

ふりがな氏名	なかの ようこ 中野 蓉子
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 737 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 7 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	Rat Endothelial Cell Attachment, Behavior and Gene Expression on NaOH-treated Titanium Surfaces (水酸化ナトリウム水溶液によりチタン表面に析出したナノ構造がラット血管内皮細胞の初期接着および遺伝子発現に与える影響について)
学位論文掲載誌	Journal of Oral Tissue Engineering 第 11 巻 第 3 号 平成 26 年 3 月 30 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

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（TNS）とよばれる構造が析出し、それが骨髄細胞の硬組織分化誘導能の向上に有効であることはすでに明らかになっている。本研究では骨形成の基盤となる早期の微細血管構築を目指し、TNS の血管内皮細胞に与える影響について検討した。実験材料として #2000 まで研磨した市販の JIS2 級純チタンを使用し、実験群としてナノシートを析出させたものを、対照群として研磨した純チタンを使用した。ナノシートの析出には、各試料を 10 M の水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、攪拌した状態で室温・大気圧条件下で 24 時間反応させた。反応後、試料を取り出し、イオン交換水にて導電率が 5  $\mu$ S 以下になるまで洗浄を行った。その後、自然乾燥させ、チタン金属表面にナノシートを析出させた。試料は実験群、対照群ともに、アセトン、エチルアルコール、イオン交換水で各 10 分間超音波洗浄を行い、その後乾熱滅菌を行った。析出したナノシートを走査型電子顕微鏡にて観察した。

次に、生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの胸部下行大動脈から血管内皮細胞を採取し初代培養を確立し、その 3 代目を実験に供した。実験群および対照群共に 24 穴プレート上に設置したチタン金属表面に 1 穴あたり  $4 \times 10^4$  個ずつ播種し、培養 15、30、45 分、1、2、3 時間後の各群における細胞接着を蛍光顕微鏡で観察し、細胞接着数を比較検討した。また培養 5 日後の TNS 表面上の管腔形成について蛍光顕微鏡で観察した。さらに培養 2 日、5 日後の ICAM-1 mRNA、5 日後の von Willebrand factor mRNA, thrombomodulin mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。

チタン金属表面上の血管内皮細胞の初期接着の観察では、実験群では対照群に比べて細胞突起が伸長し幅広く付着した像が観察され、経時的にその傾向が顕著に認められた。細胞接着数の比較では培養 3

時間で両群に有意差は認めなかったものの、他の時間群で実験群で有意に高い値を示した。また、管腔形成の観察では培養 6 日後の TNS 表面で管腔様の構造が観察された。また、全ての遺伝子発現は実験群で有意に高い値を示した。以上の結果により、チタン金属のナノレベルでの表面改質が血管内皮細胞の初期接着能および接着因子の遺伝子発現を有意に高めることを示した。

### 論文審査結果要旨

純チタン金属表面上にナノシート構造（以下TNS）が血管内皮細胞の初期の接着に与える影響について比較検討したものである。TNSを析出させた純チタン板と未処理の純チタン板を使用し、その上でラットから採取した血管内皮細胞を培養した。その後、細胞接着数の比較、細胞接着像の蛍光顕微鏡での観察を行った結果、細胞接着数の比較はTNS上で有為な値を示し、細胞接着像の観察でもTNS上での細胞の接着性を向上している様子が観察された。さらに、管腔形成像の観察、細胞接着に関わる遺伝子I CAM-1 mRNA、創傷治癒に関わる遺伝子von Willebrand factor mRNA、thrombomodulin mRNAの発現を解析を行った結果、管腔形成像の観察においてTNS上で管腔様の構造を観察した。また遺伝子発現においても、TNS上で有為な値を示すことがわかった。これらの結果はTNSが未処理のチタンと比べて血管内皮細胞の初期での接着、およびその後の動態に関わる遺伝子の発現に有利に働いているということを示している。

以上、血管内皮細胞の初期接着能の向上および遺伝子発現に TNS が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。