

ナノパルスレーザーによる骨組織適合型インプラントの創製

東北大学大学院 工学研究科

准教授 水谷正義

(平成 23 年度一般研究開発助成 AF-2011212)

キーワード：インプラント，チタン，レーザー照射，表面改質，生体適合性

1. 緒言

近年、欠損した歯に対する治療法の一つとしてデンタルインプラントが注目を集めている。同インプラントの骨埋入部である人工歯根は本体に切られたねじによって初期固定力を得るが、その後歯槽骨と堅密に接着することによって完全に固定される。そのためデンタルインプラントを用いた治療では機能的、審美的について良好な回復が期待できる。また、近年の本治療法では 10 年後のインプラント生存率が 90%以上であることが報告されており¹⁾、治療成績も優れている。そのため、デンタルインプラントの利用は今後増加していくことが予想される。

デンタルインプラントでは主に純 Ti および Ti 合金が用いられる。それは、疲労強度が高く人体に対する毒性が低く、しかも耐食性に優れるためである。特筆すべき点は、オッセオインテグレーションと呼ばれる、骨に対し軟組織を介せず接着する現象を起こすことである。このため、Ti 系金属はデンタルインプラントに限らず、骨埋入型のインプラントに広く用いられる。Ti 系金属の中でも純 Ti は縦弾性係数が Ti 合金より低く、人骨により近いため広く用いられている。

Ti 製インプラントを骨に埋入すると、まず体液中に過飽和に含まれているリン酸カルシウム類が析出する。同時に骨芽細胞が空間を感知することで活性化し、骨の成分を骨とインプラントの双方の表面上で生産する。最終的に新生骨が骨-インプラント間を完全に埋め、堅密な接着状態が得られる。一方でこの接着状態が得られるまでには数ヶ月間必要であるとされている。未接着である期間が長いと、埋入部の骨吸収を招き、インプラントが脱離してしまう場合がある。そのため、骨との接着を早めるための表面改質手法が開発されている。

表面改質手法として代表的なものにハイドロキシアパタイトの被覆²⁾や陽極酸化³⁾、サンドブラスト・酸エッチング複合処理⁴⁾などがあげられる。これらの表面改質の狙いは主に二つある。一点目は体液中においてリン酸カルシウムを自然に析出させる性質を有すること、二点目は骨芽細胞に対して無害で、かつ骨生成活性を向上させる性質を有することである。本報告では改質した表面における骨芽細胞の挙動に着目する。

Khang ら⁵⁾は異なるオーダの微細凹凸がある表面を数種類作製し、その表面における細胞の接着性を評価している。その結果、表面に対し水平方向に数百 nm オーダ、垂直方向に数十 nm オーダの凹凸を有する表面において骨芽

細胞が選択的に接着し、増殖しやすいことを報告している。Lawrence ら⁶⁾は Ti の酸化皮膜の存在によって濡れ性の向上した表面が仮足の伸展を促し、細胞の増殖に有利であることを報告している。また、酸化皮膜に存在する OH 基の量が多いほど、播種した細胞は増殖しやすくなることが報告されている⁷⁾。表面の濡れ性の向上や、OH 基量の増加は骨芽細胞の骨生成活性も向上させる⁸⁾。酸化皮膜に加え数百 nm から数 μ m オーダの凹凸が存在する場合も、骨芽細胞の骨生成活性が向上する⁹⁾。一般的に骨生成活性が向上した骨芽細胞は増殖性が低下するが¹⁰⁾、表面の OH 基を紫外線照射や水蒸気処理などで意図的に増加させた場合には、細胞の増殖性を維持しつつ骨生成活性を向上させることができる¹¹⁾。

以上のことから、骨芽細胞の増殖性と骨生成活性を向上させる表面には微細な凹凸と酸化皮膜が不可欠である。それらを純 Ti 表面に形成する手法として、本研究ではレーザー照射に着目した。純 Ti にレーザー照射することで表面が熱加工され、微細凹凸と酸化皮膜の両方が同時に形成されると考えられる。同表面は細胞の増殖性や骨生成活性を向上させる可能性がある。

