

粗造なチタン表面性状が骨芽細胞の増殖と分化に 及ぼす影響に関する細胞生物学的研究

正 木 千 尋

A Cellular Biological Study on the Effect of Rough Surface Properties of Titanium on Proliferation, Differentiation of Osteoblasts

Chihiro Masaki

(平成15年1月20日受付)

緒 言

インプラント材料の表面特性はその化学的性質、物理的性質および表面コーティング等が骨芽細胞の接着、増殖および分化に影響を及ぼすことから、インプラントの生体親和性にきわめて密接な関連性をもっている¹⁻⁵⁾。このような中であって、きわめて安定した不働態膜をもち、耐腐食性に優れた純チタンやチタン合金はインプラント材料の第一選択肢であると認識されている⁶⁻⁹⁾。これらの純チタンやチタン合金を用いるインプラントはオッセオインテグレーションと呼ばれる骨内支持構造を獲得でき、このことが長期にわたるインプラントの成功に必須の条件であるといわれている¹⁰⁻¹⁶⁾。しかしながら、最近ではより早期のより確実なオッセオインテグレーションを獲得するため、チタン表面を改質し粗造にする試みが注目を集め、現在では酸エッチング処理^{1,17)}、電解研磨処理^{18,19)}、陽極酸化処理^{20,21)}、プラスト処理^{1,17,22,23)}、プラズマスプレー処理²⁴⁻²⁷⁾などが行われている。

これらの表面の粗造性がオッセオインテグレーションに有用だとする見解は、*in vitro*において、表面が粗造になるほど collagen 新生量¹⁾ や PGE_2 および $\text{TGF-}\beta$ 産生量²⁵⁾ が有意に多くなること、 $1\alpha,25(\text{OH})_2$ ビタミン D_3 に対する骨芽細胞様細胞の応答が高まり特に osteocalcin 合成と ALP 活性の増加を促進させること²⁶⁾

などにより説明されている。また、*in vivo* の研究においても、表面が粗造になるに従いチタンインプラントの除去トルクが増加する^{28,29)}、あるいは機械研磨と比較して表面が粗造なチタンインプラントは高い骨接触率を示すこと^{22,23,30-32)} などが知られ、表面が粗造なチタンインプラントはオッセオインテグレーションを獲得する上で有利であると考えられる。しかしながら一方で、粗造な純チタン表面では滑沢な表面よりも骨芽細胞の増殖が抑制され ALP 活性も低いこと²⁴⁾ や、粗造な表面では骨芽細胞様細胞の接着細胞数が減少すること³³⁾ なども報告されており、これらの所見からはチタン表面を粗造にすることは否定的である。このように、粗造な表面がオッセオインテグレーションに与える影響に関しては科学的根拠に基づいた見解の一致はなく、コンセンサスは得られていないのが現状である。この原因として、*in vitro* の報告で用いた細胞の種類あるいはインプラント材料表面の粗さや化学的性質の違いなどが挙げられる。そこで、粗造な表面の影響について明らかにするためには、細胞外情報を細胞内へ伝達し細胞の活性化や分化などを誘導する³⁴⁾ 細胞接着を検討する必要があると考えられる。

細胞接着は接着分子の観点から細胞と細胞外基質との接着あるいは細胞同士の接着に大別される。骨芽細胞における細胞と細胞外基質との接着には integrin が関与し、integrin の $\alpha 2\beta 1$ を介する骨基質との接着は骨芽細胞の分化を誘導しようといわれている³⁵⁾。しかしながら、粗造な表面と滑沢な表面との間では integrin の $\beta 3$ サブユニットの発現量がわずかに違うだけで $\alpha 2, 3, 5$ および $\beta 1$ サブユニットの発現量にはほとんど違いがない^{36,37)} ことから、粗造なチタン表面上での骨芽細胞

広島大学大学院歯学研究科歯学臨床系（歯科補綴学第一）専攻（指導：赤川安正教授）本論文の内容の一部は、平成13年12月の第24回日本分子生物学会年会および平成14年7月の第20回日本骨代謝学会学術大会において発表した。

の分化制御には integrin はほとんど関与していないと推察できる。一方、骨芽細胞における細胞同士の接着は connexin 43や45により構成される gap junction³⁸⁻⁴⁰⁾ と cadherin を介する adherens junction^{41,42)} が関与しているとされる。しかしながら、骨芽細胞の分化の観点からは、gap junction は主に分子量2,000以下の低分子やイオンを透過する働きを担うだけで骨芽細胞の分化に関与するとの報告はなく、もっぱら cadherin を介する情報伝達系が骨芽細胞の分化を制御している可能性が報告されている⁴³⁻⁴⁷⁾。そこで粗造なチタン表面上での骨芽細胞の分化制御にも cadherin が関与している可能性が考えられるが、この点についてもまったく明らかにされていない。

本研究では、チタン表面を粗造にする表面改質が初期のオッセオインテグレーションに有用か否かを明らかにすることを目的として、異なる表面処理を施し粗造にした純チタン上における骨芽細胞の増殖と分化、さらには cadherin の発現などについて細胞生物学的に検討し、加えて、粗造な表面に対する細胞接着分子のコーティングの影響についても同様の検索を加えた。

材料および方法

実験1 粗造なチタン表面性状が骨芽細胞の増殖および分化に及ぼす影響

I. 材料

細胞には頭頂骨由来のマウス正常骨芽細胞株 (MC3T3-E1, 理化学研究所) を用いた。同細胞の培養は、10% fetal calf serum, 90 mg/L ampicillin (明治製薬) および 90 mg/L kanamycin (明治製薬) を添加した alpha modification minimum essential medium (α -MEM, SIGMA) 中で、37°C, 5% CO₂ 条件下にて行った。同細胞を 2×10^5 cell/100 mm dish の濃度に調製して播種、その後3日毎に継代して用いた。

実験材料には表面の異なる3種類の純チタンとプラスチックを用いた。すなわち、チタンプラズマ処理を施した純チタン (JIS規格2種, GC研究所) (以下TR1と略す) とプラストエッチング処理を施した純チタン (JIS規格2種, GC研究所) (以下TR2と略す) を試験群とし、機械研磨した純チタン (JIS規格2種, GC研究所) (以下TSと略す) とプラスチック (住友ベークライト) (以下Pと略す) は対照群として用いた。これらの材料をディスク状 (直径15 mm, 厚さ1 mm) に成形し、試料とした。各チタン試料を Guyらの方法⁴⁸⁾ に準じ、トリクロロエチレンに浸漬して10分間超音波洗浄し、次いでエタノールにて10分間の超音波洗浄を3回繰り返すことで試料表面に付着した脂肪や蛋白を除去、その後、オートクレーブにより滅菌し

た。また、プラスチックはすでに滅菌してあるものを用いた。なお、試料の表面アラサは表面粗さ測定器 (SE-3300, 小坂研究所) を用いて中心線平均表面アラサ (Ra) を指標に測定し、さらに、試料表面を走査型電子顕微鏡 (JSM-6300型, 日本電子データム) (以下SEMと略す) にて観察した。

II. 細胞増殖の検討

24 well microplate (Falcon) 内に配置した試料に α -MEM 中に浮遊している MC3T3-E1 を 1.2×10^4 cell/well に調製して播種し、同細胞を3, 5および10日間培養した。その後、接着細胞と非接着細胞を分別するため、試料を phosphate-buffered saline (以下PBSと略す, pH 7.4) で2回洗浄、非接着細胞を除去した。次いで、各wellに Eagle's modified essential medium (SIGMA) 600 μ l と CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent (Promega) 120 μ l を加え、37°C で2時間インキュベートした後、microplate reader (MPR-A4i, 東ソー) にて492 nm における吸光度を測定することで、試料表面に接着している生細胞数を算出した。

III. 細胞形態の観察

α -MEM 中に浮遊した MC3T3-E1 を 1.2×10^4 cell/well に調製して試料に播種し、同細胞を24時間培養後、PBS にて洗浄して非接着細胞を除去した。接着細胞の付いた試料を、2.5% グルタルアルデヒド含有 0.1 M cacodylate buffer に1時間浸漬し、前固定を行った。その後、PBS にて1時間洗浄してグルタルアルデヒドを完全に除去、その後1% 四酸化オスミウム含有 0.1 M cacodylate buffer に1時間浸漬し、後固定を行った。固定完了後、試料を50% エタノールに浸漬、その後60, 70, 80, 90, 95, 99, 100% の各濃度のエタノール中に順次浸漬して脱水した。試料を臨界点乾燥させた後 Pt-Pd 蒸着を施し、細胞の試料への伸展形態を SEM を用いて試料表面から45度の角度で観察した。

