

学位論文内容の要約

愛知学院大学

乙 第 号	論文提出者 鈴木 丈夫
論文題目 チタン表面の経時的変化とその回復方法	

I. 緒言

埋入されたチタンインプラントとその周囲に形成される骨組織の状態は、骨結合や骨-インプラント結合とよばれ、創傷治癒やリモデリングとは異なった状態を呈する¹⁻⁶⁾。組織工学的には、チタン表面はこの現象において足場としての働きをする。骨組織や歯牙欠損の再建治療材料としてのチタンインプラントは、主に歯科および整形外科領域において骨結合の概念に基づき使用されている。整形外科領域におけるチタンインプラント治療では、5-40% (平均 25%) の症例では再手術が行われている⁷⁻¹¹⁾。また、10年から25年で再手術が必要とされている¹²⁾。一方、歯科インプラント治療においては、骨-インプラント結合が不良である場合には補綴歯による上部構造を構築して咬合を回復するまでの期間が延長し、高齢者や糖尿病患者などの骨代謝能力が低下した症例では、インプラント治療は制限を受けると言われている¹³⁻¹⁶⁾。これまで、チタンは最も生体親和性の高い金属の一つとして、その物理化学的性質は経時的变化を受けにくいものと考えられてきた。しかし近年、骨-チタン結合に大きく影響を与える要因の一つとして、経時的な hidrocarbon の沈着によるチタン表面の変化が知られるようになり、さらには、チタン表面へ沈着した炭素の除去方法の一つとして、紫外線照射による方法が報告された¹⁷⁾。紫外線照射によりチタン表面は超親水性へと変化するが、これは紫外線照射により形成された親水相の表面構造の変化に起因している。紫外線照射処理では、架橋部位

においてチタン表面の酸素欠乏を誘導し、これにより Ti^{4+} 部位を Ti^{3+} に変化させることで解離性水吸収に好ましい状態となる。材料表面の親水性は表面エネルギーを表すマーカーと考えられており、タンパク質-材料-細胞の相互作用に影響を及ぼすことで、材料の生体適合性を決定するための重要な役割を果たすと考えられている¹⁸⁻²⁰⁾。現在、ほとんどの歯科、整形外科領域におけるチタンインプラント製品は長期保存が可能な材料として市販されている。チタンインプラント製品は製造後、滅菌、梱包、販売店への配送、販売店における保管、診療施設への配送、保管、そして患者への使用といった経過を辿る。この過程のために、これらチタンインプラント製品の時間的制御は不可能である。しかし長い間、時間経過によるチタンへの生物学的影響の変化については知られておらず、検索されていなかった。チタンインプラント製品の使用説明書と製造情報には、通常5年間の滅菌期限の表示以外には使用期限や保管期限などは表記されていない。しかし、最終製品を長期間保管した場合の骨結合の詳細については未だ十分には解明されていない。また、強固な骨-チタンインプラント結合を確立するためにさまざまな表面処理技術が研究されてきた²¹⁻²³⁾。しかし、現在までに報告されているチタンインプラント周囲骨の割合（骨-インプラント接触率）は50-60%程度に留まっていると言われ、改善の余地があると考えられる^{13, 24, 25)}。これらのチタンインプラント周囲では新生骨とチタンの間に軟組織の介在が認められ²¹⁾、多くのチタンインプラントでは骨結合が

100%近くには達していない¹⁾。また、インプラント治療では、強固な骨-インプラント結合が獲得できない場合や骨-インプラント結合が崩壊した際には、インプラント体が脱落する²⁶⁻²⁸⁾。

そこで本実験では、(1)時間経過に伴うチタン表面の変化、(2)紫外線照射によるチタン表面の変化、(3)骨芽細胞の増殖・分化におよぼすチタンの時間経過の影響、(4)骨芽細胞の増殖・分化におよぼすチタンへの紫外線照射の影響について明らかにする目的で、3つの異なるチタン表面（加工直後新鮮面、4週経過面、4週経過後紫外線処理面）を作製してチタン表面の経時的変化や骨芽細胞の増殖・分化への影響を検索し、さらに紫外線照射による影響を検索した。

II. 対象および方法

1) チタン表面処理

実験には、直径20 mm、厚み1.5 mmのグレード2の純チタンディスク (Micheal O' Leary UCLA HSSEAS R&D Shops, Los Angeles, USA) と直径1 mm、長さ2 mmのグレード2純チタン製シリンダー型インプラントを用いた。67%硫酸 (w/w) を使用して120°C、75秒間のエッチング処理を行った純チタン (酸処理群)²⁹⁻³¹⁾ と粒径50 μmの酸化アルミナによるサンドブラスト処理を行った純チタン (サンドブラスト群) の異なる2つの表面を作製した。作製したチタンの表面構造は、走査型電子顕微鏡 (XL30; Philips,

