

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 17日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659916
 研究課題名（和文） X線元素分析法と電子線トモグラフィ法を用いた骨-インプラント界面の多面的解析
 研究課題名（英文） multi-analysis of bone-implant interface using X-ray analysis and electron tomography
 研究代表者
 竹重 文雄 (Takeshige Fumio)
 大阪大学・歯学部附属病院・教授
 研究者番号：60206969

研究成果の概要（和文）：

本研究は、新たに開発する電子顕微鏡用試料台上で、集束イオンビームを用いて露出させた骨・インプラント界面の試料に対して集束イオンビーム加工装置と電界放射型走査型電子顕微鏡を行い「osseointegration」の様相を、構造と機能の両面から明らかにしようというものである。骨-インプラント界面の超微細構造観察では、走査型電子顕微鏡（SEM）による観察が主流である。しかしながら、SEMは表面構造を捉える手法のため、重要な構造が内部に存在する界面観察には不向きで、金属と細胞が構成する界面の状態を観察することは難しいとされてきた。今回我々は、硬組織の微細加工が可能である Focus ion beam 加工装置を用いて切片を削りだし、リアルタイムで走査イオン顕微鏡を用いて観察を行う手法を開発及び評価を行った。

研究成果の概要（英文）：

Bone and Titanium are mineralized tissue and hard material. It is difficult to prepare thin specimens or surface fabrication of these tissues for transmission and scanning electron microscope observation without demineralizing them. We present a novel method of creating a cutting surface including the bone and titanium interface using the focus Ion beam (FIB) method and Scanning Ion Microscope (SIM). This method is appropriate for nano-fabrication of thin specimens for brittle and hard materials such as bone and titanium. The major advantage of this method is its ability to visualize ultra-structure in interface of highly calcified specimens without demineralization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：再生医療

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学

キーワード：集束イオンビーム加工装置、骨細胞、オッセオインテグレーション

1. 研究開始当初の背景

近年、インプラント手術手法の進歩から、フィクスチャーの骨への結合に対する信頼性は高まり、成功率は飛躍的に向上している。一方で、チタンは現在のインプラント体の主流をなす素材であり、骨とインプラント体が強固に結合した状態である osseointegration は、インプラント治療の成功に必須のものとされている。骨とインプラント体界面の超微細構造に関しては未解明の部分が多く界面を形態学的に定義することは、インプラント治療の成功を判定する上でも極めて重要であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究は、新たに開発する電子顕微鏡用試料台上で、集束イオンビームを用いて露出させた骨・インプラント界面の試料に対して超高圧電子線トモグラフィー観察とエネルギー分散型エックス線分析を行い

「osseointegration」の発現様相を、構造と機能の両面から明らかにしようというものである。骨-インプラント界面の超微細構造観察では、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察が主流である。しかしながら、SEM は表面構造を捉える手法のため、重要な構造が内部に介在する界面観察には不向きで、金属と細胞が構成する界面の状態を観察するのは不可能である。透過型電子顕微鏡の観察がほとんど行われていない理由として、超薄切片の加工が困難であるということが考えられる。今回我々は、超薄切片作成にガリウムイオンビームを用いて細胞および金属を切削する集束イオンビーム法を応用する。切削時の振動や刃物による傷などの影響をなくした状態の断面を持つ試料作成が可能であり、さらに、イオンが原子に衝突した際に生じる2次電子像をモニターすることで、加

工時にリアルタイム画像を見ながら切削を行うことが出来た。これにより、界面の観察対象部位にターゲットを絞った試料作成が可能となり、精度の高い元素分析と電子線トモグラフィー観察が可能になった。今回は特製のチタンプレート上で培養した骨芽細胞に対して切削加工を行い、界面を形成した状態で元素分析を行うという手法を試みた。

3. 研究の方法

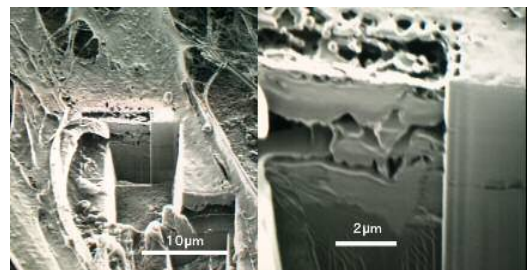
細胞培養に必要な培地の設定およびチタングリッドの加工として、骨芽細胞の培養を行うチタングリッドはFIBのホルダーの規格にあうように厚さ $50\mu\text{m}$ 、直径 3mm に加工を行う。今回は、直径 3mm の純チタン製円柱から精密カッターにより切り出し、表面研磨により最終的な厚みを調整しグリッドを作製した。この段階で、表面の研磨荒さや表面処理の条件分けを考慮して培養を行うことにより、表面性状と骨細胞の付着様相の評価も可能であると考えられる。培養する骨芽細胞は、ラットの骨髄より採取した細胞を用いて培養および加工観察試験を行った。



