

論 文 要 旨

Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia

2種類ジルコニアにおける骨芽細胞様細胞の
初期細胞応答への表面粗さの影響

山 下 大 輔

【序論および目的】

歯科用インプラントフィクスチャー材料として現在最も広く用いられている材料は金属チタンである。一方、メタルフリーレストレーションの実現を担うジルコニアは「ホワイトメタル」と呼ばれるように金属に匹敵する強度を有しており、高強度セラミックスとして歯冠修復材料、インプラントのアバットメント、上部構造に用いられている。我々はジルコニアのインプラントフィクスチャー材料としての可能性を検討するため、2種類のジルコニアにおける表面粗さの影響を骨芽細胞様細胞の初期応答について検討し、チタンおよびアルミナと比較検討した。

【材料および方法】

1. 試料板の作製

実験には直径 15 mm、厚さ 0.5 mm のセリア系ジルコニア/アルミナ・ナノ複合材料 (CZA、松下電工) 焼成体、イットリア系ジルコニア (3Y-TZP、東ソー) 焼成体、純チタン (Ti、Kobelco) 圧延板およびアルミナ (AO、大明化学) 焼成体を供した。

各試料板は表面処理によって、Smooth 群と Rough 群に分けた。前処理として、Smooth 群の試料板はダイヤモンド研磨紙 (#220、#400、#600、#1000) で順次研磨し、Rough 群の試料板は Smooth と同様に研磨後、サンドブラスト処理を行った。その後、各試料をアセトン、エチルアルコール、超純水で各 10 分間超音波洗浄を行い、オートクレーブ滅菌 (121°C、20 min) を行った。

2. 試料板表面の分析

- ・ 表面粗さの測定：表面粗さ計により算術平均粗さ (Ra) を計測
- ・ 表面形態の観察：走査型電子顕微鏡 (SEM) および原子間力顕微鏡 (AFM) にて観察

3. 生体親和性評価

培養細胞はマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用い、10% FBS 含有 α -MEM にて培養した。試料を 24 穴プレート内に配置後、 5×10^4 cells/well にて細胞を播種し、5% CO₂、37°C 下にて培養を行った。

1, 3, 6 および 24 時間培養後、MTT Assay (cell counting kit 8、同仁化学) を用いて付着細胞数を調べた。1, 3, 6 および 24 時間培養後、固定・脱水・乾燥を行い SEM にて形態観察を行った。3 時間培養後のインテグリン α_5 および β_1 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。1, 3 および 6 時間培養後、アクチンファイバーの発現を蛍光顕微鏡にて観察を行った。

【結 果】

表面粗さは Smooth 群 (平均 Ra 0.24 μ m) と比較し、Rough 群 (平均 Ra 1.04 μ m) は高い値を示し、

サンドブラストしたことにより表面が荒れていることが明らかにされた。また SEM、AFM においても Smooth 群と比較して Rough 群において表面が粗造であることが確認された。付着細胞数は 24 時間まで経時的に増加し、Smooth 群と比較して Rough 群において有意に高かった ($p < 0.05$)。しかし、各材料間における付着細胞数には有意差は認められなかった。SEM による細胞形態の観察では経時的に良好に付着・伸展している像が認められた。しかし Smooth 群、Rough 群においては形態的な違いは認められなかった。3 時間培養後における MC3T3-E1 細胞のインテグリン α_5 および β_1 の発現は、Smooth 群と比較して Rough 群において強かったが、材料間における違いは認められなかった。アクチン染色においては、6 時間においてアクチンファイバーの形成が確認できた。しかし Smooth 群と Rough 群においてアクチンファイバーの形成に違いは認められなかった。

【結論及び考察】

ジルコニアは優れた生体適合性を有し、チタンに替わるインプラントの材料として注目を浴びてきている。しかし、チタンおよびジルコニアは生体不活性な材料である。現在インプラントフィクスチャーとして用いられているチタンでは、表面改質により生体適合性の向上が実現されている。チタンの場合、表面を粗くすることにより骨芽細胞の動態の向上が報告されている。我々はジルコニアにおいても表面粗さがチタンと同様の影響を及ぼすのか、特に骨芽細胞の初期動態に注目して研究を行った。

我々の用いた Rough 群の試料板は平均 Ra 1.04 μm の粗さであり、Smooth 群は平均 Ra 0.24 μm であった。Smooth 群の試料板と比較して付着細胞数、インテグリン α_5 および β_1 の発現においては全ての材料で Rough 群が良好であった ($p < 0.05$)。しかし細胞形態、アクチン染色については Smooth 群と Rough 群で明らかな違いは認められなかった。細胞骨格のアクチンフィラメントの形成は、細胞と試料板間の接着によって発現するインテグリンを介する経路だけではなく、細胞と細胞間におけるカドヘリンを介する経路等も影響するため、明らかな差は認められなかったものと考えられる。

