

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

佐々木 敬介

論文題目

カルシウムイオン導入によるジルコニア表面の生体
活性化処理

I. 緒言

近年、ジルコニアはその優れた化学的安定性あるいは機械的強度、破壊靱性が大きいことなどから生体材料として用いられている。その応用は多岐にわたり、その一つとして、ジルコニア製インプラントが存在する。インプラント体としてはこれまで純チタン製インプラントの臨床例が多数報告されているが、アレルギーや審美的な問題への対応が求められており、このような問題を解決するために、インプラント体用の材料として、セラミックであるジルコニアが代替材料として注目されている。そして、ジルコニア表面の生体活性をより向上させるために、現在種々の表面改質方法が模索されている。チタンへの表面改質法は数多く存在し、カルシウムイオンの導入処理は生体活性に適した表面改質法としてよく知られているが、ジルコニアに対しカルシウムイオン導入処理を行なった方法は未だ報告されていない。本研究ではこの点に注目し、ジルコニアの生体活性を高めるため、表面にカルシウムイオンを導入する方法を開発し、さらにその表面性状の評価ならびに生体活性についての評価を行なった。

II. 材料および方法

1. 実験材料

試料はイットリア系ジルコニア (以下 Cercon) およびセリア系ジルコニア/アルミナ・ナノ複合材料 (以下 P-NANOZR) の半焼結体から切り出し、それぞれメーカー指定の温度により焼結した。

2. カルシウムイオン導入を行なったジルコニアの表面性状評価

1) 試料の作製

焼結したジルコニア表面にカルシウムイオンの導入を行なうため、前処理を以下のように行なった。はじめに、研磨装置にてダイヤモンドディスクを用いて面出しを行なった後、粒径 70 μm のアルミナを用いて表面にサンドブラスト処理を行なった。その後、試料をアセトン、エチルアルコールおよび蒸留水で各 10 分間超音波洗浄を行ない、室温にて自然乾燥させた。それら試料の表面に 0.5 mol/L に調製した酢酸カルシウム溶液を塗布、自然乾燥した後、それぞれ 1000、1100、1200、1350 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間の加熱処理を行ない、カルシウムイオンの導入を行なった。

2) X線回折

カルシウムイオン導入を行なった各加熱処理温度の試料表面の結晶相の同定を X 線回折装置にて行なった。

3) 3点曲げ試験

カルシウムイオン導入を行なったジルコニアの機械的強度を測定するため、電気機械式万能試験機を使用し 3 点曲げ試験にて評価を行なった。

4) ビッカース硬さ試験

マイクロビッカース硬さ試験機にて、カルシウムイオン導入後のジルコニアのビッカース硬さ (HV) を測定し機械的強度を評価した。

5) 電子プローブ X線マイクロ解析

作製した試料断面の元素の濃度特性を電子プローブ X 線マイクロ解析装置を用いて分析した。

3. カルシウムイオン導入を行なったジルコニアの生体活性評価

1) 試料の作製

鏡面研磨を行なった試料 (以下 Pol)、サンドブラスト処理を行なった試料 (以下 Sa)、1100°Cにてカルシウムイオン導入処理を行なった試料 (以下 Ca-inc) および 1100°Cにてカルシウムイオン導入処理を行なった後 37°Cにて 1 週間擬似体液 (以下 SBF) 中に浸漬した試料 (以下 Ca-incSBF) をそれぞれ調製した。Ca-incSBF は浸漬後、蒸留水にて洗浄を行ない自然乾燥させた。

2) 走査型電子顕微鏡による観察

Pol、Sa、Ca-inc および Ca-incSBF にプラチナ蒸着を行ない、走査型電子顕微鏡にて、反射電子組成像を撮影し観察を行なった。

3) 接触角測定

測定は Pol、Sa、Ca-inc、Ca-incSBF に加え、鏡面研磨後 37°C SBF に 1 週間浸漬させた試料 (以下 Pol-SBF)、サンドブラスト処理後同様の条件で SBF に浸漬させた試料 (以下 Sa-SBF) についても行なった。Pol-SBF および Sa-SBF は SBF 浸漬後、蒸留水にて洗浄、その後自然乾燥を行なった。接触角の測定は、蒸留水 5 μ L を試料表面に滴下 15 秒後に試料水平方向から撮影を行ない、 $\theta/2$ 法にて角度を求めた ($n=5$)。液体の滴下は試料上の異なる

3点で行ない、平均した値を接触角として求めた。

4) MC3T3-E1 を用いた細胞増殖試験による初期細胞接着の評価

Pol、Sa、Ca-inc および Ca-incSBF 上にて細胞増殖試験を行なった (n=4)。

細胞には、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた。試料は 24 ウェルマイクロプレートの各ウェルに静置後、エチレンオキシドガスにて滅菌した。細胞懸濁液は MC3T3-E1 を 1×10^5 cells/mL となるように調整し、各ウェルの試料上に 1000 μ L ずつ播種した。細胞増殖の測定は培養開始 1 日後と 9 日後に行なった。細胞増殖の測定には Cell Counting Kit-8 を用いた。

4. 統計処理

本実験結果の統計解析には Tukey 法による多重比較検定を行なった ($p < 0.05$)。

III. 結 果

1. X線回折

Cercon においては、1000°C 加熱処理後 CaO が検出され、1100°C 以上になると CaZrO₃ が認められるようになった。1350°C になると CaZrO₃ は検出されず、立方晶を示すピークが認められた。P-NANOZR の X 線回折図形では、1000 および 1100°C 加熱処理後 CaO が検出され、1200°C 以上になると CaZrO₃ が同定されるようになり、1350°C で立方晶を示すピークが認められた。

