

論 文 要 旨

**Surface Properties and Biocompatibility of Acid-etched
Titanium**

〔 酸エッチング処理を行ったチタンの表面特性および生体親和性 〕

岩 谷 由 香 梨

【序論および目的】

チタンは、優れた耐食性と生体親和性のために、硬組織代替用材料として整形外科および歯科領域に広く応用され、インプラント体などに用いられている。チタンの表面性状が生体親和性に影響を及ぼすことが知られているが、チタンなど生体内に埋入する材料の表面特性は、細胞の増殖・分化に影響すると言われている。我々は、酸の種類と濃度がチタンの表面性状に及ぼす影響について、様々な種類の酸を用いて検討を行ってきた。その結果、加温した濃硫酸でエッチングすると、微細な空孔の集合体よりなる粗面がチタン表面に形成されることを明らかにした。

本研究では、濃硫酸によりエッチングしたチタン表面の生体親和性の評価を行った。

【材料および方法】

1. チタンの前処理

純チタン円板 (Kobelco, KS-40, JIS-I, 直径 15 mm, 厚さ 1 mm) を用いて以下の 4 種の表面改質を行った。

- ①P0 : 粒径 1 μm のアルミナを用いた鏡面研磨
- ②SB : 粒径 70 μm のアルミナを用いたサンドブラスト処理
- ③A60 : 48% 硫酸水溶液に 60°C で 1 時間浸漬
- ④A60VF : 48% 硫酸水溶液に 60°C で 1 時間浸漬後、600°C にて 10 分間真空焼成

さらに、コントロールとしてポリスチレン板を用い、計 5 種を評価対象試料とした。

試料は、アセトン、アルコール、超純水中で各 20 分間超音波洗浄後、室温にて乾燥を行い、エチレンガスによるガス滅菌を行った。

2. 材料の状態分析

チタン表面の結晶相は、X線回折図形の測定により行い、表面形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) による二次電子像で観察した。また、表面粗さ計を用いて、 R_a (算術平均値) および R_z (最大深さ) の測定を行った。さらに、接触角測定器によりぬれ性試験を行った。統計処理は、分散分析 (ANOVA) 後、Bonferroni にて検定を行った。

3. 生体親和性評価

細胞培養試験は、各条件の純チタン板に、骨芽細胞様細胞 (MT3T3-E1) を 1 well あたり 5×10^3 cell 播種し、培地は 10% ウシ胎児血清、抗生物質を含む α -MEM を加え、5% CO_2 存在下にて 37°C で培養

した。付着細胞の細胞形態観察を、培養 24 時間後に SEM により行った。また、細胞増殖能を MTT assay により測定した (3, 6, 9 日)。また、培養上清中に産生されたコラーゲン量の測定 (3 日目) を、Collagen assay Kit を用いて行った。MTT と Collagen assay においては、コントロールとして PP を用いた。統計処理は、ANOVA 後、Bonferroni にて検定を行った。

【結果】

X線回折図形において、高濃度酸エッチングを行った A60 では水素化チタンのピークを認めしたが、真空焼成を加えた A60VF では水素化チタンのピークは消失し、 α -チタンのピークが減少した。また、サンドブラスト処理を行った SB において、他の処理のものと比較して α -チタンのピークが減少し、幅が広がった。SEM 像においては、鏡面研磨の P0 では均一な研磨痕が観察され、SB では多数の凹凸が認められ、アルミナ粒子の衝突によって延性破壊した様相を呈しており、シャープな端面が認められた。A60 と A60VF では表面構造に明らかな違いは認められず、高濃度酸エッチングにより著しく腐食され、その表面は多孔質になり、約 $1\mu\text{m}$ のマイクロポアが多数認められ、また、明瞭な粒界も観察された。表面粗さにおいて、鏡面研磨の P0 の表面粗さが Ra 約 $0.34\mu\text{m}$, Rz 約 $2.8\mu\text{m}$ であるのに対し、高濃度酸エッチングを行った A60, A60VF は Ra 約 $2.0\mu\text{m}$, Rz 約 $12.3\mu\text{m}$ と、特に大きい表面粗さを示した。サンドブラスト処理を行った SB では P0 と高濃度酸エッチングを行った A60, A60VF の中間程度の表面粗さを示した。接触角は A60 が最も低い値を示し、P0 が最も高い値を示した。表面処理法の異なるすべてのチタン上で、細胞の付着が観察された。MTT assay の結果、細胞は培養時間とともに有意な増殖がみられたが、表面処理法の違いによる差は認められなかった。コラーゲン産生においても、有意差は認められなかった。