IV. 骨芽細胞分化の検討

Alkaline phosphatase (ALP) 活性は p-nitrophenyl phosphate (pNPP) を用いた Bessey 法⁴⁹⁾ により定量した。試料に α -MEM 中に浮遊した MC3T3-E1 を 1.2×10^4 細胞 cell/well に調製して播種し、同細胞を10日間培養した。その後、0.9% NaCl にて細胞を3回洗浄して0.9% NaCl/0.2% TritonX-100 にて回収、次いで、超音波にてホモジナイズし、遠心後の上清を得た。この上清 50 μ l に reaction buffer (400 μ l : 0.5 M TrisHCl (pH 9.5) / 0.5 mM MgCl₂, 50 μ l : 5 mM pNPP) を加え、37°C 恒温槽にて30分反応させた。その後、同量の 1N NaOH にて反応を停止させ、Microplate Reader (MPR-A4i II, 東ソー) を用い、415 nm における吸光度を測定した。この吸光度を p-nitrophenol を希釈した

溶液からの標準回帰曲線を用いて活性に変換した。また、これらの値を反応時間および BCA Protein Assay (PIERCE) にて定量した蛋白量にて補正 (pNPP product nmoles/min/mg protein) し、ALP 活性とした。

V. 定量 RT-PCR 法を用いた細胞分化の検討

試料に α -MEM 中に浮遊した MC3T3-E1 を 1.2×10^4 cell/well で播種、同細胞を 7 日間培養した。その後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用い同細胞からの total RNA を抽出し、分化の指標である ALP と osteocalcin の発現量を比較検討した。定量 RT-PCR⁵⁰⁾ には、Quantitect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN) を使用し、DNA 増幅は ABI Sequence Detection System (ABI PRISM 7700, Applied Biosystems) にて行った。Template として total RNA を 1 サンプルあたり 100 ng / μ l に調整し、Reaction Mix (2 \times Quantitect SYBR Green RT-PCR Master Mix, 25 pM upstream primer, 25 pM downstream primer, Quantitect RT Mix) に加え、25 μ l とした。逆転写反応は 50°C, 30 分で行い、PCR 初期活性化は 95°C, 15 分とし、PCR 増幅反応は、変性反応 (94°C, 15 秒), アニーリング (55°C, 30 秒), 伸長反応 (72°C, 1 分) を 1 サイクルとするプログラムを 40 サイクル繰り返すことにより、ALP および osteocalcin の特異的プライマー (表 1) に挟まれている部分的 cDNA を増幅した。この増幅された RT-PCR 産物の発現量を、ABI detection system (ABI PRISM 7700, Applied Biosystems) にて解析した。すなわち、ワンステップ RT-PCR にて増幅され最初の色素の蛍光

が検出されたサイクル数である Ct 値 (Threshold cycle) を測定し、さらに、各サンプルの housekeeping 遺伝子 β -actin の Ct 値を用いて補正し、プラスチック上での発現量に対する相対的 mRNA の発現量を各試料間で比較した。

実験 2 粗造なチタン表面性状が骨芽細胞の細胞間接着に及ぼす影響

実験 1 と同様の純チタンおよびプラスチックを実験材料とし、同様に成形したものを試料とした。これらの試料に α -MEM 中に浮遊した MC3T3-E1 を 1.2×10^4 cell/well で播種し、同細胞を 1 日および 5 日間培養した。その後、各時期の細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR 法⁵¹⁾ および定量 RT-PCR 法⁵⁰⁾ にて骨芽細胞の細胞間接着を担っている cadherin の mRNA 発現の有無を観察し、次いで発現量を測定した。RT-PCR 法は、まず total RNA 1 μ l を鋳型として、First Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて cDNA を合成した。この cDNA の 5 μ g に設計した cadherin の特異的プライマー^{52,53)} (表 1) を加え、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) で PCR 法を用いて次のように増幅した。すなわち、変性反応 (95°C, 1 分), アニーリング (55°C, 1.5 分) および伸長反応 (72°C, 1 分) を 1 サイクルとするプログラムを 35 サイクル繰り返すことにより、特異的プライマーに挟まれている部分的 cDNA を増幅した。この増幅された cDNA を 1.5% アガロースゲル

表 1 RT-PCR および定量 RT-PCR に用いた各遺伝子の特異的プライマー

定量 PCR	
ALP	upstream: 5'-GAAATCTTGCTTTTAGGCCAGC-3' downstream: 5'-AATACITGAGTGCAGCAGCCG-3'
Osteocalcin	upstream: 5'-CCGCCTACAAACGCATCTACG-3' downstream: 5'-AGGATCAAGTCCCGGAGAGC-3'
N-cadherin	upstream: 5'-AGACCTGAGTTTCTGCACCAGG-3' downstream: 5'-GGATCATCCGCATCAATGG-3'
Cadherin-11	upstream: 5'-AAGCCTACATCTGAATGCCG-3' downstream: 5'-CAGGGTAACAAACAGCACAAACG-3'
RT-PCR	
N-cadherin	upstream: 5'-ATCAACCCCATCTCAGGACA-3' downstream: 5'-CCATTCAGGGCATTGGATC-3'
E-cadherin	upstream: 5'-ATTGAGCTCTCCCCCAACAGTCCCC-3' downstream: 5'-GCCGAATTCTCTCCACCTCCTTCTTCATC-3'
P-cadherin	upstream: 5'-ATTGAGCTCACAGCATCACAGGGCCTGGC-3' downstream: 5'-ATTGAATTCTGGCTCCTTCGGCTCTTGGC-3'
Cadherin-11	upstream: 5'-CGTGGAGGGTTTCAGTCGGCAGA-3' downstream: 5'-TACTGATACTCAGGTTTGAT-3'

にて電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下で検出して cadherin 発現の有無をみた。次いで、N-cadherin および cadherin-11 遺伝子の特異的プライマー（表1）を用いた定量 RT-PCR を実験1-Vと同様の方法で行い、両 cadherin の発現量を各試料間で比較した。

実験3 粗造なチタン表面へのコーティングが骨芽細胞の細胞間接着および分化に及ぼす影響
細胞および試料は実験1と同様のものを用いた。コーティング材料には、細胞接着分子である fibronectin (Human Plasma Fibronectin, Gibco BRL) および collagen type I (CELLGEN, KOKEN) を選択した。これらを 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製した後、試料をこの溶液中に 4°C, 18時間浸漬することにより、fibronectin と collagen type I のそれぞれの細胞接着分子をコーティングした（以下 FN-coat および Co-coat と略す）。その後、これらのコーティングした試料とコーティングをしていない対照のチタン試料（以下 Non-coat と略す）に α -MEM 中に浮遊した MC3T3-E1 を 1.2×10^4 cell/well で播種し、10日間培養後、実験1-Vの方法を用いて同細胞の ALP 活性を測定した。

また、粗造なチタン表面を物理的に平坦にすることを目的として、1% collagen gel (1%アテロコラーゲン, KOKEN) および 2% collagen gel (2%アテロコラー

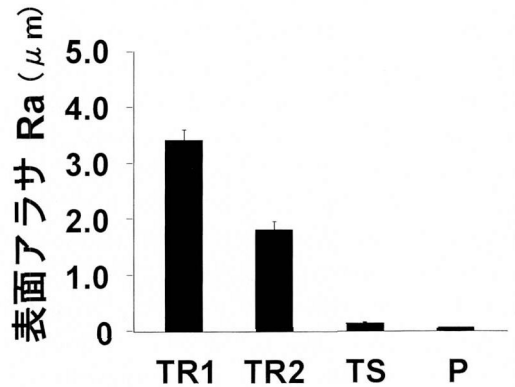


図1 試料の表面アラサ。

各試料の表面アラサを中心線平均表面アラサ (Ra) を指標に表面粗さ測定器 (SE-3300) にて測定した。TR1 は 3.61, TR2, TS はそれぞれ 1.91 と 0.14 であり、TR1 および TR2 は粗造である。対照の P は 0.03 を示している。値は試料 5 個の平均値を示す。

