

ナノ構造を用いた最近のインプラントフィクスチャー表面への 細胞接着における基盤構築 —各種顕微鏡からのアプローチ—

The Construction of Foundation in Cell Adhesion to Recent Implant Fixture Surfaces Using Modified Nanostructure: An Approach with Various Microscopes

梅田 誠, 田口 洋一郎
Makoto Umeda and Yoichiro Taguchi

大阪歯科大学 歯周病学講座

要旨 歯の喪失時の歯科治療の一つとしてインプラント治療があり、それについては約40年前、ブローネマルクが骨とチタンとの結合、すなわちOsseointegrationを提唱して以来、新しい局面を迎えている。最近のインプラントフィクスチャーはチタンの表面性状を様々な方法で制御することによってOsseointegrationをより早期に安定化させる。このことは、臨床上良い初期固定を得られる点で非常に重要である。チタンの表面性状を制御と一言で言っても様々な手法が試されており、細胞接着の観点からの基盤構築はその後の分化に至るまでの細胞挙動に影響を及ぼす。今回、チタン金属表面のナノ構造化など新規の表面性状の制御を検討する上で必要な要素について各種顕微鏡を用いて観察した。

キーワード：ナノ構造、インプラント、表面制御、チタン

1. はじめに

今日、歯の喪失に対する治療法の選択肢の一つとしてインプラント治療が普及している。そのインプラント治療の材料としてチタン系金属が用いられている。チタン (Titanium) やチタン合金 (Titanium alloy) は軽量、非磁性であり、優れた機械的特性を有し耐食性、低アレルギー性など生体親和性に富む金属である。また骨との間に顕微鏡レベルでの密着、いわゆるOsseointegration¹⁾を生じ、歯科および整形外科領域で広く利用されているバイオマテリアルである。通常、表面に数nmの薄い酸化膜すなわち酸化チタンが存在し、その酸化膜が安定しているため溶出や腐食などの現象が起こりにくくバイオマテリアルにとって非常に優れた環境となっている。

生体内においてのインプラント体埋入後の表面で起きる現象について、Kasemoら²⁾は次のように述べている。インプラント体の埋入後、最初に水が表面に吸着し水分子の二重層が親水性表面を形成し、塩素やナトリウム、カリウムイオンのような水和したアニオンやカチオンが表面の水の層に取り込まれ、その後タンパク質が吸着し細胞が接着する。その際の細胞接着は、表面に吸着したタンパク質のタイプと立体構造に依存する。細胞は、接着、増殖、遊走そして分化といった順で生命現象を営み組織を形成する。骨髄由来の間葉系細

胞や骨芽細胞は、チタン表面上でそのような生命現象を営むが、そのチタン表面の構造や化学的特性が細胞接着ひいては分化に至るまでの骨形成すなわちOsseointegration自体に重要な影響を及ぼすことになる³⁾。ここ最近はそのチタン表面の性状を制御することによってOsseointegrationの早期化や強固な安定化をめざす点で、各々のインプラントメーカーは従来の機械研磨削りだしのインプラントフィクスチャーではなく、粗酸化した表面でのインプラントフィクスチャーを開発・販売しているのが現状である。その粗酸化した表面に関しても、ここ最近の技術革新でナノメートル単位で金属表面を制御することでネットワーク構造を形成し歯槽骨とのbiointegrationの活性化に寄与している。

2. チタン金属表面の改質

チタン金属表面の改質の手法として、主に機械的、物理的、化学的の三方法に分類される。機械的方法は機械研磨やシリカ、ハイドロキシアパタイト、アルミナやチタニア粒子によるブラスト処理でチタンの表面粗さを制御するものである。物理的方法は溶射法やスパッタ法でチタン、チタニア、ハイドロキシアパタイトなどのコーティングを施すものや、イオン注入法でカルシウムイオンやフッ素イオンなどを表面に注入する方法がある。化学的方法は酸やアルカリで処理したり電界処理することで様々な酸化膜層を形成する方法やゾルゲル法などでセラミックスをコーティングする方法がある。

