

スパッタリング法を用いた Sr 固溶 HA 薄膜の作製と

骨芽細胞様細胞による評価

Preparation of strontium substitution in HA thin films using sputtering technique and evaluation of osteocompatibility with osteoblast-like cells

○ 星野智大 (茨城大院) 尾関和秀 (茨城大) 後藤哲哉 (九歯大)

増澤徹 (茨城大) 青木秀希 (国際アパ研)

Tomohiro HOSHINO, Ibaraki University
Kazuhide OZEKI, Ibaraki University
Tetsuya GOTO, Kyushu Dental College
Toru MASUZAWA, Ibaraki University
Hideki AOKI, International Apatite Co., Ltd

Abstract: The preparation of strontium (Sr) substituted hydroxyapatite (SrHA) films at Sr/(Sr+Ca) ratio of 0, 20, 40, 60, 80, and 100 at.% to the HA on titanium by sputtering. The crystallinity and the Sr/(Sr+Ca) ratio in the film were observed using X-ray diffractometer (XRD) and inductively-coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES), respectively. Cell reaction to the SrHA was evaluated by measuring the cell attachment of human osteoblastic cells (Saos-2), alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin (OCN) expression. From XRD patterns, the peaks shifted to lower 2θ values with Sr addition. In the ICP measurements, the Sr/Ca ratios in each sample almost corresponded to the target ratios. The number of cells showed no significant difference in the SrHA except for Sr 40 at.%. The ALP activity for the Sr100 was highest in all of the sample. In OCN expression, it showed a decreasing tendency with Sr addition.

Key Words: Hydroxyapatite, Strontium, Sputtering, osteocompatibility

1. 緒言

現在、歯科インプラントには様々な表面処理が施されたものがあり、その一つに生体適合性に優れたハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HA) をコーティングする方法がある。スパッタリング法により HA がコーティングされた歯科インプラントは、コーティングなしのものに比べ速やかに周囲に骨形成が起こり、早期に高い骨結合強度が得られるという特徴がある。しかしながら、骨量や骨質が不十分な状態では適用できない場合があり、骨誘導能の優れた材料が求められている。近年骨芽細胞活性の促進作用があるとして Sr が注目されている。過去の研究では、Sr を最大 7at.% ドープした HA 圧粉体がアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性及びオステオカルシン (OCN) 発現を増大させたとの報告¹⁾もある。そこで本研究では、HA 中の Ca を各比率で Sr に置換させた Sr 固溶 HA ($\text{Ca}_{10-x}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: SrHA) 薄膜の有効性を検討するため、スパッタリング法により SrHA 薄膜を作製し、SrHA 薄膜中の Sr/(Sr+Ca) 比率及び結晶性、骨芽細胞様細胞による細胞接着性、ALP 活性及び OCN 発現について評価した。

2. 実験方法

2-1 試料作製

成膜ターゲットは、HA 粉末 (太平化学産業(株))、溶液法で作製し 800°C 焼成したストロンチウムアパタイト ($\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; SrAp)、HA 及び SrAp を Sr 比率 (Sr/(Sr+Ca)×100) 20,40,60,80 at.% で混合させた粉末をそれぞれ用いた。成膜はスパッタリング装置 SPF-210HD (キャノンアネルバ(株)) を使用し、基板には Ti ((株)ニラコ) を用いた。成膜条件はガス圧力 0.5Pa、放電電力 100W で、膜厚は 1.0 μm とした。さらに膜の結晶性の向上を図るために、温度 120°C、

圧力 0.2MPa でオートクレーブにより 6 時間水熱処理を行った。作製試料は、成膜ターゲットの Sr 比率が 0, 20, 40, 60, 80, 100 at.% をそれぞれ、Sr0, Sr20, Sr40, Sr60, Sr80, Sr100 とする。

試料は、X 線回折装置 RINT2000 ((株)リガク) で Sr 固溶及び結晶性、誘導結合プラズマ原子発光分析装置 (ICP-AES; ICPS-7510, (株)島津製作所) で Sr 比率測定を行った。

