

令和元年6月5日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11227

研究課題名(和文) 電解還元性イオン水によるチタン表面のバイオリジカルエイジングの制御と生体機能化

研究課題名(英文) Control and biological functionalization of biological aging of titanium surface by electrolytic reducing ionic water

研究代表者

松野 智宣 (TOMONORI, MATSUNO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：80199827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：チタン(Ti)表面に大気中の炭素や窒素などが経時的に付着すると、親水性やタンパク質吸着が低下するバイオリジカルエイジングが生じ、オッセオインテグレーションに悪影響を及ぼす。

そこで、本研究では電気的な反発によって高い洗浄効果を発揮する電解還元性イオン水を用いて、バイオリジカルエイジングを制御してBone bioactivityを高める新規表面処理法を検討した。その結果、電解還元性イオン水への浸漬によりTi表面の炭素は減少して親水性表面に変化し、タンパク吸着や細胞接着も有意に増加した。また、埋入初期における骨とTi表面の接触率も有意に増加し、バイオリジカルエイジングを改善させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント治療による咀嚼機能の回復は一般的となった。しかし、十分な骨量や骨質の低下した高齢者は増加していくため、インプラントの生着率や残存率は低下が懸念される。この原因の1つに経時的にチタン表面が劣化するバイオリジカルエイジングがある。そこで、本研究では特殊な電解還元性イオン水にチタンを浸漬するだけで、インプラント表面に生体活性を付与できる簡便かつ安全な表面処理法を評価し、その有用性を証明した。

研究成果の概要(英文)：The biological aging of titanium (Ti) decreases in hydrophilicity and protein adsorption due to adherence of carbon and nitrogen in the air to the Ti surface with time, influences osseointegration. Therefore, in this study, we investigated the biofunctionalization to control the biological aging of the Ti surface and to enhance the bone bioactivity, using electrolytically reduced ionic water that exerts a high cleaning effect by electrical repulsion.

As a result, carbon in the Ti surface was reduced to a highly hydrophilic surface by immersion in electrolytic reducing ion water, and protein adsorption and cell adhesion were significantly increased. In addition, the contact rate of bone and Ti surface at the early stage of implantation was also significantly increased, and biological aging could be improved.

研究分野：口腔外科学

キーワード：チタン バイオリジカルエイジング 電解還元性イオン水 親水性 タンパク吸着 細胞接着 オッセオインテグレーション 骨インプラント接触率

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、インプラント治療は欠損補綴の方法として広く利用されており、さまざまな表面性状を持つインプラント体が市販されている。初期に開発されたチタンインプラントの表面性状は機械研磨された滑沢なものであったが、ブラスト処理や酸処理によって粗造面にすることでタンパク吸着量や細胞接着が高まって、オッセオインテグレーションに有利に働くことがわかり、現在の主流になっている。ただし、近年ではチタンインプラント表面に大気中の炭素や窒素などが経時的に付着することで、親水性やタンパク質の吸着量が低下するバイオリジカルエイジングがオッセオインテグレーションに影響すると報告されている<sup>1)</sup>。

(2) しかし、最近ではこのようなチタン表面のバイオリジカルエイジングに対し、インプラントを製造直後に生理食塩水中に封入することで大気との接触を遮断する方法やエイジングしたチタン表面に ultraviolet を照射して超親水性の表面に改質する光機能化などの技術が研究・開発され、臨床に用いられている。ただし、前者はインプラント体の価格が高価であり、後者の処理にも特殊で高価な器材が必要となるなどの欠点があった。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究ではより安全かつ簡便にバイオリジカルエイジングの改善が期待できないかと考え、電解還元性イオン水 (S-100<sup>®</sup>) に注目した。この S-100<sup>®</sup> は豊富な OH<sup>-</sup> を含む特殊な機能水であり、基質と付着物との間に電気的な反発力を発生させ、付着物を剥離・洗浄するという特徴を有する<sup>2)</sup>。この特徴を利用することで、チタンの表面構造を変化させずに付着した炭素や窒素などの汚染物質を容易に除去することができる。したがって、バイオリジカルエイジングによって低下したチタン表面の bioactivity を S-100<sup>®</sup> に浸漬するだけの簡便な表面処理によって、バイオリジカルエイジングを改善できるかについて、*in vitro* と *in vivo* で検討した。

