



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Facile Functionalization of Anodized Titanium Oxide with Carbon Nanohorns Enhancing Bone Formation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	高田, 紗理
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13040号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70434
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Sari_Takada_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 高 田 紗 理

学 位 論 文 題 名

Facile Functionalization of Anodized Titanium Oxide with Carbon Nanohorns
Enhancing Bone Formation

(骨形成の促進を目的としたカーボンナノホーンによる陽極酸化チタンの表面修飾)

カーボンナノホーン (CNHs)、カーボンナノチューブ (CNTs)、グラフェンなどのカーボンナノ材料 (CNMs) は、機械的強度、化学的安定性に加えて生体適合性が高いため、再生医療のためのバイオマテリアルへの応用が研究されている。我々はこれまでに、3次元細胞培養担体の1つであるコラーゲンスポンジの表面をCNTでコートすることによってCNT特有の微細構造に細胞がトラップされ、培養初期において担体深部にまで細胞が付着できること、骨芽細胞の分化が促進されることを報告した。またポリ乳酸やチタンにCNTをコートすることにより表面の親水性が向上し、骨芽細胞の接着が促進されることも明らかにした。

CNHは炭素が円錐状の構造を呈したものであり、直径100 nm程度の集合体として存在する。CNTの合成時には、ほぼ必須である金属触媒を用いることなく合成できるため、CNTをはじめとするナノカーボンと比較して生体適合性が高いことが知られている。我々は、CNHsをPTFE膜に固着し、ラット頭頂骨に作製した骨欠損部を被覆した結果、CNHsを固着したPTFE膜下にはPTFE膜のみで被覆した場合に比較して広い範囲で新生骨が形成されることを報告した。新生骨周囲にCNHsを貪食したマクロファージが多数観察されたことから、CNHsによるマクロファージへの刺激が骨再生に関与していると考え、CNH存在下でヒトマクロファージとヒト骨髄間質細胞を共培養し、CNHsを貪食したマクロファージが、骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を誘導することを明らかにした。この特徴を、歯科用インプラントの表面処理に用いることを考えた。歯科用インプラントに用いられるチタン(Ti)は、オッセオインテグレーションの早期獲得を目的として様々な表面処理が行われている。特に、陽極酸化処理は、骨芽細胞の接着を向上させ、オッセオインテグレーションを促進するという報告がなされており、すでに製品にも応用されている。そこで本研究ではオッセオインテグレーションのさらなる早期獲得を目指して、陽極酸化TiにCNHsを修飾する方法を検討するとともに、CNHsを修飾した陽極酸化Tiの細胞培養特性と骨との適合性を評価することを目的とした。

直径9mm、厚さ1mmのTiディスク(99.5%, Nilaco, Japan)と直径1mm、長さ5mmのTiワイヤ(99.5%, Nilaco, Japan,)を#600~#1500の耐水研磨紙を用いて研磨後、0.025M α -DL-グリセロリン酸(>85%, 東京化成工業)と0.2M 酢酸カルシウム(99%, 関東化学)水溶液

中にて 320V, 30mA/cm² の定電流下で陽極酸化処理を行い、得られたものを陽極酸化 Ti とした(AnTi). CNHs は大気酸化した後、カルボキシル基を付与したものを、250µg/ mL となるよう 99.9%エタノールに分散し、CNH 分散液を作成した. AnTi ディスクを陽極に Ti 板を対極に接続した後 CNHs 分散液中に固定した. 30mA/cm² の定電流下で、電圧 (250,300,350,400V), および時間 (60,120,180,240 秒) を変えた各条件で泳動電着を行った. 走査型電子顕微鏡(SEM, S4000, Hitachi, Japan,10kV)にて表面の観察を行うとともに、Image-Pro Premier 9.1 (Nippon Rober, Media Cybernetics) を使用して CNHs の付着面積を測定した. また、FE-SEM (JEOL, JIB-4600F) を用いて AnTi および CNH/AnTi の断面構造を観察した.

AnTi および CNH/AnTi ディスク上にヒト骨芽細胞様細胞(Saos2)を 10%FBS 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium 中に 1.0×10^4 / mL 濃度にて播種し、7日間培養を行った. 7日後、SEM 観察を行うとともに DNA 量と ALP 活性の測定を行った.

