



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	in vitroおよびin vivoにおけるマイクロパターンの表面性状が骨系細胞に与える影響について
Author(s)	沼本, 真一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第14999号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14999
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96908
Type	doctoral thesis
File Information	Shinichiro_Numamoto.pdf



博士論文

in vitro および *in vivo* におけるマイクロパターンの
表面性状が骨系細胞に与える影響について

令和4年3月申請

北海道大学
大学院歯学院研究科口腔医学専攻

沼本 真一郎

I 緒言

デンタルインプラントは、形態、機能ならびに審美性の回復に優れること、さらには高い予知性から、欠損補綴方法の一つとして広く臨床で使用されている (1, 2). インプラント治療の成功には、オッセオインテグレーション (3) の確立が必須であり、早期のオッセオインテグレーションの獲得を目的に、インプラント体の材料であるチタンに対して様々な表面処理に関する研究がなされてきた. 表面を粗造化し、表面積や嵌合効力を増加する陽極酸化やサンドブラスト-酸エッチング (4,5) は、すでに臨床応用がなされており良好な成績が報告されている. しかしながら、現在臨床で応用されている表面処理方法では規格化された均一な表面性状が得られていないため、表面性状における形態や大きさなど、どの要因が材料表面における骨形成に有効であるか明確にされていない.

表面構造が骨形成や生体反応に与える影響を明らかにすることを目的に、ナノインプリント法 (6,7) やナノリソグラフィー (8) により製作した規格化した均一な微細構造を用いて *in vitro* で多くの研究がなされている. Akasaka らは、骨芽細胞様細胞である Saos-2 の接着と形態がアパタイトパターンの種類と大きさに影響されること (9), RAW264.7 細胞から破骨細胞様細胞への分化では、COP のピラー、グループ、ホールの順で誘導され、破骨細胞の形成に最適なピラーの寸法は、直径 500nm、高さ 2 μ m のピラーであることを報告している (10). Kaga らは、500nm, 1 μ m, 2 μ m の Ti 表面のグループやピラーパターンを用いて、Saos-2 はパターンに応じて細胞の配向を変化させることや平面よりもパターン上で細胞の接着数や接着斑の数が多いことを報告している (11). また Makita らは 2 μ m, 1 μ m, 500nm の幅と直径を持つグループ、ホール、ピラーのゼラチンパターンで、Saos-2 を培養し、細胞接着は、平面よりもパターン上で増加すること、さらに高さ 2 μ m のピラーは、他のパターンに比較して細胞数が多いことを報告している (12). これらの先行研究からマイクロ/ナノスケールのグループ、ピラー、ホール等の表面形状やサイズが、細胞接着や増殖に影響を与えることが示されている. しかしながら、インプラント臨床において重要である表面での骨形成に与える影響については、未だ十分に解明されていない.

in vivo におけるマイクロ/ナノパターンの生体組織や細胞への影響に関する報告は *in vitro* の報告に比較して少ない. Prodanov らは、稜と溝の幅と深さを変化させた Ti 製のグループのパターンをウサギ脛骨に埋入し、骨形成を観察している (13). また, Zhu らはチタン表面にサイズを変化させたグループを付与し、ラット頭頂骨での骨形成を観察し (8), 比較的小さなグループが骨形成に効果的であるとしている. 骨組織ではないが、皮下にサイズの異なるピラーを埋入した Baker らは、ピラーの間のスペースが組織反応に影響すると報告している (14) ことから、*in vivo* においても、パターンの形状やサイズが生体組織の反応に影響を与えていることが示されている. しかしながら、*in vitro* と *in vivo* の両方の反応を、複数の形態、サイズについて比較検討した研究は、申請者の渉猟限りではあるが、なされていない. また、これら *in vivo* でのパターンに対する骨形成の検討では、組織切片の光学顕微鏡を用いた巨視的な観察手法が主に用いられ、パターンと生体組織の界面の状態は不明であ

る。パターンが生体への影響をより詳細に解明するためには、電子顕微鏡などを用いたパターンと生体組織の界面領域の詳細観察が必要である。

そこで本研究では、材料の表面性状（形態とサイズ）が、骨形成に与える影響を明らかにすることを目的に、材料として生体内で安定であるシクロオレフィンポリマー（cycloolefin polymer 以下 COP）フィルムを使用し、ナノインプリント法(6,7)にて様々な形態とサイズ（大きさ）を有するパターンを製作し、骨芽細胞様細胞の接着，増殖，ならびに石灰化について検討するとともに，ラット大腿骨骨髓内に埋入し，材料表面での骨形成を観察した。

II 材料および方法

1. 材料

実験試料の材料として COP フィルム（ZEONOR[®]，日本ゼオン株式会社）を使用した。COP は、吸水性が小さく，寸法安定性に優れ，転写性に優れ，精密成形が可能な特徴を有している。（15,16）

2. 試料の製作

小型熱プレス機（HC300-1, ASONE, Japan）の上側に COP フィルムを，下側に各種パターンを付与したモールド（Kyodo International, Inc., Kawasaki, Japan）を固定し，上側が 175℃，下側が 155℃になるまで加熱し，2MPa で 5 分間加圧した。冷却後，フィルムをモールドから撤去し，試料とした。本研究では，付与するパターンとしてピラー（柱状構造）とホール（穴状構造）を選択した。サイズ（大きさ）は，細胞培養実験用としてピラー（直径：0.5, 1.0, 2.0μm 高さ：1.0μm），とホール（直径：0.5, 1.0, 2.0μm 深さ：1.0μm）を，動物実験用としてピラー（直径：1.0, 5.0μm 高さ：5.0μm）とホール（直径：1.0, 5.0μm 深さ：5.0μm）を製作した。製作したパターンの表面形状を評価するため，走査型電子顕微鏡（SEM, S-4800, Hitachi, Japan）にて観察した。

3. 親水化処理

COP は疎水性であることから，卓上真空プラズマ装置（YHS-R, SAKIGAKE, Japan）を使用してプラズマ処理を 120 秒間行い，親水化処理の効果を検討した。

3. 細胞培養試験

1) 接着試験

各種パターンを付与した COP フィルムを 35mm ディッシュ（35mm/Tissue Culture Dish, IWAKI, Japan）に焼き付けて固定後，紫外線（UV）を 10 分間照射することにより滅菌した。親水化処理した COP フィルムについても同様に滅菌を行った。COP フィルム上に骨芽細胞様細胞 Saos-2(RCB36888; Riken BioResource Center, Ibaraki, Japan)を 27×10^4 個/mL となるように播種し，30 分間培養（CO₂5%，37.0℃）した。培養液としては D-MEM（D5796-500ML, Sigma-Aldrich），10%FBS，ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリン B 懸濁液を用いた。インキュベート後，リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し，グルタルアルデヒドで固定後，PBS で洗浄し，ギムザ染色を施した。染色試料を PBS 洗浄後，乾燥し，光学顕微鏡にて写真撮影した。得られた画像は，Image j（National

Institutes of Health, U.S.A) を用いて解析を行い、接着細胞数を計測した。群間の平均値の差を検定するため Tukey の多重比較検定にて統計解析をおこなった (n=6)。また、細胞の形態を確認するため、SEM 観察を行った。コントロールとしてはパターンを付与していない COP フィルム (プレーン) を用いた。

2) 増殖試験

接着試験と同様に各種パターンを付与した COP フィルムを 35mm ディッシュに固定後、滅菌し、COP フィルム上に骨芽細胞様細胞 Saos-2 を 10×10^4 個/mL となるように播種した。その後、増殖した細胞がコンフルエントになる直前 (7~10 日間) まで培養した。接着試験と同様の手順で処理後、光学顕微鏡にて写真撮影し、Image j にて画像解析を行い、接着細胞数を計測した。群間の平均値の差を検定するため Tukey の多重比較検定にて統計解析をおこなった (n=6)。細胞の形態については SEM にて観察した。

