

主論文の要旨

**A new application of cell-free bone regeneration:
immobilizing stem cells from human exfoliated deciduous
teeth-conditioned medium onto titanium implants using
atmospheric pressure plasma treatment**

（ 大気圧プラズマ処理したチタンインプラントへの
ヒト脱落乳歯幹細胞由来培養上清の応用 ）

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

（指導：日比 英晴 教授）

大森 正裕

【緒言】

インプラント治療は、歯の欠損を補い、咀嚼機能を回復させる有用な治療法である。しかしながら、治療期間の長さなどが課題として残されている。現在使用されている歯科用インプラントのほとんどはチタン製であり、チタンと骨が結合することにより咀嚼力に耐えることが可能である。このチタンと骨の結合は長期間必要であり、インプラント治療が長期にわたる大きな原因となっている。われわれはいままでに、骨髄間質細胞由来培養上清（BMSCs-CM）をチタンインプラント表面に付着させることで骨-インプラント接触率（BIC）が向上し早期安定性が獲得されたことを報告した。その一方で、ヒト脱落乳歯幹細胞（SHED）は骨髄間質細胞（BMSCs）よりも骨形成能が高いことや、チタン表面の親水化処理はタンパク質の吸着量が増加する報告が散見される。そこで、本研究では、親水化処理である大気圧プラズマ処理後に SHED 由来培養上清（SHED-CM）を付着させたチタン製インプラントが、周囲の骨形成や BIC を向上し、インプラントと骨の結合を早期に獲得する可能性を検討した。

【材料及び方法】

チタン材は、板（直径 15mm）、粉末（直径 1mm）、およびインプラント（Novel Biocare 社製、直径 3.75mm×長さ 7mm）を使用した。SHED は本学倫理委員会承認のもと本学附属病院にて提供されたヒト脱落乳歯歯髄から単離、培養したものを使用した。また、イヌ BMSCs（cBMSCs）はイヌ大腿骨骨髓より単離、培養したものを使用した。SHED 3-9 継代目を 80%コンフルエントまで培養後、培地を無血清培地に交換、48 時間培養後に上清を回収し、細胞片を除去したものを SHED-CM とした。

実験群は、大気圧プラズマ処理後、24 時間、37℃、5%CO₂ 条件下で SHED-CM、PBS に浸漬したもの（P-CM、P-PBS）、SHED-CM に浸漬したもの（N-CM）とし、対照群は PBS に浸漬したもの（N-PBS）とした。

各群のインプラント表面を走査型電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分光法（SEM-EDX）で観察し、表面元素を同定した。チタンに付着した物質の特性を検討するために、チタン粉末に付着させた SHED-CM 由来タンパク質を 4M グアニジン、10%EDTA を用いて溶出した。また、同溶液で SHED-CM 由来タンパク質を溶出後のインプラント表面を SEM-EDX で観察した。溶出タンパク質を SDS-PAGE で確認後、ブラッドフォード法で定量し、質量分析（LC/MS/MS）にて同定した。各群のチタン板上に接着する cBMSCs 数を計測し、さらに蛍光免疫染色でチタン板に接着する細胞を観察した。また、イヌ大腿骨に各群のインプラントを埋入し、4、8 週後で X 線学的、組織学的解析を行った。

【結果】

SEM-EDX での観察で、N-CM 群、P-CM 群では顆粒状の沈着物が確認され（Figure 1）、その沈着物上で同定された元素は Ca、C、P、O であった（Figure 2）。チタン粉末に付着した SHED-CM 由来タンパク質は、4M グアニジンでのみ溶出可能であり 1

0%EDTA では溶出できなかった。各溶液で溶出後のチタンインプラント表面では顆粒状の沈着物は観察できなかった (Figure 3)。チタン粉末に付着する SHED-CM 由来タンパク質量は、P-CM 群で有意に増加した (Figure 4)。SHED-CM に含まれるタンパク質は細胞外マトリックス成分が多く同定され、チタン粉末に付着させた SHED-CM 成分は 4 M グアニジンの溶出液のみで検出され、10%EDTA では検出できなかった (Table 1, 2, 3)。各群チタン板に接着した cBMSCs の細胞数は播種後 24 時間において P-CM 群で有意に増加し、蛍光免疫染色でも同様の結果であった (Figure 5)。イヌ大腿骨に埋入した各群のチタン製インプラントは、X 線学的評価 (Figure 6) と、組織学的評価において、P-CM 群のインプラント周囲の骨形成量が有意に増加し、BIC、スレッド周囲の骨量である骨領域分数占有率も P-CM 群で有意に増加した (Figure 7)。

【考察】

チタン製インプラントに SHED-CM を付着させると、培地由来の Ca、P、C、O がリン酸カルシウム (Ca-P) の結晶を形成し、表面に付着した。それと併せて I 型コラーゲン、デコリン、フィブロネクチンが付着した。この結果から SHED-CM が付着したインプラントを生体骨内に埋入すると、I 型コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックス成分によりインプラント表面に接着する BMSCs 数が増加し、I 型コラーゲン、Ca-P により BMSCs の骨芽細胞への分化を促進することにより周囲骨形成が向上し、早期かつ良好なインプラントと骨の結合得られたと考えられた。

また、チタン製インプラントに大気圧プラズマ処理をすることにより、表面の有機物が除去され、親水化とチタン表面に付着するタンパク質量も増加し、さらなる骨形成の向上が引き起こされたと考えられた。

今後は、インプラントと骨の結合の詳細を明らかにすることにより、チタン表面にさらに効果的な骨形成を引き起こすチタン製インプラントを開発検討する。

【結語】

本研究結果より、大気圧プラズマと SHED-CM にて処理したチタン製インプラントは、有機/無機物質の複合体が付着することによって、BIC を向上し、インプラントと骨の結合を早期に獲得する可能性が示唆された。