【考察および結論】

X線回折図形において、高濃度酸エッチングを行った事で、A60 に水素化チタンのピークが認められ、真空焼成した A60VF では水素化チタンが消失し、 α -チタンのピークが減少したことから、A60VF では水素化チタンは酸化分解し、酸化チタン被膜が形成されたと考えられる。SB において、他の処理のものと比較して α -チタンのピークが減少し、幅が広がったが、これは、表面にアルミナ粒子が衝突した結果、塑性変形が生じ、残留応力の発生によるものと考えられた。チタン表面は高濃度酸エッチングを行うことで、著しく腐食され、表面粗さは有意に増加し、チタン表面は孔径 $1\sim 2\mu\text{m}$ 程度の微細な凹凸の面となった。今回用いたチタン表面の接触角は、細胞の初期付着に好ましいとの報告のある接触角の範囲内に含まれた。骨芽細胞様細胞は、表面処理法の異なるすべてのチタン表面において付着し、増殖を認めた。MTT assay の結果、細胞は培養時間とともに有意な増殖がみられたが、表面処理法の違いによる差は認められなかった。コラーゲン産生においても、有意差は認められなかった。チタンの生体親和性は、表面粗さ、ぬれ性、表面構造、化学的特性などに影響されると報告されているが、本実験において用いた表面処理法の間では、細胞増殖及びコラーゲン産生に差は認められなかった。細胞の種類や細胞の状態が異なると、表面粗さに対する細胞増殖に影響する可能性がある。高濃度酸エッチングは、インプラント体の表面処理として、チタンの生体親和性を損なう事なく均質にエッチングする事が可能であり、チタン表面の有効な表面改質方法であると判断された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 34 号	学位申請者	岩谷 由香梨
審査委員	主査	田中 卓男	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	長岡 英一	副査 仙波 伊知郎
	副査	藤井 孝一	副査 松山 孝司

Surface Properties and Biocompatibility of Acid-etched Titanium

(酸エッチング処理を行ったチタンの表面特性および生体親和性)

(Dental Materials Journal 2008 掲載予定)

チタンは、優れた耐食性、機械的強度および生体親和性のために、硬組織代替用材料として広く臨床応用され、インプラントなどに用いられている。表面処理を施していないチタンは骨と直接統合しないことが報告されており、その表面の生体活性を高めるために各種の表面改質法が開発されている。生体内に埋入される材料の表面特性は、細胞の増殖・分化に影響する。学位申請者はこれまで、酸の種類と濃度がチタンの表面性状に及ぼす影響について、様々な種類の酸を用いて検討を行い、その結果、高濃度硫酸でエッチングすると、微細な空孔の集合体よりなる粗面がチタン表面で形成されることを明らかにした。本研究で学位申請者は、高濃度硫酸によりエッチングしたチタン表面の生体親和性について、鏡面研磨処理およびサンドブラスト処理を行ったチタンと比較検討を行った。

その結果、本研究で以下の知見を得た。

- 1) X線回折図形において、高濃度酸エッチングを行ったチタンでは、水素化チタンのピークが認められたが、真空焼成を行うと、水素化チタンは消失し、チタンのピークが減少した。これは、真空焼成により水素化チタンが酸化分解し、酸化チタン皮膜が形成されたためと考えられた。一方、他の表面処理についてはチタンのピークのみが認められた。
- 2) チタン表面は高濃度酸エッチングを処理により、著しく腐食され、表面粗さは有意に増加し、チタン表面は孔径1~2 μm 程度の微細な凹凸の粗面を呈していた。鏡面研磨処理では均一な研磨痕が観察され、サンドブラスト処理では多数の凹凸が認められ、シャープな端面が認められた。
- 3) 本実験で処理したすべてのチタン表面の接触角は60度から80度であり、細胞の初期付着に好ましいとされる接触角の範囲内であった。
- 4) 骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)は、培養条件下で、酸エッチングを施したチタン表面に付着し、増殖することが明らかにされた。
- 5) 酸エッチングを施したチタン表面における細胞増殖およびコラーゲン産生は、従来すでに臨床応用されている表面処理の場合と同様であり、有意な差は認められなかった。