### 3. 研究の方法

(1) チタンディスク (以下、Ti ディスク) は鏡面研磨した直径 9.5 mm、厚さ 1.0 mm の Ti-6Al-4V ディスクを用いた。前処理として Ti ディスクをエタノール、アセトンおよび double distilled water (以下、DDW) 中に浸漬して 10 分間の超音波洗浄を行った。前処理直後の Ti ディスクを fresh とし、前処理後にクリーンベンチ内で 1、4 週間静置してバイオリジカルエイジングさせた Ti ディスクをそれぞれ 1 week、4 weeks とした。また、fresh、1 week および 4 weeks の Ti ディスクを 3 分間 DDW に浸漬したものを Control 群、S-100<sup>®</sup> に 3 分間浸漬させたものを S-100 群、さらに、クリーンベンチ内の 15 W 殺菌灯を 48 時間照射したものを UV 群とした。

(2) ***in vitro* 研究** : ①微量元素分析 fresh、4 weeks における Control 群と S-100 群の Ti ディスク表面の化学的組成を X-ray photoelectron spectroscopy を用いて、ワイドとナローで測定した (n=4)。②親水性の評価 fresh、1 week、4 weeks における Control 群、S-100 群、および UV 群の Ti ディスク表面に DDW 0.5  $\mu$ L を滴下し、接触角計を用いて測定した (n=5)。③タンパク吸着試験 fresh、4 weeks における S-100 群、Control 群、および UV 群の Ti ディスク表面にウシ血清フィブロネクチン 1.0 mg/mL を 200  $\mu$ L 滴下し、24 時間後に Protein assay kit を用いて測定した。④細胞接着試験 MC3T3E-1 を 24 well plate 内に設置した fresh と 4 weeks の S-100 群、Control 群、および UV 群の Ti ディスク上に播種 ( $4.0 \times 10^4$  cells/well) し、24 時間インキュベート後にローダミン・ファロイジンと DAPI で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、画像解析ソフトを用いて接着面積を定量した。⑤細胞増殖試験 fresh の Ti ディスク表面に細胞接着試験と同条件で MC3T3-E1 細胞を播種し、24、72 時間インキュベート後の細胞増殖能を測定した。増殖能は CellTiter96<sup>®</sup> を添加し、37°C で 15 分間インキュベートして比色呈色させ、マイクロプレートリーダーを用いて波長 490 nm で計測した。

***in vivo* 研究** : すべての動物実験は、日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センターにおいて、「日本歯科大学生命歯学部動物実験規定」に従って行われた (承認番号 17-16)。全身麻酔下の NZW rabbit 6 羽に対し、超音波骨切削器具を用いて大腿骨に長さ 10.0 mm、幅 1.0 mm、深さ 10.0 mm のグループを形成した。その後、4 weeks の Ti ディスクを S-100<sup>®</sup> および生理食塩水に 3 分間浸漬させた後、グループ内に埋植した。埋植 4 週後に大腿骨を採取し、マイクロ CT 撮影後に非脱灰研磨標本を作製し、Villanueva bone 染色を行い、ディスク中央から骨髄側までの 5 mm の範囲における Bone-Implant Contact rate (BIC) を測定した。

### 4. 研究成果

(1) ***in vitro* 研究** : ①微量元素分析: ワイド測定において fresh と 4 weeks の Control 群で C、O、Ti の存在を認め、S-100 群で C が減少し、O と Ti が増加した。また、ナロー測定においても同様の結果が得られた。②接触角測定: Control 群は Ti ディスク上に滴下した DDW が経時的にドーム状に変化していったのに対し、S-100 処理群と UV 群は Ti ディスク表面全体に薄く広がり、良好な親水性を示した (Fig. 1)。接触角測定ではすべての群で接触角が経時的に増加傾向を示し、Control 群の fresh と 1 week、fresh と 4 weeks において有意差が認められた。また、すべての測定ポイントにおいて、S-100 群と UV 群は Control、UV 群は S-100 群と比較して有意に低値を示した (Fig. 2)。

③タンパク吸着試験： fresh における UV 群が Control 群と比較して有意に高値を示したが、S-100 群との間には有意差は認められなかった。一方、4 weeks における S-100 群と UV 群は Control 群と比較して有意に高値を示した。④細胞接着試験：すべての群において、fresh は 4 weeks と比較して細胞が密に接着していた。また、S-100 群と UV 群は Control 群と比較して Ti ディスク全体に細胞の接着が緊密であった。また、細胞接着面積では、fresh において UV 群、4 weeks においては S-100 と UV 群が Control 群と比較して有意に高値を示した (Fig. 3)。

