

機能性生体材料の開発に関する研究 — 材料表面の親水性・疎水性と細胞増殖 —

Study on development of the functional biomaterials
Cell growth on the material surface with hydrophilic/hydrophobic groups

倉田茂昭, 森下久美子, 松澤光洋¹, 二瓶智太郎², 大橋 桂², 寺中敏夫²
神奈川県立歯科大学 生体材料器械学, 小児歯科学¹, 保存修復²

S. KURATA, K. MORISHITA, M. MATSUZAWA¹, T. NIHEI²,
K. OHASHI², T. TERANAKA²

Department of Biomaterials and Devices, Kanagawa dental college

¹Department of Pediatric Dentistry, Kanagawa dental college

²Department of Oral Medicine, Kanagawa dental college

要 旨

インプラントの上部構造体に対する上皮細胞の結合を促すための処理剤 (Cyto-inducible coupling agents) の開発を目的とし, 材料表面の親水性・疎水性のバランスとその表面における細胞増殖性について検討した。材料であるカバーガラスを様々なシランカップリング剤で処理し, 材料表面の親・疎水性を変え, ガラス面上で線維芽細胞を培養した。その結果, 処理したガラス面の細胞増殖は, シランのアルキル基として, 親水性の基より疎水性の基をもつ方が細胞増殖は高かった。親水性基をもつ N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシランでは, ほとんどの細胞が死滅した。

キーワード：細胞接着性, 表面性状, 親水性, 疎水性, シランカップリング剤

Abstract

The purpose of this study was to develop the coupling agents (Cyto-inducible coupling agents) to induce the growth of human fibroblasts, and the relationship between hydrophobic/hydrophilic balance of the glass surface treated with various silane coupling agents and the growth of the fibroblast on the surface was examined. The growth of the fibroblast on the surface treated with the silane with hydrophobic group was higher than that of the silane with hydrophilic group. On the surface treated with N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane, the fibroblasts almost died.

Keywords: Cell adhesion, Surface property, Hydrophilicity, Hydrophobicity, Silane coupling agent

緒 言

顎骨に挿入されたインプラント材は骨組織とオッセオインテグレーション¹⁾するが、咀嚼による過度の咬合力が加わると歯槽骨の吸収が生じて、インプラントと骨組織との接合が緩むようになる。天然歯には歯根膜が存在し、歯根のセメント質と歯槽骨とを結合させ咬合力を緩衝する働きを担っている。そのためインプラント表面にコラーゲンなどの化合物を処理して歯根膜の再生を促したり、GBRのような骨組織再生も行われている。また、骨とオッセオインテグレーションしたインプラント体においても、インプラントの上部構造体は上皮との結合はなく、口腔に入る外来物質による汚染に常に曝されている。天然歯では上皮が付着上皮を介してセメント質と結合しており、生体内外を隔てている。上部構造体の表面と上皮細胞との結合が形成されるとより天然歯に近づくと考えられる。一方、歯周病の治療ではGTRのように遮蔽膜を設け歯根膜組織の再生治療が行われている。インプラント材や歯周病治療における天然歯根の歯根膜組織を速やかに再生するには、歯根膜線維芽細胞をそれらの面に速やかに誘導することが望ましい。このように歯根や様々な材料表面における各種細胞の誘導や増殖に対する要求がある。研究者らは、インプラントの上部構造体と上皮細胞との結合を促すような処理化合物(Cyto-inducible coupling agents)の開発を目的とし²⁾、歯肉線維芽細胞を誘導するような化合物の検索、あるいは誘導を惹起させる材料表面の化学的構造を見出すために基礎的実験を計画した。本実験では材料表面の親水性・疎水性のバランスとその表面における細胞増殖性について検討した。

