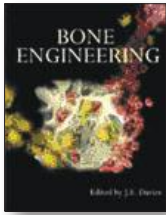


表面の最適サイズ



Bone response to laser microtextured surfaces.

レーザーマイクロテクスチャーを付与した表面に対する骨反応

JL Ricci, J Charvet, SR Frenkel, R Change, P Nadkarni, J Turner, H Alexander.
 Bone Engineering (editor: JE Davies). Chapter 25.
 Published by Em2 Inc., Toronto, Canada. 2000.

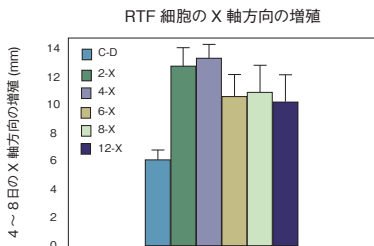


図1: コントロール群コロニーと比較した8日後のマイクログループ表面におけるRTF細胞のX軸方向の増殖グラフ(直径の増加)

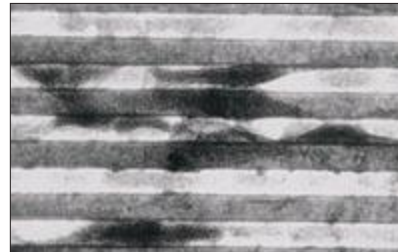


図3: 12µmのマイクログループを施した培養表面で増殖しているRTF細胞の光学顕微鏡画像。細胞は溝の頂点、底、側壁に付着している。細胞は基板の長軸方向に沿って整列している。

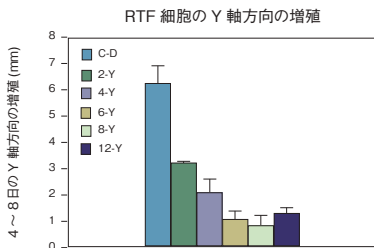


図2: コントロール群コロニーと比較した8日後のマイクログループ表面におけるRTF細胞のY軸方向の増殖グラフ(直径の増加)

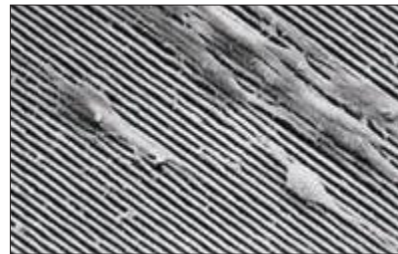


図4: 2µmのマイクログループを施した培養表面で増殖しているRTF細胞の走査型電子顕微鏡画像。細胞が溝の頂点に付着し、数本の溝にまたがっている。細胞は基板の長軸方向に沿って整列している。(目盛=100µm)

緒言

植え込み可能な装置に対する組織の反応は、組成、界面化学および表面微小形状に基づいた材質のインターフェース・パラメータの複雑な組み合わせに相関することがわかってきた。しかしながら、これらのパラメータの相対的寄与について評価することは難しい。

明確に定義された関係は確立されていないが、in vitro ならびに in vivo の実験により組織-インプラント表面相互作用における表面微小形状の役割が明らかになった。メタルとセラミックのインプラントに関して in vivo 実験で立証されているように、平滑表面は厚い線維組織被包の形成を促進するが、ラフサーフェスは軟組織の被包を薄くし、骨結合の密接化を促進することが一般的に示されている。in vitro 実験においても、チタンの平滑表面と多孔性表面では線維組織細胞の配向に対して異なる効果を持つことが示されている。表面粗さはハイドロキシアパタイトコーティングのインプラントにおける組織結合因子であり、加水分解性のエッチングによりラフサーフェスになった高分子への細胞付着および増殖を変化させることが示されている。さらに in vitro 実験からは、骨組織における細胞分化および制御因子の産出についてラフサーフェスの顕著な効果が示されてきた。in vivo では、グループ処理および機械加工のメタルや高分子表面などの微小形状は、細胞および細胞外基質を配向させ、インプラント周囲における上皮陥入の促進あるいは抑制効果を持つことが示された。さらに表面テクスチャー加工は、コラーゲン基質拘縮が起きる治癒期間に界面の安定を高め、平滑面よりも効果的にフィブリン凝塊基質を付着させることが示された。この効果は組織結合における早期の反応として重要かもしれない。

テクスチャー加工の表面はいくつかのレベルで作用しているようである。こうした表面は平滑面に比べ表面積が多く、安定が増した機械的界面を作るように組織が互いに噛み合う。また、フィブリン凝塊の接着、細胞外基質成分の接着の持続性、ならびに安定した界面における細胞の長時間相互作用においても著しい効果が期待できる。我々は、テクスチャー加工と比較して平滑な界面における線維組織の細胞が、早期の組織的コラーゲン被膜を短期間で形成するのを観察した。これは平滑面よりテクスチャー加工の方が付加的利点があることを示す。テクスチャー加工の表面は、創傷治癒の早期に現れて平滑な基質を被包してしまう線維芽細胞のコロニー形成を抑制する。

我々は、(1) 線維芽細胞コロニー形成に対するテクスチャー加工表面の効果、および(2) 調整された微小形状の線維芽細胞コロニー形成における効果を研究してきた。これらの結果に基づき、我々は in vivo モデルを用いて、調整された微小形状を持つチタン合金および工業用純チタンのインプラントを設計、作製し、実験をおこなった。これらの実験に使用した表面には、コンピューター制御によるレーザーアブレーション技術を応用して、高い配向性のある整然とした超小型構造が付与された。その結果、特定のサイズ幅に調整された表面微小形状によって骨結合が促進し、付着骨の部分的な微細構造の形状が制御されることが示唆された。

機能的に安定した軟組織界面



Tissue response to transcutaneous laser microtextured implants.