⑤細胞増殖試験：24 h では、S-100 群と UV 群が Control 群と比較して有意に高値を示した。一方、72 h では UV 群は Control 群、S-100 群と比較して有意に高値を示した。  
 (2) **in vivo 研究**：マイクロ CT 像において、S-100 群は Control 群と比較して Ti ディスク周囲の新生骨形成が活発に認められた。また、Villanueva bone 染色像において、S-100 群は Control 群と比較して、Ti ディスクの周囲に赤紫色に濃染された類骨の形成が著明にみられた (Fig.4)。さらに、BIC は S-100 群が Control 群と比較して有意に高値を示した (Fig.5)。

(3) **まとめ**：電解還元性イオン水を用いたチタンの新規表面改質法は、安全で簡便にバイオロジカルエイジングを改善でき、インプラント埋入初期のオッセオインテグレーションを促進し、治癒期間を短縮させることが示唆された。

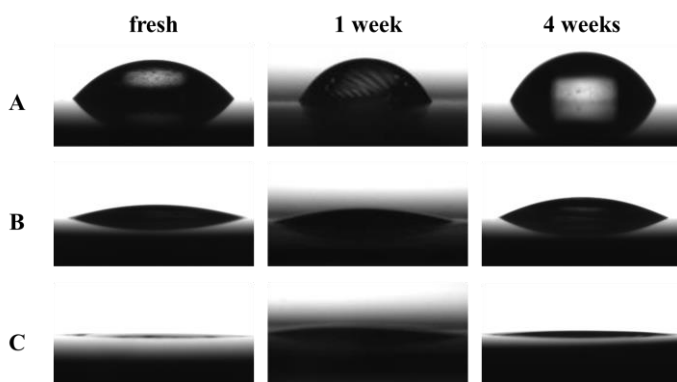


Fig. 1 接触角測定時の写真  
 A; Control disk, B; S-100 disk, C; UV disk,

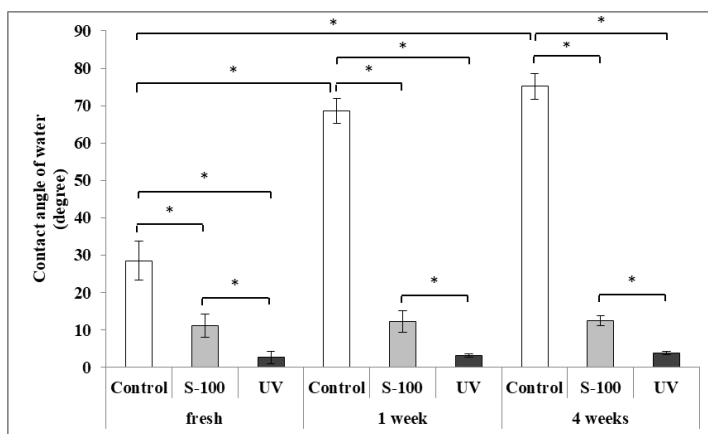


Fig. 2 接触角 (\* $p < 0.01$ , Tukey test,  $n=5$ )

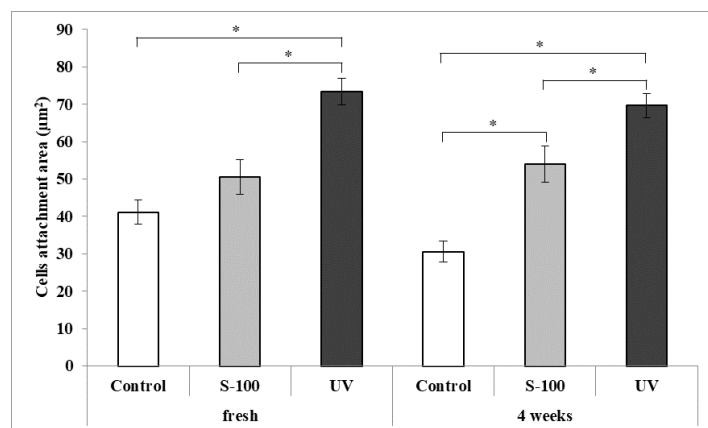


Fig. 3 細胞接着面積 (\* $p < 0.01$ , Tukey test,  $n=5$ )

