

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2014年度 博士論文

溶液浸漬処理後のチタン表面が生物学的応答  
に及ぼす影響

Effects of Biological Responses of Titanium Surfaces

Treated with Various Solutions

原田泰光

Yasumitsu Harada

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

咀嚼機能制御補綴学講座

木本克彦教授 指導

## 諸言

インプラント治療により，口腔機能が回復され，生活の質が向上することが国民に対しても周知されてきている。また，口腔機能のみならず全身的な機能回復の有用性からインプラント治療への期待も高まってきている<sup>1, 2)</sup>。それに伴い，幅広い年齢層，口腔内状態，全身状態に関わらずインプラント治療を行う場合も増えてきており，現在報告されてきている高い成功率や安全性など，これまでの成績のように達成できないことが報告されてきている<sup>3)</sup>。そのため，インプラント治療の成功率の向上や治癒期間の短縮，適応の拡大などに幅広く対応できることが求められており，現在でも症例によっては高い成功率を保っているが，より成功率を高めインプラント治療をより良くしていくためには，これまで以上に骨形成が促進されるインプラント体の改良が必要とされている。そのため，現在までに様々なインプラント表面改良，改質研究が継続して行われており，多くの基礎研究や臨床経過が報告されてきている<sup>4-6)</sup>。

代表的な表面改質の方法として，表面構造形態を変える方法<sup>7)</sup>，生体活性材料をつける方法<sup>8,9)</sup>，表面を親水化する方法<sup>10,11)</sup>などが検証されている。

インプラント表面に骨形成がなされる場合，最初にインプラント表面とタンパクが吸着することが重要であり，表面構造の改良や親水化などの改質を行うことによってインプラント表面のタンパク吸着能が向上し，その後の細胞接着能も高くなると考えられている<sup>14,15)</sup>。近年，インプラント体製作後，水溶液に保存することによって骨形成能力を向上させる方法が注目され，検討されてきている<sup>12,13)</sup>。これらの研究に使用されている水溶液は主に，純水または生理食塩水に類似した塩化ナトリウム水溶液が用いられており，この理由として，体液とほぼ等張であり，組織障害性が少ないことにより用いられている。水溶液保存により，骨形成能力を向上させる報告がある一方で，チタンインプラント表面の細胞接着能の低下や臨床的評価が変わらないといった報告などもされており，骨形成能力向上のための最適な水溶液はいまだ確立されていないのが現状である<sup>14,15)</sup>。

保存する水溶液の種類において，影響がある可能性が言われながら，溶液の種類や濃度によってインプラント体への生物学的影響を明らかにした研究は少なく，インプラント体への骨形成能力を考慮する場合，より詳細にする必要があると考えられる。

今回我々は，インプラント体への骨形成能促進のための最適な表面構築の一貫として，種類の異なる水溶液に浸漬し，タンパク吸着能，細胞接着能，細胞生存率に影響を及ぼすかどうか検証を行った。

## 材料および方法

### 1. 実験用チタン板と表面処理

*in vitro* 実験には、直径 20 mm、厚さ 2 mm のグレード 2 チタン板を用いた。表面を旋盤による研削加工を行い、滅菌水にて 3 回洗浄した。その後、超音波洗浄および高圧蒸気滅菌により洗浄、滅菌を行い、滅菌済み培養プレートに入れ暗所にて 4 週間以上保管した。*in vivo* 実験には、直径 2 mm、長さ 4 mm のシリンダー型グレード 2 チタン棒（インプラント）を用い、洗浄、滅菌を行い同様の保管を行った。

浸漬処理液として、超純水、塩化ナトリウム水溶液（以下、NaCl）、塩化カリウム水溶液（以下、KCl）、塩化カルシウム水溶液（以下、CaCl<sub>2</sub>）、塩化マグネシウム（以下、MgCl<sub>2</sub>）を用い、それぞれの溶液濃度は、0.05M、0.15M、0.30M とした。各種濃度の溶液に、実験用チタン板を 3 時間浸漬した。

### 2. 異なる表面処理液浸漬後の生細胞率の検証

本研究で使用する溶液が細胞毒性および細胞死に影響を与えるかどうか検証を行うために、各種溶液と異なる濃度で処理を施したチタン板上に骨芽細胞様細胞を播種し、培養を行い、12 時間後トリプシンに

より細胞を剥がし回収した。用いた骨芽細胞様細胞は、雄性 Sprague-Dawley ラット(8 週齢)の大腿骨から骨髓細胞を播種し、15% ウシ胎児血清 (Gibco, USA),  $10^{-8}$  M デキサメタゾン (Sigma, USA), 10 mM  $\beta$  - グリセロリン酸塩(Sigma, USA), 50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸 2 リン酸 (Sigma, USA), 抗生物質合剤 (100 U/ml ペニシリン G ナトリウム, 100 mg/ml ストレプトマイシン硫酸塩, 250 ng/ml アンホテリシン B, Invitrogen, USA) 含有の  $\alpha$  - MEM (Invitrogen, USA) と混合して、直径 100 mm 細胞培養皿 (Corning, USA) に播種して静置培養し、その後、継代培養したものを用いた。なお、本実験プロトコールは神奈川県大学の動物実験倫理委員会の承認を受けて実施された。

