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*

大谷 忠^{*1}, 中井 毅尚^{*2}, 川崎 祐平^{*2}
森 隆治^{*3}, 内尾 祐司^{*3}

Cell Migratory Characterization in Micro Processing Surface of Bone Material for Surgery Healing Control

Tadashi OHTANI^{*4}, Takahisa NAKAI, Yuhei KAWASAKI,
Ryuji MORI and Yuji UCHIO

^{*4} School of Education, Ibaraki University,
2-1-1 Bunkyo, Mito-shi, Ibaraki, 310-8512 Japan

The cell migratory characterization in micro machined surface of compact bovine bone was evaluated on basic research for surgery healing control. The property of orthopedic surgery processing was investigated prior to evaluate the cell migration, and the property was classified in the four processing mechanisms of cutting, grinding, polishing and cracking in terms of engineering processing. The cell migratory characterization was evaluated in the machined surface with above four mechanisms. The result showed that the cell migration in straight direction along the groove tended to spread the indefinite direction, according to change in the mixture groove track from straight one. From these results, the cell migratory characterization was affected by the groove track in the machined surface as previous study reported by titanium surface. The effect on the cell migration was also controlled by the roughness in machined surface with the larger groove track.

Key Words: Biomaterials, Bone, Surface Roughness, Micro Machining, Cell Migration, Cell Culture, Surgery Healing

1. 結 言

医療現場では人体の腕やひざ等が骨折し、折れた骨や剥がれた骨を固定する場合には、ピンやスクリューを用いて治療が行われる¹⁾。治療箇所固定する部品は、金属やプラスチックの材料が用いられるため、長期に渡って体内に残存し、なんらかの悪影響を及ぼす恐れがある。このような人工的な材料の代わりに、体内の骨と癒合するような同質の材料が利用できれば、上記の悪影響の心配がなくなる。

骨を材料の側面から見れば、組織の再生を促す細胞が働き、自発的に蘇生できるリモデリングの作用を有する²⁾。このような骨特有の作用を利用して、我々骨スクリュー創製グループでは、骨自身を治療用の固定部品として用いる試みを進めてきた³⁾。骨材を治療用の部品に用いた場合には、骨同士の接触における癒合の状態が、患部の回復に対して重要になる。さらに、

最適な箇所から癒合を促進したり、遅らせる等の制御によって、部品がよりうまく固定できれば、従来にはなかった新たな治療の展開が期待できる。

体内の骨と生体適合材料との癒合の研究においては、生体材料として知られているチタンを用いて、チタン表面における細胞の初期付着を調べた研究や細胞遊走に及ぼす表面形状の影響を調べた結果等が報告されている^{4,5)}。特に表面形状の影響においては、組織を再生する細胞がチタン表面のナノスケールの穴を感知する働きがあることが指摘されている⁴⁾。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骨部品の治癒効果の制御を目的とした場合には、骨表面における細胞の遊走について検討した報告はない。

そこで、本研究では治療に骨部品を用いることによって、治癒効果の制御のための骨組織の再生能力に関する基礎的研究を目的としている。本報では、その第一歩として、実際の医療現場で利用されている加工技術を工学的な観点から分類し、医学的な骨モデル加工面の抽出を試みた。さらに、骨組織の再生能力に関する基礎的研究として、再生時に組織を増殖させるために必要な骨芽細胞(骨組織をつくる細胞)がランダム

