

新インプラント用合金 Ti-13Nb-29Ta-4.6Zrの骨芽 細胞様細胞をもちいた生体 適合性に関する研究

Evaluation of New Ti-13Nb-29Ta-4.6Zr Alloy
Biocompatibility Using Osteoblast-like Cell
MG63 *in vitro*

長縄 敬弘

キーワード：Ti-13Nb-29Ta-4.6Zr,
Titanium, Implant,
PGE₂, Osteoblast



(ながなわ・たかひろ)
ICDフェロー
愛知学院大学歯学部
歯周病科非常勤講師
東山デンタルクリニック

I. 緒 言

現在の歯科や整形外科分野において、インプラント治療は、生体の機能回復のために欠かすことのできない治療方法となっており、一般的にも認知された治療方法となりつつある。しかし、インプラントの形態や術式、さらに材料など様々な点において改善の余地は残されている。

現在、インプラント材料として、純チタン (pTi) やチタン合金のTi-6Al-4V (TiAl) が比較的生体適合性に優れた金属として広く利用されている。しかし、生体適合性の点で、AlやVからの金属毒性が懸念されており、また力学的適合性の点で、緻密骨との弾性率の差が大きいことが指摘されている^{1, 2)}。

近年、チタン合金の一つとしてTi-29Nb-13Ta-4.6Zr (TiNb) が愛知学院大学歯学部歯科理工学講座で開発された。この新合金は、優れた機械的強度を持ち、Nb、Ta、Zrなど金属毒性の指摘の少ない金属元素からなり、常温で骨の構造と近い β 結晶構造を示すなどの特徴をもつ。さらに、その弾性率は、pTiやTiAlと比べ緻密骨に近いなどの特徴もあり、現在、新しいインプラント用材料としての利用が期待されているが^{3, 4)}、TiNb合金の生体適合性に関する報告は少ない。

そこで本研究では、ヒト骨芽細胞様細胞MG63細胞のTiNbへの細胞接着状態、細胞数、および培養上清中に産生される炎症性因子であるサイトカインや炎症性メディエーターを、既存のインプラント用金属であるpTi、TiAlと比較することにより生体親和性を評価した^{5~7)}。さらに生体適合性の優れた表面加工処理を選択するため、異なる粗さに切削加工したチタンプレートを作成し、同様の実験を行った⁸⁾。この研究により得られる結果はインプラント材料としてのTiNbの生体適合性を評価するのに非常に意義深いものになると考えている。

II. 実験方法

金属試料

pTi、TiNbおよびTiAlは愛知学院大学歯学部歯科理工学講座より供与された。

金属の表面処理

各金属を直径15.0mm、厚さ1.0mmに加工した。その後、(1)#400シリコンカーバイトペーパーで金属表面を均一に研磨した後、酸処理を行う群、(2)鏡面研磨および旋盤による表面粗さの異なる切削表面に加工する群の2種類の表面処理金属群を作成した。処理後の金属を蒸留水超音波洗浄の後、オートクレーブ滅菌を行い実験試料とした。

表面粗さ

表面粗さの測定にはレーザーフォーカス変位計(LT-8100, KYENCE, Japan)を使用した。無作為に抽出した部位の最上点(金属の凸部分)と最下点(金属の凹の部分)の垂直的距離の最も大きな箇所を測定した。測定は合計5回行い、その平均を各金属の表面粗さとした。

走下型電子顕微鏡

各金属の表面性状と、それに対するMG63細胞の付着状態の観察には走下型電子顕微鏡を使用した。観察面をリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、2%OsO₄で固定した。上昇アルコールで脱水後凍結乾燥および蒸着処理後、電子顕微鏡で観察した。

細胞培養

ヒト骨芽細胞様細胞MG63細胞を10%ウシ胎児血清培地含有Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)培地にて5%CO₂, 37°C環境下にて継代培養したものを実験に使用した。24ウェル培養プレートに各金属を無菌的に静置し、MG63細胞(1×10⁵個)を金属上に播種した。培養開始から48時間後に培養上清を回収し、炎症性メディエーターとサイトカインを測定した。また細胞と金属の接触がサイトカイン産生に影響するかどうかはpTi上に多孔質メンブレンの細胞培養インサートを静置し、細胞との接触を遮断することにより調べた。

