

Biocompatibility of apatite-coated titanium mesh prepared by hydrothermal-electrochemical method

(水熱・電気化学的方法によりアパタイトコーティングしたチタンメッシュの生体適合性)

鹿児島大学大学院歯学研究科

(指導教員 和泉 雄一 教授)

申請者氏名 湯田 昭彦

(背景・目的)

インプラントは埋入部位の骨の条件に依存するため、十分な骨量を獲得するために、種々の歯槽骨再生療法が行われている。この時に使われる scaffold として、高分子材料やリン酸カルシウム、コラーゲンが多く利用されているが、これらの生体材料の欠点は、目的の用途に対する強度が不十分で変形しやすいことである。一方チタンメッシュは、十分な強度を持ち、賦形性、生体親和性に優れ、操作性の良い材料であるため、整形外科や口腔外科領域において広範に利用されている。さらにチタンは骨伝導を促進するリン酸カルシウムをコーティングすることが可能であり、プラズマスプレー法、イオンビーム法、スパッタリング法などが利用されている。しかしこれらの方法は、高価な大型のコーティング装置が必要であり、複雑な形状の基板へのコーティングは困難である。我々は導電性の基板上に水熱・電気化学的方法によりアパタイトを析出させる研究をしてきた。この水熱・電気化学的方法は、メッシュのような複雑な形態の材料にもコーティング可能であり、比較的低温度で合成可能であるため、安価で簡便な方法である。また、電解条件を変化させることにより、アパタイト結晶の形態や溶解性を変えることが可能である。我々は、チタンメッシュに水熱・電気化学的方法によりアパタイトをコーティングし、確実な骨誘導のスペースの確保と骨誘導の促進を期待できる新たな GBR(Guided Bone Regeneration)膜を開発した。本研究では、このアパタイトをコーティングしたチタンメッシュ上に骨芽細胞様細胞である MC-3T3E1 を培養して、細胞接着、増殖、分化への影響を調べ、析出したアパタイトの形態や性状の違いによる細胞への影響についても検討した。

(材料・方法)

アパタイトコーティングは水熱・電気化学的方法により行い、電解液温度は 90, 100, 150℃とした。析出したアパタイトの形態観察は走査型電子顕微鏡(SEM)にて行い、組成分析をエネルギー分散型 X 線分光器(EDS)にて行った。また、X 線回折により結晶相を同定した。

細胞培養実験は、各電解液温度条件下でコーティングされたチタンメッシュおよびコーティングなしのチタンメッシュ上に、骨芽細胞様細胞(MC-3T3E1)を播種

し、5%CO₂存在下、37℃で培養した。また、細胞のみを培養したものをコントロールとした。培養後、試料上に付着した細胞の観察をSEMにて行い、細胞増殖・分化（アルカリフォスファターゼ活性、コラーゲン産生量、オステオカルシン産生量）を測定した。

（結果・考察）

水熱・電気化学的方法により合成されたアパタイトは、チタンメッシュ上に均一にコーティングされていた。SEM観察では、電解液温度90℃で析出したアパタイトは板状の結晶であり、100℃で析出したアパタイトは、板状の結晶と針状の結晶であった。150℃で析出したアパタイトは、100℃よりも大きな針状の結晶であった。さらにEDSの結果より、析出したアパタイトはカルシウム欠損アパタイトであることが示された。

細胞培養試験において、培養後のアパタイトに付着した細胞のSEM観察では、多くの細胞が形態を伸長し拡張していた。また、いずれの電解液温度においても細胞形態は類似していた。この結果から、コーティングしたアパタイトは良好な細胞分化が期待できることが明らかとなった。アパタイトをコーティングしたチタンメッシュ上の細胞増殖の測定において、付着した細胞数は150℃>100℃>90℃の順に多かった。また、時間の経過とともに細胞の増加がみられた。この結果は、アパタイトの結晶の大きさに関連しており、結晶が大きく、表面積の大きいアパタイト上に細胞は多く付着していた。細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性とコラーゲン産生量の測定では、アパタイトコーティングのチタンメッシュは、コントロールに比べ、初期において高い値を示した。オステオカルシン産生量の測定では、15日目において高い値を示し、特に、90℃、100℃で析出したアパタイトの方が150℃で析出したアパタイトよりも高い値を示した。これは、90℃、100℃で析出したアパタイトは150℃で析出したアパタイトよりも溶解性が高いことがわかっており、このことが細胞の分化に影響を与えたと思われる。