レーザーマイクロテクスチャー加工インプラントの経皮的埋入における組織反応

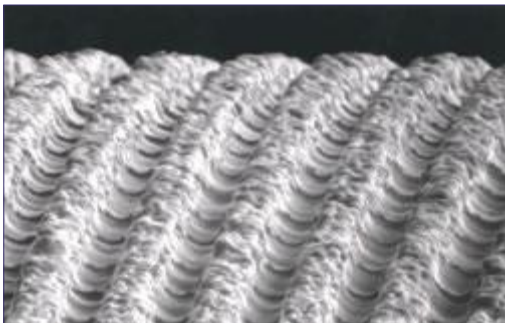
CL Ware, JL Simon, JL Ricci.

Presented at the 28th Annual Meeting of the Society for Biomaterials.

April 24-27, 2002. Tampa, FL.



図1(A) レーザーマイクロテクスチャーを付与したインプラント表面の走査電子顕微鏡 (SEM) 画像。2mm 幅のカラー部分にマイクロテクスチャーが2層。(B) 12 μ mの溝および山を示したレーザーマイクロテクスチャー表面の高倍率SEM画像。(目盛= 40 μ m)



要約

緒言: 本報告書では、軟組織結合の向上を目的として、ラビット頭蓋骨に使用したレーザーマイクロテクスチャー加工の上皮貫通型インプラントについて述べる。歯科および整形外科インプラントには組織結合を促進させるため、通常マイクロテクスチャーが加工されている。コンピュータ制御のレーザーマイクロテクスチャー技術により、インプラント表面の規定の部分に8 - 12 μ mのマイクログループを付与した。当該技術は細胞培養実験および動物実験の結果に基づいて開発されたものである。こうした表面性状を歯科インプラントのカラー部に再現し、その部位における骨結合および軟組織 - インプラント界面の安定を得られるようにした。本研究は、安定した結合組織と上皮の界面を作り出すレーザーマイクロテクスチャーの可能性について、ラビット頭蓋骨モデルを用いた上皮貫通型インプラントの評価を目的とする。

方法: ラビットを用いた研究を目的として、歯科インプラントの ϕ 4mm カラー上にレーザーマイクロテクスチャーを作製した(図1)。インプラントの長さは4.5mm、スレッド部分の直径は3.75mmであった。インプラントはOrthogen Corporation (ニュージャージー州スプリングフィールド) およびBioLok International(フロリダ州ディアフィールドビーチ)より提供された。インプラント表面は、Excimerレーザーおよび広範囲マスクング法を用い、特定部分のアブレーション加工をおこなった。レーザーアブレーションを制御することによって、ミクロン単位の分解能で規定表面のマイクロストラクチャーを正確に作製することが可能となる。レーザー加工によりカラー部周囲の表面に

機能的に安定した軟組織界面

8 μ m および 12 μ m の配向性マイクログループを付与した。コントロールインプラントのカラーは「機械研磨」されており、表面に小さな機械研磨の跡があるのが特徴である。全てのインプラントには滅菌前に硝酸清浄と不動態化をおこなった。

4本の上皮貫通型インプラントをラビット頭頂骨両側に1回法で埋入した。埋入は歯科インプラントと同様の外科プロトコルに従っておこなわれた。矢状縫合上に切開をおこない、皮膚と軟組織を外側に反転した。パイロットドリルおよび溝付きのスピードドリルを使用し、3.4mmの骨孔を形成後3.75mm直径のインプラントを埋入した。インプラントのスレッド部分は骨内に、カラー部のレーザーマイクロテクスチャー部は皮下の軟組織および上皮組織に貫通するように埋入した。ラビット1匹につき正中線の両側に2本ずつのインプラント(コントロールインプラント1本、実験インプラント3本)を埋入した。その後皮膚を縫合してインプラントを被覆した。インプラントのプラットフォームを露出させるためバンチにて穴を開け、カバースクリューを使用して抗生物質合剤軟膏を塗布した小型のプラスチックワッシャーを留めた。プラスチックワッシャーは早期治癒期間中の腫脹が起こっている間、インプラント上で皮膚が閉鎖することを防ぐために用いた。ワッシャーは2週間後に除去された。本研究には12匹のラビットが使用された。2週間、4週間および8週間後にラビットを屠殺し、周囲組織を含めたインプラントをサンプリングしてインプラントに対する硬・軟組織の反応を組織学的に観察した。