3) 石灰化試験

接着試験同様に各種パターンを付与した COP フィルム固定後、滅菌し、COP フィルム上に骨芽細胞様細胞 Saos-2 を 60×10^4 個/mL となるように播種した。24 時間培養後、分化誘導剤として 10mM β グリセロフォスフェート、10nM デキサメサゾン、50 μ g/mL アスコルビン酸を加え、2 週間培養した。培養期間中、3 日に 1 回培養液を交換した。培養後、PBS で洗浄後、ホルムアルデヒドで固定し、アリザリンレッド染色を行った。染色後、脱イオン水で洗浄してアリザリンレッドをギ酸で溶出させ、溶出液の吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した (波長 410nm)。

4. 動物埋入試験

1) 実験動物

7 週齢雄性ウイスター系ラットを実験動物として使用した。ピラー 1 μ m, 5 μ m ならびにホール 1 μ m, 5 μ m を埋入試料とし、埋入期間は、1 週、4 週とし、合計 32 匹を実験に供した (n=4)。

2) ラット大腿骨への COP フィルムの埋入

各種パターンの COP フィルムにプラズマ処理を施した。その後、紫外線 (UV) を 10 分間照射することにより滅菌した。イソフルランによる全身麻酔下で、左側大腿部を剃毛し、皮膚に切開を加え、大腿骨を露出し、歯科用ラウンドバー (No.2MS スチールバー, モリタ[®], Japan) を用いて生理食塩水注水下にて大腿骨骨髓に達する長さ 3 mm の溝を形成し、各種 COP フィルムを埋入し、皮膚を縫合した。埋入 1 および 4 週間後、10%グルタルアルデヒドで灌流固定を行い、大腿骨を摘出後、10%グルタルアルデヒドで浸漬固定を行った。10%エチレンジアミン四酢酸溶液(10%EDTA)で脱灰し、通法に従いパラフィン包埋を行い、4 μ m 薄切片を製作しヘマトキシリンエオジン染色を行い光学顕微鏡にて観察した。一部の試料については、脱灰後、Epon 樹脂に包埋し、ダイヤモンドナイフ (DiATOME, PA) とウルトラミクロトーム (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて超薄切片を製作し、透過型電子顕微鏡 (TEM, JEM1400, 日本電子) で観察を行った。

なお、本研究は、北海道大学動物実験委員会の承認のもとに行った（承認番号 20-0105 号）。

III 結果

1. 試料製作について

製作した試料を SEM にて観察した結果、モールド上のパターンは COP フィルムへ正確に転写されることが示された（図 1）。

2. 親水化処理について

表 1 に親水化処理前後の各種パターンの接触角を示す。いずれのパターンも親水化処理前の接触角は 90° を超えていた。コントロールとして用いたパターンを付与していない COP フィルム表面（プレーン）においても、 90° 程度であり、疎水性を示した。ピラーやホールのパターンの付与により接触角は増加する傾向を示した。親水化処理により、ピラー、ホールの接触角は減少した。特にピラーでは親水化処理を施すことで、接触角は $1/10$ 以下に減少した。ホールでは、接触角は減少したがピラーほどではなく、パターンのサイズが小さいほど、接触角は小さくなる傾向を示した。

3. 細胞培養

1) 接着試験

(1) 接着細胞数について（図 2）

親水化処理前の接着細胞数は、各種パターン間に差は認められなかった。親水化処理により接着細胞数は増加し、ピラー $0.5\mu\text{m}$ では有意に増加した。特に親水化処理後のピラー $0.5\mu\text{m}$ の接着細胞数は、親水化処理ピラー $1\mu\text{m}$ 、ホール $1\mu\text{m}$ 、プレーンのパターンに対して有意に高かった。その他のパターン間の有意差は認められなかった。

(2) SEM 観察について（図 3）

ピラー $0.5\mu\text{m}$ では、Saos-2 がピラー上面に沿って隣接するピラーへ仮足が伸展していたが、ピラー $2\mu\text{m}$ では、ピラー底面に仮足の付着させていた。またホールでは $0.5\mu\text{m}$ 、 $2\mu\text{m}$ ともに、仮足がホール内に伸展しているのが観察された。

2) 増殖試験

(1) 増殖細胞数について（図 4）

Saos-2 の細胞数は親水化処理により増加する傾向を示した。親水化処理ピラー $0.5\mu\text{m}$ の Saos-2 細胞数と親水化処理ホール $1\mu\text{m}$ 以外のパターンの細胞数の間には有意差が認められた。また親水化処理ホール $1\mu\text{m}$ の細胞数と親水化処理ホール $2\mu\text{m}$ の間にも有意差が認められた。親水化処理されていない群の中では各パターンで有意な差はみられなかった。

(2) SEM 観察について（図 5,6）

接着試験と同様に親水化処理ピラー $0.5\mu\text{m}$ では、ピラー上面に沿って Saos-2 細胞は、多くの仮足を伸展していたのに対し、ピラー $2\mu\text{m}$ では、ピラー底面に仮足の付着が認められた。一方、ホールでは、 $0.5\mu\text{m}$ 、 $2\mu\text{m}$ ともにホールの中には仮足は伸展せず、フィルムの上に伸展しているのが観察された。仮足の長さは、ピラーと比較して長かった。

3) 石灰化試験 (図 7)

親水化処理後には、コントロールであるプレーンを除いたすべての群で石灰化が亢進した。ピラーでは、同じ大きさの間では有意差が認められたが、ホールでは認められなかった。親水化されていない群で比較した場合、プレーンと比較して $0.5\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ のピラーでは、有意に低い値を示した。

4) 動物埋入試験

(1) ピラーの大きさの違いによる骨組織像の相違について

1 週においては、 $1\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ のいずれの大きさのピラーにおいても、試料周囲に幼弱な骨組織が観察されたが、試料と骨組織との直接的な接触は認められなかった。しかし、ピラー $1\mu\text{m}$ では、ピラー表面に方形の形態を有する骨芽細胞様の細胞が配列しているのが観察された。ピラー $5\mu\text{m}$ においては、試料表面には、線維芽細胞や骨芽細胞様細胞が観察され、一部のピラー間隙に細胞の侵入が認められた。またピラーパターンを付与していない側には紡錘形の線維芽細胞が観察された (図 8)。

4 週においては、 $1\mu\text{m}$ の大きさのピラーには、骨基質が直接接しており、ピラー間隙にエオジン好性に染色される骨基質様の構造が観察された。 $5\mu\text{m}$ の大きさのピラーにおいても、多くの線維性組織や線維芽細胞がパターンに接しており、一部では骨組織がパターンに直接接しているのが観察された。骨組織が直接接しているピラー間隙の一部にエオジン好性に染色される骨基質様構造が認められた。パターンを付与していない (プレーン) 側には紡錘形の線維芽細胞を含む線維性組織が観察され、骨組織とプレーンの直接的な接触は認められなかった (図 9)。

4 週の標本については TEM 観察を行った。ピラー $1\mu\text{m}$ においてはピラー上に骨細胞が観察され、骨組織がピラーに直接接している像がみとめられた。一部のピラーにはミトコンドリアや空胞に富む破骨細胞が認められ、ピラーに接して明帯が観察された。ピラー $5\mu\text{m}$ では、骨組織と接していないピラーに接して明帯が観察された (図 12,13,15)。

(2) ホールについて

1 週においては、ホール $1\mu\text{m}$ では、試料が標本製作中に剥離しており、試料が存在していたと考えられるホール内部には、エオジン好性に染色される構造が観察されたが、パターン表面の詳細な所見を得ることができなかった。ホール $5\mu\text{m}$ においては、パターン周囲に線維芽細胞様細胞が観察され、一部のホール内には細胞が入っているのが観察された (図 10)。