材料および方法

1. 接触角の測定

接触角測定器(CA-D型, 協和界面科学)を用い静滴法により行った。なお、表面自由エネルギー

を求めるために標準化合物として、水、 α -プロモナフタレン、そして二ヨウ素化メチレンを用い、得られた値から拡張ホークスの式より、表面自由エネルギーを算出した。測定物は、各種シラン処理ガラス面、ならびに市販のファルコン(日本BD)およびスミロン(住友ベークライト)の100mmディッシュ内側と蓋の内側、歯周組織から線維芽細胞を誘導するときに使われるプラスチックシート(23mm ϕ , 和光純薬)、さらに細胞を培養後、トリプシンで細胞を剥がした面である。

2. 細胞培養実験容器の作製

色々な表面処理をした面上で細胞を培養するために実験容器を作製した(Fig.1)。安価で、多数の試料が取り扱いでき、表面処理反応が容易な材料としてガラス板を選んだ。ガラス板は直径15mm、厚さ0.15mmの円板状の細胞生育用丸形カバーガラス(フィッシャーサイエンス社製)を用い、24穴プレート中に接着材で固定した。硬化後、カルチャープレートをアルコールで消毒後、乾燥し細胞培養実験に用いた。作製した容器で写真撮影の容易さや細胞培養の適正などを検討した。用いた接着材の名称と主成分をTable 1に示す。

このガラス板状で細胞を培養し、培養した細胞を生きたまま顕微鏡観察するために、Fig. 1のような容器を作製した。

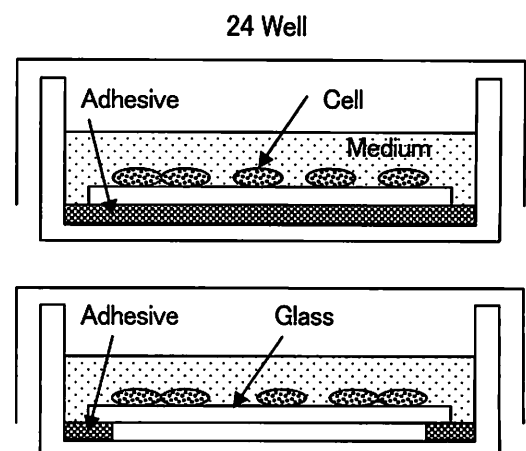


Fig.1 The glass fixed with adhesive in the well.

3. シランおよび処理

ガラス表面の親水性／疎水性を変えるために、Table 2に示したシランカップリング剤で処理した。処理溶液は、アルコキシシランでは溶媒にエタノール、クロロシランではヘキサンを用い、各シランの 1×10^{-2} mol/L を調製した。なお、アルコキシシラン処理溶液の場合、アルコキシ基の反応性を高めるために、処理寸前に処理溶液 5 mL に対し、酢酸を 0.5 mL 加えた。カバーガラスを各シラン処理溶液に 10 分間浸し処理した。次にテフロン製ピンセットでガラスを取り出し、ろ紙上にガラスを立て過剰の溶液を吸い取り、120°C、5 分間乾燥器中で加熱した。

4. 細胞培養

歯肉繊維芽細胞の調製は川瀬ら³⁾の方法により行った。すなわち、外科治療のために抜歯された歯牙を患者さんの同意を得て使用し、歯牙に付着している歯肉を小さくカットし、24 穴カルチャープレート中に入れ、上述のプラスチックシートで覆い、培地を加え、37°C、5%CO₂ - 95%Air 中、湿度 95% 以上でプレカルチャーした。24 穴カルチャープレー

ト中に種々の処理をしたガラス板を固定し、増殖した線維芽細胞 (35 × 10³ 個/ml) を含む培地 1 ml を添加し、37°C、5%CO₂ - 95%Air 中、湿度 95% 以上で 3 日間培養した。細胞の増殖は Puzas らの方法により⁴⁾、DNA を定量し求めた。

結果および考察

材料の化学的構造と材料表面上の細胞増殖との関係について、たとえば、本実験で使用したファルコン 100mm ディッシュの組織培養の容器の素材はポリスチレンである。その表面はプラズマなどを用いた酸化処理、コラーゲンやポリリシンでの表面処理などが施されている。明らかに材料表面の化学的構造、あるいは元素組成の分布と細胞の増殖とは強い関係があると考えられる。細胞を材料表面上で育成させるためには、材料表面の化学的構造、あるいはその局所的構造、表面粗さなどの外形的構造の要因を考慮する必要がある。本研究では、その手始めとして材料表面の化学的構造、すなわち材料表面の親水性と疎水性のバランスが細胞の育成にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

Table 1 Adhesive, the components, the manufacturer, and the code.

