



Title	歯表面でのナノインプリントによる表面改質と細胞応答
Author(s)	赤坂, 司
Citation	砥粒加工学会誌, 64(12), 614-617
Issue Date	2020-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84255
Type	journal article
File Information	Akasaka - 2020.pdf



◇ 特集 生体材料の表面処理 ◇

歯表面でのナノインプリントによる表面改質と細胞応答

Surface modification of tooth by nanoimprinting and cell response

赤坂 司*

Tsukasa AKASAKA

Key words: nanoimprinting, micro/nano-patterns, surface modification, tooth, cell response

1. 緒言

歯牙は微細構造を含む組織である。エナメル質は、ナノレベルのアパタイト結晶が規則正しく配列し、エナメル質の強度を上げている。象牙質は、直径ミクロンレベルの象牙細管を持ち、見る方向によりホール構造やグループ構造に見える。また、歯と骨の間にある歯根膜も歯表面から骨にかけてコラーゲンの線維でつながれ、表面からのコラーゲン線維は垂直構造のためピラー構造とみることができる。これら生体内での微細構造の存在は、構造自体が機能発現していると考えられる。

歯科材料の観点からも様々な微細構造の応用は進んでいる。コンポジットレジン中のフィラーでは、ナノ粒子を使うことにより、透光性・研磨性に優れ、機械的特性も向上する。歯科用チタンインプラントの表面修飾ではさまざまな表面形状が付与され、骨との強い結合が達成されている。ミクロンのグループ構造を付与したインプラントでは、歯肉との接着が向上する¹⁾。またジルコニア表面への微細構造の付与も行われている²⁾。さらに興味深い研究としては、配向した結晶を持つ人工エナメル質³⁾、微細ホール構造を持った象牙芽細胞への分化装置⁴⁾、微細構造レールによる人工歯根膜再生⁵⁾がある。

2. 歯質表面への直接マイクロ・ナノパターン化

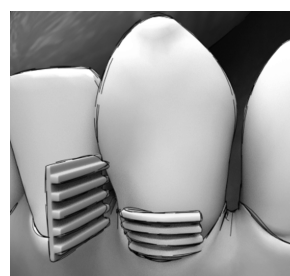
2.1 コンポジットレジンによるナノインプリント

これまで歯科用チタンインプラントの表面微細加工では主にレーザーによる溝加工が行われている。その場合、加工自体は口腔の外で行うので自由度が高い加工が行える。一般的な歯科治療では、口腔外で金属などの補綴物を作製し、患者の口腔内に装着する間接的な治療法と、口腔内で歯質に直接レジン充填するなどの直接的な治療法に分かれる。微細加工の適応においても、今後は口腔内で歯表面に歯科医師が直接微細加工を行える治療法の開発も必要となってくる。

筆者らは、歯の表面へ直接的にマイクロ・ナノパターン化ができないか試行している⁶⁾。図1は、直接法による歯質表面のパターン化の概念図と期待される効果を示した。パターン化の効果としては、パターンと歯肉細胞との強い接着を起こさせ歯肉との強い結合を獲得すること、減ってしまった歯肉を元に戻すこと、感染が起こりやすい歯と歯肉の境界面の強い封鎖による感染防御がある。また、特定のパターンデザインにより、正常な歯根膜の再生や骨との強い接着も期待できる。例えば、歯の根元部分の根面う蝕では、コンポジットレジンで修復した

場合、コンポジットレジンに歯肉細胞が付着し難いため、歯肉は退縮傾向を示す。これがパターン化で歯肉細胞との接着が強まれば、歯肉付着や感染面でも有利となる。

図2では歯表面でのパターン化例を紹介する。(a)柔軟性をもつ薄い40 μm厚のシクロオレフィンポリマー(COP)フィルムへマイクロ・ナノパターンを転写する。(b)人工歯の表面に光重合型フロアブルコンポジットレジンを塗布する。(c)その上にCOPパターンを被せ、歯科用の固定器具で押さえる。(d)歯科