Eindhoven, The Netherlands)を用いて検索した。その後、滅菌水にて3回洗淨して乾燥させた後、直ちに実験を行った群(加工直後新鮮面)、暗室にて4週間放置後に使用した群(4週経過面)、15Wの殺菌灯を用いて、48時間紫外線照射後に使用した群(4週経過後紫外線照射面)に分けた。紫外線の強度と波長は約 0.1 mW/cm^2 ($\lambda = 360 \pm 20 \text{ nm}$) および 2 mW/cm^2 ($\lambda = 250 \pm 20 \text{ nm}$) を使用した²⁹⁾。チタン表面の親水性および疎水性の性状と定量は、自動接触角計測器(DCA-VZ; 協和界面科学株式会社、埼玉、日本)を用い、チタンディスク表面上に1 μl の超純水を滴下して測定した。

作製したチタンサンプルの表面構造は、酸処理では0.5-2 μm 間隔の凹凸からなる比較的均一な微小粗面となっていた。サンドブラスト処理では酸処理と比較して不規則で大きい微小粗面の特徴を有していた。

2) タンパク吸着能

チタン表面へのタンパク質の吸着能を検索するために、牛血清由来アルブミン(Pierce Biotechnology, Rockford, USA)をモデルタンパクとして用いた。各群のチタンディスク(n=3)をアルブミン溶液中(1 mg/ml)に浸漬し、37°C、5% CO₂のインキュベーター内にて2, 24, 72時間インキュベートさせた。その後、0.9%生理食塩水300 μl によりチタンディスクを2回洗淨し、その洗淨液をすべて回収して溶液中のタンパク質をBCA法(Pierce Micro BCA Protein Assay Kit, PierceR, USA)を用いて測定した²⁹⁻³¹⁾。測定はELISA

リーダーにて562 nmの吸光度で行った。回収溶液の測定値を既知の100%濃度タンパク溶液規定値から引くことにより、チタン表面へ吸着しているタンパク量の理論値を算出した。

3) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 (MSCs) (Poietics, Cambrex BioScience, Walkersville, East Rutherford, USA) の培養には、MSC Basal medium (Stemcell Technology, British Columbia, Canada) に、 10^{-6} M Dexamethasone (Sigma, Missouri, USA)、1 M β -Glycerophosphate (Sigma)、5 mg/ml Ascorbic acid (Sigma)、0.85% Antibiotic-Antimycotic (Gibco)、15%ウシ胎児血清 (FBS) (Biowest, Nuaille, France) を添加した培養液を用いた。2回継代した後、80%コンフルエントに達した時点で、細胞を0.25%トリプシンEDTA (1 mM EDTA-4Na) を用いて剥離して回収し、12穴ポリスチレン培養プレートに設置したチタンディスク上に 3×10^4 cells/cm²の細胞濃度で播種した。全ての実験期間を通じて、細胞培養は37°C、5% CO₂、95% Airのインキュベーター中で行い、培養液は3日ごとに交換した。なお、本実験プロトコールはカルフォルニア大学ロサンゼルス校 (UCLA) の動物実験倫理委員会の承認 (UCLA Office of Animal Research Oversight承認番号2005-175-22A) を受けて実施した。

4) 細胞誘導能

チタン表面へのMSCsの誘導能検索には直径8 μm 穴のセルカルチャーインサート(345-024K; Trevigen, Gaithersburg, USA)を用いた。酸処理チタンディスクを下段のチャンバーに置き、上段のチャンバーに細胞を播種した。細胞を播種した後3時間インキュベートし、下段のチタンに付着した細胞をカルセイン-AMを用いて染色してELISAリーダーにて485 nmの吸光度で測定した。播種した細胞数を100%として3つの群のチタン表面に付着した細胞数の割合を定量分析した。

