

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

長谷川 正和

論文題目

インプラントの骨結合を促進するメソ・マイクロ・ナノスケールの新規チタン表面性状の創製

I. 緒言

インプラントは医科または歯科の分野における、重要な治療方法として確立されてきた。骨に対するより強固なオッセオインテグレーションの獲得を目指し、インプラントの表面改良が進められてきた。しかしながら最良のインプラント表面性状は未だ分かっていない。チタンあるいはチタン合金において、マイクロスケールの表面形状は、一般的には各種酸処理やサンドブラスト処理、あるいはその組み合わせによって作られる。多くの研究によってマイクロ構造が細胞接着、分化、細胞外基質形成能、骨芽細胞のミネラル化を促進することが示されてきた。一方、マイクロ構造が細胞接着、増殖、分化を妨げるという研究もいくつか見られる。しかし、マイクロ構造が特に初期の治癒の段階でオッセオインテグレーションを促進することは明らかである。また、近年のナノテクノロジーの発展に伴い、インプラント表面へのナノスケール構造体の付与による、オッセオインテグレーションの向上が期待されている。今回著者はチタン表面上にメソスケール構造体を作成することに成功し、この新しいメソ・マイクロ・ナノスケールの表面粗さがマイクロスケールの表面粗さだけの場合の能力を超えてオッセオインテグレーション強さを向上させると推察した。そこで本研究は、その新たな表面性状の生物学的なオッセオインテグレーションの獲得能を調査し、その表面荒さをコントロールして最適化させることを目的とした。

II. 対象および方法

実験 1

(1) チタン表面処理

実験には直径 20mm、1.5mm 厚のディスク型のグレード 2 純チタンを用いた。

チタン表面は 67%硫酸を 120°C、130°C、140°C、150°C まで熱し、それぞれ 75 秒浸漬させてエッチング処理を行い、異なる 4 種類の表面形状へと加工した。

(2) チタン表面性状の解析

表面加工したチタン表面は、走査電子顕微鏡を用いて観察した。3次元走査電子顕微鏡画像は写真測量技術ソフトを用いて構築した。また、表面微細構造のパラメータとなる、平均粗さ (Ra)、最大高さ (Rz) を算出した。表面微細構造物の平均数 ($/104 \mu m^2$) と平均径は、画像分析ソフトによって分析した。

(3) 細胞培養

SD 雄ラット (8 週齢) の大腿骨から採取した骨髓細胞を細胞培養ディッシュに播種した。

(4) 細胞接着能

チタン表面上で培養開始 24 時間後の細胞量を、WST-1 による比色分析を用いて測定し、細胞初期接着として評価に用いた。

(5) 細胞形態と形態測定

細胞形態の分析とチタン表面へ播種した骨芽細胞の細胞接着・伸展性の評価には、培養開始 24 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いた。細胞の面積、長径、フェレット径は、画像分析ソフトを使用して定量化した。

(6) ビンキュリン・アクチン発現分析

ビンキュリンの接着斑の形態は、培養開始 24 時間後の共焦点顕微鏡画像を画像分析ソフトによってピクセルを定量化して算出した。同様に、ローダミン・ファロイジンで染色された画像を用いて、細胞骨格としてのアクチンフィラメントを定量化するために面積を計測して算出した。

(7) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

骨芽細胞の ALP 活性は、培養開始 4 日後に比色分析によって評価した。

(8) 石灰化

骨芽細胞の石灰化能は、培養開始 7 日目におけるアリザリンレッド染色により評価された。染色された面積は画像分析ソフトを使用して面積を測定し、陽性部面積を求めた。また、培養開始 21 日目におけるカルシウム沈着の比色分析を測定した。

(9) リアルタイム定量 PCR (qRT-PCR)

培養 7 日、14 日目に RNeasy Plus Mini Kit を使用して各群の細胞からトータル RNA を回収し、cDNA を作成した。PCR 増幅には、オステオポンチン (Op)、オステオカルシン (Oc)、そしてグリセルアルデヒド-3-リン酸塩デヒドロ

ゲナーゼ (Gapdh) を使用した。関連する遺伝子発現の分析は $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で行った。種々の遺伝子発現量は 120°C 酸処理群の値との積数で示した。

実験 2

(10) インプラント埋入手術

シリンダー型グレード 2 純チタン (直径 1 mm、長さ 2 mm) を、67% 硫酸を 120°C 、 130°C 、 140°C 、 150°C にそれぞれ 75 秒浸漬させてエッチング処理を行い実験用インプラントを作製した。8 週目の雄 SD ラットの大腿骨の遠位端から 9 mm の部位に、異なる温度で酸処理したそれぞれのシリンダー型のチタンインプラントを埋入した。

(11) 生体力学的プッシュインテスト

インプラントー骨の生物学的嵌合力を測定するため、インプラントの生体力学的プッシュインテストを行った。2 週間の治癒期間後、プッシュインテストを行い、インプラントー骨結合強度を検索した。