パターン化で期待される効果

- ・ 歯肉との強い結合
- ・ 減った歯肉の回復
- ・ 感染防御
- ・ 正常な歯根膜の再生
- ・ 骨との接着など

図1 歯表面でのパターン化の模式図と期待される効果



図2 コンポジットレジンによる人工歯表面の修飾法

* 北海道大学大学院歯学研究院: 〒060-8586 北海道札幌市北区北13西7

〈学会受付日: 2020年7月31日〉

用の可視光照器にて 20 秒程度照射し、レジン硬化させる。(e)COP パターンフィルムを注意深く剥がす。すると走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscope) で観察するとサブミクロンレベルの微細構造が歯の表面に作製できている。この方法は容易であり、現在の歯科治療の延長線上で可能である。フロアブルコンポジットレジン自体も臨床に使用されているので毒性も問題ない。処置時間は 2 分程度で患者に苦痛を与えない現実的な範囲に収まる。ある程度の歯表面の曲面に適応でき、また、新たな設備投資もほぼいらぬ利点もある。まだまだ改良の余地は多くあるものの、直接歯の表面で歯科医がナノインプリントを遂行できる可能性を秘めている。図 3 は、フロアブルコンポジットレジンで作製したグループ・ピラー・ホール形状で、高さが 2 μm の幅 2 μm ((a), (c), (e))あるいは 500 nm ((b), (d), (f)) のパターンを例として示している。硬化は光重合で行われるが、過剰な照射による完全硬化はモールド剥離が困難となることから、大まかな重合の完了となる 20 秒程度の照射が好ましい。現在のところ、500 nm 幅・直径のパターンまでであれば十分なきれいな転写が可能である。

2.2 ヒト歯肉線維芽細胞の付着

パターンの機能は、細胞接着の向上、増殖や分化誘導のコントロールなどさまざまなことが挙げられる。例として、コンポジットレジンのパターン化によるヒト歯肉線維芽細胞の付着増加効果を紹介したい。図 4 は、ヒト歯肉線維芽細胞の播種 1 時間後の SEM 像である。(a)平面では球状に近い形状を示すが、(b)~(f)のグループではコンタクトガイダンスと呼ばれる溝の方向に沿った紡錘形を示す。その付着様式はグループサイズに大きく依存する。幅 50 μm ~5 μm のグループでは、溝の中に入りながら配向するが、幅 1 μm ~500 nm のグループでは溝の上にまたがって細胞が付着している。また、細胞は幅 500 nm

