

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592266

研究課題名(和文) インプラント/生体組織界面のナノレベル解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of sample making-method to observe the interface between dental implant and biological tissue on Nano scale

研究代表者

白井 肇 (SHIRAI HAJIME)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：00263591

研究成果の概要(和文)：

インプラント/生体組織界面におけるナノレベルの結合様式については、未だ全く明らかになっていない。従来の試料作製法では、インプラントと骨が剥離するため、電子顕微鏡レベルでのインプラント/生体組織界面の観察は極めて困難であった。

本研究の結果、アルゴンイオンによるイオン研磨法と Focused Ion Beam (FIB) による試料作製法との組み合わせによって、観察部位を特定した上で、電子顕微鏡レベルでのインプラント/生体組織界面を、破壊しないまま観察することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：

It is not clarified of the uniting style on implant/biological tissue interface on Nano scale still at all. Because the implant and the bone flake off in a past sample making method, the observation on implant/biological tissue interface at the electron microscope level was extremely difficult.

Observing it without destroying implant/biological tissue interface at the electron microscope level as a result of this research after the observation part had been specified by the combination with the sample making method with the argon ion by the ion grinding method and Focused Ion Beam (FIB) became possible.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：インプラント，界面，歯学

## 1. 研究開始当初の背景

インプラントと骨との接合をより早期に獲得する方法を開発するためには、接合界面の詳細な分析が必要不可欠である。チタンと骨との界面はオッセオインテグレーションと呼ばれる結合様式をとっており、光顕レベル(ミクロンレベル)で骨組織が直接インプラントに接触していることが明らかになっている。また、サブミクロン(数10~数100nm)レベルでは骨組織はインプラント表面に直接接触しておらず、Biofluidなどの透明層が介在することが報告されている。しかしながら、インプラント/骨界面におけるナノレベルあるいは分子レベルの結合様相については、界面を破壊せずに試料(厚さ70nmの超薄切片)を作製することが技術的に困難であったため、全く解明されていなかった。そこで本研究では、工学分野の先端試料作製技術を生物試料に応用することにより、界面を破壊せずにTEM観察用の超薄切片を作製する技法を確立することを考えた。

## 2. 研究の目的

インプラント/生体界面をナノレベルで解析するためには、それぞれの分析手法に応じた試料を、界面にダメージを与えずに作製する必要がある。そこで本研究では、両者の接合界面を透過電子顕微鏡TEMにて観察するため、イオンスライサ法など近年開発された試料作製法を応用し、界面を破壊せずに電子顕微鏡下での観察試料を作製する技法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験1 観察条件の設定

イオンスライサは、アルゴンイオンを低角に照射することにより試料のダメージを最小限に抑えながら超薄切片を作製するための装置である。

また、FIB (Focused Ion Beam) とは、数 nm~数 100nm 径に集束した Ga イオンのイオンビームを試料表面に照射することによって、Ga と共に試料表面を構成している原子や分子が真空中にはじき出されるスパッタリング現象を応用したエッチングを行うことで、サブミクロンの精度で特定個所に平滑な断面を作製することが可能な技術である。

チタンプレート上に、光重合性樹脂製の凸版を用いて、骨誘導タンパク(BMP-2)などのサイトカインを固定化した光反応性ゼラチンをプリントした上に、培養細胞を播種し、培養後、樹脂包埋した包埋試料と市販のインプラント体2種類(ハイドロキシアパタイトコーティングされたカルシテックのインプラントおよびチタン表面にタイユナイトという表面処理を施したノーベルバイオケアのインプラント)とを、上記2つの技術を用いた観察条件の設定のための試料として用いた。

### (2) 実験2 動物実験

14週齢のラットを、1週間の馴化後、全身麻酔下にて、ラットの両側脛骨にチタニウム合金製のインプラントを埋入した。インプラント埋入5週後、岡山大学動物実験規則に従って、安楽死させ、両側の脛骨を採取した。採取した頸骨は、通法に従ってTEM観察用に固

定、包埋し、超薄切片作製法のための試料を作製した。試料作製には、実験1において確立した試料作製法を用いた。すなわち、アルゴンイオンビームとイオンビームの遮蔽板を用い、試料の断面を無歪でイオン研磨できる日本電子製クロスセクションポリッシャ

(SM-09020CP、日本電子)を用い、作製した断面観察試料をFE-SEM (JSM-6701F, 日本電子) 下で観察した。その後、観察部位を特定した上で、工学分野の試料作製先端技術である Focused Ion Beam (FIB) による試料作製を行い、TEMにてインプラント/生体組織界面の観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験1の結果