回収したサンプルは、Apoptosis Detection kit (ANNEXIN V-FITC kit: BECKMAN, USA) のプロトコールに従って、4°C 5 分間の遠心分離を行い、上清を吸引除去し、binding buffer にて  $5 \times 10^6$  個/ml となるよう細胞数を調整し、100  $\mu$ l に対し 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 溶液, 2.5  $\mu$ l Propidium iodide (PI)溶液を反応させ、400  $\mu$ l binding buffer を加えた。その後、フローサイトメーターを用い、488 nm レーザー波長にて計測を行い計測結果からパラメーターヒストグラムを作製し、Annexin V-FITC と PI の両者に染色されない(ネガティブ)細胞を正常細胞(生細胞)と判定し、その割合から生細胞率を検証した。

### 3. 表面濡れ性試験

各条件溶液に浸漬した後，大気中にて保管し，表面が乾燥したことを確認してから計測を行った。チタン表面における濡れ性の性状及び定量は，1  $\mu\text{l}$  超純水の滴下により測定した。計測には自動接触角計（CA-X，協和界面科学，埼玉）により行い， $\theta/2$  法により滴下した液滴から接触角を求めた（図1）。

### 4. タンパク吸着能試験

モデルタンパクとして牛血清由来のアルブミン(Pierce Biotechnology, Inc., USA) を用い，各条件のチタン板上に，1 mg/ml 濃度に調整した 300  $\mu\text{l}$  のタンパク溶液を，37  $^{\circ}\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$ ，95% Air のインキュベーター中で 1 時間接触させた。条件終了後，溶液を全て回収し，さらに 0.9 % 生理食塩水 300  $\mu\text{l}$  をチタン板上に入れ，水平に揺れ動かすことにより洗浄し，溶液の回収を行った。この洗浄を 2 回繰り返すことにより回収した溶液中のタンパク量を BCA 法 (Pierce Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific Pierce, IL, USA) を用い，マイクロプレートリーダーにて測定した。測定値を既知の 100% 濃度のタンパク溶液測定値から減じ，その回収溶液から吸着しているタンパク量の理論値を算出した。

## 5. 骨芽細胞様細胞の細胞接着試験

各溶液濃度で処理を施したチタン板上に，ラット大腿骨骨髓から採取，培養を行った骨芽細胞様細胞を  $3 \times 10^4$  個/cm<sup>2</sup> の濃度で播種し，12 時間後に細胞骨格のアクチンフィラメントをローダミン蛍光標識により染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

## 6. *in vivo* における骨結合力の定量

雄性 Sprague-Dawley ラット（8 週齢）(n=28) を用い，チトゾールによる腹腔麻酔を行った後，大腿骨骨端部より 11 mm の位置（図 2A）にインプラント埋入のための直径 2 mm の穴をエンジン用ラウンドバーにて，インプラントを浸漬させた各濃度溶液を注水しながら，皮質骨のみ貫通させた。尚，インプラント埋入は，1 つの大腿骨に対して 1 本とし，各溶液条件後にそれぞれ埋入(n=4)を行った。

埋入後 2 週間後に，大腿骨を取り出し，即時重合レジンにより周囲を固定し，インプラント骨結合力を Push-in test により計測した（小型卓上試験機 EZ-S，島津製作所，京都）。Push-in test は，1 mm /分のクロスヘッド速度で鉛直下方にインプラントを押し込み(図 2B)，骨結合力の計測は，荷重 - 変位曲線の最大値を測定することによって決定した(図 2C)。

## 7. 統計解析

統計学的検討には、各群間の濃度と浸漬溶液の種類に対して 2 元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行った後に、多重比較検定として Bonferroni/Dunn 法を用いた有意差検定を行った。なお、統計学的有意差は、有意水準を 5% とした。



## 結果

### 1. 異なる種類と濃度の水溶液浸漬後の生細胞率

各種水溶液にチタン板を浸漬し、その後チタン板上に播種され、Annexin V-FITC と PI によって染色されず生細胞として検出され、その細胞割合から算出された生細胞（正常細胞）率を示す（図 3）。本実験で行った全ての溶液、濃度条件において、播種した細胞の生細胞率は、いずれも約 80%以上を保持しており、細胞の生存率は高いことが確認された。本実験で用いた異なる種類、濃度の水溶液浸漬後の各条件下における生細胞率には有意な差は認められず、使用溶液により細胞毒性やアポトーシスやネクローシスなどの細胞死への影響は少ないことが確認された。

### 2. 異なる種類と濃度の水溶液浸漬後の濡れ性の変化

各条件溶液で浸漬させた後のチタン板に超純水を 1  $\mu$ l 滴下した写真を示す（図 4）。今回用いた異なる種類、濃度の水溶液浸漬後においては、どの表面においても約 60 度以上の接触角を示し、各条件間において表面の濡れ性に有意な差は認められなかった。また、未処理表面の接触角は、今回行った全ての浸漬条件と比較し、有意な差は認められ

