

Evaluation of anodized surfaces designed for improved soft tissue integration

軟組織結合の改善を目的とした陽極酸化表面設計の評価

Michael Nosswitz¹, Misha Teale¹, Stephanie Mathes¹,
Andrea Venturato², and Angelines Gasser²

¹Institute of Chemistry and Biotechnology, Zürich University of Applied Sciences, Wädenswil, Switzerland

²Nobel Biocare Services AG, Kloten, Switzerland

Correspondence to: stephanie.mathes@outlook.com

Published 12 March 2019

アブストラクト

歯科インプラントシステムの周囲組織への急速かつ安定した結合は、インプラントおよびアバットメント表面の周囲に存在する細胞の遊走、接着、増殖、分化を可能にすることによって達成される。したがって、アバットメント表面設計の検証においては、結合組織および上皮に強固な付着をもたらす能力を慎重に評価する必要がある。表面陽極酸化が軟組織結合に与える影響を評価するため、陽極酸化 (Xeal™) 表面および機械加工表面のチタン製ディスクをヒト歯肉上皮細胞 (HGEPp) および初代ヒト歯肉線維芽細胞 (HFIB-G) の培養基質として使用した。細胞応答は、細胞成長、生存度、細胞外基質 (コラーゲン I タンパク質レベル) を定量化することにより、また細胞形態を評価することによって評価した。HFIB-G 細胞は両表面間に有意な優先度を示さなかった一方、HGEPp 細胞は Xeal™ 表面において有意に早い成長を示した。これらの結果から、陽極酸化表面は、インプラント周囲の治癒および粘膜の高さを増進することによって治癒を早め、軟組織の健康を促進する可能性があることと示唆される。

キーワード: 軟組織、Xeal™、陽極酸化表面、細胞培養、ケラチノサイト、チタン

1. 緒言

細胞挙動は、材料の表面の化学的・物理的特性 (親水性、剛性、多孔性、粗さ、形状) から強い影響を受ける¹⁻³。歯科インプラント学において、チタンおよびチタン合金は、組織結合を支え、促進する能力を有すると同時に生物学的に不活性であることから、広く応用されている⁴⁻⁶。

アバットメントレベルでの軟組織シールの急速な形成は、創傷治癒を促進し、インプラントの健康な結合を可能にするための重要な要件の一つである⁶。過去数年の間に、強化された特性を備え、より優れた軟組織接着を促進および支援すること

ができる新規または改良材料の開発を目指す目覚ましい取り組みが見られた⁶⁻⁹。

インプラントシステムが埋入される際、その表面は以下の 3 つの主要組織型と相互に作用する。

- 体を外界から隔てる密封シールを形成するケラチノサイトによって形成される上皮。細胞は、アクチンフィラメントのアンカー点としての機能を果たし、細胞骨格に支持点を与える細胞間結合を通じて相互に連結されている¹⁰。
- 新たな基質および糖タンパク質の産生を担う線維芽細胞によって形成される結合組織^{11, 12}。線維芽細胞から分泌されるこの基質は、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンといった構造タンパク質との相互作用を媒介することによって、

インプラント表面への組織接着および結合に寄与する¹。

• 新たな骨の形成によってインプラントのオッセointegrationsを担う骨芽細胞によって形成される骨組織¹³。

表面への細胞接着は、細胞間および細胞・材料間接着、遊走、メカノトランスダクション、シグナル伝達の媒介に関与する高密度タンパク質凝集体から構成される焦点接着点を通じ、部分的に達成される^{14, 15}。基質との相互作用が不相当である場合、細胞分裂を阻害し、最終的に経路カスケードを活性化してアポトーシスに至る可能性がある¹⁶。そのため、焦点接着点は、細胞増殖におけるキープレイヤーであり、生化学的・生体力学的経路を誘発することによって細胞挙動に影響を与える^{1, 16}。本 *in-vitro* 研究では、陽極酸化処理を施したナノ構造のチタン製表面¹⁷ (Xeal™; Nobel Biocare AB, Göteborg, Sweden) を標準的な機械加工チタン製表面と比較し、それらの表面が細胞接着および増殖に与える影響について評価した。可能な限り正確に *in-vivo* 条件に似通ったものとするため、初代ヒト歯肉上皮細胞 (HGEPp) および初代ヒト歯肉線維芽細胞 (HFIB-G) を試験細胞株として選択した。

