

Title	Influence of Titanium Ions on Cytokine Levels of Murine Splenocytes Stimulated with Periodontopathic Bacterial Lipopolysaccharide
Author(s)	西村, 孝太
Journal	歯科学報, 114(6): 648-649
URL	http://hdl.handle.net/10130/3527
Right	

氏名(本籍)	にしむらこうた (埼玉県) 西村孝太
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第2004号(甲第1245号)
学位授与の日付	平成25年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Influence of Titanium Ions on Cytokine Levels of Murine Splenocytes Stimulated with Periodontopathic Bacterial Lipopolysaccharide doi : 10. 11607/jomi. 3434
掲載雑誌名	The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 第29巻 2号 472-477頁 2014年
論文審査委員	(主査) 井上 孝教授 (副査) 矢島 安朝教授 加藤 哲男教授 齋藤 淳教授 服部 雅之講師

論文内容の要旨

1. 研究目的

チタンは生体親和性や耐食性が高い金属であるため、生体材料として広く用いられている。しかし、整形外科用インプラントから放出されたチタン粒子は組織内に蓄積し、インプラント周囲骨の骨溶解を引き起こすことが示唆されている。また、摩擦が無い状況下においても炎症によりチタンインプラントのチタン酸化層を破壊する可能性が報告されている。これらの報告は、放出されたチタンイオンが組織とインプラント界面における骨吸収に重要な役割を果たす可能性を示唆している。

また、デンタルインプラントの偶発症としてインプラント周囲炎があげられる。インプラント周囲炎は歯周炎と同様な炎症反応を引き起こし、プラークはその主な病原因子と考えられる。*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* などの歯周病関連細菌のエンドトキシンは、炎症性サイトカインの産生を誘導し、インプラント周囲の骨吸収に影響を与える可能性がある。

そこで本研究では、歯周病原細菌エンドトキシン (lipopolysaccharide ; LPS) で刺激したマウス脾細胞から産生されるサイトカインレベルに対するチタンイオン添加の影響を検討した。

2. 研究方法

5~10週齢の C57BL/6 マウス, BALB/c マウスより採取した脾細胞を10%FBSを含む RPMI1640培養液に 5.0×10^5 /ml に調整し、96-well 細胞培養プレートに播種した。チタンイオンの細胞毒性をみるため、細胞を播種した培養液中にチタンイオン濃度が4.5, 9.0, 18ppm になるようにそれぞれ添加し、対照群は無添加とした。XTT 細胞増殖 Assay Kit (Applichem) を用いて、チタンイオン添加直後、1日後、3日後、5日後、7日後の細胞数の変化を継時的に計測した。チタンイオン9.0ppm 添加培養4日後に、*A. actinomycetemcomitans* LPS で刺激し、その17時間後のサイトカインレベルを Multi-Analyte ELISA Kit (SABiosciences) により検討した。また、C57BL/6 マウス, BALB/c マウスの系統間の比較、実験群・対照群の比較は one-way ANOVA を行った後、Bonferroni's Multiple Comparison Test を行った ($P < 0.05$)。

3. 研究成績および結論

XTT assayの結果、C57BL/6およびBALB/cともに本実験で使用した濃度ではチタンイオンに細胞毒性はみられず、両系統のマウス脾細胞ともに1日後から濃度依存的に細胞の増殖がみられた。培養1日後におけるチタンイオン18ppm添加群では、両系統のマウスともに有意な増殖がみられた($P<0.05$)。LPS添加後のサイトカインレベルは、調べた12種類のサイトカインのうち、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 、およびGM-CSFが両系統のマウスにおいて、チタンイオン9ppm添加群で高い値がみられた。両系統間で実験群を比較した場合、IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 、TNF- α およびGM-CSFにおいてC57BL/6で有意に高い値がみられた($P<0.05$)。

本研究の結果より、チタンイオンはLPSによる炎症性サイトカイン産生を助長することが明らかになり、インプラント周囲炎の増悪因子となる可能性が示唆された。

論文審査の要旨

本研究の目的は、歯周病関連細菌エンドトキシン(lipopolysaccharides ; LPS)で刺激したマウス脾細胞からのサイトカインレベルに対するチタンイオンの影響を検討することである。C57BL/6とBALB/cの脾細胞を採取調整後、チタンイオンのマウス脾細胞に対する細胞毒性と、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPSで刺激したマウス脾細胞に対するチタンイオンの影響について、サイトカインレベルを計測することにより評価した。使用したチタンイオン濃度では脾細胞に対する細胞毒性は示さず、培養1日後から細胞の増殖がみられた。LPS刺激後のサイトカインレベルは、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 、およびGM-CSFが両系統のマウスにおいて、チタンイオン添加群で高い値がみられた。本研究の結果より、チタンイオンはLPS刺激による炎症性サイトカインの産生を助長することが明らかになり、インプラント周囲炎の増悪因子となる可能性が示唆された。

本審査委員会では、1) 実験モデルにマウス脾細胞を用いた理由について、2) Th1(細胞性免疫)、Th2(体液性免疫)優位のマウスを用いた理由について、3) コントロールの設定(他の金属イオン、他のLPSの使用など)について、4) 使用したチタンイオンの濃度設定について、5) 今回得られた結果とアレルギー反応の関連性などについて質疑、口頭試問がなされた。これらの質問に対する回答として、1) 脾臓はT細胞、B細胞を有する重要な二次器官であるため、チタンイオンに対する免疫応答を検討するのに適していると考え選択した。2) Th1、Th2から産生されるサイトカインに偏向や差がみられるのか検討するため選択した。3) 今回はインプラント周囲炎を想定しているため、チタンイオンと歯周病原細菌である*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*のLPSを選択した。4) 過去の同じチタンイオンを使用した研究で9ppmまでは細胞生存率に影響が無いと報告されているため選択した。5) マウスの遺伝的な免疫応答は明確になっているが、今回の結果よりTh1に特徴的な反応がみられなかったため、金属アレルギーと関係ないと考えられる。との説明が行われ、概ね妥当な回答が得られた。さらに、英文の表現、図の説明、図の表記について修正すべき点が指摘され、訂正が行われた。

以上により、本研究で得られた結果は、今後の歯科医学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。