

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011 年 3 月 4 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 吉成 正雄
所属機関名： 東京歯科大学
所属部署名：口腔科学研究センター 職名：教授
口腔インプラント学研究部門
所在地：千葉県千葉市美浜区真砂 1-2-2
電 話： 043-270-3536 内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

チタン表面改質による即時荷重インプラントシステムの開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 吉成 正雄	職名：教授
所属機関名： 東京歯科大学	部署名：口腔科学研究センター
中国側研究者氏名： 魏 建華	職名：講師
所属機関名： 第四軍医大学口腔医学院	部署名：口腔外科

4. 当該研究における発表論文等

第 32 回日本バイオマテリアル学会 (2010 年 11 月 30 日、広島)、シンポジウム
第 3 回口腔先端応用医科学会議 (2011 年 1 月 22 日、東京)、招待講演

5. 成果の概要

現在、治療期間を短縮し患者の QOL の向上に貢献する即時荷重インプラントを開発する要求が高まっており、チタンに生体活性やオッセオインテグレーションを向上させる様々な表面改質法

チタン表面改質による即時荷重インプラントシステムの開発

研究者氏名	魏 建華
中国所属機関	第四軍医大学口腔医学院
日本研究機関	東京歯科大学 口腔科学研究センター
指導責任者	教授 吉成正雄
共同研究者名	三浦 直, 田辺耕士, 江黒 徹

要 旨

即時荷重インプラントは、治療期間を短縮し患者の QOL の向上に貢献することから、チタンに生体活性を向上させる表面改質法により本試システムを実現する試みがなされているが、最適な表面改質法は未だ明らかになっていない。本研究は、インプラント表面の濡れ性が細胞の初期接着及びその後の細胞動態に重要な役割を果たすことから、チタン表面の濡れ性に及ぼす表面形状と表面性状を変化させた表面処理、ならびに保存条件の影響を明らかにすることを目的とした。粒度の異なるアルミナブラスト処理および酸処理を行った後、酸素プラズマ処理(O₂plasma)、紫外線照射処理 (UV)、過酸化水素処理(H₂O₂)が施され、濡れ性 (水に対する接触角) を計測した。その後、保存条件が表面親水性の持続性に及ぼす影響を調査した。さらに、それらの表面処理が骨芽細胞の動態に及ぼす影響を調査した。

表面形状に関し、ブラスト処理後に酸処理を施した条件で接触角がほぼゼロである超親水性を示した。表面性状に関し、O₂plasma 処理、UV 処理を施した試料は全ての表面形状で超親水性を示した。この親水性は大気中保存で急速に失われたが、水中保存では超親水性を維持した。また、超親水性表面は骨芽細胞の増殖、分化を促進することが明らかとなった。以上より、早期骨形成に寄与するべく親水性を得るための表面形状と表面性状を制御する処理法、また親水性を持続する保存法が明らかとなった。

Key Words : 歯科インプラント, チタン, 酸素プラズマ, 紫外線照射, 骨芽細胞

緒 言 :

インプラント骨接触部へ骨芽細胞の早期接着・増殖あるいは分化を促す環境を作り出すことは、オッセオインテグレーションを早期に実現するための重要な因子の一つである。細胞のインプラントへの接着、増殖、分化はインプラント表面の性質、すなわち表面形状 (surface topography) および表面性状 (surface physicochemistry) に影響される。表面形状は細胞の接着、伸展、配列、集簇に大きく影響するばかりではなく、細胞の分化・発現形態に重要な役割を与えることはよく知られている。一方、表面性状は、インプラントとタンパクや細胞の吸着や接着に影響を与える。表面の性状を決定する物理化学的な因子は表面エネルギー (濡れ性、接触角などで評価) と表面荷電 (ゼータ電位、等電点などで評価) であり、これらの性質は表面官能基の形成情況に支配される。

近年、表面濡れ性が骨芽細胞の動態、ひいてはオッセオインテグレーションに影響を及ぼすことが指摘され、親水性を付与したインプラントも市販されている。親水性と細胞接着の関係では、親水性が大きな表面で細胞接着性が増大傾向にあることが報告されている。さらには、チタン表面への低温プラズマ処理 (グロー放電) による親水性処理によって、各種細胞の初期接着性や分化特性が向上することが報告されている。我々は、酸素プラズマ処理により創製された超親水性表面は骨芽細胞、線維芽細胞の初期接着の促進に有効であることを報告した^{1,2)}。