4 週においては、ホール $1\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ ともにパターン表面の多くの部分で骨組織が直接接して観察され、ホール内部には、周囲の骨組織と連続してエオジン好性に染色される骨基質様組織が認められた。パターンを付与していない側は、ピラーと同様であり、紡錘形の線維芽細胞が観察された (図 11)。

4 週の標本については、TEM 観察を行った。ホール $1\mu\text{m}$ ではパターンに接して骨細胞を含む骨組織が観察された。ホール内部にも骨組織が認められたが、コラーゲン線維はホール

側壁に平行に配列し、ホール上の線維の配列とは異なっていた。ホール 5 μm では、骨組織がパターンに接して観察され、ホール内部にも認められたが、ホール底面までは達していなかった。コラーゲン線維は、ホール 1 μm とは異なり、ホール内壁には平行に配列せず、ランダムな排列を示した (図 14,15)。

III 考察

1. 親水化処理について

細胞培養の結果から親水化処理を施すことで Saos-2 細胞の接着においては 0.5 μm ピラー、増殖においては 0.5 μm および 1.0 μm のピラー、1.0 μm のホール、石灰化においてはすべてのサイズのピラーに有利な影響を与えることが示された。ピラー構造の親水性を高めると、Saos-2 の接着が高まる報告 (17) や、アパタイトピラー上の親水性が高まると、広がった細胞の比率が増加する傾向が見られた報告 (9) があり、親水性の付与は、細胞の接着や増殖に有効であった今回の実験結果と一致する。また、親水化処理されていないプラスチックなどのマイクロピラー構造を有する表面は疎水性であることも報告されており (17, 18, 19), 親水化処理を施すことにより、ピラー表面の表面エネルギーが高くなり、その結果、細胞の活性が上昇するものと考えられる。

2. 接着試験について

パターンの形状とサイズの違いは、Saos-2 のパターンへの細胞接着に影響を与えるものと考えられるが、今回の結果からは、親水化処理された 0.5 μm の小さいピラーがより Saos-2 の接着に有利であることが示唆された。Hirata らは多層カーボンナノチューブ (MWCNT) でコーティングしたコラーゲンスポンジを用いて、Saos-2 の細胞接着を検索し、MWCNT のコーティングにより播種初期段階で細胞が良好に付着・伸展することを報告し、MWCNT 特有の微細な構造が播種直後の細胞をトラップするため細胞の初期接着に有効であるとしている (20)。本研究においても、0.5 μm の小さいピラー構造が、突起として作用し Saos-2 をトラップすることにより高い接着能を示したことが推測される。さらに、親水化処理により、0.5 μm のピラーの接触角は小さくなるため細胞が基材に接触し易くなることも細胞接着に有利に働くと考えられる。細胞接着斑の観点からも 0.5 μm の小さなピラーは接着に有利に働くと考えられる。Matschegewski らは、細胞接着に関係するビンキュリンはピラーの先端に凝集し、アクチンはピラー先端のみならず、ピラーの端に局所的に集中することを報告した (19)。Özcelik らは、骨芽細胞ではチタン製マイクロピラー上 (3 μm $\times$ 3 μm) の角に近い付近でアクチン濃度が高く、細胞内のアクチン形成には境界条件が強く影響していることを示した (21)。これらピラー先端や端が接着斑の優先的な形成場所であることから考えると、単位面積あたりのピラーの数が多い、すなわち小さいピラーのほうが、接着斑の形成ができる場所が多くなるため、Saos-2 の接着に有利であると推測される。また、形状での比較に関しては、同じサイズで比較すると、ピラーとホールでは、親水化処理した場合の接触角に相違がみられたことから、形状による親水性の違いが細胞接着に影響を与えている可能性が考えられた。

3. 増殖試験について

Saos-2 は、親水化処理した 0.5 μm のピラー上で最も高い増殖を示した。Saos-2 については、粗面で増殖すること (12, 21)。また基材の親水性が高いほうが増殖を示すことが報告されている (17)。これらから考えると、本研究で 0.5 μm のピラーが最も高い増殖能を示したのは、表面性状としては粗く、親水化処理により、接触角がより小さくなったためと考えられる。

4. 石灰化試験について

パターンの形状および大きさの違いは、Saos-2 の石灰化に明らかな影響を与えなかった。親水化処理されたピラーとホールを比較すると石灰化に有意差はないが、同じ大きさでは、ピラーの方がわずかに高い傾向を示した。また、今回の石灰化の結果は、親水化処理における接触角の傾向と類似しており、石灰化に関しては、親水性、パターンの形状や大きさなどが影響を与える可能性が示唆された。今後、石灰化に対する効果を明らかにするため、より大きさの範囲の広いパターンやより詳細な親水化処理の条件の設定により石灰化に影響するか検討が必要である。

5. 動物実験について

埋入 1 週においては、ピラー 1 μm では骨芽細胞様の細胞がパターン上に配列していたが、5 μm ではパターン表面に線維性組織が観察され、一部のピラー間隙に細胞の侵入が認められた。4 週では、1 μm においては、多くのピラー表面ならびに間隙にピラーに接して骨組織が形成されていたが、5 μm では、ピラーの表面や間隙における骨形成は少なく、線維性組織が観察され、ピラーの大きさによる差異が認められた。すなわち、1 μm のほうが 5 μm に比較し、骨形成に優れることが示された。5 μm における細胞のピラー間隙への侵入については、スペースの大きさが関係すると推測されるが、Polydimethylsiloxane にマイクロピラー構造を付与し、*in vitro* でマクロファージの培養を行い、マウス皮下に埋入した Baker らは、ピラーのスペースが広いとマクロファージは集積し、*in vivo* においては、線維産生が亢進することを報告している (14)。埋入部位や動物種は異なり、本研究では、5 μm のピラー間の細胞の種類については検索していないが、ピラー間隙の広さ（ピラーの大きさ）は、周囲の細胞に影響を与え、骨形成に影響するものと考えられる。TEM 観察において、1 μm のピラーに接して骨組織が認められ、骨細胞、破骨細胞が観察されたことから、ピラーに接してリモデリングが生じている可能性も示唆された。しかしながら、5 μm のピラーでは多数の破骨細胞が観察されたことから、Baker らの報告した単球系の細胞の集積が生じ破骨細胞への分化も考えられ、今後免疫染色等による検討が必要である。

ホールでは、5 μm では、埋入 1 週後にホール内部に細胞の侵入が観察されたが、その数は、5 μm のピラーに対して少ない傾向を示した。埋入 4 週後では、5 μm ピラーに比較し 5 μm ホールのほうが、骨形成が多いこと、また、パターンの SEM 像からホール内部とピラー間のスペースを比較すると、ピラー間のスペースのほうが広いことを考慮すると、パターンにおけるスペースの広さが細胞の侵入、さらには骨形成にも関係するものと推察された。TEM

観察において、1 μm のホールで、ホール内部の壁に平行にコラーゲン線維がホールの底面まで観察された。5 μm のホールでは、コラーゲン線維は壁に平行ではなく、ランダムな配向が認められ、またホール底面まで達していなかった。マイクロ・ナノパターン上での骨形成についての TEM を使用した詳細な報告はなされていないが、この所見は、スペースの狭い（小さい）パターンが骨形成には、有利であることを示唆している。パターンのサイズに関して、ピラーやホールについての *in vivo* での報告は無く、グループについてはあるが、Zhu らはチタン表面にサイズを変化させたグループを付与し、ラット頭頂骨での骨形成を観察し(8)、リッジの幅 3 μm 、グループの幅 7 μm のパターンが骨形成に効果的であるとしている。Prodanov は、500nm のリッジとグループより 75nm のリッジと 225nm のグループで骨形成が多いとしており、小さなリッジとグループの有効性を報告している(13)。

本研究の *in vivo* の埋入試験において、2つのパターン、2つのサイズについて骨形成を検討した結果、1 μm のホールが、最も骨形成に効果的であることが示唆され、パターンの形状や大きさの違いが、骨形成に影響を与えることが示唆された。また骨形成においてパターン間の間隙が重要な因子の一つであることも示唆された。

