

# 論文要旨

## Early cellular responses of osteoblast-like cells on acid-etching and alkaline treated titanium

酸エッチングおよびアルカリ処理した  
チタン表面上での骨芽細胞様細胞の初期動態

宮本元治

### 【序論および目的】

チタンは耐蝕性、機械的強度および生体親和性に優れた金属であり、歯科領域における臨床応用は年々増加してきている。チタンの表面性状が生体親和性に大きく影響するため、様々な表面改質の研究が進められている。実際に臨床応用されているインプラントにおいても機械加工された古典的なインプラントから化学的処理などにより表面積を拡大したものへと次第にとって代わっている。

これまで、私共は、化学的処理方法である硫酸処理、アルカリ処理による表面改質の実験を行い、硫酸処理により多孔質が形成され、アルカリ処理により親水性皮膜が形成されることを明らかにした。本研究では酸処理、アルカリ処理および、酸・アルカリ複合処理をおこなったチタン表面における骨芽細胞様細胞の初期動態について検討した。

### 【材料および方法】

#### 1. チタンの前処理

実験材料として市販されている純チタン板を  $10 \times 10 \times 0.2$  mm に切断し、以下の4種の表面改質を施した。

- ① 48%硫酸水溶液に  $60^\circ\text{C}$  で1時間浸漬 (酸処理)
- ② 5 M NaOH 水溶液に  $60^\circ\text{C}$  で24時間浸漬 (アルカリ処理)
- ③ 48%硫酸水溶液に  $60^\circ\text{C}$  で1時間浸漬後、5 M NaOH 水溶液に  $60^\circ\text{C}$  で24時間浸漬 (酸・アルカリ複合処理)
- ④ 粒径  $70 \mu\text{m}$  のアルミナ ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) 粒子を用いたサンドブラスト処理

試料は、アセトン、アルコール、蒸留水、超純水で各10分間超音波洗浄し、大気中で乾燥、その後エチレンオキサイドガス滅菌を行った。

#### 2. 試験片の表面形状

表面粗さを計測し、走査型電子顕微鏡 (SEM) により評価した。

#### 3. 細胞培養

培養細胞は骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を使い、培地は10%FBS含有  $\alpha$ -MEM を使用した。試料板を24-well plate 内に配置し  $1 \times 10^5$  cells/well、培地  $500 \mu\text{l}$  にて培養を開始した。

5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下で、1、2、3時間培養後、Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。次に 24-well plate に試料板を移し、MTT 試薬を添加し、通法に従いマイクロプレートリーダーにて 450 nm の吸光度を測定した。

#### 4. 細胞の形態観察

細胞付着状態は SEM により観察した。

#### 【結果】

表面粗さ測定結果において、硫酸処理は  $R_a$  が  $1.74 \pm 0.15 \mu\text{m}$  で最も高かった。次に酸・アルカリ処理複合処理 ( $1.11 \pm 0.08 \mu\text{m}$ )、サンドブラスト ( $0.72 \pm 0.04 \mu\text{m}$ )、アルカリ処理 ( $0.21 \pm 0.04 \mu\text{m}$ ) の順となった。SEM 観察の結果、チタン板に高濃度酸処理を施すと表面に孔径 1 ~ 2  $\mu\text{m}$  程度の微細な凹凸が形成されていた。

培養 3 時間まで、骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) の付着数に変化は認められなかった。SEM 像による処理したチタン板上での細胞付着形態の結果から、経時的な変化が観察された。すなわち、培養 1 時間では、球状の細胞が存在した。培養 2 時間では、細胞突起の伸長が観察され始めた。培養 3 時間では、肥厚な細胞突起が確認され、細胞の伸展が認められた。各処理群間の明らかな違いは認められず、従来の機械的処理と同等の細胞の初期付着が認められた。

#### 【結論及び考察】

これまでの研究で、チタン板に高濃度酸処理を施すと表面に孔径 1 ~ 2  $\mu\text{m}$  程度の微細な凹凸の多孔質が形成され、表層に水素化チタンが形成されること、アルカリ処理ではチタン板表面に網目構造のチタン酸ナトリウムが形成されること、酸・アルカリ処理複合処理では、酸処理によって生じた凹凸上にチタン酸ナトリウムが形成されることが明らかにされてきた (Ban *et al.* 2004)。本研究では、付着細胞数を MTT assay にて、また、細胞形態を SEM にて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への影響はみられなかった。