2-2 細胞接着実験

ヒト骨芽細胞様細胞 Saos-2 を用い、細胞濃度 1×10^4 cell/sample で各試料上に播種した。培養液には 10% ウシ胎仔血清 (和光純薬工業(株))、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペニシリン G (和光純薬工業(株))、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン (Gibco)、0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ファンギゾン (Gibco) 含有 α -MEM (Gibco) を用い、37°C で 6, 24 時間培養した。培養後、TRIC-phalloidin (希釈率 1:40, Molecular Probes) を用いて染色した。蛍光顕微鏡 (BX50; オリンパス(株)) により、任意範囲内 (0.57 mm^2) の細胞数をカウントし、接着細胞数を決定した。

2-3 ALP 活性及び OCN 発現評価

Saos-2 を 1.0×10^4 cell/ml の濃度で各試料上に播種した。培養液には、10% FBS、抗生物質、アスコルビン酸 5mg/ml、 β グリセロリン酸 216mg/ml、 10^{-8}M デキサメタゾンを含む α -MEM を用いた。ALP では培養 7 日目、OCN では培養 14 日目で培養細胞を回収した。ALP 活性の測定は、ALP 測定キット (和光純薬工業(株)) を用いて染色後 405nm の吸光度を測定し、ALP 活性値を決定した。OCN 測定は、PCR 反応後、増幅した DNA を電気泳動で分離し、その後 DNA をエチレンブロマイドで染色し、画像解析を行った。

3. 実験結果及び考察

3-1 HA 及び SrAp, SrHA 薄膜の XRD パターン

Fig. 1 に水熱処理後の薄膜の XRD パターンを示す. 全試料に基板による Ti のピーク (35.1°, 38.4°, 40.1°) が確認された. Sr0 及び Sr100 では, HA のピーク (25.8°, 31.7°, 32.2°, 32.9°) と SrAp のピーク (24.4°, 26.5°, 30.4°) がそれぞれ確認された. SrHA 薄膜の Sr 固溶に関して, Sr 比率の上昇とともに低角側にピークがシフトした. これは, Ca よりも原子半径の大きい Sr が HA 結晶内に入ることで結晶中の面間隔が広がったためと考えられる. また Sr 比率の上昇とともに, 半値幅の小さいピークが見られることから, Sr 比率の増加に伴い高い結晶性を有する傾向があると考えられる.

3-2 ICP 測定による Sr 比率

Table 1 に ICP 測定から算出した Sr 比率を示す. SrHA 薄膜の Sr 比率は, ターゲットの Sr 比率とほぼ一致した. この結果から, ターゲットの Sr 比率を変えることにより, Sr 比率の異なる SrHA 薄膜の作製が可能であると示唆された.

3-3 細胞接着性評価

Fig. 2 に接着細胞数を示す. 接着細胞数は Sr40 が最も低く, Sr20, Sr60, Sr80 では有意差は認められなかったが, Ti と同程度であった. この結果から, Sr40 以外は良好な細胞接着性を有していると考えられる. また, Sr40 が低くなった要因の一つとして, SEM 観察 (発表時に掲載する) から他よりも粒子が大きいこと, 表面が粗く細胞接着が抑制されたと考えられる.

3-4 ALP 活性及び OCN 発現

Fig. 3 に培養 7 日後の ALP 活性値を示す. Sr40 の ALP 活性値が最も低く, Sr60 から Sr 比率の上昇に伴い ALP 活性も上昇し, Sr100 で最大となった. この結果から, SrHA 薄膜は Sr0 や Sr100 と比較して, 骨芽前駆細胞から骨芽細胞への分化は遅いと考えられる.

Fig. 4 に培養 14 日後の OCN 発現量を示す. Sr 比率の上昇に伴い減少傾向を示した. ALP では Sr100 が最大だったが, OCN では他と比べて低いことから, 骨芽細胞の分化が進まなかったと考えられる. SrHA 薄膜では, Sr0 を基準とすると, わずかに分化が進んだと考えられる.