結論および考察： 本実験期間中に合併症あるいは感染は起こらなかった。2週および4週後の組織構造については、全てのインプラント周囲に未成熟の軟組織形成がみられた。2週ではまだインプラント表面に上皮組織の再生がなかったことから、インプラント表面と上皮組織の相互作用はほとんど認められなかった。4週においても上皮組織とインプラント間の明瞭な関連はみられなかった。8週の標本には、成熟した軟組織および上皮組織がより多くみられた。これらの標本では、上皮組織は完全に再生されており、軟組織の成熟とコラーゲン組織形成がみられた。コントロール群においては、上皮組織は一貫してインプラントと軟組織間の界面を下方陥入し、インプラントのカラー部に沿って深い歯肉溝を形成した。この歯肉溝は骨表面にまで陥凹し、コントロールインプラント表面との軟組織界面もしくは組織結合はほとんど、あるいは全くみられなかった。8週におけるコントロールインプラントでは、組織界面が異なるパターンとなっていた。上皮細胞はインプラントカラー上部で歯肉溝を形成したが、歯肉溝はほとんどの症例において骨表面まで下方陥入せず、300-700 μ mの広い幅をもったバンドとして止まっていた。マイクロテクスチャーの場合にはこの組織はカラー部下方に付着していた。レーザーマイクロテクスチャーをカラー最上部まで加工しても、この軟組織付着はカラー部の下方にのみ形成され、軟組織の安定した「コーナー」がインプラントのカラー部および骨表面の両方に付着していた。この歯肉溝、上皮組織付着および軟組織付着の構造は、天然歯周囲、また場合によってはインプラント周囲に表される「生物学的幅径」構造に類似していた。

結論： この予備実験から、レーザーマイクロテクスチャー表面の上皮貫通型インプラントへの応用と、軟組織結合促進効果が示唆された。この結果によって、皮膚との界面にある軟組織が天然歯周囲でみられる「生物学的幅径」に類似した構造を生み出す能力があることが示された。これらのレーザーマイクロテクスチャーは、付着細胞および付着組織の表面や立体構造を増大させることで機能すると想定される。つまり、効果的な経皮バリアを確立し、軟組織に対して機能的に安定した界面を形成する。今後は長期研究が必要とされるが、今回の結果は部分的な構成のマイクロテクスチャーにより経皮的補綴装置の固定が向上する可能性を示唆した。

方向性を持つ組織反応



Cytoskeletal organization in three fibroblast variants cultured on micropatterned surfaces.

微小形状パターンのある表面で培養した 3 つの線維芽細胞変異株における細胞骨格形成

JC Grew, JL Ricci.

Presented at the Sixth World Biomaterials Congress. Kamuela, HI.

May 15-20, 2000.

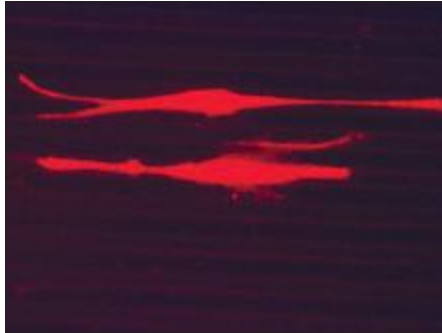


図 1: 12 μ m のグループで培養した 3T3-L1 線維芽細胞。伸長した細胞の均一な配向性に注目

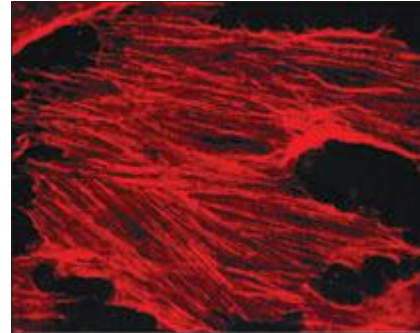


図 2: 平滑面で培養した MC-3T3 線維芽細胞

要約

緒言: インプラント表面形状および微小形状はインプラントに対する組織反応に影響を与える。合成基質の物理的・化学的特性は、培養された様々なタイプの細胞の形態、生理、行動に影響する。これまで、組織 - インプラント相互作用の研究では、細胞付着、シグナル伝達およびその他の細胞反応メカニズムが重視されてきた。ミクロン単位の基質特性によって影響を受けた細胞特性には、細胞の形状、付着、移動、配向性および細胞骨格構築などが含まれる。我々はマウス線維芽細胞株の 3 つの表現型の変異株を用いて、細胞の形状、配向性およびマイクロフィラメント分布に与える基質の微小構造の影響について研究をおこなった。マイクロフィラメント組織は、細胞付着、有糸分裂、移動およびアポトーシスを制御する細胞シグナル伝達に付随して、細胞の形状および配向性を反映している。マイクロフィラメントの束(ストレス線維)は、培養基質に対し *in vitro* 細胞反応の一因となるアクチン関連タンパク、接着分子およびタンパクキナーゼのクラスターで終わっている。