2. 材料と方法

表面処理を施していない機械加工表面 (機械加工) を対照とし、陽極酸化処理を施した表面 (Xeal, Nobel Biocare AB) と合わせ 2 種の表面を、チタン合金 (チタン 6-アルミニウム 4-バナジウム) ディスク (直径 : 6 mm) で製作した。陽極酸化表面は、規則的に配列したナノ構造を有し、酸化物層の厚さは約 150 nm であった。

2.1 ディスクの滅菌

細胞播種に先立ち、ディスクを EtOH 75% で 10 分間、滅菌 ddH₂O で 3 回洗浄した。その後、ディスクを空気乾燥させ、紫外線の下で 30 分間滅菌し、低接着 24 ウェルプレート (Thermo Scientific, cat num 12567104) に分配した。

2.2 ディスクのコーティング

2 つの表面を 2 群に分割し、それぞれ FBS およ

びラミニンでコーティングした。FBS コーティングを施した表面は、20% FBS で一晩培養 (37°C、5% CO₂) し調製した。培養後、ディスクを PBS で 1 回洗浄し、空気乾燥させた後、細胞播種を行った。ラミニン (Sigma-Aldrich, cat num L4544-100UL) のコーティングは、製造業者のガイドラインに従って実施した。

2.3 細胞播種

細胞播種は、直径 6mm のディスクに 10'000 cells/cm² の濃度で行った。ディスク当たり 40μL の細胞懸濁液をピペットで取り、表面に 1 滴付着させた。細胞を培養器 (37°C / 5% CO₂) 中に 4 時間静置した。ラミニンコーティングを施したディスク上に、30μL の細胞懸濁液を移動し、細胞播種を実施した。次に、ディスクを細胞培養培地 (2mL/ウェル) で洗い、分析を実施するまで培養した (37°C / 5% CO₂)。

2.4 増殖アッセイ

細胞増殖は、PrestoBlue® (Invitrogen, cat num A13262) アッセイにより、製造業者のプロトコルに従って 1、3、6 日後に評価した。細胞数との相関関係が得られるように、定義済みの細胞濃度 (1500、3000、6000、12000、25000、50000、100000 の細胞) をウェルに播種した。標準曲線の線形回帰適合を使用し、各ディスクの細胞数を計算した (n = 4)。

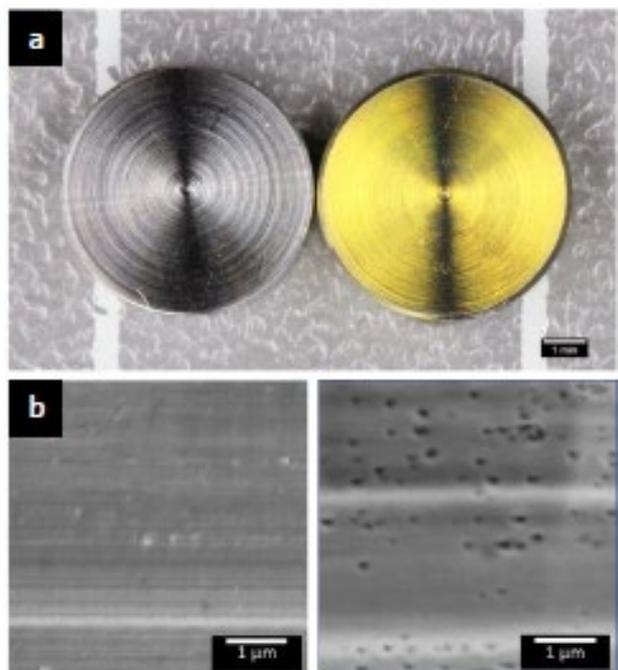


図 1 a) 機械加工 (左) および Xeal (右) のチタン製ディスクの代表的画像。スケールバー: 1 mm。
b) 機械加工 (左) および Xeal (右) の表面の SEM 画像。スケールバー: 1 μ m。