高濃度酸エッチングは、他の表面処理と比べ、インプラント体の表面処理として、チタンの生体親和性を損なうことなく均質にエッチングすることが可能であり、チタン表面の有効な表面改質方法であると判断された。

本研究は、チタンに高濃度酸エッチングを行い、その処理により生じた粗造な表面において骨芽細胞様細胞が良好に付着、増殖し、コラーゲン産生についても変化がないことを明らかにし、今後の歯科臨床応用に向けたインプラント体の表面改質法の開発に有益な基礎的研究であると思われる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 34 号		学位申請者	岩谷 由香梨
審査委員	主査	田中 卓男	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	長岡 英一	副査	仙波 伊知郎
	副査	藤井 孝一	副査	松山 孝司

主査および副査の5名は、平成20年 2月19日、学位申請者 岩谷 由香梨 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) この研究の目的は何ですか？

(回答) チタン表面の表面改質法として酸処理したチタンの表面性状と生体適合性を評価することです。将来的には生体材料としてインプラント体としての臨床応用を考えています。

質問2) 酸化チタンと水素化チタンについて、生体親和性についての知見、過去の報告等を教えてください。

(回答) 骨接触率は表面粗さに影響されますが、酸化チタン皮膜の厚さには影響されないという結果が、Larsson らにより報告されています。Perrin らは、水素化チタンは骨への影響はなかったと *in vivo* での結果を報告していますが、水素脆性のためチタンの機械的性質が低下し、細胞動態にも影響を与える可能性が考えられます。

質問3) 今回の実験で A60VF を加えた理由は何ですか？

(回答) 硫酸を用いて水素化チタンが生成されたので、さらに真空焼成を行い、水素化チタンを除去した A60VF を実験に加えることで、その影響を比較しました。水素化チタンは厚さ約 $0.2\mu\text{m}$ と推定され、ごく表層に限られており、今回の酸処理でチタンの機械的性質が低下することはありませんでした。また、本研究では細胞親和性にも影響はないことが明らかになりました。

質問4) 硫酸と塩酸とで、同じ酸なのに硫酸で表面粗さが大きくなる理由は何ですか？

(回答) 塩素イオンとチタンとの結合よりも、硫酸イオンとチタンとの結合の方が強いいため、結果的に TiCl_4 よりも、 TiSO_4 の方が生成しやすく、硫酸の方がよりチタンを溶解しやすいためと考えられます。さらに高濃度硫酸の方が酸化チタンの還元作用も強いことが影響しているものと考えられます。

質問5) なぜ48%硫酸で実験を行ったのですか？

(回答) 市販の濃硫酸 96%のままでは酸としての性質が弱いため、酸としての効力の高い48%になるように2倍希釈しました。また、1/10濃度の4.8%の希硫酸ではほとんど酸処理されず、ある程度の濃度がないと酸処理効果が得られません。さらに、還元作用が生じるような濃度範囲内でなければならないと考えられます。

質問6) 酸処理の腐食様式は何ですか？

(回答) 電子顕微鏡レベルでは凹凸が生じていますが、マクロ的には均一に腐食されているため、全面腐蝕と判断しています。

質問7) 酸処理を施したチタンの表面には、明瞭な粒界がみられ、規則正しい結晶粒の形になっていますが、特定の面が溶けるのですか？

(回答) 転位や欠陥のある部分が溶けやすいので、すべり面に沿って溶解したものと推定されます。

質問8) A60VFでは600℃で加熱していますが、600℃で結晶粒は変化しないのですか？また、再結晶する温度は？

(回答) 再結晶温度は加工度によって変化しますが、チタンの場合400℃~800℃と推定されています。X線回折図形のピーク強度比が変化していることからわかるように、この温度では再結晶していないと考えています。