親水性を付与する方法として、低温プラズマ法 (グロー放電処理)、紫外線 (UV) 照射法、過酸化水素水 (H₂O₂) 浸漬法などが提案されている。低温プラズマ法は、低温でプラズマ (電離状態) をつくりだす処理法であり、

表面に官能基を導入し表面エネルギーや表面荷電などの表面性状が制御できることから、生体材料への応用が拡大している。UV 照射法は、チタン酸化物の光触媒効果によりチタン表面に親水性を付与し、骨芽細胞の増殖、分化に有効に働くことが報告されている。H₂O₂ 浸漬法は、主に整形外科領域で提案されてきた処理法であり、表面に水酸基を導入することにより親水性を付与すると云われている。

一方、各種処理により得られた親水性はその後の大気中保存により急速に親水性が失われて疎水化に転じることから、本法を臨床へ応用するためには親水性を持続させる方法を開発することも重要な課題である。

そこで本研究は、表面形状と表面性状を変化させた表面処理がチタンの濡れ性に与える影響、および親水性を維持する保存条件の影響を明らかにすることを目的とした。同時にこれらの表面処理が骨芽細胞の動態に与える影響を調査した。

材料と方法：

1. 試験片の作製および表面処理

使用したチタンは直径 13mm、厚さ 1mm の JIS2 種チタン板 (Kobe steel, Japan) である。表面形状に関し、鏡面 (MS)、各々の粒度のアルミナブラスト処理を施した表面 (SB25, SB50 および SB150)、および SB150 に酸エッチングを施した表面 (SB150E) を調製した。表面性状に関し、表面形状調製直後 (大気中で 10 分間保存) の試料をコントロールとして用いた (As)。さらに、酸素プラズマ処理を 10 分間施した試料 (O₂Plasma)、紫外線照射 (励起波長 254 および 365nm) を 2 時間施した試料 (UV)、および酸性 H₂O₂ 溶液 (pH4.0, 60°C) に 1 日間浸漬した試料 (H₂O₂) を作製した。

2. 表面形状観察および表面粗さ測定

表面形状観察は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた。また、表面粗さの測定は表面形状測定器を用い算術平均粗さ (Ra) および最大高さ (Rmax) を算出した。

3. 接触角の測定、接触角の経時的変化

各処理表面の純水に対する濡れ性 (接触角) を表面形状および表面性状の調製 10 分後に測定した。処理面を純窒素でブローした後、水滴量 4μL の条件で液滴 15 秒後に接触角を計測した。また、接触角の経時的変化は SB150E を用い、大気中 (Air)、純水中 (DW) およびエタノール中 (Eth) と保存条件を変化させて測定した。

4. 骨芽細胞の培養試験

表面形状を SB150E に調製後、大気中 (As-Air)、蒸留水中 (As-DW) また、SB150E を O₂ 処理後蒸留水中 (O₂-DW)、UV 処理後蒸留水中 (UV-DW)、H₂O₂ 処理後蒸留水中 (H₂O₂-DW) に 1 週間保存した。これらの試料表面上で、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を通法にしたがった培養した。細胞播種後 1,3,5,7 日後の増殖を WST-1 法により評価した。また、播種後 7, 14 日後の ALP 活性を測定した。

結 果：

1. 表面形状および表面粗さ

MS は表面が平滑であり、表面粗さも $Ra=0.08\pm 0.02\mu m$ と鏡面を呈していた。SB 処理は、ブラスト粒子が大きくなるに従って凹凸が激しくなり、表面粗さも大きくなった。SB150E は、SB150 と比較してエッチピットによる微細な凹凸が多くなった。また、表面粗さは、Rmax が顕著に大きくならなかったのに対して Ra は顕著な増大を示し、SB150E は大きなうねりを持つ山に微細な凹凸が付与されている様相を呈していた。

2. 表面処理 10 分後の接触角

表面形状および表面性状を変化させたチタン表面の調製 10 分後の接触角を図 3 に示す。

表面形状の違いについて、大気中保存 10 分の試料 (As, コントロール) についてみると、MS が約 70° の接触角であったのに対し、表面粗さが大きい条件では接触角が小さくなった。特に、SB150E においては接触角がほぼ 0° と超親水性を示した。それ以外の表面性状を変化させた試料 (O₂, UV, H₂O₂) に関しては、表面形状の違いによる顕著な差が見られなかった。

表面性状の違いについて、特に O2, UV 処理を行った試料は全ての表面形状で超親水性を示した。

H2O2 試料は MS において As より接触角が小さくなったものの、SB150E では逆に接触角が大きくなった。

3. 接触角の経時的変化 (SB150E)