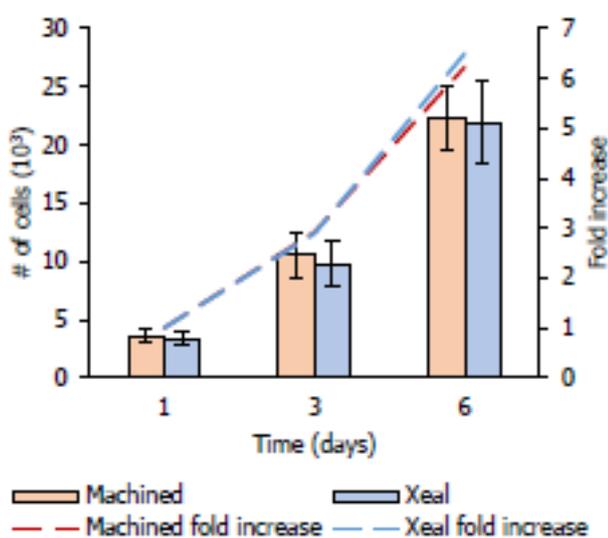


図 2 1、3、6 日後の機械加工表面および Xeal 表面における平均 HFIB-G 細胞数。右軸は、1 日後の細胞数に正規化された HFIB-G 細胞の経時的な増加倍数。エラーバーは標準偏差を表す。

2.5 固定

サンプルを PBS で 1 回洗浄した後、10%中性緩衝ホルマリン溶液を用いて 20 分間室温で培養し、細胞を固定した。培養後、PBS で 3 回洗浄し、

ホルマリンの余剰を取り除いた。サンプルは、その後使用されるまで 4°C で保管した。

2.6 DAPI 定量化

細胞核の定量化は、DAPI 染色によって実施した。40 倍の顕微鏡倍率を利用し、DAPI 信号を 358 nm で読み取った。細胞核は、CellSens ディメンション 1.6 ソフトウェアの「計算と測定」により自動で計算された。

2.7 コラーゲン-I タンパク質レベル

コラーゲン産生の定量は、MicroVue™ C1CP ELISA キット (Quidel, cat num 8003) を用いて、製造業者のプロトコルに従って実施した。コラーゲン-I の量は、値を細胞集団に正規化するため、細胞 1000 個当たりで算出した (n = 8)。

2.8 焦点接着染色

固定細胞を 0.1%トリトン X-100 で透過処理し、1% BSA 含有 PBS 中で 30 分間ブロックし、初代マウス α ビンキュリン抗体 (1:250) で 1 時間培養し、二次 Alexa Fluor 488 α マウス抗体 (1:400) および TRITC 結合ファロイジンで 1 時間培養し、その後、DAPI (300ng/mL) で染色した。

2.9 画像取得

Olympus IX81 倒立顕微鏡でディスクを分析した。CellSens Dimension ソフトウェアバージョン 1.6 を使用して蛍光画像を取得し、DAPI 細胞数の全体画像を撮影した。

2.10 統計解析

統計解析は、SigmaStat 3.5 ソフトウェアを使用して行った。One Way ANOVA を使用し、表面タイプ間の差を検定した。各表面タイプの相互比較を行うため、有意性結果について、Tukey の事後検定によってさらに解析した。

3. 結果と考察

チタンおよびチタン合金の陽極酸化プロセスは、材料の表面に物理的・化学的変化を引き起こすことが報告されている¹⁸。Xeal 表面の目視検査によって、銀色から黄色への表面色の変化が明らかに

なった (図 1a)。Xeal ディスクの表面にナノ構造が容易に認められ、全表面積の増加が示唆された (図 1b および 1c)。

3.1 線維芽細胞の挙動に対する陽極酸化の影響

線維芽細胞が両表面に付着し、両表面上で成長する能力について、細胞培養開始から 1、3、6 日後に評価した。評価を実施した全時点において、HFIB-G 細胞の総細胞数および成長速度は、両表面間で同等であった (図 2)。同様に、線維芽細胞活性および組織再生¹⁹⁻²¹の指標であるコラーゲン-I のタンパク質レベルも、全 3 時点において差がなかった (すべて $p>0.05$)。この結果から、コラーゲン-I レベルは、陽極酸化プロセスに影響されなかった。

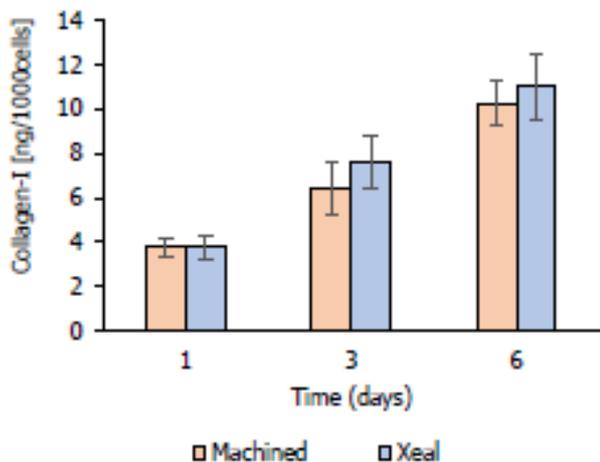


図 3 1、3、6 日後の機械加工表面および Xeal 表面における HFIB-G 細胞 1000 個当たりのコラーゲン-I 平均量。エラーバーは標準偏差を表す。

