

治癒効果の制御を目的とした骨のマイクロ加工面 における細胞の遊走能の評価

川崎 裕平¹⁾, 大谷 忠²⁾, 中井 毅尚³⁾, 内尾 祐司⁴⁾

¹⁾ 島根大学大学院総合理工学研究科 材料プロセス工学専攻

²⁾ 茨城大学教育学部 技術教育講座

³⁾ 島根大学総合理工学部 材料プロセス工学科

⁴⁾ 島根大学医学部 整形外科

Evaluation for Cell Migration on Micro-processing Surface due to Controlling Regenerative Effect

Yuhei KAWASAKI¹⁾, Tadashi OHTANI²⁾, Takahisa NAKAI³⁾ and Yuji UCHIO⁴⁾

¹⁾ Master Course of Natural Resource Process Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Shimane University

²⁾ Department of Technology, The College of Education, Ibaraki University

³⁾ Department of Natural Resource Process Engineering, Faculty of Science and Engineering, Shimane University

⁴⁾ Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Shimane University

Abstract

This paper describes the results that evaluated the cell migration on micro-processing surface due to controlling the regeneration effect. The investigated results prior to the evaluation for cell migration showed that the medical processing was categorized on the four mechanisms in terms of engineering. The four mechanisms were consisted of the crack transmission, the cutting with positive angle, the sanding with negative angle, and the heat-treatment. The cell migration on various micro-processing surface with above mechanism was evaluated that the migratory distance increased straightly on the groove with tip cutting and bonded abrasion, whereas the migration progressed to the indefinite direction on the groove with loose abrasion and crack. The cell migration along the groove with micro-processing was also affected by the depth of groove.

Key Word: Bone, Micro-processing, Cell Migration, Cell Culture, Regenerative Effect

1. はじめに

1.1 骨折治療の問題点

一般的な骨折治療の手術では、金属材料であるチタン製やステンレス製のスクリューを用いて折れた骨を固定する。しかし、骨にスクリューを埋め込んだ際のわずかな金属の突出によって健康な骨の一部を破壊したり、金属周囲に応力が集中して治療箇所が再び骨折する場合がある。このような問題を回避するため、骨の癒合後は再び手術を行い金属スクリューを取り出すが、金属に頼って固定されて

いた弱い骨が再骨折することもある。また、生体吸収材料で作られた物に吸収ピンがある。一般的には、吸収ピンは加水分解され体内に吸収されると言われているが、実際に吸収されるのは一部分であり、分解産物が炎症反応を起す場合もある。10代で吸収材料を使った手術を受けたが、術後経過5年後も吸収ピンの残留が確認され、固定した骨が脱落した報告もある。さらに、金属製スクリューと吸収性スクリューに共通した問題は、高価な材料を多数準備しなければならないことで、一般的な手術で100本のスクリューを準備する。使用頻度が低いスクリューは市販されて

おらず、最適でない市販品を使用する場合もあり、必ずしも患者にとって最適な治療が行われているとは言い難い事実もある。そこで、本研究の課題は、周囲と完全に適合し骨再生を促す骨折手術用スクリューを開発することであると同時に、個々の骨折にあわせたテーラーメイドのスクリューを提供することである。生体と共生し組織再生を促すインプラント、患者個人に合わせたテーラーメイドのインプラントによって安心して安全な医療を提供することが目的である。

1.2 本研究の目的

人体のひざ等が骨折した際、折れた骨や剥がれた骨を固定するために、ピンやスクリューを用いて治療を行う場合がある。これらの治療部品は金属やプラスチック製であるため、長期に渡って体内に残存し、体内になんらかの悪影響を及ぼす恐れがある。これに対して、骨はリモデリングの作用によって、再生を促す細胞が働き、組織を再生する特徴を有している。このようなリモデリングの作用を利用して、骨自身を治療用のスクリュー部品〔右図(a)参照〕として用いる試みが成功しつつある。以上のような、骨同士の接触が想定される部分では、スクリューの形状に加工した表面の状態が異なることにより、その後のリモデリングの作用に影響を与える可能性がある。一般的な骨折の治療は、損傷した部分を人工関節等に取り替えることによって、修復する方法が従来から用いられてきた。このような治療にはチタン等の人工関節が用いられるため、チタン加工面における細胞の初期付着を調べた研究や細胞遊走におけるピット穴の影響を調べた結果等が報告されている^{1,2)}。ところが、上述したような骨同士の接触を想定した場合や治療効果の制御を目的とした骨のマイクロ加工について検討した報告はほとんどない。

