

〔総説〕

ナノ表面制御によるチタンインプラントの最適化

會田 英紀^{1,2)}, 河野 舞¹⁾, 豊下 祥史¹⁾, 小川 隆広²⁾, 越野 寿¹⁾

1) 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系咬合再建補綴学分野

2) UCLA歯学部, Jane and Jerry Weintraub再生生体工学センター, アドバンスド歯科補綴学, 生体材料, 病院歯科部門, 骨・インプラントサイエンス研究チーム (LBIS)

Nanoscale surface modification of titanium implants

Hideki AITA^{1,2)}, Mai KONO¹⁾, Yoshifumi TOYOSHITA¹⁾, Takahiro OGAWA²⁾ and Hisashi KOSHINO¹⁾1) Division of Occlusion and Removable Prosthodontics, Department of Oral Rehabilitation,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido2) Laboratory for Bone and Implant Sciences (LBIS), The Jane and Jerry Weintraub Center for Reconstructive Biotechnology,
Division of Advanced Prosthodontics, Biomaterials and Hospital Dentistry, UCLA School of Dentistry

Abstract

This article reviews the currently available nanotechnology both at experimental and therapeutic levels with a view to clinical implications and application in implant dentistry, particularly involving pre-implant regenerative therapy as represented by bone augmentation and guided bone regeneration, and also the placement of implants. The review focuses on nanotechnology-driven surface modification of dental implants. Nanotechnology appears to offer the potential to improve biological responses. A few dental implant products with nano-scale surface features are commercially available. However, it would be immature to claim success for developing these nanotechnology-based products before completing a biological and topographical characterization, control and optimization of the surfaces. As a candidate for addressing this, this article introduces a novel nanonodular structuring of titanium. We created a biomimetic micro-to-nanoscale hierarchy topography of TiO₂ by applying a recently reported nanonodular self-assembly technique on acid-etch-created micropit titanium surfaces. The size of the nanonodules could be controlled by varying the assembly time. The micro-to-nanoscale hierarchical structured surfaces were proven to enhance, markedly, the strength of bone-titanium integration compared to microstructured surfaces without these nanonodules. We also demonstrated that biological effects were most pronounced when the nanonodules were optimized to a diameter of 300nm within the micropits both *in vitro* and *in vivo*. In conclusion, an initial step towards implementing nanotechnology has been successfully launched to show its potential to improve current implant dentistry, however further studies are required to assure the benefit and credibility to advance current therapeutic concepts and to overcome current challenges in the field.

Key words : チタンインプラント, ナノテクノロジー, 表面改質, 生体活性, オッセオインテグレーション

目 次

1. 緒言
2. ナノテクノロジーの医療分野への応用
3. ナノテクノロジーのインプラント表面改質への応用

- 3.1. 背景
- 3.2. ナノスケールでの表面改質の試み
- 3.3. ナノ表面制御技術によるナノ構造体の最適化
4. 結論

受付：平成23年3月30日

緒 言

口腔インプラントは口腔の形態と機能を再構築し、さらにその状態を維持していく上で有効な治療戦略のひとつであり、年々その需要は高まっている。オッセオインテグレートドインプラントは、Brånemarkらの機械加工により仕上げられた滑沢な表面をもつ純チタン機械研磨面に始まり (Brånemark et al., 1969), その後、治療術式の進歩と様々な表面改質に支えられて、一定の予知性を示す臨床エビデンスが蓄積されてきた。しかしながら、インプラント治療の適応には一定の制約があり、適応と判断された症例に対する成功率は90–95%であると報告されている (Pye et al., 2009)。ここで議論すべきことは、現在報告されている成功率を算出するための母集団は、一定の適応を満たした歯列欠損を有する患者群であり、インプラント治療を希望するすべての患者ではないということである。一方で、オッセオインテグレーションの質を評価する代表的なパラメータのひとつである骨–インプラント接触率に注目してみても、その値は経時的に増加していくものの、そのまま増加し続けることはなく一定期間後にプラトーに達する。現在臨床応用されているチタンインプラントの骨–インプラント接触率の値は平均で45–70%の範囲である (Buser et al., 1991; Weinlaender et al., 1992; Berglundh et al., 2007; De Maezter et al., 2008)。インプラントの脱落症例では、インプラント界面でのオッセオインテグレーションが失われていることから、インプラントが口腔内で長期的に安定して機能を営むためには、この骨–インプラント接触率は少しでも100%に近づくことが理想であると考えられる。そこで今後、適応症の拡大ならびに治療期間のさらなる短縮など患者主導型のインプラント治療を実践し、口腔関連QoLのさらなる向上を目指していくうえで、より高いオッセオインテグレーション能をもつ次世代インプラントの開発は必要不可欠であると考えられる。