細胞増殖能

細胞培養終了の4時間前にアラマブルー(Alamar Blue)10%含有DMEM培地を1ml加え、培地の吸光度(570nm)を培養終了時に測定した。細胞数は、既知の細胞数であらかじめ調整したMG63細胞の吸光度から近似的に求めた。

各種サイトカインの測定

培養上清中の各種サイトカイン濃度は市販の

ELISAおよびEIAキットにて測定した。なお細胞接着の影響を調べた際のサイトカイン量は金属添加群のサイトカイン量を金属非添加群のサイトカイン量で割ることにより比率を求め、その比率をサイトカイン量とした。同様の比率は細胞培養インサートを入れた場合についても同様の計算を行うことにより、細胞培養インサートの影響を取り除いた。

Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) mRNAの検出

MG63細胞を各金属上で、12時間培養後、トリプシン処理により細胞を回収し、TRIzol reagentを使用し全RNAを抽出した。RT-PCRは、手法に従って行った。増幅されたRANKL遺伝子のPCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動しエチジウムブロマイド染色にて評価した。

Ⅲ. 結果および考察

各金属の表面粗さおよび電子顕微鏡での金属表面の観察

研磨・酸処理を行った各金属表面粗さを凹凸の深さで比較したところ、各金属間で有意な差は認められなかった(表1)。また、各金属表面を電子顕微鏡で観察したところ、いずれの金属表面も均一に酸処理され

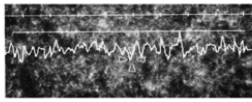
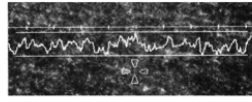
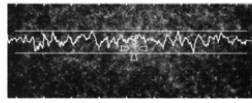
Disk surface roughness		
Titanium disks	Rt(μ m)	Surface topography
pTi	20.2 \pm 1.1	
TiNb	18.4 \pm 1.0	
TiAl	18.1 \pm 1.0	

表1 金属表面粗さの観察
表面粗さの測定にはレーザー共焦点変位計を用いた。無作為に選択した金属表面波形の最上点と最下点の距離を5回繰り返し測定し、その平均を金属表面粗さとした
table. 1 Surface roughness was measured using a laser confocal displacement meter. The surface roughness was the average distance between the highest and lowest points at five different locations.

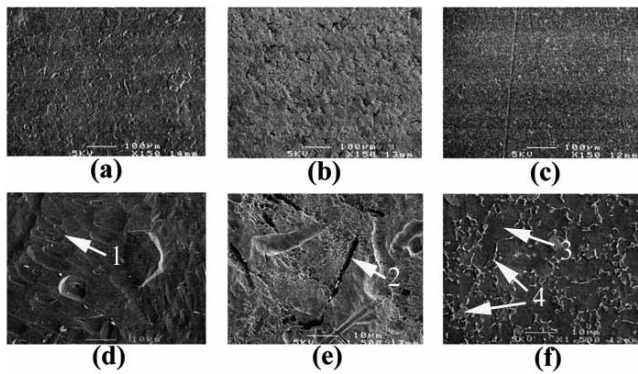


図1 電子顕微鏡による金属表面形態の観察

(a)(d) : pTi (b)(e) : TiAl (c)(f) : TiNb 上段 (a~c) は150倍の弱拡大像、下段 (d~f) は1,500倍の強拡大像を示す。矢印はそれぞれ 1 : 細密六方結晶の α 結晶構造と思われる酸処理 2 : β 結晶構造と微細な金属の亀裂 (粒界) と思われる酸処理面 3、4 : α 結晶構造 (矢印3) と β 結晶構造 (矢印4) の融点の異なる金属元素による二層領域と思われる酸処理面

fig. 1 SEM images of polished and acid-etched surface (a) and (d) : pTi; (b) and (e) : TiAl; (c) and (f) : TiNb; (top row, x150; bottom row; x1,500) Arrows 1 (d) show an α -type titanium surface. Arrow 2 (e) shows a crack. Arrow 3 and 4 (f) show β -type and α -type titanium surface.

