

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2005～2008

課題番号：17592026

研究課題名（和文） インプラント・骨ナノインターフェイスの分子レベルにおける解明

研究課題名（英文） Analysis of the nano-interface between implant and hard tissue

研究代表者

長岡 紀幸（NAGAOKA NORIYUKI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70304326

研究成果の概要：

失った歯を補う治療法として、人工歯根（インプラント）を用いる手法が一般的になってきた。インプラント治療は、インプラントと骨との結合が得られるまで数ヶ月の治療期間が必要である。早期の骨結合を可能とするインプラント開発には、インプラントと骨との界面をナノスケールで解析する技術が必要である。本研究では、従来困難とされてきた、インプラントと生体組織との界面を電子顕微鏡観察できる試料作製法を開発し、界面の直接観察を可能とした。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2005年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 2006年度 | 900,000 | 0 | 900,000 |
| 2007年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2008年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 450,000 | 3,950,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：インプラント、界面、断面 TEM 観察、表面処理

1. 研究開始当初の背景

我が国は超高齢化社会を向かいつつあり、今後、高齢者へのインプラント治療の果たす役割は益々重要になると考えられる。しかしながら現在のインプラント治療は、骨結合が得られるまで数ヶ月の治療期間が必要であることから、その間に生じる筋力の低下や患者の自立心の喪失が社会復帰を妨げる要因になることが指摘されている。

インプラント治療において、早期のオッセオインテグレーションを目指すためには、イ

ンプラント・骨のナノインターフェイスにおける分子レベルの結合様相を明らかにする必要があるが、この分野での研究報告は見当たらない。チタン表面への骨芽細胞接着様相の分子レベルでの基礎的データに立脚した本研究は、早期のオッセオインテグレーションを獲得できる治療法の確立への第一歩となりうる。さらに、初期骨形成能の高い表面性状を有した新しいチタンインプラントの開発につながり、オッセオインテグレーション獲得までの期間短縮はもちろんのこと、生

体活性の低下した高齢者や一部の有病者にも適応の拡大が期待できる。

2. 研究の目的

インプラントと生体組織との界面をナノスケール、分子レベルで分析する技術を検討することにより、現在、様々な研究機関にて開発されているオッセオインテグレーション早期獲得のためのインプラント表面処理法を評価するためのナノインターフェイス解析技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) セルディスク上で培養された細胞の観察

電子ビーム蒸着法によりチタン蒸着したセルディスクを作製した。チタン蒸着したセルディスク上にフォトリソグラフィ法によりマイクロパターンを作製して、細胞培養した。

マイクロパターンには、光硬化性ゼラチンに骨誘導蛋白 BMP-2 を添加した。光硬化性ゼラチンと BMP-2 混合溶液を、エキシマ UV で表面洗浄したチタン蒸着セルディスクに滴下し、乾燥させた。縞状パターンのマスクを重ねて紫外線照射して光硬化性ゼラチンを硬化させた。未硬化部を蒸留水中で超音波洗浄した。

細胞培養後のセルディスクは位相差顕微鏡観察、および断面 TEM 観察した。断面 TEM 観察は、セルディスク、チタン蒸着膜、培養細胞を同時に薄膜化する必要があるために、新たな断面試料作製法を開発した。断面 TEM 観察試料作製には、日本電子社製のイオンスライサ (EM-09100IS) によるアルゴンイオン研磨法を用いた。

(2) 表面処理されたインプラント表面の解析

インプラントは、早期のオッセオインテグレーション獲得、歯肉との接着性強化などを目指して、様々な表面処理が行われている。各種表面処理されたインプラント表面の断面 TEM 観察による解析を行った。試料作製には、イオンスライサによるアルゴンイオン研磨法を用いた。

(3) インプラント/骨界面の TEM 観察

インプラントに見立てたチタン製のテストピースをマウス大腿骨に埋入し、一定期間飼育し、テストピース周辺に骨再生させた。イオンスライサによるアルゴンイオン研磨法により、インプラント/骨界面を断面 TEM 観察できる試料作製法の開発を試みた。得られた試料を TEM 観察した。