ず、表面の濡れ性による表面性状の条件は同じであることが確認された。

### 3. 異なる種類と濃度の水溶液浸漬後のタンパク吸着能率

未処理表面および、異なる種類の溶液を各濃度に浸漬させ、その後、チタン表面におけるアルブミンタンパク接触 1 時間後のタンパク吸着能率を（図 5）示す。本実験で用いた溶液（NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> および MgCl<sub>2</sub>）において、浸漬濃度 0.05M, 0.15M, 0.30M の濃度の異なる条件下におけるアルブミンタンパク吸着率には、有意な差は認められなかった。また、未処理表面のアルブミン吸着率は、 $11.3\pm 4.1\%$ 、超純水に浸漬した表面では、 $13.2\pm 3.6\%$  を示し、今回用いた NaCl および KCl にて浸漬させた条件と比較し有意な差は認められなかった。しかしながら、CaCl<sub>2</sub> および MgCl<sub>2</sub> に浸漬させたチタン板のアルブミンタンパク吸着率は、未処理表面、超純水、NaCl および KCl にて浸漬させたチタン板と比較し、どの濃度間においても有意な差が認められた。CaCl<sub>2</sub> と MgCl<sub>2</sub> との間には有意な差は認められなかった。

### 4. 異なる種類と濃度の水溶液浸漬後の骨芽細胞様細胞接着能

異なる種類と濃度の水溶液浸漬後、各チタン板表面に細胞を播種し、12 時間の培養後の結果を示す（図 6）。未処理表面と NaCl および KCl

の各濃度にて浸漬されたチタン板では，細胞接着数，細胞形態には有意な差は認められなかった。浸漬溶液として  $\text{CaCl}_2$  および  $\text{MgCl}_2$  を用いた場合，未処理および  $\text{NaCl}$ ， $\text{KCl}$  に浸漬した表面と比較し，今回設定した濃度条件の全てにおいて，細胞接着数の増加が認められ，さらに細胞個々の大きさも，広がりを見せることが確認された。各種溶液のそれぞれの濃度間においては細胞接着数，細胞形態には大きな変化は認められなかった。

#### 5. *in vivo* における異なる水溶液浸漬の違いによる骨結合力

インプラントを各種溶液に浸漬させ大腿骨部に埋入し，2週間の治癒後のインプラントと骨との結合力を示す（図7）。未処理および超純水， $\text{NaCl}$ ， $\text{KCl}$  に浸漬した後のインプラントと骨結合力には，どの濃度においても有意な差は認められなかった。浸漬溶液として  $\text{CaCl}_2$  および  $\text{MgCl}_2$  を用いた場合では，未処理，超純水， $\text{NaCl}$  および  $\text{KCl}$  と比較し有意な差を認めた ( $p < 0.05$ )。また， $\text{NaCl}$ ， $\text{KCl}$ ， $\text{CaCl}_2$  および  $\text{MgCl}_2$  における，それぞれの各濃度間においては，有意な差は認められなかった。 $\text{CaCl}_2$  および  $\text{MgCl}_2$  との間では，どの濃度条件においても有意な差は認められなかった。

## 考察

本報告は、チタン表面にナトリウム、カリウム、カルシウムおよびマグネシウムを含む水溶液に浸漬することにより表面処理を行うことで、タンパク吸着率や細胞接着率、およびチタンインプラントと骨結合力に影響を与えるかどうか検証したものである。異なる溶液として塩化ナトリウム水溶液および、塩化カリウム水溶液による浸漬後では、超純水に浸漬した表面と比較し、タンパク吸着能率、細胞接着能およびチタンインプラントと骨との結合力には有意な差は認められなかった。一方、塩化カルシウム水溶液および塩化マグネシウム水溶液に浸漬した後では、今回用いた全ての実験において有意な差を認めた。また、これらの異なる溶液の浸漬により生細胞率には有意な差を認めなかった。本研究では、チタンインプラントを生体内に使用する前に、カルシウムおよびマグネシウム水溶液により浸漬処理することで、タンパク吸着能や細胞接着能を向上させる可能性があることを見出した。

チタンインプラントが生体内の骨に埋入され、骨結合が促進される場合は、タンパクが早期に吸着し、その後、細胞接着が起こり、周囲の骨形成が促進されると考えられている<sup>16,17)</sup>。よって、チタン表面にタンパクがより多く吸着することは、骨結合を促進するためにも非常

に重要と考えられる。本研究で用いたアルブミンは、血液中の血漿成分の中で最も多く含まれているタンパクであり、ホルモンやカルシウムなどの分子運搬作用によって生体内においてフィブロネクチンなどの生体外基質成分とともにチタン表面への細胞接着を促進するものと考えられている<sup>18,19)</sup>。そのため、本研究における浸漬後の表面において、このようなタンパクが速やかに、また吸着量が増加する環境にあることから、生体内での骨形成能が向上し、その後の *in vivo* における結果においてもインプラントと骨との間に有意な骨結合力の向上を認められたものと考えられ、本研究で用いたカルシウムおよびマグネシウムを含む水溶液を使用した浸漬による効果は、初期のタンパク吸着能だけでなく、その後の骨形成過程にも影響を及ぼす可能性が考えられた。

チタンインプラント表面にタンパクおよび細胞が吸着する際には、チタン表面にカルシウム沈着が起こり、カルシウムブリッジを形成すると一つの説として考えられている。これは、通常 pH=7 付近のチタン表面は、負（マイナス）の荷電状態で存在しており、吸着する際のタンパクも同様に負の帯電をしているため互いに反発する。そのため、両者をつなぐ働きとして、血液中のカルシウムなどの二価の陽イオンが沈着し、橋渡しをするカルシウムブリッジを形成することにより、タンパク吸着が促進されると考えられている（図 8）<sup>20)</sup>。一方で、一価の陽イオンとして代表的なものがナトリウム、カリウムである。こ