5) 培養初期における細胞接着能

培養初期におけるチタン表面へのMSCs接着能の検索のために、チタン表面に接着した細胞数を測定した。培養開始3時間および24時間後、PBSにて2回洗浄し、15分間、37°Cの環境下で0.1%コラゲナーゼ含有0.25%トリプシンEDTAを作用させて細胞を剥離して回収し、細胞数を血球計測盤にて計測した。その後、走査型電子顕微鏡にてチタン上に残存した細胞を確認した。さらに、テトラゾリウム塩(WST-1; Roche Applied Science, Mannheim, Germany)を用いてチタン表面に接着した細胞数の定量を行った。培養液に100 μl のWST-1試薬を加え、37°Cで4時間インキュベートし、ELISAリーダーにて420 nmの吸光度で測定して細胞活性を評価した。

6) 細胞の形態と形態測定

MSCsの形態と細胞骨格構造の確認には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。培養開始3時間後に酸処理チタンディスク上に接着した細胞を10%ホルマリンで固定し、ローダミンファロイジン (rhodamine phalloidin, Actin filament red color; Molecular Probes, Eugene, USA) を用いて細胞の蛍光染色を行った。さらに、マウス抗パキシリンモノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, USA) を用いて細胞の接触斑を抗体染色し、抗マウス二次抗体 (Abcam, Cambridge, USA) を添加した。染色後、細胞の面積、周径、フェレールの直径について画像分析ソフトウェア (ImageJ; NIH, Bethesda, USA) により定量化して解析した。

7) 細胞増殖能

MSCs の増殖活性を DNA 合成時における BrdU (5-bromo-20-deoxyuridine) の取り込みを検出することで計測した。まず、培養開始3日後に 100 mM BrdU 溶液 (Applied Science, Mannheim, Germany) を培養液に添加して10時間インキュベートさせた。その後、酸処理群およびサンドブラスト群のチタン上の細胞をトリプシン処理して DNA を変性させ、培養液にペルオキシターゼ標識した抗 BrdU 複合体を添加して 90 分間インキュベートを行った。その後、テトラメチルベンジジンを加えて発光させ、ELISA リーダーにて吸光度 370 nm で測定した。また、培養2日後および4日後に細胞密度を評価した。細胞を酸処理群およびサンドブラスト群のチタン上からトリプシン

処理により剥離し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。

8) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

MSCs の ALP 活性については、吸光度分析を用いて測定した。酸処理群およびサンドブラスト群において培養開始 10 日後、チタンディスクを脱イオン蒸留水で洗浄し、250 μ l の p-ニトロフェニルリン酸塩 (LabAssay ATP; Wako Pure Chemicals, Richmond, USA) を加えて 37°C の環境下で 15 分間インキュベートさせた後、ELISA リーダーを用いて吸光度 405 nm で測定した。

9) 石灰化能

MSCs の石灰化能については、カルシウム沈着量を吸光度分析することによって定量測定した。酸処理群およびサンドブラスト群のチタンディスク上で 25 日間培養した後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄して 0.5 M 塩酸を 1 ml 加え、約 12 時間インキュベートさせた。その後、アルカリ性の o-クレゾールフタレインコンプレクソン (Calcium Binding and Buffer Reagent; Sigma, St. Louis, USA) を加えて混和し、クレゾールフタレインコンプレクソン複合体を形成させた後、ELISA リーダーを用いて吸光度 572 nm で測定した。

10) インプラント埋入方法

ラット大腿骨へチタンインプラントの埋入を行うために、Sprague-Dawley 雄性ラット（8週齢）を使用した。まず、1-2%イソフルランを吸入させて麻酔処置を行った。次に、10%プロビドン-ヨウ素溶液で術野を消毒した後、大腿部皮膚および筋膜を切開して大腿骨および膝関節部を露出させた。大腿骨の遠位先端から9 mmの部位に0.8 mmラウンドバーを使って小孔を作製し、歯科用リーマー（#ISO 090 および 100）を使用して小孔を1 mmに拡大形成した。これらの操作は、PBSによる術野の冷却および洗浄と共にを行った。小孔形成後、シリンダー型インプラント（直径1 mm、長さ2 mm）を埋入し、筋組織および皮膚は吸収性縫合糸を使用して縫合した。本実験はUCLAの動物実験委員会の委員長により認証を受け(UCLA Office of Animal Research Oversight 承認番号 2005-175-22A)、アメリカ合衆国農務省の動物実験ガイドラインに従って行った。

11) 骨-インプラント結合強度

骨-インプラント結合強度の検索には、プッシュインテストを使用した^{13, 32)}。シリンダー型チタンインプラントを埋入後、2週間の治癒期間の後に大腿骨を摘出し、インプラントの埋入面が上面になるように常温重合レジンをを用いて大腿骨をアルミ製枠内に固定した。レジンの硬化後、試験機（Instron 5544 electro-mechanical testing system; Instron, Canton, USA）に固定し、2000 Nのロードセルとプッシングロッド（直径0.8 mm）