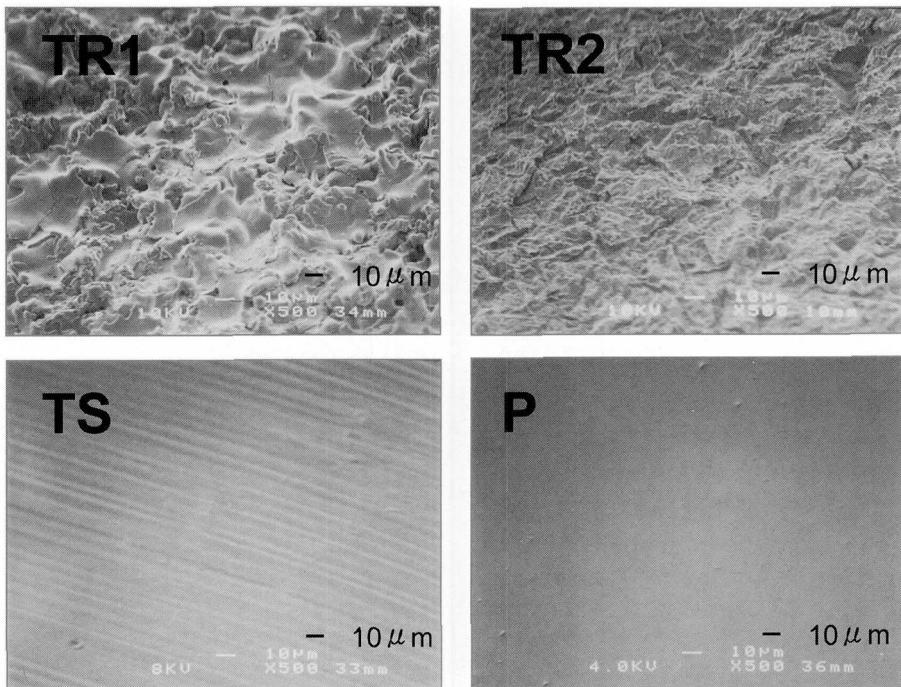


図2 試料表面の SEM 像。

TS および P の表面は滑沢であるのに対して、TR1 および TR2 のそれは粗造であることがよくわかる。

(— : 10 μm)

ゲン, KOKEN) を選択し, 試料をこれらの溶液中に 4°C, 18時間浸漬することで両者の collagen gel をコーティングした (以下 1% gel-coat および 2% gel-coat と略す)。その後, 37°C にて collagen をゲル化させ, 次に α -MEM 中に浮遊した MC3T3-E1 cell を 1.2×10^4 cell / well で試料に播種, 同細胞を10日間培養した。この間, 実験 1 - IIIと同様の方法を用い, 培養1日後の細胞形態を観察した。次いで定量 RT-PCR を実験 1 - Vと同様の方法で行い, 5日後の N-cadherin および cadherin-11 mRNA の発現量を測定し, さらに, 実験 1 - VIの方法を用いて10日後の ALP 活性も測定した。

結 果

実験 1

各試料の Ra は, TR1, TR2 がそれぞれ $3.61 (\pm 0.20)$ と $1.91 (\pm 0.16)$ であり, 対照とした TS と P はそれぞれ $0.14 (\pm 0.02)$ と $0.03 (\pm 0.02)$ であった (図 1)。また, SEM 観察では, TS および P の表面は滑沢であるのに対して, TR1 および TR2 のそれは粗造であることが認められた (図 2)。

MC3T3-E1 の増殖は, 3 日後および 5 日後において TR1 と TR2 では TS と比較して抑制される傾向にあっ

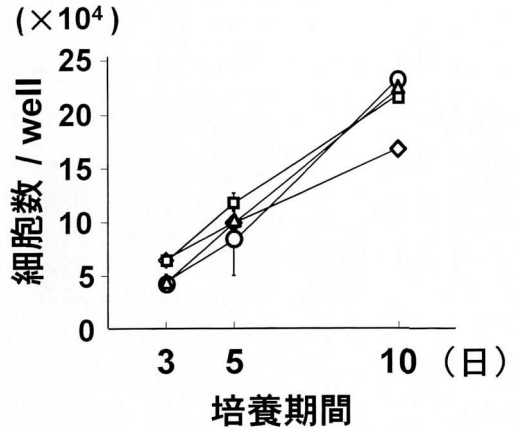


図 3 培養 3, 5, 10 日後の試料上での MC3T3-E1 の増殖。

試料に MC3T3-E1 を 1.2×10^4 cell / well で播種, 同細胞を 3, 5, 10 日間培養後, MTS 法にて 492 nm の吸光度を測定し, 生細胞数を算出した。3 日後および 5 日後において TR1 および TR2 では増殖している細胞数は TS と比較して少ない傾向にあるが, 10 日後では 3 種類のチタン試料上でほぼ同様の増殖を示す。

(—△—: TR1 —○—: TR2 —□—: TS
—◇—: P)

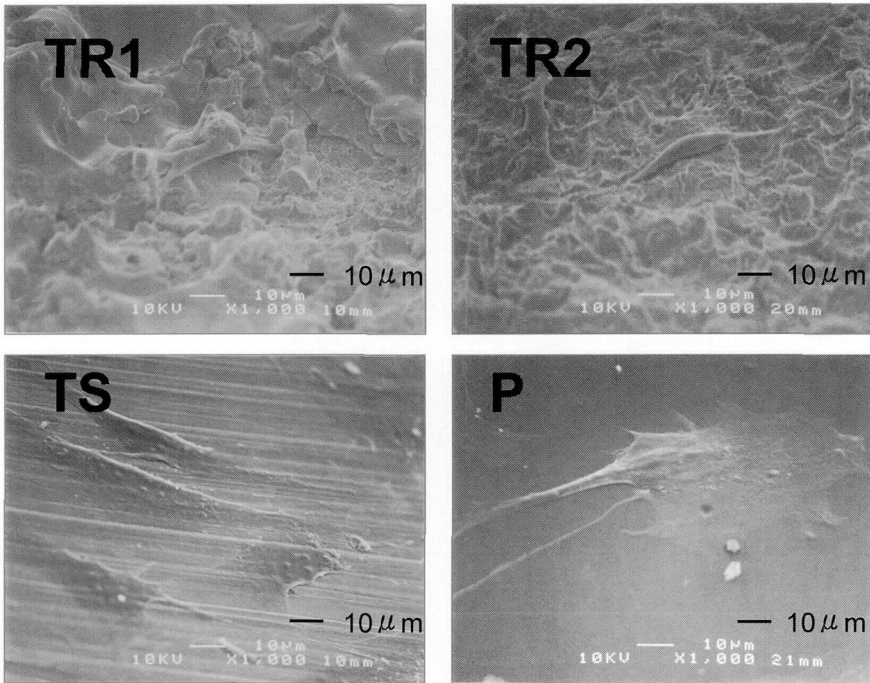


図 4 培養 1 日後の試料上における MC3T3-E1 の SEM 像。

MC3T3-E1 は TS および P 上で TR1 や TR2 上と比較してよく伸展し, 細胞同士もよく接触している。一方, TR1 および TR2 上では細胞同士が接触している像はほとんど認められない。(—: 10 μ m)

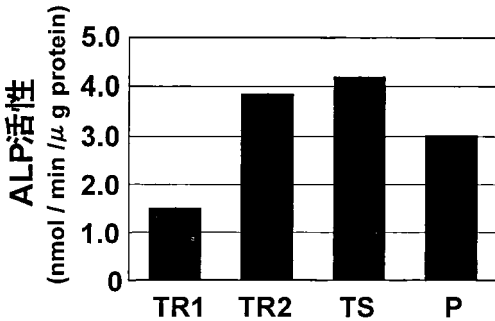


図5 培養10日後の試料上におけるMC3T3-E1のALP活性。

ALP活性はTS上で最も高く、TR1上の2.8倍、TR2上の1.1倍、P上の1.4倍を示している。

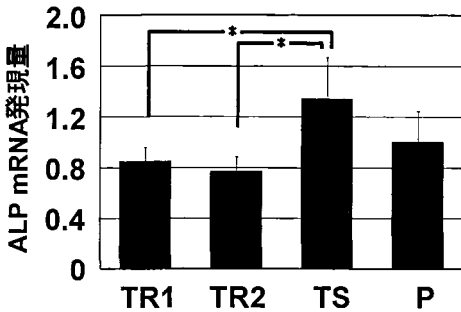


図6 培養7日後の試料上におけるMC3T3-E1のALP mRNA発現量。

TR1およびTR2上のALP mRNA発現量はTS上と比較して有意に少ない(*: $p < 0.01$)。

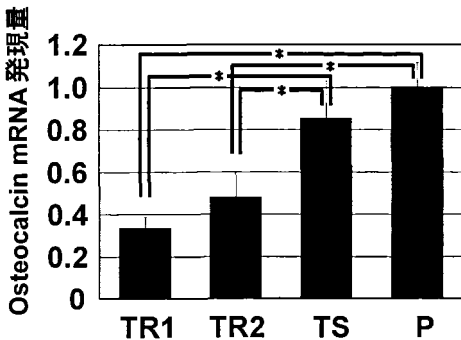


図7 培養7日後の試料上におけるMC3T3-E1のosteocalcin mRNA発現量。

TR1およびTR2上のosteocalcin mRNA発現量はTSおよびP上と比較してそれぞれ有意に少ない(*: $p < 0.01$)。

たが、10日後には3種類のチタン試料でほぼ同様の増殖を示した(図3)。

SEM像では、MC3T3-E1はPおよびTSでTR1やTR2と比較してよく伸展し、細胞同士もよく接触していた。一方、TR1およびTR2では細胞同士が接触している像はほとんど認められなかった(図4)。