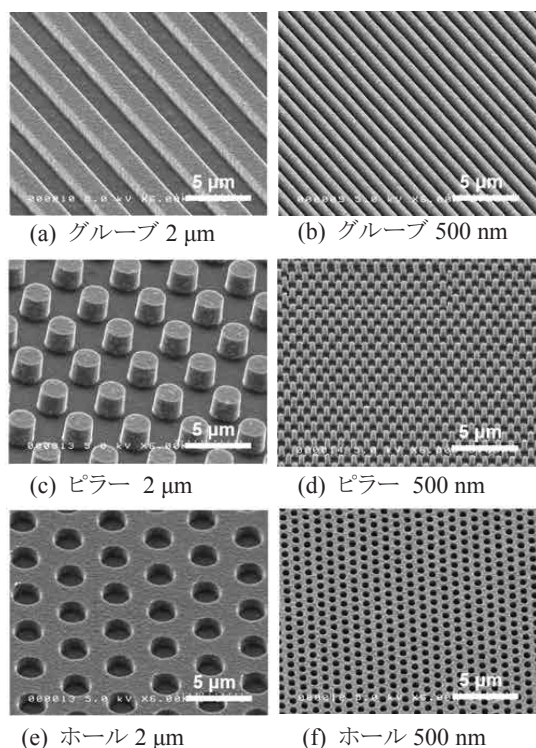


図 3 コンポジットレジンによる各種微細パターンの SEM

のグループ上でのみ横方向へも広く伸展する。かなり狭い範囲のサイズでのみ効果が大きく発揮されることを示している。

付着細胞数(図 5)はグループ幅に大きく依存し、幅が狭くなるほど付着細胞数が増加していることがわかる。このことは、例えばパターンを歯肉界面に埋入した時に、500 nm 幅のグループであれば早い細胞付着が起きるため、感染のリスクを減らせる利点につながるかもしれない。さらにグループの方向に細胞は配列することになるので、配列した細胞および細胞外マトリックスの収縮による封鎖効果も期待できる。

2.3 その他のパターンの特徴

その他のマイクロ・ナノパターンの特徴についていくつか紹介したい。パターンでの活性は、パターン種とサイズ、さらに材質が重要である。これら組み合わせにより、多種多様な機能を発現できる。歯科材料では、コンポジットレジンの他にもセメント・印象材・シーラー・石膏などでパターン化が可能である。

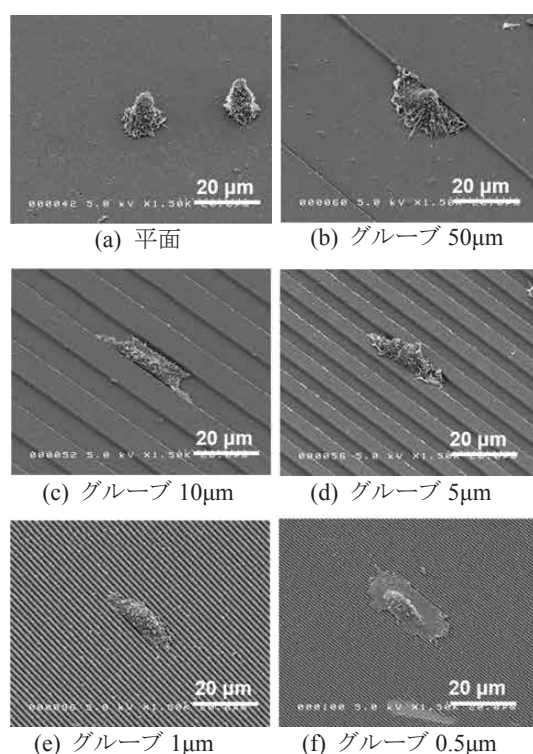


図 4 付着したヒト歯肉線維芽細胞の SEM 像

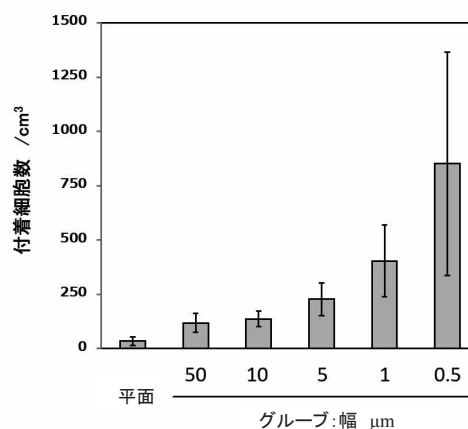


図 5 グループパターンに対するヒト歯肉線維芽細胞の付着

それぞれでやすさ、精度、溶解性に差があるものの、広範囲な硬化する歯科材料が使用できる⁶⁾。また歯の主要成分であるアパタイト⁷⁾やコラーゲン⁸⁾を用いたパターン化も達成している。材質を変えるためには、パターン表面へのタンパク質吸着法もあり、血清、フィブロネクチン、アルブミン、ムチンでのコートでは、吸着タンパク質の種類により細胞の活性は変化する⁹⁾。ヒト歯肉線維芽細胞のグループに対する活性では、コートなし・ムチンやアルブミンコートで細胞は付着するものの配向までは観察されない。一方で、血清やフィブロネクチンでコートすると、細胞付着も多く十分な配向も観察される。このことは、パターン形状やサイズだけでなく適切な材質と組み合わせることにより、機能が効果的に発現できることを示している。さらに細胞の種類に対してもパターンの作用は異なる。骨芽細胞様細胞 Saos-2 とヒト口腔由来上皮細胞株 Ca9-22 の増殖では、Saos-2 ではグループ上で増殖が多いが Ca9-22 では平面上が多い¹⁰⁾。一方で、マクロファージ RAW264.7 では、ピラー上にて活性が高い¹¹⁾。細胞種によって好ましいパターン種類や材質が異なってくるので注意が必要である。