ていることが認められた (図1 a~c)。ただし強拡大で観察してみると、金属ごとの表面形態は明らかに異なり、金属の化学組成の違いにより同条件の酸処理を行っても、形態に違いが表れることが明らかとなった (図1 d~f)。

各金属上での細胞培養状態の観察、および細胞数の測定

研磨・酸処理を行った各金属上でMG63細胞を24時間培養した際の細胞形態を電子顕微鏡にて観察したところ、各金属間で培養状態に差は認められず、金属表面で均一に増殖していた (図2)。一方、48時間培養時の細胞増殖数を比較したところ、pTiとTiAlではコントロールに比べ細胞数が少なかったのに対し、TiNbはコントロールと同程度の細胞数が測定された。このことから、TiNb上での良好な細胞増殖能が示唆された (図3)。

細胞の金属接触による影響、およびPGE₂産生量の比較

MG63細胞をpTiに接触させ培養する状態と、多孔質メンブレンのインサートを介してpTiと接触しない状態で培地中に産生するサイトカイン量の違いを比較

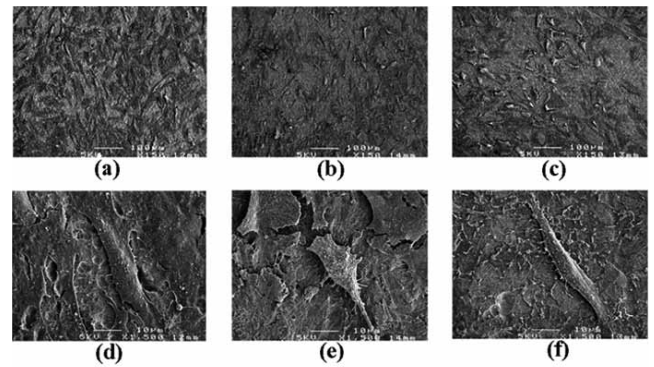


図2 電子顕微鏡によるMG63細胞の培養状態の観察

(a)(d) : pTi (b)(e) : TiAl (c)(f) : TiNb上で24時間培養したMG63細胞の電子顕微鏡写真像 上段 (a~c) は150倍の弱拡大像、下段 (d~f) は1500倍の強拡大像を示す
fig. 2 SEM image of MG63 cells cultured on titanium disks of different compositions. (a) and (d) : pTi; (b) and (e) : TiAl; (c) and (f) : TiNb; (original magnification; a, b, and c, x150; d, e, and f, x1500)

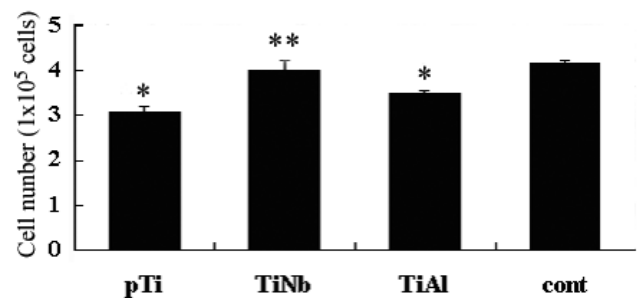


図3 金属種類の細胞数に対する影響

各金属上でMG63細胞を48時間培養後の細胞数を測定した。細胞培養終了の4時間前にアラマブルー 10%含有DMEM培地を1 ml加え、培地の吸光度 (570nm) を培養終了時に測定した。細胞数は既知の細胞数であらかじめ調整したMG63細胞の吸光度から近似的に求めた。*p < 0.05 : vs control

fig. 3 Number of proliferated MG63 cells on titanium disks of different compositions. Data are presented as the mean \pm SE. * p < 0.05 : vs control