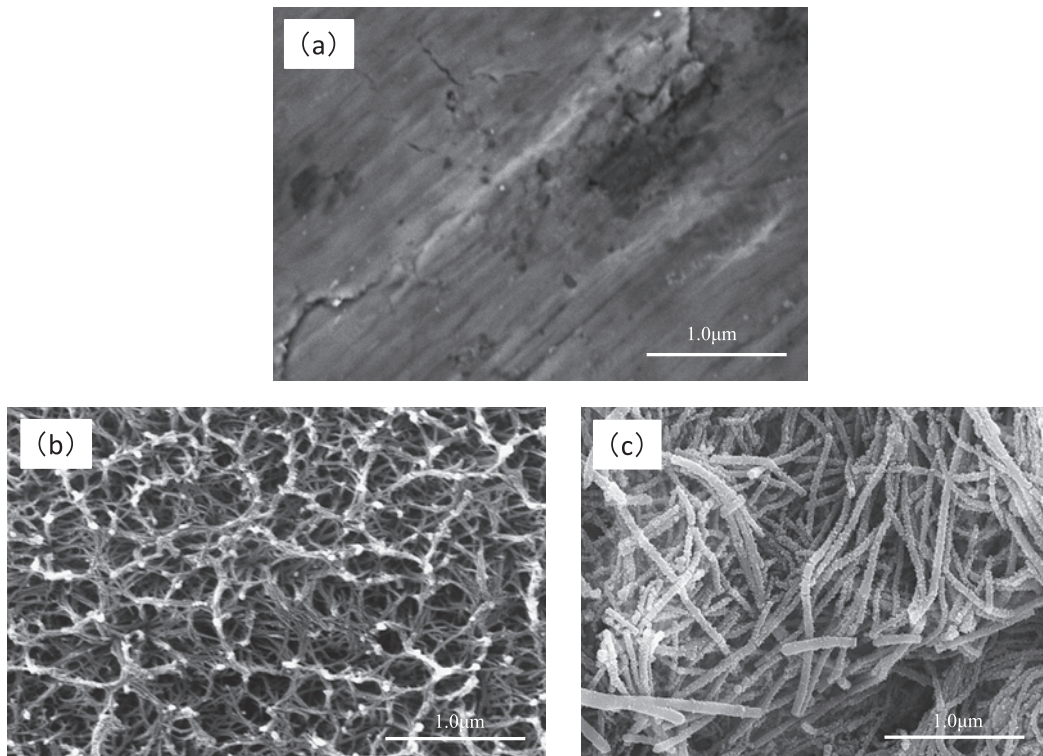
また表面改質後の表面粗さについても諸説あるが、

Gueheneeら⁴⁾はマクロレベル(10 μm～数mm)、ミクロレベル(1～10 μm)、ナノレベル(100～1,000 nm)に分類し、それぞれについて次のように述べている。インプラントフィクスチャーにおいて、マクロレベルでは初期固定や長期安定性に優れるが金属イオンの溶出やインプラント周囲炎のリスクを増加させる。一方、ミクロレベルでは歯槽骨とフィクスチャー表面の接触面積が増大し引き抜き試験に要するトルク値も大きくなりOsseointegrationの結合力も強くなっている。また細胞のサイズと同程度の10 μm程度の表面粗さが生体親和性に関して望ましいとも報告している。現在ではミクロレベルでの表面改質が市販のインプラントフィクスチャーに施されているが、Svanborgら⁵⁾はミクロレベルでスムーズであってもナノレベルでは必ずしもスムーズでなくフィクスチャー表面の特性とOsseointegrationの関係を理解するためにはナノレベルでの表面特性が関与するといわれている。我々は、東北大学多元物質科学研究所化学プロセス設計研究分野 関野徹准教授らが開発した室温化学合成法での酸化チタンナノシート(TNS)構造⁶⁾を用いて生体組織とナノレベルで相互作用することで生体適合性材料へ応用できるように細胞接着から分化に至るまでの基盤構築について各種顕微鏡を用いて観察を行った⁷⁾。次項においては、それらの成果を基に各種の観察方法を紹介したい。

