

ふりがな 氏名	りみん 李 敏
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 940 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 3 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	Structural Characterization and Osseointegrative Properties of Pulsed Laser - Deposited Fluorinated Hydroxyapatite Films on Nano - Zirconia for Implant Applications (インプラント応用のための PLD 法によるフッ素化ハイドロキシアパタイトを成膜したナノジルコニア材料の表面分析とオッセオインテグレーション評価)
学位論文掲載誌	International Journal of Molecular Science 第 23 巻 第 5 号 令和 4 年 2 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 本田 義知 教授

論文内容要旨

近年、ジルコニアが有する優れた性質から、インプラント材料への応用が試みられている。ジルコニアと純チタン金属の生体適合性に関しては、明確な違いを記した報告は認められないものの、ジルコニアに純チタン金属と同等の生体適合性およびそれ以上の結果を付すために様々な物理化学的方法が試されている。しかし、現時点で理想的な処理方法は確立されておらず、有効なインプラント材料としての表面処理方法を開発できれば、ジルコニア材料表面上での早期の骨形成が期待できる。本研究では、ナノジルコニアインプラント材料に対して、パルスレーザーデポジション (PLD) 法により通常のハイドロキシアパタイトより強耐酸性、低溶解度のフッ素化ハイドロキシアパタイト (FHA) を成膜することで、高い骨形成能を促す新規インプラント材料の創製を試みた。

対照群にはナノジルコニア板及びスクリューを、実験群にはPLD法でFHA薄膜を成膜したナノジルコニア板及びスクリューを使用した。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) 観察、X線光電子分光法 (XPS) 元素分析、EDSによる表面元素マッピング及びX線回折 (XRD) 測定を行った。生後 8 週齢のSD雄性ラット両側大腿骨から骨髓間葉細胞を単離、継代培養し、3代目を各種試料に播種した。培養開始24時間後にCell Titer-Blueを用いて、細胞の初期接着数を評価した。また培養7, 14日後の細胞を対象としてALP活性を測定した。次に、培養21, 28日後の細胞からカルシウム析出量を測定した。培養3, 7, 14, 21日後の細胞から逆転写後に得られたmRNAより、ALPmRNA, Runx2mRNA, BglapmRNAおよびBMPmRNAの遺伝子発現について群間で比較した。さらに、生後 8 週齢のSD雄性ラットの右大腿骨に対照群と実験群のスクリューを埋入した。埋入 8 週後にラットを安楽死させて大腿骨を採取し、固定、包埋後に切片を作製して組織学的観察を行い、群間で比較した。統計学的解析には、各測定値にStudentのt検定を用い、有意水準は5%に設定した。

SEMおよびSPMによる表面解析では、実験群にFHAの薄膜が均一に成膜されていることが確認できた。XPSとEDS分析では、FHAに起因するCa, P, Fのピークがそれぞれ均一に検出されていた。また、XRD測定にて、成膜されたFHA膜は結晶化されていることが明らかとなった。ラット骨髄間葉細胞の初期接着、各種分化誘導能の遺伝子マーカー発現解析の結果は、対照群と比較して実験群で統計学的に有意に高い値を示した。In vivoの実験結果において、実験群では対照群と比較して新生骨の形成量が多いことが示された。以上の結果より、ナノジルコニア表面へのフッ素化ハイドロキシアパタイトのコーティングは、オッセオインテグレーション獲得能を向上させることがin vitro, in vivo両面から明らかになった。

論文審査結果要旨

本研究では、純チタン金属と同等もしくはそれ以上の骨形成能を有する新規ナノジルコニアインプラント材料の開発を最終目標として、パルスレーザーデポジション (PLD) 法を使用して、ナノジルコニア材料に耐酸性、低溶解性のフッ化ハイドロキシアパタイト (FHA) 薄膜を成膜させ、インプラント埋入周囲組織に与える影響を in vitro, in vivoの両面から検証している。なお、本研究は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認 (第20-08004号) を得て行っている。

対照群にはナノジルコニア板及びスクリューを、実験群にはPLD法でFHA薄膜を成膜したナノジルコニア板及びスクリューを使用した。FHA薄膜を成膜した材料表面は走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) 観察、X線光電子分光法 (XPS) 元素分析、EDSによる表面元素マッピング、X線回折 (XRD) 測定、接触角測定および材料表面の固着強度を解析した。

In vitro評価にはSD系ラット骨髄細胞を使用した。実験開始24時間後の骨髄細胞の初期接着数の評価とともに、材料表面における骨髄細胞の形態を観察した。実験開始7, 14日後のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、実験開始21, 28日後のカルシウム (Ca) 析出量、実験開始3, 7, 14, 21日培養した後に得られた細胞を回収し、逆転写後に得られたmRNAを対象として、硬組織分化誘導能に関わる各種遺伝子発現量を解析した。

In vivoの評価には生後8週齢のSD雄性ラットの右大腿骨に対照群と実験群のスクリューを埋入することで評価を行った。埋入8週後にラットを安楽死させて大腿骨を採取し、マイクロCT、組織学的観察により、両者のインプラント埋入周囲組織の新生骨の形成量を比較・検討した。なお、統計学的解析には、各測定値にStudent-t検定を用い、有意水準は5%に設定した。

SEMおよびSPMによる表面解析では、実験群にFHAの薄膜が均一に成膜されていることが確認できた。XPSとEDS分析では、FHAに起因するCa, P, Fのピークがそれぞれ均一に検出されていた。XRD測定にて、成膜されたFHA膜は結晶化されていることが明らかになり、実験群のナノジルコニアにはFHA膜が成膜されていることが明らかとなった。また、実験群の材料表面では接触角の低下を示すとともに、材料表面のFHA膜のナノジルコニア材料に対する固着強度は17Mpaであった。In vitroの評価では初期接着能および全ての硬組織分化誘導能に関する解析結果において、対照群と比較して実験群で統計学的に有意に高い値を示した。In vivoの実験結果において、実験群では対照群と比較して新生骨の形成量が多いことが示された。

以上の結果より、ナノジルコニア表面へのフッ素化ハイドロキシアパタイトのコーティングは、オッセオインテグレーション獲得能を向上させることを明らかにし、新規インプラント材料の創製の可能性があるという点において、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。