IV 結論

COP フィルムにサイズの異なるピラーとホールの 2 種類の形態を付与し、*in vitro* ならびに *in vivo* で骨形成への影響について検討した。*in vitro* においては、接着、増殖においてパターンの形状や大きさの影響を受け、0.5 μm の小さいピラーが有利であることが示された。また、親水化処理は、接着や増殖に有効であり、ピラーは石灰化において親水化処理の影響を大きく受けることが示唆された。*in vivo* では、パターンの形態やサイズが骨形成に影響を与え、特に小さいサイズのホールのパターンが骨形成に有利であることが示唆された。

参考文献

- 1) López-valverde N, Flores-fraile J, Ramírez J, de Sousa B, Herrero-hernández S, López-valverde A. Bioactive surfaces vs. Conventional surfaces in titanium dental implants: A comparative systematic review J. Clin. Journal of Clinical Medicine, 9(7), 1-28, 2020.
- 2) W. Nicholson J. Titanium Alloys for Dental Implants: A Review. Prosthesis, 2(2), 106-116, 2020.
- 3) Albrektsson T, Brånemark P, Hansson H, Lindström J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. Acta Orthopaedica, 52(2), 155-170, 1981.
- 4) Yamamoto T, Fujisawa K, Ohe G, Nagai H, Miyamoto Y. Effect of Surface Topography on Loss of Osseointegration of Dental Implant : Comparison between Smooth and Rough Surfaces. 日口腔インプラント誌 28(3), 18-25, 2015.
- 5) Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of. blasting material and surface topography. Biomaterials 17, 15-22, 1996.
- 6) Guo L, Nanoimprint Lithography: Methods and Material Requirements. Advanced Materials, 19(4), 495-513, 2007.
- 7) Traub M, Longsine W, Truskett V. Advances in Nanoimprint Lithography. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 7, 583-604, 2016.
- 8) Zhu M, Ye H, Fang J, Zhong C, Yao J, Park J, Lu X, Ren F. Engineering High-Resolution Micropatterns Directly onto Titanium with Optimized Contact Guidance to Promote Osteogenic Differentiation and Bone Regeneration. ACS Applied Materials and Interfaces, 11(47) 43888-43901, 2019.
- 9) Akasaka T, Miyaji H, Kaga N, Yokoyama A, Abe S, Yoshida Y. Adhesion of Osteoblast-like Cells (Saos-2) on Micro-/Submicro-Patterned Apatite Scaffolds Fabricated with Apatite Cement Paste by Micro-Molding. Nano Biomedicine 8(2), 112-122, 2016.
- 10) Akasaka T, Tamai M, Yoshimura Y, Ushijima N, Numamoto S, Yokoyama A, Miyaji H, Takata R, Yamagata S, Sato Y, Nakanishi K, Yoshida Y. Different micro/nano-scale patterns of surface materials influence osteoclastogenesis and actin structure. Nano Research in press
- 11) Kaga N, Akasaka T, Horiuchi R, Yoshida Y, Yokoyama A. Adhesion of Human Osteoblast-like Cells (Saos-2 cells) on Micro/nanopatterned Structures Sputter-Coated with Titanium. Nano Biomedicine , 8(2) 74-82, 2016,
- 12) Makita R, Akasaka T, Tamagawa S, Yoshida Y, Miyata S, Miyaji H, Sugaya T. Preparation of micro/nanopatterned gelatins crosslinked with genipin for biocompatible dental implants. Beilstein Journal of Nanotechnology, 9(1), 1735-1754, 2018
- 13) Prodanov L, Lamers E, Domanski M, Luttge R, Jansen J, Walboomers X. The effect of nanometric surface texture on bone contact to titanium implants in rabbit tibia. Biomaterials, 34(12), 2920-2927, 2013.

- 14) Baker D, Liu X, Weng H, Luo C, Tang L. Fibroblast/Fibrocyte: Surface Interaction Dictates Tissue Reactions to Micropillar Implants. *Biomacromolecules*, 12(4), 997-1005, 2011.
- 15) Kohara T. Development and Application of the Cyclo-olefin Polymer. *高分子* 57(8), 613-616, 2008.
- 16) Yamazaki M. Industrialization and application development of cyclo-olefin polymer. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 213, 81-87, 2004.
- 17) Myllymaa K, Myllymaa S, Korhonen H, Lammi MSaarenpää H, Suvanto M, Pakkanen T, Tiitu V, Lappalainen R. Improved adherence and spreading of Saos-2 cells on polypropylene surfaces achieved by surface texturing and carbon nitride coating. *J Mater Sci: Mater Med* 20, 2337-2347, 2009.
- 18) Lee J, Lin Y, Shen Y, Chen W. The Nano-topology Influence of Osteoblast-like Cell on the Bio-nanostructure Thin Film by Nanoimprint. 2010 International Conference on Nanotechnology and Biosensors IPCBEE 2. 67-71, 2011.
- 19) Matschegewski C, Staehlke S, Loeffler R, Lange R, Chai F, Kern D, Beck U, Nebe B. Cell architecture-cell function dependencies on titanium arrays with regular geometry. *Biomaterials*, 31(22), 5729-5740, 2010.
- 20) Hirata E, Uo M, Nodasaka Y, Takita H, Ushijima N, Akasaka T, Watari F, Yokoyama A. 3D collagen scaffolds coated with multiwalled carbon nanotubes: Initial cell attachment to internal surface. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 93(2), 544-550, 2010.
- 21) Özçelik H, Padeste C, Hasirci V. Systematically organized nanopillar arrays reveal differences in adhesion and alignment properties of BMSC and Saos-2 cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 119, 71-81, 2014.

表 1：細胞培養用の COP フィルムの接触角(°). (a)は親水化処理がおこなわれていない. (b)は親水化処理をおこなっている.

(a)						(b)					
	0.5μm	1μm	2μm				0.5μm	1μm	2μm		
ビラー	122.9±5.9	111.5±6.3	111.6±7.3	プレーン	88.9±5.5	ビラー	7.2±2.4	9.9±2.5	8.5±2.0	プレーン	7.6±1.4
ホール	105.9±3.0	91.9±7.3	99.5±8.1			ホール	25.2±3.6	37.6±4.2	40.6±1.6		

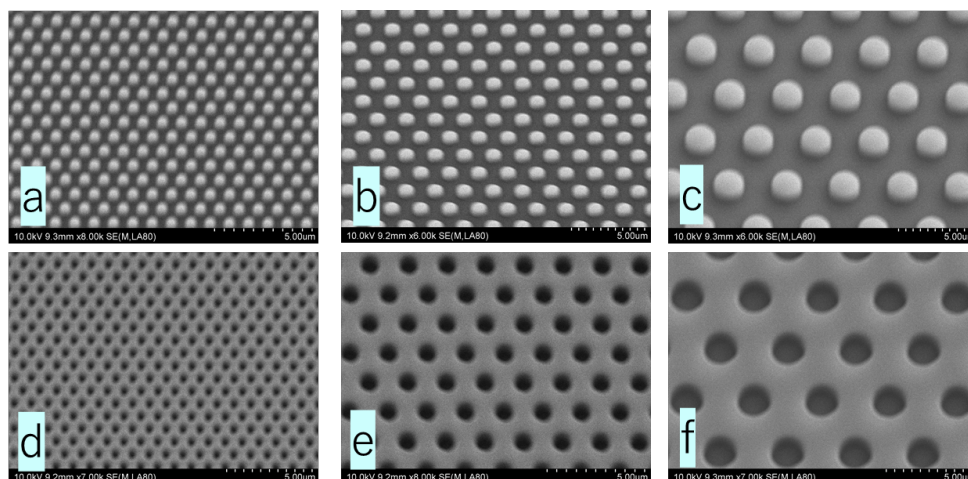


図 1: パターンの SEM 像. (a)(b)(c) : ピラー, 高さ : $1\mu\text{m}$, 直径 : $0.5\mu\text{m}$ (a), $1\mu\text{m}$ (b), $2\mu\text{m}$ (c), (d)(e)(f) : ホール, 深さ : $1\mu\text{m}$, 直径 : $0.5\mu\text{m}$ (d), $1\mu\text{m}$ (e), $2\mu\text{m}$ (f), ピラー, ホールともに均一な形状と大きさを有するパターンが作製されている.

