



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Effects on bone regeneration of thin apatite coating on titanium by chemical coating process using calcium phosphate slurry [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	伊藤, 達郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11242号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56112
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsuro_Ito_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 伊藤 達郎

学位論文題名

Effects on bone regeneration of thin apatite coating on titanium by
chemical coating process using calcium phosphate slurry

（スラリー埋没加熱処理によるアパタイト薄膜形成がチタン表面の
骨形成に及ぼす影響）

【諸言】

Ti および Ti 合金は優れた機械的強度や生体適合性を有している。しかし、Ti は生体不活性材料であり、オッセオインテグレーション獲得に多くの期間がかかると報告されている。そのため、より早期で確実なオッセオインテグレーション獲得のために陽極酸化処理、プラスト酸エッチング、ハイドロキシアパタイト (HAp) などの表面改質に関する研究が多くなされてきた。HAp は骨芽細胞の分化や石灰化物形成を促進し、高い骨伝導性を有しているため、プラズマスプレーコーティング法などを利用して臨床応用されている。良好な臨床成績が報告されている一方でコーティングとインプラント体界面での剥離や HAp 皮膜そのものの破折、さらには溶解等の問題も報告されている。その原因としては、皮膜の厚さや HAp 膜と Ti 間の熱膨張係数の差などが推察されている。このような現状を鑑み、我々は、チタン (Ti) 表面に HAp を含有する約 300nm の薄膜を比較的簡便に形成できるスラリー埋没加熱処理法に着目した。本研究の目的は、スラリー埋没加熱処理法を用いて Ti ワイヤードとディスクに HAp を含有する薄膜を作製し、その表面観察ならびに解析を行うとともに、薄膜が Ti の骨伝導性に与える影響について *in vitro* および *in vivo* での評価を行うことである。

【材料と方法】

1. 試料作製ならびに分析

Ti ディスク（直径 21.5mm, 99.9% Ti, Nilako[®], Japan）および Ti ワイヤード（直径 1mm, 長さ 8mm, 99.9% Ti, Nilako[®], Japan）、をエメリー紙 1000 番で研磨し、試料とした。これらの試料

を第三リン酸カルシウム ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$; Sigma Aldrich Inc.) が含まれたスラリー内に埋没し、大気圧中 973K で、2 時間熱処理することにより試料表面に HAp を含む薄膜を作製した (CP-coated Ti)。スラリーに埋没せず熱処理のみ行った試料をコントロールとした (Anneal Ti)。作製した試料の表面観察を走査型電子顕微鏡 (FE-SEM; JSM-6701F, JEOL) にて行い、表面粗さを走査型プローブ顕微鏡 (SPM; SPM-9700, Shimadzu, Japan) にて計測し、試料表面特性分析を X 線回折法 (XRD; New D8 ADVANCE, Bruker AXS) にて行った。

2. 組織学的検索ならびに組織計量学的検索

10 週齢雄性 Wistar 系ラットの左側大腿骨に CP-coated Ti ワイヤーもしくは Anneal Ti ワイヤーを 8mm の間隔を開けて 2 本埋入し、カルセイン (Wako pure Chemical Industries, Ltd) にて標識した。術後 2 週および 8 週で試料を周囲組織とともに摘出した。2 本のうち 1 本は Villanueva bone 染色を施し、PMMA 樹脂包埋し非脱灰標本とした。もう 1 本は 20%EDTA (pH 7.4) にて脱灰後、パラフィン標本を作製し、H.E.染色を行い、組織学的に評価した。また、組織計量学的検索として、骨-インプラント体接触率 (BIC) を求めた。

3. 細胞培養特性の評価

5 週齢雄性 Fisher 系ラットの骨髓細胞 (RBSMC) を初代培養後、CP-coated Ti ディスクおよび Anneal Ti ディスク上に 1.0×10^5 個/well 播種した。2 週および 3 週間培養した後、DNA 量、アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)、オステオポンチン量 (OP)、オステオカルシン量 (OC) およびカルシウム量を測定した。また、1 週および 2 週間培養後、RT-PCR にて、Cbfa1、collagen I、GAPDH の mRNA の発現について比較検討を行った。

