

ふりがな 氏名	ちょうい 張葉
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第970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	Effect of Hydroxyapatite Coating by Er: YAG Pulsed Laser Deposition on the Bone Formation Efficacy by Polycaprolactone Porous Scaffold (ポリカプロラクトン多孔質足場による骨形成効果に及ぼす Er: YAG パルスレーザー堆積法によるハイドロキシアパタイトコーティングの影響)
学位論文掲載誌	International Journal of Molecular Sciences 第23巻 第16号 令和4年8月
論文調査委員	主査 橋本 典也 教授 副査 馬場 俊輔 教授 副査 本田 義知 教授

論文内容要旨

唇顎口蓋裂や歯周病などの疾患による歯槽骨の欠損は、歯科領域で解決すべき課題の1つである。しかし、骨吸収が速いこと、ドナー部位での罹患率が高いこと、頭蓋顎顔面骨組織修復において複雑で個別の形態をもつことから、自家骨移植には限界がある。近年、生体材料やバイオセラミックスに適用可能な3次元印刷技術を融合して作製した複合足場が、骨再生医療領域で広く注目されている。本研究の目的は、Er:YAGパルスレーザー堆積法（PLD法）によりハイドロキシアパタイト（HAp）を被覆したポリカプロラクトン（PCL）多孔質足場（HAp-PCL）を作製し、in vivo および in vitro での物性、生体適合性、骨形成能を評価することである。

Er:YAGパルスレーザーによるHApの堆積とその後の加水分解の過程を経て、PCL多孔質足場上にHApをコーティングすることを試みた。PCLへのHApのコーティングは、走査型電子顕微鏡（SEM）、X線回折装置、X線光電子分光法、フーリエ変換赤外分光法にて確認された。ラット骨髄由来間葉系幹細胞（rBMSCs）をPCLまたはHAp-PCLディスク/足場に播種した。ディスクを用いた初期接着と細胞の生存率を、DNA含有量アッセイとlive/deadアッセイで評価した。加えて、蛍光染色、SEM、DNAアッセイにより、足場への細胞の接着と増殖を評価した。8週齢のF344雄ラットの頭蓋骨にトレフィンバーとハンドピースを用いて、臨界サイズの骨欠損を形成した。形成した骨欠損部に、各足場（PCLまたはHAp-PCL）を埋入した。埋入2、4、8週後にラットを安楽死させ、欠損組織周囲の頭蓋骨を採取し、マイクロコンピュータ断層撮影（ μ CT）により骨形成を定量的に評価した。ヘマトキシリン・エオジン染色、

アルカリホスファターゼ染色、Von Kossa 染色、von Willebrand 因子の免疫染色、オステオカルシンの免疫蛍光染色を行い、顕微鏡観察した。

Er:YAG-PLD 法により PCL 多孔質足場上に HAp がコーティングされていることが確認された。rBMSCs を用いた *in vitro* 実験では、HAp-PCL ディスクでより良好な初期細胞接着が観察された。一方、多くの rBMSCs は、HAp コーティングの有無に関係なく、ディスク上で生存していた。さらに、rBMSCs はどちらの足場にもよく接着し、増殖した。*in vivo* の実験から、HAp コーティングは骨形成を促進し、HAp-PCL グループの新生骨の量は、どの時点でも PCL グループより有意に高いことが判明した。これは、HAp の優れた骨再生能に加え、足場表面の水濡れ性が向上したためと考えられる。

論文審査結果要旨

本研究では、Er:YAG パルスレーザー堆積法 (PLD 法) によりハイドロキシアパタイト (HAp) で被覆したポリカプロラクトン (PCL) 多孔質足場 (HAp-PCL) を作製し、*in vitro* および *in vivo* での物性、生体適合性、骨形成能を評価することを目的とした。

Er:YAG-PLD 法による PCL 多孔質足場へのハイドロキシアパタイトコーティングを行った。PCL 多孔質足場は力学的・物理化学的に特性評価され、骨髄由来間葉系幹細胞 (rBMSCs) を用いて足場材の生体適合性が調べられた。また、各足場 (PCL または HAp-PCL) は 8 週齢の F344 雄ラットの頭蓋冠骨欠損部に埋入した。埋入 2、4、8 週後にラットを安楽死させ、頭蓋冠を回収し、マイクロコンピュータ断層撮影 (μ CT) により骨形成を定量的に評価した。ヘマトキシリン・エオジン染色、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色、Von Kossa 染色、von Willebrand 因子の免疫染色、オステオカルシンの免疫蛍光染色を行った。

走査型電子顕微鏡 (SEM)、X 線回折装置、X 線光電子分光法、フーリエ変換赤外分光法の結果、Er:YAG-PLD 法により PCL 多孔質足場へハイドロキシアパタイトをコーティングすることができたと認められた。PCL 足場は、HAp コーティングにより機械的特性が強化された。水濡れ性は、HAp コーティングにより向上した。rBMSCs を用いた *in vitro* 細胞実験では、各足場の良好な生体親和性が示された。 μ CT 分析により、組織体積に対する骨体積の割合は、HAp-PCL 群が PCL 群に比べ、有意に高くなった。染色の結果、HAp-PCL 群の骨組織再生の程度は、対応する時間帯において PCL 群より有意に高くなった。ALP 染色の結果、PCL 群では、ALP 陽性細胞は足場の骨膜側で検出された。一方、HAp-PCL 群では、ALP 陽性細胞は足場全体に存在し、凝集構造を形成していた。

以上、HAp コーティングは骨形成を促進し、Er:YAG-PLD 法により得られたハイドロキシアパタイトで被覆された PCL 多孔質足場は、骨組織工学において有望な材料で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。