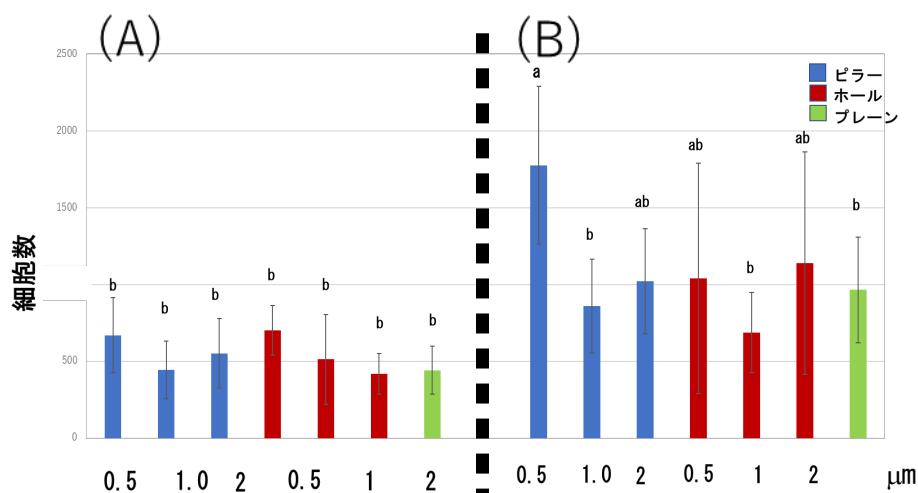


図 2: Saos-2 接着試験 (接着数). (A) : 親水化処理前. (B) : 親水化処理後. 親水化処理した COP フィルムのほうが接着能が高い傾向を示した. また親水化処理した試料では $0.5\mu\text{m}$ のピラーは, 接着能が高い傾向を示す. 同じアルファベットどうしは有意差なし.

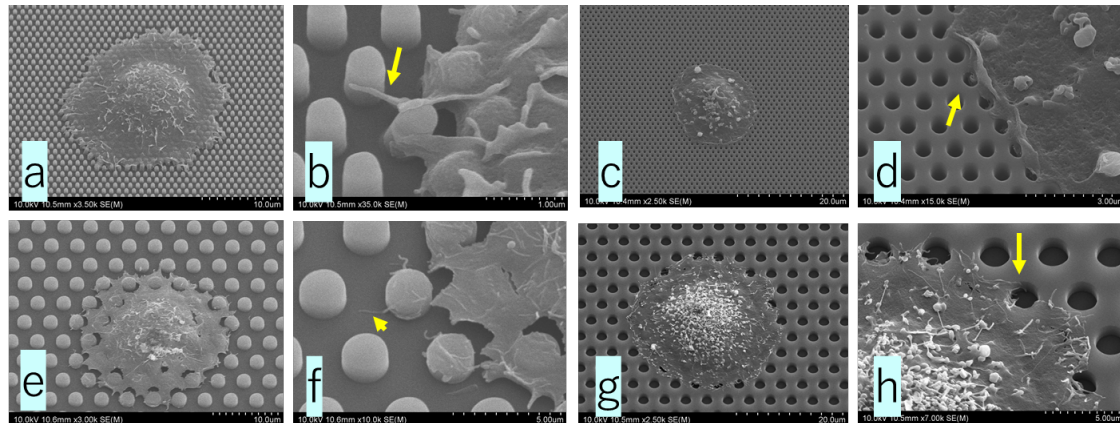


図 3 : Saos-2 接着試験 (SEM 観察) (a) : 親水化処理された $0.5\mu\text{m}$ ピラー (b) : (a)の強拡大図 糸状仮足がピラー間に付着しているのが確認される(黄色矢印). (e) : 親水化処理された $2\mu\text{m}$ のピラー (f) : (e)の強拡大図. 糸状仮足がピラー底面に付着しているのが確認される. (黄色矢印). (c) : 親水化処理された $0.5\mu\text{m}$ のホール (d) : (c)の強拡大図. (g) : 親水化処理された $2\mu\text{m}$ のホール (h) : (g)の強拡大図. (d)(h)ともに糸状仮足がホールに侵入しているのが確認される. (黄色矢印)

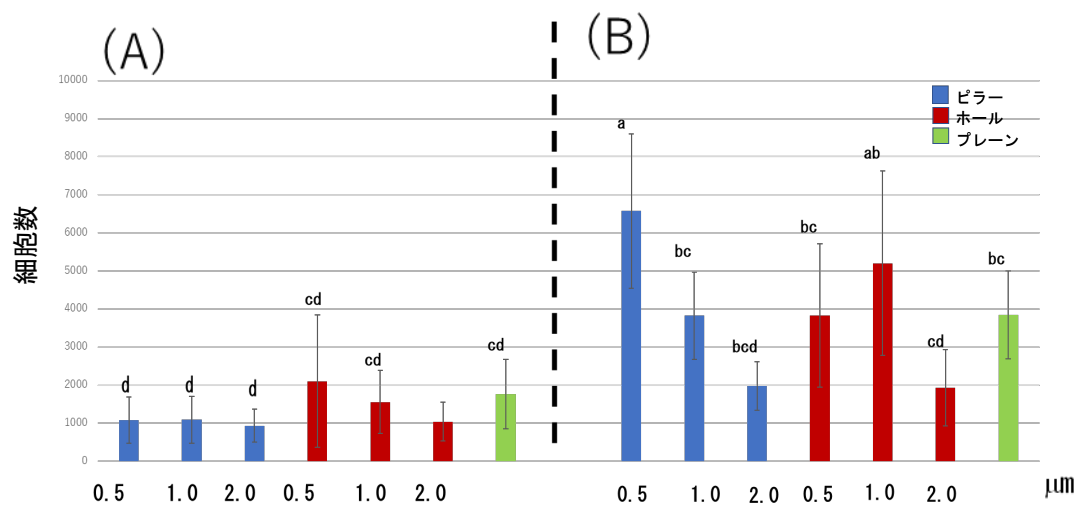


図 4: Saos-2 増殖試験. (A): 親水化処理前 (B): 親水化処理後 親水化処理した COP フィルムでは増殖能が高い傾向を示した. また親水化処理した試料では, 0.5μm のピラーは増殖能が高い傾向を示した. また同じアルファベットどうしは有意差がないことを表している.