10 週齢の Wistar 系雄性ラット(24 匹,体重 300-330g)の左側大腿骨に、直径 1mm の歯科用バーを用いて埋入孔を形成した. AnTi あるいは CNH/AnTi ワイヤを骨髓腔内に骨の長軸方向に平行に埋入した. 7 日および 28 日後に灌流固定を行い、ワイヤを周囲組織とともに摘出した. 大腿骨を EDTA にて脱灰した後、Ti に組織が付着しない様に可及的に力をかけずにワイヤを撤去した. 通法に従いパラフィン標本を作製し、HE 染色を行った後、光学顕微鏡(AX-80, OLYMPUS)による組織学的観察を行った. また、7 日後の試料と骨との接触率 (BCR) を測定した. さらに、インプラントと骨との界面を詳細に観察するため、28 日後の HE 標本の一部を用いて透過型電子顕微鏡(TEM, JEM1400 80 V, JEOL Ltd. Tokyo, Japan)による観察を行った.

泳動電着法を用いた AnTi への CNHs の電着条件の検索では、時間を 180 秒とし、電圧を変化させると、電圧 250V の場合には CNHs の付着面積は少なく、300V で最も多く均一に修飾されていることが示された. 350V, 400V と電圧が上昇するとともに付着面積は減少した. 電圧 300V で時間を変化させた電着では、60 秒および 120 秒では付着面積は 180 秒と比較して小さく、240 秒ではさらに減少しており、CNHs の凝集がみられた. 300V, 180 秒で電着を行った CNH/AnTi の FE-SEM の断面像では、陽極酸化によって形成された細孔内部にも CNHs が 0.2~0.3µm の厚みで均一に堆積しているのが観察された. 以上より 300V, 180 秒での電着によって CNHs が均一かつ最も多く修飾されることが明らかとなった. 泳動電着法は、CVD 法のような高熱処理や化学薬品を必要とせず、AnTi に CNHs を表面修飾するのに有効であると考えられる.

7 日間培養後の Saos2 の SEM 観察像では、CNH/AnTi 上で良好に細胞が付着しており、細胞の仮足は CNHs に直接接して伸展していた. AnTi と比較して、CNH/AnTi に付着した細胞の DNA 量は有意に高く ($p < 0.01$), ALP 活性は有意差が認められなかった ($p > 0.1$). これにより、CNH/AnTi 上では骨芽細胞様細胞の増殖は促進されるが、分化には影響を与えないことが示された. また、我々は、カルボキシル化した CNTs をポリ乳酸表面に修飾し、濡れ性の向上により細胞接着が促進され、細胞増殖が生じることを報告したが、本研究においても、カルボキシル化 CNHs を使用することにより細胞接着が促進され、細胞増殖が促進された結果、DNA 量が増加したと考えられる.

AnTi および CNH/AnTi ワイヤ埋入 7 日後の光学顕微鏡観察では、Ti 周囲に骨芽細胞が配列した幼若な新生骨組織が観察された。また、新生骨の一部は直接 Ti に付着しており、CNH/AnTi の BCR は、AnTi と比較して有意に高かった($p < 0.05$)。埋入 28 日後では、7 日後と比較して、両サンプルとも Ti 周囲に形成された骨量は増加していた。また、新生骨上に観察された CNHs を TEM により観察したところ、一部が骨基質と接して存在していることが確認された。これらの結果から、CNHs が骨組織と適合性を有することが明らかとなった。特に CNH/AnTi は AnTi より早期の骨形成に有利であり、骨伝導性を向上させることが示唆された。我々のこれまでの報告では、CNHs を固着した PTFE 膜上ではラット頭蓋骨欠損部の早期の骨形成を促進し、新生骨周囲には CNHs を貪食したマクロファージが局在すること、CNHs を貪食したマクロファージは骨芽細胞の分化を促進することが明らかになっている。CNHs は細胞毒性を誘発することなく様々な免疫系反応の調節因子となり、新生骨形成へ関与する可能性がある。本研究では CNH/AnTi 周囲に観察されたマクロファージの数は少なかったが、今後 CNH/AnTi 上でのマクロファージの挙動および骨形成に及ぼす影響について検討していく必要がある。

本研究において、泳動電着法を用いることにより、CNHs を簡便かつ均一に AnTi に修飾することが可能となった。陽極酸化チタンの CNHs による修飾は骨伝導性を向上させたことから、インプラントへの応用が期待された。