* 原稿受付 2008年5月22日。

^{*1} 正員、茨城大学教育学部(☎310-8512 水戸市文京2-1-1)。

^{*2} 島根大学総合理工学部(☎690-8504 松江市西川津町1060)。

^{*3} 島根大学医学部。

E-mail: t-ohtani@mx.ibaraki.ac.jp

に走化する能力（遊走能）に着目し、医学的な骨モデル加工面における細胞の遊走能について検討した。

2. 実験方法

2・1 供試材 供試材には牛脛骨における皮質骨部分を用いた。骨材はラメラ層からなるオステオンと呼ばれる緻密質の骨組織が、軸方向に配列することによって、組織に異方性を有する⁶⁾。このような骨の異方組織は、加工時における組織の破壊形態に影響するため⁷⁾、図1(a)に示すように、1本の脛骨中央部から、常に円周方向(C)に対して、平行な断面が供試面となるように試験片を抽出した。その断面を旋削加工により平滑に仕上げた場合をコントロール面とした。さらに、実際の医療現場で利用されている整形加工器具を用いて、コントロール面に表面加工を施した。これらの器具による加工特性を調べるため、器具の先端形状や加工後における表面の観察結果から、工学的な観点をもとに、医学的な整形加工の機構を分類した。分類された加工機構を基にして、工学的な加工法により再現した骨モデル加工面を用いて、細胞培養実験を行った。

2・2 細胞培養実験 医学的なモデル加工面における細胞の遊走能を評価するため、上記の実験同様、細胞培養実験の試験片を図1(a)に示すような1本の脛骨中央部から切り出した。試験片は図1(b)に示すように、長さ方向(A:軸方向)が10mm、幅方向(C:円周方向)が10mm、厚さ方向(R:半径方向)が2mmとし、そのA-C方向から形成される断面（以下では円周断面と記す）に培養する細胞を植え込む作業（播種）

を行った。細胞を播種する段階では、初期遊走の条件を一定とするため、円周断面の中央部に直径が2mm、深さが1mmの穴をドリル加工した。

細胞培養実験では、ガス滅菌した試験片を1週間静置し、ガス抜きを行った試験片を実験に供した。生体における細胞培養の実験では、生体内(In vivo)および生体外(In vitro)の条件に大別される。本実験では人為的に実験条件をコントロールしたIn vitroの環境下で細胞培養を行った。培養実験では、最初に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。培地は α -MEM(Minimum Essential Medium Alpha Medium)を用い、30分間培地に静置した後、試験片の接線断面中央の穴に細胞を播種した。播種する細胞は、マウスの骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を用いて、中央部の穴に濃度が 2.5×10^4 個/ $2 \mu\text{l}$ を各試験片に $2 \mu\text{l}$ 毎播種した。さらに、骨表面に播種した細胞を培地内においても定着できるようにするため、予備実験の結果から、培養実験前に骨試験片を10分間静置させた。その後、細胞を播種した骨試験片をシャーレ内に培地で満たし、インキュベーター内において4日間培養を行った。培養の環境は、温度が 37°C で、 $5\%\text{CO}_2$ のインキュベーター内の雰囲気下とした。

2・3 細胞の遊走能の評価 細胞の遊走能について評価するため、培養実験後における円周断面の細胞の状態を観察した。細胞の観察は、中央部の穴から増殖した細胞を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、それを蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞の遊走能の評価は、顕微鏡写真において観察された蛍光色を遊走している細胞と見なし、その様子から細胞の遊走能を評価した。細胞の遊走能は、図1(b)のように、円周断面の中央の穴から放射状に分類したA～Hの各エリアに分けて評価した。各エリアにおける評価は、中央の穴中心から最も離れた地点に存在する細胞5つを測定し、画像解析により、中央からの距離を求め、その平均値を各エリアにおける遊走距離として求めた。

3. 結果および考察

3・1 医学的な整形加工における加工機構の特性

図2(a)-(i)は医療現場で利用されている整形加工器具を観察した時の先端形状を示す。整形加工器具には、図2(a)および(b)に示すように、医療用のみや挟んで骨を分離するリウエル鉗子が用いられている。また、図2(c)-(f)のように、器具を手動や機械的に一方向および往復運動させることによって、先端の鋸やワイヤーで骨を切断したり、図2(g)-(i)のように、医療用やすりによって骨表面を除去したり、切れ刃を機械的に回転させて除去するスチールバーやダイヤモンドバーが用いられている。

Fig.1 Configuration of sample specimen used in this experiment.

