

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890170
 研究課題名（和文） 交互浸漬を用いた新開発チタンアパタイト表面と骨芽細胞の付着解析
 研究課題名（英文） Evaluation of Osteoblast-like Cells Attachment to Titanium with Surface Modifications
 研究代表者
 宮本 元治（MIYAMOTO MOTOHARU）
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員
 研究者番号：50452941

研究成果の概要：本研究では、チタン表面にユニークな表面形状を持たせ、その表面に独自の手法でアパタイトコーティングの規格化を行い、骨芽細胞様細胞の増殖及び挙動の現象の解明に努めた。アパタイトをチタンにコーティングし、均一な基板を作製した。細胞増殖、走査型電子顕微鏡、細胞骨格を検証し、経時的变化を新開発チタンアパタイト表面において確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,330,000	399,000	1,729,000
総計	2,660,000	399,000	3,059,000

研究分野：補綴系歯学

科研費の分科・細目：補綴理工系歯学

キーワード：(1) 表面処理 (2) チタン (3) アパタイト (4) 骨芽細胞様細胞 (5) 交互浸漬 (6) インプラント (7) 材料加工・処理 (8) 生体材料

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、様々なインプラントが開発され、形状・表面性状の特色あるインプラントが注目を浴び、臨床応用に用いられている。それに伴い、企業はインプラントの開発に力を削っているのが現状である。その背景には、“インプラントがいかに早く骨とオッセオインテグレーションを起こすことができるか”の要望に他ならない。

①チタンは優れた生体親和性をもつことから、歯科インプラント材料として汎用されている。

②アパタイトは生体活性材料として、近年め

ざましい研究・開発がなされている。

(2) アパタイトコーティングされたインプラントはコストがかかり高価であるのが現状であるため、低コストで生産できるインプラントを実用させたい。

2. 研究の目的

今回の研究は、チタン表面にユニークな表面形状を持たせ、その表面に独自の手法でアパタイトを低コストでコーティングし、この改質基板上での骨芽細胞の挙動、及び付着の

メカニズムの解明を目的とすることである。
3. 研究の方法

(1) チタン処理及びアパタイト生成の均一性の確立

市販されている純チタン板(AS)を均一に表面処理するため、規格化された基板を作製する。その基板をランダムに抽出して表面改質の評価を行い、規格をクリアした基板のみを培養実験等に使用する。コンピューターパソコン解析、表面粗さ測定装置、ぬれ性試験装置等で確認。

アパタイトコーティングの表面改質法

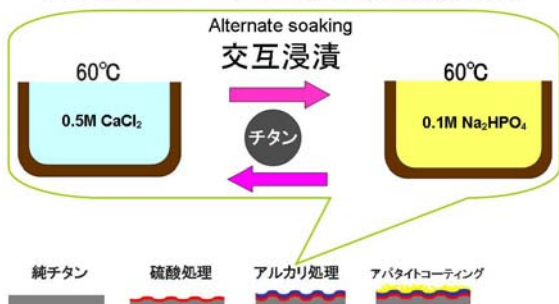


図1 交互浸漬法

- ① 48%硫酸水溶液に 60°C 1時間浸漬(AE)
- ② 5M NaOH 水溶液に 60°C 24時間浸漬(AT)
- ③ 48%硫酸水溶液に 60°C 1時間浸漬後に 5M-NaOH 水溶液に 60°C 24時間浸漬(酸アルカリ複合処理)(AA)
- ④ 酸アルカリ複合処理した純チタン板に 0.5M CaCl₂、0.1M Na₂HPO₄水溶液に浸漬時間 60秒間、20サイクルの交互浸漬し、アパタイトコーティングしたもの(AAA)

Code	Acid etching	Alkaline treatment	Apatite coating
AS	-	-	-
AE	○	-	-
AT	-	○	-
AA	○	○	-
AAA	○	○	○

表1 各試料基板コード

(2) チタンを表面改質したアパタイト成分分析

規格をクリアしたチタン表面処理で交互浸漬し、アパタイトを形成させた後に、走査型電子顕微鏡、エックス線解析装置、フーリエ変換分光光度計、エネルギー分散型X線分析装置等を用い元素分析の同定。

(3) 骨芽細胞様細胞培養における細胞傷害性、増殖の測定

培養細胞は骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を用い、培地は10%FBS含有α-MEMを使用。細胞傷害性、増殖を Assay kit にて測定。

(4) 骨芽細胞の成熟及び石灰化の確認

アルカリフォスファターゼ(ALP)にて検討する。また、assay kitでも検討

(5) 初期付着における経時的变化による細胞骨格の確認

Actin: 抗 Actin ポリクローナル抗体、β-Tubulin: 抗β-Tubulinモノクローナル抗体等で走査型共焦点レーザー顕微鏡にて、細胞の付着形状を確認、いわゆる細胞骨格の分析。

4. 研究成果

(1) 純チタンの表面処理を行い均一な基板を作製した。表面粗さ測定はアパタイトコーティング処理を行った以外のものを計測した。交互浸漬で作製されたアパタイトコーティング基板の表面粗さは、酸アルカリ処理を施した表面処理と類似することが推測される。

Ra (μm)	表面粗さ
AS	0.53±0.05
AE	2.05±0.11
AT	0.55±0.07
AA	2.01±0.15

(Mean ± S.D.)