2. 4 血液細胞の付着

材料を生体内に埋入すると、多くの場合、初期には血液との接触が起こる。その後は、繊維芽細胞やマクロファージが集まり、複数の段階を経て組織が生成する。生体内での反応は複雑であり、活性評価を *in vitro* で完全に再現するのは非常に困難である。血液と材料との相互作用を評価するのも、材料埋入後の反応を予測する 1 つのデータとなる。

そこでマイクロ・ナノパターンに対する血液細胞の付着様式を紹介する。図 6 は、親水化処理した直径 50 μm ~500 nm のピラー構造を、10% 保存血液溶液に 10 分間浸漬したときの付着した血液細胞数を示している。付着数はピラーの直径に大きく依存し、平面や直径 500 nm では付着数は低いものの、直径 5 μm で最も高い値を示す。その差は約 15 倍にも及ぶ。血液細胞の場合もパターンサイズの影響は大きい。

血液細胞の付着様式を SEM にて観察すると、多くの血小板が付着している様子がわかる(図 7)。ピラー 5 μm の場合は、ピラーとピラーの間で細胞が付着する。ピラー間に細胞が入れるような適度な間隙があると、細胞が侵入し粘着物質によりピラー壁に付着する。このため付着数が最高になったものと推測される。一方で、直径 1 μm のピラー上では、ピラー間の間隙は狭く、間に細胞は入ることができない。単にピラー表面に付着している状態である。凹凸により付着は多くなるものの、5 μm ピラーのように間に入り込む効果がないため、それ以上の付着数にはならなかったと考えられる。また、別の見方をすると、凹凸の効果は 1 つではなく、サイズにより細胞に対する効果の種類も変わってくる。この場合では、細胞の足の先端と同程度のサイズによる引っ掛かりの効果と、細胞自体と同程度のサイズにより収納効果が現れる。より巧みなデザインにより何倍もの効果を発現できるのだろう。今後の課題である。

2. 5 血餅との付着

止血や組織回復の初期治癒過程段階では、血液中のフィブリン網が形成されるとともに血球凝集が起こり、血餅ができる。材料埋入の場合、血餅が材料に強く接着するか全く接着し