を使用して先端速度 1 mm/分でインプラント表面から垂直方向に荷重負荷を行った。プッシュインテストによる強度計測には、荷重変位曲線のピーク値を使用した。酸処理群およびサンドブラスト群のインプラントについてそれぞれ、加工直後新鮮面、4週経過面、4週経過後紫外線照射面の3種類のシリンダー型チタンインプラントを作製し、6群に対して各群5匹のラット、合計30匹の大腿骨にインプラントを埋入した (n=5)。

12) 統計解析

細胞 10 個を無作為に抽出して細胞形態計測に用いた。チタン表面の紫外線処理おける効果は Two-way ANOVA によって検討した。また、加工直後新鮮面、4週経過面、4週経過後紫外線照射面の差については、Post hoc Bonferoni 試験を行った。また、データが、1 時点のみの際には One way ANOVA を使用した。

III. 結果

1. 紫外線処理によるチタン表面の変化

酸処理群において 1 μ l の超純水滴下した加工直後新鮮面の接触角は超親水性とされる 3° 以内であった (超親水性: 接触角 5° 以内)。4週経過したチタン表面での接触角は 55° より高い疎水性を示した。酸処理群の4週経過面における接触角は紫外線処理 (4週経過後紫外線照射面) 後には 3° 以内に減少し、超親水性を示した。サンドブラスト群でも同様であつ

た。

2. 紫外線処理によるチタン表面へのタンパク吸着能の変化

各群において、アルブミン吸着能については著明な差が認められた ($p < 0.01$; Two-way ANOVA)。培養 2 時間後において、4 週経過面では約 10% のアルブミンが吸着されていたが、加工直後新鮮面では約 60% のアルブミンが吸着されていた ($p < 0.01$; Bonferoni 法)。培養 72 時間後においても、4 週経過面では加工直後新鮮面と比較してアルブミン吸着の量は 40% 以下になっていた ($p < 0.01$)。培養 2 時間後および 24 時間後において、4 週経過後紫外線照射面では加工直後新鮮面と同等のアルブミン吸着量を示し、72 時間後ではさらに多くなっていた ($p < 0.05$)。

3. 酸処理チタン表面の細胞誘導能と初期細胞接着能

セルカルチャーインサートの孔を通過してチタン表面へ移動した MSCs の細胞数は、培養条件により大きく異なっていた ($p < 0.01$; One-way ANOVA)。4 週経過面において、培養 3 時間後にチタン表面に移動していた細胞の数は、加工直後新鮮面と比較して 50% 程度であり、4 週経過後紫外線照射面と比較して 25% 程度であった ($p < 0.01$)。4 週経過後紫外線照射面では、加工直後新鮮面の約 2 倍となっていた ($p < 0.01$)。酸処理チタン表面に接着した細胞数は、以下の順番に多くなっていた：4 週経過後紫外線照射面

>加工直後新鮮面> 4週経過面 ($p<0.01$; Two-way ANOVA)。4週経過面に接着した細胞数は、加工直後新鮮面の50%以下であった。培養24時間後において、4週経過後紫外線照射面では加工直後新鮮面よりも高い細胞接着能を示した(120%以上) ($p<0.01$)。細胞数は4週経過面では著しく減少していたが、4週経過後紫外線照射面では増加していた。

4. 酸処理チタン表面上の細胞形態

培養3時間後において、4週経過後紫外線照射面では細胞数が最も多く、4週経過面で最も少なく、これは接着細胞数と同様の傾向であった。アクチン染色では、加工直後新鮮面と4週経過後紫外線照射面の細胞において、複数の方向に大きな突起の伸張がみられたが、4週経過面では細胞は小さな類円形を呈し、細胞骨格の発達はあまりみられなかった。加工直後新鮮面および4週経過後紫外線照射面の細胞では、細胞接着および癒着を調節するタンパク質であるパキシリンが細胞の形に沿って強く観察された。特に、4週経過後紫外線照射面の細胞では、細胞原形質に陽性像が認められた。細胞の面積、周径、およびフェレーの直径においては、加工直後新鮮面および4週経過後紫外線照射面では、4週経過面と比べて5-8倍になっていた ($p<0.01$; Bonferoni 法)。加工直後新鮮面と4週経過後紫外線照射面の間には有意な差はみられなかった。