本レビューでは、生命科学分野への応用が期待されているナノテクノロジーに注目し、現在公表されているナノテクノロジーのうち、特にインプラント表面改質に応用可能であるもの、あるいはその潜在性をもつものを紹介する。その中でナノスケールの表面性状を有すると謳っているデンタルインプラントの製品に対してのレビューも交えながら、その生物学的活性について従来のインプラント表面との比較検討を行う。最後にわれわれが発明した新規ナノ表面制御テクノロジーについて解説し、ナノスケールで最適化された表面微細構造を有するチタンインプラントのすぐれた骨芽細胞親和性ならびに

骨親和性についても紹介する。

ナノテクノロジーの医療分野への応用

ナノテクノロジーと生命科学を融合させて、高度の医療を実現しようとする基礎と臨床にまたがる研究分野をナノメディシンと呼ぶようになって久しい。ナノメディシンとは、物質をナノスケールすなわち原子や分子レベルで自在に制御することにより、1) バイオチップなどのナノバイオデバイスおよび量子ドット (Quantum dot) を用いた生体イメージング技術に代表される診断技術への応用、2) ドラッグ–デザイン、薬物送達システム (Drug delivery system (DDS)) および再生医療を目指した新規バイオマテリアルの開発に代表される治療技術への応用を目指す学問領域である。ナノスケールで物質を観察し、制御することによって初めて発見されたナノ固有の現象や材料特性が報告されていることから、ナノテクノロジーが生命科学にブレークスルーをもたらすことが大きく期待されている。

分子生物学という観点から、すべての生命現象は分子レベルのスケールで動作するシステム活動の結果と考えることができ、生体内では分子認識と分子認識に基づくセルフアセンブリが多数、随所に起こり、それらが統合されて個体としての生命活動を営んでいる。このことは、インプラント歯科学において最も重要な生体反応であるオッセオインテグレーションについても例外なくあてはまるものであるから、インプラント埋入前の遺伝子診断、メンテナンス中のナノバイオモニタリング、オッセオインテグレーションの早期獲得を目指した新規バイオマテリアルの開発およびインプラント周囲炎の治療を目指した創薬ならびにDDSの開発にナノテクノロジーを導入することはきわめて有効であると考えられる。

ナノテクノロジーのインプラント表面改質への応用

3.1. 背景

オッセオインテグレーションとは、純チタン表面に光学顕微鏡レベルで、線維性組織を介在することなしに骨が直接接触した状態と定義されている。骨内にインプラントが埋入されると、埋入部位では創傷の治療過程で新生骨が形成される。われわれは、骨–インプラント界面では、周囲の正常な海綿骨領域と比べて有意に高い骨分布密度を示すこと (Ogawa and Nishimura, 2003)、酸処理チタン表面の新生骨は、周囲の海綿骨と比べて約3倍の硬さを有していること (Butz et al., 2006) より、チタン表面における骨形成は通常の創傷治療の過程でインプ

ラント周囲に起こる骨形成とは明らかに様相が異なっていることを示した。このことから、オッセオインテグレーションの獲得にいたる骨新生は、チタン表面を足場とする一種のティッシュエンジニアリングとみなすことができる。つまり、チタン表面における骨新生では、チタンそのものがチタン表面近傍の骨形成原細胞が付着するための足場として機能すると同時に、付着した細胞を賦活させ、その増殖と機能分化を制御する役割を担っている。また、方法論的還元主義の観点からも、インプラント表面のオッセオインテグレーション能を評価するためには、細胞レベルでの研究成果が極めて重要であると考えられる。*in vitro*の実験系において、主な研究対象となる骨芽細胞の大きさは平均で20–50 μm であることから、ナノスケールでの表面改質がチタン表面における細胞挙動に影響をおよぼすことは容易に想像できる。