そこで本研究では、骨のマイクロ加工に伴う組織の再生能力に関する基礎的研究を行うため、医学的な骨加工を工学的な観点から検討し、モデル加工面の導出を試みた。さらに、骨のモデル加工面における細胞培養を行い、治療効果の制御を目的とした基礎的知見を得るため、骨表面の細胞の遊走能について検討した。

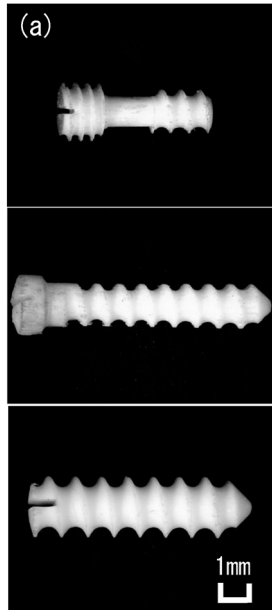


図1 試作した骨スクリュー

ける組織の影響を考慮して、常に接線方向に対して平行な断面が細胞遊走面になるように試験片を抽出した。モデル加工面の導出に用いる試験片は図2(b)に示す10(長さ)×5.0(幅)×5.0mm(厚さ)の寸法で作製し、半径方向に試験片を種々の方法により加工した。細胞培養実験に用いる試験片は図2(c)に示す10(長さ)×10(幅)×2.0mm(厚さ)の寸法に加工し、接線方向断面において細胞培養実験を行った。

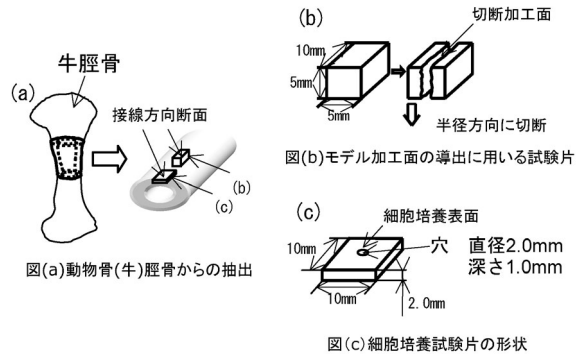


図2 供試材および試験片の形状

整形外科的な治療では、ステンレス製の機具を用いて、損傷部の骨加工を行う場合が多い。このような加工においては、専用の特殊な医療用機具が用いられる場合もあり、医学的な手加工や機械加工が行われる。そこで、本実験に供する加工面は、医学的な骨加工を工学的な加工学の観点から検討し、加工の機構による違いを基準にして、加工方法を分類し、細胞培養に供する加工面を決定した。

2.2 細胞培養実験と遊走能の評価

骨加工面における細胞遊走の様子を観察するため、細胞の増殖から遊走に至る条件を一定にするため、試験片の接線断面中央部に図2(c)に示す直径が2.0mm、深さ1.0mmの穴をドリル加工した。培養細胞は、表1に示す条件でマウスの骨芽細胞様細胞を用いて、図3に示すようにガス滅菌した試験片をシャーレに置き、培地を少量入れて試験片を含浸させた。さらに、試験片を取り出し、中央の穴に 2.5×10^4 個/ $2 \mu\text{l}$ の細胞を播種し、温度が 37°C で5% CO_2 のインキュベーター内の雰囲気中に試験片を入れ、細胞を培養した。骨表面に現れた細胞は、アクリジンオレンジで染色することによって、蛍光色に分離し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

加工面における細胞遊走の評価は、蛍光顕微鏡写真における蛍光色と背景を白黒の画像に二値化処理した結果を基に行った。得られた二値化画像から、画像解析ソフト(Quick Grain Standard)を用いて、試験片中央部からの遊走距離を評価した。また、粗さ試験には粗さ計を用いた。

表1 細胞培養実験の条件

細胞	MC3T3-E1(マウス骨芽細胞様細胞)
細胞の濃度	2.5×10^4 個/ $2 \mu\text{l}$
インキュベーター内の条件	温度 37°C 雰囲気 5% CO_2
細胞の染色液	アクリジンオレンジ

