

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11755

研究課題名(和文)インプラントの表面形状によるぬれ性の制御とその生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Evaluation of implant capability from the aspect of cellular morphology regulation by surface topography and osteoimmunology

研究代表者

荻野 洋一郎 (OGINO, YOICHIRO)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：50380431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インプラントに使用されるチタンの経時的なぬれ性の変化に対する表面形状の影響と細胞反応について評価した。経時的にぬれ性が変化するが、スムーズサーフェスにおいては接着細胞の形態変化に影響し、細胞形態制御因子である RhoA の発現を有意に高めた。しかし、これらの変化はラフサーフェスでは認めなかった。細胞接着数は疎水性になると表面形状に関わらず優位に減少したことから、ぬれ性は細胞の機能というよりは存在する細胞数を変えることでその相互作用の誘導に影響を及ぼしている可能性が示唆された。接着を促進する血清タンパクを表面にコーティングすることでこれらが回復したことからこれらの考察の正当性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔インプラントは、近年、歯の喪失した場合の治療法であるが、トラブルも多く報告されている。その背景には、インプラント体の過剰評価も一つの要因と考えている。そこで、本研究では、インプラント治療において有効でされているインプラントのぬれ性を細胞レベルで科学的に検証することにより、その能力を評価することとしている。

ぬれ性の高いインプラントは、これまでインプラントと骨の統合に有効とされてきたインプラント体の表面形状に加えてあくまでも補助的な効果であり、インプラントの成績を大きく変えることは過剰評価である可能性が考えられた。しかし、一定の有効性はあるために今後、その適応症例を検証する必要がある。

研究成果の概要(英文)：This study examined the influence of the time-dependent wettability of different surface topographies on initial cellular behavior.

Titanium disks with smooth topography (SM) and three kinds of rough topography (sandblasted (SA), microtopography (M) and nanotopography (N)) were prepared. Time-dependent changes in surface wettability were observed in all surfaces as shown in previous studies. On SM surfaces, hydrophobic alteration influenced cell spreading and the activity of RhoA (a small GTPase protein of the Rho family), while no alterations were observed on rough surfaces except for the number of adherent cells. Serum adsorption could recover these functional deteriorations by hydrophobic alteration. These findings suggest that surface topography is a more potent regulator in initial cellular behaviors such as cell spreading and RhoA activation than surface wettability.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：インプラント ぬれ性 表面形状 細胞形態 RhoA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント(以下、インプラントと表記)表面の物理化学的な特徴はオッセオインテグレーション達成において重要な要素の一つである。市場では表面形状が粗なインプラント(ラフサーフェイスインプラント)が主要なインプラントとなっており、多くのインプラントメーカーがラフサーフェイスインプラントを開発、販売しており、臨床でも近年では使用されているインプラントではほぼ100%がラフサーフェイスインプラントとなっている。また、ラフサーフェイスインプラントもその表面はマイクロレベルからナノレベルまで多数のインプラント表面が開発、臨床応用されており、これまでのインプラント臨床に大きな恩恵を与えてきた。

近年、親水性を有するインプラントがオッセオインテグレーションに有効とされ、臨床応用されている。物質の表面のぬれ性については、物理学、材料学の分野で多くの研究がなされてきているが、インプラント分野については、圧倒的にそのエビデンスは欠如、不足している。また、表面形状、ぬれ性、初期の細胞挙動の相互作用についての詳細な検証が不足しており、また親水性がオッセオインテグレーションの達成のどの部分に有効に作用しているか、そのメカニズムは明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では上記の背景を踏まえ、親水性インプラントの有効性を細胞レベルで検証を行い、その作用メカニズムを検証することとした。

研究で使用するインプラントについては、表面形状がスムーズなインプラントに加え、インプラント市場でも臨床応用されている2種類のラフサーフェイス(マイクロレベル、ナノレベル)を準備し、各々、表面のぬれ性の経時的変化など、材料学的検証を行った。

