



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アナターゼ型二酸化チタンが光処理機能化と骨髄由来間葉系幹細胞親和性に及ぼす影響
Author(s)	坂田, 美幸; Sakata, Miyuki
Citation	北海道歯学雑誌, 32(2), 193-201
Issue Date	2012-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/48713
Type	journal article
File Information	09-sakata_gencho.pdf



原 著

アナターゼ型二酸化チタンが光処理機能化と
骨髄由来間葉系幹細胞親和性に及ぼす影響

坂 田 美 幸

抄 録：チタンインプラントが生体内で機能圧を負担するためには、オッセオインテグレーションの成立が必須である。表面微細形状は骨形成に影響を与える重要な表面特性であり、一般的にrough surfaceは、smooth surfaceと比較して早期にチタンインプラント表面に骨を形成するとの報告が多く、広く普及している。また、紫外線（UV）照射により、チタンの骨芽細胞親和性および骨親和性が向上することが報告されており、このような効果の一因として、光触媒作用が考えられている。そこで、アナターゼ型二酸化チタン結晶を含む被膜により光触媒活性を高めた新規チタン表面を作製し、その表面特性および間葉系幹細胞に対する影響を調べた。

鏡面研磨チタン（Pol）、酸処理チタン（AE）およびAEにアナターゼ被膜を形成したチタン（An）を作製し、それぞれに対して暗所保管期間を設定した試料を準備して、表面構造の解析と光触媒活性を評価した。また、間葉系幹細胞を用いて、初期細胞接着を評価するとともに、リアルタイムPCR法にて細胞骨格関連遺伝子の発現を定量した。

Anは試料作製直後から4週間超親水性を示した。ラマン分光法を用いてAn表面を分析し、アナターゼ型二酸化チタンが含まれていることを確認した。さらにメチレンブルー分解試験を行い、このアナターゼ型二酸化チタンには、高い光触媒活性があることを確認した。接着細胞数は、いずれの試料でも経時的に減少したが、AnはPol、AEと比べて接着細胞数が多く、経時的な減少率も小さかった。さらに、UV照射によりPol、AEでは試料作製直後と同程度まで細胞接着数が回復したのに対し、Anは試料作製直後と比較しておよそ30%増加した。細胞骨格関連遺伝子の発現は経時的に減少したが、UV照射によりRas homolog gene family, member A（Rho A）ではおよそ40%増加した。

本研究から、アナターゼ型二酸化チタン結晶を含む被膜をチタン表面に形成することによって光処理機能化に伴い骨髄由来間葉系幹細胞（BMSC）に対する親和性が増強したことから、骨親和性の極めて高いチタンインプラント開発の可能性が示唆された。

キーワード：チタンインプラント、光処理機能化、アナターゼ型二酸化チタン、光触媒作用、骨髄由来間葉系幹細胞親和性

緒 言

チタンインプラントは、喪失した歯の代用としてだけでなく人工関節や骨折部位の固定などの整形外科領域においても重要な役割を果たしている¹⁻³⁾。チタンインプラントが生体内で機能圧を負担するためには、インプラント表面と骨の間に結合組織の介在のない界面を獲得すること、すなわちオッセオインテグレーションが必要である。オッセオインテグレーションの成立には、インプラント表面に間葉系幹細胞が接着し、細胞増殖に伴う細胞密度の増大が細胞相互作用を活性化させ、骨芽細胞へと分化し骨を形成す

るという一連の現象が関与する。早期に強固なオッセオインテグレーションを獲得するためには、これらの現象に要する時間を短縮することが必要である。チタンの表面性状は細胞の接着、伸展、分化に大きな影響を与えることから、インプラント表面に対する様々な表面改質がこれまで試みられてきた。

市販のインプラント表面は、表面改質法の違いから機械研磨面、サンドブラスト面、酸エッチング面、陽極酸化面、アパタイトコーティング面など多岐に渡り、インプラント体の表面特性の違いはインプラント表面における骨形成に影響を与える。一般的に酸エッチング面などのrough

surfaceは機械研磨面に代表されるsmooth surfaceと比較し、早期に骨の形成が起こることが報告されており⁴⁻⁹⁾, rough surfaceを有するチタンインプラントは臨床の現場において現在の主流となっている。しかしながら, *in vitro*の実験系では骨髄由来間葉系幹細胞は, rough surfaceと比べてsmooth surface上において, より高い初期細胞接着と細胞増殖を示すことが知られている。これまでインプラント表面での骨形成をさらに促進させることを目指して, rough surface上で分化を妨げることなく, 細胞接着, 増殖を向上させる試みが数多くなされてきた。

紫外線 (UV) 照射を応用した表面改質では, チタンやジルコニアなどのバイオマテリアルの骨芽細胞親和性および骨親和性が向上すると報告されている^{10,11)}。この光処理機能化の特徴は物理化学的な表面改質であり, 光処理機能化チタンの示す優れた生体親和性はUV照射に伴う光触媒作用が一因として考えられている。酸化チタンにUVを照射すると, 電子と正孔が生じる¹²⁾。この電子と正孔が非常に強い酸化力, 還元力を持っており, 空気中の水や酸素などと反応することでヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) やスーパーオキシドアニオン ($\cdot\text{O}_2$) などの活性酸素種を生じる。この活性酸素種の中でもヒドロキシラジカルは特に酸化力が大きく, 有機物質を構成するC-C結合, C-H結合, C-N結合, C-O結合, O-H結合, N-O結合を切断する。

