

ふりがな氏名	まりん 馬 琳
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第1009号
学位授与の日付	令和6年3月1日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項に該当
学位論文題目	Effect of Er:YAG Pulsed Laser-Deposited Hydroxyapatite Film on Titanium Implants on M2 Macrophage Polarization In Vitro and Osteogenesis In Vivo (チタンインプラント上にEr:YAGレーザーデポジション法によって成膜されたハイドロキシアパタイト膜がM2型マクロファージの分極化と骨形成に与える影響)
学位論文掲載誌	International Journal of Molecular Sciences 第25巻 第1号 令和6年1月
論文調査委員	主査 前川 賢治 教授 副査 高橋 一也 教授 副査 橋本 典也 教授

### 論文内容要旨

インプラント埋入初期時にはマクロファージはM1型とM2型の2種に分極化されるが、M2型は炎症を抑制し、骨形成を誘導することが知られるとともに、ハイドロキシアパタイト(HAp)はM2型マクロファージの分極化を促進すると考えられている。これまで、Er:YAGレーザーデポジション(Er:YAG-PLD)法を提案し、種々の材料上へのHAp薄膜の作製を試みてきた。そこで本研究では、純チタンの板およびスクリュー上にEr:YAG-PLD法により形成されたHAp膜が、M2マクロファージの分極化、インプラント埋入周囲組織に与える影響をin vitro, in vivo両面から評価した。

市販のJIS2種チタンの板(Φ15 mm×1 mm)およびスクリュー(Φ1.2 mm×12 mm)を実験材料とし、前処理としてサンドブラスト処理を施した後、これらの上にEr:YAGレーザー(アーウィンアドベール、モリタ製作所製)を用いたEr:YAG-PLD法により、α-リン酸三カルシウム(α-TCP)膜を形成させた。照射エネルギーは300 mJ、照射時間は10秒とした。成膜されたα-TCP堆積膜を90°Cの蒸留水内で10時間浸漬することで加水分解させてHAp膜にした(実験群)。対照群は無処理の純チタン金属とした。堆積膜がHApであることを、表面解析(SEM, EDS, XRD)により確認した。マウスマクロファージ細胞株RAW264.7を継代培養して両群試料に播種し、所定の時間培養した後、フローサイトメトリーによりマクロファージの分極化、及びTNF-α, IL-6, IL-10, Arg-1, VEGF, TGF-β1, BGLAP, OSMの遺伝子発現量を比較した。また、生後8週齢のSD系雄性ラット両側大腿骨から骨髄間葉細胞を単離後、継代培養し、3代目を両群試料に播種、所定の時間培養後に細胞のALP活性、カルシウム析出量ならびにRUNX2, BMP, BGLAPの遺伝子発現量を比較した。さらに、SD系ラットの大腿骨に各群のスクリューを埋入し、8週後に屠殺した上で純チタン表面と骨の界面および周囲の新生骨量をMicro-CTで解析するとともに、摘出した大腿骨切片をピラヌエバ染色する組織学的解析にて新生骨量を比較した。なお、実験はin vitroは計4回、in vivoは計8回行い、各測定項目に対してStudentのt検定によ

り統計解析を行い、有意水準は 5%とした。

表面解析の結果より、SEM 画像において実験群の材料表面に HAp と推測される針状の結晶構造が認められた。EDS 及び XRD の解析結果から、HAp の結晶構造をもつ薄膜が純チタン金属表面に形成されていることが示された。In vitro 評価では、マクロファージ細胞株 RAW264.7 を使用した実験群の M2 マクロファージの分極化 ( $p=0.018$ ) 及び各種遺伝子発現量 ( $p<0.05$ ) が有意に高い値を示した。SD 系ラット骨髄細胞では、実験群の ALP 活性 ( $p<0.05$ )、カルシウム析出量 ( $p<0.00001$ ) 及び各種遺伝子発現量 ( $p<0.05$ ) が有意に高い値を示していた。また、in vivo 評価の結果、Micro-CT 解析で、対照群と比較して実験群での新生骨形成量が有意に高い値を示した ( $p=0.008$ )。組織切片に対する顕微鏡観察では、実験群で対照群と比較して新生骨の形成量が有意に高い値を示した (新生骨範囲: $p=0.041$ , 骨接触率: $p=0.018$ )。

本研究の結果より、Er:YAG-PLD 法によって純チタン金属表面への HAp 膜の形成が可能であることが明らかとなった。また、HAp 膜を純チタン金属上にコーティングすることによって、インプラント埋入周囲組織の M2 マクロファージの分極化、硬組織分化誘導能、および新生骨の形成が向上することが明らかとなった。

### 論文審査結果要旨

本研究では、純チタンの板およびスクリュー上に Er:YAG-PLD 法により形成された HAp 膜が、M2 マクロファージの分極化、インプラント埋入周囲組織に与える影響を in vitro, in vivo 両面から検討している。本研究は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認 (第 21-09002) を得て行っている。

サンドブラスト処理した市販の JIS2 種チタンの板およびスクリューを実験材料とし、これらの上に Er:YAG レーザーを用いた Er:YAG-PLD 法により、 $\alpha$ -リン酸三カルシウム ( $\alpha$ -TCP) 膜を形成させた。成膜された  $\alpha$ -TCP 堆積膜を 90°C の蒸留水内で 10 時間浸漬することで加水分解させて HAp 膜にした (実験群)。対照群は無処理の純チタン金属とした。

表面解析として、走査型電子顕微鏡 (SEM)、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) による表面観察、X 線回折装置 (XRD) による結晶状態測定と X 線光電子分光法 (XPS)、エネルギー分散型分光装置 (EDS) による元素解析を行った。

In vitro 評価にはマクロファージ細胞株 RAW264.7 および SD 系ラット骨髄細胞を使用した。フローサイトメトリーによりマクロファージ分極化および各種遺伝子発現量を比較した。また、骨髄間葉細胞の ALP 活性、カルシウム析出量ならびに成骨遺伝子発現量を比較した。

In vivo 実験の評価では、SD 系ラットの大腿骨に各群のスクリューを埋入し、埋入 8 週後のラットを安楽死させて大腿骨を採取し、Micro-CT および組織学的観察を行った。

SEM の結果によって、実験群の材料表面に針状の結晶構造が認められた。EDS, XPS 及び XRD の解析結果から、HAp の結晶構造をもつ薄膜が純チタン金属表面に形成されていることが示された。In vitro 評価では、マクロファージ細胞株 RAW264.7 を使用した実験群の M2 マクロファージの分極化及び各種遺伝子発現量が有意に高い値を示した。SD 系ラット骨髄細胞では、実験群の ALP 活性、カルシウム析出量及び各種遺伝子発現量が有意に高い値を示していた。また、in vivo 評価の結果、Micro-CT 解析で、対照群と比較して実験群での新生骨形成量が有意に高い値を示した。組織切片に対する顕微鏡観察では、実験群で対照群と比較して新生骨の形成量が有意に高い値を示した。

以上より、Er:YAG-PLD 法によって純チタン金属表面への HAp 膜の形成が可能であることが明らかとなった。また、HAp 膜を純チタン金属上にコーティングすることによって、インプラント埋入周囲組織の M2 マクロファージの分極化、硬組織分化誘導能および新生骨の形成が向上することが明らかとなった。以上のことを明らかにして点において、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。