方法: TiO₂ コーティングのマイクロテクスチャーを施したポリスチレンのインサートを入れた 24 穴のウェルプレートに、10%の NCS、1%の抗生物質を加えた DMEM 培養地で、NIH-3T3 線維芽細胞、3T3-L1 線維芽細胞 (ATCC、ヴァージニア州マナッサス) および MC-3T3 線維芽細胞 (JP O'Connor 氏による寄贈) を培養した。培養基質には 8 μ m もしくは 12 μ m の平行な溝、3 μ m の直角方向の溝によって分離されている 3 x 3 μ m² の正方形の柱、あるいは特徴無し (コントロール) のものを使用した。10,000 個の細胞を、インサートを入れているウェルの中に播種し、1 日後、走査電子顕微鏡 (SEM) 用の標本作製とローダミン - ファロイジン染色をおこなった。

結果: 3T3 線維芽細胞の 3 つの変異株全てが 1 日以内に全ての基質に付着した。コントロールの表面の培養細胞に顕著な配向性もしくは形状はなく、いくつかの細胞質には、明らかに焦点性癒着で終結するストレス線維のランダム配列がみられた。8 μ m あるいは 12 μ m の溝をつけた基板上で培養した全細胞株のほぼ全ての細胞が、溝の頂上もしくは底で溝に並行に増殖、伸長し、配向していた (図 1)。8 μ m の溝で培養した細胞は 12 μ m の溝のものより頻りに溝を乗り越えて増殖していた。溝のある表面で 1 日培養した細胞でストレス線維形成を示すものは、どの細胞株にもほとんどみられなかった。溝を格子状につけた基質上で培養した細胞の多くには、柱の上で終結するストレス線維がみられた。この線維は中央の細胞質塊から直角に伸張し、突起した柱の頂上で終結する過程で構築された星状構造を持つと推察される (図 1)。本所見は、我々が過去におこなった柱様基板上の培養 NIH-3T3 細胞の所見と同様であった。SEM では 3T3 変異株に対する基質の細胞形状効果と細胞配向効果を確認した。

考察: 平行溝ならびに交差溝が、3T3線維芽細胞の 3つの表現型分散株の細胞の形、配向性、細胞骨格構造を決定づけることが、本実験から明らかとなった。NIH-3T3変異株は線維形成株であるが、3T3-L1変異株は脂質合成をしており、また MC-3T3変異株は骨原性である。こうした細胞の表現型の分析を、アルカリ性ホスファターゼ分析 (MC-3T3細胞はアルカリ性ホスファターゼ陽性) および Sudan Black B 染色 (3T3-L1細胞の脂質封入に対する染色) によっておこなった。上記のコンタクトガイダンスにおける細胞外基質および細胞接着分子の役割特性は明らかにならなかったが、今後のテーマではある。我々は以前、インテグリン分散およびチロシンキナーゼ活性がマイクロメトリック基質の特性による物理的に抑制されていることを明らかにした。同様の抑制が本稿で述べた細胞の中でも起こっていると仮定される。インプラントに対する組織応答を指示する細胞株における表現型の相違の解明が、インプラントの結合改善と延命に有益となるかもしれない。

謝辞: 本論文は NSF の助成金 SBIR-9160684 および DUE-9750533、ならびに NJCU・SBR の助成金 220253 を受けた。微小形状の鑄型は Cornell Nanofabrication Facility にて製作した。

方向性を持つ組織反応



Cytological characteristics of 3T3 fibroblasts cultured on micropatterned substrates.

微小パターンを持つ基板上で培養した 3T3 線維芽細胞の細胞学的特徴

JC Grew, SR Frenkel, E Goldwyn, T Herman, JL Ricci.

Presented at the 24th Annual Meeting of the Society for Biomaterials.

April 22-26, 1998. San Diego, CA.

要約

緒言: 組織-インプラント相互作用は完全には解明されていないが、インプラントの表面形状および微小形状は細胞反応に影響する。合成基質の物理的・化学的特性は様々なタイプの培養細胞における形態、生理および行動に影響する。これらの詳細が *in vitro* においてようやくわかりはじめた。平滑な基板上で培養した細胞と、ミクロン単位の表面規則性を持つ基板上で培養した細胞間では、形態、付着、遊走、方向および細胞骨格構成が異なる。我々はマウス線維芽細胞の形状、方向、ならびにマイクロフィラメントと接着斑の分布 — 基板の微小形状に影響するコンタクトガイダンスおよびその他の因子の関連パラメータについて研究をおこなった。マイクロフィラメントの構造は細胞形状および配向性を反映するのみならず、細胞付着、有糸分裂、遊走およびアポトーシスをつかさどる信号変換体系にも重要である。マイクロフィラメント束はアクチン関連タンパク質、接着タンパク質、信号変換機能を持つプロテインキナーゼの集合体で一単位となる。我々は、(1) マイクロフィラメント/張線維、(2) 接着斑分子、(3) 細胞付着に関連する主要キナーゼ生成物のホスホチロシンなどの分布に関して分析をおこなった。