れらはチタン表面には付着するが、陽イオンの帯電がなくなるため、それ以降のタンパク吸着を阻害している可能性が考えられる。現在までの研究報告から本実験結果を推考すると、カルシウム、マグネシウムなどの二価の陽イオンが関与している可能性が高いと考えられるが、本研究で用いた水溶液には塩化物も含まれているため、チタン表面上にタンパクが吸着する際に塩化物が、タンパク吸着に促進または阻害作用を起こしている可能性もあるため、カルシウム、マグネシウムおよび塩化物とタンパクおよび細胞との相互作用を今後、より明らかにする必要があると思われる。そのため、単にカルシウムイオンにより生物学的応答が向上するということを結論付けるには慎重を期する必要があると思われるが、二価の陽イオンが関与していると仮定した場合、チタンを浸漬する際に使用する溶液の選択が非常に重要になると考えられる。また、骨とチタン表面との分子結合形態や組織学的構造においては、より上流の細胞応答経路および組織学形態の観察を行うことにより本研究に使用した溶液の効果による、より詳細なメカニズムが明らかとなると考えられるため、今後検証していく必要があると思われる。

本研究中に使用したナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムの他に、一価の陽イオンとしては、銀イオン( $\text{Ag}^+$ )、アンモニウムイオン( $\text{NH}_4^+$ )があり、二価の陽イオンまたはそれ以上の陽イオンとし

では、バリウムイオン( $\text{Ba}^{2+}$ ), 銅イオン( $\text{Cu}^{2+}$ ), 亜鉛イオン( $\text{Zn}^{2+}$ ), スズイオン( $\text{Sn}^{2+}$ ), アルミニウムイオン( $\text{Al}^{3+}$ )などが挙げられる。しかし、これらの陽イオンが含まれる溶液において、血漿中にも含まれ、人体に対して悪影響が少ない溶液を考慮すると、本研究で用いたナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムイオンを含む水溶液が検証の対象となると考えられた。本研究において使用した塩化カルシウム、塩化マグネシウム水溶液は、細胞生存率に影響を与えず、細胞毒性が少ないことが認められた。一般に、溶液の種類や濃度によって細胞への影響が生じる場合は、細胞の核の萎縮、断片化が生じるアポトーシスと、細胞小器官が膨潤し、細胞膜が破裂するネクローシスが引き起こされる。本研究で用いたフローサイトメトリー法は、細胞のアポトーシス、ネクローシスの割合を検出することが可能であり、本研究に用いた全ての溶液、濃度において、正常細胞率の有意な差は認められなかったことから、溶液による細胞毒性および細胞死への影響は少ないものと考えられた。

本研究において、特にカルシウムイオンが含まれる塩化カルシウム水溶液により生物学的応答が増加していたが、カルシウムイオンは、負の電荷に対して、カリウム、ナトリウムイオンよりも高い親和性があることが示されている<sup>21)</sup>。さらに、チタン表面への親和力もカルシウムイオンが一番高いとの報告もなされている<sup>22)</sup>。そのため、インプ

ラントを生体内に埋入し骨形成がなされる際には、チタンインプラント表面にカルシウムの付着が優位であり、重要とされるが、インプラントと接する血漿成分中にはカリウムやナトリウムがカルシウムよりもはるかに多く存在する。それにも関わらず、カルシウムが優位に付着する可能性があるのは、チタン表面が負に帯電しており、カルシウムがカリウム、ナトリウムよりも高い親和性を持っているためと考えられ、チタン表面のカルシウム濃度が僅かでも増加することにより、生物学的応答に影響を与えるものと考えられた。

現在、骨形成能力を向上する目的でチタンインプラント表面にアパタイトを施したインプラントがあり、多くの研究もなされている。このようなインプラントは、表面にカルシウムを主としたアパタイトが存在するため、すでにカルシウムブリッジが形成されていることより、タンパク吸着能や細胞接着能が有利であるとされている。しかし一方で、チタンインプラントも数多く存在しており、チタンインプラントを使用する場合には、カルシウム被覆層が存在しないため、骨形成条件としては不利であると考えられている。そのため、骨形成能を促進する表面形態や、表面修飾が必要とされており、本研究で用いた溶液浸漬による方法は、現在のチタンインプラントの骨形成能力を向上させるシンプルで簡便な表面処理方法の一つになりうる可能性が示唆された。



現在の日常臨床におけるインプラント治療の成功率は、98%とも言われており、16年間のサバイバルレートも82.94%と高い数値が報告されている<sup>23)</sup>が、より骨形成を促進させることで、インプラント周囲に形成される骨量および骨質に影響を与え、より良い条件でインプラント結合が形成されるものと考えられる。1998年に示された現代のインプラント成功の基準の指標となるトロント会議では、インプラントの機能開始1年以降の経年的な垂直的骨吸収は平均0.2mm以下とされている。インプラント周囲の骨量および骨質が、より強固になった場合は、垂直的骨吸収においても最小限に予防出来、インプラント生存率も向上することが予測される。

本結果より、インプラント治療をより確実に成功へと導くためには、チタンインプラントの表面改良、成長因子の使用や手術方法の改良だけでなく、インプラント体を使用する前のインプラント表面処理方法などを考慮することにより、高い骨形成能を有した環境が得られるのではないかと考えられた。今後、より骨形成能に最適な溶液の種類及び濃度などの更なる詳細検討は必要であり、検証項目としても細胞挙動である遺伝子発現から組織状態まで明らかにする必要があるが、今後のインプラント治療の発展を考える上で新たな表面改良法の研究に寄与する一要因になったのではないかと考えられた。

