

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592971

研究課題名(和文) 新たに発見されたチタンエイジング現象の網羅的解析と解決のための回復方法の探求

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the newly discovered titanium aging phenomenon and quest of the recovery method for the titanium aging

研究代表者

堀 紀雄(Hori, Norio)

神奈川県大学・歯学部・その他

研究者番号：20386832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：チタンという材料は生体不活性材料として広く医療領域に使用されてきている。歯科で代表的なのがチタンインプラントである。チタンインプラントを生体骨内に埋入することでチタン表面に骨が出来、人工歯根として安定する。成功率の向上や長期に安定させるにはインプラント周囲に骨がより形成される必要がある。本研究において、チタン表面が加工されてから時間経過により表面の性状は変化し、それに伴い骨形成能が低下することを見出した。この現象を回復するために光テクノロジーを応用した光照射処理方法と溶液による表面処理方法を確立し有効であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The titanium has been used widely medical area as bioinert material. The titanium implant is used as dental treatment. Reported bone-implant contact percentages are far below the perfect. In dental implant to stabilize the improvement and long-term success rate, it is necessary that the bone is more formed. This study examined the possible changes in the bioactivity of titanium surfaces during their aging and investigated the effect of Ultraviolet light treatment or solution coating method during the age-related change of titanium bioactivity. Establish a light irradiation treatment method and surface treatment method according to the solution which applies the optical technology in order to recover this phenomenon was found to be effective.

研究分野：歯科補綴

キーワード：チタン インプラント エイジング 表面性状 濡れ性 オッセオインテグレーション インプラント 骨接触率

## 1. 研究開始当初の背景

(1) チタン材料は、歯科領域のみならず人工関節等の整形外科領域などにも広く用いられている。インプラント治療が成功した場合、口腔機能の回復や社会復帰により生活の質が向上し、患者にもたらされる利益は非常に大きい。しかしながら、患者の高齢化、全身疾患の併発などによりインプラント周囲に形成される骨形成能が低下している場合や、骨吸収により十分に骨質量が得られない場合は、インプラント治療が失敗に終わってしまう場合がある。より成功率を向上させ、適応を拡大させるには、チタン表面の骨形成能や伝導能を向上させる必要があり、これまで様々な表面形態の改良研究が行われている。しかしながら、現在の表面形態改良では飛躍的な向上は達成できていないため、これまで以上の形態改良方法を模索していく必要があると考えられている。

(2) これまでチタン材料の表面効果は変わらないと考えられてきた。一般的にはチタンは生体不活性材料として分類されているため、チタン表面に骨形成能がなされることは積極的にはされないため、表面をいかに生体活性表面にするかが考えられている。

(3) 申請者らのグループでは、チタン表面加工後から時間経過による表面特性の変化が生じ、これに伴うインプラント周囲の骨形成能が低下することを報告した(Hori N, et al. J.Dent Res, 2009)。この発見により、チタン材料は、表面加工後の時間経過や状態により生体活性表面状態になりうることを示唆された。しかしながら、この表面性状の変化のメカニズム解明とより詳細な解析は不明であり、チタン材料の新たな性質の確立のためにも明らかにする必要がありと考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、チタン材料の新たに見出された時間経過による表面性状の変化のメカニズム解明とエビデンス構築基盤を確立することにある。また、チタン表面を、活性表面とする方法を模索することである。

## 3. 研究の方法

(1) 表面加工後から時間設定されたチタン試料の作製

チタン表面の表面性状としてチタン表面の表面形状として機械研磨面、酸処理面、サンドブラスト面を用い、それぞれの表面作製後の時間経過を設定する。時間設定は、表面作製直後(新鮮面)、表面処理後3日後、2週間後、4週間後とし、保管中は培養プレートに入れ、暗室に保管する。