4. 研究成果

(1) セルディスク上で培養された細胞の観察

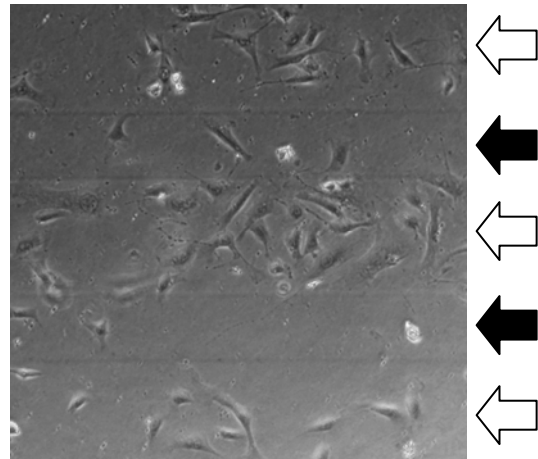


図1 マイクロパターン上で培養された細胞の位相差顕微鏡像

◀ : 光硬化性ゼラチン+BMP-2 の硬化物が存在する領域

◻ : 光硬化性ゼラチン+BMP-2 が洗浄された領域

察

セルディスクへのチタン蒸着は、樹脂製のセルディスクへの熱ダメージを考慮する必要がある。セルディスクへのチタン蒸着が可能な手法は、電子ビーム蒸着法、マグネトロンスパッタ法が推奨できる。いずれにしても、セルディスクの熱ダメージには注意する必要がある。

電子ビーム蒸着法により、セルディスクにチタン蒸着した。さらにフォトリソグラフィ法により光硬化性ゼラチンと骨誘導蛋白 BMP-2 混合物によるマイクロパターンを作製して、細胞培養した。図1は細胞培養後の位相差顕微鏡像である。光硬化性ゼラチンと BMP-2 硬化物の存在する帯よりも、洗浄された領域に細胞の接着、増殖が確認できた。光硬化性ゼラチンで固定された BMP-2 が存在する領域よりも、チタン表面が露出した領域の方が細胞接着、増殖が優位であることが示唆された。マイクロパターンの作製法を考慮すると、図2に示すように、光硬化性ゼラチンと BMP-2 が洗浄された領域にも、分子レベルで光硬化性ゼラチンと BMP-2 がチタン表面に吸着して残っていると考えられる。このた