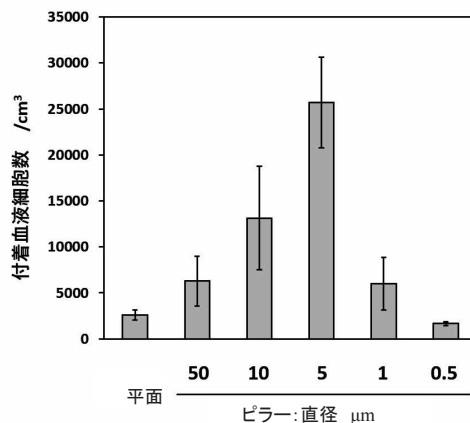


図 6 ピラーパターンに対する血液細胞の付着

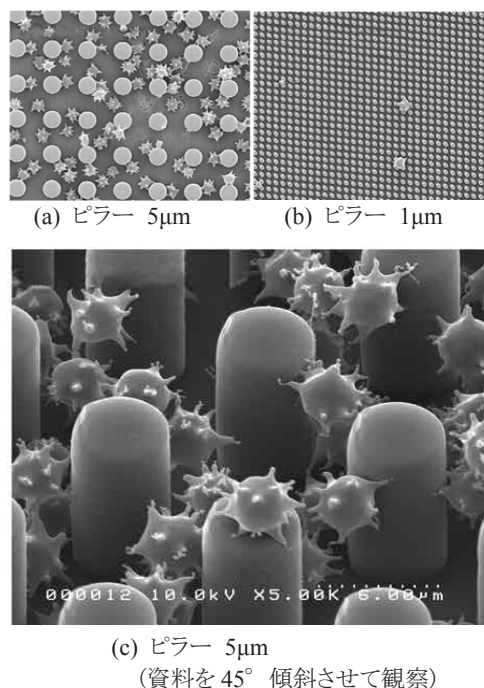


図 7 直径 5 μm と 1 μm ピラーに対する血小板付着

ないか、その後の組織再生に影響してくる可能性がある。

図 8 には、①血餅接着試験として材質の異なるパターン上で血餅を形成させる手順を、②血餅を強制的に剥離させた断面を SEM にて観察した結果を示している。図 9 には推定機構の概略図を示す。ここでの材質は、プラズマ処理した COP と架橋ゼラチンである。サイズは直径 5 μm のピラーで、血球細胞が付着しやすいサイズを使用している。

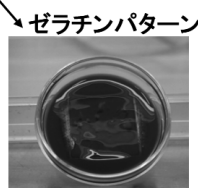
血餅形成後、COP パターン上では容易に剥がれてしまうが、ゼラチンパターンでは比較的強く接着する。それぞれの破断面観察を行うと、COP パターン上では界面破壊を示すきれいな COP 表面が観察される。これは図 9(a)のように血液細胞の血小板はパターン間に大量に入り込み付着するが、血餅ができて血餅自体は COP と強く接着しないために容易に剥離してしまうと考えられる。一方、ゼラチンでは比較的強く接着し、破断面観察では血餅側の凝集破壊を示すゼラチンピラーと血小板およびフィブリンファイバーの混合物が観察される。これは図 9(b)のように血小板はピラーの間に大量に入り込み付着し、フィブリンファイバー形成時にフィブリンがゼラチンピラー

① 血餅形成

ピラー5 μ mの
パターン上に
血液添加



COPパターン



ゼラチンパターン

② 血餅剥離後、SEM観察

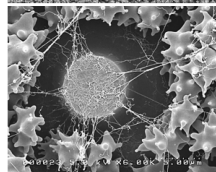
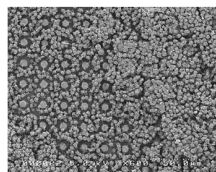
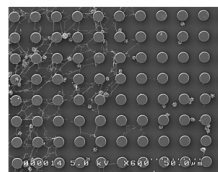


図8 COP およびゼラチンパターンに対する血餅の相互作用

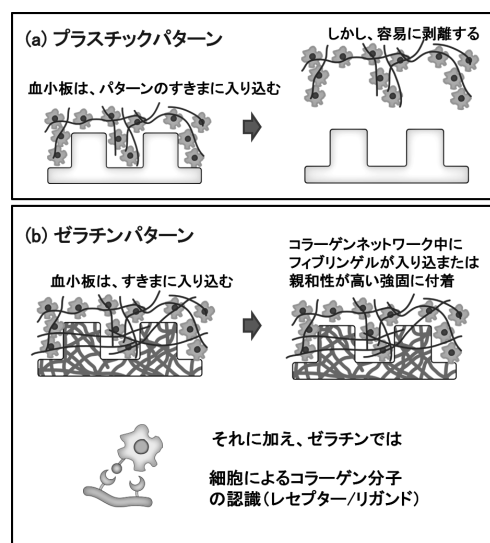


図9 パターン材質による血餅付着の違いの推定機構

と一部融合するか、フィブリンとコラーゲン間の親和性のため強く結合したと考えられる。またはレセプター/リガンド結合のような細胞によるコラーゲン分子の認識かもしれない。いずれにしても、この例でもパターン形状だけでなく材質がかなり重要である。パターン設計および材質選択の両方が機能発現に大きく寄与することになる。