本報告ではマウス由来の骨芽細胞様細胞を用いて培養試験を行った。まず、レーザー照射した純 Ti 表面における細胞の接着状態を観察し、検討を加えた。また、MTT Assay により増殖性を、ALP (アルカリホスファターゼ) 活性の測定により骨生成活性を評価した。

2. 実験方法

2.1 試験片の準備

供試材としては、JIS2 種の純 Ti を用いた。同材を ϕ 15.0mm、厚さ 4mm の円盤状に機械加工し、その一方の端面を耐水研磨紙 (#320~#1200) および SiO₂ 懸濁液を用いて鏡面状に仕上げた (Polished シリーズ)。図 1 に装置の外観を示す。本研究ではレーザーダイオードを励起源とするナノ秒パルス Nd:YVO₄ レーザを用いた。表 1 に試験片に対するレーザー照射条件を、図 2 にレーザー走査パスを示す。この条件でレーザー照射された試験片を Laser シリーズとする。同シリーズの SEM による観察および XRD, XPS による分析を行った。XPS 分析を行う試験片は表面への炭化物の付着を防ぐため、超純水で繰り返し超音波洗浄を行ったうえで、超純水中に保管した。また、洗浄した Laser シリーズの試験片全体を表 2 に示す組成を有する 1.5SBF に 2 日間浸漬し、Laser-SBF シリーズを作製した。

表1 レーザ照射条件

使用レーザー	レーザーダイオード励起 Nd:YVO ₄ レーザ
焦点ずらし量	2.0mm
ビーム強度	5.0W
走査線の間隔	50mm
走査速度	10mm/s
波長	532nm
集光レンズの焦点距離	150mm
周波数	40kHz
パルス幅	13.4ns

表2 1.5SBF のイオン組成

イオン	イオン濃度/mmol・L ⁻¹
Na ⁺	213.00
K ⁺	7.50
Mg ²⁺	2.25
Ca ²⁺	3.75
Cl ⁻	221.70
HCO ₃ ⁻	6.30
HPO ₄ ²⁻	1.50
SO ₄ ²⁻	0.75

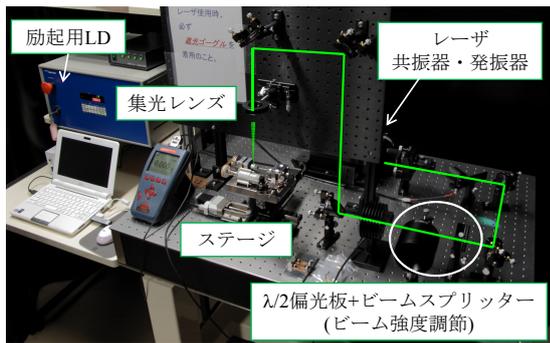


図1 Nd:YVO₄ レーザシステム

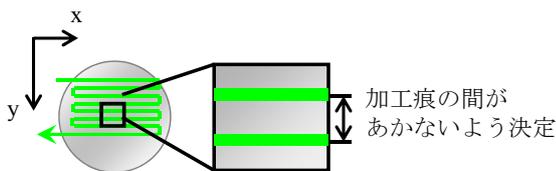


図2 走査パス

各シリーズの試験片は緩衝剤に HCl と Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) を用いた生理食塩水中に保管した。これは細胞の増殖性や骨生成活性に悪影響を及ぼす不純物の付着を防ぐためである。HCl-Tris 緩衝生理食塩水は 8.4g の NaCl と 25ml の 1 M HCl を加えた 1 リットルの水溶液に、Tris を少しずつ溶かし pH7.6 に調整することで作製した。緩衝溶液とすることで溶液を酸性に傾きにくくし、Laser-SBF シリーズ表面のヒドロキシアパタイトの溶出を防ぐ狙いがある。

2・2 細胞培養試験

本実験では、ラットの間葉系幹細胞から分化させた骨芽細胞様細胞を用いた。骨芽細胞の接着性および増殖性、骨生成活性を向上させる表面は自然骨との早期の接着が期待できる。試験片は HCl-Tris 緩衝生理食塩水に浸漬した状態で高圧蒸気滅菌 (121℃, 15 分間) したものをを用いた。細胞は試験片一つ当たり 1×10^4 cells 播種し、温度 37℃, CO₂ 濃度 5 % に維持されたインキュベータ内に 72 時間静置することで培養した。