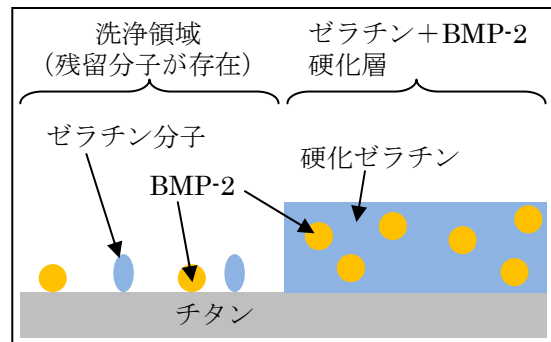


図2 マイクロパターン構造の予想

め、光硬化性ゼラチンで固定された BMP-2 よ

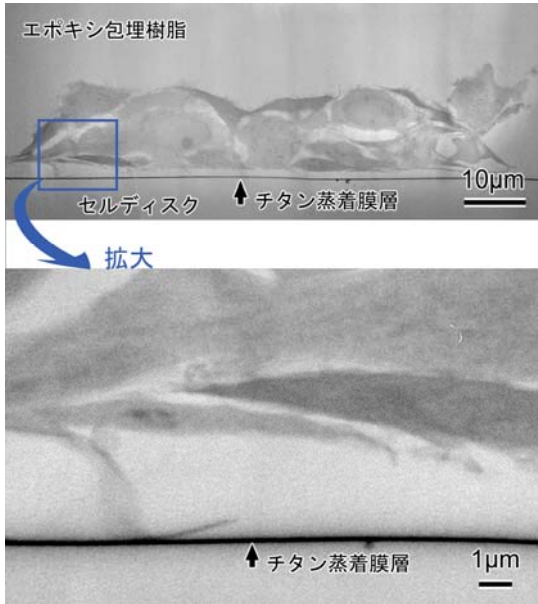


図3 チタン蒸着されたセルディスク上で培養された細胞の断面 TEM 像

りも、チタン表面に吸着し、僅かに残ったフリーな状態の BMP-2 の方が細胞接着、増殖に大きく寄与したと考えられる。

チタン蒸着したセルディスク上で細胞培養された試料を断面 TEM 観察する手法を開発した。この試料を断面観察するためには、セルディスク、チタン蒸着膜、培養細胞を同時に薄膜化する必要がある。断面 TEM 観察試料作製のためには、培養細胞はエポキシ樹脂で包埋するが、3 種類の材料間で硬さ、延性などが異なるために、ダイヤモンドナイフによる薄切が困難である。このため、培養細胞をエポキシ樹脂包埋後、基板との界面で剥離させ、再包埋後に薄切し、断面 TEM 観察されてきた。本手法は、培養細胞をエポキシ樹脂包埋後、精密切断、機械研磨により前加工し、アルゴンイオン研磨することにより、界面近傍を断面 TEM 観察可能な試料を作製した。本手法を用いれば、ガラス、セラミクス、金属製の細胞培養プレート上で培養され細胞をプレートと同時に薄膜化でき、断面 TEM 観察できる。このため、細胞接着層の界面を断面観察できる。図3は本手法により断面 TEM 観察試料を作製し、TEM 観察した結果である。細胞培養試料は上記のマイクロパターン上で培養された細胞である。培養細胞は 2% グルタルアルデヒド + 2% パラホルムアルデヒド固定のみであり、オスミウム後固定を施していない。さらに、薄膜化後、2 重染色していない。オスミウム後固定は、この断面 TEM 試料作製法でも、問題なく行えるが、2 重染色は行えない。これは、イオン研磨のダメージ層が数 nm 存在することに起因し、イオン研磨された試料を 2 重染色することのコンセン

サスが得られていない。しかしながら、培養細胞のコントラスト向上は、TEM 観察において暗視野法の利用または、エネルギーフィルター TEM (EF-TEM) によるエネルギー損失電子像の観察で解決できる。

オッセオインテグレーション早期獲得のために、BMP-2 などのサイトカインをインプラント表面に固定する研究が行われている。本研究の結果は、光硬化型ゼラチンで固定化された BMP-2 よりも、チタンに吸着した BMP-2 の方が細胞接着、増殖に効果を発揮した結果を示した。サイトカインの固定化法に注意する必要があることを示す結果と考えられる。断面 TEM 観察試料作製法については、様々な材料上で細胞培養する基礎研究において、材料と培養細胞の界面を断面観察できる手法を開発できた。インプラント開発において、各種材料と培養細胞との界面観察は、今後ますます重要になると考えられることから、これらの研究に有用な基礎技術を開発できた。

(2) 表面処理されたインプラント表面の解析
インプラント表面に施される表面処理は材料学的な構造解析、生体適合性、生体安全性評価など、ナノスケールの分析、解析が必