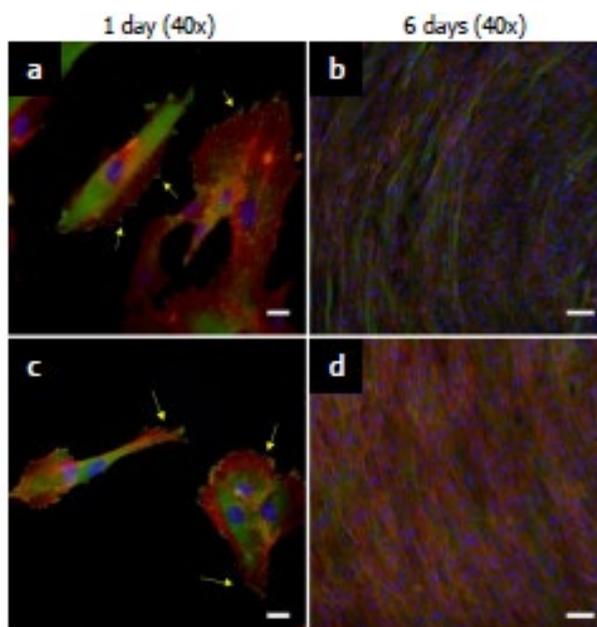


図 4 HFIB-G 細胞のアクチン (赤色)、DAPI (青色)、ビンキュリン (緑色) によるトリプル蛍光染色。a) および b) は、それぞれ 1 日後および 6 日後の機械加工表面における HFIB-G 細胞。1 日後に、細胞の輪郭を描く小さな緑色の点として接着域が認められる。c) および d) は、それぞれ 1 日後および 6 日後の Xeal 表面における HFIB-G 細胞。スケールバー： a) および c) は 20 μm 、b) および d) は 100 μm 。

次に、線維芽細胞の形態について、細胞骨格の成分としてアクチンフィラメント、焦点接着のメディエーターとしてビンキュリン、さらに DAPI 核染色を加えたトリプル蛍光染色により分析した。焦点接着領域は、機械加工および Xeal の両表面において、細胞の輪郭を描く小さな緑色の点として肉眼で見えた (図 4a および c)。細胞培養から 6 日後、線維芽細胞はコンフルエントに達し、表面に存在する溝に沿って放射状に整列していた (図 4b および d)。機械加工表面と Xeal 表面を比較し、線維芽細胞の形態に大きな差は見られなかった。

3.2 ケラチノサイトの挙動に対する陽極酸化の影響

線維芽細胞の評価に続き、ケラチノサイト成長について同じ細胞培養モデルにおいて評価した。1 日後、機械加工表面と Xeal 表面との間に有意差は認められなかった (図 5a)。3 日後に Xeal 表面の

細胞数は機械加工表面の細胞数よりも有意に多く (図 5a)、6 日後には両表面の上皮細胞数の差はさらに大きくなり、Xeal 表面がケラチノサイト増殖をより強く促進できたことが示唆される。増加倍数を計算することによって、Xeal 表面での細胞成長がより早いことが確認された。1 日後の細胞数の小さな差は、細胞が新たな表面に適応した結果、増殖速度が遅かったことと関係している可能性が高かった。

細胞生存度の評価に加え、DAPI 染色による細胞数の定量化を 1、3、6 日後に実施した。結果は、これまでの研究結果を確認するものであり、Xeal 表面において総細胞数がより多いことを示した。

(図 5b)。Xeal 表面と機械加工表面との間に見られた差について、どの程度が Xeal 表面の特性のみによって生じたのかを評価するため、ラミニンまたは FBS を使用してディスクのコーティングを行った。ラミニンは基底膜の主要成分であり、優れた支援を行うことがよく知られており²²、それに対して FBS は、ケラチノサイト増殖を支援するために使用される標準的なコーティングである。HGEPP 細胞は、ラミニンまたは FBS でコーティングされた Xeal 表面および機械加工表面の両表面に付着し、両表面において広がったが、3 時点のいずれにおいても細胞数に有意差は見られず (図 6)、既述の差が実際には 2 種類のチタン製ディスクの表面特性の変化に起因することが確認された。