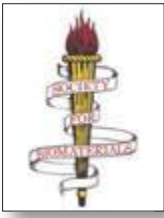
方法: 1cm² のマイクロテクスチャー加工インサートの入ったマルチウェルプレート内で、冷凍保存株の 3T3 線維芽細胞(メリーランド州ロックヴィル、ATCC 社) を 10%FBS 含有 DMEM で培養した。インサートはシリコン型で溶媒キャストされたポリスチレンで構成され、酸化チタンコーティングされている。表面は、8μm の平行の溝、12μm の平行の溝、3μm² の柱(3μm の溝が直角に交わることで作られた突起)、あるいは特徴無し(コントロール群)とした。インサートを入れたウェルに 4,000 の細胞を播種し、4 日または 8 日間の培養をおこなった。細胞は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察をした。また、(1) ローダミン - ファロイジン、(2) マウス抗タリン / マウス抗ピンキュリンと抗マウス - ローダミン抗体、(3) 抗ホスホチロシン - フルオレセイン抗体のいずれかを用いて細胞染色をおこなった。

結果: 3T3 細胞は培養 4 日までに全基板に付着し、8 日までにはかなり増殖した。ところどころ重なり合う細胞もみられた。コントロール群の表面上で培養した細胞には顕著な配向性や形状の特性はなかった。その細胞質にはローダミン染色の拡散がみられ、明らかなストレス線維はなかった。接着斑およびホスホチロシンは拡散分布していた。8μm あるいは 12μm の溝がある基板で増殖した細胞は溝に沿ってほぼ均一な配向がみられた。8μm 溝では培養細胞はほとんどが溝の頂部で増殖しており、溝を超えてまたがっているものも多かった。12μm 溝の培養細胞は主に溝の頂部もしくは溝内で増殖しており、隣の溝の頂部にまたがって増殖しているものは少なかった。どちらの溝でも 8 日間培養した細胞の中には、ストレス線維の限局した痕跡を示すものもあった。接着斑とホスホチロシンは細胞と基板の接触面部位に限定されており、溝から溝にまたがる細胞の一部分は接着斑とホスホチロシンが欠如していた。柱様表面の培養細胞では、柱の間を交差する溝に沿うようにマイクロフィラメントの直交配列がみられたものの、ストレス線維は観察されなかった。これらの細胞は柱の頂上に留まるか表面に定着し、基底面に限ってマイクロフィラメント束の分布がみられた。SEM からは、基底細胞膜表面の柱の貫通と、柱周囲への細胞含有物の定着が明らかであった。接着斑とホスホチロシンも同様に分布していた。

考察: 本実験では、平行あるいは直行の溝が 3T3 線維芽細胞の接着斑の形状、方向、細胞骨格形成および分布に影響を与えることが確認されたが、ラット腱線維芽細胞への効果に関する我々のこれまでのデータを発展させる結果となった。これらのプロセスを誘導する細胞外基質の役割は、明らかにはなっていないものの、考察の必要がある。基質の物理特性によってキナーゼ活性が制限される発見は新規であり、基質に対する反応は、細胞の種類によって異なるメカニズムであることが明らかになった。我々は、インプラントの結合の促進と機能の延命に関わるそれぞれの細胞特性のうちの表現型について、それらの相違を発見することを目標としたい。

謝辞: 本研究は、全米科学財団 SBIR フェーズ I 助成金 #9160684 およびジャージー市州立大学 SBR 助成金 #220251 を受けている。微細構造の鋳型は Cornell Nanofabrication Facility にて製作した。

細胞の配向性および組織化



Effects of surface microgeometry on fibroblast shape and cytoskeleton.

繊維芽細胞の形状と細胞骨格に対する表面微小形状の効果

JC Grew, JL Ricci, AH Teitelbaum, JL Charvet.

Presented at the 23rd Annual Meeting of the Society for Biomaterials.
April 30-May 4, 1997. New Orleans, LA.

要約

緒言：表面微小形状は組織-インプラント相互作用に影響を与えるが、その作用は殆ど明らかとなっていない。細胞のコンタクトガイダンス、つまり表面微小形状に対する組織反応は、細胞の増殖およびその他の行動に大きく影響する。例えば、溝を付与した表面においては、溝の深さおよび幅の最低限度は細胞の形状と配向性ならびに増殖方向に影響を与える範囲でなければならない。細胞の付着、形状および配向性が細胞骨格形成に影響しているが、このような細胞骨格形成は微小形状効果によるものと考えられる。我々は、様々な表面微小構造をもった模擬生体材料上で培養した線維芽細胞の特性を調べた。ヒト線維組織の細胞はインプラントに接触する最初の細胞になることを踏まえ、実験ではラット腱線維芽細胞 (RTF) を用いておこなった。インプラントの線維性被包化は表面粗さ及び微小形状によって起こる。粗面化により被膜は薄く成長するため、骨細胞・骨組織とインプラントとの接触がより緊密になり、インプラントの結合が改善される。