細胞に及ぼす影響として、特にこれまでの報告で細胞とインプラント(チタンディスク)との初期の相互作用での有効性が示唆されているために、主に細胞接着や細胞機能に関連していると報告されている細胞形態への影響を検証し、また細胞形態を制御する細胞骨格制御因子 RhoA の発現について調査することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) チタンディスク作製

チタンディスクには純チタンディスク(タイプ )を使用し、以下の3群を設定した。

研磨のみ: スムース群(S)

表面のサンドブラスト処理群

サンドブラスト後、5N塩酸処理群: マイクロサーフェイス(M)

サンドブラスト後、2N硫酸と30%過酸化水素水の混和液処理群: ナノサーフェイス(N)

それぞれのチタンディスクを作製後、アルコール処理と紫外線照射で無菌化を図り、その後の解析に使用した。

#### 2) チタンディスクの表面解析

表面形状の観察を走査型電子顕微鏡(SEM)で行い、表面の粗さ測定には3Dレーザー顕微鏡(表面粗さ)を使用した。

#### 3) チタンディスク表面の元素解析

チタンディスク表面(D0、D56)の元素解析をX線光電子分光法(XPS)で解析した。

#### 4) 表面のぬれ性の解析

作製したそれぞれチタンディスクの作製直後のぬれ性(0日: D0)と作製1(D7)、2(D14)、8(D56)週後のぬれ性を接触角の測定(自動接触角計)により評価し、比較を行った。

#### 5) 細胞実験

使用細胞: マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1

培養条件: 培養液は alpha-minimum essential medium (α-MEM)、ウシ胎児血清(fetal bovine serum; FBS)を使用した。37℃、5%CO<sub>2</sub>下での培養を行った。

細胞形態の観察

細胞をD0、D56のディスクに播種し、6時間後の細胞形態を観察した。チタンディスク表面による細胞接着への影響を重視するために、細胞接着に影響を与えるFBSの影響を減じるためにその濃度を3%とした。チタンディスク上の細胞形態を撮影するために、蛍光免疫染色(アクチンと核の染色)を行った。

RhoA 活性の計測

D0とD56のディスクに細胞を播種し、2時間後のRhoA活性を計測した。上記同様に細胞接着に影響を与えるFBSの影響を減じるためにその濃度を3%とした。RhoA活性の計測には、市販されている計測キット(G-LISA RhoA activation assay kit)を使用した。

細胞接着能の検証

チタンディスクの表面形状とぬれ性が細胞接着に及ぼす影響を検証するために、3種のチタンディスクにおいて、D0とD56のディスクを準備し、細胞を播種後、6時間後の細胞接着数をMTS assayで計測した。

細胞接着

細胞接着におけるFBSの影響を検証するために、D56のチタンディスクをFBSに24時間浸漬し、接着タンパクのコーティングを行ったのちに、と同様の手法で細胞接着数を計測した。

## 5) 統計解析

計測値はすべて平均値 ± 標準偏差で表記し、2 群間の比較には T 検定を行った。有意水準は 5 %とした。

## 4. 研究成果

### 1) チタンディスクの解析

上記の方法で作製したチタンディスクを図 1 に示す。

SM は購入したチタンディスクの色をそのまま呈しており、表面には光沢があるが、SA、M では光沢がなくなり、SA ではやや黒味が、M ではやや白色が強くなっている。一方、N は表面が褐色を帯び、同じく光沢はなくなった状態になっている。

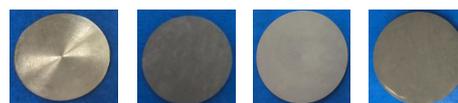


図 1: チタンディスク 左より S、SA、M、N を示す。

SEM で観察した表面形状を図 2 に示す。SM では、表面に顕著な凹凸は認められず、研磨の際に生じたと考えられる研磨痕が認められた。SA では、表面にプラスト処理によって生じたと考えられる凹凸を認めた。M では、プラスト処理と酸処理によって生じたと考えられる SA には認められないピット様構造を認めた。一方、N では、SA に類似した表面を観察することができたが、SA よりももっと微細な凹凸構造を認めた。これによりナノ構造を有していることが示された。