(12) 統計解析

Total ALP 活性と Ti 表面形状 (Ra、ノジュール平均数、ノジュール平均径) との相関関係、そして、プッシュイン値と表面形状 (Ra、ノジュール平均数、ノジュール平均径) との相関関係が CORREL 関数を用いて計算し、最小 2 乗回帰によって回帰式を求めた。

III. 結果

実験 1

(1) 表面分析

弱拡大の SEM 画像は、マイクロ構造で覆われたチタン表面を示した。酸処理の上昇に従い、マイクロ構造上にメソ構造が現れた。このノジュール様のメソ構造体の大きさは $10\sim 50\ \mu\text{m}$ 程度で、酸処理の温度が高いほど大きくなり、数も増加した。強拡大像では典型的な酸処理面のマイクロ構造のシャープなエッジが示されたのに対し、メソ構造体上ではナノレベルでピークが丸みを帯び、特徴的な粗糙面を示した。

3D SEM 画像では 120°C 群で $1\sim 5\ \mu\text{m}$ 程度の高さの一様な凹凸面が示された。酸処理の温度が上がるにつれてより多くのメソ構造が発現し、 150°C 群では $10\sim 20\ \mu\text{m}$ 程度の高さのメソ構造体を示した。Ra、Rz において、より高い温度での酸処理群で増加を示した。ノジュール様のメソ構造体の数は酸処理の温度が高くなるにつれ増し、 140°C をピークに、 150°C では減少した。メソ構造体の直径においては、酸処理の温度の上昇とともに増加を示した。

(2) 酸処理チタン表面上の細胞増殖能

140°C あるいは 150°C の酸処理表面に対して、 120°C の酸処理面に接着する骨芽細胞数は多くなっていた。

(3) 酸処理チタン表面上の細胞形態

酸処理の温度が高いほど、酸処理表面において、より長く伸びた骨芽細胞

の糸状の突起が観察された。細胞の面積、長径、およびフェレット径は、酸処理の温度が高いほど大きくなっていった。特に長径は 140°C において最も大きく、フェレット径は 140°C と 150°C において有意に大きかった。

(4) 酸処理チタン表面上の細胞のビンキュリン・アクチン発現

酸処理温度が高くなるほどアクチン発現あるいはビンキュリン発現は高くなっていった。アクチンの発現について、120°C と比較して 130°C、140°C、150°C で有意に高く、ビンキュリンの発現についても、120°C と比較して 140°C、150°C でそれぞれ有意に高くなっていった。

(5) 酸処理チタン表面上の骨芽細胞分化能および石灰化能

ALP 活性は、より高い温度で酸処理された表面において高かった。総カルシウム沈着量によって評価される骨芽細胞の石灰化能は、より高い温度の酸処理群において、より多い結果を示した。同様に、アリザリンレッド染色による石灰化能についても、より高い温度で酸処理された表面において高い傾向がみられた。

(6) 酸処理チタン表面上の細胞の遺伝子解析

OP は、酸処理温度が上昇するとともに、発現量が有意に高かった。OC についても同様に、酸処理温度の上昇とともに、発現量が高くなっていった。

実験 2

(7) 酸処理チタンのインプラント-骨結合強度

2週における生物学的嵌合力は、酸処理の温度とともに高くなり、140°Cをピークに150°Cでは低くなっていた。

(8) 各結果の相関関係

Ra と ALP は有意に相関し、Ra が増加するとともに、ALP も増加を示した。同様に、メソスケールのノジュールの平均数と平均径も、ALP と有意な相関を示した。プッシュイン値においては、Ra との相関を認めなかった。反対に、メソスケールのノジュールの平均数と平均径は、いずれも有意な相関を認めた。

IV. 考察

今回の実験の結果から、温度の上昇、つまり表面粗さの上昇に伴い、比例関係を持って分化能が上昇していることが示された。さらに共焦顕微鏡分析から、初期の分化が促進されていることが認められた。酸処理の温度が高くなるにつれインテグレーションが有意に強くなる結果が示された。この傾向は、140°C群をピークに、150°C群では減少した。骨芽細胞の増殖と分化がメソ・マイクロ・ナノスケールのチタン表面荒さによって増加したという細胞実験の結果の裏付けにより、インプラント一骨のインテグレーションの強さは単に早められただけではなく、強化されたと考えられる。各結果の相関関係を求めた結果、メソ構造物の数や大きさはオッセオインテグレーションの強さに影響をもたらしていた。これらのことから、この

メソ構造体はプッシュイン試験で測定されるインテグレーション強さに加え、骨の機械的嵌合を高めていると示唆された。

V. まとめ

今回著者は、高温での酸処理によって、新しいメソ・マイクロ・ナノスケールの表面性状を作製した。この三次元的な表面性状は、骨芽細胞の接着や増殖を妨げることなく有意に分化を促進した。骨伝導やオッセオインテグレーション強さは、ノジュール様のメソスケール構造体の大きさと密度と高い相関を示した。オッセオインテグレーションの強さは、酸処理が140°Cで行われた場合に最大を示し、その強さはマイクロスケールのみの表面荒さの場合と比較して約2.3倍を示した。