ALP活性はTSで最も高く、TR1の2.8倍、TR2の1.1倍、Pの1.4倍を示していた(図5)。ALP mRNA発現量をみると、TR1およびTR2の値はTSと比較して有意に少なかった($p < 0.01$) (図6)。また、TR1およびTR2におけるosteocalcin mRNA発現量はTSおよびPと比較してそれぞれ有意に少なかった($p < 0.01$) (図7)。

実験 2

4種類のcadherinのうち、N-cadherinおよびcadherin-11のみがTSにおいて発現していた(図8)。N-cadherin mRNA発現量は1日後および5日後とも各試料間で有意な差はみられなかったが、TR1およびTR2における発現量はTSと比較して少ない傾向にあった(図9)。Cadherin-11においても、1日後では試料間に有意な差はみられなかったものの、5日後でのTR1およびTR2の発現量はTSおよびPと比較してそれぞれ有意に少なかった($p < 0.01$) (図10)。

実験 3

TR1およびTR2においては、fibronectinあるいはcollagenのいずれをコーティングしてもALP活性はNon-coatと比較して増加しなかった。一方、TSのALP活性はNon-coatと比較してFN-coatで1.1倍、Co-coatで1.7倍と増加し、PにおいてはFN-coatで1.7倍、Co-coatで2.2倍とそれぞれ上昇していた(図11)。

2% collagen gelをコーティングした場合のSEMによる観察では、すべての試料表面はcollagen gelで完全に覆われており、いずれの試料上の細胞も四方に伸展しながらお互いがよく接触していた(図12)。

1% collagen gelコーティングしたTR1においては、ALP活性はNon-coatと比較して約2倍、TR2においては約1.5倍に上昇した。2% collagen gelのTR1ではALP活性が約3.3倍に増加し、いずれもNon-coatのTSよりも高かった。一方、TSおよびPにおいては、1%あるいは2% collagen gelのいずれをコーティングしてもcollagenコーティングと比較してALP活性は増加しなかった(図13)。また、2% collagen gelをコーティングした場合のcadherin発現量をみたところ、TSおよびPにおけるN-cadherin mRNA発現量はコーティングによる影響をほとんど受けなかったのに

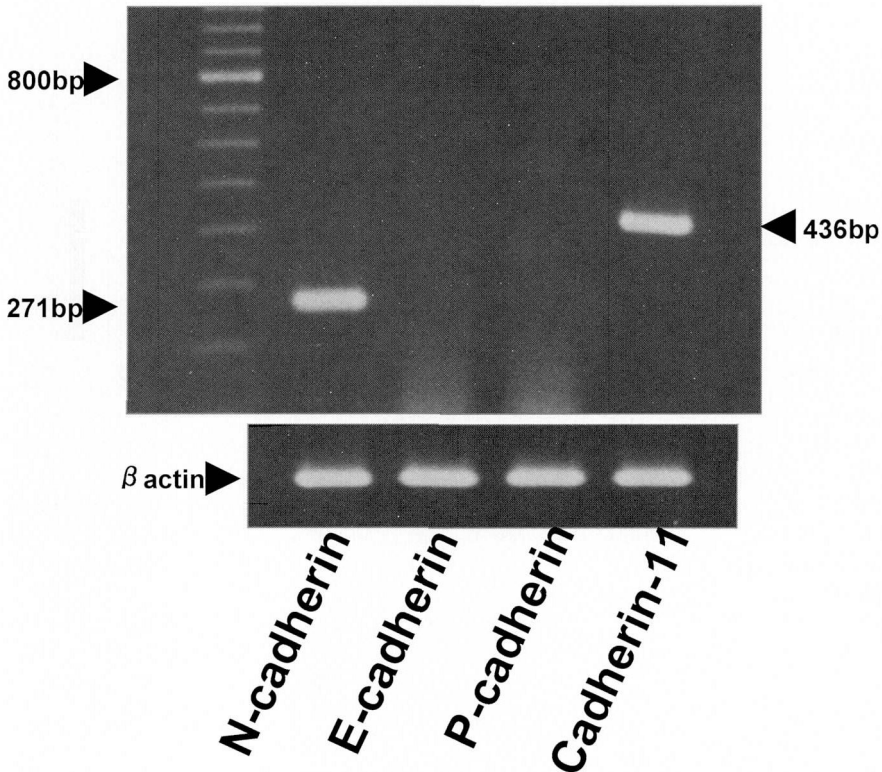


図8 培養1日後のチタン試料上における MC3T3-E1 に発現する各 cadherin mRNA 分子種の同定。4種類の cadherin のうち、N-cadherin および cadherin-11のみが発現している。

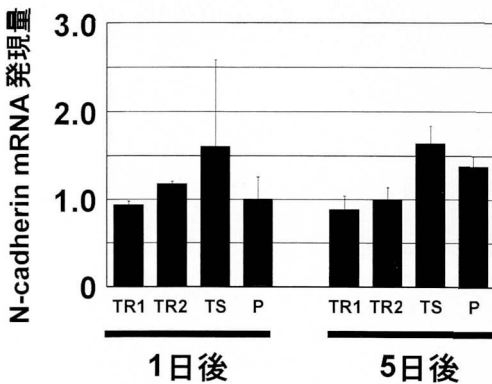


図9 培養1日後および5日後の試料上における MC3T3-E1 の N-cadherin mRNA 発現量。

TR1 および TR2 上の N-cadherin mRNA 発現量は TS 上と比較して少ない傾向にある。

対して、TR1 および TR2 においてはコーティングすることにより mRNA 量は増加する傾向にあった (図14)。このことは cadherin-11においても同様であった。すなわち、TS および P ではコーティングを行っても cadherin-11の発現量は増加しなかったが、コーティン

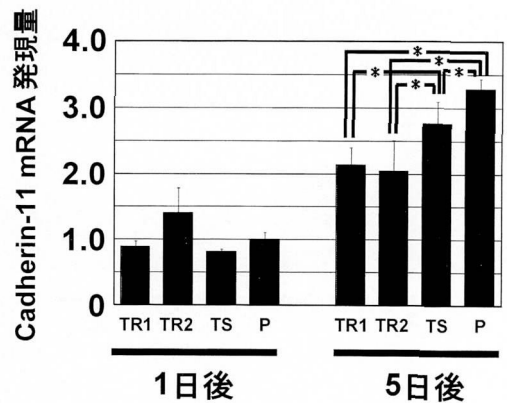


図10 培養1日後および5日後の試料上における MC3T3-E1 の cadherin-11 mRNA 発現量。

1日後においては TR1 および TR2 上の cadherin-11 mRNA 発現量は TS および P 上と比較してほとんど変わらないが、5日後になると、TR1 および TR2 上のそれは TS および P 上と比較してそれぞれ有意に少ない (* : $p < 0.01$)。

グされた TR1 および TR2 においては同発現量は有意に増加した ($p < 0.01$) (図15)。

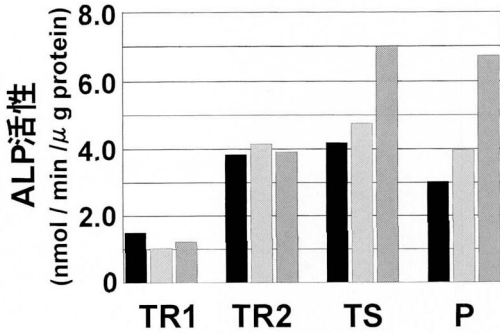


図11 Fibronectin および collagen type I をコーティングした試料上における MC3T3-E1 の ALP 活性。
TR1 および TR2 上における ALP 活性は、コーティングを行っても Non-coat と比較して増加していない。一方、TS および P 上においては Non-coat と比較して増加を示している。
(■ : Non-coat □ : FN-coat ▨ : Co-coat)

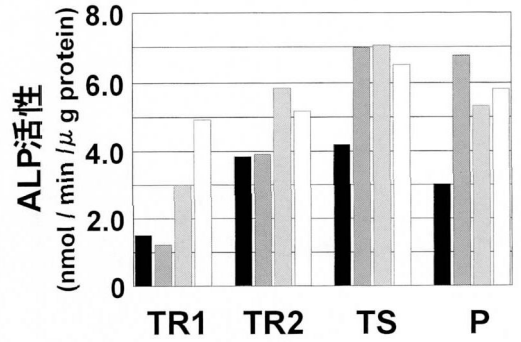


図13 1%および2% collagen gel をコーティングした試料上における MC3T3-E1 の ALP 活性。
TR1 および TR2 においては、1% collagen gel のコーティングによって ALP 活性は上昇を認める。また、TR1 では2% collagen gel のコーティングにより Non-coat の TS よりも高い活性を示す。一方、TS および P においては、1%および2% collagen gel のコーティングを行っても ALP 活性は上昇していない。
(■ : Non-coat □ : Co-coat ▨ : 1% gel-coat □ : 2% gel-coat)

