

O2-1

ストロンチウムアパタイト薄膜の作製とその細胞接着性評価

Preparation of strontium apatite films and the cell attachment of osteoblast-like cells on them

○ 星野智大 (茨城大院) 尾関和秀 (茨城大) 後藤哲哉 (九歯大)

増澤徹 (茨城大) 青木秀希 (国際アパ研)

Tomohiro HOSHINO, Ibaraki University
Kazuhide OZEKI, Ibaraki University
Tetsuya GOTO, Kyushu Dental College
Toru MASUZAWA, Ibaraki University
Hideki AOKI, International Apatite Co., Ltd

Abstract: The preparation of strontium apatite (SrAp) thin films and the cell attachment of human osteosarcoma cell line Saos-2 on the films were investigated. SrAp was coated onto Ti substrates using radio frequency sputtering. The coated films were subjected to hydrothermal treatment. The crystallinity and the surface of the films were observed using X-ray diffractometer (XRD) and a scanning electron microscope (SEM), respectively. The cell attachment was carried out with the osteoblast-like cells. From XRD patterns, as-sputtered SrAp film was high crystallinity. In the cell attachment measurement, the number of cells on the SrAp film increased by hydrothermal treatment, and also the cell area on SrAp film after hydrothermal treatment exhibited the same level as hydroxyapatite (HA) films after the treatment and Ti. Furthermore, the number of vinculin on the SrAp film treated with the treatment was larger than HA films.

Key Words: Hydroxyapatite, Sputtering, Dental Implant, Vinculin

1. 緒言

ハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HA)は、優れた生体適合性を有しており、人工骨などの生体材料として利用されている¹⁾。しかし、HA 単体では破壊靱性が低い²⁾ため、金属の表面に HA をコーティングした複合材料の形で幅広く利用されている。HA 膜を成膜する方法の一つとして、高周波(RF)マグネトロンスパッタリング法がある。スパッタリング法は、基板上に均一な薄膜を成膜でき、その薄膜と基板との付着強度が高いという特徴がある²⁾。スパッタリング法によりコーティングされた HA 薄膜がプラズマスプレー法による HA 膜よりも優れた骨結合強度を示したとの報告もされている³⁾。この水熱処理を行ったスパッタリング HA 薄膜の技術を用いた歯科インプラントは、現在日本で実用化されている。しかしながら、この歯科インプラントは、骨密度の低い高齢者などには使用できないケースがある。近年、ストロンチウムが、積極的に骨形成に作用し、骨芽細胞の活動を促進するだけでなく、破骨細胞の活動を減少させるとして注目されている⁴⁾。そこで本研究では、HA の Ca を Sr に全て置換したストロンチウムアパタイト($\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; SrAp)を作製し、これを成膜材料(ターゲット)として、スパッタリング法を用いて Ti 基板上に成膜し、SrAp 薄膜の評価を行った。更に、骨親和性評価の基礎的な評価としてヒト骨芽細胞様細胞による接着細胞数と細胞伸展、vinculin 発現について実験を行った。

2. 実験方法

2-1 試料作製

スパッタリング装置には SPF-210HD ((株)キャノンアネルバ)を使用し、成膜を行った。基板は、Ti 板 ((株)ニラコ)を用いた。SrAp 薄膜におけるターゲットには、溶液法で作製し、800°Cで焼成した SrAp 粉末を使用した。比較対象として、HA 粉末 ((株)太平洋化学産業)をターゲットに使用した HA 薄膜も作製した。成膜条件は、ガス圧力 0.5Pa、放電電力 100W で、膜厚は 1 μm とした。さらに、膜の結晶

性の向上を図るために水熱処理を行った。条件は、温度 120°C、圧力 0.20MPa で、SrAp 薄膜では 6 時間、HA 薄膜では、24 時間行った。

作製した薄膜は、X 線回折装置 RINT2000 ((株)リガク)で生成物の同定及び膜の結晶性を、走査型電子顕微鏡及びエネルギー分散型 X 線分析装置 JSM-5600LV ((株)日本電子)で表面性状観察を行った。