培養後 SEM による細胞の観察、MTT Assay および ALP 活性の測定を行った。なお、MTT Assay および ALP 活性の測定におけるサンプル数は $n=5$ とし、上記シリーズに Well シリーズも加えて実験を行った。

MTT Assay では相対的な細胞数を測定することができる。本実験では 4 種類の異なる数の細胞を播種したウェルを 2 組用意し、一方を MTT Assay で、もう一方を血球計算盤で細胞数を測定することで検量線を引いた。これを用いて MTT Assay の結果を細胞数で表すようにした。また、ALP 活性は骨芽細胞の骨生成量と強い相関があることが知られている¹⁵⁾。本研究ではその結果を細胞数で割ることにより、細胞数あたりの骨生成活性を評価した。

3. 実験結果及び考察

3・1 レーザ照射した純 Ti の表面性状

図3に Laser シリーズの表面の SEM 画像を示す。同図より、Laser シリーズでは、50μm おきにレーザー走査の方向に沿った数十μm オーダの凹凸が形成されていることがわかる。これはレーザー照射によって基材が蒸発したためである。同図の (d), (e) より、加工痕内側では、数μm オーダの凹凸と 100 nm を下回るオーダの凹凸が混在した表面になっていることがわかる。この部位における数μm オーダの複雑な形状をした凹凸は基材の蒸発によって形成されたと考えられる。また、(f), (g) に示された部分では数μm オーダの凹凸に加え数十 nm および数 nm の凹凸が自己相似的に形成した表面となっている。図3 (b), (c) の部分ではμm 以上のオーダについて平滑であるが、数十 nm オーダでは凹凸が認められる。図3 (b), (f) に示された部分ではレーザー走査線の中心から外れているため、基材の蒸発は起きていないと考えられる。その一方、10μm 以上のオーダでみると平坦ではないため、基材の溶融が起きているか、あるいは加工痕中心部で溶融した基材が付着したものと考えられる。図3 (f) の部位は (d) の部位と比較して高さがあるため、溶融した基材が付着することで図にみられる凹凸が形成した可能性が高い。このように、レーザー照射した純 Ti は数 nm から数十μm オーダの凹凸が混在した非常に複雑な凹凸を有する表面となった。前述したように表面凹凸のオーダによって細胞に及ぼす影響が異なるが、このような表面では細胞の増殖性と骨生成活性がともに向上する可能性がある。

図4にXRD分析の結果を示す。同図より、Laserシリーズ表面には、ルチルおよびアナターゼ型結晶を有するTiO₂が形成していることがわかる。これらの結晶構造を有するTiO₂はOH基と合わせ、細胞の骨生成活性向上に有効であることが知られている¹²⁾。

次にOH基の数はXPSによって評価を行った。図5にXPSによる表面の分析結果を示す。OH基のピークはO1s軌道のピークを分離することで得られるが、通常このピークには不純物である炭化物の炭素-酸素結合のピークが含まれている。本研究では下記の式によってOH基の量を算出した。

$$(\text{OH}) = (\text{OH})_{\text{MEAS}} - (\text{C-O})_0 - (\text{O-C=O})_0 \quad (1)$$

$$(\text{C-O})_0 = \left(\frac{(\text{C-O})}{(\text{C-H}) + (\text{C-O}) + (\text{O-C=O})} \right) \left(\frac{\text{C}}{\text{O}} \right) (\text{OH})_{\text{MEAS}} \quad (2)$$

$$(\text{O-C=O})_0 = \left(\frac{(\text{O-C=O})}{(\text{C-H}) + (\text{C-O}) + (\text{O-C=O})} \right) \left(\frac{\text{C}}{\text{O}} \right) (\text{OH})_{\text{MEAS}} \quad (3)$$