5. 酸処理チタン表面における細胞増殖能

酸処理表面上における細胞密度は培養 2 日後、培養 4 日後ともに加工直後新鮮面、4 週経過面、4 週経過後紫外線照射面のそれぞれにおいて有意な差が認められた ($p < 0.01$; Two-way ANOVA)。培養 4 日後においては、加工直後新鮮面では 4 週経過面よりも細胞が約 30%多くなっていた ($p < 0.05$)、一方、4 週経過後紫外線照射面では 4 週経過面よりも細胞が約 150%多くなっていた ($p < 0.01$)。細胞あたりの BrdU DNA 結合は 4 週経過後紫外線照射面が最も高く、加工直後新鮮面、4 週経過面と続き ($p < 0.01$)、増殖した細胞数と同様の結果を示した。

6. 酸処理チタン表面における骨芽細胞分化能および石灰化能

酸処理群における細胞培養 10 日後の ALP 活性は、加工直後新鮮面と比較して 4 週経過面で有意に低くなっていた ($p < 0.01$)。加工直後新鮮面での ALP 活性は 4 週経過面よりも約 2.5 倍高かったが、4 週経過後紫外線照射面での ALP 活性は加工直後新鮮面よりも高くなっていた。細胞あたりの ALP 活性は加工直後新鮮面、4 週経過面、4 週経過後紫外線照射面のそれぞれにおいて有意な差が認められた。加工直後新鮮面と 4 週経過後紫外線照射面の細胞数あたりの ALP 活性は 4 週経過面の細胞数あたりの ALP 活性より有意に高くなっていた ($p < 0.05$)。総カルシウム沈着量は 4 週経過後紫外線照射面で最も多く、4 週経過面で最も少なくなっていた ($p < 0.05$)。4 週経過

後紫外線照射面の総カルシウム沈着量は4週経過面と比較して約70%多くなっていた。

7. サンドブラスト処理チタン表面における細胞増殖能

サンドブラスト群においては酸処理群での結果と同様に、細胞密度と増殖活性は加工直後新鮮面が4週経過面より高くなっていた($p < 0.01$)。細胞培養4日後における細胞密度と培養3日後における細胞増殖能は加工直後新鮮面よりも4週経過後紫外線照射面が有意に高くなっていた($p < 0.05$)。細胞あたりのALP活性は加工直後新鮮面と4週経過後紫外線照射面が4週経過面よりも高くなっていた($p < 0.01$)。また、加工直後新鮮面と4週経過後紫外線照射面の間には有意な差は認めなかった。総量カルシウム沈着量については、4週経過面では加工直後新鮮面よりも有意に少なくなっていた($p < 0.01$)。4週経過後紫外線照射面上の総カルシウム沈着量は加工直後新鮮面よりも有意に多くなっていた($p < 0.05$)。

9. 骨-インプラント結合強度

インプラント埋入後2週において、酸処理群の加工直後新鮮面では、酸処理群の4週経過面インプラントよりもプッシュインテストの値が約2倍高くなっていた($p < 0.01$)。酸処理群の4週経過後紫外線照射面におけるプッシュインテストの値は、酸処理群の加工直後新鮮面とほぼ同等であった。

サンドブラスト群の4週経過面のプッシュインテストの値はサンドブラスト群の加工直後新鮮面の約半分程度であった($p < 0.05$)。サンドブラスト群の4週経過後紫外線照射面では、サンドブラスト群の加工直後新鮮面に比較してプッシュインテストの値は高くなっていた($p < 0.05$)。

IV. 考察

1. 時間経過によるチタンの生体親和性の低下と紫外線照射による回復

本研究の結果、4週経過面では親水性が失われてタンパク吸着能が減少していた。また、培養したヒト間葉系幹細胞 (MSCs) の誘導能、接着能、細胞の大きさ、増殖能、分化能、骨結合力は減少していた。これらのことから、4週経過面は加工直後新鮮面より生体親和性が低いことが考えられた。しかし、4週経過面に紫外線照射を行うことでチタンディスク表面には超親水性が得られ、タンパク吸着能が増加し、培養した MSCs の誘導能、接着能、細胞の大きさ、増殖能、分化能そして骨結合力に増加が見られた。さらに、4週経過後紫外線処理面では4週経過面だけでなく加工直後新鮮面よりも生物学的能力が改善していると考えられ、紫外線照射による生体親和性の向上が示唆された。2つの異なる表面形態 (酸処理とサンドブラスト処理) においては、時間経過による生物学的能力の低下および紫外線による生物学的能力の改善には同様の傾向が認められた。