したところ、炎症性メディエーターであるプロスタグランジンE₂ (PGE₂) はpTi上で培養することにより、コントロールに比べ約30倍の産生量が認められた。しかしPGE₂以外のサイトカインに違いは認められなかった (図4 a, b)。次に、MG63細胞を、酸処理後の各種金属上で培養し、培地中に産生されるPGE₂量を比較したところ、pTiが709.37 \pm 111.1pg/mlと最も多く産生し、次いでTiNbとTiAlはそれぞれ557.46 \pm

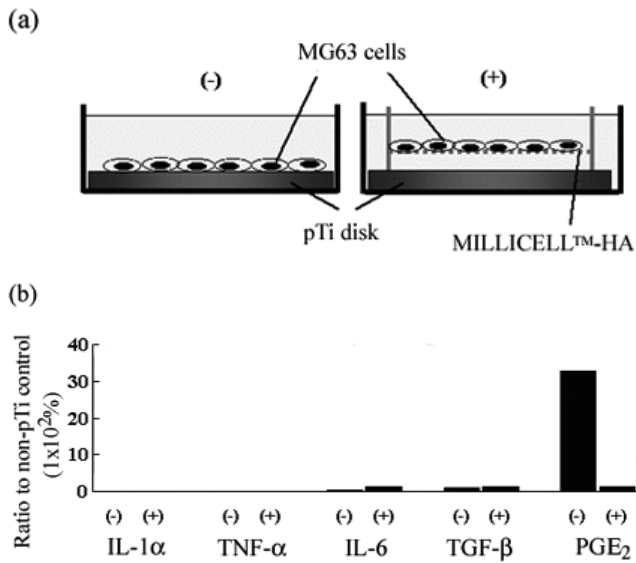


図4 細胞と金属の接触が及ぼす影響

細胞と金属の接触がおよぼす影響を調べるためメンブレンフィルター (MILLICELL™-HA) を細胞と金属間に介在させて培養した略図 (a) 培養終了後の培養上清中のサイトカイン量は、金属非添加群に対する金属添加群の比率にて算出。(+) : メンブレン使用時 (-) : メンブレン非使用時 (b)

fig. 4 Effect of cell-titanium disk contact on cytokine production. (a) Schematic of co-culture system used in this study. (b) Data are presented as the ratio of the content in culture medium with a pTi disk to that without a pTi disk.

119.6pg/ml、 456.80 ± 121.6 pg/mlであった。pTiとTiNbはコントロールより有意に高いPGE₂産生量を示した ($p < 0.05$) (図5)。ところで、PGE₂は濃度により骨吸収系と骨形成系の2つの働きを持つことが知られている^{9, 10}。低い濃度 (10^{-9} M) のPGE₂は、破骨細胞促進因子であるRANKLの発現を刺激し^{11~13} 破骨細胞形成を促す¹⁴。また比較的高い濃度 (10^{-7} M) では骨形成を促進すると報告されている¹⁵。今回発現していたPGE₂が骨形成系か骨吸収系のどちらに働いているかを検証するためRANKLの発現量を比較したところ、コントロール群と比較して、金属との共存培養群ではRANKLの発現が促進していたことから、今回発現していたPGE₂は破骨細胞の促進へ働いていることが示唆された。(図6)

金属表面加工処理の影響

金属上での培養細胞の分化やタンパク質産生は金属

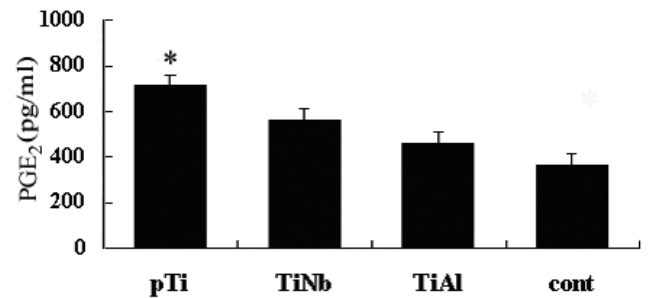


図5 金属種類のPGE₂産生に対する影響

各種金属上でMG63細胞を48時間共存培養し、培養上清中に産生したPGE₂量をELISA法にて測定した。* $p < 0.05$: Ti disks vs TiAl disks

fig. 5 Effect of titanium composition on PGE₂ production by MG63 cells. Values (means \pm SE) are shown as pg/ml. * $p < 0.05$: Ti disks vs TiAl disks