2. 実験の方法

2.1 材料と加工の方法

供試材には、人骨に類似した動物骨である、図2(a)に示す牛脛骨の皮質骨を用いた。骨材はオステオンの層が軸方向に配列するため、細胞が遊走する表面の組織は異方性を有する。そこで、本実験では、加工および細胞遊走にお

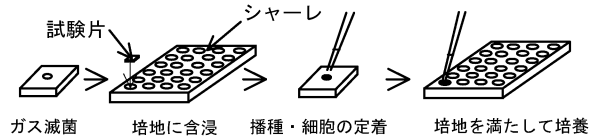


図3 細胞培養の手順

3. 結果および考察

3.1 医学的な骨加工の特性

一般的に医学的な骨加工に用いられる医療器具は、ノミ、リウエル鉗子、手鋸、振動鋸、糸鋸、ティーソウ、ヤスリ、スチールバー、ダイヤモンドバーおよびレーザー機器を取り上げた。これらの医療器具の刃先端部を観察した結果、図4に示すように、ノミ、リウエル鉗子、およびスチールバーは刃先が平らな形状、手鋸、振動鋸は連続的で鋭利な切れ刃の形状、糸鋸やティーソウはスパイラルしたなめらかな切れ刃が連続している形状、ヤスリやダイヤモンドバーは砥粒や細かい硬質の突起を持つ形状、レーザー機器はレーザーを照射するための管が観察できた。これらの器具の加工法の特徴は、リウエル鉗子のように材料を挟んでむしり取るような加工や、レーザー機器のように熱処理を行なう糸鋸やティーソウを用いた自由な曲線の加工、スチールバ

ーやダイヤモンドバーのように材料を削り取る加工や、ノミを用いた割裂加工等のように、一般的な加工に類似した機器が用いられていた。加工を行った骨表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行った結果、図5(A) (B) (J)に示すように割裂を誘発する加工や骨の表面に熱処理を行った加工表面で骨組織が観察できたのに対して、図5(C) ~ (I)に示すように切削および研削加工を行った加工表面では骨組織が押し潰され、加工方向に応じた軌跡が残ることがわかった。また、粗さ試験の結果においては、図6に示すように、ノミやリウエル鉗子およびレーザー機器で加工を行った表面の粗さは $20\mu\text{m}$ を超える値を示したのに対して、切削および研削加工を行った表面の粗さは $5\sim 10\mu\text{m}$ 程度またはそれ以下の値を示した。さらに、切断方向と測定方向の関係については、切断方向に対して垂直方向 (図6中●) に測定した粗さよりも平行方向 (図6中○) に測定した粗さの方が高い値を示すことがわかった。これらの加工方法について工学的な観点から、以下の4つの加工機構に分類できることがわかった。