2-2 細胞接着

細胞には、ヒト骨芽細胞様細胞株 Saos-2 を使用した。使用するサンプルは、水熱処理前後の SrAp 薄膜 (sp-SrAp, hyd-SrAp) と HA 薄膜 (sp-HA, hyd-HA) とする。細胞は、 1.0×10^4 cells/sample の細胞濃度で播種した。培養液には、10%ウシ胎仔血清 (FBS; (株)和光純薬工業)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペニシリン G (PCG; (株)和光純薬工業)、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン (GM; Gibco)、0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ファンギゾン (Gibco) 含有 α -MEM (Gibco) を用いた。温度は 37°C とし、6、24 時間培養を行った。

細胞培養後、CS バッファーで洗浄し、4%ホルマリンで固定した。その後、TRITC-phalloidin (希釈率 1:40, Molecular Probes)を用いて、温度 37°C で 30 分間染色を行った。細胞接着数は、蛍光顕微鏡 (BX50; (株)オリンパスオプティカル)で観察し決定した。

細胞伸展範囲と Vinculin 発現レベルは、マウス抗ビンキュリンモノクローナル抗体、抗マウス二次抗体により染色後、TRITC-phalloidin を用いて温度 37°C で 30 分間染色を行い、蛍光顕微鏡観察により決定した。

3. 実験結果及び考察

Figure.1 に SrAp ターゲットと水熱処理前後の SrAp 薄膜の XRD パターンを示す。全てのサンプルにおいて、SrAp の代表的なピーク (24.4°, 26.5°, 30.4°, 31.7°) と基板による Ti の代表的なピーク (35.1°, 38.4°, 40.1°, 53.0°) が確認された。水熱処理前の SrAp 薄膜では、SrAp ターゲットとほぼ

一致するパターンであることから、SrAp 薄膜の作製が確認できる。さらにピークの半値幅が小さく、結晶性が高いと考えられる(b)。一方水熱処理後の SrAp 薄膜では、水熱処理前と比べて大きな変化は確認できなかった(c)。

Figure.2 に各サンプルにおける接着細胞数を示す。接着細胞数は、培養時間の増加とともに増加傾向を示した。HA 薄膜では、水熱処理前後の接着細胞数に有意差はなく、コントロールの Ti と同程度の高い値を示した。一方 SrAp 薄膜では、水熱処理前の状態(sp-SrAp)では非常に低い細胞接着数を示した。しかしながら、水熱処理後の SrAp 薄膜(hyd-SrAp)では、薄膜表面の細胞の足場となるたんぱく質が増加し、接着細胞数が増加したと考えられる。

Figure.3 に細胞の伸展度合いを示す接着細胞 1 個あたりの細胞面積を示す。培養時間 6 時間における水熱処理前の SrAp 薄膜(sp-SrAp)のデータは得られなかった。培養時間 24 時間において、水熱処理後の HA 薄膜(hyd-HA)と SrAp 薄膜(hyd-SrAp)はともに Ti と同程度の高い値を示し、水熱処理後の SrAp 薄膜への細胞接着は良好であると考えられる。

Figure.4 に培養時間 24 時間における接着細胞 1 個あたりの Vinculin 数を示す。水熱処理前の SrAp 薄膜 (hyd-SrAp) については、接着細胞数が少なく染色も不鮮明であったためデータは得られなかった。Vinculin はインテグリン裏打ちタンパク質で、細胞が基質と接着する部分に集積・発現する接着分子の一つである⁵⁾。Vinculin 数において、水熱処理後の SrAp 薄膜では HA 薄膜よりも高い値を示した。このことから、従来の HA 薄膜よりも高い細胞接着性が示唆され、細胞初期接着に関して良好な接着性をしていると考えられる。

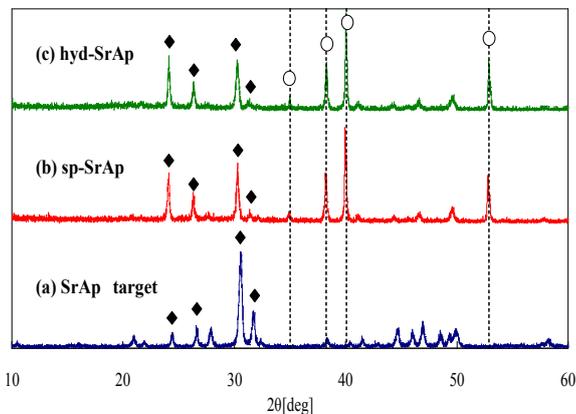


Fig.1 XRD patterns of : (a) SrAp target, (b) as-sputtered SrAp film, (c) sputtered SrAp film after the hydrothermal treatment. Key: ◆=SrAp, ○=titanium