方法：後足の伸筋腱から得られた保存培養の RTF を、平滑 (コントロール)、 $2\mu\text{m}$ または $12\mu\text{m}$ の平行直線の溝、あるいは $3 \times 3\mu\text{m}$ の溝で分断された 8×50 もしくは $80 \times 50\mu\text{m}$ のダイヤモンド形状の表面を持つポリスチレン基板上で培養した。基板はシリコンの鋳型で溶媒キャストし、酸化チタンでコーティングしたものを用い、この 15mm のそれぞれの円形抜き型の基板を 24 個のウェルプレートに入れ、20,000 個の RTF を播種した。培養 4 日および 8 日で細胞を固定した。ローダミン-ファロイジン、ならびに抗ピンキュリンの後にフルオレセイン合成二次抗体にて細胞を染色し、細胞形態を走査型電子顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察・記録した。

結果：平滑基板ならびに微小形状基板で増殖した RTF の配向および形状は常に異なっていた。培養細胞の増殖方向は、平滑基板ではランダムになる傾向があったが、微小形状基板では総じて直線の溝ならびにダイヤモンドの長い辺の方向と一致していた。 $2\mu\text{m}$ の溝ならびにダイヤモンドパターンの基板上で増殖した RTF はパターンの盛り上がった部分に多く、直溝をまたいで付着していた。 $12\mu\text{m}$ の溝で培養した RTF は溝内およびダイヤモンドパターンの両方で増殖しており、溝をまたいでいるものはほとんどなかった。大きいダイヤモンドパターンの表面で培養した RTF は盛り上がった部分での増殖が多かった。平滑基板で培養した RTF は概ね円形で左右対称になっており、中央の細胞集団から全方向に短突起を伸ばしていた。直線溝の基板上で培養した RTF はほとんどが紡錘状になり、狭い溝 (2 または $3\mu\text{m}$) をまたいでいる時、もしくは溝の壁 ($12\mu\text{m}$ の溝) と側面接触をする時のみ、溝に対して直角に突起を伸ばした。基板の微小形状はマイクロフィラメントの束 (ストレス線維) の形成にも影響を与えた。ストレス線維は微小形状基板上の培養 RTF における配向の主な方向と一致していた。平滑基板の培養 RTF では、様々な角度で細胞質いっぱい広がるマイクロフィラメント束がみられた。免疫蛍光顕微鏡観察で明らかに、全ての細胞内においてマイクロフィラメント束の末端にピンキュリンが存在した。これは、細胞-基板付着の位置が焦点付着と一致することを示唆している。

結論：本研究では直線およびダイヤモンドのパターンにおける線維芽細胞の配向性と細胞骨格形成への影響が示され、これまでに観察されてきた細胞形状変化や方向性の増殖という、基板の微小形状によるコンタクトガイダンス効果が表された。 $3 \sim 10\mu\text{m}$ 幅の RTF は、 2 および $3\mu\text{m}$ の溝をまたいでいることが多かったことから、細胞成長の最適化には、表面の特徴をさらに絞り込む必要性を示唆している。今回の結果は、コラーゲンゲル中に細胞を懸濁させて作製した「ドット」培養に関する今までの報告とは異なっており、培養細胞の微小形状効果はドット培養より播種培養の方が小さいと思われる。増殖するドット培養細胞は基板表面でかなりの距離を移動している可能性が高い。このように溝は、定着する播種培養細胞より、移動するドット培養細胞に対して重要なガイドの役割をしている可能性がある。特に基板への細胞付着モデルを用いた比較実験の継続によって、パターン化された基板上の細胞挙動の知識が深まるであろう。例えば、組織-インプラント界面における線維組織増殖の割合および方向をコントロールすることが可能となれば、インプラントの安定性が最適化されるであろう。

謝辞：本研究は NFS SBIR フェーズ I の助成金 #9160684 によっておこなわれた。微小形状の鋳型は Cornell Nanofabrication Facility にて製作した。

細胞の内部成長阻止



Cell interaction with microtextured surfaces.

マイクロテクスチャー表面の細胞相互作用

JL Ricci, R Rose, JK Charvet, H Alexander, CS Naiman.

Presented at the Fifth World Biomaterials Congress.

May 29-June 2, 1996. Toronto, Canada.

表 1： 細胞成長および形状パラメータ

| | 表面 | | | |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | コントロール群 (平滑) | 1.75 μ m | 6.5 μ m | 12.0 μ m |
| 8 日後の細胞コロニー mm ² (S.D.) | 83.8 (11.0) | 85.6 (5.6) | 36.6* (4.7) | 39.3* (6.1) |
| 細胞付着面積 μ m ² (S.D.) | 2666.4 (1534.9) | 604.4 (247.5) | 621.1* (250.0) | 934.0* (493.1) |
| 細胞離心率 長さ / 幅 (S.D.) | 2.1 (0.9) | 6.0* (2.6) | 6.7* (3.4) | 7.3* (3.4) |
| 細胞密度 細胞 / mm ² (S.D.) | 912.8* (135.5) | 667.6* (115.8) | 715.3* (114.9) | 676.0* (134.6) |
| 細胞配向性 (溝との相対性) | ランダム | >90% ± 40° 以内 | 100% ± 20° 以内 | >95% ± 20° 以内 |
| *p<0.05 | | | | |