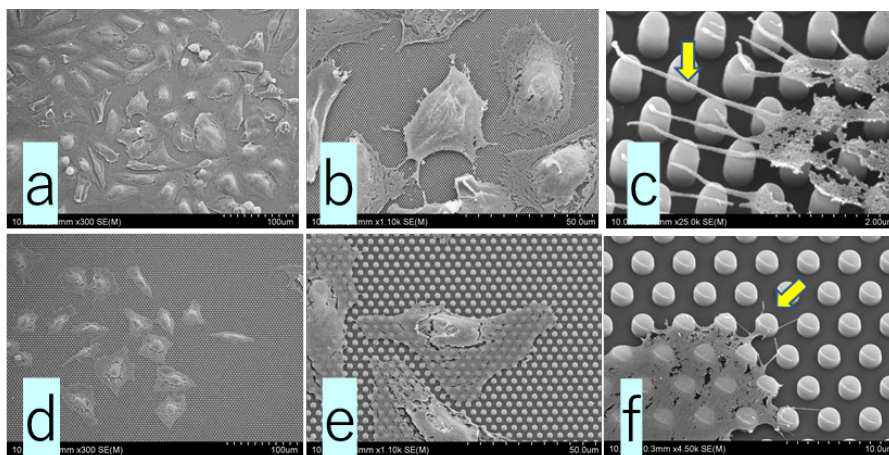


図 5: Saos-2 増殖試験の SEM 観察(a): 親水化処理された 0.5μm のピラー (b), (c): (a)の強拡大図. 糸状仮足がピラー間に伸展しているのが確認される(黄色矢印). (d): 2μm の親水化処理されたピラー (e)(f): (d)の強拡大図. 糸状仮足がピラー底面に付着しているのが確認される. (黄色矢印)

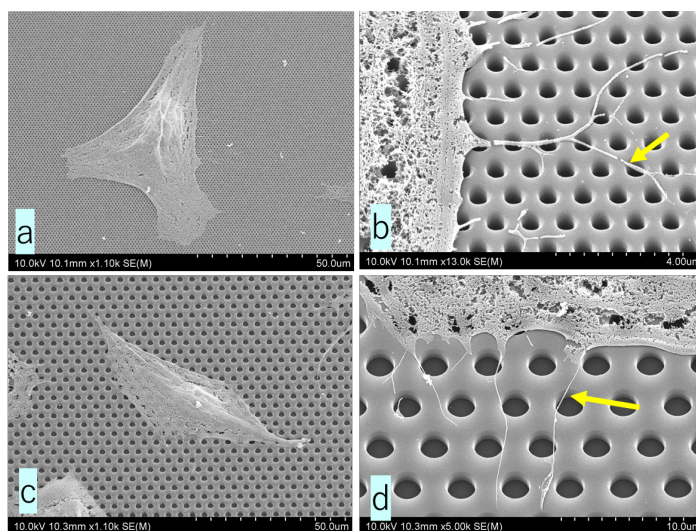


図 6 : Saos-2 増殖試験の SEM 画像 (a) : 親水化処理された 0.5 μm のホール (b) : (a) の強拡大像.
糸状仮足がホールの中には入らず、ホールを乗り越えているのが観察される. (黄色矢印).
(c) : 親水化処理された 2 μm のホール (d) : (c) の強拡大図. ホール間のフィルムの上に仮足が伸展している. (黄色矢印)

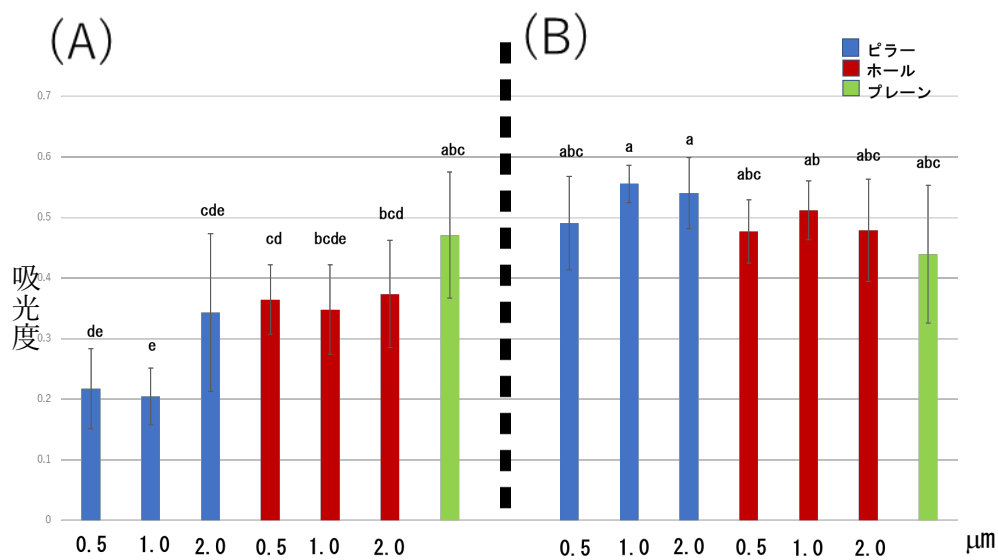


図 7: Saos-2 石灰化試験. (a) : 親水化処理前 (b) : 親水化処理後親水化処理された COP フィルムの石灰化能は高いことが示された. 同じアルファベットどうしは有意差がない.

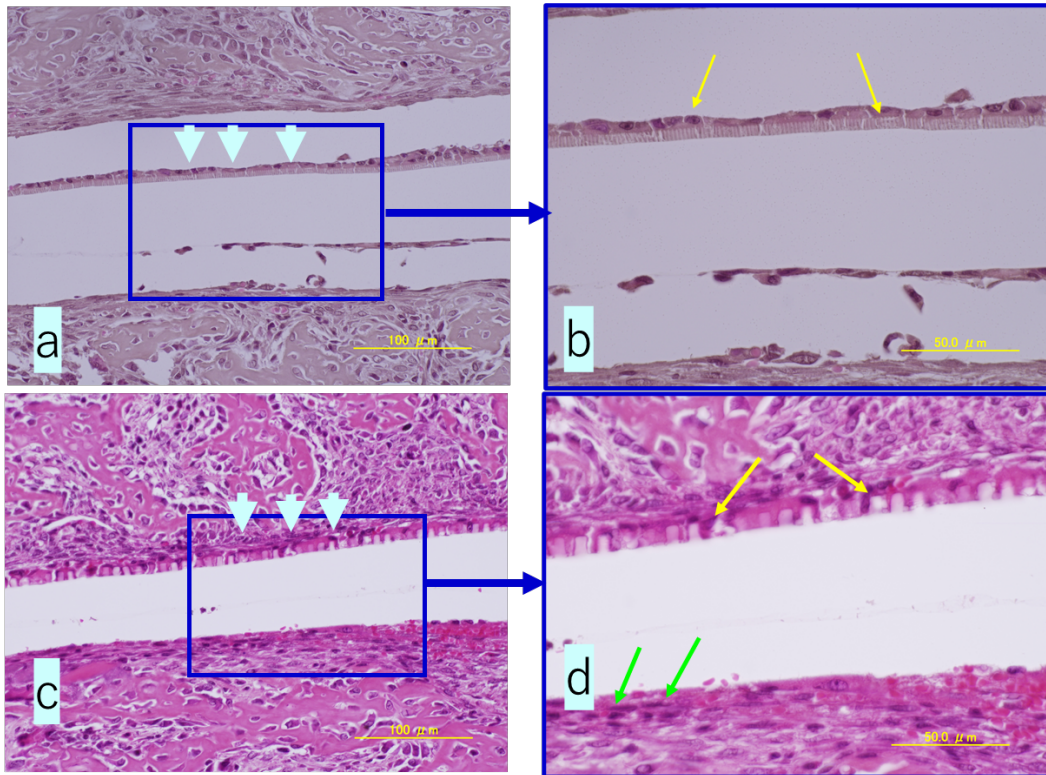


図 8：ピラーの組織像 1 週 (a)：ピラー1 μm (b)：(a)の強拡大像. (c)：ピラー5 μm (d)：(c)の強拡大像. (a)(c)ともに矢印は COP フィルム上のパターン側をあらわす.

ピラー1 μm では、フィルム上に骨芽細胞様の方形を呈する細胞が配列している(黄色矢印). ピラー5 μm では、一部のピラー間に細胞が侵入しており(黄色矢印)、パターンを付与していない側には紡錘形の線維芽細胞が観察される (緑色矢印).