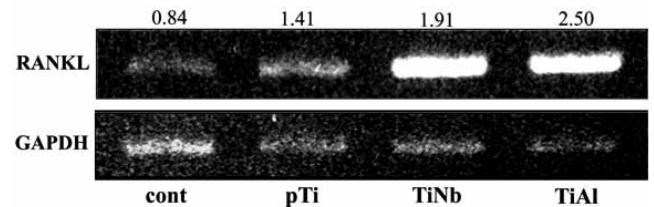


図6 金属種類のRANKL mRNA発現に対する影響

各金属上でMG63細胞を12時間の共存培養し、細胞中のmRNAを通常法に従い採取し、RANKL mRNAをPCR法にて増幅し発現量を比較した

fig. 6 Effect of titanium disks of various compositions on RANKL mRNA expression.

の表面粗さや表面性状、金属組成が影響を及ぼすことが報告されているが⁸、本実験ではMG63細胞を、粗さの異なる金属表面加工処理した各金属上で培養し、培地中に産生されるPGE₂量を比較した。その結果、PGE₂産生量はいずれの金属においても金属表面を鏡面研磨した場合はコントロールと同程度あったのに対し、pTiでは最も表面の凹凸を高くした場合、PGE₂量は 728.63 ± 99.1 pg/mlとなり鏡面研磨した場合の 300.47 ± 60.7 pg/mlに比べ有意に高いPGE₂量を示した。TiAlの場合は表面を粗くするに従いPGE₂量は上昇し、それぞれ 323.90 ± 7.2 pg/ml、 587.67 ± 116.4 pg/ml、 799.87 ± 136.9 pg/mlであり、中間の表面粗さでも鏡面研磨に比べ約2倍のPGE₂量を示した。しかしTiNbでは表面粗さを粗くするに従い、PGE₂量がそれぞれ

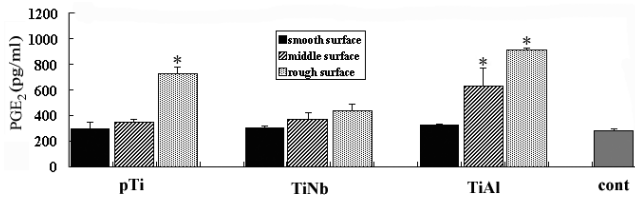


図7 表面粗さのPGE₂産生に対する影響

粗さの異なる各金属上でMG63細胞を48時間培養し培養上清中に産生したPGE₂量をELISA法にて測定した。各金属の表面は smooth surface；鏡面研磨 middle surface；高さ20mm間隔60mmの刻み rough surface；高さ100mm間隔250mm*に調整した：p<0.05 smooth surface vs middle surface, rough surface

fig. 7 Effect of surface roughness on PGE₂ production by MG63 cells. MG63 cells were cultured on a machine-grooved surface. After 24 hours of culture, the medium was changed and culture was continued for an additional 24 hours. At harvest, the medium was collected, and PGE₂ concentration was measured by ELISA. p<0.05 smooth surface vs middle surface, rough surface.