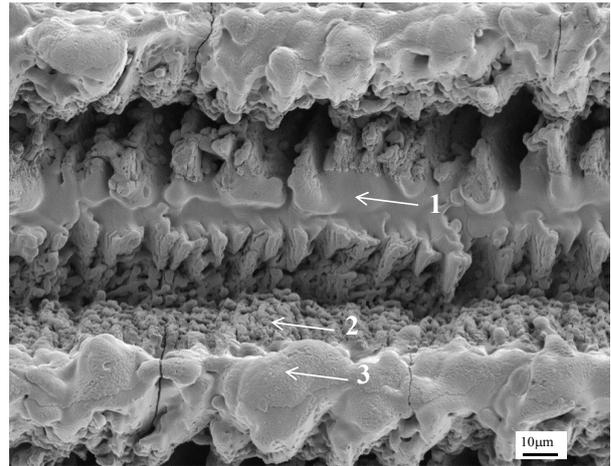
本研究ではOH基のピークから不純物のピークを割合的に差し引くことによって本来のOH基の量を算出した。原理的には不純物のピークをO1s軌道のピークから分離することも可能であるが、ピークの強度が相対的に小さく、分離数も多くなるため、正確に行うのは困難である。

図6に式(1)～(3)を用いて求めたOH基の量を示す。本研究で用いた方法を用いて算出したOH基量は、不純物のピークが大きいほど結果は不確かになる。図5より両シリーズのC1s軌道のピークはO1s軌道のピークの10分の1程度であるため、図6を解釈するうえでは最大10%程度の不確かさを考慮すればよい。図6における二つのデータはそれ以上の差があるため、Laserシリーズ表面ではPolishedシリーズより多くのOH基が存在しているといえる。

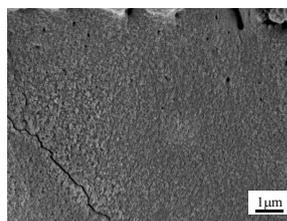
以上のことより、純Ti表面にレーザ照射することで複雑な微細凹凸と、表面にOH基を有するルチルおよびアナターゼ構造の酸化皮膜が形成することが明らかとなった。この表面は、骨芽細胞の増殖性および骨生成活性を共に向上させる可能性がある。

3・2 レーザ照射した純Tiの表面の細胞適合性

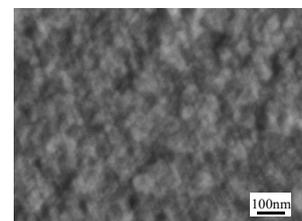
図7に細胞のSEMによる観察結果を示す。同図(a)より、Polishedシリーズ表面の細胞は非常に薄く伸展しており、繊維芽細胞様になっていることがわかる。また、図7(b)、(c)よりLaserシリーズの表面では細胞がより立体的になっていることがわかる。図中のいずれの細胞も加工痕の底に接着せず、加工痕をまたぐようにその両岸に接着する形となっている。図7(e)のような山部に存在する細胞においても同様に細胞中央部は基材表面から離れている。なお、図中の位置に限らず、Laserシリーズ表面において加工痕の底部に密着した細胞は確認されなかった。以上のことよりLaserシリーズ表面に接着した細胞は小さ



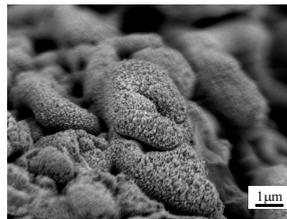
(a)全体像



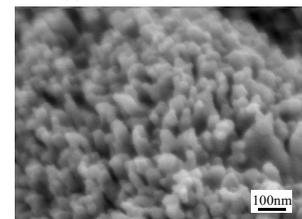
(b)拡大図1 (×10k)



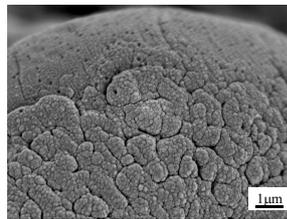
(c)拡大図1 (×100k)



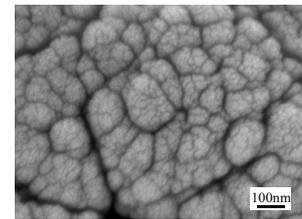
(d)拡大図2 (×10k)