チタンプレート上に、培養細胞を播種・培養後、樹脂包埋した包埋試料を、イオンスライサで観察部位を特定した上で、FIBによる試料作製をすることによって、TEMにてチタンプレート/細胞間をナノスケールで観察することが可能であったことから、イオンスライサで観察部位を特定した後、FIBによる試料作製を行う手順を確立することができた。

また、同じ試料作製手順を用いて、市販のインプラント体を用いて、チタン合金とチタン合金の表面処理技法であるハイドロキシアパタイトならびにタイユナイト間との界面観察を行った。

その結果、ハイドロキシアパタイトのコーティング層は約 50 ミクロンから 200 ミクロンの厚さがあり、ネジ山の底の部分は厚くなっており、コーティングは均一とはならず、陥凹部には約 200  $\mu\text{m}$  のハイドロキシアパタイトの厚い層が観察できた。また、表面処理されたハイドロキシアパタイト層には多数の亀裂が入り、その一部にはエポキシ樹脂

が入っているのが観察された。エポキシ樹脂が迷入している亀裂は、組織処理の過程で入った亀裂ではなく、包埋の時点から入ったものと解釈されるため、クラックが表面からインプラントとの界面付近まで繋がっていることが推察された。

一方、タイユナイトの断面観察からは、表面処理層の厚さが約 20 ミクロンでほぼ均等に表面処理されている様子が観察された。さらに高倍で観察すると、表面処理層間で組織処理過程による問題と推察される剥離が観察され、大部分の場所では数ミクロンのインプラントに強固に結合した表面処理の部分と剥離してしまったその他の部分に分かれていた、元素分析を追加して行った結果、TiUnite の表面は硫酸系溶液中での陽極酸化の後、リン酸系溶液中での陽極酸化の2段階の工程をとっていることが推察され、今回の組織処理過程での剥離は、この2つの酸化層の間で生じたものと考えられた。

チタン合金においても、本手技を用いれば、従来の熟練と時間を要する機械研磨による方法に比較して、簡便に試料作製ができ、効率的に電界放射型走査電子顕微鏡 (FE-SEM) 下で、高分解能観察(10 万倍~25 万倍)を行うことができることが示唆された。

そこで動物実験へと移行した。

##### (2) 実験2の結果

イオンスライサを用い、作製した断面観察試料を FE-SEM 下で観察した結果、インプラントと生体組織との間に剥離は認められなかったため、観察部位を特定した上で、FIBによる試料作製を行い、TEMにてインプラント/生体組織界面の観察を行った。その結果、表面処理されたチタン表面と生体組織はナノレベルの観察においても隙間なく密着し、その界面には層状ならびにドーム状の構造

物が確認された。チタン表面の層状ならびにドーム状の構造物については、元素分析の結果、骨である可能性が高いと思われるが、層状の構造物とドーム状構造物との関連については全く未解明で、今後一層の検索が必要である。このように、本研究の結果から、今まで全く解明されていなかったインプラント/生体組織界面ナノレベルでの観察が可能となった。

### (3) 結果のまとめ

本研究の結果、使用するインプラントによっては、表面処理の厚さが厚く TEM 観察にはむかえないことが明らかとなったものの、アルゴンイオンによるイオン研磨法と Focused Ion Beam (FIB) による試料作製法との組み合わせによって、目的とする観察部位を特定した上で、TEM 観察レベルでのインプラント/生体組織界面を、破壊しないまま観察することが可能となった。

本手技は、従来の熟練を要する機械研磨による方法に比較して、簡便に試料作製ができ、効率的に高分解能観察を行うことが可能であることから、世界的にみても、今まで解明されていなかったインプラント/骨界面におけるナノレベルあるいは分子レベルでの、オッセオインテグレーションの獲得メカニズム解明への第一歩となると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 武田宏明, 白井 肇, 長岡紀幸, 岡 祐佳, 鈴木康司, 河野隆幸, 鳥井康弘, 高分解能走査電子顕微鏡によるインプラント表面の観察, 第 3 回総合歯科協議会・学術大会, 2010 年 11 月 7 日, 九州大学歯学部教育交流プラザ
- 2) 白井 肇, 武田宏明, 長岡紀幸, 吉田靖弘, 坂本隼一, 原 哲也, 河野隆幸, 鈴木康司, 皆木省吾, 鈴木一臣, 鳥井康弘, 高分解能走査電子顕微鏡によるインプラント/生体組織界面の観察, 第 31 回岡山歯学会総会・学術大会, 2010 年 9 月 26 日, 岡山大学歯学部 第一講義室

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白井 肇 (SHIRAI HAJIME)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号: 00263591

### (2) 研究分担者

鳥井 康弘 (TORII YASUHIRO)  
岡山大学・岡山大学病院・教授  
研究者番号: 10188831  
皆木 省吾 (MINAGI SHOUGO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 80190693