

学 位 論 文 題 名

Improvement of Osteoconductivity by Coating with
Thin Film of CaTiO_3 on the Surface of Titanium(CaTiO₃薄膜によるチタンの骨伝導性向上に関する研究)

学位論文内容の要旨

緒言

現在、デンタルインプラント治療は欠損補綴治療の選択肢の一つとして普及しつつあり、良好な予後が報告されている。インプラント治療の予後は埋入手技、材料および表面処理方法などに影響を受けると考えられており、インプラント体材料としてはチタン(Ti)、Ti 合金が使用されてきた。しかし、これらの材料は生体適合性、機械的強度に優れるが、オッセオインテグレーションの獲得に長期間を要すると報告されている。その改善を目的としてプラズマスプレー、陽極酸化、酸エッチング、浸漬、イオン蒸着、イオン注入など様々な表面改質に関する研究がなされている。一方、ハイドロキシアパタイト(HA)等のリン酸カルシウム系セラミックスは骨形成に有効であることから、現在、Ti の機械的強度と HA の骨形成能の両方の長所を生かしたプラズマスプレー法によるHAコーティングがデンタルインプラントに応用されている。臨床においても一般的に使用されているが、母材からの剥離、破折、溶解等の問題も報告されている。我々はこれらの問題点の原因と考えられている被膜厚さや結晶度の低下を解決する方法として、Ti 表面にチタン酸カルシウム(CaTiO_3)をマグネトロンスパッタにて蒸着し、アニール処理にて結晶度を高めるといふ、 CaTiO_3 薄膜処理に注目した。共同研究者である大津は、被膜厚さは最低 50nm まで薄くできること、擬似体液中で CaTiO_3 薄膜が HA の形成を促進することを報告し、さらに我々との共同研究で CaTiO_3 薄膜処理された Ti に生体適合性、骨伝導性があることも報告している。しかし、チタン酸カルシウム薄膜処理法の研究において、生体反応に対するアニール処理の影響が検討されておらず、骨形成の詳細な評価は行われていない。また *in vitro* での実験は行われていないため骨髄細胞や骨芽細胞への影響についても不明である。本研究の目的は、これらを詳細に検討し、チタン酸カルシウム薄膜処理が骨伝導性に与える影響について明らかにすることである。

材料と方法

複合イオンビーム成膜装置を利用し、純度 99.9%の Ti ワイヤー、Ti ディスクそれぞれの表面に Rf-マグネトロンスパッタにより CaTiO_3 ターゲットを用いて、厚さ 50nm の CaTiO_3 薄膜を作製後、大気中にて 600°C、2 時間アニール処理を行った。その後、走査型電子顕微鏡(SEM)により薄膜表面性状の観察を行い、表面粗さの計測は走査型プローブ顕微鏡を使用し、平均粗さ(Ra 値)を計測した。表面組成の分析はエネルギー分散型 X 線分光(EDS)と薄膜 X 線回折(GIXD)にて計測を行い、GIXD は入射角 $\alpha =$

1° にて測定を行った。

動物埋入実験では生後 14 週齢、Wistar 系雄性ラット 26 匹を用い、アニール処理済み Ti ワイヤ (ATW) と CaTiO_3 薄膜処理 Ti ワイヤ (CTW) をインプラント体としてラット左側大腿骨の長軸に対し垂直に貫通するよう、2 本埋入した。その際骨標識としてカルセインを投与した。埋入後 2 および 8 週で摘出し、2 本埋入したインプラント体の 1 本を周囲組織とともにパラフィン包埋し、パラフィン脱灰標本を、もう 1 本を Villanueva-Bone 染色後、PMMA 樹脂包埋し非脱灰標本を作製した。脱灰標本は薄切後、HE 染色を行い光学顕微鏡にて観察し、非脱灰標本は蛍光顕微鏡にて観察した。また、非脱灰標本から組織計量学的検索を行い、骨-インプラント体の接触率、骨髓腔中央部の新生骨の占有率を計測した。

また培養実験では 6 週齢 Fisher 系ラットの骨髓細胞を 1 週間初代培養後、ディッシュに付着した骨髓間質細胞を、アニール処理済み Ti ディスク (ATD)、 CaTiO_3 薄膜処理 Ti ディスク (CTD) 上に 1.0×10^5 cell/well 播種し、2 および 3 週間培養を行い、アルカリフォスファターゼ活性/DNA 量 (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 (Ca) を測定した。