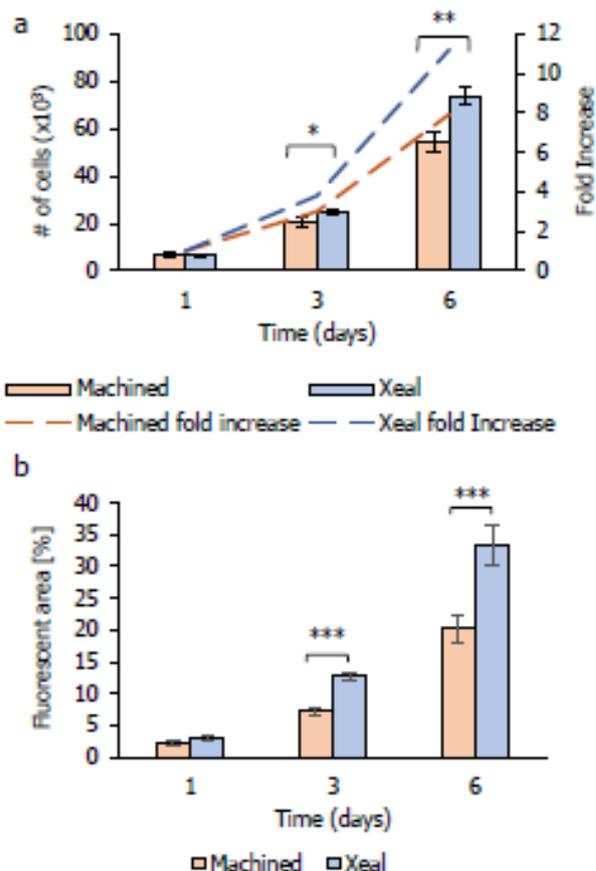


図 5 a) 1、3、6 日後の機械加工表面および Xeal 表面における HGEPP の平均細胞数。右軸は、1 日後の細胞数に正規化された HGEPP 細胞の経時的な増加倍数。b) 1、3、6 日後の機械加工表面および Xeal 表面における細胞の総 DAPI 蛍光面積の定量化。エラーバーは標準偏差を表す。有意水準 : p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***)。

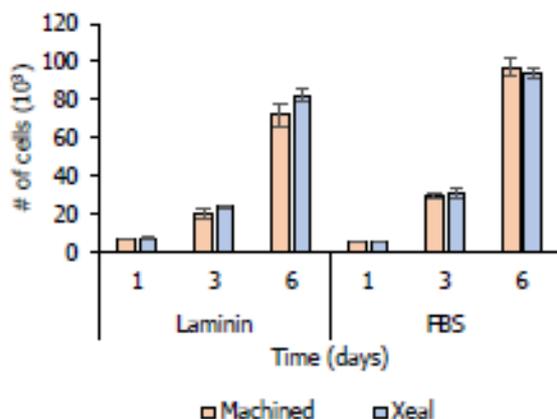


図 6 (左) 1、3、6 日後のラミニンでコーティングされた機械加工表面および Xeal 表面における HGEPP の平均細胞数。(右) 1、3、6 日後の FBS でコーティングされた機械加工表面および Xeal

表面における HGEPP の平均細胞数。エラーバーは標準偏差を表す。

異なる表面における細胞形態の定性的評価をトリプル蛍光染色によって実施したところ、焦点接着点の細胞付着および形成がすべての表面タイプ（コーティングを施していない、およびラミネンまたは FBS でコーティングを施した Xeal 表面および機械加工表面）において示された（図 7）。細胞形態は極めて類似しているように見え、すべての場合において、アクチンフィラメントが細胞・基質間および細胞間接着を支えていることが認められた。興味深いことに、アクチンフィラメントは細胞体全体にわたり均等に分布しており（図 7、黄色の矢印）、活発な細胞骨格の再配列を示し、細胞が基質表面上で増殖および遊走していることを示唆した。すべての場合において焦点接着点にビキュリンタンパク質が検出され、Xeal 表面が対照表面と同様に焦点接着付着を支えることができる基質であると示唆された。