Adhesive	Component	Manufacturer	Code
High super 5	Epoxy resin, 2 paste type	Cemedine	HS5
Super X clear	Acrylic modification silicone resin.	Cemedine	SXC
Araldite	Epoxy resin, 2 paste type	Nichiban	ARA

Table 2 Silane coupling agents and the code.

Silane	Code
CF ₃ (CF ₂) ₅ -CH ₂ CH ₂ -Si(CH ₃) ₂ Cl	F13C
CF ₃ (CF ₂) ₅ -CH ₂ CH ₂ -Si(OC ₂ H ₅) ₃	F13
C ₈ H ₁₇ -Si(CH ₃) ₂ Cl	OCTC
H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH(CH ₂) ₃ -Si(OC ₂ H ₅) ₃	NAE
HO(CH ₂) ₃ -CONH-(CH ₂) ₃ -Si(OC ₂ H ₅) ₃	NHB
HOCH ₂ -[CH(OH)] ₄ -CONH-(CH ₂) ₃ -Si(OC ₂ H ₅) ₃	GLU

1. 市販ディッシュの表面自由エネルギー

市販ディッシュ容器の面、および細胞を培養した後、トリプシンで細胞を剥がした面、ならびに細胞培養に使われるプラスチックシートの三種の化合物の接触角と表面自由エネルギーを Fig.2 に示す。各材料の表面は、2つのグループに分かれた。一つは、表面自由エネルギー約 70mN/m をもつもので、ファルコンディッシュ内側 (F-I)、ファルコンの継代剥離した面 (F-C)、およびプラスチックシート (PS) である。他は、表面自由エネルギー約 60mN/m をもつもので、ファルコンディッシュ蓋側 (F-U)、スミロン蓋側 (S-U)、およびスミロン内側 (S-I) である。スミロンはディッシュの容器と蓋との間に、表面自由エネルギーの差は認められなかった。ファ

ルコンの容器内側の面 (F-I) や容器で細胞を培養し、トリプシンで細胞を剥離した面 (F-C) およびプラスチックシート面 (PS) は、ファルコンのディッシュの蓋の内側 (F-U) に比べ、表面自由エネルギーが低い。すなわち、水に対する接触角が低く、細胞培養のために親水処理が施されていると考えられる。表面自由エネルギーに比べ、水の接触角の差の方が大きいので、以後の実験では、水に対する接触角により親水性・疎水性を評価した。