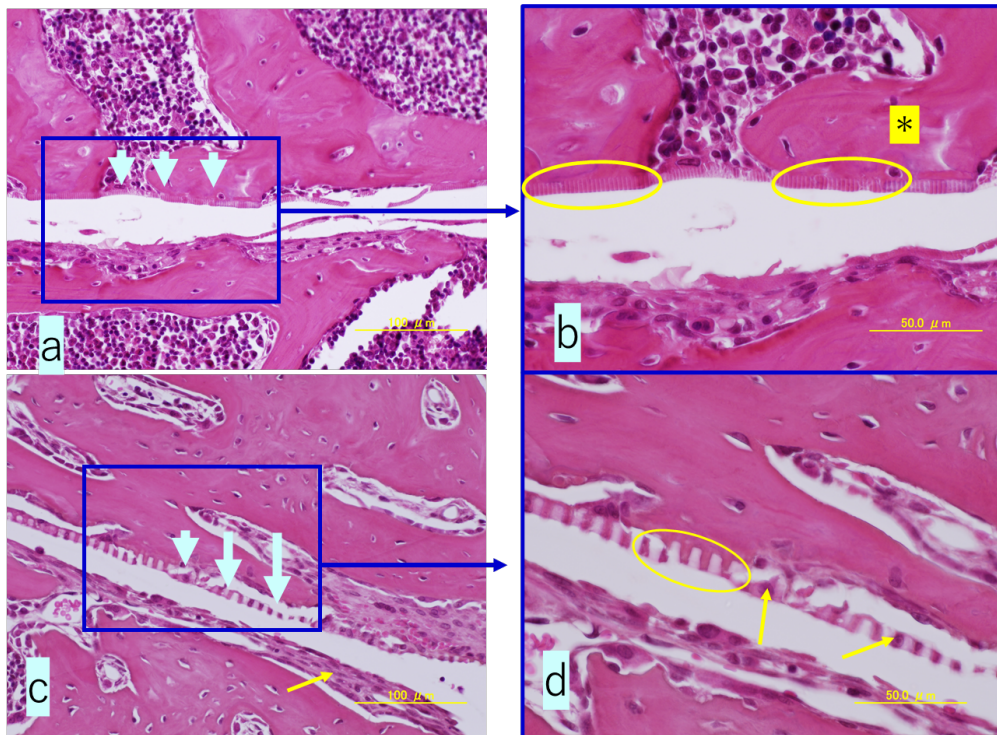


図 9：ピラー組織像 4 週 (a)：ピラー1 μ m (b)：(a)の強拡大像. (c)：ピラー5 μ m (d)：(c)の強拡大像. (a)(c)ともに矢印は COP フィルム上のパターン側をあらわす. ピラー1 μ m では、パターン側に広く骨組織が観察される(*). ピラー間にはエオジン好性に染色される骨様組織が認められる (黄色楕円). ピラー5 μ m では、ピラー間に一部骨様組織が観察され(黄色楕円), 大きな胞体を持つ細胞(黄色矢印)が観察された. パターンの反対側は線維組織が観察される (黄色矢印).

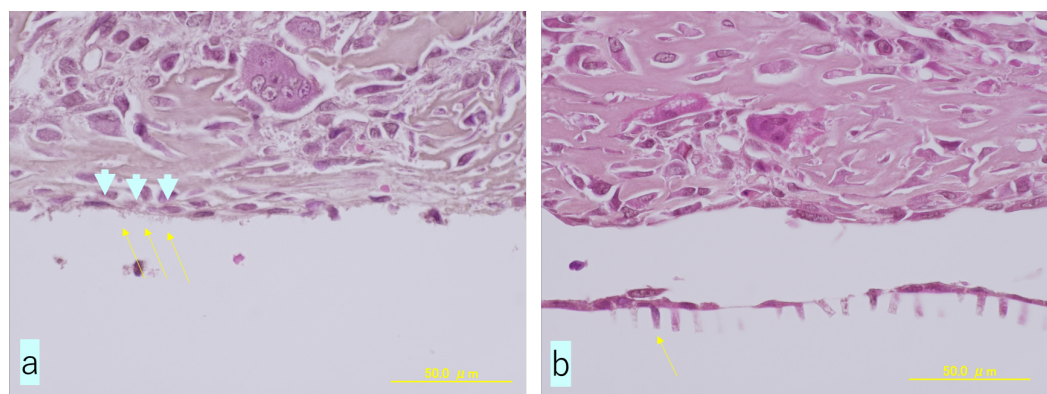


図 10：ホールの組織像 1 週 (a)：ホール 1 μ m (b)：ホール 5 μ m. (a)の青矢印は COP フィルム上のパターン側をあらわす. ホール 1 μ m では、ホール内にわずかにエオジン好性の物質が入り込んでいる(a の黄色矢印). ホール 5 μ m では、一部、ホール内に細胞が侵入しているのが観察される(b の黄色矢印)

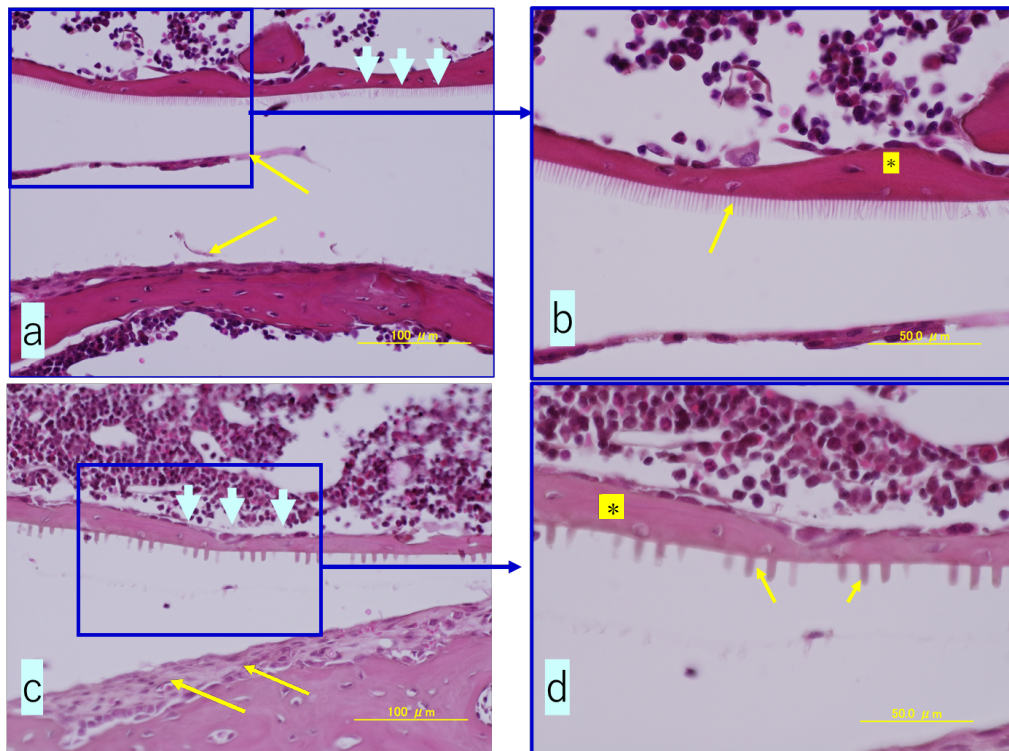


図 11：ホール組織像 4 週 (a)：ホール 1 μ m (b)：強拡大図. (c)：ホール 5 μ m (d)：強拡大図. (a)(c)ともに青矢印は COP フィルム上のパターン側をあらわす. ホール 1 μ m, 5 μ m ともパターンに沿って広く骨組織が観察される(b, d の*). ホール内部も骨様組織が認められる. (b, d の黄色矢印). パターンの反対側は線維組織が観察される(a, c の黄色矢印).