3. チタン金属表面の改質の観察方法

3.1 走査型電子顕微鏡(Scanning electron microscopy; SEM)

最も古くから用いられ、ポピュラーな観察方法である。試料の表面構造を三次元的に観察するには有用な顕微鏡で、実体顕微鏡などとはちがひ、高い分解能で表面の繊細な超微細構造を表現する能力を有している。ここ最近では、コンピュータによる三次元画像分析や後に述べる走査型プローブ顕微鏡などの開発によりSEMの役割は終わったように思われがちだが、実際の画像解像度は極めて優れており緻密な構造を観察するには非常に重要である。チタン金属板上に前述の室温(30°C)で析出させたTNS構造と110°Cで析出させた酸化チタンナノチューブ(TNT)構造をSEM(S-4000, SHIMADZU, Kyoto)にて観察した所見を図1に示す。TNT構造ではチタン金属表面に内径5～7 nm、外形8～10 nmのチューブ構造が形成されていることが観察された。一方でTNS構造においては、チタン金属表面に析出されたナノ構造が網目状にネットワーク構造を形成していることが観察される。チューブ構造間にはチタン酸ナトリウムの結晶構造が見られ、ナノ構造の詳細な構造を精査するためにはSEMの使用は欠かせないものと思われる。尚、後に述べるが金属表面のみの観察



(Journal of Prosthodontic Researchより一部修正のうえ、転載)

図1 2級チタン金属板上に30°C、10 M水酸化ナトリウム水溶液にて析出させたTNS構造と110°Cの水酸化ナトリウム水溶液にて析出させた酸化チタンナノチューブ構造のSEM画像。TNS構造においてナノレベルの粗面がネットワーク構造を形成している。(a) 無処理のチタン (b) TNS構造を析出させたチタン (c) 酸化チタンナノチューブ構造を析出させたチタン

は様々な顕微鏡でも観察できるが、細胞播種後の表面と細胞の接着の両方を観察するには、なかなかSEMを上回る画像が得られないのが実状である。

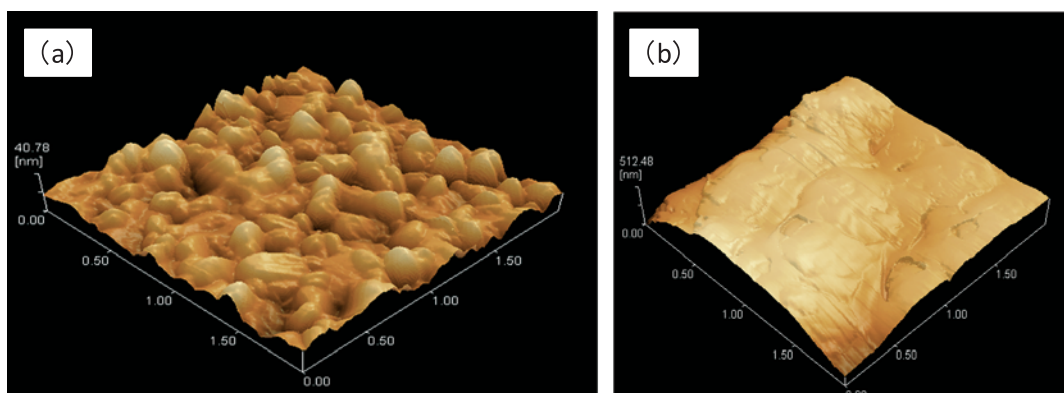
3.2 走査型プローブ顕微鏡 (Scanning probe microscope; SPM)