一般的に光触媒に使用されている二酸化チタンはその結晶構造によってアナターゼ型とルチル型の2種類に大きく分けられる。アナターゼ型の二酸化チタンは, 結晶が針状を呈しておりルチル型と比較し表面積が大きく, 活性酸素種の生成量が多いことから, 光触媒作用が効率的に起こるため (図1), 現在は主にこのアナターゼ型が用いられている^{13,14)}。そこで今回, チタン表面の光触媒活性を高めることで光処理機能化に伴う骨芽細胞親和性が增强されるという仮説を立てて, アナターゼ型結晶体を付与することにより, 光触媒活性を高めたチタン表面を作製し, 表面特性の分析を行なうとともに, 新規チタン表面でのラット骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow derived mesenchymal

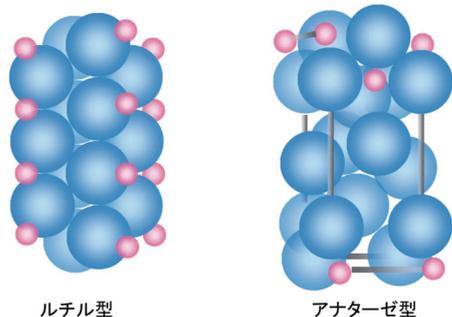


図1 ルチル型とアナターゼ型酸化チタンの結晶構造 (模式図)。赤球がチタン原子, 青球が酸素原子。原子間の結合力の違いにより, アナターゼ型の表面積の方が大きい。

stem cell, BMSC) の挙動を調べることを目的とした。

材料と方法

1. 試料作製

JIS規格第II種チタンディスク (直径20 mmまたは7 mm, 厚さ3 mm, 純度99.9%) に対して, 1) Polished (Pol): 600 gritにて研磨し, コロイダルシリカを用いて鏡面仕上げとした試料, 2) Acid-etched (AE): Polを, 19%フッ化水素酸 (HF) にて30秒間, その後125℃に加熱した66.6%濃硫酸 (H_2SO_4) にて75秒間処理した試料, 3) Anatase-coated (An): AE表面に光触媒コーティング剤 (ST-K211, 石原産業, 大阪) を塗布し, 300℃で10分間乾燥する工程を10回繰り返すことによりAE表面に二酸化チタン結晶を固化した試料の計3種類のチタン表面を用意した。各試料は暗所保管期間を0 (作製直後), 1週間ならびに4週間設定し, 実験に用いた。さらに, 4週間経過した試料に殺菌灯 (GL15, 三菱電機, 東京) を用いて紫外線ピーク波長 250 ± 20 nm (2.0 mW/cm²) を48時間照射した試料を用意した。

2. 各試料の表面特性の評価

今回チタン表面に形成した被膜の結晶構造を分析するためにX線回折装置 (XRD) (RIGAKU RINT2500 VHF, リガク, 大阪) および顕微ラマン分光装置 (RAMAN) (NR-1800, 日本分光, 東京) を用いた。XRDの測定条件は, 管球にCuを用い, 電圧30 kV, 電流80 mA, 2θ の走査範囲を $20 \sim 80^\circ$ とした。RAMANの測定条件は, He-Neレーザ (波長: 633 nm) を用い, 分解能 1 cm⁻¹, 測定範囲 $120 \sim 870$ cm⁻¹, 積分時間15秒, 積分回数10回とした。

3. 光触媒活性の評価

各試料表面の光触媒活性は, メチレンブルーの分解によって評価した。各試料はあらかじめ20 ppmのメチレンブルー標準液内で24時間暗所にて保管したのち, 10 ppmのメチレンブルー試験液5 mlの入ったペトリ皿に浸漬した。紫外線ピーク波長が 360 ± 20 nm (紫外線強度 0.1 mW/cm²) および 250 ± 20 nm (紫外線強度 2.0 mW/cm²) であるブラックライト (FL15 BLB, 東芝, 東京) を10 mm離れた位置から試料表面に照射し, 2, 4, 6時間経過後のメチレンブルー溶液の664 nmにおける吸光度を吸光度測定器 (Ultrospec3100 pro, Arsham Bioscience) を用いて測定することにより, 退色変化を調べた。

4. 表面元素分析および水酸基定量

各試料の表面元素分析はX線光電子分光装置 (XPS) (ESCA-850, 島津製作所, 京都) を用いて高真空状態下 (1.0×10^{-6} Pa) で行なった。表面水酸基の定量には誘導体化

試薬として無水トリフルオロ酢酸 (TFAA) (和光純薬工業, 大阪) を用いた。

誘導体化の化学反応式を図2に示す。70 mlバイアル瓶にTFAAを1滴滴下し、その中に10 mlバイアル瓶に入れた試料を入れ密栓し室温で60分間反応させた。反応後は栓を開放して室温で1時間の減圧乾燥を行った¹⁵⁾。試料表面の水酸基とTFAAが反応し、生成したトリフルオロ酢酸 (TFA) から水酸基量を定量した。

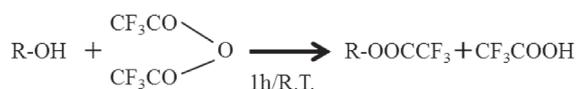


図2 誘導体化の化学反応式。生成されたF元素を含むトリフルオロ酢酸から水酸基量を定量することができる。

5. 水滴接触角測定

各試料表面の表面ぬれ性の評価として、4 μlの水を作製直後、暗所保管3日から4週間、4週間経過後の試料表面に滴下し、水滴接触角計 (Phoenix Alpha, S.E.O, 韓国) にて水滴接触角を計測した。さらに、暗所保管4週間経過後の試料にUV照射したものについても同様にして水滴接触角を計測した。

