

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	塚中 真佐子
論文題目	Evaluation of bioactivity of alkali- and heat-treated titanium using fluorescent mouse osteoblasts (蛍光タンパク導入マウス由来骨芽細胞を用いたアルカリ加熱処理チタンの生体活性能の評価)		
(論文内容の要旨)			
人工関節や骨補填材には種々の生体材料が使用され、より高い骨結合能を得るための新規材料が開発されている。生体内で材料が骨組織と結合するためには、材料が骨芽細胞の増殖と分化を活性化することが重要である。材料の骨親和性を評価する方法として、これまで in vitro の研究においては、骨芽細胞を材料上で培養し、骨芽細胞特異的遺伝子の発現を生化学的に評価する手法が用いられてきた。金属材料は不透明であるため、顕微鏡を用いて非侵襲的に細胞を観察することは困難であった。 本研究では不透明な金属材料上で骨芽細胞の増殖と分化の状態を非侵襲的に評価することを目的として、骨芽細胞と骨細胞において特異的に発現することが知られている 2.3 kb の I 型コラーゲンのプロモーターにより赤色蛍光タンパクである mRFP1 を発現するトランスジェニックマウス (Col1a1(2.3kb)-mRFP1 トランスジェニックマウス) を作成し、その骨芽細胞を用いた材料の評価系を確立した。本手法を用いて、生体内で高い結合能を持つことが既に知られている金属材料であるアルカリ加熱処理チタンの評価を行った。このトランスジェニックマウスより採取した頭蓋冠由来骨芽細胞をアルカリ加熱処理チタン上で培養し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、同一サンプルの継時的観察を行った。アルカリ加熱処理チタン上では観察期間を通じて未処理のチタンと比較して強い蛍光が観察された。その結果は従来の手法である XTT を用いた細胞増殖能アッセイと RT-PCR を用いた骨芽細胞特異的遺伝子の発現の評価と同様の傾向を示すものであった。またアルカリ加熱処理チタン上では骨芽細胞分化の指標である石灰化結節の特徴的な形成パターンが観察された。結節形成の初期である培養 16 日目においては、アルカリ加熱処理チタン上では、未処理の純チタンと比較して結節数は 3 倍多く、平均面積も 1.5 倍大きかった。結節の大きさの分布の評価から、アルカリ加熱処理チタンでは未処理のチタンと比較して、観察期間を通じて小さい結節が多数観察され、アルカリ加熱処理が骨芽細胞の分化の開始を促進していることが示唆された。このような継時的な空間的な評価は従来の手法では困難であり、同一検体を繰り返し観察できる本法により可能となった。 本研究では Col1a1(2.3kb)-mRFP1 トランスジェニックマウスを用いて in vivo での骨形成の評価もおこなった。マウスの大腿骨内にワイヤー状に成形したアルカリ加熱処理チタンを挿入し、一定期間経過後、引き抜いて蛍光観察を行った。ワイヤー周囲に新しく形成された骨組織は蛍光として観察および定量化することが可能である。術後 28 日目の観察では、アルカリ加熱処理チタンの周囲には、未処理のチタンと比較して、5 倍の蛍光が観察された。その結果は硬組織標本を用いた組織学的評価と同様の傾向を示した。切片の作成に特殊な工程が必要な硬組織標本による評価と比較して、本法は観察前に準備の必要がなく			

簡便な手法である。
Col1a1(2.3kb)-mRFP1 トランスジェニックマウスを用いた材料の評価法は、従来の評価方法と比較して簡便であり、 in vitro においては非侵襲的に継時的な観察も可能であることから、新規材料の骨結合能のスクリーニングと、骨結合能に関する基礎的研究において有用な手法である。
（論文審査の結果の要旨）
本研究では金属材料の骨結合能を簡便に評価する系を確立することを目的として、金属材料上で骨芽細胞の増殖と分化の状態を非侵襲的・継時的に評価することが可能な蛍光イメージングの評価系を確立した。骨芽細胞と骨細胞において特異的に発現することが知られている 2.3 kb の I 型コラーゲンのプロモーターにより赤色蛍光タンパクである mRFP1 を発現するトランスジェニックマウス（ Col1a1(2.3kb)-mRFP1 トランスジェニックマウス）を作製し、その骨芽細胞を用いた材料の評価系について検討を行った。骨芽細胞を材料上で培養し同一試料の蛍光を継時的に観察した実験において、生体内で高い結合能を持つアルカリ加熱処理チタン（ AhTi ）上では観察期間を通じて未処理のチタンと比較して強い蛍光とより多くの小さな石灰化結節が観察され、アルカリ加熱処理が骨芽細胞分化の開始を促進していることが示唆された。以上のことから Col1a1(2.3kb)-mRFP1 トランスジェニックマウスを用いた材料の評価法は、従来の方法と比較して簡便であり、非侵襲的に継時的な観察も可能であることから、有用な手法であることが示唆された。
以上の研究は金属材料の骨結合能の生物学的なメカニズムの解明に貢献し、新規材料の骨結合能のスクリーニングを簡素化することにより、より骨結合能の高い金属材料の開発に寄与するものである。
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 2 6 年 2 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
旨公開可能日： 年 月 日 以降