- (1) き裂の伝播が成長した割裂機構
- (2) 正のすくい角による切削機構
- (3) 負のすくい角による研削機構
- (4) 熱処理による溶融機構

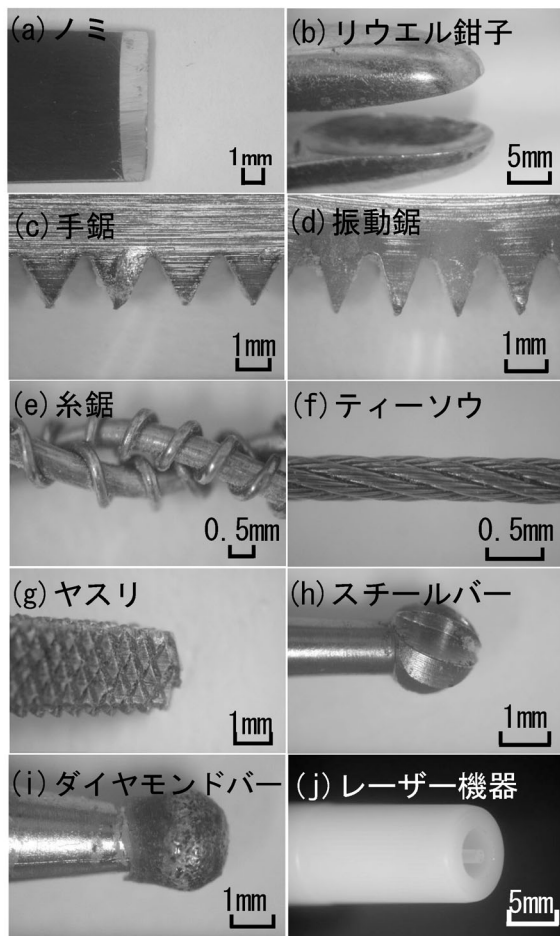


図4 医療器具切れ刃先端写真

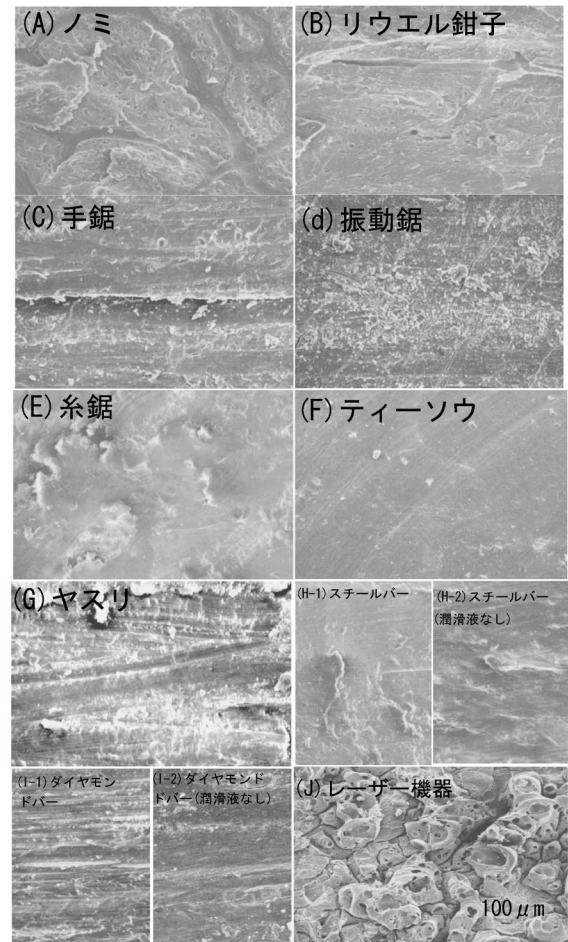


図5 骨切断加工面 SEM 写真

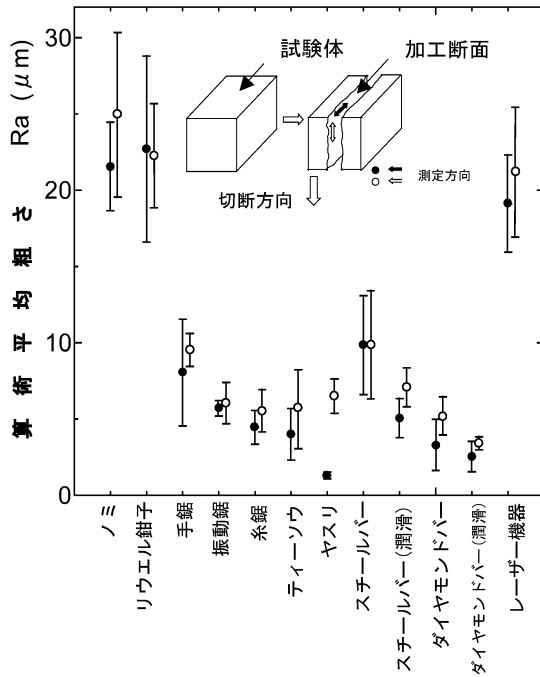


図6 骨切断加工面における算術平均粗さ

3.2 モデル加工面の導出

以上の加工機構を参考にして、本実験では切削加工、固定および遊離砥粒による研削加工、および割裂加工を施したモデル加工面において、細胞の遊走を評価した。表2にモデル加工面の加工条件を示す。本実験ではこれらのうちの機械加工と割裂加工をモデル加工面の導出に用いた。図7は本実験に用いた試験片における加工面の様子を示す。これらの加工面は、切削加工では図7(a), (b)のように、工具切れ刃によって削り取られた断面は、交錯せずに通直な軌跡が現れた。これに対して、固定砥粒による加工面では、図7(c), (d)のように、切れ刃の軌跡は切削加工の場合と同様に通直であるが、それらの軌跡は交錯した。遊離砥粒による加工面では、図7(e), (f)のように、方向性を持たない切れ刃の軌跡が任意の方向に混ざり合う特徴を有していた。さらに、割裂加工面では、図7(g)のように、骨組織が破壊によって形成された大きな凹凸の断面上に認められた。

