

論文内容要旨

カルシウム修飾チタンの歯科インプラントへの
応用に関する基礎的研究

応用生命科学部門口腔外科学

(主指導教員：菅井 基行 教授)

応用生命科学部門口腔外科学

(副指導教員：武知 正晃 准教授)

応用生命科学部門先端歯科補綴学

(副指導教員：津賀 一弘 准教授)

高本 愛

論文内容要旨

論文題目 カルシウム修飾チタンの歯科インプラントへの応用に関する
基礎的研究

学位申請者 高本 愛

【目的】

歯科インプラントのフィクスチャー部位の表面デザインは、アパタイトコーティングとチタン表面の粗造化に大別される。アパタイトコーティングは周囲の骨組織と早く結合する利点を有するが、細菌の温床になることが危惧されるため、現在は表面を粗造化したチタンインプラントが主流である。近年、即時インプラントへの要求も高まっており、チタンの骨結合速度を高める研究が注目されている。化学処理等の表面改質によってチタンの骨結合速度を高める研究が散見されるが、市販の歯科用チタンインプラントに適用するためには表面の粗造構造を損なわない手法が好ましく、歯槽骨のインプラント埋入部周辺には細菌が存在することから、細菌付着力が増すような表面修飾法は好ましくない。これらの制約に基づき、本研究ではカルシウム修飾チタン (*J. Mater. Sci: Mater.* 2005) に着目した。市販品に適用されている粗造化したチタン表面に対してカルシウム修飾を行い、細胞適合性と細菌付着性を評価し、関連性を見出すとともに、カルシウム修飾チタンが歯科インプラントに応用可能であるか基礎的に検討した。

【材料および方法】

1. 粗造化したチタン表面へのカルシウム修飾と表面分析

円盤状の純チタンディスク ($\phi 14\text{mm}$, 厚さ 1mm) を基板として用いた。歯科インプラントに適用されている粗面表面を得るために、株式会社ジーシーに依頼して、純チタンディスクの表面を粗造化した。アセトン及び超純水を用いて、脱脂・洗浄後、カルシウム修飾処理を行った。具体的には、約 17ppm のオゾンが溶存した 100mM 塩化カルシウム水溶液 (25°C) 中に、粗面化した純チタンディスクを 24 時間浸漬することで処理を行った (試料名: $\text{Ca-O}_3\text{-Ti}$)。対象群として、何も処理を施していない粗面チタンディスク (試料名: Ti)、塩化カルシウム水溶液 (25°C) 中に 24 時間浸漬した試料 (試料名: Ca-Ti)、カルシウムイオンを含まないオゾン溶存水 (25°C) 中に 24 時間浸漬した試料 (試料名: $\text{O}_3\text{-Ti}$) を用いた。

各々の試料の表面構造を電子顕微鏡を用いて観察するとともに、表面粗さを 3D レーザー顕微鏡を用いて計測した。表面のカルシウムの修飾の有無については X 線光電子分光法 (XPS) により分析した。自動接触角測定装置を用いて水滴の基板に対する静的接触角を測定して、各々の試料表面の濡れ性を評価した。

2. カルシウム修飾した粗面チタンの細胞適合性

骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 を用いて *in vitro* 細胞適合性評価を行った。70%エタノールで滅菌したそれぞれの試料を 24well プレートに静置し初期接着評価については 5×10^3 個/ml の細胞懸濁液を、細胞増殖性評価について 1×10^3 個/ml の細胞懸濁液を、試料表面に 1ml ずつ播種した。3 時間、1, 3, 5, 7 日培養後、0.05%トリプシン処理によって基板から細胞を剥がした後、血球計算盤にて細胞数をカウントした。3 時間培養後、試料表面に接着した細胞の様子を観察するために、脱水・固定作業を行った後、電子顕微鏡を用いて観察した。

3. カルシウム修飾した粗面チタンの細菌付着性

細菌は、グラム陽性球菌である *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) と グラム陰性桿菌である *Escherichia coli* (*E. coli*) を

用いた。 *S. aureus* と *E. coli* を Brain Heart Infusion 培地にて 18 時間好気培養した後、 10^7 CFU/ml の濃度に調整し、菌液を各々のチタン試片上に播種した。一定時間培養後、緩く付着した菌を PBS で除去し、チタン試片表面に付着した細菌の ATP 量を測定した。

【結果と考察】

1. 粗造化したチタン表面へのカルシウム修飾と表面分析

電子顕微鏡で各々の試料表面を観察した結果、処理によるマイクロオーダースケールの構造変化は認められず、処理後も処理前と同様の粗面構造が維持されていた。表面粗さにおいても、処理による粗さの変化は認められなかった。XPS を用いてカルシウム修飾の有無を調べたところ、Ca-O₃-Ti 試料にのみカルシウムが検出され、Ca-Ti 試料の表面からはカルシウムの検出は認められなかった。この結果から、塩化カルシウム水溶液に浸漬しただけではチタン表面にカルシウムは修飾されず、カルシウム修飾へのオゾンの寄与が明らかとなった。接触角測定の結果、オゾンを用いなかった処理群の値が 99-120° であったのに対し、オゾンを用いた処理群の値はほぼ 0° であった。この結果と XPS の結果を併せて考察すると、オゾンによりチタン表面に水酸基が形成され、この水酸基を介してカルシウムイオンが表面修飾されていると推察された。

2. カルシウム修飾した粗面チタンの細胞適合性

すべての培養時間に置いて Ca-O₃-Ti 試料は、その他の試料と比較して有意に細胞が増殖した。播種してから 3 時間後の細胞形態を観察したところ、Ca-O₃-Ti 試料上に付着した細胞は、その他の試料の細胞と比較して多くの細胞が接着し、伸展している様子が観察された。処理による表面粗さの変化は認められないため、細胞接着性に及ぼす表面粗さの影響は考慮する必要はない。一方、Ca-O₃-Ti 試料にはカルシウムが修飾されており、その他の試料表面にはカルシウムが存在しない。以上の結果から、Ca-O₃-Ti 試料に修飾したカルシウムが細胞接着性および細胞増殖性の亢進に寄与したと結論づけた。

3. カルシウム修飾した粗面チタンの細菌付着性

Ca-O₃-Ti 試料表面の細菌付着数は Ti 単独試料と比較して有意に減少した。この結果は表面水酸基による親水性の発現とその安定性が影響していると考えられた。

【結語】

本研究によって、市販されている粗面チタン表面にもカルシウム修飾が可能であること、オゾンを溶存させたカルシウム塩水溶液にチタン試料を浸漬させる簡便な方法でカルシウム修飾は可能なこと、この処理によってマイクロオーダースケールの構造変化は認められないこと、修飾にはチタン表面の水酸基が寄与していること、チタン表面に修飾されたカルシウムは細胞接着性を高め、細菌付着性を促さないことが明らかになった。以上より、カルシウム修飾は歯科インプラントに適した表面処理方法であることが示唆された。