2. 時間経過によるチタン表面の親水性の低下と紫外線照射による回復

チタン表面では、時間経過によって少なくとも3つの要因（チタン表面のぬれ性、 hidrocarbon の付着量、電荷）に変化が起こるとされている^{29-31, 33, 34}。本研究では、4週間経過チタン表面では細胞接着能、増殖能、分化能の低下がみられ、酸処理群とサンドブラスト群においては共に親水性の減少が認められた。一方で、紫外線処理によるこれらの細胞能の向上と親水性の回復には相関がみられた。このことから、親水性はチタンの生体親和性の向上と関連が深いと考えられた。以上の結果から、加工直後新鮮表面と4週経過後紫外線処理表面ではチタン表面への酸処理やサンドブラスト処理などの表面処理方法に依存せず、共に高い親水性の性質をもち、細胞の生体親和性も高いことが明らかとなった。また、本研究ではチタン表面への紫外線照射のみで疎水性 ($>50^\circ$ 接触角) から高い親水性 ($<5^\circ$ の水接触角) への親水性の変化を得ることができた。加工直後のチタン表面は、時間経過と共に hidrocarbon がチタンに付着することにより表面エネルギーが減少し、 Ti^{3+} 部位から Ti^{4+} へ変化することで超親水性から疎水性へと変化するといわれている³⁴。しかし、生体材料表面の親水性の向上は細胞接着能や骨形成能の向上には必須ではないと考えられている³⁵⁻³⁸。今後、親水性と細胞接着および骨形成能の関連について、詳細に検討する必要があると考えられた。

3. タンパク質の吸着と細胞接着および細胞形態

チタン表面への経時的な hidrocarbon の付着により表面は被覆され、チタンの露出面積が減少してタンパク吸着や骨芽細胞の付着が減少するとされている³⁹⁾。生体材料へのタンパク質の吸着と細胞接着は、生体材料周囲の骨形成の初期において重要とされる。細胞表面の受容体に存在するインテグリンは、細胞接着機能を担うタンパク質の一つであるフィブロネクチンの最小機能部位であるアミノ酸配列アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) との結合によって、材料に吸着したタンパク質と相互に結合する³⁶⁻³⁸⁾。この過程は細胞接着に重要な役割を果たし、その後の細胞の広がりや増殖、細胞の機能などを制御するといわれている³⁸⁾。本研究においては、アルカリ性の環境下において、タンパクから2価の銅イオンが遷移する時に1価の銅イオンが形成されることを利用している BCA 法を用いた³⁹⁻⁴¹⁾。紫外線処理チタン表面ではタンパク質の吸着と接着した MSCs の細胞数の増加が認められたが、4週間経過チタン表面では減少していた。MSCs の広がりのはやくさは4週間経過表面上では遅くなっていたが、紫外線処理チタン表面では促進されていた。細胞骨格の発達と細胞の広がりのはやくさは、加工直後新鮮表面、紫外線処理チタン表面では複数の方向に大きな突起の伸張がみられたが、4週間経過面では、細胞は小さな円形を呈し、細胞骨格の発達もあまりみられなかった。また、細胞接着斑分子の一つであるパキシリンの発現は、4週間経過表面では減少していたが、4週間経過後紫外線

処理チタン表面では増加していた。また、電荷については、タンパクや細胞、経時的変化を伴ったチタン表面ではその電荷はマイナスの状態であるといわれている^{30, 42, 43)}。しかし、紫外線照射によってチタン表面がプラスの状態に変化することにより、タンパクの吸着、細胞誘導能が向上すると考えられている^{30, 44)}。これらのようなチタン表面のぬれ性、ハイドロカーボンの付着量、電荷などの要因は互いに関連し、チタンの生体親和性に影響を与えていると考えられる。今後、様々な条件下におけるチタン上でのタンパク質吸着と細胞接着の関係について、また、チタン表面への紫外線照射が骨-インプラント結合に与える影響を詳細に検索する必要性が考えられた。

以上、本研究の結果から、チタン表面では経時的に変化が起こり、この変化は培養細胞やチタンインプラント周囲の骨形成に影響を与えることが示唆された。今後、時間経過に伴うチタン表面の変化および紫外線照射がチタンの生体親和性に与える影響についてさらに詳細に検索する必要があると考えられた。

V. まとめ

本研究では、時間経過に伴うチタン表面の変化および紫外線照射によるチタン表面の変化が骨芽細胞の増殖・分化におよぼす影響を検索する目的で、酸処理とサンドブラスト処理の異なる2種類のチタン表面を作製して実験