3.3 細胞培養実験における評価

図7における試験片を用いて、細胞培養実験を行った結果、図8に切削加工面(t=100μm)を一例にあげて示すように、いずれの加工面においても中央の穴から増殖した細胞が、遊走する様子が認められた。そこで、得られた蛍光顕微鏡による観察結果をもとに、細胞の遊走能を詳細に調べるため、図9に示すように試験片表面を放射状に8つのエリアに分割し、各エリアにおける細胞の遊走距離を評価した。試験片表面をXおよびY座標軸で評価した結果においては、図10に示す切削加工面では、エリアA, D, E, HにおいてY軸方向に著しく細胞が遊走する傾向が認められた。さらに、切れ刃の軌跡の溝の深さが大きいものはより顕著にY方向へ遊走することがわかった。また、固定砥粒によ

る加工面(#80)の結果においては、エリアA, D, E, HにおいてY軸方向への遊走距離は小さいものの、切削加工と同様のY方向へ遊走する傾向が認められた。さらに、こちらも切削加工と同様に、切れ刃の軌跡の溝の深さが大きいものはより顕著にY方向へ遊走することがわかった。また、遊離砥粒加工面(#80)や割裂加工面では中央部から任意の方向に突出した遊走が認められるものの、同心円状に近い形で細胞の遊走が認められた。

表2 モデル加工面の加工条件

Property of processing	Processing method of model surface	Processing condition
		D=Depth of cutting d=mean abrasive grain size
Cutting	Tip cutting	D=100(μm)
		D=20(μm)
Grinding	Bonded abrasive	d=180μm(#80)
		d=40μm(#400)
	Loose abrasive	d=180μm(#80)
		d=40μm(#400)
Cracking	Chisel cracking	—

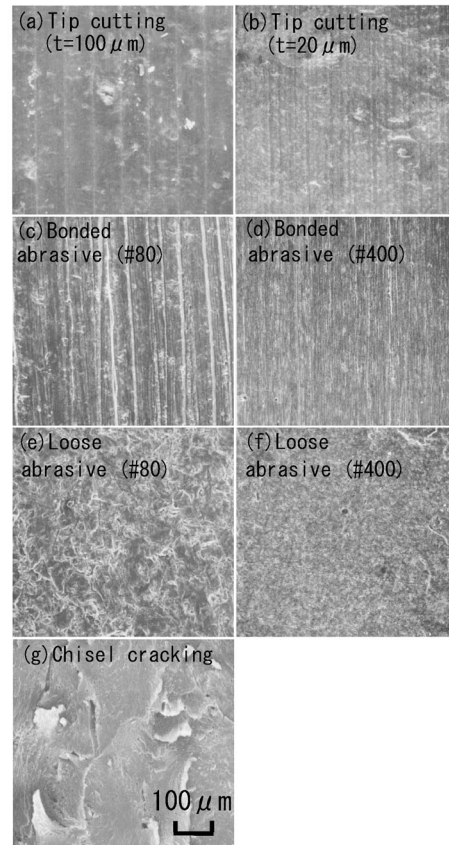


図7 モデル加工面のSEM写真

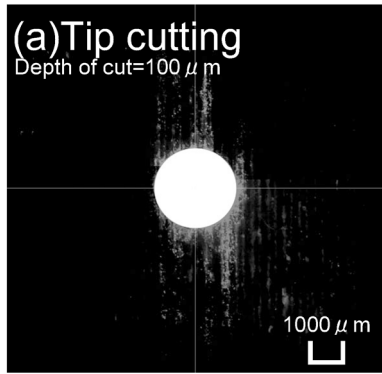


図8 細胞の蛍光顕微鏡観察写真
切削加工面 (t=100 μm)

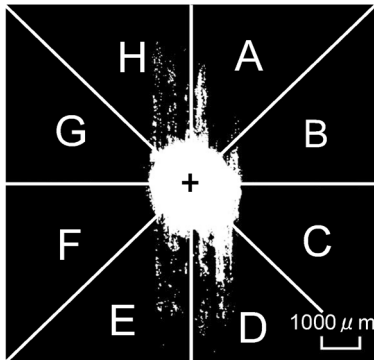


図9 二値化处理およびエリア分割画像
切削加工面 (t=100 μm)