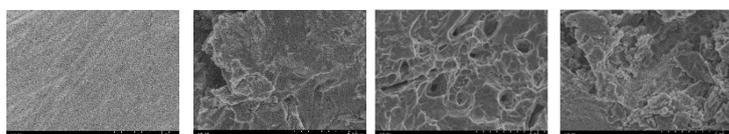


図 2: チタンディスクの SEM 像 左より SM、SA、M、N

表面粗さの計測結果を図 3 に示す。D0 と D56 でそれぞれ粗さを比較したところ、それぞれのサーフェイスにおいて 2 群間に差を認めなかった。すなわち、表面の粗さは時間経過によって変化しないことが示された。

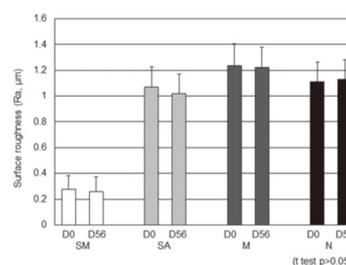


図 3 表面粗さの計測

チタンディスク表面の元素解析 (XPS による解析) では、Ti、O、C の元素を検出した。SA と N では、プラスト処理による Al、Si を検出したが、M では検出されなかった。これは M 表面の製作の際の酸処理によりこれらの元素が喪失したことが示唆された。なお、D0 と D56 で表面元素に顕著な違いは認められなかった。

表面のぬれ性の計測のために、水の接触角を計測した。計測結果を図 4 に示す。D0 では、M、N では、チタン表面に滴下した水は即座に広がり、接触角の計測は不可能であった。すなわち、D0 においては、M、N ともに超親水性であったことが示された。一方、D56 ではすべてのディスクで接触角は大きくなり、時間経過に伴って、ディスクの表面は疎水性になっていくことが示された。この変化は、チタン表面の形状に関わらずに発生することが示された。

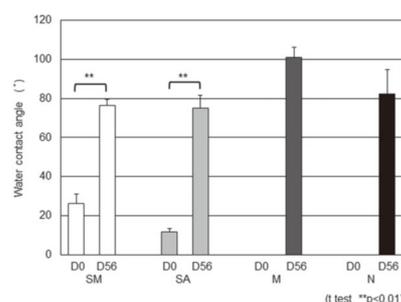


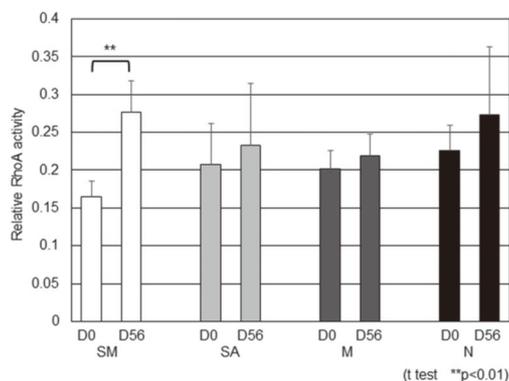
図 4: 水の接触角の計測

この表面のぬれ性に変化を経時的に観察したところ、M では、製作直後は超親水性であったにも関わらず、1 日後には接触角は SM と同等の角度を示した。一方、N では、その変化は他の 3 群と比較すると緩やかな上昇であった。

接着細胞を観察したところ、SM の D0 では、細胞がしっかりと進展しているのに対し、D56 では、細胞が多数の突起を伸ばしていた。SA、M、N では、D0、D56 ともに細胞が細かい突起を伸ばしており、SM の D0 のようにアクチン (赤) 線維の伸展は、認められなかった。また、それぞれの表面形状で顕著な違いは認められず、製作後の経過時間が異なったチタンディスクが接着細胞の形態に及ぼす変化も明確でなく、いわゆるラフサーフェイスでは、細胞形態は進展せず、多数の突起を誘導した接着であり、時間経過に伴ったぬれ性の変化の影響も少ないことが示唆された。