Fig.2 Shape of edge in orthopedical surgical instruments.

図3は整形加工器具により骨材の接線断面を加工した時、その断面組織を走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて観察した結果である。図3(a)および(b)のように、医療用のみやりウエル鉗子によって加工された骨表面は、オステオンのラメラ層が段差を伴って破壊したおうとつのある表面が観察できる。また、図3(c)-(d)のように、鋸で切断した表面は、骨が切削によって除去され、細かい切り屑の付着が観察できる。図3(e)-(f)のように、ワイヤで切断した場合には、ワイヤのおうとつによって引っ掻かれ、不規則な表面の傷が観察できる。また、図3(g)-(i)のように、工具先端の大きなおうとつや小さなおうとつの切れ刃によって、表面が掘り起こされ、引っ掻かれた様子が観察できる。

以上の整形加工器具の先端形状や加工面の観察結果を基に、医学的な整形加工の特性について、工学的な観点から整理した結果を表1に示す。これらの器具は、切れ刃の先端角が正および負のすくい角による刃先から構成されており、一方向あるいは往復運動の作用により、骨を除去することができる。さらに、その加工

Fig.3 Scanning electron microscope of bone surface processed by orthopedical surgical instruments.

特性は、鋸による切削、振動切削、規則的な方向性のある引っ掻きや不規則な方向への引っ掻き、破壊の誘発等を有する。これらの加工特性を工学的な除去機構に対応させると、切削による除去機構や負のすくい角の切れ刃が材料を引っ掻き固定および遊離砥粒の除去機構、破壊を誘発する除去加工（以後割裂加工とする）の機構に分類できる⁸⁾。

以上の結果より、本実験で取り上げた骨整形加工の機構は、工学的な観点から、切削、固定砥粒、遊離砥粒および割裂加工の除去機構と対応している。

3・2 骨加工面における細胞の遊走能 前節で分類した医学的な加工機構を工学的な方法により再現したモデル加工面において細胞培養実験を行った。これらのモデル加工面は、図4(a)-(h)に示すように、切削、研磨、割裂加工面およびコントロール面とした。図4(a)-(b)の切削加工面は、すくい角が 0° の旋削用正三角形チップを用いて、円周断面に垂直な方向に、切り込み深さが $t=100\mu\text{m}$ および $20\mu\text{m}$ の条件で、切削速

Table 1 Property of bone surface processed by orthopedical surgical instruments.

Surgical instruments	Rake angle	Removal direction	Property of orthopedical surgical processing	Model mechanism of engineering processing
(c) Manual saw	Negative	Reciprocation	Saw cutting	Cutting
(d) Vibration saw	Negative	Reciprocation	Saw vibratory cutting	
(g) File	Negative	Reciprocation	Scratching	Bonded abrasive
(h) Steel bar	0°	Unidirectional	Scratching	
(i) Diamond bar	Negative	Unidirectional	Grinding	
(e) Jig saw	Negative	Loose direction	Loose scratching	Loose abrasive
(f) T-saw	Negative	Loose direction	Loose scratching	
(a) Chisel	Positive	Unidirectional	Cracking	Cracking
(b) Clamp	0°	Unidirectional	Cracking

Fig.4 Scanning electron microscope of model bone surface processed by engineering method.

度が 5mm/s の条件でシェーパー加工した場合である。また、研磨加工面は図 4(c)-(f)のように、平均砥粒径が $d=180\mu\text{m}$ および $40\mu\text{m}$ のアルミナ系砥粒を用いて加工した固定および遊離砥粒加工面である。両砥粒加工面は、0.1m の距離直線移動できる台上に研磨紙を固定し、また遊離砥粒を散布し、上部から試験片を 0.02MPa

Fig.5 X-Y diagram of cell migratory distance on bone surface processed by engineering method.