要約

緒言： インプラント表面のマイクロテクスチャーが組織相互作用に影響を与える可能性は以前から認識されている。これまでの研究において、我々はマイクログループ、粗面、複雑な表面性状などの様々な特定の表面微小形状と結合組織の線維芽細胞の in vitro 相互作用を観察してきた。ほとんどの場合、このような表面性状は、類似した組成であっても、線維芽細胞コロニーの増殖率および増殖方向において異なった（そして明らかな）効果がある。細胞コロニーの増殖に対する表面性状効果のメカニズムは解明されていない。本研究では、結合組織細胞密度、細胞付着面積（拡散）および細胞形状に及ぼす特定の表面微小形状の効果を調べた。その結果、付着細胞の増殖を制御する基本的メカニズムが、表面微小形状に存在する可能性が示唆された。

材料と方法： 生後 14 日の Sprague-Dawley ラットの後足伸筋腱から腱線維芽細胞 (RTF) を採取し、保存培養株として増殖培養した。ペニシリン-ストレプトマイシンおよび 10% のウシ胎仔血清を含むダルベッコ変法イーグル培地にて第二期～第四期継代細胞を増殖させ、全ての実験に備えた。移植片培養モデルに類似した「ドット」培養モデルを使用し、それぞれの表面上で細胞コロニーを増殖させた。これらの細胞を可溶コラーゲン (Vitrogen, Celltrix, カリフォルニア州パロアルト) 中に懸濁させ、20,000 個の細胞を含む 2 μ L の液滴を実験表面上に播種した。その表面は放射状細胞コロニーの増殖基板となった。光学電子顕微鏡および画像解析方法を用い、増殖率および増殖方向の他、細胞密度 (細胞数 / mm²)、細胞付着面積 (μ m²)、細胞配向性 (基板に対する配向性) および細胞伸長 (離心率、細胞の長さ・幅比率) を測定した。それぞれの測定においては、各実験グループから毎回 30 個の細胞を用いた。実験基板の表面は、60nm TiO₂ の蒸着と、コーネル大学国立 Nanofabrication センター (NY 州イサカ) のリソグラフィ法で製造したシリコンウエハー・テンプレートの鋳型から、溶剤キャストしたポリスチレンで構成されていた。基板には、鏡面のように平滑な表面 (コントロール) と、隆線と溝を 1.75、6.5 および 12 μ m 矩形波のマイクログループを準備した。t-検定による統計分析をおこなった。

結果： 3 つのマイクログループを施した表面の全てにおいて、細胞コロニー増殖、細胞付着面積、細胞離心率、細胞密度および細胞配向性 (表 1) に顕著な効果が確認された。細胞コロニーの増殖と拡散は抑制され、細胞離心率 (伸長) は増加した。また、効果的な細胞の平行配向がみられた。細胞密度は全ての実験群表面においてコントロール群に比べ減少した。

考察： 実験に用いられた表面微小形状は、明確に定義されることで、細胞の配向、形状変化、増殖率減少に効果的である。一般的に付着依存性細胞は付着し拡散して細胞分裂を繰り返している。今回の結果から、微小形状の表面で明らかにみられる増殖抑制効果は、マイクログループの細胞拡散抑制作用に基づいているという可能性が示唆された。またこの実験から、平滑面 vs マイクロテクスチャー表面の線維性カプセル化の違いは、マイクロテクスチャーによる線維芽細胞拡散増殖抑制作用が原因である可能性も示唆された。組織結合を制御するためには、この微小形状はインプラントの表面として潜在的な用途がある。

謝辞：本研究は、NSF SBIR フェーズ I 賞 9160684 により、Orthogen Corporation 基金でおこなわれた。

線維性被膜化の抑制



In vitro effects of surface roughness and controlled surface microgeometry on fibrous tissue cell colonization.

線維組織細胞のコロニー化における表面粗さ及び制御された表面微小形状の in vitro 効果

JL Ricci, J Charvet, R Sealey, I Biton, WS Green, SA Stuchin, H Alexander.

Presented at the 21st Annual Meeting of the Society for Biomaterials.

March 18-22, 1995. San Francisco, CA.