これまでオッセオインテグレーション能の向上を目指して、インプラント体表面に対して、各種酸処理、サンドブラスト、あるいは両者の混合処理により表面を削除する方法や各種コーティング法により付加的に表面を改質する方法が試みられてきた。これらの表面改質によりインプラント表面の表面微細構造、化学的性状ならびに物理化学的性状が変化する。このうち表面微細構造を特徴付ける代表的なパラメータのひとつである表面粗さに注目すると、算術平均粗さが1.0–2.0 μm の中等度の粗造な表面を有するインプラントが臨床的に最も優れた成績を示しているとされている。しかし、同時にこのカテゴリーに属するインプラント間にはオッセオインテグレーション能に関して、大きな有意差は認められないと考えられている (Jokstad et al., 2003; Albrektsson and Wennerberg, 2004a, b)。しかしながら、これらはいずれもマイクロスケールでの評価にとどまっており、ナノスケールの表面微細構造がチタン表面における骨形成原細胞の挙動に与える影響に関しては不明な点が多い。

これらのことより、ナノテクノロジーはインプラント歯科学に大きな革新をもたらす可能性を持ったテクノロジーとして期待されている。

3.2. ナノスケールでの表面改質の試み

前述の通り、ナノテクノロジーはインプラント歯科学分野の多岐にわたる応用の可能性を秘めている。このうちインプラント体の表面改質への応用にしばって文献を検索すると、表1、2に示す多数の報告がある。表面改質の方法による分類としては、1) 物理学的修飾、2) 化学的修飾、3) 生物学的修飾の3つに大別される (表1)。また、表面改質の成分組成による分類としては、1) 生体分子による修飾、2) 無機化合物による修飾、3) 金属および合金による修飾、4) 複合体による修飾の4つに大別される (表2)。われわれの知る限りにおいて、これまでに実際に製品化されて臨床応用にいたったものは3つであり、そのうち2つは化学的修飾によるもので、残りのひとつは物理化学的修飾によるものと説明されている。

このうちのひとつはOsseoSpeed™ (Astra Tech AB, Mölndal, Sweden) であり、二酸化チタン粒子によるブラスト処理の後にフッ化水素による酸処理を施したものである (以下、TiO₂/HFサーフェイス)。SEM観察により、TiO₂/HFサーフェイスの表面には直径約100nmのナノ構造体が付与されていることが確認されている (Guo et al., 2007)。サンドブラスト処理のみの表面 (以下、TiO₂サーフェイス) に比べて、TiO₂/HFサーフェイスではサンプルディスク上で培養したヒト間葉系幹細胞の骨関連遺伝子の遺伝子発現の亢進が認められている (Cooper et al., 2006)。また、*in vivo*の実験系において、TiO₂/HFサーフェイスはTiO₂サーフェイスと比べて有意に高い骨-インプラント接触率と骨-インプラント結合強度を示したという報告がある (Ellingsen et al., 2004; Cooper et al., 2006)。しかしながら、X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) を用いた表面元素分析によりTiO₂/HFサーフェイスの表面には0.8%のフッ素原子が検出されていることから、前述の生物学的効果があらわれたのはナノ構造体が付与されたことによるものなのか、フッ素の作用によるものなのかは明らかになっていない。

もうひとつはNanoTite™ (BIOMET 3i, Palm Beach, USA) であり、塩酸と硫酸を用いて二重に酸処理した純

表1 ナノ表面制御の方法論的分類

Approaches	Methods	References
Physical modification	Physical vapor deposition	Coelho et al., 2005; Ogawa et al., 2008
	Nanolithography	Kubo et al., 2009
	Femtosecond laser	Lyuksyutov et al., 2003
		Jeong et al., 2011
Chemical modification	Acid treatment	Guo et al., 2007
	Sol-gel processing	Advincula et al., 2006; Nishimura et al., 2007
Biological modification	DNA coating	Putnam, 2006
	Protein coating	Schuler et al., 2006