(e)拡大図2 (×100k)



(f)拡大図3 (×10k)



(g)拡大図3 (×100k)

図3 Laserシリーズの表面観察結果

な接着面積でも大きな接着強度が得られている可能性がある。Manganoら¹³⁾はこのような形状の骨芽細胞は高い骨生成活性を有していることを報告している。

Laser-SBFシリーズ表面では、図7(f)に示すような加工痕間の凸部に密着した細胞が多いことが特徴である。図7(g)に示した凸部以外の位置にも細胞が接着していることもあった。この場合、Laserシリーズ表面のものと同様、加工痕の両岸に接着していた。また、細胞を上から見た際の大きさは他のシリーズ表面上のものと比較して最も小さい傾向が認められた。その一方で、図7(f)、(g)に示された細胞のように立体的な構造をとっているものが多かった。もう一点、Laser-SBFシリーズ上の細胞に特徴的なことはその表面に例外なく凹凸が形成されていること

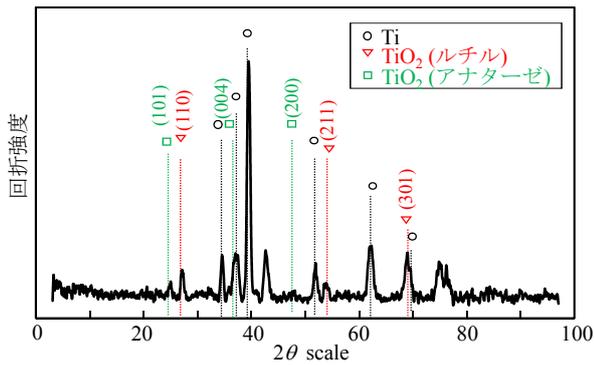
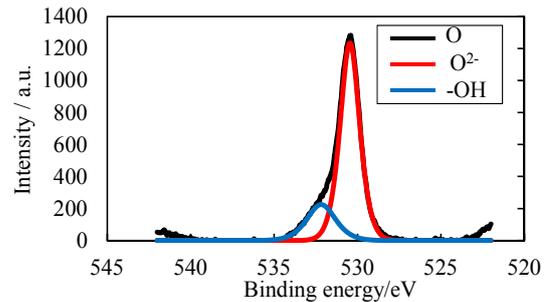


図4 Laser シリーズ表面の XRD 分析結果

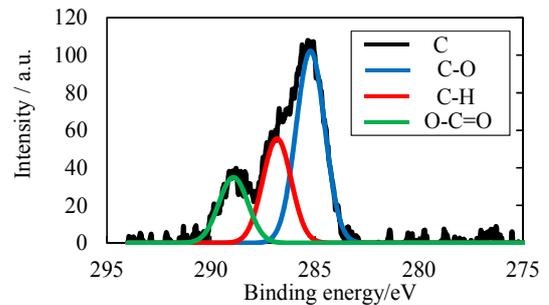
である。図 7 (h) にその様子を示す。Laser シリーズ表面の細胞は同 7 (d), (e) に示すもののように表面に凹凸のあるものが多数を占めていたが、同図 (b) のように凹凸の少ないものもあった。骨芽細胞や軟骨細胞などの間葉系細胞の機能性が高い状態にある場合、細胞はより立体的な構造を取り、表面には凹凸が形成されることが知られている¹⁴⁾。以上のことから、Laser-SBF シリーズ>Laser シリーズ>Polished シリーズの順に、表面で培養した骨芽細胞の骨生成活性が高いことが予想される。