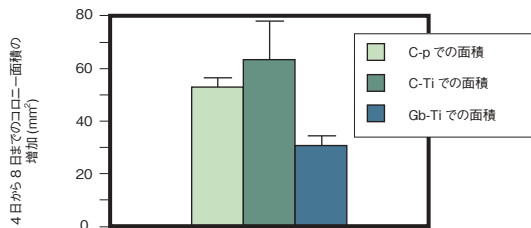


図1: 粗面仕上げをした(GB-Ti)表面と平滑(C-p および C-Ti)表面上のRTF細胞コロニー増殖

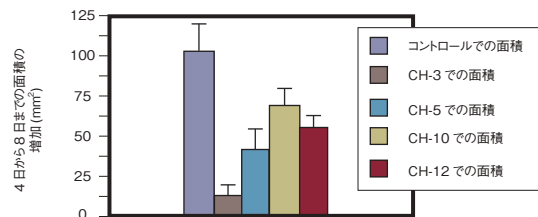


図2: 格子形状を3µm(CH-3)から12µm(CH-12)までにした表面、ならびにコントロールである平滑面(Con)でのRTF細胞コロニー増殖

要約

緒言: インプラントの軟組織被膜化は、インプラント材料の組成、界面化学および表面微小形状と関連していることがわかっている。骨内におけるインプラントの表面微小形状(あるいは表面性状)が線維性被膜形成に関与している。例えば、平滑面は粗面よりも厚い線維性被膜形成を誘導する。これは表面微小形状が線維性組織の増殖に影響することを示唆している。我々は、プラスチック技術により粗くした表面、ならびに3~12µmの小さい四角の突起を設けた微小形状表面に対して、ラット腱線維鞘(FTF)細胞コロニー、およびヒト人工股関節全置換術の術中から獲得したインプラント被膜線維芽細胞(HICF)コロニーに関して in vitro における評価をおこなった。

材料および方法: 生後14日のSprague-Dawleyラットの後足伸筋腱からRTF細胞を培養した。HICF細胞については、セメント結合でない人工股関節の除去を含む、人工股関節全置換術を受けた患者から得た線維被膜組織サンプルから培養した。組織はサンプル近位の部位から採取し、保存株培養を作るために無菌状態で培養した。全て保存株として培養した細胞は、可溶コラーゲンと混合させ、「ドット」培養のために調合した。実験表面上では2µLの点に20,000個の細胞が含まれた。これらの細胞-コラーゲンのドットは細胞増殖の起点となり、増殖する細胞コロニーを形成した。そして4日後および8日後に、細胞コロニーを固定・染色し、画像処理/画像分析システムに接続したビデオカメラ付きの立体顕微鏡により、増殖面積を測定した。4日と8日における細胞コロニーの増殖は、コロニー面積あるいはその直径の増加とした。粗面はポリスチレンの培養板をグリットプラストもしくはビードプラストして作製した。コントロールの平滑面はマスキングをした部分を使用した。プラストに使用した材料によって表面形状は様々であった。媒体は整形外科用メタルインプラントの表面仕上げに用いられているものと同様で、表面形状の特徴も同様になった。規則的に加工した微小形状基板は、コーネル大学のNational Nanofabrication Facilityにて光リソグラフィー法を用い、製作精度テンプレートから溶液流涎ポリスチレンによって成形した。整形外科用チタン合金インプラント表面を模倣するため、表面は全てTiO₂の600-Å層でスパッタコーティングを施した。微小形状表面は、それぞれ明確な特徴を持つ、格子にしたもの、もしくは3、6、10および12µmのサイズの四角のポストからなるチェッカー盤模様の表面にした。

結果: 細胞の全コロニーは、ドット周辺では細胞増殖が観察され、4日までは安定した増殖を示した。無秩序に配向した細胞が、コントロール群の平滑面上で円状のコロニーを形成した。これは粗面上でも同じであった。規則性を持つ微小形状面は、増殖の方向が制限されているため、普通でない形状のコロニーとなった。個々の細胞レベルでは、基板表面構造に沿った配向、ならびに表面構造間の溝に配向していることが観察された。最小の微小形状面では、それぞれの細胞がいくつかの四角の突起表面に付着しているのが観察された。実験表面は全て、両タイプの細胞とも、細胞コロニーの増殖を著しく抑制した。RTFの細胞増殖を説明した図1に示されているように、コントロール群のTiコーティング表面(C-Ti)および処理無し表面(C-p)に比較し、グリット・プラスチックのTiコーティング表面(GB-Ti)では細胞増殖の著しい抑制が観察された。全ての格子状表面はコロニー増殖の強い抑制作用を示したが、そのうち最も強い細胞増殖抑制は3µmの表面(図2)で観察された。図2もRTF細胞コロニーのデータを示している。

結論: 粗面ならびに一連の規則的な微細溝で培養したRTFおよびHICF細胞のコロニーは、増殖が抑制されることが明らかとなった。培養基板によってコロニーの細胞密度が高くなることはなかった。また、培養基板の表面積の増加によるものでもなかった。これらの結果からは、全体的な細胞コロニー増殖に対する細胞コンタクトガイドランス—細胞の配向および遊走に影響を与える基質の微小形状効果—の影響がみられた。in vitroで観察された粗面および微小形状の線維細胞増殖効果は、in vivoにおいて粗面が線維被膜化を起しにくくという結果との関連も考えられる。その場合、規則的に加工した微小形状表面が、線維被膜化の効果的な抑制に利用できる可能性がある。

謝辞: 本研究はOrthogen Inc.の援助、および、Orthopaedic Research and Educational Foundationの助成金を受けたものである。