表2 ナノ表面構造体の組成成分分類

Categories	Assembled substances	References
Biological molecules	Cell-adhesive epitopes	Schaffner et al., 1999 ; Huang et al., 2003 ; Elmengaard et al., 2005 ; Senyah et al., 2005 ; Rammelt et al., 2006 ; Schuler et al., 2006 ; Balasundaram and Webster, 2007 ; Sargeant et al., 2008
	DNA	Dunn et al., 2005 ; Zhao et al., 2005 ; Putnam, 2006 ; Park et al., 2007a ; Zhang et al., 2007
Ceramics	Carbons	Price et al., 2003b ; Webster et al., 2004a
	Calcium phosphates including HA*	Coelho et al., 2005 ; Thian et al., 2005 ; Wang et al., 2006 ; Adamopoulos and Papadopoulos, 2007 ; Mendes et al., 2007 ; Nishimura et al., 2007 ; Lin et al., 2009 ; Lee et al., 2009
	Al ₂ O ₃ **	Price et al., 2003a ; Briggs et al., 2004 ; Mendonca et al., 2009
Metals and alloys	TiO ₂ ***	Kommireddy et al., 2005 ; Chen and Mao, 2006 ; Yao and Webster, 2006 ; Advincula et al., 2007 ; Jeong et al., 2007 ; Ogawa et al., 2008 ; Kubo et al., 2009
	Cr-Co et al.	Howlett et al., 1999 ; Webster and Ejiogor, 2004 ; Papageorgiou et al., 2007 ; Ogawa et al., 2008
Composites	Collagen/HA	Itoh et al., 2005 ; Teng et al., 2008
	TiO ₂ /HA	Oh et al., 2005
	Calcium phosphate/Chlorhexidine	Scharnweber et al., 2007
	Ti/PLGA****	Smith et al., 2007

*Hydroxyapatite

**Alumina

***Titanium dioxide

****Poly-lactic-co-glycolic acid

チタンならびにチタン合金表面にハイドロキシアパタイト (HA) のナノパーティクルを化学的に沈着させたものである (以下, ナノHAサーフェイス). このナノHAサーフェイスの特徴は, 従来のHAコーティングサーフェイスのようにインプラント表面がすべてHAで覆われているのではなく, 表面の約50%は酸処理面が露出していることである (Nishimura et al., 2007). ヒト上顎臼歯部に埋入したインプラント表面に新生された骨を組織計量学的に評価したところ, 二重酸処理のみの表面 (以下, HCl/H₂SO₄サーフェイス) に比べて, ナノHAサーフェイスでは骨-インプラント接触率が埋入後4, 8週ではそれぞれ3, 1.2-2.5倍に増加した (Goene et al., 2007 ; Orsini et al., 2007). また, *in vivo* のラット実験モデルにおいて, ナノHAサーフェイスはHCl/H₂SO₄サーフェイスと比べて埋入後2週の骨-インプラント結合強度は1.3倍に増加していたことが報告されている (Nishimura et al., 2007 ; Lin et al., 2009). しかしながら, これらの生物学的効果があらわれたのはナノ構造体が付与されたことによるものなのか, HAの作用によるものなのかは明らかになっていない.

最後も前述のNanoTite™同様にインプラント表面にHA

のナノパーティクルを付加したものであるが, イオンビームデポジションという物理蒸着によってHAの被膜を形成する点が異なる (Bicon, Boston, USA). チタン合金に対して, アルミナ (Al₂O₃) によるブラスト処理と硝酸による酸処理を施したもの (以下, Al₂O₃/HNO₃サーフェイス) にHAのナノパーティクルを物理蒸着することによって全面に300-500nmのアモルファスなHA薄膜が形成される (以下, ナノHA薄膜サーフェイス). *in vivo* のイヌ実験モデルにおいて, ナノHA薄膜サーフェイスはAl₂O₃/HNO₃サーフェイスと比べてインプラント表面における骨形成が促進されたとの報告があるが, 表面微細構造に関しての詳細は不明である (Coelho and Suzuki., 2005).

これらの表面はいずれもナノスケールでの表面微細構造をコントロールするまでには至っておらず, チタン表面に付与したナノ構造体の化学的組成ならびに結晶構造も不明であり, 報告されている生物学的な効果がどのようなメカニズムで発現するのも明らかにされていない. これらの点から, 現状ではいずれの表面改質法もナノテクノロジーに基づく新規表面制御技術として確立されていないと考える.

