を利用して、骨の石灰化を促進する骨形成因子である **BMP-2** を担持させることを検討した。**BMP-2** の等電点はおおよそ 9 であり²⁸⁾ 中性溶液中では正電荷を持つため、リン酸化プルランへの担持が可能となる。実際、**Ti disk** 上に接着したリン酸化プルランを **BMP-2** 溶液に浸漬後、**Saos-2** の石灰化誘導を行うと、リン酸化プルランを接着した **Ti disk** と比較し石灰化は促進された。

BMP-2 と結合したリン酸化プルランがチタンに接着することで disk 表面に付着する Saos-2 に BMP-2 と Dexamethasone , Ascorbic acid, β -glycerophosphate を高濃度で直接的かつ継続的に提供し石灰化誘導を促進させたため, Ti disk 上の石灰化物形成が促進したと推測される. この結果より BMP-2 が機能を失うことなく PPL に担持された可能性が考えられた. しかし BMP-2 は過剰量になると石灰化に悪影響を及ぼすことが報告されている^{29,30)}ため使用量には注意を要する.

既存のハイドロキシアパタイトコーティングは, 剥離した際にハイドロキシアパタイトが組織内で吸収しないため, 長期残存し感染源になりやすいという問題がある. それに対し, リン酸化プルラン処理は, チタンと化学的に結合しているため, ハイドロキシアパタイトコーティングと比較し, 高い接着性が期待でき, 剥離したとしてもリン酸化プルランは速やかに吸収されるため, 感染源にならないという利点がある. 感染はインプラント治療にとって大敵であり, リン酸化プルラン処理は有用な処理法と考えられる.

結論

リン酸化プルランの生体親和性、骨再生を促進する特性をもつ点において、オッセオインテグレーションに関わる細胞への影響と、細胞培養におけるリン酸化プルランの薬物担体としての機能について検討した。

そこでリン酸化プルランは **Ti disk** に接着することで **disk** 上の骨芽細胞様細胞が増殖し石灰化誘導を促進することが示された。またリン酸化プルランによる **BMP-2** を用いた薬物担体機能は **Ti disk** 上において石灰化誘導を促進することが示された。培養液へリン酸化プルランを添加すると、破骨細胞様細胞の形成に影響を与えることが示唆された。

よって、リン酸化プルランは適応条件により、骨関連細胞の増殖と分化に影響を与えることが明らかになった。そのためリン酸化プルランをチタン基材のインプラントにコーティングすることでオッセオインテグレーション向上に寄与できる可能性があり、インプラントにおける表面処理法の開発に有用である。

謝辞

本研究を終えるにあたり数々のご支援をいただきました北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学講座口腔診断内科学教室 北川善政教授，ならびに健康科学講座生体材料学教室 吉田靖弘教授，赤坂司准教授，中西康助教，ならびに健康科学講座口腔分子生化学教室 田村正人教授，ならびに長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科生体材料学分野 阿部薫明准教授，ならびに岩手医科大学大学院 歯学研究科医療工学講座 武本真治教授に厚く御礼申し上げます．

参考文献

- 1) M. S Block. Dental Implants: The Last 100 Years. Oral and Maxillofacial Surgery, 6, 11-26, 2018.
- 2) D. D Bosshardt, V. Chappuis, D. Buser, Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. Periodontology 2000,73: 22-40,2017
- 3) 宮本 洋二, 藤澤 健司, 武知 正晃, 桃田 幸弘, 長山 勝, 山内 英嗣, 坂東 永一, 日野出 大輔: 歯科インプラントのオッセオインテグレーション獲得に關与する臨床的要因の検討. 日本口腔インプラント学会誌,15(4):34-43,2002
- 4) R. Smeets, B. Stadlinger, F. Schwarz, B. Beck-Broichsitter, O. Jung, C. Precht, F. Kloss, A. Gröbe, M. Heiland, T. Ebker : Impact of Dental Implant Surface Modificationson Osseointegration. BioMed Research International, 6285620, 2016.
- 5) 鮎川 保則, 熱田 生, 鶴田 勝大, 松下 恭之, 古谷野 潔: 口腔インプラントの表面改質の現在と未来. Journal of the Surface Finishing Society of Japan ,67(6) : 297-301, 2016.
- 6) 懸田 明弘, 山下 忍, 原田 順男, 金内 洋光, 青木 秀希: 表面構造分析によるハイドロキシアパタイトコーティングインプラントの実験的研究. 日本口腔インプラント学会誌, 20 (4) : 592-601, 2007
- 7) 赤川 安正, 松浦 正朗, 矢谷 博文, 渡邊 文彦: よくわかる口腔インプラント, 10-11, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2011
- 8) 松永 興昌, 山本 勝己, 吉松 繁人: インプラント修復の臨床基本手技 1 診査・診断, 26-33, 50-57, デンタルダイヤモンド社, 東京, 2013
- 9) 藤野 茂, 古屋 延明, 渡辺 浩, 松嶋 弘希, 杉山 和孝: HA コーティングインプラントの 10 - 13 年間の臨床評価. 日本顎咬合学会誌 咬み合わせの科学 31(3) : 206-214,2011.
- 10) 古澤 利武, 斉藤智則, 室野井 基夫, 山下 忍, 水沼一昭: 骨吸収により除去した HA コーティングインプラントの表面変化について. 日本口腔インプラント学会誌(12) :55-63,1999.
- 11) H. Aydogdu, D. Keskin, E. Turker Baran, A. Tezcaner. Pullulan microcarriers for bone tissue regeneration. Materials Science and Engineering, 63, 439-449,2016.
- 12) J. Yonehiro, Y. Yoshida, A. Yamashita, S. Yoshizawa, K. Ohta, N. Kamata, T. Okihara, F. Nishimura. Flavonol-containing phosphorylated pullulan may

