

論 文 題 目

オゾンナノバブル水（ONBW）を用いた  
チタンインプラントの生体親和性の維持

平成 28 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

堀川 英洋

## [目的]

現在市販されている口腔インプラントには種々の表面処理が施され、臨床応用されている。それらの口腔インプラントの多くが大気保存の状態出荷されている。口腔インプラントの原材料であるチタンは、切削、酸処理およびサンドブラストなどの表面加工直後から経時的に、環境由来の炭化水素化合物などがチタン表面の酸化被膜に沈着して生体親和性が低下する生物学的老化現象を引き起こすことが知られている。オゾン水には強力な殺菌作用と洗浄効果があることが報告されており、これらの効果を利用した医療への応用や半導体製造工程におけるウェーハの洗浄まで広い分野で利用されている。本研究では、オゾン水の効果が長期的に維持されるように改良された機能水としてのオゾンナノバブル水を利用し、口腔インプラントの生体親和性を維持したまま保存可能な新しい手法を開発し、オッセオインテグレーションを早期に獲得させることを目的とした。

## [材料と方法]

### 1. チタンディスク表面への処理と解析

#### 1) チタン試料

実験に使用したチタンは、JIS 第2種の純チタン（直径 13.0 mm、厚さ 3.0 mm）を用いた。試料の表面は、コロイダルシリカを用いて鏡面研磨した。親水化への処理はアルゴン雰囲気下でグロー放電処理を施した。

#### 2) 接触角の測定

チタンディスクの表面を鏡面研磨した後で親水化したチタン試料を、大気中、蒸留水中、アセトン中およびオゾンナノバブル水中で保存し、ぬれ性の経時的変化を28日間にわたって調べた。

#### 3) X線光電子分光法によるチタン表面の炭化水素化合物の測定

チタンディスクの表面を鏡面研磨した後で親水化したチタン試料を、大気中、アセトン中およびオゾンナノバブル水中で保存し28日間後の炭化水素化合物の汚染状態を確認した。

#### 4) ヒト骨髄間葉系幹細胞の初期付着細胞数の計測

鏡面に研磨して親水化したチタン試料を大気中、蒸留水中、アセトン中およびオゾンナノバブル水中に24時間保存した。その後、それぞれのチタン試料上に

ヒト間葉系幹細胞を播種して4時間培養し、試料面に付着している細胞の数を計測することで評価した。

#### 5) 走査電子顕微鏡(SEM)を用いた付着細胞の形態観察

各試料表面に付着した細胞の形態を調べるために、SEMによる観察を行った。37°Cで4時間培養後、グルタルアルデヒドを用いて細胞を固定した。エタノールで脱水した後、CO<sub>2</sub>臨界点乾燥を行い、イオンコーターにて金コーティングを行った。

#### 6) 共焦点レーザー顕微鏡を用いたアクチンフィラメントおよびビンキュリンの観察

試料表面に付着した細胞の細胞骨格の配列と細胞形態は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。37°Cで4時間培養後、アクチンフィラメントを、ローダミンファロイジンを用いて蛍光染色した。ビンキュリンの局在は、1次抗体としてマウス抗ヒトビンキュリンモノクローマ抗体、2次抗体としてFITC標識抗マウス抗体にてビンキュリンを免疫化学染色した。

#### 7) アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の計測

分化誘導を行った細胞のALP活性は、染色法および光学的な定量法を用いて評価した。染色法では37°Cで30分間培養し光学顕微鏡で観察した。染色された試料はImage Jを用いて、面積比をもって活性を評価した。光学的な定量法では37°Cで15分間培養し、それぞれの試料をマイクロプレートリーダーにて405 nmの吸光度を測定した。

### 2. SDラットの大腿骨に埋入したミニインプラントの評価

#### 1) チタン製ミニインプラント

インプラント体はJIS第2種のチタン製インプラント(直径1 mm, 長さ2 mm)を使用した。インプラントはアルゴン雰囲気下でグロー放電処理を行った後にオゾンナノバブル水で保存し、対照群として体気中にそれぞれ7日間保存した。