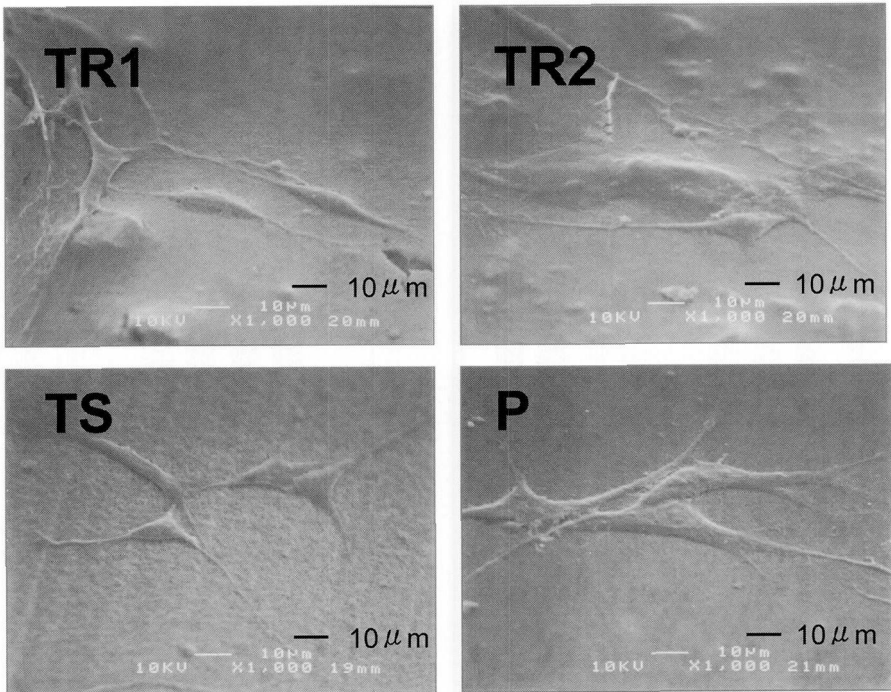


図12 2% collagen gel をコーティングした試料上における MC3T3-E1 の SEM 像。
試料表面は collagen gel で完全に覆われており、どの試料上の細胞も四方に伸展しながらお互いが接触している。(— : 10 μm)

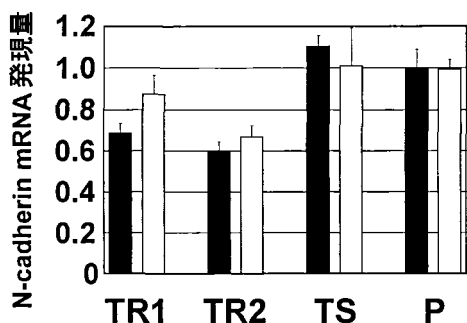


図14 2% collagen gel をコーティングした試料上における MC3T3-E1 の N-cadherin mRNA 発現量。

TR1 および TR2 においてはコーティングにより N-cadherin mRNA 発現量が増加する傾向にある。

(■ : Non-coat □ : 2% gel-coat)

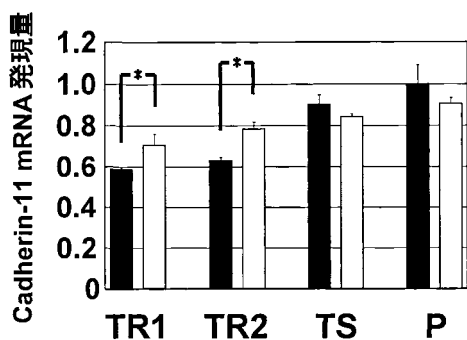


図15 2% collagen gel をコーティングした試料上における MC3T3-E1 の cadherin-11 mRNA 発現量。

TR1 および TR2 においてはコーティングにより osteocalcin mRNA 発現量が有意に増加している (* : $p < 0.01$)。

(■ : Non-coat □ : 2% gel-coat)

考 察

I. 研究材料について

インプラントの材料に関しては高い生体親和性を示す純チタンおよびチタン合金が広く用いられてきている。しかしながら、バナジウムやアルミニウムを含むチタン合金は細胞毒性の影響が懸念されている⁵⁴⁻⁵⁹⁾ので、本研究では骨芽細胞の増殖、分化に少しでも影響を及ぼす可能性のある因子を排除するため純チタンを選択した。また、表面性状に関しては、研究報告が豊富で^{1, 17-27)}すでに臨床で広く用いられているものなから、粗造度の高い (Ra3.6) チタンプラズマスプレー処理を施したもの²⁴⁻²⁷⁾とそれより粗造度の低い (Ra1.9) プラストエッチング処理を施したもの^{1, 17, 22, 23)}を用いた。また細胞に関しては、オッセオインテグ

レーションにおける骨形成を担う骨芽細胞を選択し、さらに、細胞分化の検討には分化期に安定していることが必要であるため、正常な骨芽細胞様細胞から樹立され⁶⁰⁾通常の培養条件下にて石灰化結節を形成することが確認されている MC3T3-E1 を用いた。

II. 粗造なチタンの表面が骨芽細胞に及ぼす影響について

チタンの表面性状を考える上では化学的な性質と物理的な性質の二つの側面からの理解が必要となる。化学的性質に関しては、あらかじめ electron spectroscopy for chemical analysis を用いて今回用いた 3 種類のチタン表面を検討したところ、微量の炭素や窒素が含まれていたものの 3 材料間でほとんど相違はなかった。このことから、3 種類のチタンの化学的性質はほぼ同一とみなしてよい。一方、物理的な性質はこれまでにその形状が重要な要素であると考えられ、同じ粗造度でも三次元的表面形状の違いにより細胞応答は異なるといわれている⁶¹⁾。また、プラスチックにおいても、形状が変化すると ALP 活性および ALP mRNA の発現量が影響されるといわれている⁶²⁾ことから、初期の細胞増殖と分化には材料の物理的性状が化学的性質よりも大きく影響することは疑いがないと思われる。

粗造なチタン表面上では ALP 活性が低く、その転写レベルの ALP mRNA 発現量も TR1 および TR2 上で有意に少なかった。ALP 活性は骨芽細胞の分化の初期マーカーである⁶³⁾といわれていることから、粗造なチタン表面では骨芽細胞の分化が抑制されている可能性が示唆される。また、osteocalcin は骨と歯牙にのみ分布し、石灰化組織に特異的な骨形成マーカーとして知られている⁶⁴⁾ことより、TR1 および TR2 上で osteocalcin mRNA 発現量が有意に少なかった結果からも、粗造なチタン表面で骨芽細胞の分化が抑制されていることが示唆できる。一方、文献的には、表面が粗造なほど $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ ビタミン D_3 に対する MG63 の応答が高まり、特に osteocalcin の合成と ALP 活性が促進されるとの報告²⁶⁾がある。この報告では、細胞がコンフルエントに達した後に実験を開始し骨芽細胞の分化後期を検討していることから、分化初期を検討している本研究結果と比較はできないものの、粗造なチタン表面が細胞分化に影響を及ぼすことは示唆できよう。いずれにしても、粗造な表面上では骨芽細胞の分化開始時期が遅延している可能性が考えられる。本研究でも、TS や P など滑沢な表面上では細胞がよく伸展して細胞同士もよく接触していたのに対して、TR1 や TR2 など粗造な表面上では細胞の伸展も少なく細胞同士の接触もほとんどみられなかったということ、さらに粗

造な表面上では細胞増殖が抑制されていたことなどからも、粗造な表面上では分化開始時期が遅延している可能性が指摘できる。この場合、粗造なチタン表面では物理的形状により細胞の偽足の伸展が阻害されることが考えられよう。

さらに、粗造なチタン表面において骨芽細胞の分化が抑制されるという現象に、細胞外情報を細胞内へ伝達し細胞の活性化や分化などを誘導する³⁴⁾細胞接着が関与していることも考えられる。骨芽細胞における細胞接着のなかで、細胞と細胞外基質との接着には integrin が関与し、integrin の $\alpha 2\beta 1$ を介する骨基質との接着は骨芽細胞の分化を誘導しうることが示されている⁴³⁾。しかしながら、粗造な表面と滑沢な表面との間では integrin の $\beta 3$ サブユニットの発現量がわずかに相違するだけで $\alpha 2$, 3, 5 および $\beta 1$ サブユニットの発現量にほとんど差がない^{36, 37)}とされることから、粗造なチタン表面上での骨芽細胞の分化制御に integrin はほとんど関連していないものと推察できる。一方、骨芽細胞の細胞同士の接着には、connexin 43や45により構成される gap junction³⁸⁻⁴⁰⁾と cadherin を介する adherens junction^{41, 42)}の2つが関与している。しかしながら、前者に関しては主に分子量2,000以下の低分子やイオンを透過する働きを担うだけであり、骨芽細胞の分化の点からは関連がないと考えられる³⁹⁾。そこで、cadherin を介する adherens junction が注目されるが、実際、HAV ペプチド^{44, 45)}や中和抗体^{43, 46)}、相補的オリゴヌクレオチドを用いた報告⁴⁶⁾やドミナントネガティブ N-cadherin のトランスフェクションによる研究^{44, 45)}などから N-cadherin が骨芽細胞間関連遺伝子の発現に必要不可欠であることが示唆されている。加えて、Kawaguchi ら⁴⁷⁾はノックアウトマウスを用いた実験により cadherin-11 単独でも骨形成に貢献すると報告しており、骨芽細胞の分化の制御に cadherin を介する情報伝達系が関与している可能性は高い。そこで、本研究では cadherin 発現について検討したが、機械研磨したチタン表面には N-cadherin と cadherin-11 が共に発現する一方で、粗造なチタン表面上ではこれらの cadherin の発現は抑制されていた。この結果は、粗造なチタン表面上でみられた骨芽細胞同士の接触がまったくみられなかった SEM 観察所見とよく一致しており、細胞同士の接着が阻害されていたことを示している。一方で、対照群の中でも cadherin 発現量に相違がみられ、5日後の機械研磨したチタン上での cadherin-11 はプラスチック上と比較して発現量が有意に少なかった。このことより、表面の物理的な形状の相違のみでなく、材質の相違も cadherin を介する細胞接着に影響を及ぼすことが考えられるが、予備的に行った実験において、