表2 表面粗さの結果

(2) ①走査型電子顕微鏡で表面状態の観察も行った結果、表面粗さ測定の結果と類似し、AEでは、直径1~2μmのマイクロ孔が無数に存在し、裂溝の形成が確認された。アルカリ処理に関しては、表面が網状の状態に化学的変化を示しているが、表面粗さに明らかな変化を示していることはなかった。酸アルカリ処理に関しては、酸処理で形成された裂溝

が残存しているものの、鋭利な突起やマイクロ孔の消失が確認された。アパタイトコーティングされた基板は、アパタイトの形成を確認することができた。

②エックス線解析装置により、26、32 度付近にみられるアパタイト特有のピークを確認することができた。またフーリエ変換分光光度計を用い、FTIR スペクトルにて、1100 カイザー付近にピークがみられ、リン酸 (PO₄) の吸収ピークを認め、1450 カイザー付近で炭酸の吸収ピークがあり、炭酸含有アパタイトであることを確認することができた。これにより、チタンの表面改質を行い、炭酸含有アパタイトを付着させることが可能であることが立証された。

(3) 骨芽細胞様細胞培養における細胞傷害性、増殖の測定

骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を経時的に確認を行った。1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間と観察。また、1 日、3 日、5 日 7 日の培養後の増殖能も確認した。

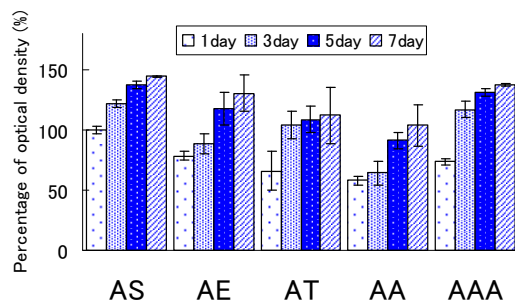


図 2 MTT assay による細胞増殖

(4) 骨芽細胞の成熟及び石灰化の確認

ALP 活性を 5 日、7 日で確認を行った。7 日までの石灰化は各試料で有意な違いは見られなかった。

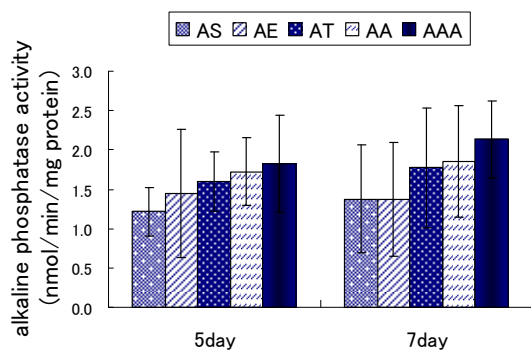


図 3 ALP 活性

(5) 初期付着における経時変化による細

胞骨格の確認

①骨芽細胞様細胞を Actin: 抗 Actin ポリクローナル抗体、β-Tubulin: 抗 β-Tubulin モノクローナル抗体等で走査型共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光染色像の観察を行った結果、アパタイトコーティングされたチタン板では、3 時間での β-Tubulin において、他の基板との違いが見られた。このことは、早期に細胞付着が行われる可能性があることを示唆した。

②走査型電子顕微鏡観察では、すべての処理において、付着細胞が、経時的に伸長していく様子が確認できた。

特にアパタイトコーティングされた基板は 3 時間ではっきりと確認でき、多くの糸状突起 (フィロポディア) を確認しました。表面粗さが低いほど葉状突起ラメリポディア様の突起を確認することができた。

(6) まとめ

MTT assay SEM による形態的観察をおこなったが、表面処理による骨芽細胞様細胞の影響はみられなかった。酸処理、酸・アルカリ複合処理では、表面に凹凸があるため、細胞の接着点形成が困難であることが予想された。しかし、滑沢なアルカリ処理表面における細胞付着においても前者との違いはみられなかった。経時的にアパタイトコーティングされたチタン板は、初期付着に関して良好な細胞伸展が行われることを確認した。しかし、増殖に関しては、純チタン板に優れる結果を示すことができなかった。

アパタイトとチタンの組み合わせたインプラントは、骨の形成能を高め、早期的な咬合付加ができるものと考えられる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 宮本元治, 石井裕明, 河野博史, 山下大輔, 竹内尚士, 町頭三保, 野口和行, 伴清治

微小せん断試験法による酸処理チタンと陶材との接着強さ

第 22 回 歯科チタン学会大会

2009 年 2 月 14-15 日

チタンと歯科臨床 (歯科チタン学会誌)・第 7 巻・第 1 号 P24

日本大学理工学部駿河台校舎 1 号館 6 階 CST ホール

(2) 宮本元治, 河野博史, 山下大輔, 町頭三保, 神原賢治, 野口和行, 和泉雄一, 伴清治,
表面改質チタンプレート上での骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の初期付着,
第 50 回秋期日本歯周病学会学術大会
2007 年 9 月 21 日 日本歯周病学会会誌 49 巻
秋季特別 P. 183 (東京フォーラム)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 元治 (MIYAMOTO MOTOHARU)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号：50452941

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者