を行った。その結果、表面処理後 4 週間経過したチタン表面における MSCs の接着能、増殖能および分化能は表面処理直後のチタン表面と比較して低くなっていた。また、表面処理後 4 週間経過したチタンインプラントをラット大腿骨へ埋入した際の骨-インプラント結合の強度は表面処置直後のインプラントと比較して 60%程度であった。しかし、チタン表面への紫外線光照射により、表面処理後 4 週間経過したチタン表面では超親水性が回復し、表面処理直後のチタン表面よりも骨-インプラント結合の強度は高くなっていた。これらの結果は、異なる 2 種類のチタン表面において同様の傾向が認められた。以上、本実験の結果から、時間の経過によりチタン表面の生体親和性は低下するが、紫外線照射によって生体親和性が回復することが示唆された。

謝辞

稿を終わるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りましたカリフォルニア大学歯学部 小川隆広教授、口腔病理学講座 前田初彦教授に感謝いたします。また、本研究に際して多大なるご援助、御協力を頂きました口腔病理学講座 久保勝俊准教授、杉田好彦准教授、吉田和加講師ならびに口腔病理学講座員各位に厚く御礼を申し上げます。

文献

1. Nakamura HK, Butz F, Saruwatari L, Ogawa T: A role for

- proteoglycans in mineralized tissue-titanium adhesion. J Dent Res, **86**:147-152, 2007.
2. Ogawa T, Nishimura I: Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. Int J Oral Maxillofac Implants, **18**:200-210, 2003.
 3. Ogawa T, Nishimura I: Genes differentially expressed in titanium implant healing. J Dent Res, **85**:566-570, 2006.
 4. LeGeros RZ, Craig RG: Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. J Bone Miner Res, **8 Suppl 2**:S583-596, 1993.
 5. Puleo DA, Nanci A: Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials, **20**:2311-2321, 1999.
 6. Saruwatari L, Aita H, Butz F, Namamura HK, Outang J, Yang Y, Chiou WA, Ogawa T: Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro- and ultrastructure. J Bone Miner Res, **20**:2002-2016, 2005.
 7. Espehaug B, Furnes O, Havelin LI, Engesaeter LB, Vollset SE: The type of cement and failure of total hip replacements. J Bone Joint Surg Br, **84**: 832-838, 2002.

8. Hudson JI, Kenzora JE, Hebel JR, Gardner JF, Scherlis L, Epstein RS, Magaziner JS: Eight-year outcome associated with clinical options in the management of femoral neck fractures. Clin Orthop Relat Res: 59-66, 1998.
9. Lu-Yao GL, Keller RB, Littenberg B, Wennberg JE: Outcomes after displaced fractures of the femoral neck. A meta-analysis of one hundred and six published reports. J Bone Joint Surg Am, **76**: 15-25, 1994
10. Tidermark J, Ponzer S, Svensson O, Soderqvist A, Tornkvist H: Internal fixation compared with total hip replacement for displaced femoral neck fractures in the elderly. A randomised, controlled trial. J Bone Joint Surg Br, **85**: 380-388, 2003.
11. Ravikumar KJ, Marsh G: Internal fixation versus hemiarthroplasty versus total hip arthroplasty for displaced subcapital fractures of femur--13 year results of a prospective randomised study. Injury, **31**: 793-797, 2000.
12. Martinez de Aragon JS, Keisu KS: 21-year results of the uncemented fully textured lord hip prosthesis. Clin Orthop Relat Res, **454**: 133-138, 2007.
13. Ozawa S, Ogawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa H, Nishimura RD,

- Nishimura I: Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone*, **30**: 137-143, 2002.
14. van Steenberghe D, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G, Quirynen M: The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. *Clin Oral Implants Res*, **13**: 617-622, 2002.
15. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP: Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **13**: 620-629, 1998.
16. Zhang H, Lewis CG, Aronow MS, Gronowicz GA: The effects of patient age on human osteoblasts' response to Ti-6Al-4V implants in vitro. *J Orthop Res*, **22**: 30-38, 2004.
17. Wang W, Hashimoto K, Fujishima A, Chikuni M, Kojima E, Kitamura A, Shimohigoshi M, Watanabe T: Light-induced amphiphilic surfaces. *Nature*, **388**: 431-432, 1997
18. dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K: Surface energy of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med*, **19**: 2307-2316, 2008.