4. 結論

細胞生存度および細胞数を定量化することによって、Xeal 表面が HGEPP 細胞の増殖を高める能力を有することが確認された。これらの結果は、陽極酸化が上皮細胞でラミネンとの相互作用を高め、インテグリン、続いて焦点接着キナーゼ (FAK) を活性化し、その結果、増殖性細胞応答を生じることを明らかにした、これまでに報告済みの研究を裏付ける²³。予想していたとおり、両表面間の化学的・物理的相違をマスキングするために機械加工表面および Xeal 表面をラミネンまたは FBS でコーティングした場合、細胞増殖に大きな差は見られなかった。興味深いことに、HFIB-G 細胞増殖、コラーゲン-I タンパク質レベル、細胞形態は両表面間で同等であり、線維芽細胞およびケラチノサイトが特定の表面に対して異なる反応を示すことが確認された。これらのデータは、Xeal 層によって引き起こされる化学的・物理的変化が細胞成長において見られた差の主要メディエーターであることを確認する。この研究結果は、表面性状およびナノトポグラフィーが細胞挙動に対していかに強い影響を与え得るかということを示す科学

文献によって裏付けられる^{18, 23, 24}。結論として、本研究は、チタン合金の陽極酸化が線維芽細胞の増殖およびコラーゲン-I の産生を支えるために化学的・物理的特性を維持しつつ、HGEPP 細胞の増殖を高める可能性を秘めていることを示唆する。新たに開発された表面の性能を確かめるために、また組織の健康改善に関する表面性状および形状の寄与についてより理解を深めるために、さらなる研究が行われている^{25, 26}。さらに、Xeal アバットメントに関するランダム化比較試験の最近報告された成果によって、機械加工アバットメントと比較し、粘膜が一貫してより健康であったことが示されている²⁷。

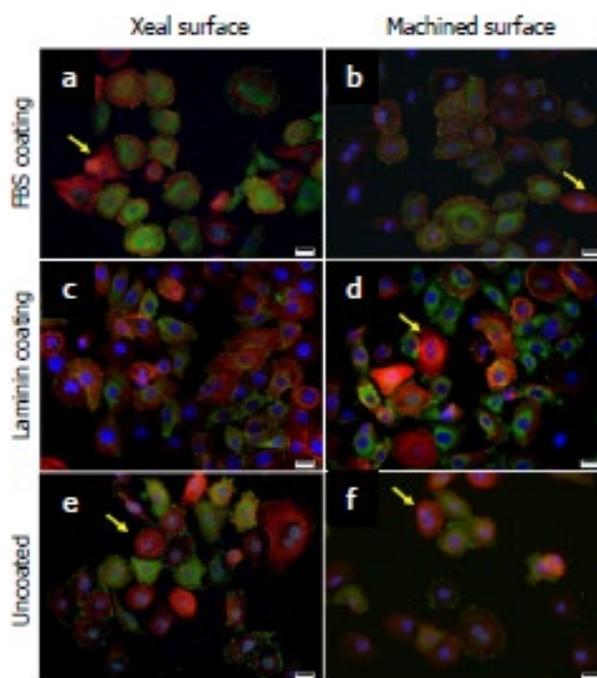


図 7 HGEPP 細胞のアクチン (赤色)、DAPI (青色)、ビンキュリン (緑色) によるトリプル免疫蛍光染色。FBS でコーティングした a) Xeal 表面および b) 機械加工表面。ラミネンでコーティングした c) Xeal 表面および d) 機械加工表面。コーティングを施していない e) Xeal 表面および f) 機械加工表面。スケールバー：20 μm 。

利益相反

著者は、本研究に関し利益相反がないことを宣言する。Andrea Venturato および Angelines Gasser は現在、Nobel Biocare Services AG の従業員であ