以上の結果を受けて、縦軸に Y 方向、横軸に X 方向への遊走距離を評価し細胞の遊走パターンを整理した結果、図 11 に示すように以下の 3 つのパターンに分類できた。グラフの破線で示した対角線は Y 方向にも X 方向にも同じ距離進んだことを表し、すなわち同心円状に細胞の遊走が広がったことを示す。切削加工においては、傾きが大きく Y 方向への遊走が大きいものと、対角線上に分布することが認められた。それに比べて固定砥粒加工においては、切削加工に比べて傾きは小さく、Y 方向への遊走が認められるものの、その距離は小さくなった。また、遊離砥粒加工および割裂加工においては、対角線から対照的に全体に広がる形で分布するような任意の方向に偏って遊走することが認められた。

- ① 切削加工のように、細胞が Y 方向に著しく遊走するパターン
- ② 固定砥粒加工のように、細胞が Y 方向にやや緩やかに遊走するパターン
- ③ 遊離砥粒加工や割裂加工のように細胞が任意の方向に偏って遊走するパターン

これらのことより細胞の遊走の仕方の違いには、骨表面の形状が関与していると考え、次に表面粗さと遊走距離の関係を調べた。縦軸に X 方向への遊走距離、横軸に X 方向への最大高さ R_z の値を取り評価したものを図 12 に示す。ここで X 方向への表面粗さというのは、Y 方向に工具を移