attenuate pulp inflammation. International Endodontic Journal, 46, 119-127, 2013.

13) M. V Cardoso, J. de Rycker, A. Chaudhari, E. Coutinho, Y. Yoshida, B. Van Meerbeek, M. F Mesquita, W. J da Silva, K. Yoshihara, K. Vandamme, J. Duyck. Titanium implant functionalization with phosphate-containing polymers may favour in vivo osseointegration. Journal of Clinical Periodontology, 44, 950-960, 2017.

14) M. Vivan Cardoso, A. Chaudhari, Y. Yoshida, B. Van Meerbeek, I. Naert, J. Duyck, Bone tissue response to implant surfaces functionalized with phosphate-containing polymers. Clinical Oral Implants Research, 25, 91-100, 2014.

15) 遠藤 一彦, 安彦 善 裕 : 歯科インプラント用金属材料と細胞の係わり. *Materia Japan* 34 (10) : 1167-11711, 1995

16) 板橋 勇人, 藤森 伸也, 宮崎 隆, 李 元植 : 異なった微小表面形状を有するチタン表面上での骨芽細胞様細胞の初期動態 (in vitro) について. *The Japanese Society for Dental Materials and Devices* 141 : 136 -141 , 1995

17) 小野寺滋也, 角田左武郎, 羽鳥仁志, 岩瀬正泰, 板橋勇人, 藤森伸也, 宮崎隆, 南雲正男 : 骨芽細胞様細胞のチタンプレートへの初期付着について 日本口腔科学会雑誌 44(2) : 160 - 165, 1995

18) 今井 庸 二, 渡辺 昭彦, 増原 英一 : 材料の生体適合性に及ぼす表面粗さの影響. *人工臓器学会誌* 9 (6) : 911-914, 1980

19) 藤森 伸也, 種々の微小表面形状を付与したチタン板の表面分析並びにその表面上での骨芽細胞様細胞の増殖と分化に 関する研究 *The Japanese Society for Dental Materials and Devices* 14 (1) : 155 -168, 1995

20) 井田 有亮 : 歯科技工における新しいチタンの研磨方法の検討 北海道医療大学歯学雑誌 29 : 200, 平成 22 年

21) 柴田 陽, 宮崎 隆 : インプラントの表面構造 : 抗菌性と組織適合性は両立するか. *日本口腔インプラント学会誌* 33 (1) : 21-27, 2020

22) 角田方衛, 筏義人, 立石哲也 : 金属系バイオマテリアルの基礎と応用, 305, アイピーシー, 東京, 2000

23) 小林 悦郎, 須貝 稔, 樋口 美起 : 酸化チタン(IV)一水和物によるリン酸イオンの吸着除去. *日本化学会誌* 1 : 39-44, 1979

24) E. Iravani, S. A Allahyari, Z. Shojaeib, M. Torab-Mostaedia. Surface Modification and Spectroscopic Characterization of TiO₂ Nanoparticles with 2-Aminoethyl Dihydrogen Phosphate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(8), 1608-1616, 2015.

- 25) R. D Warner : Review: Analysis of the process and drivers for cellular meat Production. *Animal*, 13(12), 3041-3058, 2019.
- 26) 皆川 仁：ソケットグラフトにおけるリフィットデンタルの有効性～ハイブリッドコラーゲンマテリアルの高機能化～. 岩野義弘, 最新 骨補填材料&メンブレン YEARBOOK 2021/2022,83, クインテッセンス, 東京都, 2021,
- 27) 高橋 浩一郎:骨形成タンパク質(BMP)の臨床応用に向けて. *日薬理誌* 116: 232-240,2000.
- 28) 宮島 佳孝, 北田 憲司:支持体の処理方法及び処理装置. 特開 2015-188420. 2015-11-02
- 29) Ulf. M. E. Wikesjö, M. Qahash, G. Polimeni, C. Susin, R. H Shanaman, M. D Rohrer, J. M Wozney, J. Hall : Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(11), 1001-1010, 2008.
- 30) A. Chaudhari, M. Vivan Cardoso, J. Martens, K. Vandamme, I. Naert, J. Duyck J. Bone tissue response to BMP-2 adsorbed on amorphous microporous silica implants. *Journal of Clinical Periodontology*, 39, 1206-1213, 2012.