(2) 時間経過による表面性状の観察  
時間経過により表面性状に変化があるかど

うかの観察を行う。観察には、微細構造の観察に適した走査型電子顕微鏡(SEM)を用い、表面の組成分析は Electron Probe Micro Analyzer (EPMA)により行う。また、表面粗さ計測機(surfcom 590A, 東京精密, 東京)を用い、表面粗さに違いが見られるか検討を行う。表面電荷測定としてナノクーロンメーター(NK-1001, KISCO, 大阪)を使用することで表面電荷測定が可能である。また、ゼーター電位測定システム(ELSZ-1)により界面動電位の測定が可能である。

## (3) タンパク吸着能試験

使用タンパクとしてフィブロネクチンなどの血液に含まれる細胞接着に関連するタンパクを使用し、各チタン板上に、既知のタンパク溶液を、37 °C 5% CO<sub>2</sub> 95% Air インキュベーター中で 3, 24, 72 時間接触させる。表面を2回洗浄し、溶液を全て回収する。回収されたタンパク量はBCA法(Pierce Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce®, USA)を用い、マイクロプレートリーダーにて測定する。さらにチタン板上に吸着したタンパクは、タンパク質染色試薬(SYPRO®, Sigma-Aldrich, USA)にて蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察後、イメージ解析ソフト(Image-Pro-Plus®, Media Cybernetics, USA)を用い、チタン板表面積あたりのタンパク被覆率を算出する。

## (4) 細胞接着能および生物学的活性の検討

雄性 Sprague-Dawley ラット(8週齢)の大腿骨から骨髓細胞を採取し、ラット骨髓間葉系幹細胞由来の骨芽細胞様細胞の培養を行う。各条件のチタン板上に、設定した細胞数を播種し、24時間の培養を行う。チタン板上の細胞をトリピン処理後回収し、細胞数を計測する。細胞の増殖能力や細胞生存能力を発色測定(WST-1 cell proliferation assay system, Takara, Japan)などにより定量分析を行う。加えて、各条件下のチタン板上の細胞の広がりなどを視覚化し、形態学的特長をつかむ為、条件時間培養後、細胞骨格のアクチンフィラメントと核を蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。観察された細胞は、細胞の広がり面積や大きさを定量化する。得られたデータは、各群間に対して Two-way ANOVA を行った後に、post hoc test を行い、有意差検定を行う

## (5) in vivo における表面時間経過による骨インプラント結合能の検討

ラット大腿骨に直径1mm、長さ2mmのシリンダーインプラントを埋入し、4、8、12週治療後に組織切片を作製し、インプラント周囲に形成されている骨量およびインプラント骨接触率の算出を行う。

(6) 表面加工後の表面劣化現象後の回復手段の探求

チタン表面が加工されてから時間経過および保管方法の違いにより表面劣化現象が止められなかった場合、その回復手段について探求を行う。

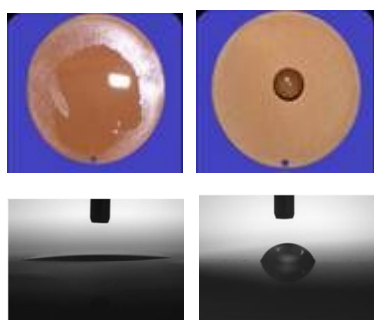
この方法としては、表面に高エネルギーを与えること、表面の炭化水素の付着を減少させることが現在まで分かっている。これらを解決する手段として、高エネルギー放射線照射、電磁波、紫外線などを考えている。特に紫外線照射処理は、光の波長領域によりチタンの持っている光触媒効果などを期待できるため、この回復方法として検証を行う。

