

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19146

研究課題名(和文) PLD法を利用した新規アパタイトコートインプラントの創製

研究課題名(英文) Fluorinated hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed laser deposition On NANOZR-substrate: Surface characterization, cell activity and osteogenesis ability

研究代表者

内藤 大介(Naito, Daisuke)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：80758087

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):インプラント治療の成功のためには初期固定の確立および埋入周囲組織の早期回復が必須である。共同研究者である近畿大学の本津茂樹教授は薄膜作製技術を用いて厚さ10 μ m以下の薄くて曲がる極薄アパタイトシートの開発に成功した。このアパタイトシートはインプラント表面に被覆させることが可能でこの材料を足場とすることで、インプラントの成功率を格段に向上させることが期待できる新期材料の開発ができる。本申請研究は金属アレルギー患者に対する治療選択肢の一つであるナノジルコニア材料へアパタイトをレーザーコーティングすることで生体アパタイトシート被覆新規インプラント材料の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的な特色は、ナノテクノロジーの一つである材料表面のナノ構造制御に着目し、新たな生体材料を開発し他分野への応用を視野に入れているという点にある。オッセオインテグレーションとともにバイオインテグレーションが注目される中、アパタイトシートならびに細胞シートを応用させたこの結果は医科界・歯科界において多くの患者に普及させることが期待できる。

研究成果の概要(英文):The purpose of this study was to evaluate the surface characterization, mechanical properties, bioactivity in vitro and in vivo of NANOZR-substrate FHAp coatings obtained by pulsed laser deposition (PLD). Surface morphology, crystalline phase identification, identification of functional groups, bond strength testing and cell morphology, cell proliferation, evaluation of hard tissue Differentiation and the amount of new bone formation of materials were measured. These results suggest that the NANOZR-substrate FHAp coatings is the good candidate for increasing the osseointegration of the implant in contact with the bone and can be most promising for implant fabrication compared to the unmodified NANOZR.

研究分野：再生歯学

キーワード：インプラント in vitro in vivo ハイドロキシアパタイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年開発されたナノジルコニアはイットリア系ジルコニアの欠点を克服するため、水熱特性に優れたセリアを安定剤として用いたアルミナ粒子の複合体の材料研究が進められ双方向ナノ複合体が構築されたナノ複合セラミックスが開発された。ナノジルコニアでは不純物が無く粒界がきわめて強くなる。これにより強い曲げ強さと強固な破壊靱性値を有している。また、このナノジルコニアは厚みを薄くすることで弾性を持つことが知られており、本講座ではこの材料をクラスプに応用する研究を開始している (H27~29 年度科学研究費助成金基盤研究 C を受諾・共同研究者)。また、この強い曲げ強さと弾性はインプラント材料の具備すべき材料条件としても一致しており、インプラント材料として期待されるが、確実な初期固定を得るためには表面構造制御が必須である。

申請者は、ナノジルコニアに濃アルカリ処理を施すことで、無処理のナノジルコニア表面と比較して Ra の上昇 (SPM による評価)、酸化膜の増加 (XPS による評価)、接触角の低下および細胞接着が確認され、表面制御の成果が明らかとなった。また、Zr のピークを観察すると水酸基を有しており、ラット骨髄細胞の初期接着および硬組織分化誘導能の向上に寄与することを明らかにした。本テーマは International Journal of Molecular Science に掲載された。

ナノジルコニアに対する濃アルカリ処理は硬組織分化誘導能の向上を誘導するものの、主要なインプラント材料である純チタン金属と比較すると、確実な初期固定が得ることができるとは言えず、金属アレルギーを有する患者に対するインプラント材料であるジルコニア材料を生かすためには新たな表面処理方法が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本申請者の共同研究者である近畿大学生物理工学部 本津茂樹教授は PLD 法により、10 μ m 以下の薄くて曲がる極薄アパタイトシートの開発に成功した。このシートは歯質と同素材であるため、骨や歯質に直接貼り付き、骨組織の再生に有用な材料として期待される。大阪歯科大学では歯科保存学講座がこのシートを利用し、エナメル質を容易に修復する「歯の絆創膏」として臨床応用され、各種メディアでも取り上げられた。アパタイトシートは純チタンインプラント表面にも容易に薄膜形成することが可能で、本講座大学院生 陳先生は近畿大学 本津茂樹教授との共同研究でアパタイトをレーザーコーティングした純チタン金属インプラント材料がインプラント埋入周囲組織の硬組織分化誘導能を向上させることを *in vitro* および *in vivo* の両面から検討し、新規バイオ材料の作成に成功した。

本研究の目的は金属アレルギー患者に有用であるナノジルコニア材料へ PLD 法によってハイドロキシアパタイトをコーティングすることでインプラント埋入周囲組織にどのような影響を与えるのか *in vitro* および *in vivo* の両面から検討を行い、オッセオインテグレーションとバイオインテグレーションを兼ね備えた新規インプラント材料の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、PLD 法によりアパタイトシートをコーティングしたインプラント体として生体に埋入した場合の SD 系ラットのインプラント周囲骨組織の評価を中心とする。SD 系ラットの大腿骨骨髄から間葉系幹細胞を単離し、各種実験材料上にこれを播種・培養し、細胞接着能、細胞増殖能、骨芽細胞への分化能について評価する。また、ラット大腿骨にチタンナノ構造を析出した各種実験材料を埋入し周囲骨組織の評価を MicroCT 分析および免疫蛍光染色で行い、オッセオインテグレーションの評価を行う。