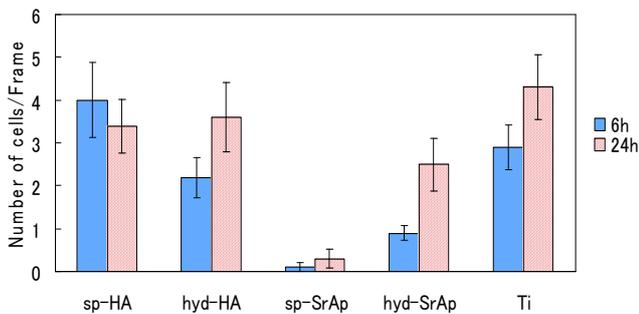


Fig.2 Number of osteoblast-like cells attached on films after 6, 24h of culture in a certain area. (N=10)

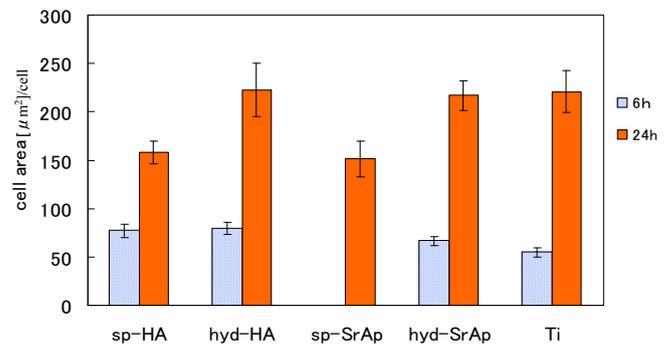


Fig.3 Area of osteoblast-like cells on samples after 6, 24h of culture. (data about sp-SrAp of 6h not available)

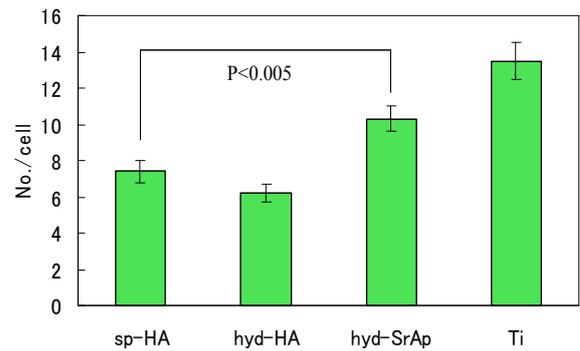


Fig.4 Number of vinculin per cell cultured on films after 24h of culture. (data about sp-SrAp not available)

4. 結言

本研究では、スパッタリング法を用いて SrAp 薄膜を作製し、従来の HA 薄膜と比較して SrAp 薄膜の結晶性及び細胞接着性の評価を行った。SrAp 薄膜は水熱処理前の状態でも高い結晶性を示した。接着細胞数と細胞面積に関して、水熱処理後の SrAp 薄膜は、HA 薄膜と同程度の値を示した。水熱処理後の SrAp 薄膜の Vinculin 数は、有意に高い値を示した。

参考文献

- (1)H.Aoki, Medical Applications of Hydroxyapatite, Ishiyaku EuroAmerica, Inc. Tokyo, St.Louis, 1994.
- (2)K.Ozeki, H.Aoki, and T.Masuzawa, TEM Observation on Nano-Interface Between Hydroxyapatite Sputtered Film and Titanium Substrate, Journal of the Australian Ceramic Society, 46, 72-73, 2010.
- (3) K.Ozeki,A.Mishima,T.Yuhta,Y.Fukui and H.Aoki, Bone bonding strength of sputtered hydroxyapatite films subjected to a low temperature hydrothermal treatment, Bio-Medical Materials and Engineering, 13, 451-463, 2003.
- (4)C.Capuccini, P.Torricelli, E.Boanini, M.Gazzano, R.Giardino and A.Bigi, Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells, Journal of Biomedical Materials Research PartA, 594-600, 2009.
- (5)A.Okumura, M.Goto, T.Goto, M.Yoshinari, S.Masuko, T.Katsuki and T.Tanaka, Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2), Biomaterials, 22, 2263-2271, 2001.