6. 培養細胞および培養条件

8週齢の雄性Sprague-Dawleyラット大腿骨から採取したBMSCを37℃, 5% CO₂, 95%気相下において15% FBS, 10⁻⁸ M dexamethasone, 10 mm Na-β-glycerophosphate, 50 μg/ml ascorbic acid, antibiotic-antimycotic溶液含有α-MEM中で通法に従い分離、初代継代培養し、80%コンフルエントに達した培養細胞を0.25% trypsin-1 mm EDTA-4Naにて剥離し、各実験に用いた。なお、本実験に関しては北海道医療大学動物実験委員会「動物実験に関する指針」に準拠して行なった。

7. 初期接着細胞数の評価

各試料表面に播種密度が2×10⁴ cells/cm²となるように細胞を播種し、4時間培養後、非接着細胞を取り除いた後に、0.2% コラゲナーゼ含有0.25% trypsin-1 mm EDTA-4Naにて試料表面に接着した細胞のみを剥離回収し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。

8. 細胞骨格関連遺伝子発現の解析

初期細胞接着と同様にAn上に細胞を播種し、3時間培養後、試料表面に接着した細胞のみを剥離回収し、血球計算盤を用いて細胞数を計測し、2×10⁴ cells/mlの濃度に調整した細胞溶液をTRIzol (Invitrogen, アメリカ) を用いてtotalRNAを抽出し、通法に従い、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Quiagen, ドイツ), oligo(dT)₁₅ primer (1 μM) にてcDNAを合成した。細胞骨格の制御に関与するCell division control protein 42 (Cdc42), Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), Ras homolog gene family, member A (Rho A) および VinculinのcDNAをTaqmanプローブ (Applied Biosystems, アメリカ) を用いて増幅し、Step One[®] real time PCR system (Applied Biosystems) で増幅産物を定量した。内部標準にはGAPDHを用い、その相対比を比較検討した。

9. 統計学的分析

統計学的検討には、各群間に対してOne-Way ANOVAを行なった後に、post hoc test としてScheffe法を用いた有意差検定を行なった。なお、統計学的有意差は、有意水準を5%とした。

結 果

1. 試料表面の結晶解析

図3に各試料のXRDおよびRAMANのパターンを示す。解析結果からはともに、Anにおいて矢印で示すアナターゼ型のピークが認められたが、Pol, AEではアナターゼ型の

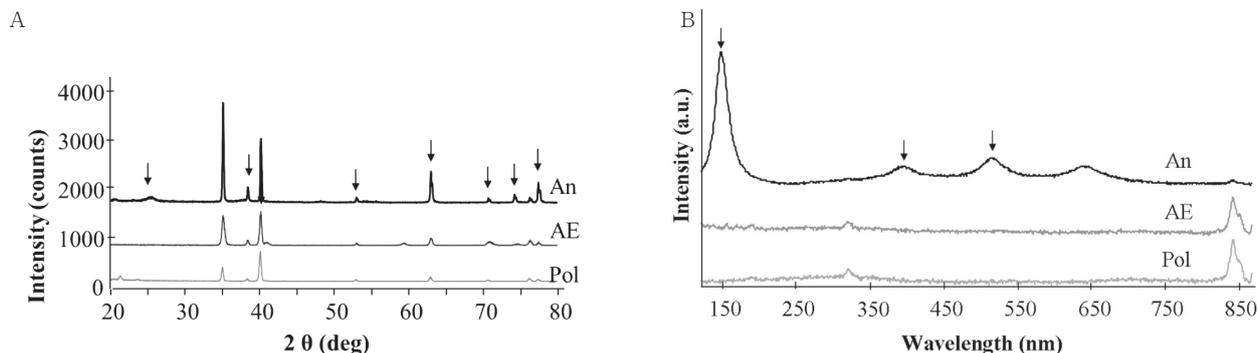


図3 各試料表面の結晶構造解析。アナターゼ型結晶の検出を示すピークが出現した波長を矢印で示す。Anではアナターゼ型結晶のピークを検出したが、PolおよびAEでは検出されなかった。
A: XRDパターン B: RAMANスペクトル

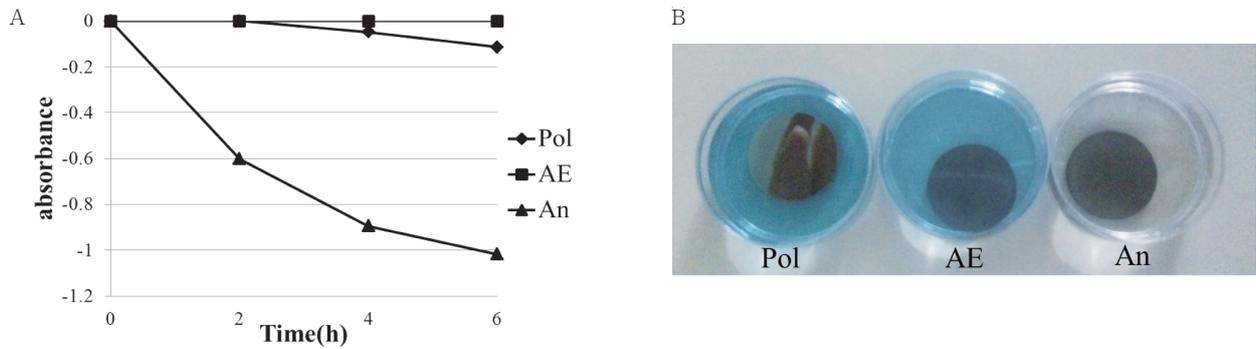


図4 メチレンブルー分解試験の結果

A: 吸光度の変化. Anは経時的に吸光度が減少した.

