

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏名(本籍)	廣田正嗣(愛知県)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	甲第421号
学位授与年月日	平成26年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学位論文題目	Bone responses to zirconia implants with a thin carbonate-containing hydroxyapatite coating using a molecular precursor method (分子プレカーサー法を用いて作製した炭酸含有アパタイト薄膜コーティングジルコニアインプラントに対する骨反応) Journal of Biomedical Materials Research: PartB –Applied Biomaterials impress
論文審査委員	主査 教授 大井田新一郎 副査 教授 早川 徹 副査 教授 大久保力廣

内容の要旨

【緒言】

現在、インプラント材料としては、チタンあるいはチタン合金が使用されている。しかしながら、アバットメントとの摩耗によるイオンの流出やそれに伴うチタンアレルギー等が危惧されつつある。欧米ではインプラント体に部分安定化ジルコニアを利用した商品が臨床応用され始めた。部分安定化ジルコニアは、高い強度、靱性を有し、白色を呈するため審美性に優れ、アレルギー反応を惹起せず、さらにプラーク付着抑制効果も期待されることから、近年金属材料の代替としても注目されている。しかしながら、部分安定化ジルコニアがオッセオインテグレーションを獲得するか否かは未だ疑問点が多く、本邦においては臨床応用に至っていないのが現状である。

本研究は、歯科臨床に実用可能なメタルフリーインプラントの確立のため、骨適合性向上を目指して、部分安定化ジルコニアに分子プレカーサー法を用いて炭酸含有アパタイト(CA)薄膜コーティングを施し、その骨適合性について検討した。

【材料と方法】

実験試料として、ディスク状(ϕ 1.2 mm, 厚さ 1.0 mm, #1200 研磨)およびシリンダー状(ϕ 3.5 mm, 高さ 7.0 mm, プラスト+酸処理)の2種類の形状のイトトリア 3%添加型正方晶部分安定化ジルコニア(Y-TZP)を用いた。Y-TZP ディスクは薄膜のキャラクタリゼーションと擬似体液(SBF)浸漬実験に、Y-TZP シリンダーはインプラント埋入動物実験に供した。まず、EDTA-Ca 錯体にリン酸アンモニウム塩をCa/P比が1.67となるよう調整して分子プレカーサー溶液を作成した。Y-TZP ディスクおよびY-TZP シリンダーに分子プレカーサー溶液を塗布した後、酸素雰囲気下 600°C で2時間の加熱焼成を行い、CA 薄膜コーティングを形成した(CA-Y-TZP)。

CA 薄膜の表面粗さ、水に対する接触角、表面性状の走査型電子顕微鏡(SEM)観察およびエネルギー

分散型 X 線分析装置(EDX)による測定を行った。また、薄膜の形成状態、被膜厚さ、基材との密着性の評価のために、集束イオンビーム加工観察装置(FIB)を用いて薄膜の断面観察を行った。なお、FIB は CA 薄膜の損傷を防止できる観察方法である。X 線回折法(XRD)、フーリエ赤外分光法(FT-IR)によって、CA 薄膜の結晶構造や組成について解析した。

SBF 浸漬実験は、各ディスクを pH7.4 に調整したハンクス溶液 20ml 中に 37°C で 14 日間浸漬して行った。浸漬 1, 3, 7, 14 日後に試料を取り出し、析出した結晶の形態観察を SEM にて行った。また、結晶の析出状態を観察するために一部試料は、断面観察を行った。さらに、XRD、FT-IR を用いて析出した結晶の構造解析を行った。

動物実験として、Y-TZP および CA-Y-TZP シリンダー型インプラントをウサギの脛骨(皮質骨)および大腿骨関節(海綿骨)に埋入して新生骨の形成状態について調査委した(鶴見大学歯学部動物実験委員会: 承認番号 24A059)。インプラント埋入 11 週後にカルセインによる骨の蛍光ラベリングを行い、埋入 12 週後にインプラント試料を摘出して、ホルマリン固定、アルコール系列による脱水後、メチルメタクリレート樹脂にて包埋して、厚さ約 100 μm の非脱灰薄切研磨標本を製作した。共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)による蛍光ラベリングの観察後、塩基性フクシン・メチレンブルー重染色を施し、光学顕微鏡を用いてインプラント周囲の新生骨の形成挙動を観察した。また、画像解析ソフトを用いて蛍光標識長、骨-インプラント接触率(BIC)および骨量(BM)算出し、定量的評価を行った。