で押し付け、繰り返し一方に 10m の距離を研磨した場合である。切削加工面や固定砥粒加工面では、切れ刃の直線的な軌跡が連続的に形成されているのに対し

て、遊離砥粒加工面では切れ刃の引っ掻きの作用により、方向性のない微小なおうとつが様に観察できる。図4(g)のように、工具刃先角が 30° の切れ刃により破壊を誘発させた割裂加工面では、不規則なおうとつが形成されている。また、上記のモデル加工面に対して、図4(h)のような、平滑な断面によるコントロール面を比較のために用いた。コントロール面は、すくい角が 0° の旋削用チップを用いて300rpmの回転速度による旋削加工を行った場合である。また、図4に示すようなX-Yの矢印は、細胞培養実験後に細胞の遊走方向を評価するために定義した座標系を意味する。ここでのX-Y座標系と試験片の位置関係においては、X(C:円周方向)-Y(A:軸方向)とした。

図5(a)-(h)はこれらの加工面において細胞培養実験を行い、円周断面中央の穴を中心としたX-Y座標における細胞の遊走距離を求めた結果である。図5(a)-(b)の切削加工面では、X座標に比べて、Y座標の方向に細胞が遊走する傾向にあり、切り込み深さが大きいほどその傾向は著しい。図5(c)-(d)の固定砥粒加工面では、切削加工と同様、Y座標の方向に細胞が遊走する傾向にあるものの、切削加工に比べて、Y座標への細胞の遊走は抑制される傾向にある。図5(e)-(f)の遊離砥粒加工面では、砥粒径が大きい#80の場合には、固定砥粒に比べて、細胞の遊走は同心円上に広がる傾向にある。ところが、砥粒径が小さい#400の場合には、#80に比べて、細胞の遊走は任意の方向に拡大する傾向にある。また、図5(g)の割裂加工面においては、遊離砥粒加工に比べて、さらに任意の方向へ細胞の遊走が拡大しており、図5(h)のコントロール面ではあらゆる方向への細胞の遊走が著しい。

以上の結果から、骨加工面における細胞の遊走能は、本実験で用いた加工面のおうとつの状態によって異なることがわかる。

3・3 細胞遊走に及ぼす加工面のおうとつの影響

細胞の遊走能に及ぼす加工面のおうとつの影響について詳細に調べるため、図6-8はX-Y座標の方向に細胞が遊走した距離 L_X と L_Y との関係について、加工機構別に整理した結果である。図中の結果は、図5(a)-(h)の各条件において、5回の細胞培養実験を行い、A~Hの各エリアにおける最大遊走距離のデータをすべてプロットした結果である。図中に示した点線の対角線上にプロットが存在する場合には、XおよびY座標の方向に均等に細胞が遊走していることを意味する。図6の切削加工の機構においては、X-Y座標における細胞が遊走する方向は、データの集団から2つのグループに大きく分類できる。その1つのグループは、

Y方向に大きく細胞が遊走する傾向にあり、その傾向は切り込み深さが $t=100\mu\text{m}$ の場合に著しい。また、図7の固定砥粒加工の機構においても、切削加工の機

Fig.6 Relationship between the migratory distance L_X and L_Y on the cutting surface.

Fig.7 Relationship between the migratory distance L_X and L_Y on the bonded abrasive surface.

Fig.8 Relationship between the migratory distance L_X and L_Y on the loose abrasive and cracking surfaces.

構と同様、2つのグループの中でY方向に大きく細胞が遊走する場合があります、それぞれのグループにおけるデータのばらつきは切削加工の場合に比べて大きくなる傾向にある。図8の遊離砥粒加工および割裂加工の機構においては、対角線を境にXおよびY座標のいずれの方向においてもデータがばらついており、任意の方向に細胞が遊走している。すなわち、細胞の遊走能は、加工面に形成されたおうとつの影響を受け、おうとつが規則的に配列する場合から交錯する場合へと移行するに従って、細胞も不確定な任意の方向へと遊走することがわかる。