図 8 に MTT Assay による細胞数の測定結果を、図 9 に ALP 活性の測定値を示す。両図のデータは検定力検定ソフト G*Power による検定力の事後検定によって 90%以上の高い検定力を有していることがわかっている。そのため分散分析の結果は信頼できるものといえる。図 8 より Well シリーズ表面で最もよく細胞が増殖し、次いで Laser シリーズおよび Polished シリーズ表面で細胞増殖率が高かった。このことより、Laser シリーズ表面は Polished シリーズと同程度に細胞に対して無毒であり、細胞が増殖しやすい表面であるといえる。Laser-SBF シリーズ表面では細胞が播種した数よりも減少している。その一方で、同表面では細胞一つ当たりの骨生成活性が最も高かった。これは骨芽細胞が高い機能性を示す場合、細胞の増殖性が落ちるためである⁸⁾。逆に骨芽細胞が高い増殖性を獲得した場合、機能性を失うことになる。これは図 8, 図 9 の Polished シリーズおよび Well シリーズにおいて顕著に表れている。

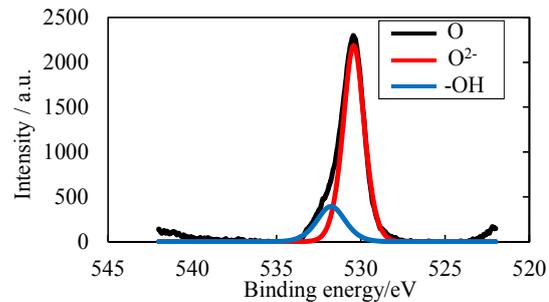
Laser シリーズ表面では Polished シリーズ表面と同程度細胞が増殖するが、骨生成活性は Polished シリーズのそれを上回る。つまり Laser シリーズは細胞の増殖性を低下させることなく、骨生成活性を向上させる表面を有しているといえる。これは表面の凹凸、および OH 基を有する酸化皮膜が、骨芽細胞の骨生成活性を向上させつつ増殖を促したためと考えられる。Laser-SBF シリーズ表面 (ハイドロキシアパタイト層) は骨芽細胞の骨生成活性は向上させるものの細胞増殖性を低下させた。ハイドロキシアパタイトは OH 基を有しているので、Laser シリーズにおける細胞の高い増殖性には凹凸が深く関与しているものと考えられる。