2. 作製した細胞培養実験容器の操作性

ガラス板を 24 穴プレートのウェルに固定するに当たり、ガラス板の全面に接着材を塗布、あるいは周囲のみに塗布の 2 通りで行った (Fig.1)。用い

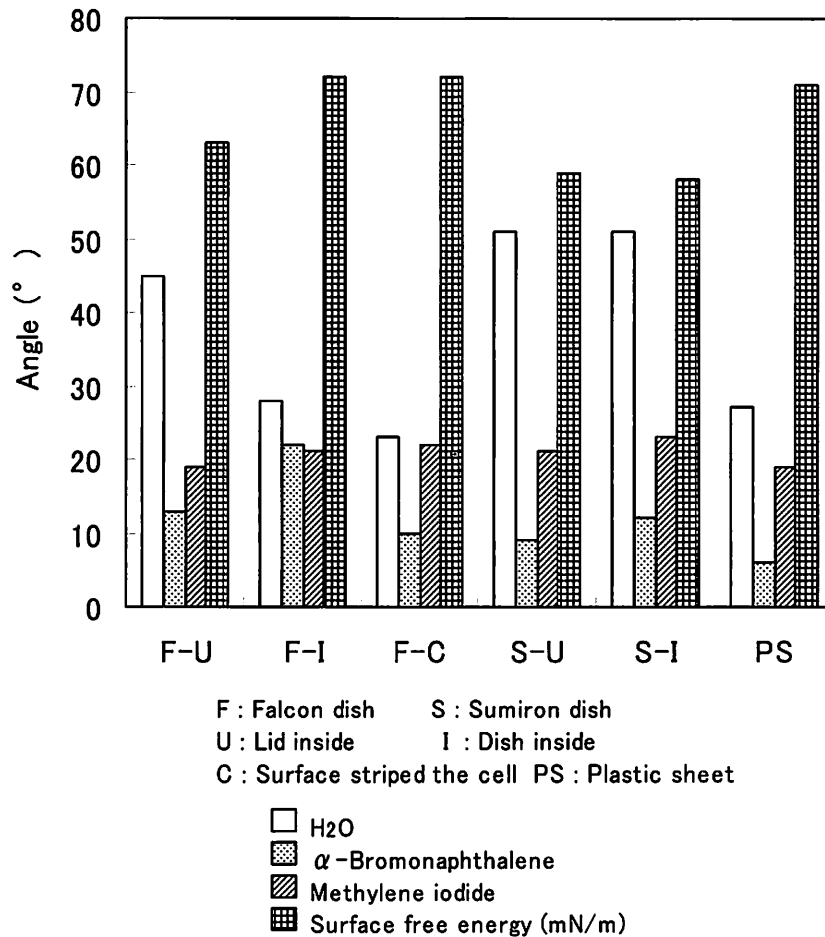


Fig.2 Contact angle and surface free energy of the surface of dish and plastic sheet.

た接着材、ガラス板を固定した接着材の透明性、ならびに細胞増殖の結果を Table 3 に示す。接着材ハイスーパー 5 は透明で写真撮影は可能であったが、細胞増殖はアラルダイトに比べ劣った。スーパー X クリア接着材は、薄く濁っており写真撮影はできず、細胞は死滅した。アラルダイトは透明性に欠け写真撮影はできないが、細胞増殖は他の接着材に比べ良かった。

写真撮影が可能ないようにガラス板の底面の周囲のみに接着材を塗布しプレートに固定した (Under in Fig.1)。細胞増殖の結果を Table 4 に示す。写真撮影はすべて可能であった。スーパー X クリアでは、上述と同様に細胞がすべて死滅し、毒性が強いことが分かった。アラルダイトを用いた場合は、上述と同様に細胞増殖に問題は認められなかった。スーパー X クリアの成分は、アクリル変性シリコーン樹脂であり、無溶媒一液性の接着材である。接着材自体は高分子であり、水に容易に溶解しないと考えられることから、硬化触媒に細胞死滅の原因があると

思われる。一方、ハイスーパー 5 やアラルダイトの成分は、エポキシ樹脂系の 2 液型の接着材である。アクリル変性シリコーン樹脂系に比べ、エポキシ樹脂系の接着材の方が毒性が低いようだ。アラルダイトは硬化がやや遅いが、細胞培養には問題がなかった。以後の実験では、表面処理したガラス板の周囲をアラルダイトで固定し実験した。

3. シラン処理したガラス面の接触角と細胞増殖

疎水性および親水性のアルキル基をもつ各種シランで処理したガラス面の水に対する接触角、ならびにそのガラス表面上で培養した細胞量を Table 5 に示す。接触角は疎水性のフルオロアルキル基をもつ F13 と F13C が最も大きく、それぞれ 105 および 100 度となった。次に疎水性のオクチル基をもつ OCT の 91 度であった。それらのシランに比べて親水性のアミノ基や水酸基をもつ NAE, NHB および GLU の接触角は小さく、それぞれ 55, 44, および 7 度となった。

Table 3 Adhesive, the aspect in applying adhesive, the condition of the photographing, and the life-and-death of the cell.