プラスチック表面を粗造にした場合にも cadherin の発現量は減少していたので、cadherin 発現に大きく影響を及ぼしているのはプラスチックとチタンとの材質の違いというよりも表面形状の違いの可能性が高い。一方、cadherin の細胞内成分が細胞膜の裏打ちタンパク質である β -カテニンや γ -カテニンと直接結合し、さらにその複合体は細胞内骨格線維であるアクチン等と結合し連動していること⁶⁵⁾などを考えると、粗造な表面上ではアクチンの重合が阻害されて細胞骨格の形成に影響を与え、カテニンを介する cadherin の発現を抑制している可能性も考えられよう。

いずれにせよ、*in vitro* の結果からは粗造な表面は初期の骨芽細胞の伸展、増殖および分化にとって有利でないことが明らかとなった。しかしながら、臨床的には粗造な表面は表面積を増加させ、骨との機械的嵌合力にも優れて^{22, 23, 28-32)}埋入直後の初期固定にきわめて有利とされていることから、粗造な表面に何らかの初期の細胞間接着や細胞分化を促進させる条件を与えることで、粗造な表面の持つ欠点を克服して、さらに確実なオッセオインテグレーションを目指すことが次の課題となる。

Ⅲ. コーティングが骨芽細胞に及ぼす影響について

実験1, 2の結果から粗造なチタン表面上ではきわめて初期の骨芽細胞の増殖、分化および細胞同士の接着などが抑制されており、表面が粗造なチタンは初期の骨形成に必ずしも有利とは言えないことが示された。そこで、この欠点を克服しより確実なオッセオインテグレーションを得るためには、早期に骨芽細胞同士を接着させて分化を促進する必要がある。しかしながら、細胞同士の接着を促進させる方法は現在のところ報告がないため、その前段階である細胞の伸展を促進させる一つの方法として、細胞接着分子をチタン表面へコーティングすることを試みた。これらのコーティングに用いることのできる接着分子としては、これまでに vitronectin⁶⁶⁻⁶⁸⁾、fibronectin⁶⁶⁻⁷⁰⁾および collagen type I^{66, 68, 70, 71)}、type IV^{66, 70)}などが報告され、機械研磨チタンやプラスチック上において細胞接着や細胞伸展を促進することが示されている。そこで、代表的な細胞接着分子であり、かつ骨芽細胞の初期接着を増加させ⁷²⁾、細胞の増殖・分化に関与している可能性が示されている⁷³⁾ fibronectin と、ミネラル沈着の足場として重要な役割を担い⁷⁴⁾主に integrin $\alpha 1\beta 1$ および $\alpha 2\beta 1$ と結合し^{35, 75)}、骨芽細胞の初期接着⁷⁶⁾、骨芽細胞の ALP 活性⁷⁷⁾、石灰化関連遺伝子発現⁷⁸⁻⁸⁰⁾ および石灰化⁷⁹⁾などを高める collagen type I を選択した。これらのコーティングを行った機械研磨のチタンやプラ

スチック表面で ALP 活性は増加したが、表面が粗造である TR1 や TR2 上などでは細胞接着が促進されたにもかかわらず ALP 活性はまったく変化しなかった。これらのことより、fibronectin や collagen type I のコーティングでは表面の粗造性が十分に修正されず、依然として細胞の増殖や分化が抑制されているものと考えた。そこで、さらに表面形状を改善することを計画し、培養上優れた担体となり⁷⁰⁾すでに形成外科領域では皮膚の陥凹修復に臨床応用されている⁸¹⁾ collagen gel を用い、粗造なチタン表面を物理的に平坦にすることを試みた。その結果、ALP 活性は 1% collagen gel を用いることで TR2 上において 2 倍、TR2 上で 1.5 倍、さらに 2% collagen gel の場合では TR1 上で 3.3 倍と、コーティングなしの TS 上よりも明らかに高まっていた。一方、TS および P 上においては、これらのコーティングを施しても ALP 活性は高まらなかった。Fibronectin および collagen のコーティングの場合では細胞接着数は増加したものの、ALP 活性は全く上昇しなかったことを考えると、collagen gel を用いたことで細胞接着が促進したというよりむしろ、チタン表面の物理的な形状が変化した結果、細胞の伸展や遊走を阻害する因子が減少して細胞同士が接着しやすい足場環境が形成されたことによると考える方が妥当であろう。また、粗造なチタン表面で ALP 活性が抑制された場合には cadherin 発現量も減少し、一方 collagen gel をコーティング後 ALP 活性が亢進すると cadherin の発現量も同時に増加したことから、cadherin と ALP 活性は何らかのリンクをしている可能性があり、cadherin 発現が骨芽細胞の分化の指標となりうるかもしれない。本研究において、2 種類の cadherin はほぼ同様の発現パターンを示したが、粗造な表面上で発現が有意に抑制され、collagen gel コーティングにより発現が有意に亢進したのは cadherin-11 のみであったこと、cadherin-11 の発現量は N-cadherin の 5~10 倍であったことなどを考え併せると、N-cadherin および cadherin-11 の両者は共に骨芽細胞の分化に関与するが、なかでも cadherin-11 の関与の度合いが強いと推察できる。

In vivo において、3% collagen gel を骨欠損やハイドロキシアパタイトコートインプラント周囲に応用した報告では、術後 2 週で collagen 内に未分化間葉系細胞の侵入が認められ、術後 1 ヶ月で collagen を中心として骨組織が新生したことが示されている⁸²⁾。このことより、本研究で用いた collagen gel を粗造な表面にコーティングしたインプラントにおいても、collagen を足場とする骨新生が起り、最終的には collagen gel が吸収されて良好なオッセオインテグレーションが得られるのではないかと考えられる。

以上より、粗造なチタン表面では骨芽細胞の増殖、細胞間接着および分化が抑制されることが明らかになり、特に cadherin を介する細胞間接着が阻害されている可能性が高いことが示された。このことは粗造なチタンインプラント表面が有利であるとされている生体内においても、オッセオインテグレーションを獲得するうえでのみならず初期段階での骨芽細胞の分化が抑制されている可能性を示唆している。また、collagen gel を粗造な表面にコーティングすることで cadherin の発現が高まり、細胞分化が促進したことから、早期の確実なオッセオインテグレーションを考えていくうえで、粗造なインプラント表面を用いる場合には collagen gel をコーティングし、初期の細胞応答に有利な環境を整えることが有用であると思われる。

総 括

本研究では粗造な純チタン表面改質の有用性の一端を明らかにすることを目的とし、粗造なチタン表面での増殖・分化過程における骨芽細胞の特性を細胞生物学的に検討し、さらに細胞接着因子のコーティングの影響についての検討も加え、以下の結果を得た。

1. 粗造な純チタン表面では、機械研磨されたチタン表面に比べ、骨芽細胞の増殖は低かった。
2. チタンプラズマ処理およびブラストエッチング処理を施したチタン上における ALP 活性、ALP mRNA および osteocalcin mRNA 発現量は、いずれも機械研磨したチタン上に比較して有意に低い値を示した。
3. 機械研磨されたチタン表面で培養した骨芽細胞においては N-cadherin と cadherin-11 が発現し、粗造な純チタン表面では cadherin 発現量が抑制されていた。
4. 粗造な純チタン表面に collagen gel をコーティングすることで、骨芽細胞がより伸展して細胞同士が接触すること、さらに、ALP 活性および cadherin 発現量が亢進することなどが示された。