図 1

左 FIB 加工装置用ホルダー

右チタン製 FIB 用メッシュ (培養後)



試料の固定と集束イオンビーム (FIB : FB2000A, HITACHI) を用いて界面露出を行う。この期間に同時に、イオンスパッタリング効率を考えた切削時間や切削量の基礎データの採取を行い石灰化組織においてもアーチファクトの生じないように初期においては。固定は、一般的な細胞固定法である Karnovsky 溶液 (4%パラホルムアルデヒド+5%グルタルアルデヒドの混合溶液) を用いて行う。細胞の大きさとオスミウム酸のチタンへの影響を考えると後固定は行わない。固定後には、CO₂ 臨界点乾燥を行った。

チタンプレートを Focus Ion Beam 加工装置 (FB2000A 日立社製) に装着して、チタンと骨細胞の形成する界面に対して直交方向にガリウムイオンにて、切削加工を行った。切削モードは、最初の削り込みが出力の大きい (M1) モードにて行い、チタン界面まで切削後に出力の小さい (M0) モードにて仕上げ加工を行った。

この段階で想定される問題点として、元素分析であるため非蒸着下での観察になるためチャージアップ (帯電) が起こる部分に関しては、低電圧においても高分解能を保つことが出来る電界放出型の SEM の特性を利用して加速電圧を 1 ~ 5 kV に押さえた状態での観察を行った。

4. 研究成果

チタンプレート上に培養した骨細胞に対して、集束イオンビーム加工装置により断面の観察を行うことが可能であるということが示された。石灰化に関する評価は、切削面に対してはチャージアップなどの影響から精度の高い評価が困難であることが分かったが、界面の観察は行うことが可能であることが確認できた。

元素分析においては、界面の作製方法を検討することにより、高精度の分析が可能になると考えられる。さらに形態学的な評価を行うためには、臨界点乾燥では、乾燥に伴う変形が生じるため、実際には包埋後に切片化した透過型電子顕微鏡などとの比較も必要になってくると考えられるが、その際にも FIB 加工装置を用いた試料作成法は有効な手法になると考えられる。

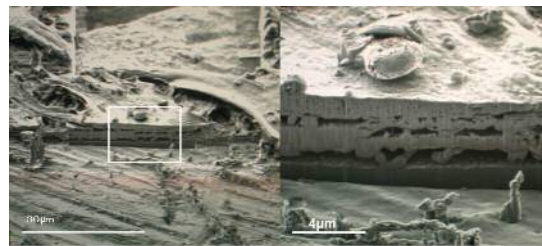


図 2 上 : 骨細胞中央の切削、右図に細胞組織の下面の空隙とチタンとの界面が観察出来る。下 : 細筋が差なっている様相と細筋とチタンとの境目になる部位にある空隙が観察出来る。

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. Matsumoto M, Miura J, Takeshige F, Yatani H, Mechanical and morphological evaluation of the bond-dentin interface in direct resin core build-up method, *Dental Materials*, (29) 287-293, 2013 年 03 月, (査読有)

2. Detection of dentinal microcracks using Infrared Thermography, Matsushita-Tokugawa M, Miura J, Iwami Y, et al, *Journal of Endodontics*, (39) 88-91, 2013 年, 学術論文 (査読有)

3. Miura J, Kubo M, Nagashima T,
Takeshige F, Ultrastructural
observation of human enamel and dentin
by ultra-high voltage electron
tomography and focus ion beam technique,
Journal of Electron Microscopy,
61(5) :335-41, 2012 年, 学術論文(査読
有)

[学会発表] (計 3 件)

1. Mizuho Kubo, Jiro Miura, Masato Shimizu,
Tadashi Nagashima, Fumio Takeshige
Structural Modifications of dentinal
microcracks with human aging
IADR 2013 3.20-23 Seattle, United
States

2. 三浦治郎

歯科医療における界面構造観察の有用性
微細構造解析プラットフォーム第 2 回ワー
クショップ (招待講演)

NIMS 筑波 2013 年 3 月 1 日 筑波市

3. 三浦治郎、長谷川利昭、久保美寿穂、長島
正、竹重文雄：未脱灰石灰化硬組織における
電子線トモグラフィー用切片加工法、第 68 回
日本顕微鏡学会学術講演会 2012 年 5 月 14
日 筑波市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹重 文雄 (Takeshige Fumio)
大阪大学・歯学部附属病院・教授
研究者番号：60206969

(2) 研究分担者

三浦 治郎 (Miura Jiro)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70437383

江草 宏 (Egusa Hiroshi)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号：3037907