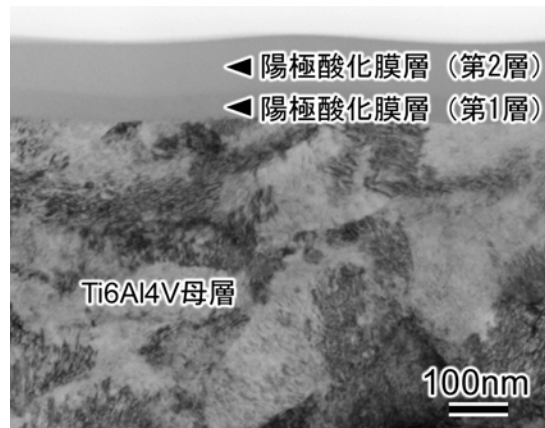


図4 陽極酸化されたインプラント表面の断面 TEM 像

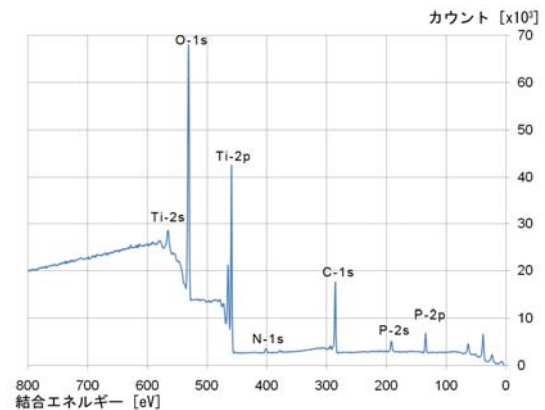


図5 陽極酸化処理されたインプラント表面の X 線光電子分光スペクトル



図6 熱処理されたインプラント表面の断面 TEM 像

要である。インプラント表面処理を解析するために、断面 TEM 観察した。イオンスライサによる断面 TEM 観察試料作製法は、高分解能観察が可能なまでに薄膜化でき、さらにイオン照射によるダメージ層の形成が数 nm 以下であるため、観察、分析に悪影響がほとんどない。この手法を用いて、各種表面処理されたインプラント表面構造を解析した。

図4は陽極酸化処理された Ti6Al4V 合金製インプラントのスクリー部を断面 TEM 観察した結果である。本研究に用いたインプラントは、陽極酸化により形成される酸化膜層が2層に分かれること、酸化膜層はアモルファスであること、チタン合金母層に接する酸化膜層（第1層）にはチタン合金母層の結晶粒が存在すること、表面層には陽極酸化の処理液に含まれるリンを含むこと、さらに酸化膜層と母層の間に陽極酸化前の洗浄操作（酸洗い）による数 nm のフッ化物層が存在することが明らかになった。また、図5に示すように、インプラント表面の X 線光電子分光分析（XPS）により、最表面には Al（アルミニウム）、V（バナジウム）が存在しないことが明らかになった。特に V は生態への影響が不明な点が多い。さらに、WHO は V の発ガン性について、「ヒトに対して発ガン性の可能性がある」と分類している。インプラント表面に V が存在しないことは、生体安全性において有益な結果である。陽極酸化処理は、現在市販されているインプラントの表面処理に多く用いられる方法であることから、他の陽極酸化処理されたインプラントの評価にも、本研究の手法が応用できる。

上記とは別のインプラント表面処理が施された試料の構造解析を行った。純チタン表面を酸化処理してチタニアゲルを作製し、熱処理により結晶化させたものを試料とした。図6は断面 TEM 観察結果である。試料作製にはイオンスライサを用いた。純チタン母層表面にチタニアの結晶層が存在し、その上にヒゲ状のチタニアが存在する構造が明らかに

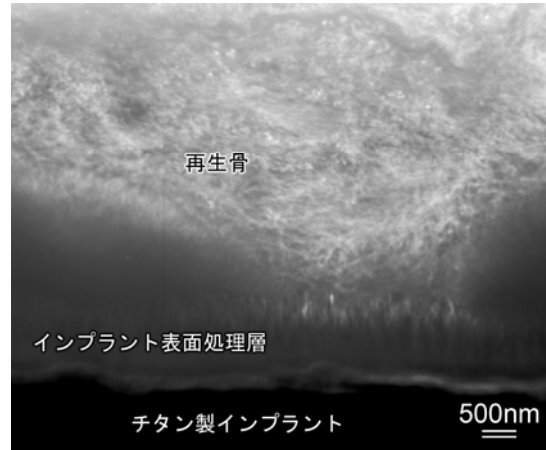


図7 インプラント/骨界面の断面 TEM 像

なった。このインプラント表面処理法を用いてチタン製のテストピースを作製し、動物実験を行った。インプラント/骨界面を断面 TEM 観察した。この結果は、以下の(3)に示す。