304.06 ± 17.2 pg/ml, 373.04 ± 63.7 pg/ml, 434.70 ± 99.9 pg/mlと増加傾向は示したものの、鏡面研磨と比較した場合、有意差は認められなかった。(図7)

IV. 結 論

1. MG63細胞はいずれのチタンとも良好な接着を示すことがSEMにより明らかとなった。
2. MG63細胞とpTiの接着によりPGE₂が産生されることが明らかとなった。
3. MG63細胞と各種チタンとの共存培養により産生されるPGE₂は、pTiが最も高く次にTiNbの順であった。
4. MG63細胞は各種チタンとの共存培養することにより、多くのRANKLを発現していた。
5. PGE₂産生を指標に各種チタンの生体親和性を評価した場合、TiNbはpTi以上に生体適合性が良好である可能性が示唆された。
6. 金属の表面荒さを増しても、pTiやTiAlの様にPGE₂産生を増加させなかったことは、臨床的に骨組織との良好な嵌合を得るため、金属表面を粗造に加工してもPGE₂を産生しにくく、TiNbがインプラント材料として優れている可能性が示唆された。

以上のことからTiNbは、金属毒性が少なく、機械的嵌合力と細胞の分化に有利な粗造面を加工できる合金であり、なおかつ粗造にした際に産生される生理活性物質が過剰に産生されないことから、既存のインプラント以上に生体適合性の優れた高生体融合機能性材料の一つになりうる可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Thompson, GJ., Puleo, DA.: Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation timecourse in vitro. *Biomaterials*, 17(20): 1949-1954, 1996.
- 2) Hallab, NJ., Vermes, C., Messina, C., et al.: Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. *J Biomed Mater Res*, 60(3): 420-433, 2002.
- 3) 新家光雄：生体用b型チタン合金の開発，*まてりあ*，37(10)：843-46, 1998.
- 4) Kuroda, D., Niinomi, M., Morinaga, M., et al.: Design and mechanical properties of new b type titanium alloys for implant materials. *Materials science & engineering*, A243: 244-49, 1998.
- 5) Lincks, J., Boyan, BD., Blanchard, CR, et al.: Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, 19(23): 2219-2232, 1998.
- 6) Spyrou, P., Papaioannou, S., Hampson, et al.: Cytokine release by osteoblast-like cells cultured on implant discs of varying alloy compositions. *Clin Oral Implants Res*, 13(6): 623-630, 2002.
- 7) Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE.: Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res*, 54(2): 209-15, 2001.
- 8) Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, et al.: The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1996.
- 9) Raisz LG, Koolemans-Beynen AR.: Inhibition of bone collagen synthesis by prostaglandin E2 in organ culture. *Prostaglandins*, Dec 10, 8(5): 377-85, 1974.
- 10) Chyun YS, Raisz LG.: Stimulation of bone formation by prostaglandin E2. *Prostaglandins*, 27(1): 97-103, 1984.
- 11) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 31, 95(7): 3597-602, 1998.
- 12) Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, et al.: Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 19, 246(2): 337-41, 1998.

- 13) Li X, Pilbeam CC, Pan L, Breyer RM, Raisz LG. : Effects of prostaglandin E2 on gene expression in primary osteoblastic cells from prostaglandin receptor knockout mice. *Bone.*, 30(4) : 567-73, 2002.
- 14) Collins DA, Chambers TJ. : Effect of prostaglandins E1, E2, and F2 alpha on osteoclast formation in mouse bone marrow cultures. *J Bone Miner Res.*, 6(2) : 157-64, 1991.
- 15) Flanagan AM, Chambers TJ. : Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandins E1 and E2. *Endocrinology*, 130(1) : 443-8, 1992.