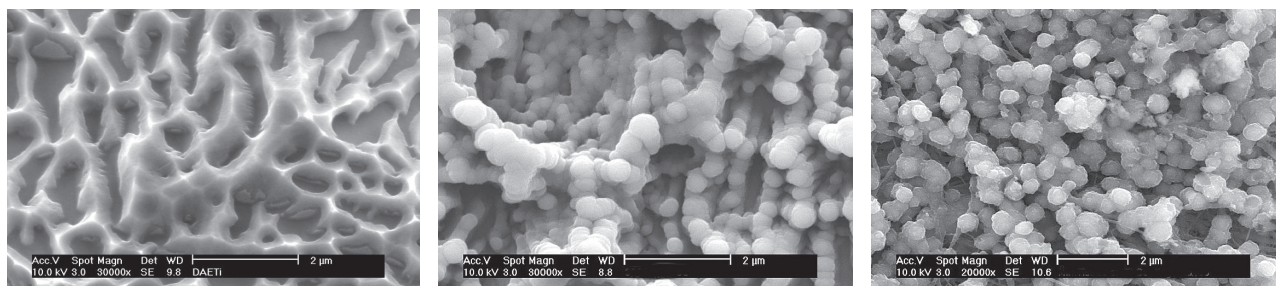


図1 マイクロナノスケール階層化生体模倣表面のSEM像（左：酸処理チタン，中央：マイクロナノスケール階層化生体模倣表面，右：酸処理チタン上に形成された石灰化組織）

3.3. ナノ表面制御技術によるナノ構造体の最適化

われわれは、ナノテクノロジーの一つである物理蒸着（Physical Vapor Deposition）の技術をインプラントの表面改質に応用して、マイクロスケールの表面粗さを有するチタン表面に付加的に自己組織化による二酸化チタンのナノ構造体を付与する技術を開発した（Ogawa et al., 2008）（図1）。本技術の先進性のひとつは、物理蒸着時間を変えることで、ナノ構造体の大きさを容易に制御することが可能となることである。酸処理チタン表面に粒径100, 300, 500nmのナノノジュラー構造体を付与したもの（以下、ナノノジュラーサーフェイス-100, 300, 500）は、ナノ構造体を付与していない酸処理チタン表面（以下、マイクロラフサーフェイス）に対して骨芽細胞の初期細胞接着ならびに細胞伸張が有意に増加していた。また、ラット大腿骨に埋入したシリンダー形状のインプラントに対して、術後2週にバイオメカニカル試験（Push in試験）（Ogawa et al., 2000）を行い、オッセオインテグレーション能を調べたところ、すべてのナノノジュラーサーフェイスがマイクロラフサーフェイスの約3倍の骨-インプラント結合強度を示した（Kubo et al., 2009）。さらに、骨芽細胞親和性ならびにオッセオインテグレーション能に関して、300nmのナノノジュラー構造体を付与したナノノジュラーサーフェイス-300が最