#### 4. 研究成果

(1)チタン表面を各種方法で表面加工を行い観察した。表面加工直後および時間経過した表面においてもチタン表面の色調などには変化は認められなかった。

(2)表面加工後および時間経過による表面性状に変化があるかどうか観察を行った。表面の濡れ性試験においては、加工直後では超親水性を示したのに対し、加工後4週間経過した表面においては水が弾き、疎水性傾向になっていることを確認した。走査型電子顕微鏡の観察では、表面加工後においても時間経過においても表面形態には変化は認められなかった。表面粗さ計測においても表面粗さには有意な差はなかった。ナノクーロンメーターにより表面電荷の測定では、表面加工直後では正電荷を示していたが、時間経過により負電荷傾向になり、4週間経過した表面では界面電動電位は負電荷を示した。

#### 酸処理表面作製後の時間経過に伴う濡れ性



表面加工直後 (新鮮面)      表面加工後 4週経過面

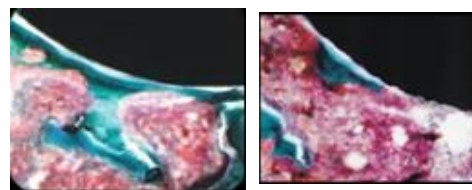
(3)タンパク吸着能試験では、表面加工直後の表面と比較し、4週間経過した表面では、表面加工直後が示すタンパク吸着量の約1/3までタンパク吸着能率が低下していることが確認された。

(4)ラット大腿骨から採取し培養した骨芽細

胞様細胞を用いて細胞接着能試験を行ったところ、表面加工直後では、接着細胞数も多く認められ、細胞個々の広がりも早期に広がり機能していることが観察された。表面加工し4週間経過した表面では、表面加工直後と比較し、細胞接着数は有意に減少し、細胞個々の広がりも認められなかった。

(5)インプラント周囲に形成されるインプラント骨結合率を測定したところ、表面加工直後ではインプラント骨接触率は90%以上示したのに対し、表面加工後から4週間経過したインプラントを使用し、同じ治療期間では、約40%のインプラント骨接触率を示した。

表面加工後の経過時間の違いによるインプラント周囲に形成される骨組織  
(青色部分が形成された骨組織)



表面加工直後 (新鮮面)      表面加工後 4週経過面

(6)チタン表面が加工されてから時間経過による表面特性の変化および骨形成能の低下が示されたことより、保管方法および回復方法を模索した。保管方法としては、表面加工後、水中保管および真空状態や不活性ガス中の保管を試みた。その結果、表面の濡れ性は一定期間保存されているものの、タンパク吸着能や細胞接着能などの生物学的応答については表面加工後4週間経過した表面と比較し有意な差は認められなかった。

次に表面の回復方法として高エネルギーを与えることを検証した。高エネルギーは、短から中波長領域の紫外線を使用した。表面加工後4週間経過した表面に紫外線照射を行ったところ、表面性状は超親水性を示した。また表面電荷は光照射後、正電荷を示し、加工直後と同様の傾向を示した。表面特性の変化に伴い、生物学的応答に関しても表面加工直後の表面に見られた傾向を示した。タンパク吸着能は初期に高い割合を示し、細胞接着能試験においても接着細胞数が増加し、細胞個々の広がりも早期に起こっていることが確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

原田 泰光、大野 晃教、堀 紀雄、木本 克彦、  
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、日本口腔インプラント学会誌、査読有、28巻、2015、29 - 37

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsoi/28/1/28\\_29/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsoi/28/1/28_29/_pdf)

〔学会発表〕(計 1 件)

大野 晃教、熊坂知就、小田切憲、堀 紀雄、木本 克彦、紫外線領域における照射がチタン表面改質による陶材接着強さの検討、第43回日本口腔インプラント学会

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

堀 紀雄 (HORI, Norio)  
神奈川県立歯科大学・歯学部・その他  
研究者番号：20386832

### (2)研究分担者

木本 克彦 (KIMOTO, Katsuhiko)  
神奈川県立歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：70205011

大野晃教 (OHNO, Akinori)  
神奈川県立歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：00611633

小田切憲 (ODAGIRI, Ken)  
神奈川県立歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：60350534