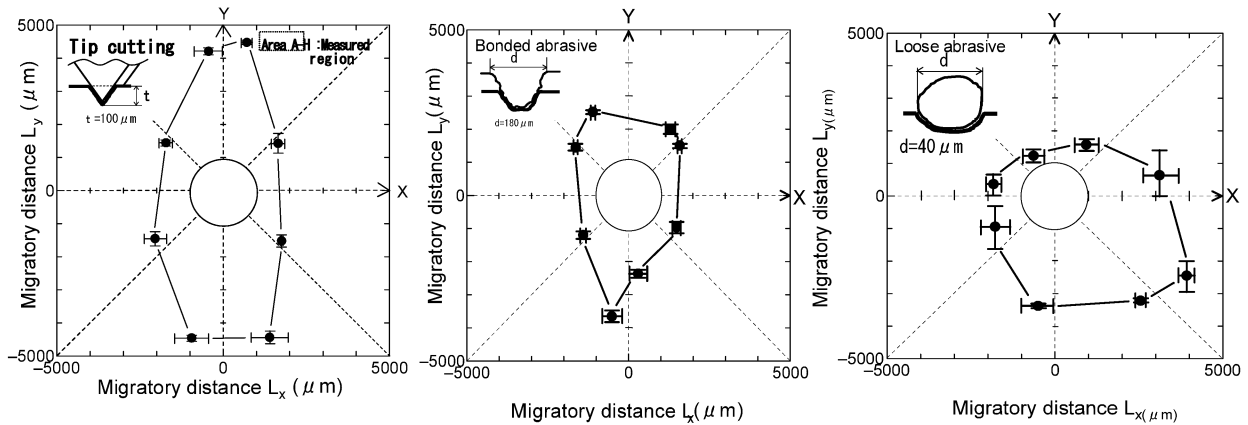


図10 遊走距離の測定結果のグラフ

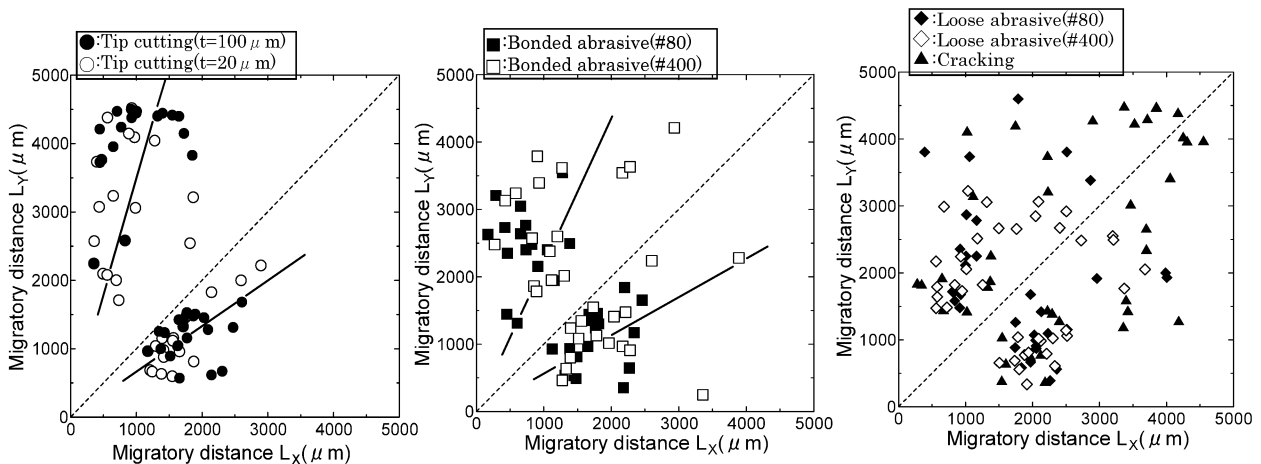


図11 モデル加工面における細胞遊走の分類

動させて付いた工具切れ刃の軌跡に対して、粗さ計の触針を軌跡に対して垂直方向に走らせて測定したものとする。X 方向への粗さが大きかった切削加工では、最大高さが $120\ \mu\text{m}$ 前後の時に細胞の遊走距離は $2000\ \mu\text{m}$ であったのに対して、最大高さ $20\ \mu\text{m}$ 前後から粗さが小さくなるにつれて遊走距離が大きくなり、X 方向への細胞の遊走は表面粗さの影響を受けて制御される可能性があることがわかった。さらに割裂加工のような破壊により骨組織が剥き出しの表面(図中▲印)では、機械加工に見られるような遊走とは違った傾向を示す可能性があることがわかった。

参考文献

- 1) H. Itahashi, T. Miyazaki, S. Fujimori, W. Lee "Early Cellular Responses of Osteoblast-like Cells in vitro on Titanium Surface with Different Micromorphologies" Dental Materials Journal Vol.14, No.1, (1995), 136-141
- 2) O. Zinger, K. Anselme, A. Denzer, P. Habersetzter, M. Wieland, J. Jeanfils, P. Hardouin, D. Lan dolt "Time-dependent morphology and adhesion osteoblastic cells on titanium model surface featuring scale-resolved topography" Biomaterials 25, (2004) 2695-2711

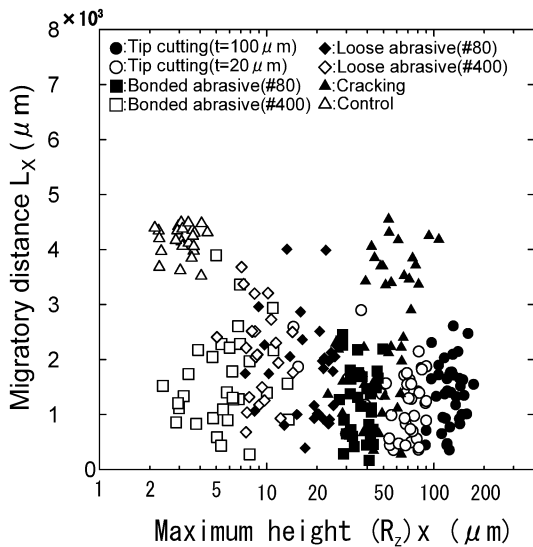


図12 表面粗さと細胞の遊走距離の関係

4. まとめ

医学的な骨加工を工学的に分類し、種々のモデル加工面において細胞培養実験を行った後、中央の穴から増殖した細胞の遊走距離と加工面の粗さを評価した結果、以下の結論を得た。

- (1) 医療現場で用いる骨加工法は工学的な観点から分類すると切削、研削、割裂、熔融の4つの加工機構に分類できる。
- (2) 骨加工面における細胞の遊走は以下のパターンに分類できた。
 - ①細胞がY方向に著しく遊走(切削加工)
 - ②細胞がY方向にやや緩やかに遊走(固定砥粒)
 - ③細胞が任意の方向に偏って遊走(遊離砥粒、割裂)
- (3) 骨加工面における細胞の遊走は、表面を機械的に加工するような場合には、その凹凸の深さや形状が関係していることがわかった。

本研究は、島根大学重点研究プロジェクト医農工連携分野で行った研究の成果である。