全ての計測結果は、Mann-Whitney U 検定により 2 群を比較し、有意水準を 5% とし て統計学的に検索した。

結果

SEM 像からは ATD、CTD 共に多くの結晶粒界が認められたが、著しい違いは認められず、Ra 値も ATD、CTD 間に有意差は認められなかった。EDS による定性分析の結果、ATD からはカルシウムが検出されず、CTD からのみカルシウムが検出された。また GIXD の結果から ATD、CTD 共にルチル型二酸化チタンのピークが確認され、ペロブスカイト型 CaTiO_3 のピークは CTD からのみ確認された。

組織学的検索結果として、埋入 2 週後の HE 染色像では ATW、CTW とともに幼弱な細胞が多く骨形成が活発であるが、CTW と比較し ATW の方が骨細胞の数が多く、インプラント体と新生骨の間に線維や肉芽組織の介在が認められた。埋入 8 週後では ATW、CTW とともに骨細胞の数が減り、骨が成熟していたが、ATW は CTW と比較し骨の形成が連続ではなく、骨髓がインプラント体と接している部位が確認された。埋入 2 週後の非脱灰標本の蛍光像では ATW、CTW 共に埋入時に投与したカルセインの沈着で確認される新生骨の存在が確認できたが、ATW と比較し CTW は新生骨の幅が厚く、ATW は骨が連続していない部位が存在した。埋入 8 週後では ATW は 2 週時のものと比較して骨が厚くなり、骨の連続していない部位が確認できた。

組織計量学的検索結果では、骨-インプラント体の接触率は 2 週および 8 週において CTW は ATW と比較し有意に高く ($p < 0.05$)、ATW において、8 週後の値は 2 週に比較し、有意に高かった ($p < 0.05$)。また 2 週後の ATW と 8 週の CTW の値の間に有意差は認められなかった。骨髓腔中央部の新生骨の占有率は 2 週後においては CTW は ATW と比較して有意に高く ($p < 0.05$)、CTW は ATW の 2 倍近くであったが、8 週においては有意差が認められなかった。ATW において 8 週は 2 週より有意に高かったが ($p < 0.05$)、CTW において、有意差は認められず、むしろ 8 週は減少傾向を示した。

生化学的検索結果として、CTD の ALP は 2 週および 3 週において ATD に比較し、有意に高かった ($p < 0.05$)。OP、OC、Ca については 2 週では有意差が認められなかったが、3 週後の CTD の値は、ATD に比較し有意に高く ($p < 0.05$)、特に OP については、CTD の値は ATD の 2 倍以上であった。

考察

表面性状の検索結果からチタン酸カルシウム薄膜処理は表面粗さに影響しないことが明らかとなり、 CaTiO_3 薄膜処理は表面の物理的性質に影響しないことが推察され、 CaTiO_3 薄膜処理による化学的な性質が骨伝導性に関与していることが示唆された。組織計量学的検索結果から、 CaTiO_3 薄膜処理をおこなうことにより、同じ接触率を得るのに要する期間はアニール処理の $1/4$ と短縮されることが示された。*in vitro*における生化学的検索の結果から、薄膜近傍の骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化が促進されたことが示され、 CaTiO_3 薄膜処理は骨形成に有利であることが示唆された。

結論

チタン酸カルシウム薄膜処理は、骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を促進することにより骨伝導性の改善することが明らかとなり、オッセオインテグレーションの早期獲得や骨形成に有効である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 山 敦 郎

副 査 教 授 亘 理 文 夫

副 査 教 授 網 塚 憲 生

学 位 論 文 題 名

Improvement of Osteoconductivity by Coating with Thin Film of CaTiO_3 on the Surface of Titanium

(CaTiO_3 薄膜によるチタンの骨伝導性向上に関する研究)