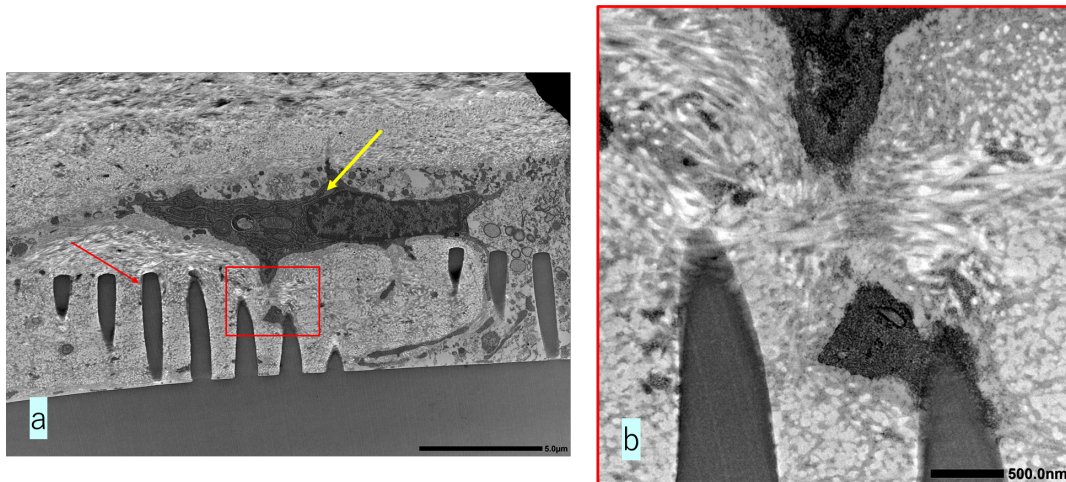


図 12：TEM 像 ビラー 4 週 (a)：ビラー1μm (b)：強拡大像 (a)の赤矢印はビラー，黄色矢印は骨細胞．ビラー先端部に接して骨細胞が観察され，ビラーに直接接して骨組織（コラーゲン線維）が観察される(a, b)．

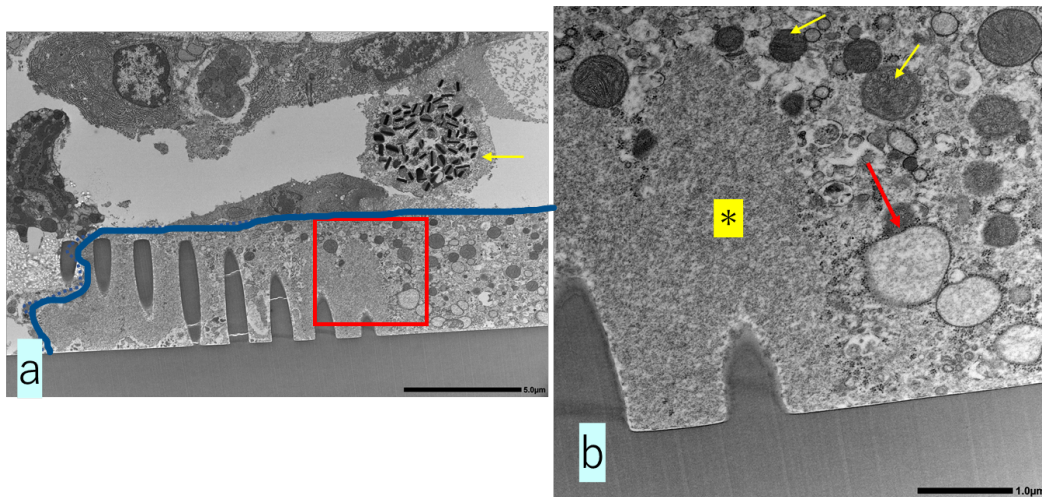


図 13：TEM 像 ビラー 4 週 (a)：ビラー1μm (b)：強拡大像．好酸球(aの黄色矢印)が観察される．また破骨細胞（青線）がビラーを取り囲み，明帯(bの*)，ミトコンドリア(bの黄色矢印)，空胞(bの赤矢印)が観察される．

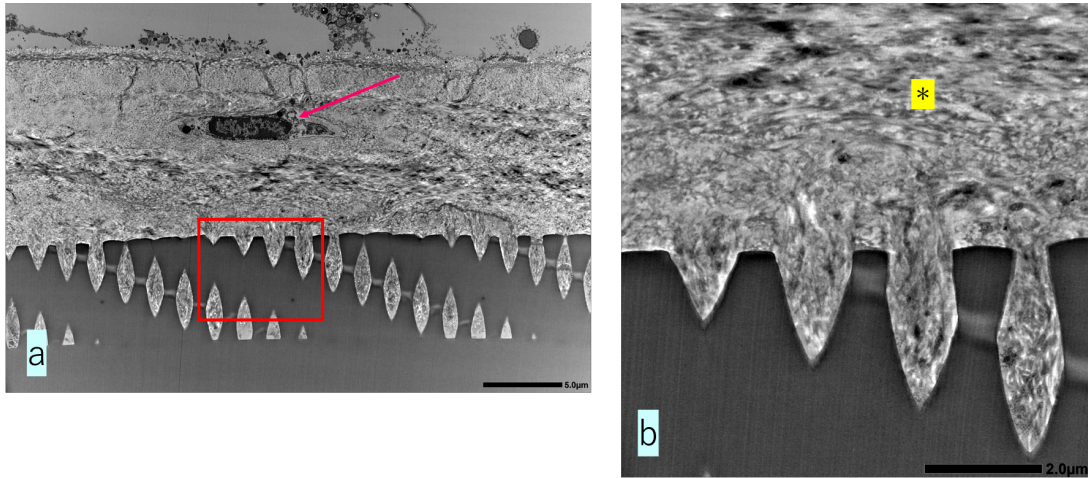


図 14： TEM 像 ホール 4 週 (a)：ホール 1 μ m (b)：(a)の強拡大像。パターン表面に骨組織が広範に観察され、骨組織内に骨細胞(aの赤色矢印)が認められる。ホール内部に骨組織(bの*)が認められた。コラーゲン線維は、ホール側壁に平行に走行しており、ホールに接している。

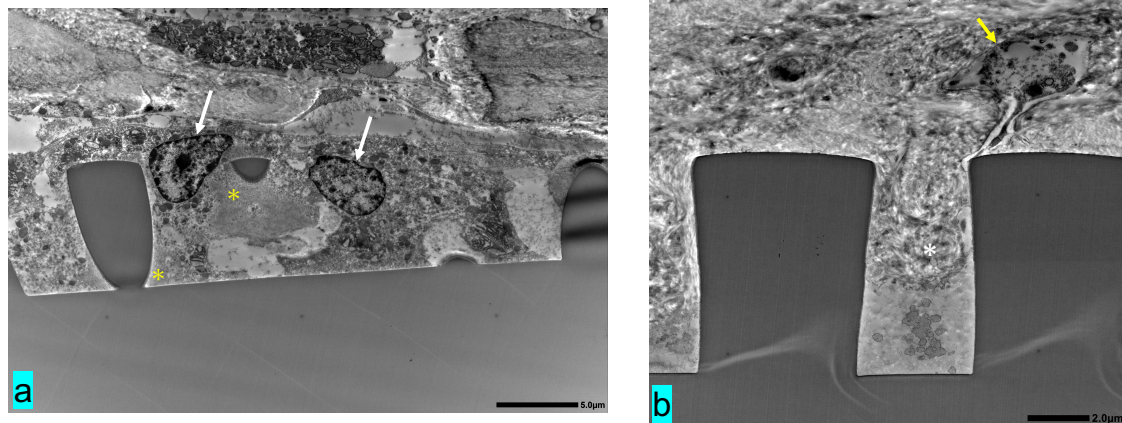


図 15： TEM 像 4 週(a)：ピラー5 μ m パターンに接して明帯(黄色*)を含む破骨細胞(核：白矢印)の一部が観察された。パターンと骨組織は接していない。(b)：ホール 5 μ m 骨細胞(黄色矢印)を含む骨組織がパターンに接して認められ、ホール内にランダムな配列のコラーゲン線維(白*)が観察されるが、底面までは達していない。