19. Clark AJ, Kotlicki A, Haynes CA, Whitehead LA: A new model of protein adsorption kinetics derived from simultaneous measurement of mass loading and changes in surface energy. *Langmuir*, **23**: 5591-5600, 2007.
20. Noh H, Vogler EA: Volumetric interpretation of protein adsorption: mass and energy balance for albumin adsorption to particulate adsorbents with incrementally increasing hydrophilicity. *Biomaterials*, **27**: 5801-5812, 2006.
21. LeGeros RZ, Craig RG: Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *J Bone Miner Res*, **8 Suppl 2**: S583-596, 1993.
22. Puleo DA, Nanci A: Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, **20**: 2311-2321, 1999.
23. Pilliar RM: Cementless implant fixation--toward improved reliability. *Orthop Clin North Am*, **36**: 113-119, 2005.
24. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, 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.
25. Marinho VC, Celletti R, Bracchetti, Pertrone G, Minkin C, Piattelli A: Sandblasted and acid-etched dental implants: a

- histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **18**: 75-81, 2003.
26. Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL: Dental implant failure rates and associated risk factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **20**: 569-577, 2005.
27. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P: Failure patterns of four osseointegrated oral implant systems. *J Mater Sci Mater Med*, **8**: 843-847, 1997.
28. Chuang SK, Wei LJ, Douglass CW, Dodson TB: Risk factors for dental implant failure: a strategy for the analysis of clustered failure-time observations. *J Dent Res*, **81**: 572-577, 2002.
29. Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T: The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, **30**: 1015-1025, 2009.
30. Iwasa F, Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Ogawa T: Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism. *Biomaterials*, **31**: 2717-2727, 2010.
31. Ueno T, Yamada M, Suzuki T, Minamikawa H, Sato N, Hori N, Takeuchi K, Hattori M, Ogawa T: Enhancement of bone-titanium integration

- profile with UV-photofunctionalized titanium in a gap healing model. *Biomaterials*, **31**: 1546-1557, 2010.
32. Ogawa T, Ozawa S, Shih JH, Ryu KH, Sukotjo C, Yang JM, Nishimura I: Biomechanical evaluation of osseous implants having different surface topographies in rats. *J Dent Res*, **79**: 1857-1863, 2000.
33. Hori N, Att W, Ueno T, Sato N, Yamada M, Saruwatari L, Suzuki T, Ogawa T: Age-dependent degradation of the protein adsorption capacity of titanium. *J Dent Res*, **88**: 663-667, 2009.
34. Att W, Hori N, Takeuchi M, Ouyang J, Yang Y, Anpo M, Ogawa T: Time-dependent degradation of titanium osteoconductivity: an implication of biological aging of implant materials. *Biomaterials*, **30**: 5352-5263, 2009
35. Moursi AM, Globus RK, Damsky H: Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Sci*, **110 (Pt 18)**: 2187-2196, 1997.
36. Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D: Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J Biomed Mater Res*, **40**: 48-56, 1998.
37. Mata A, Su X, Fleischman AJ, Roy S, Banks BA, Miller SK, Midura

- RJ: Osteoblast attachment to a textured surface in the absence of exogenous adhesion proteins. *IEEE Trans Nanobioscience*, **2**: 287-294, 2003.
38. Yang G, Obiakor H, Sinha RK, Newman BA, Hood BL, Conrads TP, Veenstra TD, Mage RG: Activation-induced deaminase cloning, localization, and protein extraction from young VH-mutant rabbit appendix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 17083-17088, 2005.
39. 堀紀雄, 木本克彦, 鈴木丈夫, 山田将博, 小川隆広: チタンの自然放置下における生物学的老化: 時間経過に伴い減退するチタン表面のたんぱく吸着能および細胞接着能. *日本口腔インプラント学会誌*, **22(2)**: 97-105, 2009
40. Gembitsky DS, Lawlor K, Jacovina A, Yaneva M, Tempst P: A prototype antibody microarray platform to monitor changes in protein tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Proteomics*, **3**: 1102-1118, 2004.
41. Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF: The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*, **113**: 867-879, 2003.
42. Ellingsen JE: A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials*, **12**: 593-596, 1991.

43. Klinger A, Steinberg D, Kohavi D, Sela MN: Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro. *J Biomed Mater Res*, 36:387-392, 1997.
44. Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Iwasa F, Yoshino F, Kimoto K, Lee, MC, Ogawa T: Electrostatic control of protein adsorption on UV-photofunctionalized titanium. *Acta Biomater*, 10: 4175-4180, 2010.