さらに 2 種のジルコニア、アルミナ、チタンの材料間の比較においては、上記に述べた骨芽細胞様細胞の初期動態は同等であった。この結果は、各試料板の表面は化学的に安定な酸化物で被覆されているため、細胞の初期動態への影響はなかったものと推測された。

以上の結果より、2 種類のジルコニア (3Y-TZP および NANOZR) とともに、その表面粗さは骨芽細胞様細胞の付着に影響を与え、表面を粗くすることにより純チタン、アルミナ表面と同様に骨芽細胞様細胞の初期付着が改善されることが示された。以上のことより、チタンインプラントと同様にジルコニア対しても表面改質は必要であり、ジルコニアはインプラントフィクスチャーとして十分に応用可能であるものと考えられる。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 6 1 号		学位申請者	山下 大輔
審査委員	主査	田中 卓男	学位	博士 (医学 <u>歯学</u> 学術)
	副査	鳥居 光男	副査	松口 徹也
	副査	藤井 孝一	副査	松山 孝司

Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia
(2種類のジルコニアにおける骨芽細胞様細胞の初期細胞応答への表面粗さの影響)

純チタンやチタン合金は約40年以上にわたりインプラントフィクスチャーの素材として使用され、高い成功率を有している。しかしながらチタンインプラントには審美的問題や金属アレルギーの問題などが報告されており、これらの問題解決が重要な課題である。一方、セラミックスは優れた色調や化学安定性から生体材料として注目され、アルミナは生体材料として用いられてきたが、機械的特性の問題が報告されてきた。近年、ジルコニアは優れた機械的特性から生体材料として注目され、歯冠修復材料、インプラントのアバットメント、上部構造に用いられており、さらに次世代のインプラントフィクスチャー用材料として期待されている。インプラントにはオッセオインテグレーションの獲得が必要であり、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。機械加工されただけの表面よりも粗造な表面においてチタンインプラントのオッセオインテグレーションが良好に獲得されることが報告されており、ジルコニアにおいても同様な表面改質が有効であると推測される。本研究では2種類のジルコニア(3Y-TZPおよびNANOZR)における骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の初期応答についてサンドブラスト処理を施したRough群と機械研磨したSmooth群に分けて表面粗さの影響を評価し、チタンおよびアルミナと比較検討した。

その結果、本研究では以下の知見を得た。

1. Rough群における付着細胞数は、3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assayの結果、Smooth群より有意に高い値を示した。一方、群内の各材質間において違いは認められなかった。
2. SEMによる細胞形態観察では、全ての試料上において初期の球状から時間経過とともに偽足様突起を伸ばし、良好に付着、伸展していた。
3. Integrin α_5 , β_1 の細胞表面発現は、Flow cytometerによる解析の結果、Rough群においてSmooth群より良好であった。一方、群内の各材質間に発現の違いは認められなかった。
4. Actin染色により、培養6時間後の全ての試料上においてActin fiberの形成が認められた。

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。ジルコニア製インプラントフィクスチャーの実現のためにはインプラント表面への早期の細胞付着、良好なオッセオインテグレーションが必要である。サンドブラスト処理により粗造な表面を獲得した2種類のジルコニア(3Y-TZPおよびNANOZR)とも、その表面粗さは骨芽細胞様細胞の付着に影響を与え、純チタン、アルミナ表面と同様に表面を粗くすることにより骨芽細胞様細胞の初期付着が良好になることが明らかとなった。

本研究はジルコニアの表面粗さの違いにおける細胞の初期応答を評価したもので、きわめて臨床的に有意義である。さらに研究の進展により、ジルコニアインプラントフィクスチャーへの応用の可能性が期待され、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 61 号	学位申請者	山下 大輔
審査委員	主査	田中 卓男	学位 博士 (医学 歯学 学術)
	副査	鳥居 光男	副査 松口 徹也
	副査	藤井 孝一	副査 松山 孝司

主査および副査の5名は、平成21年2月10日、学位申請者山下 大輔 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) サンドブラストすることによりジルコニアは正方晶から単斜晶へと相変態が起こるということだが、ジルコニアが単斜晶へ変化したままで用いてはいけなはなぜか。

(回答) サンドブラストすることにより正方晶が単斜晶へと変化し、ジルコニア表面へ応力が残留する。単斜晶の状態であると不安定であり、表面の残留応力を解放するために熱処理を行い正方晶へと戻す必要がある。

質問2) ジルコニアの場合、単斜晶への変化により圧縮応力が残留しているため、単斜晶の状態の方が強度的に強いのではないか。

(回答) 機械的強度は単斜晶である状態において圧縮応力が存在しているため、強度が強いという報告があるが、応力が残留していることにより低温劣化が生じやすく結晶状態としては不安定であることから正方晶へと戻す必要があると考える。また、薄肉部や辺縁部では残留応力による変態が危惧されるため、熱処理による正方晶への変態は必要であると考え。