●抄録● 新インプラント用合金Ti-13Nb-29Ta-4.6Zrの骨芽細胞様細胞をもちいた生体適合性に関する研究
／長縄 敬弘

緒言

近年、新しいインプラント用合金としてTi-29Nb-13Ta-4.6Zr (TiNb) が開発された。この新合金は、優れた機械的強度を持ち、Nb、Ta、Zrなど金属毒性の指摘の少ない金属元素からなる。また常温で骨の組織構造と近いβ結晶構造を示し、その弾性率は、純チタン (pTi) やTi-6Al-4V (TiAl) と比べ緻密骨に近い。TiNb合金は、現在新しいインプラント用材料としての利用が期待されているが、その生体適合性に関する報告は少ない。本研究では、チタンプレートと骨芽細胞様細胞MG63の共存培養系をもちいて、増殖細胞数や骨代謝における重要な調節因子であるプロスタグランジンE₂ (PGE₂) 産生量を指標にTiNbの生体親和性を評価した。TiNb、pTiおよびTiAlはそれぞれ、研磨・酸処理加工または機械切削加工による表面処理を行った。研磨・酸処理加工の表面形態や表面粗さは走下型電子顕微鏡および共晶点変位計をもちいて観察した。MG63細胞はチタンプレートまたはコントロールとして培養プレートで48時間培養し、培養後の増殖細胞数はアラマブルー法にて、また培養上清中に産生したPGE₂はEIA法にて検出した。研磨・酸処理後の各チタンは異なる表面性状を呈したが、表面粗さに有意な差は認められなかった。48時間後の増殖細胞数を比較したところ、pTiとTiAlではコントロールと比較して明らかに減少していたのに対して、TiNbはコントロールと差は認められなかった。PGE₂産生量はpTiではコントロールと比較して有意に増加していたのに対して、TiNbとTiAlではコントロールと有意な差は認められなかった。粗さの異なる各チタンで同様の実験を行ったところ、pTiとTiNbでは粗さに依存してPGE₂産生量が有意に増加したのに対して、TiNbでは粗くなるに従い増加傾向を示したものの、有意な増加は認められなかった。TiNbは研磨・酸処理表面において細胞増殖に有利な形態を示し、また同程度の表面粗さにも関わらず、pTiほどPGE₂を産生しなかった。さらに表面を粗く加工してもPGE₂産生を増加させなかった。これらのことから、PGE₂を指標としてTiNbの生体親和性を評価した場合、既存のpTiやTiAl以上に優れた生体親和性を有し、インプラント用合金として有用である可能性が示唆された。

キーワード : Ti-13Nb-29Ta-4.6Zr, Titanium, Implant, PGE₂, Osteoblast

Evaluation of New Ti-13Nb-29Ta-4.6Zr Alloy Biocompatibility Using Osteoblast-like Cell MG63 *in vitro*

Takahiro NAGANAWA, D.D.S., PhD., F.I.C.D.

Recently, as a new implant material, Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TiNb) has been developed. This β -type structural alloy is known to be composed of non-toxic elements and has superior mechanical properties. However, their biocompatibilities between osteoblast cells were poorly characterized. The aim of this study is to evaluate the biocompatibility of TiNb using osteoblast-titanium co-culture system. MG63 osteoblast-like cells were cultured on three kinds of titanium disks, which were TiNb, Pure titanium (pTi) and Ti-6Al-4V (TiAl). Then cell proliferation and prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesis that is potent mediator of bone metabolisms were measured. pTi and two titanium alloys, TiNb and TiAl, were prepared with two kinds of surface, which were polished-acid etched surface or machined-grooved surface. The topography and roughness of polished-acid etched surface were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and confocal displacement meter. MG63 cells were cultured on titanium disks or on plastic culture plate as a control for 48h. After culture period, proliferated cell numbers and PGE₂ production containing in culture supernatant were determined using Alamar Blue assay and enzyme immunoassay (EIA), respectively. Surface roughness showed no significant difference among three kinds of titanium disks when treated with polished-acid etched surface, however SEM revealed various surface topography. After 48h culture, cell numbers were significantly reduced on pTi and TiAl, however no significant difference was observed on TiNb. However, there was no significant difference among TiNb, TiAl and control. We further examined the effect of surface roughness on PGE₂ production using machine-grooved treated titanium disks. pTi and TiAl stimulated production of PGE₂ depend on surface roughness, however roughed TiNb did not affect PGE₂ production. It was suggested that TiNb has favorable biocompatibility because it had efficient surface topography for cell proliferation, and the level of PGE₂ production was not induced dependent on surface roughness. We conclude that TiNb would have usefulness for implant material.

Key words : Ti-13Nb-29Ta-4.6Zr, Titanium, Implant, PGE₂, Osteoblast