SPMはレンズのかわりに鋭い探針(プローブ)を用いて画像を得る顕微鏡の総称で、最もバイオイメージングに利用されてきている原子間力顕微鏡(Atomic force microscope; AFM)を中心に紹介する。AFMは探針を試料表面に近接させたときに探針・試料間の多様な物理量を用いて試料表面の情報を得ようとする顕微鏡であり、これまでの光学顕微鏡や電子顕微鏡とは一味違う顕微鏡で、様々な情報が得られるので有用である。特徴としては、試料表面の凹凸形状をきわめて高い分解能で解析することができ、XY平面だけでなくZ(高さ)方向の情報も数値として測定でき、導電性に関係なく観察可能なのでSEMの際に行う導電処理は不要で表面の直接観察が可能である。このAFMに試料-探針間に働く他の相互作用を同時検出することで、各種物性を画像化することができるようになったものをSPMと呼ぶ。SPM装置(SPM-9600, SHIMADZU)ではコンタクトモード・ダイナミックモードによる観察が可能で、主にダイナミックモードにて表面観察を行ってきた。コンタクトモードによる観察は試料表面を検出する探針(カンチレバー)の反り具合を検出する手法で、ダイナミックモードはカンチレバーを振動させる手法である。より高度な画像を得るためにはコンタクトモードによる画像を抽出すべきであるが、コンタクトモードは環境および凝集力による影響を受けやすく、TNS構造のような構造には不向きといえる。TNS構造についてSPMで観察し、三次元で表示した所見を図2に示す。表面の凹凸構造がナノメートルの単位で三次的に表現され、平均粗さ(Ra)を中心とする各種表面粗さについても算出される。TNS構造のAFMにおける観察ではナノレベルのノジュール構造によって形成され、約100nmのスケールであることが確認さ

れた。形状以外の情報を同時に得られることは他の顕微鏡とは違う大きな長所であるが、限界もあり観察できる試料が限られていることを理解しておくべきである。また、AFMの基本は探針で表面をトレースすることにあり、利用上で探針の制御に細心の注意が必要で、試料と探針を傷つけることのないように操作上十分な習練が必要である。また他の注意点として、三点ほど挙げられる。一つ目に観察したい金属板を基板(試料台)にしっかりと固定すること、二つ目に観察する表面の凹凸が数 μm 以内であること、三つ目に観察する表面に不純物など別の構造物が存在しないことである。

4. 細胞播種後のチタン金属表面への細胞接着とシグナル伝達に用いる顕微鏡による評価

細胞の成長・分裂には他の細胞やバイオマテリアルを中心とする基質への接着が必要である。細胞接着は、細胞の構造や形態、運動さらには増殖や分化に関与している。我々は前述のTNS構造を析出させたチタン金属板にラット骨髄細胞を播種し硬組織への分化を誘導すると、対照群の無処理のチタン金属板に比べて有意に高い誘導能を示すことを報告した⁷⁾。またそれはいわゆるチタン金属へのタンパクの接着そして細胞接着を契機に硬組織分化誘導を高めOsseointegrationの早期化に寄与することも報告している。その他、カリフォルニア大学ロサンゼルス校ワイントホープ研究所の小川隆広教授らはUV照射によってOsseointegrationを高めることを報告している⁸⁾が、表面性状の改質がタンパクや細胞の接着を高めOsseointegrationにつながることも報告している。下記に示す顕微鏡による観察によって細胞と基質との接着が視覚的に示すことができるが、その他、顕微鏡以外にタンパクを分離してウェスタンブロット解析を行ったり、目的タンパク質が細胞の表面抗原である場合はフローサイトメトリーを用いて細胞分布を解析することで細胞間の接着機構をより詳細に分析できることを付記しておきたい。



(Journal of Prosthodontic Researchより転載)