試料の表面粗さ、接触角は t 検定($\alpha=0.05$)を、蛍光標識長、BIC および BM は一元配置分散分析後、Bonferroni の多重比較($\alpha=0.05$)を用いて統計解析を行った。

【結果および考察】

各試料の表面粗さは、CA 薄膜コーティング前後で変化はなく、ぬれ性の向上のみが認められた。SEM 観察の結果、CA 薄膜の表面的にはクラックやピンホール等の欠陥は認められなかった。断面観察の結果、CA 薄膜の被膜厚さは 1.0 μm 以下であり、密着性、均一性に優れていることが判明した。また、FIB 加工により CA 薄膜の断面観察を損傷することなく鮮明に観察できることが示された。EDX、XRD および FT-IR による元素分析の結果、形成した薄膜は CA と確認された。

本研究で用いた分子プレカーサー法は、プレカーサー溶液に浸漬または滴定後、電気炉内で 2 時間の加熱焼成する単純な工程で 1 μm 以下の密着性に優れた CA 薄膜を形成することができ、従来から用いられているプラズマプレー法やマグネトロンスパッタリング法に比較して、操作が簡便かつ安価であり、また 3 次的に複雑な形態にもコーティングできる点で有利である。

SBF 浸漬実験では、浸漬初期において CA-Y-TZP ディスクの方が Y-TZP に比較し析出結晶の粒径が大きく、より球状に近似した形態の結晶が多数観察される傾向が認められた。断面観察の結果、CA-Y-TZP ディスクの方が Y-TZP に比較し結晶析出が多く、試料表面と析出結晶との接着面が隙間なくより均一であり、結晶内部に剝離や亀裂が少ない像が観察された。析出結晶の XRD および FT-IR 分析の結果、析出結晶が CA であることが確認された。

SBF 浸漬実験におけるアパタイト形成能が *in vivo* での動物埋入実験の骨形成能と相関することが報告されており、生体材料の骨形成能を評価するための予備実験として、SBF 浸漬実験が推奨されている。本研究においても SBF としてハンクス溶液を用い浸漬実験を行った結果、Y-TZP 上においても良好な CA 結晶の析出亢進が認められ、*in vivo* における良好な骨形成能が期待できる。

動物埋入実験では、インプラント埋入期間および標本摘出時にすべての動物において炎症反応は見

られなかった。カルセインによる新生骨形成の蛍光ラベリングを CLSM で観察した結果、脛骨、大腿骨ともに Y-TZP が CA-Y-TZP に比較し、インプラント周囲の新生骨形成が多い傾向が認められた。蛍光標識長の測定の結果 Y-TZP が CA-Y-TZP に比較し高値を示し、特に皮質骨埋入において統計学的有意差を認めた($p < 0.05$)。

光学顕微鏡による病理組織学的観察の結果、脛骨、大腿骨どちらの場合においても Y-TZP に比較して CA-Y-TZP の方がより多くの新生骨形成が認められた。BIC および BM の測定の結果、脛骨、大腿骨どちらの場合も、Y-TZP に比較し CA-Y-TZP において平均値で高い BIC と BM を認めた。特に大腿骨における BIC では、CA-Y-TZP の方が統計学的に有意に高い値を示した($p < 0.05$)。これらの結果は SBF 浸漬実験におけるアパタイト結晶析出状態の *in vitro* の結果と一致しており、CA 薄膜コーティングによって新生骨形成が誘導されたことが示唆された。

【結論】

分子プレカーサー法により Y-TZP 上に均一な CA 薄膜を形成することができた。擬似体液浸漬実験においては、アパタイト結晶の析出亢進が認められ、動物埋入実験においても Y-TZP 周囲に早期の新生骨形成を認め、良好な BIC および BM が得られた。以上、分子プレカーサー法を用いて作成したアパタイト薄膜コーティングジルコニアインプラントは、メタルフリーインプラントとして歯科臨床に適応できる可能性が示唆された。