B: 6時間経過後の各試料を浸漬したメチレンブルー試験液. 左からPol, AE, An. Anの試験液はメチレンブルーが分解され、ほぼ透明であった.

のピークが認められなかった. これらの結果から、今回用いた被膜形成法によりチタン表面にアナターゼ型結晶が形成されていることが確認された.

2. メチレンブルー分解試験

表面性状の異なる各試料にブラックライトを最長6時間照射し、経時的なメチレンブルー試験液の吸光度を経時的に測定した(図4-A). AnはPol, AEと比較して有意な吸光度の低下が認められ、照射開始6時間後には溶液はほぼ透明となり、メチレンブルーがほとんど分解されたこと

が目視でも確認できた(図4-B).

3. 試料表面の元素分析と表面水酸基の定量

各試料のTFAAによる誘導体化後のXPSによる測定結果では、UV照射により、表面の炭化水素が減少した(図5). また、UV照射により、O1sスペクトルにおいてPolおよびAEは照射前とは異なる532.5eV付近に水酸基が検出されたが、AnはUV照射前から同部位において水酸基が検出された. 誘導体化後に検出されるCF₃に由来するF元素濃度の変化量はC1sスペクトル上の293.5eVにおける結合

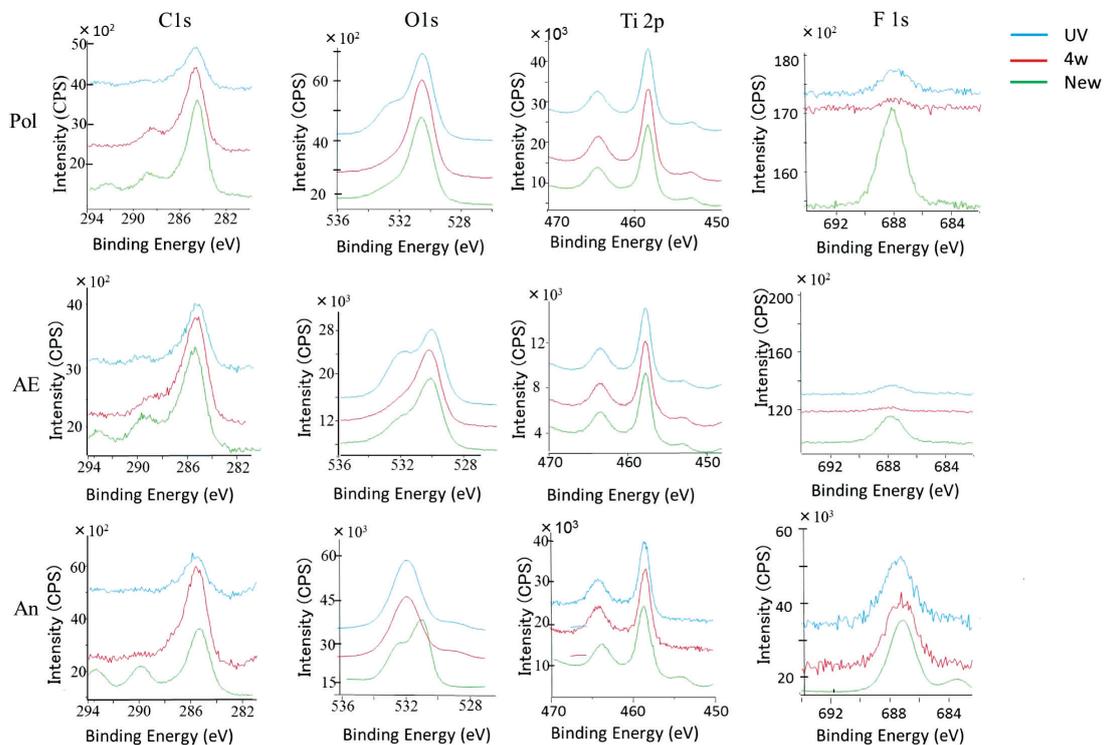


図5 ESCAによる各試料表面元素分析結果. 試料作製直後(New, 緑), 4週経過後(4w, 赤), 4週経過後にUV照射(UV, 青). 各試料ともピークとの高低差が検出強度を示す. 左からC1sスペクトル, O1sスペクトル, Ti2pスペクトル, F1sスペクトル. 経時的およびUV照射による炭化水素と水酸基の変化が認められた.

エネルギーのピーク強度が表面水酸基量となる。各試料とも作製直後においてはピークを確認できたが、4週およびUV照射試料でのピークは認められなかった。

4. 水滴接触角の推移

作製直後の各試料の接触角はほぼ0°となり超親水性を示し、その後、PolおよびAEの表面は時間依存的に接触角が増大し、4週間経過後には疎水性へと変化したが、Anでは4週間経過後においても有意な変化は認められず、超親水性の状態を維持した(図6-A)。さらに、4週間経過後の各試料にUVを1時間照射したところ、水滴接触角は再び超親水性となることも確認した(図6-B)。