図2 TNS構造を析出させたチタン金属と無処理のチタン金属の表面のSPMによる観察。TNS構造を析出させたチタン金属ではnm単位の凹凸が三次元的に観察される。平均表面粗さ(Ra)はTNS構造を析出させたチタン金属では36.495nm、無処理のチタン金属では2.775nmであった。(a) TNS構造を析出させたチタン (b) 無処理のチタン

4.1 SEM

細胞接着後の伸展像がもっともわかりやすい観察方法である。TNS 構造を析出させたチタン金属板にラット大腿骨から抽出した骨髓細胞を播種して1日経過後の細胞のSEM 観察像を図3に示す。細胞突起の本数や細胞突起同士のネットワーク構造が対照群の無処理のチタン金属板より多く観察され、細胞播種直後より細胞活動にナノ構造が影響を及ぼしていることが示唆される。試料作製の際に、10%グルタルアルデヒドの前固定とオスmium酸による後固定の操作をしっかりと行うことが肝要である。

4.2 蛍光顕微鏡

細胞骨格を形成する主要なタンパク質であるアクチン線維を蛍光色素結合ファロイジンで染色して形態を観察することによって細胞接着を評価することができる。TNS 構造を析出させたチタン金属板にラット大腿骨から抽出した骨髓細胞を播種して6時間培養後の細胞骨格像を図4に示す。TNS 構造という構造因子により、細胞突起が時間の経過とともに

伸展している像が観察された。また細胞はバイオマテリアルなどの基質に接着する際、細胞膜が全面で直接接着するのではなく、接着斑というタンパク質の集合体で接着している。その接着斑関連タンパク質の大半は細胞質に存在し細胞外周で斑状に局在している。免疫組織化学染色の手法によって、その目的タンパクに対する抗体を一次抗体として用い、蛍光標識の二次抗体を用いれば蛍光顕微鏡もしくは共焦点レーザー顕微鏡で観察することができる。蛍光顕微鏡は、蛍光物質に特定の波長を照射、励起させた蛍光を観察するもので、膜成分、タンパク質、酵素、ヌクレオチドや特定の細胞小器官に蛍光物質と抗原抗体反応を用いて結合させることで観察することができる。一方、共焦点レーザー顕微鏡は蛍光顕微鏡の一種であるが、可視光の代わりにレーザー光線を用いピンホールを用いることでよりノイズの少ないコントラストの高い鮮明な画像で観察することができる。SEMと同様、試料作製の際の固定操作は大変重要であるが、目的タンパクの破壊につながる行為を慎まなければならない。SEMと違い

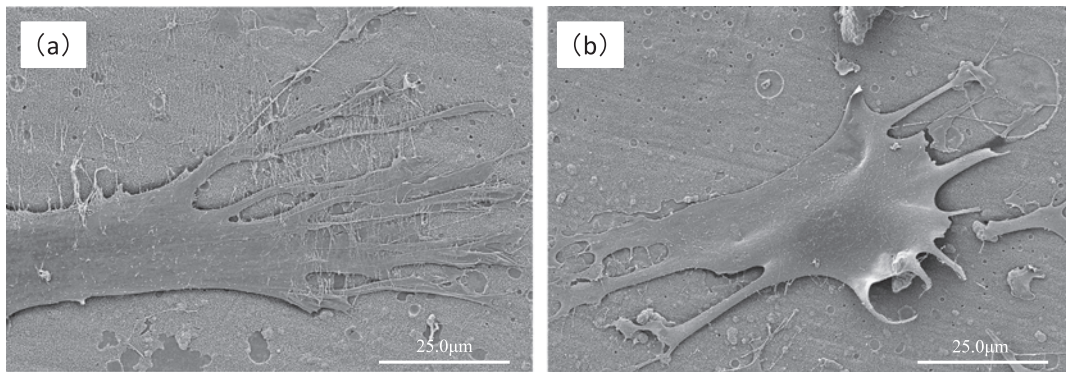


図3 TNS 構造を析出させたチタン金属板と無処理の金属板にラット骨髓細胞を播種して1日後のSEMによる観察。細胞の伸展像がともに認められるが、細胞棘の多さと細かな伸展像がTNS 構造を析出させたチタン金属板には認められる。(a) TNS 構造を析出させたチタン金属上の細胞 (b) 無処理のチタン金属上の細胞