Cercon と異なり P-NANOZR はアルミナを含むが、アルミナとカルシウムイオンは反応しなかった。

2. 3点曲げ試験

Cercon では各温度で統計学的有意差は認められなかった。P-NANOZR の各温度における曲げ強さは同程度の値を示し、統計学的有意差は認められなかった。

3. ビッカース硬さ試験

Cercon では、1000℃加熱処理後の値がわずかに低下したが、その他の温度では有意差は認められなかった。P-NANOZR では各加熱処理温度において同程度の値を示し、有意差は認められなかった。

4. 電子プローブ X線マイクロ解析

FE-EPMA による試料断面の元素濃度を観察した結果、Cercon においてカルシウムが表面から内側にかけて分布している領域が検出された。加熱処理の温度が上がるにつれカルシウムの分布している領域は増加し、より深くカルシウムイオンが導入されていた。さらに温度の高い 1350℃での加熱処理後の断面解析では、カルシウムの分布する範囲がより深部にまで観察され、局所的にカルシウム濃度の高い部分も検出された。P-NANOZR においても同様に、加熱処理の温度が上昇するにつれカルシウム濃度の深部への領域増加が観察された。

5. 走査型電子顕微鏡観察

Cercon における Ca-inc の SEM 像では顆粒状の物質が観察された。Ca-incSBF の表面は Ca-inc と比較して明らかに異なり、浸漬後は表面の粒子が観察されなくなった。P-NANOZR においては、Ca-inc の SEM 像では、Pol において観察された粒子よりも大きな粒子が観察された。Ca-incSBF の表面は、Cercon と同様に浸漬前と比較して明らかな像の違いを示し、浸漬後は表面の粒子が観察されなくなった。

6. 接触角測定

Cercon および P-NANOZR の両試料とも、SBF に浸漬していない状態の Pol、Sa および Ca-inc の試料間で統計学的有意差は認められなかった。また、Pol および Sa 両試料において、各々浸漬前と浸漬後の接触角を比較して有意な差は認められなかったが、SBF 浸漬後の Ca-inc は Pol や Sa と比較してはるかに低い値を示し、Cercon では $7.5 \pm 1.5^\circ$ 、P-NANOZR では $4.2 \pm 0.6^\circ$ であった。

7. MC3T3-E1 を用いた細胞増殖試験による初期細胞接着の評価

Cercon において、培養 1 日後の Ca-incSBF では Pol、Sa、および Ca-inc より有意に細胞数が増加していた。培養 9 日後では、各試料間に有意な差は認められなかった。P-NANOZR においては、培養 1 日後では Ca-incSBF は Pol および Sa より有意に細胞数が増加し、培養 9 日後で各試料間に有意差は認められなかった。

IV. 考察

X線回折の結果より、1350°C加熱処理において Cercon および P-NANOZR 両試料は、 CaZrO_3 が分解され、立方晶が生成された。機械的強度の低下はみられなかったが、結晶相を正方晶の状態に保つことが困難であることから、1350°Cは加熱処理温度として不適切であると推定される。従って、本実験では適切な加熱処理温度として、1000、1100、1200°Cがあげられるが、温度が高温になることにより生じる立方晶生成の懸念、および加熱処理温度の不足によるカルシウムとジルコニアの反応不足が生じる懸念を考慮し、生体活性の評価には 1100°Cで加熱処理を行なったジルコニアを採用した。

ジルコニア表面の接触角について、インプラント表面のぬれ性は細胞の初期接着及びその後の細胞動態に重要な役割を果たすことが知られている。カルシウムイオン導入を行なった試料の接触角は SBF 浸漬前が Cercon で $64.0 \pm 7.2^\circ$ 、P-NANOZR で $46.0 \pm 6.5^\circ$ であったのに対し、SBF 浸漬後は Cercon で $7.5 \pm 1.5^\circ$ 、P-NANOZR では $4.2 \pm 0.6^\circ$ と親水性を示した。Pol および Sa においては SBF 浸漬前と浸漬後との比較で有意な差が認められず、Ca-inc においてのみ浸漬前後で著明な変化が認められた。その理由の一つとして、ジルコニア表層に固溶するカルシウムが、SBF への浸漬によりカルシウム水和物を生成し、その水酸基によって親水性が得られた可能性が考えられる。しかしながら、その検出については今後のさらなる研究が必要である。本実験における細胞増殖試験の結果より、培養 1 日目での Ca-incSBF 上の細胞数は、Cercon においては他のすべての表面処理条件より有意に増加し、

P-NANOZR においては Pol および Sa より有意に増加していた。即ち、親水性の表面が初期の細胞増殖に有利に働いたことが示唆される。従って、カルシウムイオン導入処理による表面ぬれ性の向上は初期の細胞接着に有効に働いており、生体親和性の向上に寄与すると考えられる。

V. まとめ

ジルコニア表面に酢酸カルシウム水溶液を塗布、加熱処理することによってジルコニア表層にカルシウムイオンが導入された。適正な加熱処理温度でのカルシウムイオンの導入はジルコニアの機械的強度を低下させることなく、生体親和性を向上することが示唆された。