5. 初期接着細胞数

図7に示す通り、すべてのチタン表面において試料作製

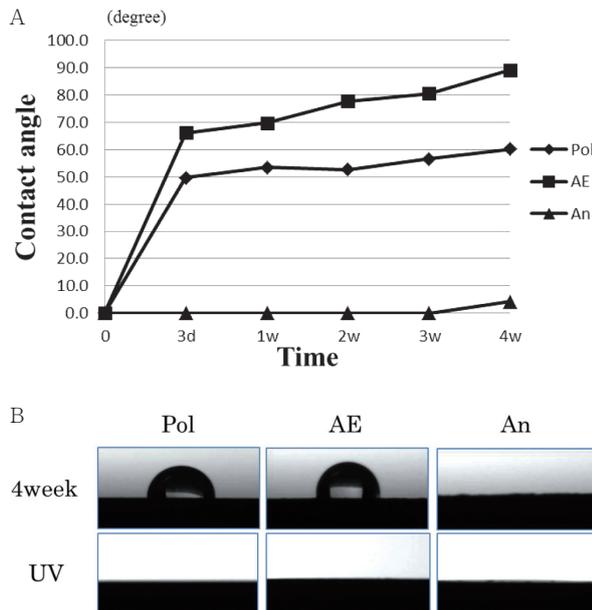


図6 水滴接触角

A: 水滴接触角の経時的推移。Anの水滴接触角の増大は認められなかった。
 B: 試料上の水滴(4w経過試料およびUV照射試料)。UV照射によって再び超親水性へと変化した。

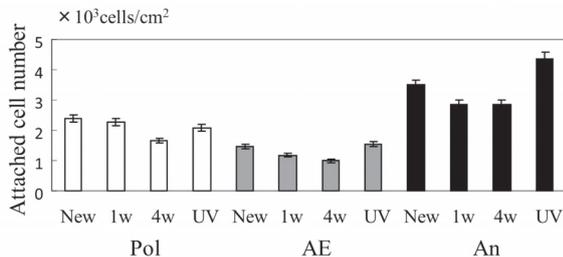


図7 播種4時間後のBMSCの初期接着数。各試料ともUV照射によって作製直後と同等あるいはそれ以上の接着数を示した。

からの時間経過に伴い、初期接着細胞数が減少する傾向が認められた。AEでは4週間後33%減少したが、Anは19%の減少であった。また、細胞接着数はPolおよびAEよりも有意に大きかった ($p < 0.05$)。さらに、UV照射によってPol、AEとも試料作製直後と同程度の細胞接着数に回復し、Anは作製直後よりも30%増加した。

6. 細胞骨格関連遺伝子の発現

遺伝子発現レベルはGAPDHを内部標準とし、比較ΔCt法(ΔΔCt法)を用いて定量した。各遺伝子発現の変化においてPol、AEでは明らかな時間依存的変化は認められなかったがAnは経時的に遺伝子の発現量が減少し、UV照射によって試料作製直後に近い数値に回復し、RhoAでは40%程度の発現量の増加が認められた。また、UV照射によりPolにおけるVinculinを除いて、すべての試料作製直後と比較し、試料作製直後以上の発現量を示し、UV照射による遺伝子発現の増加が認められた(図8)。

考 察

チタン表面が作製されてから時間経過とともに生物学的活性が失われていくことはよく知られている。また、細胞とチタン表面との接着にはインテグリンなどの接着性タンパクが関与し、これらのタンパクの吸着には表面の水酸基量が関与すると考えられている。したがって、チタン表面の水酸基の増加に伴い、タンパク質吸着と細胞接着は促進される^{10,16-17}。この現象はチタン表面の水酸基が中性領域で正の電荷を持ち、負の電荷を持つタンパク質をより多く吸着するためと考えられている¹⁸。チタンインプラント表面には作製後速やかに二酸化チタン層が形成されるだけでなく、炭化水素の吸着により表面水酸基量が減少し、タンパク質の吸着および細胞の接着が阻害されると考えられる。また、表面水酸基量の減少は材料の親水性の低下をもたらす、水滴接触角の増大へと繋がる。このようにチタン表面が作製されてからの時間経過とともに生物学的活性を失っていく現象を、チタンの生物学的エイジングとしてとらえている。この生物学的エイジングによる影響は、骨芽細胞のチタン表面での細胞増殖および分化を遅延させるだけでなく、骨-インプラント接触率の低下を引き起こし、オッセオインテグレーションを獲得する上で重大な妨げとなりうると報告されている¹⁹。

このチタン表面に吸着した炭化水素を除去する効果的な方法として、UV照射処理がある。UV照射により酸化チタン表面で生成した活性酸素種の強い酸化力によって、分解困難な有機物質や有害気相物質の分解・抗菌作用などを発揮すると考えられる²⁰。そこで、環境問題やクリーンエネルギー分野において、汚染物測定、防曇、防汚、抗菌効果のある材料として二酸化チタンの光誘起超親媒性ならびに光触媒作用が注目されている²¹⁻²⁶。さらに、UV