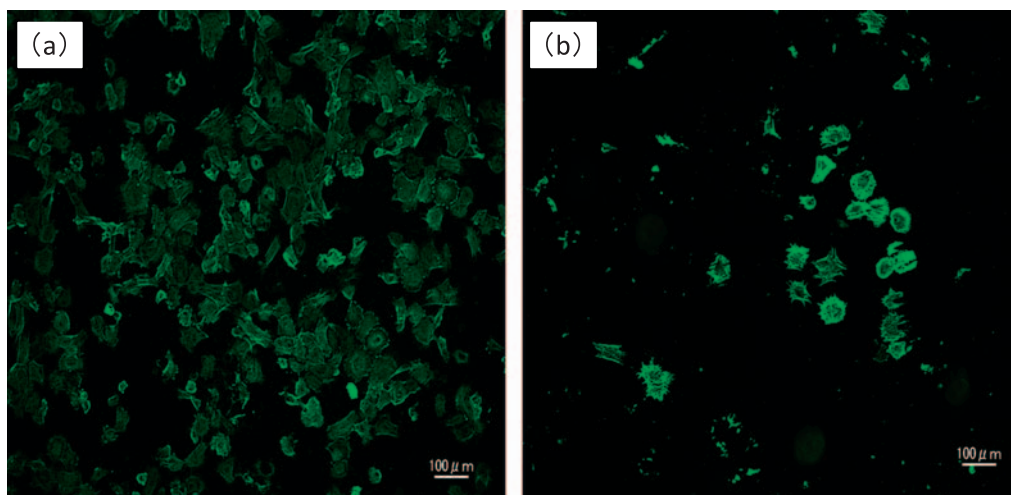


図4 チタン金属表面の蛍光顕微鏡による形態観察。上から順番に細胞をそれぞれのチタン金属板上に播種してから6時間培養後の細胞骨格を蛍光色素結合ファロイジンで染色して蛍光顕微鏡にて観察を行った。TNS 構造を析出させたチタン金属に播種した細胞のほかに顕著な接着斑が認められた。(a) TNS 構造を析出させたチタン金属上の骨髓細胞 (b) 無処理のチタン金属上の骨髓細胞

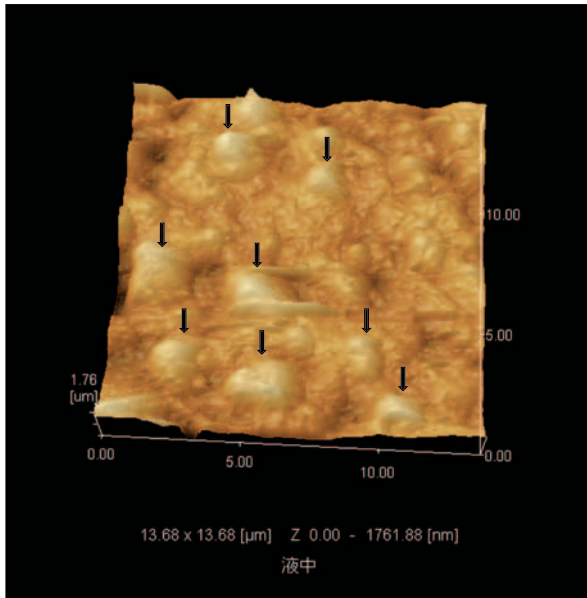


図5 ラット骨髓細胞をTNS析出チタン金属表面に播種し1時間培養後のSPMによる観察。μm単位であるがTNS構造とは違う凹凸構造が観察される(↓で記す)。本構造は培養細胞の骨格形態を示したものであると思われる。