【結果】

1. 表面分析結果

SEM 観察から、両試料とも表面に数十ナノメートルの粒状の構造物が観察された。SPM より、Anneal Ti と CP-coated Ti の表面粗さに有意差は認めなかった。XRD より、CP-coated Ti 上では HAp、ルチル型 TiO_2 およびアナターゼ型 TiO_2 の波形のピークを認めた。

2. 組織学的検索結果

埋入 2 週間においては、Anneal Ti および CP-coated Ti 周囲に、細胞成分の多い幼若な骨組織が観察されたが、CP-coated Ti には、Anneal Ti に比較して、より多くの骨組織が認められた。8 週間では、試料表面の骨組織は増加し、CP-coated Ti の多くの部分は新生骨と接していたが、Anneal Ti では骨髓組織が接している部分も観察された。2 種の試料ともに、8 週では 2 週に比較し、試料表面に形成された骨は薄層化していたが、Anneal Ti に比較して CP-coated Ti でより薄くなっていた。組織計量の結果、2 週および 8 週ともに CP-coated Ti の BIC は、Anneal Ti に比較し有意に高い値を示した。一方、2 週の CP-coated Ti の BIC と 8 週の Anneal Ti はほぼ同じ値を示した。

3. 細胞培養結果

DNA 量は、2 週、3 週ともに Anneal Ti と CP-coated Ti の間に有意差はなく、両試料ともに 2 週から 3 週にかけて DNA 量が減少していた。2 週では、OC とカルシウム量に有意差

が認められ、Anneal Ti に比較して CP-coated Ti は、高い値を示した。一方、3 週では、DNA 量を除くすべての項目において CP-coated Ti が Anneal Ti に比較して有意に高い値を示した。RT-PCR では、1 週において CP-coated Ti 上の Cbfa1 が Anneal Ti よりも強い遺伝子発現を認めた。しかし、collagen I では 1 週、2 週ともに Anneal Ti と CP-coated Ti で差は認められなかった。

【考察】

2 週、8 週ともに CP-coated Ti の BIC は Anneal Ti に比較し有意に高く、さらに、2 週の CP-coated Ti と 8 週の Anneal Ti の BIC ではほぼ同じ値を示した。このことから、CP-coated Ti 上では Anneal Ti に比べてより早期に骨形成が起こると示唆された。一方、CP-coated Ti 周囲の新生骨の厚みは Anneal Ti に比べて薄くなっていた。CP-coated Ti 上では Anneal Ti に比べてより早期に骨のリモデリングが起きている可能性が考えられるが、今後さらなる検討が必要となる。

RBSMC の骨芽細胞への分化を評価するために骨形成の特異的なマーカーである ALP、OP、OC を計測し、分化した骨芽細胞を調べるための項目としてカルシウム量を計測した。その結果、3 週においてすべての項目で CP-coated Ti は Anneal Ti よりも有意に高い値を示し、加えて 2 週において OC およびカルシウム量は CP-coated Ti で有意に高かった。さらに、1 週において CP-coated Ti 上での Cbfa1 の遺伝子発現が Anneal Ti に比べて強かった。これらの結果より、CP-coated Ti 上では RBSMC から骨芽細胞への分化および骨芽細胞の成熟が Anneal Ti 上よりも早期に起こることが示唆された。

表面粗さのような表面特性は、細胞動態に影響することが報告されているが、SEM 像および SPM の結果から、CP-coated Ti と Anneal Ti の表面粗さに有意差を認めなかった。両試料の表面の物理的特性は Anneal 処理によるものであることが推察された。すなわち、HAp 薄膜処理は表面粗さには影響せず、薄膜の化学的特性に影響を与えたものと考えられた。

DMA 量に関して、CP-coated Ti と Anneal Ti の間に有意差が認められなかったことも、HAp 薄膜が BMSC の増殖ではなく分化に有効であったことを示唆している。今後、CP-coated Ti 上での BMSC の接着を含め、骨芽細胞の分化のメカニズムを詳細に説明しうる研究が必要である。

【結論】

スラリー埋没加熱処理により形成される Ti 表面の HAp を含有する薄膜は骨髄細胞から骨芽細胞への分化および骨芽細胞の成熟を促進し、初期における骨形成に有効であることが明らかとなった。