Adhesive	Aspect after the adhesion *1	The condition of the photographing	Life-and-death of the cell
HS5	Transparent	○	○
SXC	Cloudy	×	×
ARA	Very cloudy	×	○

*1: Adhesive was applied in the full face of glass plate.

Table 4 Adhesive and the life-and-death of the cell.

Adhesive *1	Life-and-death of the cell
HS5	○
SXC	×
ARA	○

*1: Adhesive was applied in the circumference of glass plate.

Table 5 Contact angle of glass plate treated with silane and cell viability on the surface.

Silane	Contact angle for water (°)	Cell viability*1 (%)
Well surface	28	100
Glass surface	19	80
F13C	100	70
F13	105	80
OCTC	91	50
NAE	55	0
NHB	44	0
GLU	7	0

*1: Ratio when that on well surface is set to 100.

細胞増殖は、ガラスを固定しないウエル面が最も細胞増殖が良く、次に未処理ガラスおよびF13処理面であった。オクチル基をもつシランで処理したガラス面上での細胞増殖は、ウエル面と比較し約半分の50%であった。疎水性の高い官能基をもつF13およびF13C処理の場合、ウエルの増殖に比べ劣るものの細胞は生育した。一方、親水性の基をもつNAE,AHBおよびGLUでは、細胞はすべて死滅した。細胞増殖には必ずしも親水性の高い表面が良いわけではなく、疎水性の基をもつ方が高いことが分かった。

4. 親水性/疎水性のバランスを変えたガラス面の接触角と細胞増殖

疎水性のフルオロアルキル基をもつF13と水酸基を多数もつ親水性のGLUを任意の割合で混合し処理し、ガラス面上の疎水性/親水性のバランスを変えた。処理ガラス面の水に対する接触角とその面上で培養した細胞増殖の結果をFig.3に示す。なお、Fig.3中にはウエルおよび未処理ガラス表面の接触角と細胞増殖の結果を合わせて示した。接触角が20～50度のとき、細胞の増殖が良く、材料表面の親水性・疎水性のバランスには最適な値があるようだ。疎水性基としてフルオロアルキル基だけでなく炭化水素のみからなるアルキル基や親水性基として

の水酸基の数を変え検討する必要があるだろう。

処理剤および処理層の分子構造と細胞増殖について考えてみる。フルオロアルキル基をもつF13やF13Cにより形成される処理層は、同じフルオロ基をもつテフロン表面とは異なる。テフロンはPoly(tetrafluoroethylene)からなる高分子で、その表面はフッ素原子に覆われており、他の官能基はほとんど表面にない。一方、F13やF13Cは、そのアルコキシ基やクロル基がガラス表面上で加水分解しシラノール(-Si-OH)を生じ、ガラス表面や自体のシラノールと縮合し、シロキサン結合(-Si-O-Si-)を形成する。しかしながら、一部未反応のシラノール基が残る。シラノール基やシロキサン結合は親水性の官能基であり、細胞サイズのレベルでは、フルオロアルキル基の疎水性とシラノール基やシロキサン結合の親水性基を認識し、細胞が増殖しているのかも知れない。接触角による水の液滴は、細胞レベルからすると巨大であり、表面のマクロ的な疎水性・親水性しか評価できない。今後の課題である。NAEやNHBの接触角は、約50度で細胞生育には適していると考えられるが、細胞はすべて死滅したことから、アミノ基は細胞の生育を阻害すると思われる。官能基の違いによる細胞への影響をさらに検討する必要がある。