## 結論

チタンインプラント表面において、種類の異なる水溶液に浸漬を行い、タンパク吸着能と骨芽細胞接着、*in vivo* による骨結合力を検証したところ、浸漬溶液としてカルシウム、マグネシウム水溶液に浸漬した表面では、未処理表面および超純水、ナトリウム、カリウム水溶液に浸漬した後の表面と比較し、タンパク吸着能、細胞接着能、骨結合力が向上し、有意な増加を認めた。カルシウム、マグネシウム水溶液による浸漬処理は、チタン表面の骨形成能を向上させる簡便な方法の一つとなる可能性が考えられた。

## 謝辞

本研究の遂行に際し、科学研究費補助金（基盤研究（C）, 課題番号：24592971. 研究代表者：堀紀雄）の補助を受けた。

## 参考文献

- 1) Kimoto K, Ono Y, Tachibana A, Hirano Y, Otsuka T, Ohno A, Yamaya K, Obata T, Onozuka M. Chewing-induced regional brain activity in edentulous patients who received mandibular implant-supported overdentures: a preliminary report. *J Prosthodont Res.* 2011;55:89-97.
- 2) 塚野 寛久, 冲本 公繪, 大東 文和, 北原 亨, 寺田 善博. インプラント補綴前後の咀嚼能力と口唇周囲軟組織運動の客観的評価を行った症例. *日補綴会誌.* 2012;4:302-311.
- 3) Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont* 1998;11:491-501.
- 4) Wei J, Igarashi T, Okumori N, Igarashi T, Maetani T, Liu B, Yoshinari M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater.* 2009;4:045002.

5) Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, Boyan B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials*. 2005;26:1897-1847.

6) Hori N, Iwasa F, Ueno T, Takeuchi K, Tsukimura N, Yamada M, Hattori M, Yamamoto A, Ogawa T. Selective cell affinity of biomimetic micro-nano-hybrid structured TiO<sub>2</sub> overcomes the biological dilemma of osteoblasts. *Dent Mater*. 2010;26:275-287.

7) 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*. 1991; 25:889-902.

8) Cooley DR, Van Dellen AF, Burgess JO, Windeler AS. The advantages of coated titanium implants prepared by radiofrequency sputtering from hydroxyapatite. *J Prosthet Dent*. 1992;67:93-100.

9) De Andrade MC, Sader MS, Filgueiras MR, Ogasawara T. Microstructure of ceramic coating on titanium surface as a result of hydrothermal treatment. *J Mater Sci Mater Med.* 2000;11:751-755.

10) Wei J, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Liu B, Oda Y. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;81:66-75.

11) Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa T. The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys. *Biomaterials.* 2009;30:4268-4276.

12) Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2006;76:323-334.

13) Bang SM, Moon HJ, Kwon YD, Yoo JY, Pae A, Kwon IK. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25: 831-837.

14) Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*. 2005 ; 74 : 49-58.

15) Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004;83:529-33.

16) Tsai JA, Lagumdzija A, Stark A, Kindmark H. Albumin-bound lipids induce free cytoplasmic calcium oscillations in human osteoblast-like cells. *Cell Biochem Funct*. 2007;25:245-249.

17) Park JM, Koak JY, Jang JH, Han CH, Kim SK, Heo SJ. Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006;21:859-866.

18) Degasne I, Baslé MF, Demais V, Huré G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, 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.* 1999;6:499-507.

19) Yang Y, Dennison D, Ong JL. Protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:187-192.

20) Hori N, Ueno T, Suzuki T, Yamada M, Att W, Okada S, Ohno A, Aita H, Kimoto K, Ogawa T. Ultraviolet light treatment for the restoration of age-related degradation of titanium bioactivity. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25:49-62.

21) Korolev N, Lyubartsev AP, Rupprecht A, Nordenskiöld L. Competitive binding of Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> ions to DNA in oriented DNA fibers: experimental and Monte Carlo simulation results. *Biophys J.* 1999;77:2736-49.

22) Guo CY, Matinlinna JP, Tang AT. Effects of surface charges on dental implants: past, present, and future. *Int J Biomater.* 2012;2012:381535.

23) Simonis P, Dufour T, Tenenbaum H.

Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of  
non-submerged dental implants. Clin Oral Implants Res. 2010;21;772-777.