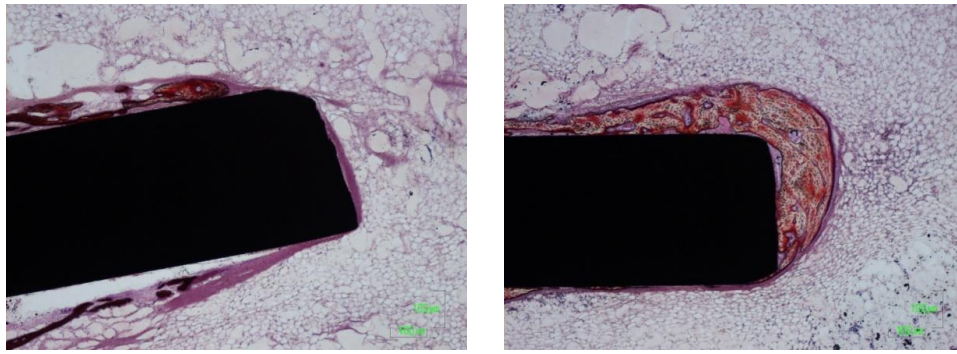


Fig. 4 Ti ディスク埋植 4 週後のウサギ大腿骨の Villanueva bone 染色像  
A; Control, B; S-100 (scale bar=100 μm)

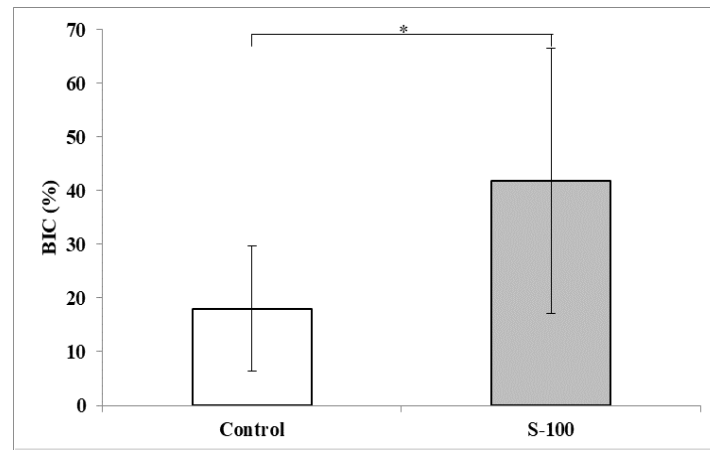


Fig. 5 ウサギ大腿骨埋植 4 週後の BIC (\* $p < 0.05$ , t-test, n=5)

<引用文献>

- 1) 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* 2009; 30 (29): 5352–5363.
- 2) Shu T, Okajima M, Wada Y, Shimokawa K, Ishii F. The treatment effect of the burn wound healing by electrolytic reduction ion water lotion. *Biosci Trends*. 2010; 4 (1): 1-3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

MIKI Takahito, MATSUNO Tomonori, HASHIMOTO Yoshiya, MIYAKE Akiko, SATOMI Takafumi, In Vitro and In Vivo Evaluation of Titanium Surface Modification for Biological Aging by Electrolytic Reducing Ionic Water. *Applied Sciences*, 2019, 10.3390/app9040713.

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ①松野智宣, 浅野一成, 北原和樹, 宮坂 平, 又賀 泉, 電解還元性アルカリイオン水によるチタン表面のバイオリジカルエイジングの制御, 第 69 回日本口腔科学会, 2015 年.
- ②三木貴仁, 松野智宣, 浅野一成, 又賀 泉, チタン表面のバイオリジカルエイジングを改善する電解還元性イオン水を用いた表面機能化, 第 61 回日本口腔外科学会, 2016 年
- ③Miki T, Asano K, Miyasaka T, Matsuno T, Evaluation of the novel surface treatment method of titanium by electrolytic reduction ion water. 9th Asia Pacific Dental Congress, 2017 年.
- ④三木貴仁, 浅野一成, 山口友輔, 松野智宣, チタンのぬれ性を高める安全で簡単な表面処理, Oral Reconstruction Symposium JAPAN, 2017 年.
- ⑤三木貴仁, 山口友輔, 浅野一成, 松野智宣, 電解還元性イオン水によるチタン表面のバイオリジカルエイジングの制御と生体機能化, 第 21 回日本顎顔面インプラント学会, 2017 年
- ⑥Miki T, Asano K, Yamaguchi Y, Matsuno T, Evaluation of the novel surface treatment method of titanium by electrolytic reduction ion water, The 30th Annual Congress of Taiwan Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2018年
- ⑦Matsuno T, Miki T, Y Yamaguchi, Hashimoto Y, Miyasaka T, Satomi T, Overcoming the biological aging of titanium by using electrolyzed deoxidized and ionized water, European Association for Osseointegration, 2018年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：橋本 典也

ローマ字氏名：(HASHIMOTO, yoshiya)

所属研究機関名：大阪歯科大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20228430

研究分担者氏名：浅野 一成

ローマ字氏名：(ASANO, kazunari)

所属研究機関名：日本歯科大学

部局名：生命歯学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：10632531

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：三木 貴仁

ローマ字氏名：(MIKI, takahito)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。