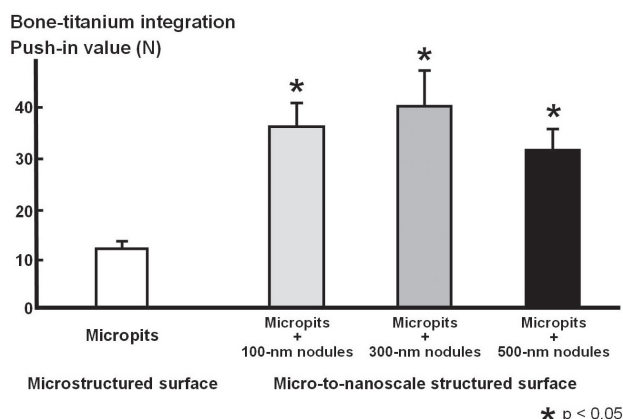


図2 マイクロナノスケール階層化生体模倣表面の骨-インプラント結合強度

も高い値を示したことより、300nmの付近の大きさのナノ構造体がインプラント表面での骨芽細胞による骨新生にとって最適であることが明らかになった。また、このナノ表面制御技術は、酸処理チタン表面以外にもサンドブラスト処理されたチタン表面にも応用可能である。さらにはチタン以外にも、1) チタン合金やコバルトクロム合金などの他の金属材料、2) シリカなどのセラミックス、3) シリコンなどの半導体、4) ポリスチレン、コラーゲン膜、生体吸収性ポリマー（PLGA：Poly Lactic-co-Glycolic Acid）などの有機材料にもナノ構造体を付与することが可能である。このナノ表面制御技術はその汎用性の高さが注目され、インプラント表面改質以外にも広く再生医療への応用、さらには電池技術やクリーンテクノロジーへの応用が期待されている。

結 論

本レビューにより、以下の結論を得た。

1. ナノテクノロジーはインプラント歯科学分野の多岐にわたる応用の可能性を秘めていることが示された。
2. これまでに、ナノスケールの表面性状を有する新規サーフェイスとして実際に製品化されたインプラント表面は、いずれもナノ構造の解析ならびに最適化が不十分であり、生物学的効果が発現するメカニズムも不明である。
3. われわれは物理蒸着の技術をインプラントの表面改質に応用して、マイクロナノスケール階層化生体模倣表面（Biomimetic micro-to-nanoscale hierarchical structured surface）を開発した。ナノノジュラー構造体を付与することで骨芽細胞親和性ならびにオッセオインテグレーション能が大きく向上することが示された。さらにインプラント表面に付与するナノ構造体の大きさは300 nmの付近が最適であることが確認された。

文 献

Adamopoulos O and Papadopoulos T. Nanostructured bio-ceramics for maxillofacial applications. J Mater Sci Mater