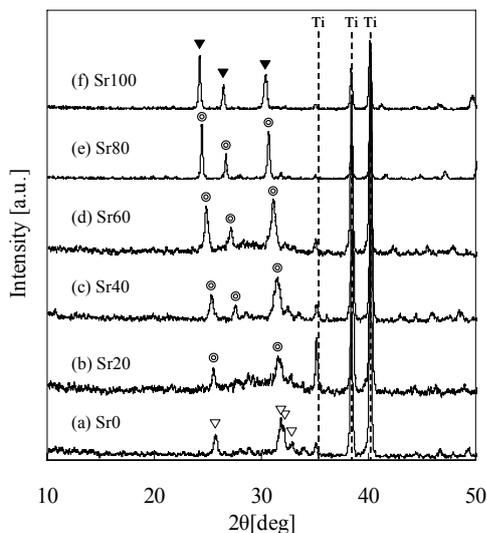


Fig. 1 XRD patterns of : (a) Sr0, (b) Sr20, (c) Sr40, (d) Sr60, (e) Sr80, (f) Sr100. Key: ▽=HA, ▼= SrAp, ⊙=SrHA, Ti=titanium substrate.

Table 1 Sr/(Sr+Ca) ratio in the film (N=3).

Sample	Sr [at.%]
Sr20	20.7±0.5
Sr40	40.3±1.0
Sr60	60.2±0.3
Sr80	79.8±0.8

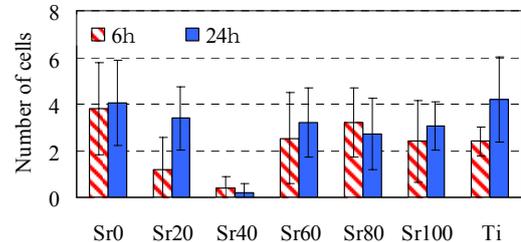


Fig. 2 Number of osteoblast-like cells attached to the films after 6, 24 h of culture in a certain area (0.57mm²) (N=15).

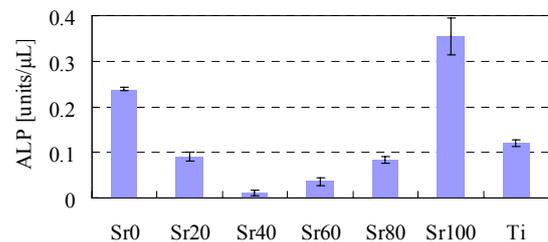


Fig. 3 ALP activity on the films after 7 days of culture (N=4).

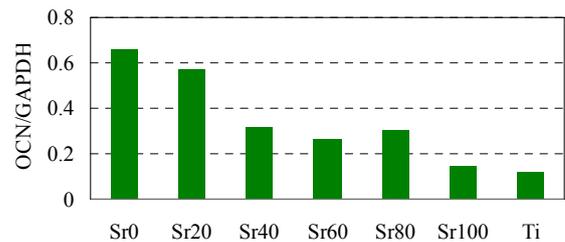


Fig. 4 OCN expression on the films after 14 days of culture.

4. 結言

スパッタリング法を用いて SrHA 薄膜を作製し, SrHA 薄膜中の Sr(Sr+Ca)比率及び結晶性, 骨芽細胞様細胞による細胞接着性, ALP 活性及び OCN 発現を評価した.

(1)XRD 結果より, ピークの低角側へのシフトから Sr 比率の異なる SrHA 薄膜の作製が確認でき, Sr 比率が高いほど SrHA 薄膜は高い結晶性を示した.

(2)ICP 結果から, Sr20, Sr40, Sr60, Sr80 の Sr/(Sr+Ca)比率はそれぞれ, 20.7±0.5, 40.3±1.0, 60.2±0.3, 79.8±0.8 となった. Sr 比率の異なるターゲットを用いることで, 薄膜中の Sr 比率を制御できることが示唆された.

(3)細胞接着の結果, Sr40 は有意に低く, Sr20 及び Sr60, Sr80 では, Sr0 と同程度の細胞接着性を示した.

(4)ALP 活性及び OCN 発現評価において, ALP 活性では Sr100 が最大となり, OCN 発現では Sr0 が最大を示した.

今後の課題として, 骨芽細胞による骨造成 (石灰化) 実験などを行い, Sr の有効性についてさらに検討を行う.

参考文献

- (1)C.Capuccini, P.Torricelli, E.Boanini, M.Gazzano, R.Giardino, A.Bigi, Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells, Journal of Biomedical Materials Research PartA, 594-600, 2009.