固定操作は1回である。固定液としては目的タンパクの保護の観点から冷メタノール、固定強度の観点から37°C、4%パラホルムアルデヒドを用いることが望ましい。

4.3 SPM

細胞播種後のチタン金属表面への細胞接着を観察する場合、SPMは適していないかもしれないが、SPMは静的な物性を観察するもので動的な物性を観察するには適していなかった。しかしながら、前述したコンタクトモードを応用することで、水中という静電気の影響を受けにくい環境でのSPMでの細胞観察が可能になる。今回、TNS構造を析出させたチタン金属面に細胞を播種して1時間培養後のSPMでの観察を試み、得られた画像を図5に示す。今日まで培養生細胞をSPMで観察した報告は少なく、インプラント材料表面に関する研究という点では極めて少ない。したがって、観察された画像が培養細胞であるかどうかは明確ではないが、画像より得られた凹凸のスケールが報告されている細胞のスケールと同等であり、培養液中の細胞をSPMにて観察する有用性がこれからより認められていくのではないかと考えられる。また、この方法をさらに応用することでフォースカーブ(カンチレバーのたわみという特性を生かして試料表面の吸着力および緩和力の測定ができる)を測定することが可能で、TNSと培養細胞の吸着力についても今後の研究課題として期待できる。

5. おわりに

今回、インプラントフィクスチャーの早期の安定化を目的にチタン金属表面の性状制御をトピックに、臨床への商品化に向けて顕微鏡という観点から研究のファーストステップについて紹介した。骨結合型インプラントはブローネマルクが発表して以来約40年経ち、様々な形へと変貌を遂げようとしている。インプラント周囲炎を中心として臨床上の問題点などが指摘され始めており、表面性状も単に構造の改質だけでなく、抗菌化など様々な機能を付加されようとしている。また金属アレルギーの観点からも、チタンのみではなくジルコニアなどの非金属材料でのインプラントフィクスチャーの商品化も現実味を帯びる中で、様々な顕微鏡を用いての細胞の基質に対する基盤構築を解明することは非常に有用であり、今後も必要不可欠な方法だと考える。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は平成24年度日本私立学校共済事業団 学術振興資金、平成24年度日本学術振興会 科学研究費学術研究助成基金助成金(若手研究(B)(24792345)、基盤研究(C)(24592942))ならびに大阪歯科大学口腔インプラント研究委託金(12-3)を用いて行い、玉置敏夫名誉客員教授、北条博一客員教授にお礼申し上げます。尚、本研究について大阪歯科大学欠損歯列補綴咬合学講座 小正聡博士のご助力を賜ったことに心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Branemark, P.I., Hansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J. *et al.*: *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 11(suppl)16, 1-132 (1977)
- 2) Kasemo, B. and Gold, J.: *Adv. Dent. Res.*, 13, 8-20 (1999)
- 3) Dalby, M.J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M.O., Herzyk, P. *et al.*: *Nat. mater.*, 6(12), 997-1003 (2007)
- 4) Guehenne, L.L., Soueidan, A., Layrolle, P. and Amouriq, Y.: *Dent. Mater.*, 23, 844-854 (2007)
- 5) Svanburg, L.M., Andersson, M. and Wennerberg, A.: *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 92B, 462-469 (2010)
- 6) Miwa, T., Nishida, H., Egusa, H., Park, D.J., Sekino, T. and Tanaka, S.: The 21st JAPS-KOSEF Core University Program (CUP) Seminar between Japan and Korea 36 (2008)
- 7) Komasa, S., Taguchi, Y., Nishida, H., Tanaka, M. and Kawazoe, T.: *J. Prosthodont. Res.*, 56, 170-177 (2012)
- 8) Aita, H., Att, W., Ueno, T., Yamada, M., Hori, N., Iwasa, F., Tsukimura, N. and Ogawa, T.: *Acta. Biomater.*, 5, 3247-3257 (2009)