細胞の付着や伸展時、細胞の基底面は点接触するといわれている。本研究で行った酸処理、酸・アルカリ複合処理、サンドブラスト処理では、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る。一方、アルカリ処理した表面は滑沢であるが、細胞付着においては酸処理、酸・アルカリ複合処理と違いはみられなかった。

本研究より、チタン板への骨芽細胞様細胞の初期付着に関しては、各表面処理による多孔質や親水性皮膜の著明な影響はみられず、細胞の伸展に十分な表面形状と性状を示す可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 13 号	学位申請者	宮本 元治
審査委員	主査	田中 卓男	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	長岡 英一	副査 鳥居 光男
	副査	田沼 順一	副査 瀬戸口 尚志

**Early cellular responses of osteoblast-like cells on acid-etching and alkaline treated titanium**  
 (酸エッチングおよびアルカリ処理したチタン表面上での骨芽細胞様細胞の初期動態)

生体硬組織代替材料としてチタンの臨床応用は年々増加傾向にある。このことは、チタンが耐蝕性、機械的強度および生体親和性に優れていることなどが理由としてあげられる。インプラントは、オッセオインテグレーションの獲得が必要とされ、その獲得要因の1つにインプラントの表面性状があげられる。オッセオインテグレーションは、機械加工されただけのインプラント表面よりも粗造な表面のインプラントで獲得出来るとの報告から、化学的処理による表面改質したチタンを開発した。そこで、チタン表面の面積を増大させる酸処理、アパタイト形成能を付加するアルカリ処理、これら2つの表面処理を組み合わせた酸・アルカリ複合処理、最後に市販されている処理方法としてサンドブラスト処理の計4種類について検討することとした。良好な初期付着は、早期のオッセオインテグレーションの確立につながることから、初期付着に着目し、骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) に及ぼす影響を評価した。

その結果、本研究では以下の知見を得た。

- 1) 表面粗さは酸処理が最も粗く、次に酸・アルカリ複合処理、比較対照用のサンドブラスト処理、アルカリ処理の順であった。すべての処理間で有意差が認められた。
- 2) MTT assay により骨芽細胞様細胞の初期付着において、酸・アルカリ複合処理は他の処理と同等な付着細胞数を示した。
- 3) SEM による細胞形態の経時的変化から、細胞は球状のものから仮足突起を伸ばし、細胞表面の増大傾向を酸・アルカリ複合処理及び、すべての処理表面からも確認することが出来た。

インプラント治療は、咬合・咀嚼機能の改善の目的として歯科医療の一治療法として確立されつつある。インプラント表面への早期の細胞付着は、良好な骨性結合を獲得できる。表面改質としての酸・アルカリ複合処理は、化学的組成を変化させ、チタンが元来持つ生体親和性を損なわずに、微細な表面構造を獲得した。酸・アルカリ複合処理は他の処理法と同等の初期付着を示し、表面でのアパタイト形成能を考慮すると、酸・アルカリ複合処理が、本研究で用いた4種の表面処理法の中では最も適したチタンインプラントの表面処理法として有用である可能性が示唆された。

本研究はチタンの処理の違いにおける細胞の初期動態を評価したもので、きわめて臨床的に有意義である。さらに研究の進展が期待され、学位論文として十分な価値を有するものである。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 13 号	学位申請者	宮本 元治
審査委員	主査	田中 卓男	学位 博士(医学・歯学・学術)
	副査	長岡 英一	副査 鳥居 光男
	副査	田沼 順一	副査 瀬戸口 尚志

主査および副査の5名は、平成19年2月23日、学位申請者 宮本 元治 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 本論文に記載されている中で、cleaning operation、sterilization procedures、surface treatmentの違いは何か？

(回答) Introduction の文章中の cleaning operation はインプラント表面を洗浄することで、sterilization procedures はインプラントの滅菌過程を、surface treatment は表面処理操作法を意味しており、種々の操作が表面状態に影響することを示しています。また、Materials and Methods 中の Ultrasonically cleaned の cleaned はチタン表面の洗浄の意味で表現している。cleaning operation の cleaning と同じ意味である。