#### 2)SDラットへのインプラント体埋入手術

インプラント体埋入手術には8週齢のSDラットを使用した。イソフルランによる吸入麻酔下で導入、維持を行い、さらに局所麻酔下でラット大腿骨部にインプラントの埋入手術を行った。インプラント埋入手術14, 28日後にそれぞれ評価を行った。

(1) SD ラットの大腿骨に埋入したインプラントの除去トルク試験

インプラントの除去トルク試験を行い、インプラント体と骨とのインテグレーションの強さを評価した。除去したインプラントは SEM で観察し、インプラント体と骨様組織の付着状態を評価した。

(2) 軟 X 線撮影像と塩基性フクシン・メチレンブルー重染色像の観察

インプラント埋入手術 14 日後に SD ラットを組織固定液による灌流固定後、インプラント体埋入部の周囲骨を含めて摘出した。ポリエステル樹脂にて包埋し、切片機にてインプラント体の長軸に対して垂直に試料を薄切した。その後、包埋したラットの大腿骨の厚さを 120  $\mu\text{m}$  に機械研磨をして調整した。調整した試料は軟エックス線発生装置を用いて撮影した。撮影条件は 40 kV, 1 mA, 1 秒間とした。さらに試料片を厚さ 50  $\mu\text{m}$  に調節して塩基性フクシン・メチレンブルー重染色を施し、光学顕微鏡にて組織像を観察した。

[結果と考察]

チタンディスクを大気中に保存し 28 日が経過した試料では、X 線光電子分光において炭化水素化合物の付着を示す C1s のピークが高くなることを確認した。同期間オゾンナノバブル水中に保存した試料では、このピークが低い状態を維持していた。また、大気保存の試料と比較して、高いぬれ性、細胞接着性、初期細胞付着数を示し、骨芽細胞への分化を示す ALP 活性は高い値を示した。ラットの大腿骨にインプラントを埋入した動物実験では、オゾンナノバブル水に保存したチタンインプラントは埋入 14 日後の仮骨形成期において、大気中に保存した試料と比較して、高い除去トルク値と骨接触率を示した。軟 X 線写真ではインプラント体周囲に不透過像が多くみられ、骨の形成がみられた。オゾンナノバブル水に口腔インプラントを保存することでチタン表面の生物学的老化現象を抑制して高い生体親和性を示したと考えられ、口腔インプラントの保存方法によってもインプラントの表面性状が左右されることが示唆された。

[文献]

Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T.

The effect of ultraviolet functionalization of titanium on

integration with bone. *Biomaterials*. 30:1015-1025, 2009.

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 Biomaterialia*. 5: 3247-3257, 2009.

Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups

on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 28: 3074-3082, 2007.

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*. 30: 5352-5363, 2009.

Furuichi A, Arakawa S, Mano Y, Morita I, Tachikawa N, Yamada Y, Kasugai

A. Comparative analysis of efficacy of ozone nano bubble water (NBW3) with established antimicrobials. Bactericidal efficacy and cellular response. An in vitro study. *J Oral Tissue Engin*. 10: 131-141, 2012.

Hayakumo S, Arakawa S, Mano Y, Izumi Y. Clinical and microbiological

effects of ozone nano-bubble water irrigation as an adjunct to mechanical subgingival debridement in periodontitis patients in a

randomized controlled trial. Clin Oral Invest. 17: 379-388, 2013.

Rupp F, Scheideler L, Eichler M, Geis - Gerstorfer J. Wetting behavior of dental implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 26: 1256-1266, 2011.

Shibata Y, Hosaka M, Kawai H, Miyazaki T. Glow discharge plasma treatment of titanium plates enhances adhesion of osteoblast-like cells to the plates through the integrin-mediated mechanism. Int J Oral Maxillofac Implants. 17: 771-777, 2002.

Takahashi M, Chiba K, Li P. Free-radical generation from collapsing microbubbles in the absence of a dynamic stimulus. J Phys Chem B. 111: 1343-1347, 2007.

Takahashi M, Ishikawa H, Asano T, Horibe H. Effect of microbubbles on ozonized water for photoresist removal. J Phys. Chem C. 116: 12578-12583, 2012.