図説

図 1 接触角算出方法

図 2 (A) in vivo 試験におけるインプラント埋入位置 (断面図) (B)力学試験写真 (C) 力学試験により得られる解析グラフ

図 3 各種溶液浸漬後の細胞生存率

図 4 表面濡れ性試験

未処理および各種溶液浸漬後の濡れ性

図 5 未処理および各種溶液浸漬後のタンパク吸着率

\* :  $p < 0.05$

図 6 各種溶液浸漬後の細胞接着動態の観察

Scale bar =  $50 \mu\text{m}$

図 7 in vivo における各種溶液浸漬後に埋入されたインプラントと骨との結合力 \* :  $p < 0.05$

図 8 インプラント体表面におけるタンパクおよび細胞の吸着過程

☒ 1

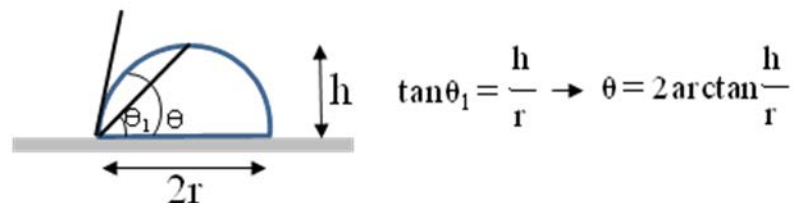


図2

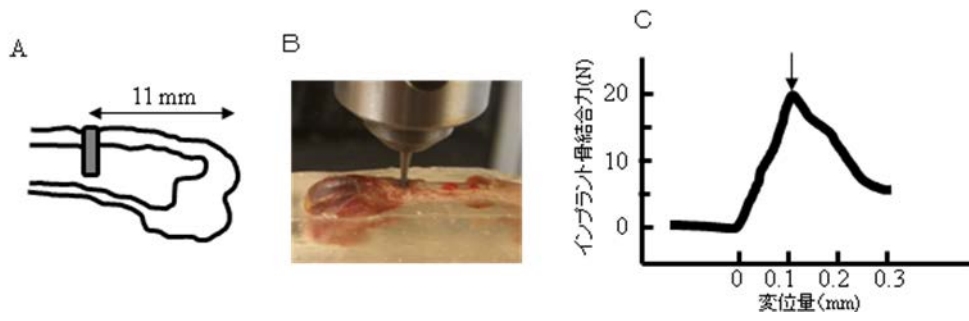
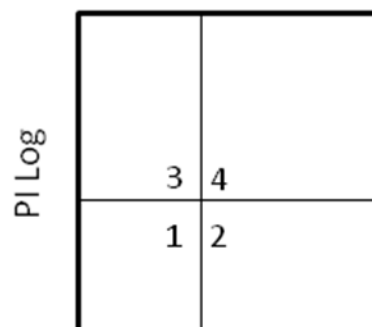
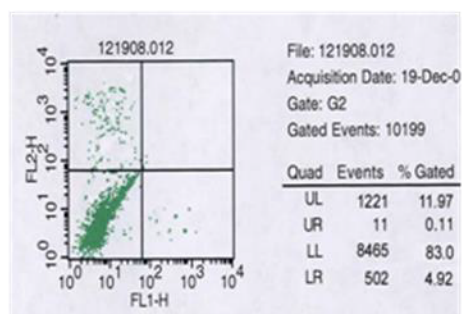


図3



Annexin V-FITC Log

1 区画に検出される細胞割合を  
正常細胞(生細胞)と判定

- 1: Annexin V-FITC (-), PI (-)  
2: Annexin V-FITC (+), PI (-)  
3: Annexin V-FITC (-), PI (+)  
4: Annexin V-FITC (+), PI (+)

|                                       | 生細胞率 (%) |      |      |
|---------------------------------------|----------|------|------|
| 未処理                                   | 83.0     |      |      |
| 超純水                                   | 83.5     |      |      |
| NaCl(0.05, 0.15, 0.30M)               | 82.4     | 85.0 | 86.7 |
| KCl(0.05, 0.15, 0.30M)                | 87.2     | 84.4 | 83.8 |
| CaCl <sub>2</sub> (0.05, 0.15, 0.30M) | 83.1     | 87.2 | 82.9 |
| MgCl <sub>2</sub> (0.05, 0.15, 0.30M) | 85.6     | 82.3 | 83.3 |

図4

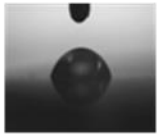

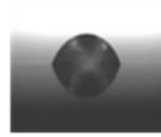





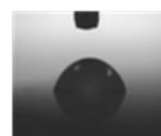



|                   |  | 未処理   |   | 超純水  |  |
|-------------------|--|---|---|--|--|
|                   |  | 接触角: $70 \pm 0.8^\circ$   |   | 接触角: $68 \pm 1.2^\circ$  |  |
| 種類 \ 濃度           |  | 0.05 M  | 0.15 M  | 0.30 M   |  |
| NaCl              |  | <br>$62 \pm 1.5^\circ$   | <br>$72 \pm 0.6^\circ$   | <br>$64 \pm 1.6^\circ$   |  |
| KCl               |  | <br>$60 \pm 3.7^\circ$ | <br>$68 \pm 0.7^\circ$ | <br>$69 \pm 2.1^\circ$ |  |
| CaCl <sub>2</sub> |  | <br>$65 \pm 2.4^\circ$ | <br>$67 \pm 0.9^\circ$ | <br>$62 \pm 1.1^\circ$ |  |
| MgCl <sub>2</sub> |  | <br>$68 \pm 0.9^\circ$ | <br>$71 \pm 0.8^\circ$ | <br>$67 \pm 2.5^\circ$ |  |