以上の結果から、粗造なチタン表面上では骨芽細胞の増殖、細胞間接着および分化が抑制されることが明らかになり、特に cadherin を介する細胞間接着が阻害されている可能性が高いことが示された。また、collagen gel を粗造な表面にコーティングすることで cadherin の発現や細胞分化を促進させることが示されたことから、早期の確実なオッセオインテグレーションを考えるうえで、粗造なインプラント表面を用いる場合には collagen gel をコーティングすることが有用である可能性も示唆できた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医学専攻顎口腔頸部医学講座（歯科補綴学第一）赤川安正教授に深甚なる謝意を表します。また、本論文作成に際し、終始御教示、御指導頂きました本学大学院医歯薬学総合研究科創生医学専攻先進医療開発科学講座（口腔病理学）高田隆教授ならびに本学大学院医歯薬学総合研究科創生医学専攻探索医学講座（歯科理工学）岡崎正之教授に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、御指導、御鞭撻を賜りました本学大学院展開医学専攻顎口腔頸部医学講座（歯科補綴学第一）山中威典博士ならびに本学大学院展開医学専攻顎口腔頸部医学講座（歯科補綴学第一）細川隆司博士に心より感謝の意を表します。さらに、多くのご支援を頂きました千葉大輔博士および本学大学院医歯薬学総合研究科展開医学専攻顎口腔頸部医学講座（歯科補綴学第一）の教職員各位に感謝の意を捧げます。さらに、材料の提供を頂いた株式会社ジーシーの方々に謝意を表します。最後に常に私を支えてくれた両親静夫、清美と妻恭子に感謝致します。

文 献

- 1) Martin, J.Y., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Schraub, D.M., Simpson, J., Lankford, J.Jr., Dean, D.D., Cochran, D.L. and Boyan, B.D.: Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J. Biomed. Mater. Res.* 29, 389-401, 1995.
- 2) Links, J., Boyan, B.D., Blanchard, C.R., Lohmann, C.H., Liu, Y., Cochran, D.L., Dean, D.D. and Schwartz, Z.: Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Bio-materials* 19, 2219-2232, 1998.
- 3) Degasne, I., Baslé, M.F., Demais, V., Huré, G., Lesourd, M., Grolleau, B., Mercier, L. and Chappard, D.: Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif. Tissue Int.* 64, 499-507, 1999.
- 4) Lohmann, C.H., Sagun, R.Jr., Sylvia, V.L., Cochran, D.L., Dean, D.D., Boyan, B.D. and Schwartz, Z.: Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1, 25-(OH)₂D₃ through regulation of phospholipase A₂ activity and activation of protein kinase A. *J.*

- Biomed. Mater. Res.* 47, 139-151, 1999.
- 5) Shah, A.K., Lazatin, J., Sinha, R.K., Lennox, T., Hickok, N.J. and Tuan, R.S.: Mechanism of BMP-2 stimulated adhesion of osteoblastic cells to titanium alloy. *Biol. Cell* 91, 131-142, 1999.
- 6) Itakura, Y., Kosugi, A., Sudo, H., Yamamoto, S. and Kumegawa, M.: Development of a new system for evaluating the biocompatibility of implant materials using an osteogenic cell line (MC3T3-E1). *J. Biomed. Mater. Res.* 22, 613-622, 1988.
- 7) Swart, K.M., Keller, J.C., Wightman, J.P., Draughn, R.A., Stanford, C.M. and Michaels, C.M.: Short-term plasma-cleaning treatments enhance *in vitro* osteoblast attachment to titanium. *J. Oral Implantol.* 18, 130-137, 1992.
- 8) Vrouwenvelder, W.C.A., Groot, C.G. and de Groot, K.: Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass, hydroxyapatite, titanium alloy and stainless steel. *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 465-475, 1993.
- 9) Bordji, K., Jouzeau, J.K., Mainard, D., Payan, E., Netter, P., Rie, K.T., Stucky, T. and Hage-Ali, M.: Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. *Bio-materials* 17, 929-940, 1996.
- 10) Brånemark, P-I., Breine, U., Adell, R., Hansson, B.O., Lindstrom, J. and Ohsson, A.: Intra-osseous anchorage of dental prostheses I. Experimental studies. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 3, 81-100, 1969.
- 11) Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B. and Brånemark, P-I.: A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int. J. Oral Surg.* 10, 387-416, 1981.
- 12) Albrektsson, T.: Direct bone anchorage of dental implants. *J. Prosthet. Dent.* 50, 255-261, 1983.
- 13) Brånemark, P-I.: Osseointegration and its experimental background. *J. Prosthet. Dent.* 50, 399-410, 1983.
- 14) Zarb, G.A. and Symington, J.M.: Osseointegrated dental implants: Preliminary report on a replication study. *J. Prosthet. Dent.* 50, 271-276, 1983.
- 15) Lindquist, L.W., Carlsson, G.E. and Jemt, T.: A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin. Oral Impl. Res.* 7, 329-336, 1996.
- 16) Buser, D., Mericske-Stern, R., Bernard, J.P., Behneke, A., Behneke, N., Hirt, H.P., Belser, U.C. and Lang, N.P.: Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table

- analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin. Oral Impl. Res.* 8, 161–172, 1997.
- 17) Könönen, M., Hormia, M., Kivilahti, J., Hautaniemi, J. and Thesleff, I.: Effect of surface processing on the attachment, orientation and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 1325–1341, 1992.
 - 18) Larsson, C., Thomsen, P., Lausmaa, J., Rodahl, M., Kasemo, B. and Ericson, L.E.: Bone response to surface modified titanium implants: Studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology. *Biomaterials* 15, 1062–1074, 1994.
 - 19) Larsson, C., Thomsen, P., Aronsson, B.O., Rodahl, M., Lausmaa, J., Kasemo, B. and Ericson, L.E.: Bone response to surface modified titanium implants: Studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials* 17, 605–616, 1996.
 - 20) Lausmaa, J., Kasemo, B., Mattsson, H. and Odelius, H.: Multi-technique surface spectroscopic characterization of electropolished and anodized Ti. *Appl. Surf. Sci.* 45, 189–200, 1990.
 - 21) Serruys, Y., Sakout, T. and Gorse, D.: Anodic oxidation of titanium in 1 M H₂SO₄, studied by Rutherford backscattering. *Surface Sci.* 282, 279–287, 1993.
 - 22) Cochran, D.L., Schenk, R.K., Lussi, A., Higginbottom, F.L. and Buser, D.: Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. *J. Biomed. Mater. Res.* 40, 1–11, 1998.
 - 23) Piattelli, A., Manzoni, L., Scarano, A., Paolantonio, M. and Piattelli, M.: Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: An experimental study in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 13, 805–810, 1998.
 - 24) De Santis, D., Guerriero, C., Nocini, P.F.: Adult human bone cells from jaw bones cultured on plasma-sprayed or polished surfaces of titanium or hydroxyapatite discs. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 7, 21–28, 1996.
 - 25) Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T.W., Cochran, D.L., Simpson, J., Dean, D.D. and Boyan, B.D.: Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 32, 55–63, 1996.
 - 26) Boyan, B.D., Batzer, R., Kieswetter, K., Liu, Y., Cochran, D.L., Szmuckler-Moncler, S., Dean, D.D. and Schwartz, Z.: Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 alpha, 25-(OH)₂D₃. *J. Biomed. Mater. Res.* 39, 77–85, 1998.
 - 27) Cooper, L.F., Masuda, T., Whitson, S.W., Yloheikila, P. and Felton, D.A.: Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 14, 37–47, 1999.
 - 28) Carlsson, L., Rostlund, T., Albrektsson, B. and Albrektsson, T.: Implant fixation improved by close fit. Cylindrical implant-bone interface studied in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* 59, 272–275, 1988.
 - 29) Wennerberg, A., Albrektsson, T., Andersson, B. and Krol, J.J.: A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin. Oral Impl. Res.* 6, 24–30, 1995.
 - 30) Thomas, K.A. and Cook, S.D.: An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J. Biomed. Mater. Res.* 19, 875–901, 1985.
 - 31) Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H. and Stich, H.: Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 889–902, 1991.
 - 32) Ericsson, I., Johansson, C.B., Bystedt, H. and Norton, M.R.: A histomorphometric evaluation of bone-to-implant contact on machine-prepared and roughened titanium dental implants. A pilot study in the dog. *Clin. Oral Impl. Res.* 5, 202–206, 1994.
 - 33) Anselme, K., Linez, P., Bigerelle, M., Le Maguer, D., Le Maguer, A., Hardouin, P., Hildebrand, H.F., Iost, A. and Leroy, J.M.: The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* 21, 1567–1577, 2000.
 - 34) Ruoslahti, E. and Obrink, B.: Common principles in cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 227, 1–11, 1996.
 - 35) Takeuchi, Y., Nakayama, K. and Matsumoto, T.: Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interactions with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 271, 3938–3944, 1996.
 - 36) Sinha, R.K. and Tuan, R.S.: Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 18, 451–457, 1996.
 - 37) Lange, R., Luthen, F., Beck, U., Rychly, J., Bau-