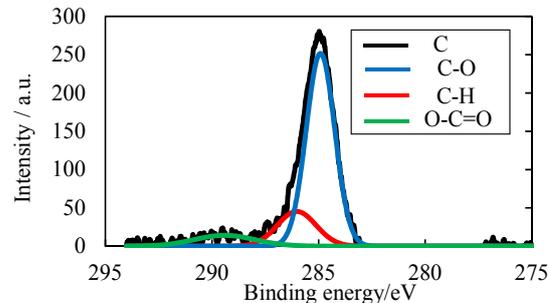
(a) Laser シリーズ : O 1s



(b) Laser シリーズ : C 1s



(c) Polished シリーズ : O 1s



(d) Polished シリーズ : C 1s

図5 XPS 分析結果

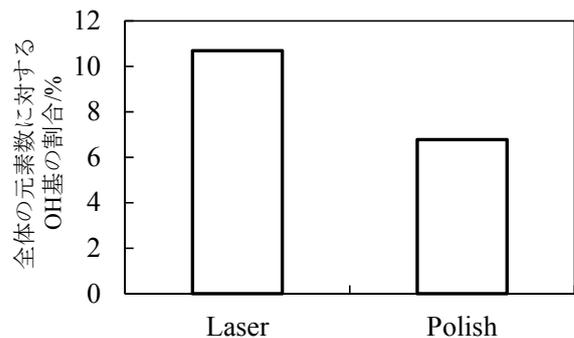


図6 表面の OH 基量

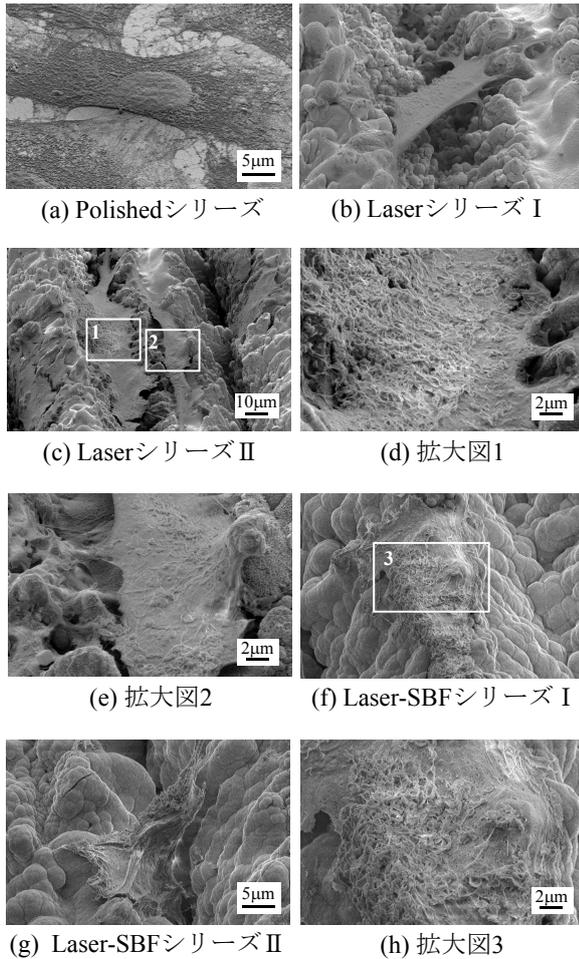


図7 骨芽細胞のSEM観察結果

4. 結言

本報告ではレーザー照射した試験片上における細胞の挙動や増殖性、骨生成活性を調べるため、骨芽細胞様細胞を用いた細胞試験を行った。Laser シリーズや Laser-SBF シリーズ上では細胞の形状が立体的に変化し、細胞表面に凹凸が形成された。これは細胞の機能性が発現しやすい状態にあることを示す証拠の一つである。実際に、Laser シリーズでは Polished シリーズと比較して細胞数あたりの ALP 活性は 4 倍程度と大きく向上し、Laser-SBF ではさらにその 1.5 倍程度であった。増殖性は Laser シリーズと Polished シリーズが同程度で、Laser-SBF シリーズはそれらに劣る結果となった。以上の結果はレーザー照射した表面では細胞の増殖性を損なうことなく機能性を向上させられる可能性を示唆するものである。

謝辞

本研究は公益財団法人天田財団（天田金属加工機械技術振興財団）平成 23 年度一般研究開発助成 AF-2011212 による助成を受けて実施した。ここに謝意を表す。