図5

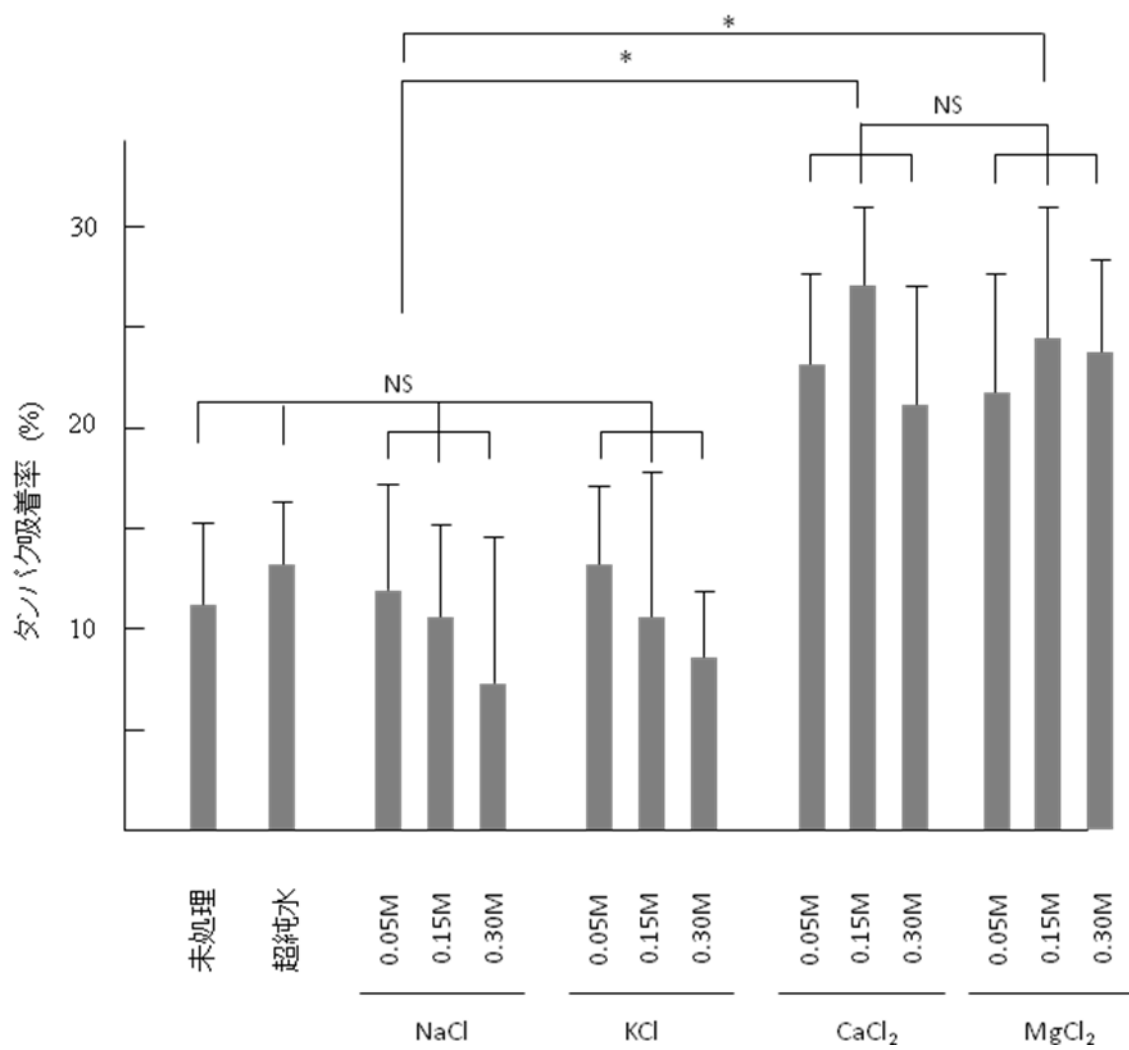


図6

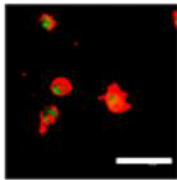
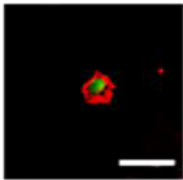
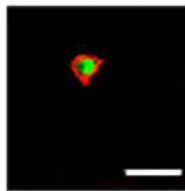
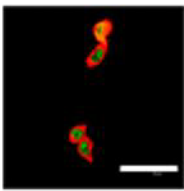
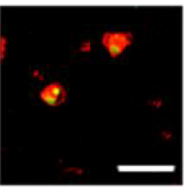
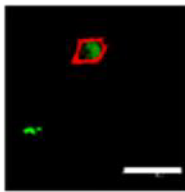
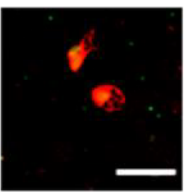
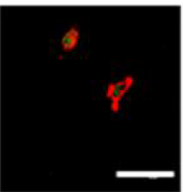
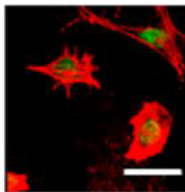
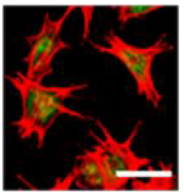
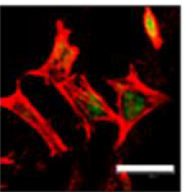
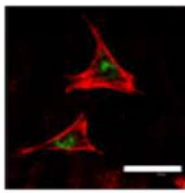