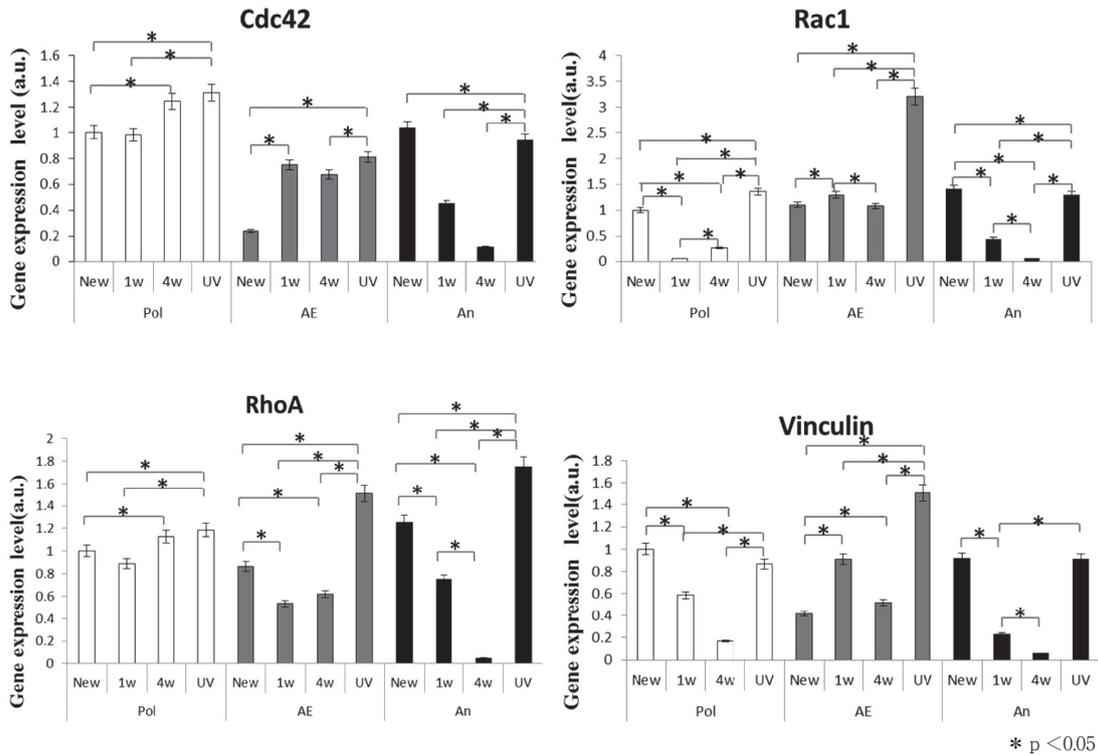


図8 播種3時間後の試料に接着していたBMSCにおける細胞骨格関連遺伝子の発現。

左上Cdc42, 右上Rac1, 左下RhoA, 右下Vinculin. Pol, AEでは時間依存的変化は認められなかったが, Anは時間依存的に発現量が減少した。また, UV照射によって各試料とも発現量の回復が認められた。

照射によるチタン表面の炭化水素の分解は, 長波長UVによる光触媒作用だけでなく, 短波長UVによる直接的分解作用によっても起こると考えられる。チタンインプラントに一定の波長のUVを照射することで, チタン表面に吸着した炭化水素を除去するだけでなく, チタン表面の濡れ性の向上や表面電荷の移動が起こることも相乗的に関連し, 早期に強固なオッセオインテグレーションの獲得ができるとして期待されている²⁷⁻²⁹⁾。しかしながら, そのメカニズムについてはいまだ明らかでないことから, 本実験では, アナターゼ型二酸化チタンに着目し, 光触媒活性を高めた試料の上での骨芽細胞の挙動について検討した。

チタン表面には膜厚数nm程度の二酸化チタン層が存在しているが, 自然に形成されるこの二酸化チタン層の光触媒活性は低いと考えられている。本実験でもPolおよびAEでは, XRDおよびRAMANによる表面分析においてアナターゼ型二酸化チタンのピークは検出されず, メチレンブルー分解試験の結果からも, 光触媒活性はほとんど認められなかった。そこでチタン表面に高い光触媒活性を付与するためには, アナターゼ型二酸化チタン結晶を付与することが必要となる。その方法としては, 湿式法と乾式法がある。湿式法には, 非耐熱材料に対してアナターゼ型結晶の酸化チタン粉末やゾルを利用して固定するコーティング法, ガラスなどの耐熱材料に対してチタン化合物を塗布し, 400℃以上で焼成するゾル・ゲル法がある。また, 乾

式法には化学反応を利用して金属表面上の二酸化チタン層の結晶構造を変える陽極酸化法, 液相析出法 (LPD) や, チタン表面に二酸化チタンを真空蒸着する方法, スパッタ法, 溶射法がある。乾式法は真空中あるいは大気中で酸化チタンを成膜するために, 専用の特殊な装置が必要である²⁶⁾。今回の試料作製にはチタン溶液に浸漬した試料を引き上げて乾燥させることで, 簡便にアナターゼ被膜を付与できるディップ法を採用した。被膜形成後に超音波洗浄し, 被膜が剥離しないことを確認したが, 今後生体内に埋入する際に被膜が基材から剥離する可能性もあることから, 将来的には, 乾式法によりチタン表面にアナターゼ型二酸化チタン結晶を付与する方法についても検討する必要があると思われる。本実験で用いたコーティング材を塗布した結果, 作製した新規試料からはXRDおよびRAMANともにアナターゼ型のピークが検出された。また, メチレンブルー分解試験では, 目視でほぼ透明の状態にまでメチレンブルーが分解されていることも確認でき, 非常に高い光触媒活性を有することが示された。基材に用いたAEでは, アナターゼの明確なピークが認められず, また, メチレンブルーの分解もほぼ進行しなかったことから, コーティング材に含まれる酸化チタン粉末に起因するアナターゼ型結晶であり, 光触媒活性を獲得したと考えられる。

今回作製したアナターゼ被膜を付与した試料では, PolならびにAEと比較して作製直後の表面水酸基量が多く,

炭化水素量は減少し、超親水性を示した。また、これらの経時的な変化も少なかったことから、UVの照射にかかわらず親水性が長時間維持されることが確認された。さらに、UV照射により表面水酸基量の変化はピークの出現した波長から表面吸着水と考えられ、これにより親水性の維持と表面の炭化水素の吸着が改善されたと推察される。