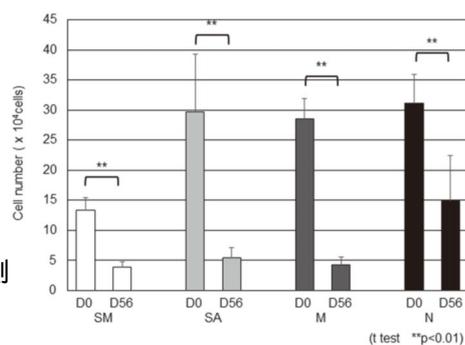
続いて、D0、D56 の各表面形状における細胞骨格制御因子 RhoA の発現の検証結果を図5に示す。SM に比べて、ラフサーフェイスでは RhoA の発現は高い傾向にあった。一方、時間経過の影響を検証したところ、SM においてのみ D56 では、RhoA の発現が高くなること示された。

図5：RhoA 活性の計測



それぞれのディスクに細胞を播種した場合の接着細胞数の計測結果を図6に示す。全群において、D0 では D56 に比べて接着細胞数は有意に増加した。すなわち、疎水性のディスクにおいては、親水性のディスクに比べて細胞接着は減少することが示された。

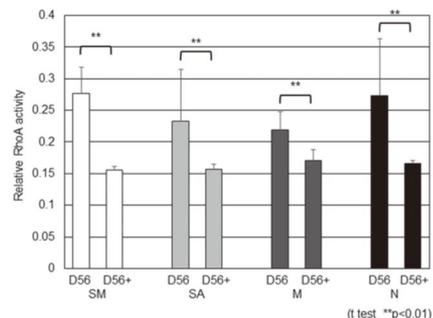
図6：細胞接着数の計測



これまでの結果より、疎水性のディスクにおいては、SM においては細胞形態の変化が認められ、RhoA の活性が高くなり、接着細胞数も少なくなる一方で、ラフサーフェイスではその影響が認められないことが示された。

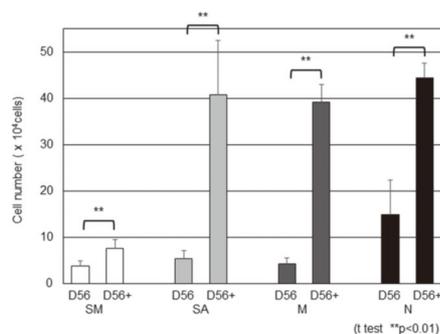
そこで、細胞接着に有効に作用すると考えられる血清のコーティングを行った。

図7：血清コーティング後の RhoA 活性



血清コーティング後の RhoA 活性の計測結果を図7に、また細胞接着数を図8に示す。血清のコーティングにより全群で RhoA 活性は有意に減少し、また、接着細胞数も有意に増加した。血清中のタンパクは接着に有効であることが示唆された。

図8：血清コーティングのチタンディスクにおける接着細胞数



以上より、インプラントを模倣したチタンディスクで、作製した4種類の表面形状で検証したぬれ性の効果は、SM では親水性は細胞の挙動にポジティブに作用し、また疎水性ではネガティブに作用した。しかし、ラフサーフェイスでは、その効果は非常に限定的であり、唯一差が認められたのは、ぬれ性の変化によって細胞接着数に変化（親水性では細胞接着数が有意に増加する）することが示された。これが親水性が有効とされているメカニズムである可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura T, Ogino Y, Ayukawa Y, Koyano K.	4. 巻 37(4)
2. 論文標題 Influence of the wettability of different titanium surface topographies on initial cellular behavior.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dent Mater J.	6. 最初と最後の頁 650-658.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2017-334.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishimura T, Ogino Y, Ayukawa Y, Koyano K
2. 発表標題 Cell Adhesion is Regulated by Titanium Surface Topographies and Wettability
3. 学会等名 96th General Session and Exhibition of The IADR（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村朋子、荻野洋一郎、鮎川保則、古谷野潔
2. 発表標題 チタンの表面形状と表面特性の経時的変化が細胞反応に与える影響
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第126回学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古谷野 潔  (Koyano Kiyoshi)  (50195872)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鮎川 保則  (Ayukawa Yasunori)  (50304697)	九州大学・歯学研究院・准教授       (17102)	