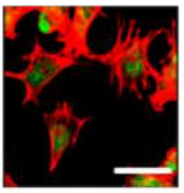
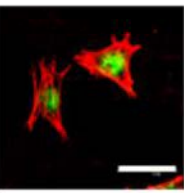
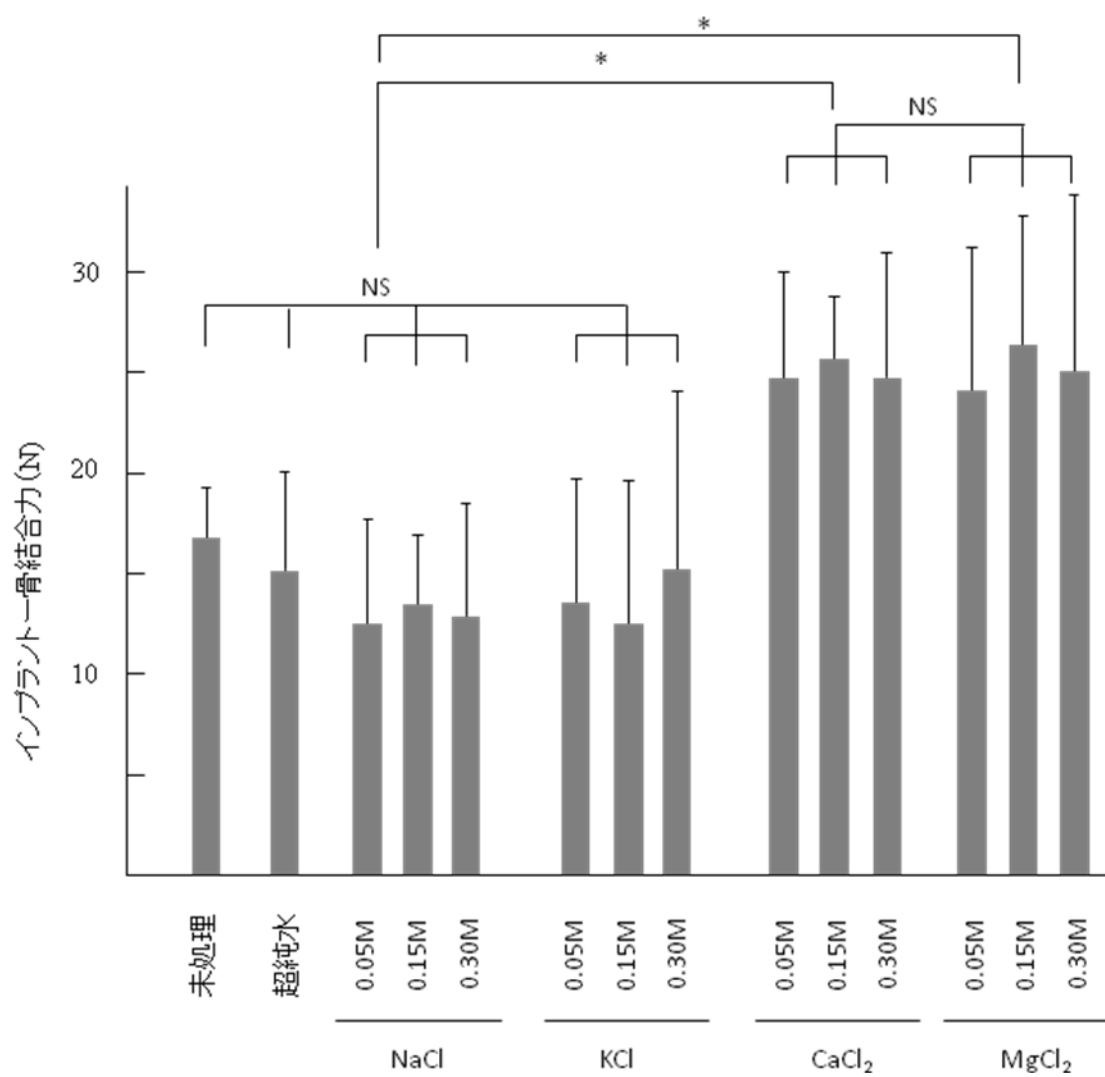
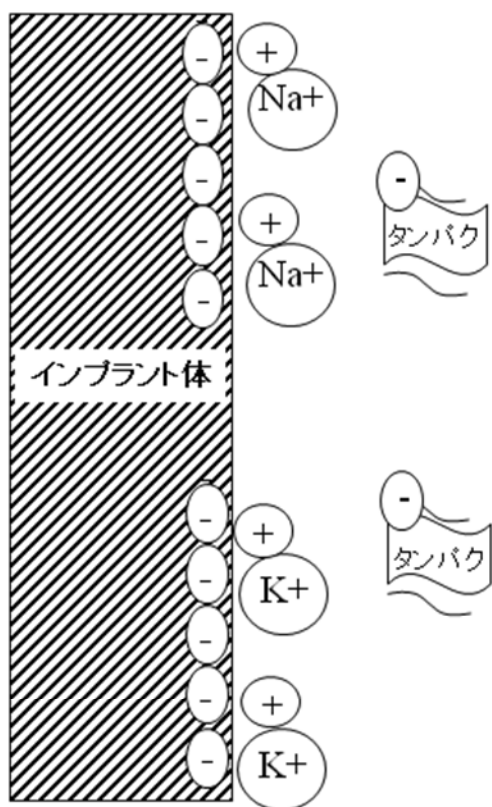
|                   |      | 未処理   |  | 超純水   |  |
|-------------------|------|---|--|---|--|
|                   |      |    |   |   |  |
| 種類                | 濃度   | 0.05 M  | 0.15 M   | 0.30 M  |  |
|                   | NaCl |   |    |    |  |
| KCl               |      |  |  |  |  |
| CaCl <sub>2</sub> |      |  |  |  |  |
| MgCl <sub>2</sub> |      |  |  |  |  |



図7



一価陽イオンの場合



二価陽イオンの場合