さらに、初期接着細胞数はPol, AEと比較し高い数値を示し、経時的な減少率を2/3に縮小できただけでなく、UV照射によって試料作製直後以上の細胞接着が認められた。アナターゼ型結晶の存在によって炭化水素の分解は進行すると考えられるが、UV照射によって活性酸素種が多く発生することによって、光触媒作用が活性化された結果、UV照射したAnでは、試料作製直後よりも初期細胞接着に有効であることが示唆された。これに反し、細胞骨格関連遺伝子の発現においては、従来のPolおよびAEと比較し、AnにおけるRho A以外の遺伝子発現量が少なく、また、経時的な発現量の減少も認められたことから、必ずしも表面水酸基量の維持、超親水性の維持が初期細胞接着においての必要条件でないことが推察された。また、本実験において用いたコーティング剤によって付与された被膜に含まれるアナターゼ型二酸化チタンの含有量は13%程度であり、ほとんどが二酸化ケイ素(SiO₂)であったことも確認したことから、光触媒作用には十分なアナターゼ型二酸化チタン含有量ではあるが、試料表面に付着した細胞が強固に接着・伸展においてSiO₂が抑制的に作用している可能性がある。先に述べた、チタン表面に直接アナターゼ型二酸化チタンを効率よく付与することができれば、SiO₂の含有を抑えることもできると思われる。しかしながら、今回用いたコーティング剤による被膜であってもUV照射による遺伝子発現量の回復および増加はPolおよびAE以上の数値を示したことから、Anが光処理機能化において優位に作用する可能性が示唆された。

チタンインプラントは流通経路などの理由から製造から実際に埋入されるまでの間に一定期間がかかる。この間にもチタンインプラント表面の生物学的エイジングは進行している。既に報告されているとおり、光処理機能化はチタンインプラントの生物学的エイジングを解消する有効な手段である。今回作製したアナターゼ型二酸化チタン結晶を含む薄膜は、チタン表面の生物学的エイジングの進行を抑制させるだけでなく、高い光触媒作用によって光処理機能化がより効果的に起こると考えられることから、より細胞親和性の高い新規チタン表面の開発に応用できる可能性が示唆された。

結 論

本研究では、作製したアナターゼ型結晶を付与したチタン試料によって、表面特性の分析、ラット間葉系幹細胞の挙動を検討した結果、以下の結論を得た。

1. 作製したAnは高い光触媒活性を示したが、PolおよびAEでは光触媒活性をほとんど示さなかった。
2. An表面の水酸基量の割合はPol, AEと比較し多く、水滴接触角の変化が認められなかった。また、これらの結果は本実験で設定した保管期間およびUV照射の有無によらなかった。
3. Anの初期細胞接着数は保管期間の延長によって減少したが、Pol, AEと比較し減少率は小さかった。
4. Anに初期接着した細胞の細胞骨格関連遺伝子は保管期間の延長により発現量が減少したが、UV照射によって試料作製直後と同等あるいはそれ以上の発現量となった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に多大なご援助・ご助言を頂きました北海道医療大学歯学部咬合再建補綴学分野の越野寿教授および會田英紀准教授と教室員の皆様、北海道医療大学歯学部生体材料工学分野の遠藤一彦教授、本学大学院歯学研究科口腔健康科学講座口腔分子生化学教室の田村正人教授と教室員の皆様に厚く御礼を申し上げますとともに、ご理解ご協力を賜りました本学大学院歯学研究科口腔機能学講座リハビリ補綴学教室の大畑昇教授をはじめ教室員の皆様に心より感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Homsy CA, Cain TE, Kessler FB, Anderson MS, King JW: Porous implant systems for prosthesis stabilization. Clin Orthop Relat Res. 89 : 220-35, 1972.
- 2) Effenberger H, Imhof M, Richolt J, Rehart S: Cement-free hip cups. Current status. Orthopade 33 : 733-50 ; quiz 751, 2004.
- 3) Stilling M, mAdsen F, Odgaard A, Rømer L, Andersen NT, Rahbek O, Soballe K: Superior fixation of pegged trabecular metal over screw-fixed pegged porous titanium fiber mesh: a randomized clinical RSA study on cementless tibial components. Acta Orthop 82 : 177-86, 2011.
- 4) Thomas KA, Cook SD: An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. J Biomed Mater Res 19 : 875-901, 1985.
- 5) Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T: Removal torques for polished and rough titanium implants. Int J Oral maxillofac Implants 3 : 21-24, 1988.
- 6) Grössner-Schreiber B, Tuan RS: The influence of the titanium implant surface on the process of osseointegration. Dtsch Zahnärztl Z 46 : 691-693, 1991.