インプラント表面の断面 TEM 観察は、表面処理された層とインプラント母層の界面を直接観察できる。本研究に用いた手法は、イオンスライサによるアルゴンイオン研磨法で、高分解能観察や各種分析をするのに十分な膜厚に薄膜化できる。さらに、薄膜化により、界面の剥離が起きやすい試料に対しても応用可能である。本手法は、インプラント表面処理法の開発において有用といえる。

(3) インプラント/骨界面の TEM 観察

インプラント/骨界面を断面 TEM 観察できる試料作製法を開発した。本研究による手法は、イオンスライサによるアルゴンイオン研磨法である。この手法により、インプラント/骨界面を断面 TEM 観察可能な試料を作製する基本技術を開発した。

動物実験により、インプラントに見立てた表面処理済みのチタン製テストピースをマウス大腿骨に埋入し、骨再生させた。還流固定後、テストピース埋入部の大腿骨を摘出し、樹脂包埋した。精密機械切断、機械研磨により、前加工し、アルゴンイオン研磨した。インプラント/骨界面近傍を薄膜化することができ、界面を断面 TEM 観察できた。図7は TEM 観察結果である。テストピースの表面処理による図6と同様の構造が観察できた。さらにインプラント表面上の再生骨が観察できた。

インプラント/骨界面の断面 TEM 観察は、インプラント開発において重要であるが、界面で剥離すること、ダイヤモンドナイフで薄切できないことから、難題とされてきた。従来は、界面近傍で剥離させた後、界面近傍を断面 TEM 観察できるように骨組織を樹脂に再包埋し、ダイヤモンドナイフで薄切する手法が用いられてきた。しかし、剥離時にインプ

ラント表面に残留する部分があることが指摘され、この残留部分を観察できないことから、真の界面観察が求められてきた。

本研究により開発したインプラント/骨界面の断面 TEM 観察試料作製法は、従来不可能であった界面観察を可能にするものである。この手法は、インプラント/骨界面を形態観察、分析できる試料作製法として最適と考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Okauchi-Yabuuchi, M., Tamamura, R., Nagaoka, N., Takagi, S., Kishimoto, E., Takagi, T., Rodriguez, A., Inoue, M., Nagatsuka, H., Akao, M. and Nagai, N.; Chemical Analysis of a Novel Coating Material, CaTiO₃-aC., Journal of Hard Tissue Biology, 17(3), 115-120, 2008, 査読有り

(2) Nagai, N., Okauchi, M., Rodriguez, A., Gunduz, M., Hu, H., Kubota, M., Nagaoka, N., Inoue, M., Nagatsuka, H., Takagi, T. and Akao, M.; Development of New Titanium Coating Material (CaTiO₃-aC) with Modified Thermal Decomposition Method., Journal of Hard Tissue Biology, 17(2), 47-54, 2008, 査読有り

(3) Nakamura, H., Nagaoka, N., Hirata, A., Inoue, M., Ozawa, H. and Yamamoto, T.; Distribution of actin filaments, non-muscle myosin, M-Ras, and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in osteoclasts after calcitonin administration., Histology and Cytology, 68, 143-150, 2005, 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

長岡紀幸、山本敏男、元素分析のための生体硬組織試料作製法、日本顕微鏡学会 第 23 回分析電子顕微鏡討論会 (招待講演)、幕張メッセ 国際会議場、2007

[その他]

本研究の成果の一部は、2009 年 5 月に仙台で開催される日本顕微鏡学会・第 65 回学術講演会で発表予定である。

雑誌論文は、「Journal of Biomaterials Applications」に投稿中の論文が 1 編ある。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 紀幸 (NAGAOKA NORIYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70304326

(2) 研究分担者

山本 敏男 (YAMAMOTO TOSHIO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30107776

鈴木 一臣 (SUZUKI KAZUOMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30050058

吉田 靖弘 (YOSHIDA YASUHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90281162

(3) 連携研究者

なし