- Med 18 : 1587–1597, 2007.
- Advincula MC, Rahemtulla FG, Advincula RC, Ada ET, Lemons JE and Bellis SL. Osteoblast adhesion and matrix mineralization on sol–gel–derived titanium oxide. *Biomaterials* 27 : 2201–2212, 2006.
- Advincula MC, Petersen D, Rahemtulla F, Advincula R and Lemons JE. Surface analysis and biocorrosion properties of nanostructured surface sol–gel coatings on Ti6 Al4V titanium alloy implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 80 : 107–120, 2007.
- Albrektsson T and Wennerberg A. Oral implant surfaces : Part 1—review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 17 : 536–543, 2004a.
- Albrektsson T and Wennerberg A. Oral implant surfaces : Part 2—review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* 17 : 544–564, 2004b.
- Balasundaram G and Webster TJ. Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications. *Nanomed* 1 : 169–176, 2006.
- Berglundh T, Abrahamsson I, Albouy JP and Lindhe J. Bone healing at implants with a fluoride–modified surface : an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 18 : 147–152, 2007.
- Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J and Ohlsson A. Intra–osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3 : 81–100, 1969.
- Briggs EP, Walpole AR, Wilshaw PR, Karlsson M and Palsgard E. Formation of highly adherent nano–porous alumina on Ti–based substrates : a novel bone implant coating. *J Mater Sci Mater Med* 15 : 1021–1029, 2004.
- Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH and 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.
- Butz F, Aita H, Wang CJ and Ogawa T. Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. *J Dent Res* 85 : 560–565, 2006.
- Chen X and Mao SS. Synthesis of titanium dioxide (TiO₂) nanomaterials. *J Nanosci Nanotechnol* 6 : 906–925, 2006.
- Coelho PG and Suzuki M. Evaluation of an IBAD thin–film process as an alternative method for surface incorporation of bioceramics on dental implants : a study in dogs. *J Appl Oral Sci* 13 : 87–92, 2005.
- Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A and Ellingsen JE. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit–blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 27 : 926–936, 2006.
- De Maeztu MA, Bracerás I, Alava JJ and Gay–Escoda C. Improvement of osseointegration of titanium dental implant surfaces modified with CO ions : a comparative histomorphometric study in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37 : 441–447, 2008.
- Dunn CA, Jin Q, Taba M Jr, Franceschi RT, Bruce Rutherford R and Giannobile WV. BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects. *Mol Ther* 11 : 294–299, 2005.
- Ellingsen JE, Thomsen P and Lyngstadaas SP. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontol* 2000 41 : 136–156, 2006.
- Elmengaard B, Bechtold JE and Soballe K. In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press–fit titanium alloy implants. *Biomaterials* 26 : 3521–3526, 2005.
- Goene RJ, Testori T and Trisi P. Influence of a nanometer–scale surface enhancement on de novo bone formation on titanium implants : a histomorphometric study in human maxillae. *Int J Periodontics Restorative Dent* 27 : 211–219, 2007.
- Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok IJ and Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO₂ grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. *Biomaterials* 28 : 5418–5425, 2007.
- Howlett CR, Zreiqat H, Wu Y, McFall DW and McKenzie DR. Effect of ion modification of commonly used orthopedic materials on the attachment of human bone–derived cells. *J Biomed Mater Res* 45 : 345–354, 1999.
- Huang H, Zhao Y, Liu Z, Zhang Y, Zhang H, Fu T and Ma X. Enhanced osteoblast functions on RGD immobilized surface. *J Oral Implantol* 29 : 73–79, 2003.
- Itoh S, Kikuchi M, Koyama Y, Matumoto HN, Takakuda K, Shinomiya K, et al.. Development of a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite for medical use. *Biomed Mater Eng* 15 : 29–41, 2005.
- Jeong SH, Park YJ, Kim BS and Song HJ. Effects of oxygen content on bioactivity of titanium oxide films fabricated on titanium by electron beam evaporation. *J Nanosci Nanotechnol* 7 : 3815–3818, 2007.
- Jeong YH, Kim WG and Choe HC. Electrochemical behavior of nano and femtosecond laser textured titanium alloy for implant surface modification. *J Nanosci Nanotechnol* 11 : 1581–1584, 2011.
- Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, Carr AB, Naert I and Wennerberg A. Quality of dental implants. *Int Dent J* 53 : 409–443, 2003.
- Kommireddy DS, Patel AA, Shutava TG, Mills DK and Lvov YM. Layer–by–Layer assembly of TiO₂ nanoparticles for stable hydrophilic biocompatible coatings. *J Nanosci Nanotechnol* 5 : 1081–1087, 2005.
- Kubo K, Tsukimura N, Iwasa F, Ueno T, Saruwatari L, Aita H, Chiou WA and Ogawa T. Cellular behavior on TiO₂ nanonodular structures in a micro–to–nanoscale hierarchy model. *Biomaterials* 30 : 5319–5329, 2009.
- Lin A, Wang CJ, Kelly J, Gubbi P and Nishimura I. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone–implant fixation in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants* 24 : 808–816, 2009.
- Lyuksyutov SF, Vaia RA, Paramonov PB, Juhl S, Waterhouse L, Ralich RM, Sigalov G and Sancaktar E. Elec-