3. 結 言

本稿では、歯の表面でのナノインプリントによるマイクロ・ナノパターン修飾について紹介した。1つの大きな課題としては、曲面に対してのナノインプリント法の開発である。現在も十分に解決できたとはいえない状態であり、歯の部位や個人差により歯の表面の曲面状態は変わる困難さがある。難しい問題であるが、解決できればマイクロ・ナノパターンの応用はさらに進むことになるだろう。また、パターン形状に関してもデザイン次第で無数に設計することができる。さらに材質の組み合わせを含めるとバリエーションは膨大である。その反面、デザインと材質の組み合わせによる細胞活性や生体内での活性の関係は、まだまだ未解明なのかもしれない。今後も勢力的な研究が必要である。

4. 参考文献

- 1) BioHorizons : <https://www.biohorizons.com>
- 2) A. Pae, H. Lee, H. S. Kim, Y. -D. Kwon and Y. -H. Woo: Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces, *Biomed. Mater.*, 4, 2, (2009) 025005.
- 3) K. Onuma and M. Iijima: Artificial enamel induced by phase transformation of amorphous nanoparticles, *Sci. Rep.*, 7, (2017) 2711.
- 4) S. Miyashita, N. E. M. B. Ahmed, M. Murakami, K. Iohara, T. Yamamoto, H. Horibe, K. Kurita, T. Takano-Yamamoto and M. Nakashima: Mechanical forces induce odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells on three-dimensional biomimetic scaffolds, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 11, 2, (2017) 434.
- 5) S. P. Pilipchuk, A. Monje, Y. Jiao, J. Hao, L. Kruger, C. L. Flanagan, S. J. Hollister and W. V. Giannobile: Micropatterned Scaffolds with Immobilized Growth Factor Genes Regenerate Bone and Periodontal Ligament-Like Tissues, *Adv. Healthc. Mater.*, 7, 22, (2018) e1800750.
- 6) T. Akasaka, H. Miyaji, T. Imamura, N. Kaga, A. Yokoyama and Y. Yoshida: Submicro-patterning of curable dental materials by molding methods: A screening trial, *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, 12, 2, (2017) 281.
- 7) T. Akasaka, H. Miyaji, N. Kaga, A. Yokoyama, A. Abe and Y. Yoshida: Adhesion of osteoblast-like cells (Saos-2) on micro-/submicro-patterned apatite scaffolds fabricated with apatite cement paste by micro-molding, *Nano Biomed.*, 8, 2, (2016) 112.
- 8) R. Makita, T. Akasaka, S. Tamagawa, Y. Yoshida, S. Miyata, H. Miyaji and T. Sugaya: Preparation of micro/nano-patterned gelatins crosslinked with genipin, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 9, (2018) 1735.
- 9) T. Akasaka, T. Imamura, H. Miyaji, N. Kaga, A. Yokoyama and Y. Yoshida: Effect of protein adsorption on alignment of human gingival fibroblasts on grooved composite resin, *eJSSNT*, 14, (2016) 225.
- 10) N. Kaga, T. Akasaka, T. Matsuura, A. Yokoyama and Y. Yoshida: Proliferation of Saos-2 and Ca9-22 cells on grooved and pillared titanium surfaces, *Biomed. Mater. Eng.*, 30, 5-6, (2020) 559.
- 11) J. Honma, T. Akasaka, M. Tamai, Y. Yoshimura, T. Taira, H. Miyaji, S. Yamagata, Y. Sato and Y. Yoshida: Fusion of RAW 264.7 macrophage cells on micro-scale fine pillar patterns, *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, 13, 4, (2018) 1123.