保存条件の違いによる接触角の経時的変化は、As 試料 (調製直後の接触角 0°) において、大気中保存 (Air) では急速に接触角が大きくなり 7 日後で約 100° と疎水性表面となり、その後は一定となった。Eth 保存においては 7 日後で As より小さい約 80° を示した。一方、純水中保存 (DW) では保存後 21 日においても接触角 3° と超親水性を維持した。O2 および UV 試料 (調製直後の接触角 0°) では、As 試料より全体的に小さな接触角で推移しているものの、保存条件の違いにおいては As 試料と同様な傾向を示した。H2O2 試料 (調製直後 17.5°) は他の試料と同様に Air, Eth 保存では経時的に接触角が大きくなるものの DW 保存では小さくなった。

3. 骨芽細胞の培養結果 (SB150E)

表面形状 SB150E 上における骨芽細胞の増殖傾向を図 2 に示す。水中に保存した As-DW (未処理) に比較し、特に O2-DW, UV-DW 試料上では、培養 3 日後に増殖が増加し、増加傾向は 5 日後で顕著になった。ALP 活性は、As-DW に比較し、O2-DW, UV-DW, H2O2-DW は 7 日後から有意に増加した。

考 察 :

本研究は、先ず処理直後 (10 分) の表面形状がチタンの濡れ性に与える影響 (As) を検討した。その結果、ブラスト処理面は鏡面に比べ親水性を示した。特に、ブラスト処理に酸エッチングを施した表面 (SB150E) においては接触角がほぼ 0° と超親水性を示した。この結果は、Wenzel model³⁾により説明できる。表面形状が異なるときの接触角 $\cos\theta_r$ は、 $\cos\theta_r = r \cos\theta$ で表せる (r : 表面構造因子, $\cos\theta$: 平坦表面の接触角)。この model は、平坦面で接触角が 90°未満の親水性表面では、表面が粗造化するとより親水性に、疎水性表面ではより疎水性になることを意味している。表面構造因子 r には表面積が大きく関与し、表面積が無限大になるような表面 (フラクタル表面) は超親水性や超疎水性表面になりうる。

本研究における SB150E 表面は、SB150 と比較し微細な凹凸が多くなり、表面粗さ計測では R_{max} が顕著に大きくならなかったのに対して R_a が顕著な増大を示し、大きなうねりを持つ山に微細な凹凸が付与されている様相を呈していた。したがって、SB150E 表面では表面積が極端に大きくなり、超親水性に転じたと考えられる。

本研究では次に、表面性状を変化させる各種表面処理がチタンの濡れ性に与える影響を検討した。その結果、特に O2, UV 処理を行った試料は全ての表面形状で超親水性を示した。

チタンに酸素プラズマ照射や紫外線照射を施すと、表面は親水性に変化する。酸素プラズマ照射に関しては、高エネルギー分子の衝突によって有機物質が分解される、また酸化チタンがプラズマ状態酸素により励起され同時に雰囲気中の水分子が反応し水酸基が形成されると報告されている。UV 照射に関しては、250nm 付近以下で有機化合物を分解する、酸化チタン (アナターゼ型) は波長が 387nm 以下で光触媒反応により OH ラジカル

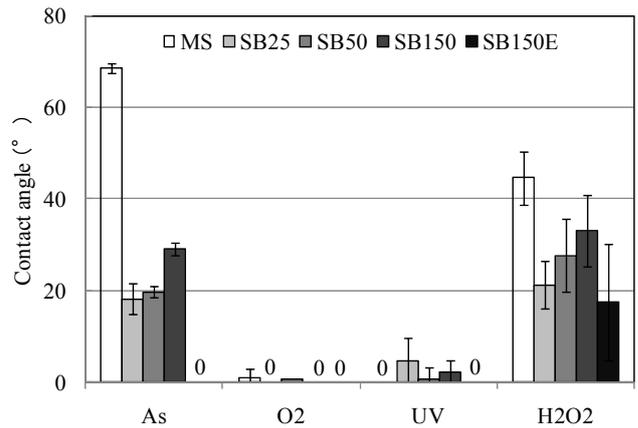


図 1 表面形状および表面性状を変化させたチタン表面の接触角 (調製 10 分後)