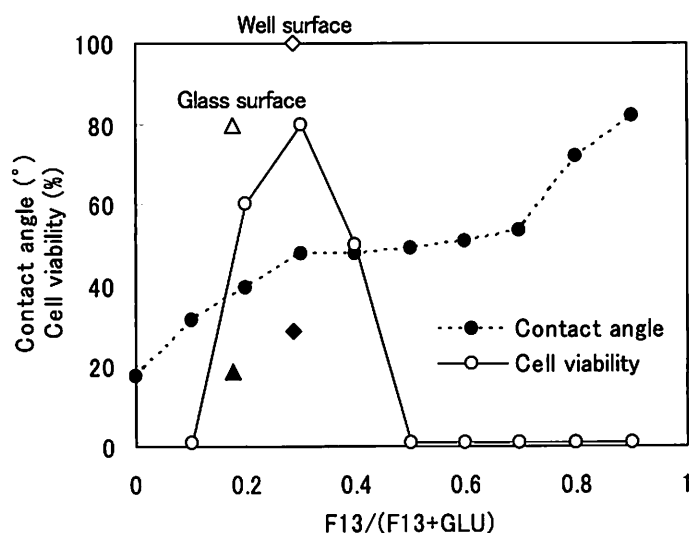


Fig.3 Contact angle for water and cell viability on the glass treated with silane mixture.
Opened symbol : cell viability. Closed symbol: Contact angle.

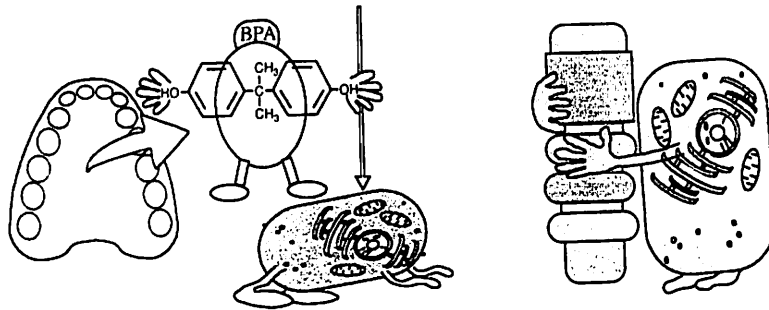


Fig.4 Biocompatibility

まとめ

インプラントに歯根膜を付与、あるいはインプラントの上部構造と上皮との結合ができないかという思いから、その手始めとして材料表面の親水性・疎水性のバランスと細胞増殖との関係を検討した。材料表面の親水性・疎水性のバランスによる違い、あるいは官能基の違いにより、細胞増殖は大きく影響されることが分かった。材料表面の親水性・疎水性の評価については、従来の液滴による評価でなく、ミクロ的に評価する方法を見出す必要があった。たとえば、トンネル顕微鏡を用いた物理化学的な方法などが考えられる。今後の課題としては、疎水性・親水性シランの種類を系統的に変えたり、シラン以外の化合物による処理の研究も必要であろう。本研究はまだ入り口であり、さらに基礎的な研究を踏まえることにより、様々な材料表面への細胞接着が可能となり、優れた生体適合性をもつ材料が得られることを期待する (Fig4)。

文献

- 1) Hansson HA, Albrektsson T, Branemark PI. Structural aspects of interface between tissue and titanium implants. *J Prosthet Dent*, 50, 108-113, 1983.
- 2) 倉田茂昭, 松澤光洋, 二瓶智太郎ほか. 機能性生体材料の開発に関する基礎的研究 材料表面の親水性・疎水性と細胞増殖. *歯科材料・器械*, 20(Special Issue 37), 132, 2001.
- 3) Kawase T, Sato S, Yamada M, Hirayama A, Miake K, Saito S. Human periodontal ligament cells in vitro: Characterization of alkaline phosphate. *J Bone Mineral Res*, Suppl. 1, 63A, 1, 1986.
- 4) Puzas JE, Goodman DBP. A rapid assay for cellular deoxyribonucleic acid. *Anal Biochem*, 86, 50-55, 1978.