- 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* 25 : 889-902, 1991.
- 8) Wilke HJ, Claes L, Steinemann S: The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone. Heimke G, Soltesz U, Lee AJC. *Clinical implant materials: Advances in Biomaterials*, 309-314, Elsevier, Amsterdam, 1991.
- 9) Albrektsson T, Ann Wennerberg: Oral Implant Surfaces: Part2-Review Focusing on Clinical Knowledge of Different Surfaces. *Quintessence*, 544-564, 2004.
- 10) Aita H, Att W, Ueno T, Yamada M, Hori N, Iwasa F, Tsukimura N, Ogawa T: Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation. *Acta Biomater* 5 : 3247-57, 2009.
- 11) Att W, Takeuchi M, Suzuki T, Kubo K, Anpo M, Ogawa T: Enhanced osteoblast function on ultraviolet light-treated zirconia. *Biomaterials* 30 : 1273-1280, 2009.
- 12) Fujishima A, Honda K: Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature*. 238 (5358) : 37-38, 1972.
- 13) Sawase T, Jimbo R, Baba K, Shibata Y, Ikeda T, Atsuta M: Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clin Oral Implants Res* 19 (5) : 491-496, 2008.
- 14) 松田 実, 関 浩子, 中村知彦, 北垣 寛 : 酸化チタン光触媒の薄膜化に関する研究. 京都府中小企業総合センター技報 26 : 74-78, 1998.
- 15) 野村英治 : 誘導体化技術による官能基の定量化と分布分析. 塗料の研究 150 : 2-8, 2008.
- 16) Yoshinari M, Matsuzaka K, Inoue T, Oda Y, Shimono M: Bio-Functionalization of Titanium Surfaces for Dental Implants. *Materials Transactions* 43 : 2494-2501, 2002.
- 17) 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* 25 : 49-62, 2010.
- 18) Hanawa T, Kon M, Doi H, Ukai H, Murakami K, Hamanaka H, Asaoka K: Amount of hydroxyl radical on calcium-ion-implanted titanium and point of zero charge of constituent oxide of the surface-modified layer. *J Mater Sci Mater Med* 9 : 89-92, 1998.
- 19) 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* 30 : 4268-4276, 2009.
- 20) 清野 学 : 酸化チタン物性と応用技術. 177, 技報堂, 東京, 1991.
- 21) 藤嶋 昭, 相澤益男, 井上 徹 : 電気化学測定法(下). 361, 技報堂, 東京, 1989.
- 22) 中村朝徳 : 光触媒酸化チタンを用いたコーティング. *TECHNO-COSMOS*, 14 : 34-39, 2001.
- 23) Keleher J, Bashant J, Heldt N, Johnson L, Li YZ: Photo-catalytic preparation of silver-coated TiO₂ particles for antibacterial applications. *World J Microbiol Biotechnol* 18 : 133-9, 2002.
- 24) Nakashima T, Ohko Y, Kubota Y, Fujishima A: Photocatalytic decomposition of estrogens in aquatic environment by reciprocating immersion of TiO₂-modified polytetrafluoroethylene mesh sheets. *J Photochem Photobiol* 160 : 115-20, 2003.
- 25) Suketa N, Sawase T, Kitaura H, Naito M, Baba K, Nakayama K, Wennerberg A, Atsuta M: An antibacterial surface on dental implants, based on the photocatalytic bactericidal effect. *Clin Implant Dent Relat Res* 7 : 105-111, 2005.
- 26) Shibata T, Hamada N, Kimoto K, Sawada T, Sawada T, Kumada H, Umemoto T, Toyoda M: Antifungal effect of acrylic resin containing apatite-coated TiO₂ photocatalyst. *Dent Mater J* 26 : 437-444, 2007.
- 27) Takeuchi K, Saruwatari L, Nakamura HK, Yang JM, Ogawa T: Enhanced intrinsic biomechanical properties of osteoblastic mineralized tissue on roughened titanium surface. *J Biomed Mater Res* 72 : 296-305, 2005.
- 28) Ogawa T, Saruwatari L, Takeuchi K, Aita H, Ohno N: Ti nano-nodular structuring for bone integration and regeneration. *J Dent Res* 87 : 751-756, 2008.
- 29) Iwasa F, Tsukimura N, Sugita Y, Kanuru RK, Kubo K, Hasnain H, Att W, Ogawa T: TiO₂ micro-nano-hybrid surface to alleviate biological aging of UV-photofunctionalized titanium. *Int J Nanomedicine* 6 : 1327-41, 2011.

ORIGINAL

The effects of anatase-formed titanium-dioxide on photofunctionalization and osteoblastic compatibility of titanium

Miyuki Sakata

ABSTRACT : Osseointegration is essential in achieving stability of titanium implants against functional forces. To obtain early and strong osseointegration, it is important to reduce the time required for cell proliferation and differentiation. Recent studies have reported that bone formation on rough surfaces occur earlier than on smooth surfaces. Therefore, the microtopological properties of titanium surfaces are an important factor to determine osteoconductivity, and titanium implants with roughened surface are commonly used. The amount of surface hydroxyls is a key factor determining the biocompatibility at the tissue-material interface. Treatment of titanium surfaces with UV light have demonstrated increases biocompatibility and osteoconductivity, generated by a photocatalytic action. This study showed that enhancement of the photocatalytic reaction leads to an increase in photofunctionalization at the surface of titanium. Commercially pure titanium disks were polished up to 600 grit, and further finely polished with colloidal silica (Pol). Acid-etched disks (AE) were Pol treated with hydrofluoric acid (HF), following sulfuric acid (H₂SO₄). The AE disks coated with anatase-formed titanium-dioxide (An) were prepared to enhance the photocatalytic activity. Initial attachment of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSC) was evaluated by counting the number of attached cells, and the cytoskeletal-associated gene expression of the attached cells was quantified after 4 h of incubation. All samples were characterized by laser-Raman spectroscopy, and the superficial layer of the An samples was found to contain anatase-formed titanium-dioxide. Methylene blue reduction tests showed that An offers good potential for photocatalytic activity. And An samples were maintained superhydrophilic for 4 weeks, and the number of attached cells on these samples decreased with time after preparation, however, the An substrates were superior to the Pol and AE of all time-point. The UV treatment was shown to be able to recover the ability to attach cells on aged surfaces, the number of attached cells on UV-treated An samples was about 30 % higher than that on new An samples. The cytoskeletal gene expression of the attached cells was reduced time-dependently, however, UV photofunctionalization enables a recovery of the level of expression of Cdc42, Rac1, and Vinculin; for Rho A, the level of expression was about 30 % higher than for new sample. This study suggests that anatase-formed titanium-dioxide enhanced osteoblastic biocompatibility contribute to an effect of photofunctionalization, and suggests that the potential for developing titanium implant surfaces with very high bone compatibilities.

Key Words : titanium implant, photofunctionalization, anatase-formed titanium-dioxide, photocatalytic action, osteoblastic compatibility