り、寄与研究者 (contributing scientist) として本研究に参加した。

資金提供

本研究のための試験材料および試薬は、Nobel Biocare Services AG から供給され、また資金提供を受けた。

References

1. Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T. & Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* 29, 739-767 (2011).
2. Teng, F.-Y. et al. A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorganic chemistry and applications* 2012, 687291-687291 (2012).
3. Anselme, K. & Bigerelle, M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomaterialia* 1, 211-222 (2005).
4. Feng, B., Weng, J., Yang, B.C., Qu, S.X. & Zhang, X.D. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials* 24, 4663-4670 (2003).
5. Annunziata, M. & Guida, L. The Effect of Titanium Surface Modifications on Dental Implant Osseointegration. *Front Oral Biology* 17, 62-77 (2015).
6. Rompen, E., Domken, O., Degidi, M., Farias Pontes, A.E. & Piattelli, A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clinical Oral Implants Research* 17, 55-67 (2006).
7. Kononen, M., Hormia, M., Kivilahti, J., Hautaniemi, J. & Thesleff, I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 26, 1325-41 (1992).
8. Mustafa, K., Lopez, B.S., Hultenby, K., Wennerberg, A. & Arvidson, K. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clinical Oral Implants Research* 9, 195-207 (1998).
9. Hormia, M., Könönen, M., Kivilahti, J. & Virtanen, I. Immunolocalization of proteins specific for adherens junctions in human gingival epithelial cells grown on differently processed titanium surfaces. *Journal of Periodontal Research* 26, 491-497 (1991).
10. Bruce, A.A., Johnson; Julian, Lewis; David, Morgan; Martin, Raff; Keith, Roberts; Peter, Walter. *Molecular Biology of the Cell* (2015).
11. Velnar, T., Bailey, T. & Smrkolj, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 37, 1528-42 (2009).
12. Shaw, T.J. & Martin, P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci* 122, 3209-13 (2009).
13. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21, 667-681 (2000).
14. Humphries, J.D. et al. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 179, 1043-57 (2007).
15. Case, L.B. et al. Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nature Cell Biology* 17, 880 (2015).
16. Frisch, S.M. & Screaton, R.A. Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 555-562 (2001).
17. Milleret, V. et al. Rational design and in vitro characterization of novel dental implant and abutment surfaces for balancing clinical and biological needs. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, epub ahead of print (2019).
18. Kim, K., Lee, B.-A., Piao, X.-H., Chung, H.-J. & Kim, Y.-J. Surface characteristics and

- bioactivity of an anodized titanium surface. *Journal of periodontal & implant science* 43, 198-205 (2013).
19. Marsell, R. & Einhorn, T.A. The biology of fracture healing. *Injury* 42, 551-555 (2011).
 20. Wang, Y., Zhang, Y. & Miron, R.J. Health, Maintenance, and Recovery of Soft Tissues around Implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 18, 618-634 (2016).
 21. Sculean, A., Gruber, R. & Bosshardt, D.D. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *Journal of Clinical Periodontology* 41, S6-S22 (2014).
 22. Tjin, M.S. et al. Biologically relevant laminin as chemically defined and fully human platform for human epidermal keratinocyte culture. *Nature Communications* 9, 4432 (2018).
 23. Takebe, J., Miyata, K., Miura, S. & Ito, S. Effects of the nanotopographic surface structure of commercially pure titanium following anodization–hydrothermal treatment on gene expression and adhesion in gingival epithelial cells. *Materials Science and Engineering: C* 42, 273-279 (2014).
 24. Huang, H.-H., Wu, C.-P., Sun, Y.-S., Yang, W.-E. & Lee, T.-H. Surface nanotopography of an anodized Ti–6Al–7Nb alloy enhances cell growth. *Journal of Alloys and Compounds* 615, S648-S654 (2014).
 25. Susin, C., Fiorini, T., Demoner Ramos, U. & Schüpbach, P. Safety and Efficacy of a Novel Anodized Abutment on Soft Tissue Healing in Yucatan Minipigs. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, epub ahead of print (2019).
 26. Roffel, S. et al. Evaluation of a novel oral mucosa in vitro implantation model for analysis of molecular interactions with dental abutment surfaces. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, epub ahead of print (2019).
 27. Hall, J., Neilands, J., Davies, J.R., Ekestubbe, A. & Friberg, B. A randomized, controlled, clinical study on a new titanium oxide abutment surface for improved healing and soft tissue health. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, epub ahead of print (2019).

Copyright

© 2019 The Authors. Published by FOR.

Liability Disclaimer

This article is intended for use by professionals only. Neither Foundation for Oral Rehabilitation nor the author(s) of this article make any representation or warranty, whether implied or express, nor assume any liability with regards, for example, to fitness of the information for a particular purpose or completeness of the information provided herein.

How to cite this article: Michael Nossowitz, Misha Teale, Stephanie Mathes, Andrea Venturato, and Angelines Gasser. Evaluation of anodized surfaces designed for improved soft tissue integration. *Foundation for Oral Rehabilitation (FOR)* 2019, pp. 1-7.

www.for.org/scientific-article/001