(1) 試料作製

実験材料として PLD 法によりアパタイトシートコーティングを施したパナソニックヘルスケアより購入したナノジルコニア板 (直径 15mm, 厚さ 10mm) およびナノジルコニアスクリューを使用し、対照群として機械処理を施した同材料を使用した。試料は実験群、対照群ともに、アセトン、エチルアルコールおよびイオン交換水で各々 10 分間超音波洗浄を行い、その後乾熱滅菌を行った。

(2) 表面解析

試料の微細構造の観察には、実験群および対照群の純チタン金属表面を走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4000, 島津)、走査型プロトタイプ顕微鏡 (SPM, SPM-9600, 島津) を使用して X, Y および Z 方向に 2 μ m の範囲をスキャンした。試料表面における元素分析を X 線電子分光分析装置 (XPS, PHI x-tool, アルバックファイ) にて行い、結晶構造を XRD にて解析した。また、アパタイトのコーティングを確認するため、FTIR にて解析した。

(3) 細胞培養

生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から、骨髄間葉細胞を採取した。本研究は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。骨髄間葉細胞の初代培養を確立、継代し 3 代目を実験に共試した。プレートに 1 穴あたり 4 万個の細胞を播種後、培地を分化誘導培地に交換し、分化誘導を開始した。細胞を 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ を含む加湿条件下で培養した。細胞はコン

フレントに達するまで、各試料上で培養した。培地に 10 %FBS および骨分化誘導剤 (10 mM - グリセロリン酸ナトリウム (和光純薬, 東京, 日本), 80 µg/ml アスコルビン酸 (ナカライテスク, 京都, 日本), 10^{-8} M デキサメタゾン含有の分化誘導培地を用い分化誘導を開始した。

(4) 接着試験および増殖試験

実験群および対照群のナノジルコニア板を 24well プレート (Falcon, Becton Dickson Labware, NJ, USA) に配置し, ラット骨髓細胞を 4×10^4 個/ml ずつ播種し, 1, 3, 8, 24 および 72 時間それぞれ培養し, 各培養後の細胞増殖について CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いて測定した。

(5) ALP 活性

培養開始 7 および 14 日後における各々の培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後, 0.2 % トライトン (Sigma, St. Louis, MO, USA) にて抽出・溶解した。ALP 活性の測定には, Alkali Phosphatase Luminometric ELISA Kit® (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いメーカー指示に従い ALP 活性の測定を行った。DNA の定量を, the Pico green Double standard DNA Assay Kit (DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本) を用いメーカー指示に従って行った。DNA の定量後, DNA の定量あたりの ALP 活性を算出した。

(6) カルシウム析出量

培養 21 および 28 日後における細胞外マトリックスに析出したカルシウム量を 10 % 硝酸にて抽出した。カルシウム析出量は, Calcium E-test Kit (和光純薬, 東京, 日本) を用いて定量した。

(7) 骨形成に関する遺伝子の発現

実験群および対照群のナノジルコニア表面上の培養 3 日後の培養細胞より逆転写後, mRNA を抽出し, アプライドバイオシステム社製 StepOne Plus™ Real-Time PCR System を用いて実験群と対照群における骨形成に関する遺伝子のマーカーについて比較検討した。

(8) in vivo 評価

実験群および対照群のナノジルコニアスクリューを生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの大腿骨に埋入後 8 週間生育した後安楽死させ, 大腿骨を摘出後, Micro-CT により CT 画像を撮影した。1 週後にテトラサイクリン, 4 週後にアリザリンレッド, 8 週後にカルセインを注射し, 埋入後 8 週間生育した後安楽死させ, 大腿骨を摘出後, 通常法に従い, 10% 中性緩衝ホルマリンによる灌流固定後に大腿骨を一塊として摘出した。採取した大腿骨をスクリュー挿入部に沿って, 矢状断方向の約 5-7 µm の厚さの切片を作製し, Villanueva 染色を行い, 組織学的観察を行った。また解析項目は BA, BIC, LBA とした。

(9) 統計解析

各試験の評価はそれぞれ 3 回行い, 各実験の得られたデータの統計処理は SPSS 14.0 J for Windows を用いて行った。実験群および対照群の有意差検定は Student の t 検定を用いて行い, 5% 以下を有意水準とした。

4. 研究成果

(1) 表面解析

SEM の観察では, 実験群でナノジルコニア板にアパタイトの結晶が形成されていることが明らかとなった。SPM の解析では実験群で Ra の上昇を認めた。XPS, FTIR および XRD の観察では実験群で材料表面にアパタイトの形成を認めるピークを認めた。

(2) 細胞接着および増殖

すべての計測時間で, 細胞接着および増殖量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(3) ALP 活性

すべての計測時間で, ALP 活性は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(4) カルシウム析出量

すべての計測時間で, カルシウム析出量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(5) 骨形成に関与する遺伝子マーカーの発現

すべての計測時間で, 骨形成に関与する遺伝子マーカーの発現量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(6) in vivo 評価

すべての計測データにおいて実験群で対照群より統計学的に有意に高い値を示した。これは実験群で硬組織の形成量が多いことを示している。

以上の結果により, PLD 法によりハイドロキシアパタイトをコーティングした NANOZR 表面がインプラント周囲組織の硬組織形成に in vitro および in vivo レベルの両面から関与することが明らかとなった。この結果は海外雑誌に掲載予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------