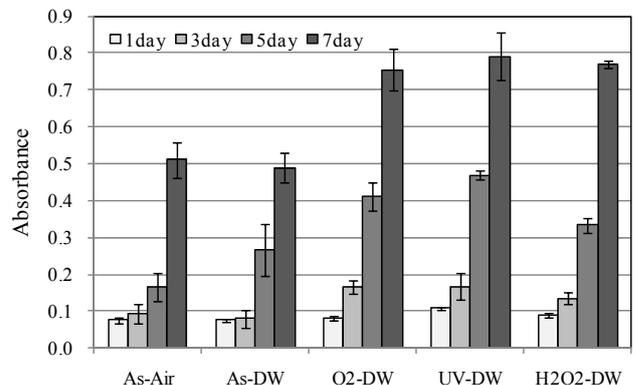


図 2 各種表面処理チタン上での細胞増殖 (SB150E)

および空気中の水分子の解離吸着により水酸基を形成すると報告されている。以上の如く、酸素プラズマ処理とUV照射では本質的に差はなく、量的な違いこそあれ、表面に吸着した疎水性有機物（ハイドロカーボン）が分解される効果と、表面に水酸基が導入される効果が相まって、超親水性を発揮するものと考えられる。なお本研究では、処理時間をO2Plasmaでは10分に、UV処理では120分としたが、文献も参考にすれば処理効率はO2Plasmaが有利と考えられる。

本研究において、過酸化水素(H₂O₂)処理は、水酸基が生じやすくチタンを腐食しない濃度とpHに設定した。その結果、MSにおいてAsより接触角が小さくなったものの、SB150Eでは逆に接触角が大きくなった。この理由は判然としないが、疎水性有機物の分解が不十分だったことが一因として考えられる。

以上の処理による親水性（接触角）の評価は、処理直後（10分）に行った。しかし、本法の臨床応用を考慮すると、処理後に親水性を安定的に持続する方法を見いだすことが重要になると考えられる。そこで、本研究は親水性を維持する保存条件の影響を調査した。その結果、SB150E試料において、全ての表面性状を変化させた条件（コントロールを含む）で、大気中保存では急速に接触角が大きく親水性は退行したが、純水中保存では親水性を持続した。また、エタノール中保存では純水中ほどの効果はなかった。

一般にO2PlasmaおよびUV処理表面は、大気中保存により、処理により活性化された表面へ大気中の表面汚染物質が吸着する、活性種により分解した親水性の低分子物質が離散してしまう、などの理由で親水性が退行するとされ、この現象はAgingなどと呼ばれている。本研究において、O2PlasmaおよびUV処理は極性溶媒中に浸漬することで親水性が持続するものと推定される。また、純水中保存でより有効であった理由は、水分子が水酸基の保持に有効に働いた結果と考えられる。

本研究の結果、ブラスト後の酸エッチング処理（SB150E）を行い、水中に保存すれば、特別な処理を施さなくてもチタン表面は超親水性が持続することが判り、本処理は臨床的に簡便で有効な方法であると判断される。しかし、この接触角の計測は、処理面を純窒素でブローしてから行ってはいるが、吸着した水分子が一層残存していたとも考えられ、さらなる検討が必要であろう。事実、細胞培養試験の結果、同様な親水性を有しているAs-DWとO2-DW、UV-DW、H2O2-DWは増殖、分化とも後者が有意に増加した。この結果は、接触角の測定のみでは細胞の動態を評価できないことを示している。すなわち、親水性をもたらす要因（表面エネルギーや表面水酸基）についても検討する必要がある。特に生体のように水環境においては、表面エネルギーの極性成分や水酸基チタン上に存在する塩基性水酸基が骨芽細胞の増殖と分化に重要な役割を演ずることが考えられる。以上より、本実験で得られた親水化処理の有効性を検証するためには、表面エネルギーや表面水酸基の生成状態を評価することが必要であると考えられる⁴⁾。

本研究では、親水性を付与するための表面形状と表面性状を制御する処理法、また親水性を持続する保存法について明らかになった。本結果が骨形成に寄与するかは今後の*in vitro* および*in vivo* 試験を待たねばならないが、臨床により近いチタンの親水性表面処理技術が提供できたと考える。

参考文献：

- 1) 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 2007; 81B: 66-75.
- 2) 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 doi:10.1088/1748-6041/4/4/045002.
- 3) Wenzel RN. Resistance of solid surfaces to wetting by water. Ind Eng Chem 1936; 28: 988-994.
- 4) Yoshinari M, Matsuzaka K, Inoue T. Surface modification by cold-plasma technique for dental implants -Bio-functionalization with binding pharmaceuticals-. Japanese Dental Science Review 2011; in press.

注：本研究の一部は、2010年11月30日『第32回日本バイオマテリアル学会』（シンポジウム）で、また2011年1月22日『第3回口腔先端応用医科学会議』（招待講演）で報告した。

作成日：2011年3月4日