論文要旨

本研究の目的は、Ti 表面に蒸着したチタン酸カルシウム(CaTiO_3)薄膜上での骨形成を *in vivo* および *in vitro* で検討することにより、骨伝導性の向上に関する CaTiO_3 薄膜処理の有効性を明らかにすることである。複合イオンビーム成膜装置にて、Ti ワイヤ、Ti ディスクそれぞれの表面に厚さ 50nm の CaTiO_3 薄膜を作製後、600℃で2時間アニール処理を行った。その後、走査型電子顕微鏡(SEM)による薄膜表面性状の観察、薄膜 X 線回折(XRD)およびエネルギー分散型 X 線分光法(EDX)による表面組成の分析、さらに原子間力顕微鏡を用いた表面粗さの計測を行った。アニール処理済みの Ti ワイヤ(ATW)と薄膜処理 Ti ワイヤ(CTW)を14週齢ラットの大腿骨に埋入し、2および8週後に摘出し、病理組織学的ならびに組織計量学的検索を行った。また6週齢ラットから骨髄細胞を採取後、アニール処理(ATD)、アニール処理済み薄膜処理 Ti ディスク(CTD)上に播種し、2および3週間培養後アルカリフォスファターゼ(ALP)活性/DNA 量、オステオポンチン(OP)、オステオカルシン(OC)とカルシウム(Ca)量を測定した。SEM 像からは ATD と CTD の表面性状に差違は認められず、EDX からは CTD にのみ Ca の存在が、また XRD からは CTD にのみ Perovskite 型 CaTiO_3 の存在が確認された。表面粗さは両者の間に有意差は認められなかった。動物実験においては、埋入後2週で骨-インプラント体接触率および骨髄中央部の新生骨占有率は、CTW は ATW と比較し有意に高く、8週においても骨-インプラント体接触率では有意差が認められた。*in vitro* では3週後では全ての計測項目において両群間に有意差が認められた。以上の結果から CaTiO_3 薄膜上では早期に骨髄細胞の骨芽細胞への分化が促進され、その結果、骨伝導性が向上することが明らかとなり、 CaTiO_3 薄膜処理のデンタルインプラントへの応用の可能性が示唆された。

審査の内容

1. プラズマスプレーによるハイドロキシアパタイト(HA)コーティングインプラントの欠点について

HA をプラズマ溶射するとコーティング層には熱分解によるガラス層が形成され、骨との親和性の低下、コーティング層の剥離が報告されている。

2. 実験部位について

大腿骨を実験部位として用いた理由は、当教室では同部位を用いた研究がなされており実験方法が確立していること、棒状の試料を用いた研究は、長管骨が実験部位として使用されることが多いことからこの部位を用いた。

3. チタン酸カルシウム薄膜に対する骨基質蛋白結合と骨基質形成のメカニズムについて

OC、OP などは、石灰化骨基質のカルシウムと結合することが知られている一方、骨芽細胞の基質に対する定着や分化などにも影響を及ぼすことが報告されている。従ってチタン酸カルシウム薄膜は OC、OP などの基質蛋白を結合することで骨芽細胞の定着・基質合成に影響を及ぼす可能性が推測される。

4. Ti インプラント周囲に HA が析出するメカニズムについて

チタン表面の酸化膜は体液中でマイナスにチャージするため、体液中のナトリウムイオンがチタン表面に速やかに誘導され、これに牽引されたリン酸イオンの析出が増大し、カルシウムイオンが誘導される。ナトリウムがカルシウムと置換されることにより、チタン表面には HA が形成される。

5. 細胞培養における観測時期を 2 および 3 週とした理由について

骨髄細胞の培養では、OP、OC、Ca が検出されるのは、2 週から 4 週であることが多くの文献で報告されている。さらに予備実験において培養期間が長期間に及ぶと、細胞やその生成物が培養ディスクから剥がれやすくなり、ばらつきが生じやすくなった。以上のことから計測時期を 2 および 3 週とした。

6. 脱灰標本作成時におけるインプラント除去の手技について

インプラント体の 1 本を周囲組織とともに脱灰し、インプラント体の長軸方向と平行にインプラント体に沿って切断した。その後細心の注意を払いながらインプラント体の除去を行った。

本研究結果から CaTiO_3 薄膜処理は、臨床におけるオッセオインテグレーションの早期獲得や埋入初期の骨形成に有効である可能性も示され、新たなチタンの表面処理方法として期待できる。今後さらに研究を進めることにより臨床に反映しうると考えられ、将来性の点においても高く評価されるものであった。よって学位申請者は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。