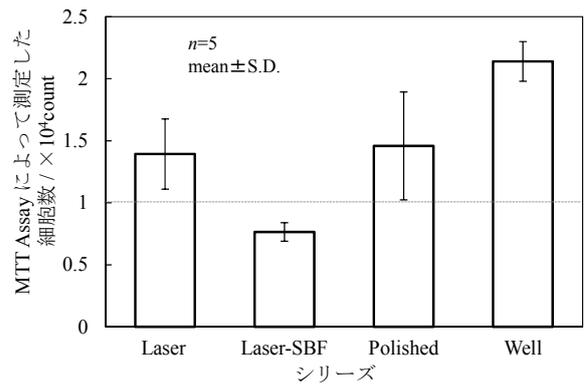


図8 MTT Assay による細胞数促成結果

* Laser シリーズ—Polished シリーズを除く全組み合わせにおいて有意水準 5% で有意差あり

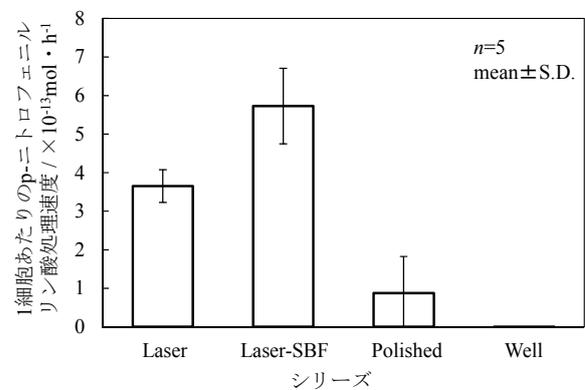


図9 ALP 活性測定結果

* 全組み合わせにおいて有意水準 5% で有意差あり

参考文献

- 1) 塩山司, 伊藤創造, 武部純, 石橋寛二, 横田光正, 石川義人, 飯島伸, 鈴木哲也, 八重柏隆, 佐藤雅仁, 朝岡昌弘, 高橋直子, 口腔インプラント室における臨床統計観察, 岩手医科大学歯学雑誌, Vol.34, No.3, Page 97-109 (2009).
- 2) T Hayakawa, K Takahashi, M Yoshinari, H Okada, H Yamamoto, M Sato, K Nemoto, Trabecular bone response to titanium implants provided with a thin carbonate-containing apatite coating applied using molecular precursor method, *Int J Oral Maxillofac Implants*, Vol.21, No.6, Page 851-858 (2006).
- 3) B Setzer, M Bächle, M C Metzger, R J Kohal, The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia, *Biomaterials*, Vol.30, No.6, Page 979-990 (2009).
- 4) G Zhao, Z Schwartz, M Wieland, F Rupp, J Geis-Gerstorfer, D L Cochran, B D Boyan, High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure, *J Biomed Mater Res A*, Vol.74, No.1, Page49-58 (2005).

- 5) D Khang, J Lu, C Yao, K M Haberstroh, T J Webster, The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium, *Biomaterials*, Vol.29, No.8, Page 970-983 (2008).
- 6) J Lawrence, L Hao, H R Chew, On the correlation between Nd:YAG laser-induced wettability characteristics modification and osteoblast cell bioactivity on a titanium alloy, *Surf Coat Technol*, Vol.200, No.18-19, Page 5581-5589 (2006).
- 7) L Xie, X Liao, G Yin, Z Huang, D Yan, Y Yao, W Liu, X Chen, J Gu, Preparation, characterization, in vitro bioactivity, and osteoblast adhesion of multi-level porous titania layer on titanium by two-step anodization treatment, *J Biomed Mater*, Vol.98, No.2, Page 312-320 (2011).
- 8) L Bren, L English, J Fogarty, R Policoro, A Zsidi, J Vance, J Drelich, N Istephanous, K Rohly, Hydrophilic/electron-acceptor surface properties of metallic biomaterials and their effect on osteoblast cell activity, *J Adhes Sci Technol*, Vol.18, No.15/16, Page 1711-1722 (2004).
- 9) Z Schwartz, R O Navarrete, B D Boyan, M Wieland, D L Cochran, Mechanisms regulating increased production of osteoprotegerin by osteoblasts cultured on microstructured titanium surfaces, *Biomaterials*, Vol.30, No.20, Page 3390-3396 (2009).
- 10) R A Gittens, T McLachlan, R Olivares-Navarrete, Y Cai, S Berner, R Tannenbaum, Z Schwartz, K H Sandhage, B D Boyan, The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation, *Biomaterials*, Vol.32, No.13, Page 3395-3403 (2011).
- 11) T Miyauchi, M Yamada, A Yamamoto, F Iwasa, T Suzawa, R Kamijo, K Baba, T Ogawa, The enhanced characteristics of osteoblast adhesion to photofunctionalized nanoscale TiO₂ layers on biomaterials surfaces, *Biomaterials*, Vol.31, No.14, Page 3827-3839 (2010).
- 12) H T Chen, C H Hsiao, H Y Long, K C Chen, J L He, C J Chung, C H Tang, Micro-arc oxidation of β -titanium alloy: Structural characterization and osteoblast compatibility, *Surf Coat Technol*, Vol.204, No.6-7, Page 1126-1131 (2009).
- 13) C Mangano, F Mangano, A De Rosa, V Desiderio, R D'Aquino, F De Francesco, V Tirino, G Papaccio, A Piattelli, The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures, *Biomaterials*, Vol.31, No.13, Page 3543-3551 (2010).
- 14) S Nuernberger, C Albrecht, V Vecsei, S Marlovits, H Redl, N Cyran, The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts, *Biomaterials*, Vol.32, No.4, Page 1032-1040 (2011).
- 15) T M Li, H C Huang, C M Su, T Y Ho, C M Wu, W C Chen, Y C Fong, C H Tang, Cistanche deserticola extract increases bone formation in osteoblasts, *J Pharm Pharmacol*, Vol.64, No.6, 897-907 (2012).