質問2) MC3T3-E1 細胞を使用した理由は、また種の差はあるが、ヒトの細胞株との見解は？

(回答) 骨原性のマウス頭蓋冠由来株細胞で腫瘍細胞株ではなく、多くの研究で使用されている。ヒト由来の骨芽細胞を用いることは理想であったが、今後の実験での課題と考えている。

質問3) 一般的に初期付着とは何時間までの状態のことをいうのか。培養を短時間で終えているが、長期観察を行わなかったのはなぜか？

(回答) 明確な定義はないが、24 時間以内のことを指す研究が多い。良好な初期付着はオッセオインテグレーションの確立に繋がると考え、今回は初期付着に着目した。

質問4) サンドブラスト(SB)処理のSB+酸処理、SB+アルカリ処理も実験群として評価した方が良かったのではないかと？

(回答) 実際条件を多くすることは有意義なことであるが、サンドブラスト処理は市販されている製品であり、比較対照用として採用したものである。サンドブラスト処理に酸処理を追加することで、表面荒さを更に大きくできる可能性があり、今後の検討課題と考えている。

質問5) MTT assay の結果を細胞接着している数と判断していいのか、また他の確認方法を検討したのか？

(回答) 細胞は付着・伸展の過程で、仮足突起が観察される。その仮足突起がみられれば、生細胞と考えられる。付着しなかった場合は接着能が無い球状形態であり、リン酸バッファー(PBS)にて基板を洗浄した際に洗い流されていると考えられる。したがって、MTT assay の結果を細胞接着している数と判断した。

今回用いた MTT assay は Cell Counting Kit (Dojindo 社製品)を使用した。これは、細胞増殖および細胞毒性測定用試薬で市販されており、他の研究でも頻用されており、細胞数測定の評価法として認知されている。

質問 6) 表面粗さの違いがあっても、細胞数および形態において有意差がないのはなぜか？

(回答) 他の環境要因が考えられる。例えば、表面の界面張力—ぬれ性、材料表面との電気的な性質 (帯電粒子の界面構造の違い)、細胞基底面で起こる接着点の獲得の違いなどが要素として考えられる。

質問 7) 質問 6) に関して、ぬれ性は平滑な方が良いのではないか？

(回答) ぬれ性は単純に表面粗さだけに依存せず、親水性コロイド層などの複合的性状によるものであると考える。また、多孔質による毛細管現象などが生じた可能性も考えられる。

質問 8) commercially pure titanium (cpTi) とは、どのような組成のものか？

(回答) 一般的に市販されている純チタンを指している。C、N、O、Fe が 0.5~1%程度含有されている。Ti-6Al-4V などのチタン合金と区別するためにこの用語が用いられている。

質問 9) 酸処理、アルカリ処理の条件設定はどのようにして行ったのか？

(回答) 酸処理では、表面粗さが最も粗くなる条件を採用した。アルカリ処理では、アパタイト形成能が最も高くなる条件とした。

質問 10) 細胞の付着について、どのように確認したのか？

(回答) 細胞付着の確認は MTT assay による細胞数と、走査型電子顕微鏡で観察し、細胞の付着状態を示す細胞突起を確認した。本研究では細胞の組織構造、細胞骨格の確認は行っていないが、その後、共焦点レーザー顕微鏡により細胞骨格 (Actin、Tubulin) の観察を行っている。

質問 11) 基材の製造方法は、表面改質に影響しないのか？

(回答) 純チタンの成形方法は、鋳造法、切削法、圧延法などがあるが、本実験は圧延法による基材のみを評価した。結晶粒の違いがあれば表面改質に影響があると推定されるが、細胞付着への影響は少ないと考えられる。

質問 12) 酸・アルカリ処理した時の特徴は何か？

(回答) 酸処理により三次元構造を有し、機械的研磨表面とは異なった三次元的特徴を有している。血餅やタンパク質の吸着しやすさなどが考えられる。この酸処理後にアルカリ処理を加えることで、アパタイトの形成能を増大させ、酸処理・アルカリ処理の特徴を兼ね備えた表面処理と考えた。

質問 13) 本実験では粗さの違いによる細胞付着の差はないが、機械的研磨処理と化学的処理の違いはあるのか？

(回答) 方向性のある溝を形成した機械的研磨面よりも方向性のない化学的処理面の凹凸部で細胞の付着状態が良いとの報告がある。本実験では、初期付着時において有意差がなかったが、長期観察では差がみられる可能性は十分考えられる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。