図9は図6-8のすべての加工面における表面粗さを測定し、X座標の方向への最大高さ(R_{zx})の平均と細胞の平均遊走距離 L_x との関係について求めた結果である。X座標の方向への細胞の遊走は、割裂加工を除いた機械的除去加工では、(R_{zx})が増大するとともに、 L_x は滑らかに減少している。チタン表面における細胞の増殖を調べた結果においては、直径が約 $30\mu\text{m}$ の穴のある表面⁴⁾や R_z 約 $20\sim 30\mu\text{m}$ のおうとつ⁵⁾では、サブマイクロの穴のある表面や $R_z=1\mu\text{m}$ 以下の平滑な面に比べ、細胞の増殖が著しいことが報告されている。このことから、今回の骨加工面においてもチタン加工面の場合と同様、細胞の遊走はおうとつの影響を受けるとともに、大きなおうとつを形成する除去加工面では、細胞の遊走も抑制されることがわかる。なお、骨加工面では本来の骨組織の影響によって、チタン表面のような平滑な面が得られない場合や破壊の誘発によって生じた表面では、骨材特有の細胞の遊走能を有する可能性がある。これらの結果のさらなる解明については今後の課題となる。

以上の結果は、骨部品や骨手術における加工方法や加工面の性状を工夫することにより、骨芽細胞の進行を制御でき、骨同士が接触する条件での治癒効果の促

Fig.9 Relationship between the migratory distance L_x and the maximum height (R_{zx}).

進や局所的な抑制・制御等に役立てるための基礎的知見になり得る。

4. 結 語

医療現場で用いられている医学的な整形加工技術を工学的な観点から分類し、導出された骨のモデル加工面において細胞培養実験を行った。得られた結果は以下の通りである。

- (1)医療現場で利用されている骨整形加工技術は、工学的な観点から、切削、固定砥粒、遊離砥粒および割裂を誘発する除去機構と対応した。
- (2)細胞培養実験の結果から、骨加工面における細胞の遊走能は、加工面に形成されるおうとつの大きさや形状によって異なった。
- (3)細胞の遊走能は、加工面に形成された切れ刃の軌跡に沿って細胞が遊走する傾向から、その軌跡が直線の場合から交錯する場合へと移行するに従って、不確定な任意の方向へと遊走することがわかった。
- (4)以上の細胞の遊走能は、機械的除去加工によって形成されるおうとつの影響を受け、大きなおうとつを形成する除去加工面では細胞の遊走が抑制された。

文 献

- (1) Wheeler, L., Mcloughlin, W., Biomechanical assessment of compression screws, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, No.350(1998), pp.237-245
- (2) Curry, D., *Bones Structure and Mechanics*, (2002), p.15, Princeton University Press.
- (3) Project promote organization in Shimane University, Annual report of 2007 year for cooperative project in field of medical, engennering and agriculture(in Japanese), (2008), pp.79-90, Shimane University.
- (4) Zinger, O., Anselme, K., Denzer, A., Haberasetzer, P., Wieland, M., Jeanfils, J., Hardouin, P., Landolt, D., Time-dependent morphology and adhesion osteoblastic cells on titanium model surface featuring scale-resolved topography, *Biomaterials*, Vol.25 (2004), pp.2695-2711
- (5) Itahashi, H., Miyazaki, T., Fujimori, S., Lee, W., Early cellular responses of osteoblast-like cells in vitro on titanium surface with different micromorphologies, *Dental Materials Journal*, Vol.14, No.1 (1995), pp. 136-141.
- (6) Bullough, PG., *Vigorita's Orthopaedic Pathology*, (1997), pp.1-36, London, Mosby-Wolfe.
- (7) Ohtani, T., Nakai, T., Kawasaki, Y., Mori, R., Uchio, Y., Effect of anisotropic tissue on chip formation in micro cutting of bone, *Journal of the Japan Society of Mechanical Engineers*, Vol.75, No.749(2009), pp.197-202.
- (8) The Japan Society of Mechanical Engineers, *The principle of product processing*, (1998), p.125, p.145, Nikkan Kougyo Press.