- trostatic nanolithography in polymers using atomic force microscopy. *Nat Mater* 2 : 468–472, 2003.
- Mendes VC, Moineddin R and Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials* 28 : 4748–4755, 2007.
- Nishimura I, Huang Y, Butz F, Ogawa T, Lin A and Wang CJ. Discrete deposition of hydroxyapatite nanoparticles on a titanium implant with predisposing substrate microtopography accelerated osseointegration. *Nanotechnology* 18 : 245101–245109, 2007.
- Ogawa T, Ozawa S, Shih JH, Ryu KH, Sukotjo C, Yang JM and Nishimura I. Biomechanical evaluation of osseous implants having different surface topographies in rats. *J Dent Res* 79 : 1857–1863, 2000.
- Ogawa T and Nishimura I. Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18 : 200–210, 2003.
- Ogawa T, Saruwatari L, Takeuchi K, Aita H and Ohno N. Ti nano-nodular structuring for bone integration and regeneration. *J Dent Res* 87 : 751–756, 2008.
- Oh SH, Finones RR, Daraio C, Chen LH and Jin S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials* 26 : 4938–4943, 2005.
- Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A and Caputi S. Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol* 78 : 209–218, 2007.
- Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, et al.. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 28 : 2946–58, 2007.
- Park DJ, Choi JH, Leong KW, Kwon JW and Eun HS. Tissue-engineered bone formation with gene transfer and mesenchymal stem cells in a minimally invasive technique. *Laryngoscope* 117 : 1267–1271, 2007a.
- Price RL, Gutwein LG, Kaledin L, Tepper F and Webster TJ. Osteoblast function on nanophase alumina materials : Influence of chemistry, phase, and topography. *J Biomed Mater Res A* 67 : 1284–1293, 2003a.
- Price RL, Haberstroh KM, Webster TJ. Enhanced functions of osteoblasts on nanostructured surfaces of carbon and alumina. *Med Biol Eng Comput* 41 : 372–375, 2003b.
- Putnam D. Polymers for gene delivery across length scales. *Nat Mater* 5 : 439–451, 2006.
- Pye AD, Lockhart DE, Dawson MP, Murray CA and Smith AJ. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect* 72 : 104–110, 2009.
- Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwiipp H and Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 27 : 5561–5571, 2006.
- Sargeant TD, Guler MO, Oppenheimer SM, Mata A, Satcher RL, Dunand DC, et al.. Hybrid bone implants : self-assembly of peptide amphiphile nanofibers within porous titanium. *Biomaterials* 29 : 161–171, 2008.
- Schaffner P, Meyer J, Dard M, Wenz R, Nies B, Verrier S, Kessler H and Kantelehner M. Induced tissue integration of bone implants by coating with bone selective RGD-peptides in vitro and in vivo studies. *J Mater Sci Mater Med* 10 : 837–839, 1999.
- Scharnweber D, Flossel M, Born R and Worch H. Adjusting the chlorhexidine content of calcium phosphate coatings by electrochemically assisted co-deposition from aqueous solutions. *J Mater Sci Mater Med* 18 : 391–397, 2007.
- Schuler M, Owen GR, Hamilton DW, de Wild M, Textor M, Brunette DM and Tosatti SG. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence : a cell morphology study. *Biomaterials* 27 : 4003–4015, 2006.
- Senyhan N, Hildebrand G and Liefelth K. Comparison between RGD-peptide-modified titanium and borosilicate surfaces. *Anal Bioanal Chem* 383 : 758–762, 2005.
- Smith LJ, Swaim JS, Yao C, Haberstroh KM, Nauman EA and Webster TJ. Increased osteoblast cell density on nanostructured PLGA-coated nanostructured titanium for orthopedic applications. *Int J Nanomedicine* 2 : 493–9, 2007.
- Teng SH, Lee EJ, Park CS, Choi WY, Shin DS and Kim HE. Bioactive nanocomposite coatings of collagen/hydroxyapatite on titanium substrates. *J Mater Sci Mater Med* 19 : 2453–2461, 2008.
- Thian ES, Huang J, Best SM, Barber ZH and Bonfield W. Magnetron co-sputtered silicon-containing hydroxyapatite thin films—an in vitro study. *Biomaterials* 26 : 2947–2956, 2005.
- Wang H, Eliaz N, Xiang Z, Hsu HP, Spector M and Hobbs LW. Early bone apposition in vivo on plasma-sprayed and electrochemically deposited hydroxyapatite coatings on titanium alloy. *Biomaterials* 27 : 4192–4203, 2006.
- Webster TJ and Ejirofor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals : Ti, Ti 6 Al 4 V, and CoCrMo. *Biomaterials* 25 : 4731–4739, 2004.
- Webster TJ, Waid MC, McKenzie JL, Price RL and Price JU. Nano-biotechnology : carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants. *Nanotechnology* 15 : 48–54, 2004a.
- Weinlaender M, Kenney EB, Lekovic V, Beumer J3rd, Moy PK and Lewis S. Histomorphometry of bone apposition around three types of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7 : 491–496, 1992.
- Yao C and Webster TJ. Anodization : a promising nanomodification technique of titanium implants for orthopedic applications. *J Nanosci Nanotechnol* 6 : 2682–2692, 2006.
- Zhang Y, Song J, Shi B, Wang Y, Chen X, Huang C, et al.. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects. *Biomaterials* 28 : 4635–42, 2007.

Zhao M, Zhao Z, Koh JT, Jin T and Franceschi RT. Combinatorial gene therapy for bone regeneration : cooperative interactions between adenovirus vectors expressing bone morphogenetic proteins 2, 4, and 7. *J Cell Biochem* 95 : 1–16, 2005.