- mann, A. and Nebe, B.: Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol. Eng.* **19**, 255–261, 2002.
- 38) Civitelli, R., Beyer, E.C., Warlow, P.M., Robertson, A.J., Geist, S.T. and Steinberg, T.H.: Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J. Clin. Invest.* **91**, 1888–1896, 1993.
- 39) Steinberg, T.H., Civitelli, R., Geist, S.T., Robertson, A.J., Hick, E., Veenstra, R.D., Wang, H.Z., Warlow, P.M., Westphale, E.M., Laing, J.G. and Beyer, E.C.: Connexin 43 and connexin 45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J.* **13**, 744–750, 1994.
- 40) Civitelli, R.: Cell-cell communication in bone. *Calcif. Tissue Int.* **56**, S29–31, 1995.
- 41) Bhargava, U., Bar-Lev, M., Bellows, C.G. and Aubin, J.E.: Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells. *Bone* **9**, 155–163, 1988.
- 42) Palumbo, C., Palazzini, S. and Marotti, G.: Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone* **11**, 401–406, 1990.
- 43) Oberlender, S.A. and Tuan, R.S.: Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* **120**, 177–187, 1994.
- 44) Cheng, S.L., Lecanda, F., Davidson, M.K., Warlow, P.M., Zhang, S.F., Zhang, L., Suzuki, S., St. John, T. and Civitelli, R.: Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 633–644, 1998.
- 45) Ferrari, S.L., Traianedes, K., Thorne, M., Lafage-Proust, M-H., Genever, P., Cecchini, M. G., Behard, V., Bisello, A., Chorev, M., Rosenblatt, M. and Suva, L.J.: A role of N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 198–208, 2000.
- 46) Háy, E., Modrowski, D., Lomri, A. and Marie, P.J.: N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *J. Cell. Physiol.* **183**, 117–128, 2000.
- 47) Kawaguchi, J., Azuma, Y., Hoshi, K., Kii, I., Takeshita, S., Ohta, T., Ozawa, H., Takeichi, M., Chisaka, O. and Kudo, A.: Targeted disruption of cadherin-11 leads to a reduction in bone density in calvaria and long bone metaphyses. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1265–1271, 2001.
- 48) Guy, S.C., McQuade, M.J., Scheidt, M.J., McPherson, J.C. III., Rossmann, J.A. and Dyke, T.E.V.: In vitro attachment of human gingival fibroblasts to endosseous implant materials. *J. Periodontol.* **64**, 542–546, 1993.
- 49) Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.M.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164**, 321–329, 1946.
- 50) Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986–994, 1996.
- 51) Yamanaka, T., Sakamoto, A., Tanaka, Y., Zhang, Y., Hayashido, Y., Toratani, S., Akagawa, Y. and Okamoto, T.: Isolation and serum-free culture of epithelial cells derived from epithelial rests of Malassez in human periodontal ligament. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **36**, 548–553, 2000.
- 52) Tsutsumimoto, T., Kawasaki, S., Ebara, S. and Takaoka, K.: TNF- α and IL- β suppress N-cadherin expression in MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1751–1760, 1999.
- 53) Kawaguchi, J., Kii, I., Sugiyama, Y., Takeshita, S. and Kudo, A.: The transition of cadherin expression in osteoblast differentiation from mesenchymal cells: Consistent expression of cadherin-11 in osteoblast lineage. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 260–269, 2001.
- 54) Rae, T.: The biological response to titanium and titanium-aluminium-vanadium alloy particles. *Biomaterials* **7**, 30–40, 1986.
- 55) Evans, E.J.: Cell damage *in vitro* following direct contact with fine particules of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy. *Biomaterials* **15**, 713–717, 1994.
- 56) Maurer, A.M., Merritt, K. and Brown, S.A.: Cellular uptake of titanium and vanadium from addition of salts or fretting corrosion in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 241–246, 1994.
- 57) Yao, J., Glant, T.T., Lark, M.W., Mikecz, K., Jacobs, J.J., Hutchinson, N.I., Hoernner, L.A., Kuettner, K.E. and Galante, J.O.: The potential role of fibroblasts in periprosthetic osteolysis: Fibroblast response to titanium particles. *J. Bone Miner. Res.* **10**, 1417–1427, 1995.
- 58) Squire, M.W., Ricci, J.L. and Bizios R.: Analysis of osteoblast mineral deposits on orthopaedic/dental implant metals. *Biomaterials* **17**, 725–733, 1996.
- 59) Wang, J.Y., Wicklund, B.H., Gustilo, R.B. and Tsukayama, D.T.: Prosthetic metals interfere with the functions of human osteoblast cells in vitro. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **339**, 216–226, 1997.
- 60) Sudo, H., Kodama, H.A., Amagai, Y., Yamamoto,

- S. and Kasai, S.: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* **96**, 191–198, 1983.
- 61) Wieland, M., Chehroudi, B., Textor, M. and Brunette, D.M.: Use of Ti-coated replicas to investigate the effects on fibroblast shape of surfaces with varying roughness and constant chemical composition. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 434–444, 2002.
- 62) Hatano, K., Inoue, H., Kojo, T., Matsunaga, T., Tsujisawa, T., Uchiyama, C. and Uchida, Y.: Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. *Bone* **25**, 439–445, 1999.
- 63) Torii, Y., Hitomi, K., Yamagishi, Y. and Tsukagoshi, N.: Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol. Int.* **20**, 459–464, 1996.
- 64) Gerstenfeld, L.C., Chipman, S.D., Glowacki, J. and Lian, J.B.: Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev. Biol.* **122**, 49–60, 1987.
- 65) Yamada, K.M. and Geger, B.: Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 76–85, 1997.
- 66) Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**, 491–497, 1987.
- 67) Grezik, W.J. and Robey, P.G.: Bone matrix RGD glycoproteins: Immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 487–496, 1994.
- 68) Verrier, S., Bareille, R., Roviera, A., Dard, M. and Amedee, J.: Human osteoprogenitor responses to orthopedic implant: Mechanisms of cell attachment and cell adhesion. *J. Mater. Sci.* **7**, 46–51, 1996.
- 69) Curtis, A.S.G. and Forrester, J.V.: The competitive effects of serum proteins on cell adhesion. *J. Cell Sci.* **71**, 17–35, 1984.
- 70) Park, J.C., Kim, H.M. and Ko, J.S.: Effects of extracellular matrix constituents on the attachment of human oral epithelial cells at the titanium surface. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **13**, 826–836, 1998.
- 71) Cooper, L.F., Handelman, B., McCormack, S.M. and Guckes, A.D.: Binding of murine osteoblastic cells to titanium disks and collagen I gels: Implication for alternative interpretations of osseointegration. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **8**, 264–272, 1993.
- 72) Dean, J.W.3rd., Culbertson, K.C. and D'Angelo, A.M.: Fibronectin and laminin enhance gingival cell attachment to dental implant surfaces in vitro. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **10**, 721–728, 1995.
- 73) 宮田輝夫：医科領域におけるコラーゲンの展望。歯科ジャーナル **28**, 125–131, 1988.
- 74) Ahmad, M., McCarthy, M.B. and Gronowicz, G.: An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Bio-materials* **20**, 211–220, 1999.
- 75) Takeuchi, Y., Suzawa, M., Kikuchi, T., Nishida, E., Fujita, T. and Matsumoto, T.: Differentiation and transforming growth factor- β receptor down-regulation by collagen- $\alpha 1\beta 1$ integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 29309–29316, 1997.
- 76) Geisler, U., Hempel, U., Wolf, C., Scharnweber, D., Worch, H. and Wenzel, K-W.: Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 752–760, 2000.
- 77) Masi, L., Franchi, A., Santucci, M., Danielli, D., Arganini, L., Giannone, V., Formigli, L., Benvenuti, S., Tanini, A., Beghe, F., Mian, M. and Brandi, M.: Adhesion, growth, and matrix production by osteoblasts on collagen substrata. *Calcif. Tissue Int.* **51**, 202–212, 1992.
- 78) Lynch, M.P., Stein, J.L., Stein, G.S. and Lian, J.B.: The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: Modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp. Cell Res.* **216**, 35–45, 1995.
- 79) Shi, S., Kirk, M. and Kahn, A.J.: The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype. *J. Bone Miner. Res.* **11**, 1139–1145, 1996.
- 80) Celic, S., Katayama, Y., Chilco, P.J., Martin, T.J. and Findlay, D.M.: Type I collagen influence on gene expression in UMR 106–06 osteoblast-like cells is inhibited by genistein. *J. Endocrinol.* **158**, 377–388, 1998.
- 81) 小島和彦, 天野照仁：皮下陥没癥痕に対する注射用コラーゲンの適応。交通医学 **39**, 6–13, 1985.
- 82) 高田和典：コラーゲンのハイドロキシアパタイト・チタン複合インプラントへの応用に関する実験的研究。九州歯会誌 **45**, 181–201, 1991.