

論文内容要旨

論文題目

紫外線オゾン処理によるハイドロキシアパタイトの高機能ナノバイオ界面制御

学位申請者 保田 啓介

ハイドロキシアパタイト (HAP) は、骨と直接結合する特徴から医工学分野で高く評価されているものの、生体界面における溶解度が低く、骨との結合に時間を要することが指摘されている。そこで、Abe *et al.* (2013) は、HAP 表面を 30%リン酸溶液で処理して Ca/P 比を変化させることで溶解性を高め、骨芽細胞の接着・増殖を促進できる生体活性化表面改質法を開発した。

一方、短波の紫外線 (UV-C : 波長 185nm/254nm) は、大気中の酸素よりオゾンを生成し、金属、高分子およびセラミックス材料に対して表面改質や汚染除去効果を有することから、近年、医工学分野への応用が進んでいる。この紫外線オゾン処理 (UV/O₃ 処理) は、チタンやジルコニアの生体活性を増強するとの報告があるものの、HAP では汚染除去効果に関する報告のみで、生体活性に係る効果は未だ明らかでない。

そこで、本研究の目的は、リン酸溶液で処理した生体活性化表面改質 HAP における UV/O₃ 処理による高機能ナノバイオ界面制御の効果を明らかにすることとした。

実験 1 : 未処理 HAP (iHAP) に対する UV/O₃ 処理の効果を検討した。試料 HAP プレート (10 mm×10 mm×2 mm) に対して、UV/O₃ 処理を専用の装置を用いて行った。処理時間は 0, 1 - 5, 10, 30, 60, 120 分とした。各試料について、X 線光電子分光装置 (XPS) による表面元素分析、走査型電子顕微鏡装置 (SEM) による表面観察、共焦点レーザー走査型顕微鏡装置による表面粗さ (Ra) 計測および接触角計による表面ぬれ性評価の表面科学的分析を行った。統計学的検討は、one-way ANOVA および多重比較 Tukey 法を用い、有意水準を 5%とした。

iHAP の Ca/P 比は処理前後で変化せず、一方、コンタミネーション由来の炭素 (C) 量は処理時間の増加に従って漸減し、処理時間 10 分で 10 atom%以下となり安定した。また、接触角は処理時間の増加に従い漸減し、処理時間 5 分で 10° と安定した。本結果より、iHAP に対する UV/O₃ 処理は、表面のコンタミネーションを除去し、ぬれ性を向上させることが明らかとなった。

実験 2 : 30%リン酸溶液で処理した生体活性化 HAP (HAP-30%PA) に対する UV/O₃ 処理の効果を検討した。HAP プレートを 30%リン酸溶液にて 25°C, 10 分間処理、超純水で洗浄し、HAP-30%PA を作製した。実験 1 と同様に UV/O₃ 処理した試料 (UV-処理時間 (分)-HAP) について表面科学的分析を行った。また、処理後の効果の持続性について、UV-5-HAP

における 1, 3, 5, 7 日後の表面ぬれ性を評価した。統計学的検討は、実験 1 と同様に行った。

iHAP と同様に Ca/P 比は処理前後で変化しなかった。コンタミネーション由来 C 量は処理時間の増加に従い漸減し、処理時間 5 分で 10 atom% 以下となり汚染除去効果が認められた。また、接触角は処理時間 5 分以降において 5° 以下となって安定し、UV-5-HAP のぬれ性は 7 日間変化せず安定していた。以上より、HAP-30%PA に対する至適処理時間は 5 分であることが明らかとなった。

実験 3 : UV/O₃ 処理した HAP-30%PA に対する骨芽細胞応答解析を行った。処理群 (UV-5-HAP) およびコントロール群 (UV-0-HAP) 上にマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を播種、培養した。細胞増殖能の評価では、WST-8 法により細胞播種後 1, 3, 5 日における吸光度を測定した。分化能の評価では、細胞を播種してコンフルエントに達した後、7, 14, 21 日における骨分化マーカー (ALP, Type I collagen, Osteopontin, Osteocalcin) の mRNA の発現レベルを定量 RT-PCR にて測定した。石灰化能の評価では、28 日にアリザリンレッド S 染色を行い、染色度を輝度にて評価した。統計学的検討は、one-way ANOVA および多重比較 Tukey 法、群間の比較には Student's *t* test を用い、有意水準を 5% とした。

細胞増殖能は、培養 3 日において処理群がコントロール群と比較し有意に増加し、培養 5 日でその差はさらに拡大した。分化能では、培養 14 日の Type I Collagen および Osteopontin の mRNA 発現量、また、培養 21 日の ALP および Osteocalcin の mRNA 発現量において、処理群がコントロール群と比較し有意に増加していた。さらに、石灰化能では、処理群がコントロール群と比較し有意に濃染していた。以上より、HAP-30%PA に対する UV/O₃ 処理は骨芽細胞成熟における細胞増殖、分化、石灰化をいずれも促進させることが示唆された。

以上、実験 1, 2 および 3 の結果より、UV/O₃ 処理は、生体活性化 HAP 表面において元素構成を変化させることなくナノレベルでの汚染除去効果を発揮し、そのぬれ性を制御することで骨芽細胞の増殖、分化、石灰化を促進させることが明らかとなり、高機能ナノバイオ界面制御としての効果が示唆できた。