以上の結果より、水熱・電気化学的方法によりアパタイトをコーティングしたチタンメッシュは生体適合性が良好であるものと判断された。また、アパタイトの形態、性状の違いが細胞の増殖、分化に影響することが認められた。

（Dental Materials Journal , 24(4), 2005年12月掲載予定）

様式 7

報告番号	歯研第129号		氏名	湯田 昭彦	
論文審査担当者	主査	和泉 雄一			
	副査	田中 卓男	長岡 英一	藤井 孝一	

Biocompatibility of apatite-coated titanium mesh prepared by hydrothermal-electrochemical method

(水熱・電気化学的方法によりアパタイトコーティングしたチタンメッシュの生体適合性)

歯科インプラントは埋入部位の骨の条件に依存する。十分な骨量を獲得するために、種々の歯槽骨再生療法が行われている。この時に使われる scaffold として、高分子材料やリン酸カルシウム、コラーゲンが多く利用されているが、これらの生体材料の欠点は、強度が不十分で変形しやすいことである。一方チタンメッシュは、十分な強度を持ち、賦形性や生体親和性に優れ、操作性の良い材料であるため、整形外科や口腔外科領域において広範に利用されている。さらにチタンは骨伝導を促進するリン酸カルシウムをコーティングすることが可能である。プラズマスプレー法、イオンビーム法、スパッタリング法など種々の方法が利用されているが、これらの方法は、高価な大型のコーティング装置が必要であり、複雑な形状の基板へのコーティングは困難である。申請者らは、導電性の基板上に水熱・電気化学的方法によりアパタイトを析出させる研究を行い、メッシュのような複雑な形態の材料にも安価で簡便にコーティングができ、また、電解条件の変化により、アパタイト結晶の形態や溶解性を変えることを可能にした。この方法を用いて、確実な骨再生のスペースの確保と骨形成の促進が期待できる新たなアパタイトコーティングチタンメッシュを開発した。本論文では、このメッシュ上に骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を培養して、細胞接着、増殖、分化への影響を調べ、析出したアパタイトの形態や性状の違いによる細胞への影響について検討した。

その結果、水熱・電気化学的方法により合成されたアパタイトは、チタンメッシュ上に均一にコーティングされていた。SEM 観察では、電解液温度 90℃で析出したアパタイトは板状の結晶であり、100℃で析出したアパタイトは、板状の結晶と針状の結晶であった。150℃で析出したアパタイトは、100℃よりも大きな針状の結晶であった。さらに EDS の結果より、析出したアパタイトはカルシウム欠損アパタイトであることが示された。細胞培養において、培養後のアパタイトに付着した細胞の SEM 観察では、多くの細胞が形態を伸長し拡張していた。また、いずれの電解液温度においても細胞形態は類似していた。この結果から、コーティングしたアパタイトは細胞分化の促進を促すことが明らかとなった。コーティングメッシュ上の細胞増殖の測定において、付着した細胞数は、150℃ > 100℃ > 90℃の順に多く、時間の経過とともに細胞の増加がみられた。骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性とコラーゲン産生量の測定では、コーティングメッシュは、コントロールに比べ、初期において高い値を示した。オステオカルシン産生量の測定では、15日目において高い値を示した。

本論文は、水熱・電気化学的方法によりアパタイトコーティングしたチタンメッシュの *in vitro* における生体適合性評価を行ったものであり、アパタイトをコーティングしたことで、骨芽細胞様細胞の分化を促進することが明らかとなった。また、アパタイトの性状や形態による生体適合性への影響を調べた結果、アパタイトの結晶性が高い程、細胞の分化が低いことが認められた。これらの情報は、歯槽骨再生のための生体材料としてアパタイトコーティングしたチタンメッシュの応用を検討する上で、極めて有効な基礎情報を提供している。

よって、本審査委員会は、本論文が学位論文として十分に価値があるものと判断した。

最終試験の結果の要旨および担当者

様式 8

報告番号	歯研第129号	氏名	湯田 昭彦	
論文審査担当者	主査	和泉 雄一		
	副査	田中 卓男	長岡 英一	藤井 孝一

審査委員会は平成 17 年 12 月 12 日（月）、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めるとともに、これと関連した生体親和性を有する生体材料および細胞生物学的諸問題、手技や研究結果の解釈および骨再生誘導法との関連に関する事項について試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。

以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者としての学力と識見を有するものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに十分な資格をもつと判断した。