質問3) 表面処理としてサンドブラस्टィングを選択したのはなぜか。

(回答) チタンにおける表面処理には酸により表面の荒らす処理などもあるが、ジルコニアは耐薬品性が高く化学的処理は有効ではなく、機械的に表面を粗造にすることのできるサンドブラस्टィングを選択した。

質問4) Tiは70 μ mのアルミナ、他の試料は125 μ mのSiCにてサンドブラストしているが、表面にアルミナ、SiCは残留していないのか。

(回答) サンドブラスト後に超音波洗浄を行い、乾燥後X線回折により表面の残留を調べたが、アルミナ、SiCのピークは認められなかったため、表面への残留はないものとする。

質問5) Smoothな試料の中でアルミナのみ荒れているように見えるのはなぜか。また、アルミナの焼結温度を変えてもジルコニアのような表面にはならないのか。

(回答) アルミナは多くの単結晶粒子が焼結した多結晶体であり、一般的なセラミックス特有の表面形状を表している。ジルコニアはセラミックスとしては特異的であり、金属に類似した表面形態を呈している。アルミナでは表面の研磨により、構成している各結晶粒子が脆性破壊するため、粗造な表面として観察される。

質問6) Smoothの表面粗さ平均0.24 μ mとRoughの表面粗さ平均1.04 μ mに対して何か意味合いを持たして分けたのか。

(回答) インプラント表面の細胞応答において最適な表面粗さが1~1.5 μ mという報告に基づいて表面処理を行った。

質問7) MTT assayは試薬を添加してから何時間インキュベートしているのか。

最終試験の結果の要旨

(回答) 試薬を添加後1時間のインキュベーションを行った。

質問8) MTT assay において付着細胞と付着していない細胞はどのようにわけているのか。

(回答) 付着しなかった細胞は付着能が無いか弱い状態であり、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて基板を洗浄した際に洗い流した。したがって、MTT assay の結果を付着している細胞であると判断した。

質問9) 材質間において付着細胞数に差がないことに関してどのように考えるか。

(回答) チタン、アルミナ、ジルコニアは全て生体不活性な材料であり、また表面は化学的に安定な酸化物で被覆されているため、細胞への影響はなかったものとする。

質問10) Smooth と Rough において細胞形態に差がないとのことだが、付着細胞数に差が出ていることに関してどのように付着をしているものとするのか。

(回答) 本論文の Figure として示してはいないが、SEM 観察において細胞の仮足の状態を確認した際、Rough な試料板上においてサンドブラストにより粗造になった表面へ三次元的に仮足を伸ばしていたため、Smooth と比較して付着が強かったものとする。

質問11) 試料板表面に付着する Fibronectin の存在は何由来のものとするのか。

(回答) 細胞播種に用いた培地に添加している血清由来の Fibronectin と考える。

質問12) 血清由来の Fibronectin が試料板表面に付着するというのは一般的なことなのか。

(回答) フィブロネクチンがセラミックス、金属、高分子などの人工物に付着し、細胞接着が起こることが多く報告されており、一般的なこととする。

質問13) Actin 像を見る限り細胞数が増えているように見えないのだが、どう考えるか。また、顕微鏡下において数が増えているというのは確認できているのか。

(回答) 蛍光顕微鏡下において球形であった細胞が経時的に伸展し、細胞付着数が増加しているのを確認している。細胞形態、細胞が重なり合って Actin fiber がわかりにくくなるため、細胞が重なり合わずに典型的な Actin fiber を示す部位を選択的に示した。

質問14) Actin 観察において24時間後を観察していないのはなぜか。

(回答) Actin 形成の初期に差が認められれば、その後の形成にも差があると考えられるが、6時間において Actin fiber は明確に観察され、各試料板上においてほぼ同等であることが確認されたので、6時間までの観測とした。

質問15) 表面が粗いと細胞の付着が向上していることに関してどのように考えるか。また、サンドブラストすることによって表面を粗造にすると表面積が増加するが、細胞接着の向上はその表面積によるものではないのか。

(回答) 細胞接着には多因子が関係してくると考える。例えば、表面のぬれ性、ゼータ電位などの材料表面との電気的な性質、Fibronectin などのタンパク吸着、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、表面積の増加もその1因子として考えられる。

質問16) Actin 像観察においてはなぜ差が認められなかったのか。

(回答) 細胞骨格の Actin fiber の形成は、細胞と試料板間の接着によって発現するインテグリンを介する経路だけではなく、細胞と細胞間における Cadherin などを介する経路等も影響するため、明らかな差は認められなかったものと考えられる。

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。