最終試験の結果の要旨

質問 9) 酸化チタンのピークが XRD で観察されないのは何故ですか？また、測定は粉状ですか、板状ですか？

(回答) 今回用いたチタン表面の酸化チタンの厚さが、XRD 装置の検出限界以下の厚みであるためです。測定は板状で行いました。赤外分光分析では酸化チタン皮膜の存在を確認しています。

質問 10) SB と PO で用いているアルミナは、どのようにして用いたのですか？

(回答) SB では 70 μm のアルミナ粒子を 0.4MPa で吹きつけし、PO では 1 μm の微粒子アルミナを研磨粉として回転研磨器具とともに使用しました。

質問 11) コラーゲンアッセイの原理と、測定したコラーゲンの種類について教えてください。

(回答) コラーゲンの定量には Sircol Collagen Assay Kit を用い、I-V 型コラーゲン量を測定しました。このキットの原理は、コラーゲンの [Gly-X-Y]_n (ヘリカル構成部) に特異的に結合する色素 (Sircol dye) でコラーゲンを染色し、吸光度を測定することでコラーゲン量を求めます。コラーゲン量既知の標準液の吸光度から検量線を作成し、各 well 中の培地中のコラーゲン産生量を算出し、さらに各 well の細胞数を計測し、細胞当たりのコラーゲン産生量を算出しました。

質問 12) 接触角で 60 度から 80 度が良いとされる理由は何故ですか？

(回答) 一般的に接触角が大きくなるとぬれ性が悪くなるので、細胞の初期付着は悪くなります。接触角と細胞増殖の関係調べた Tamada らの報告によれば、60 度から 80 度の接触角が最も細胞の初期付着と増殖に適しているとされています。一方、ぬれ性が良いほど血餅ができやすく生体親和性がよいとの報告もあります。細胞増殖に影響する因子として、接触角だけでなく、表面粗さ、化学的性質等、様々な因子が考えられます。

質問 13) 酸処理した表面粗さの説明図で、表面粗さの値が一定時間後にプラトーになるのは何故ですか？

(回答) チタン表面で、酸化チタンからなる不動態皮膜の溶解と生成、水素化チタンの生成と溶解、金属チタンの溶解が化学平衡のもとに繰り返されているわけですが、これらの現象によって生じる表面粗さは化学平衡によって確定される温度と濃度の条件で決定され、それ以上の反応の進行はありませんので、プラトーになると考えられます。

質問 14) 表面粗さが大きいと生体親和性がよいとする理由は何ですか？

(回答) *in vitro* において、粗面な程、骨芽細胞様細胞が良くインプラント体に接着するという報告が多くみられます。また、*in vivo* においては、粗面インプラントが粗面であればあるほど、剪断強さが増加し、骨との統合が良好であるのに対し、滑面インプラント体では線維性の被包が増加することが報告されています。また、インプラント体を通して伝わる力は、インプラント体が粗面でのみ受けとめることが可能であり、滑面では荷重を伝達できず、インプラント体の周りに骨欠損を助長することになるとの報告もあります。さらに、表面の粗さは血管と新生骨の侵入を許し、骨形成に重要な意義を持つことが報告されています。

質問 15) 他の表面処理法と比較して、高濃度酸エッチング法を行う利点としてどのようなものがありますか？

(回答) 以下のような利点があります。

- ①インプラント体の内部孔など、複雑な形態の部分ではサンドブラスト処理は困難です。高濃度酸エッチングは、液体 (硫酸) を用いるため、複雑形態に問題なく、表面処理を施すことができます。
- ②従来のサンドブラスト処理では、アルミナ粉がチタン基材に突き刺さって残留し、骨統合に悪影響を及ぼすといわれています。一方、高濃度酸エッチングでは、処理後、硫酸を洗い流してしまえば、この問題はありません。
- ③恒温器と硫酸があればできますので、比較的安価にチタンの表面粗さを増すことができます。
- ④チタンの生体親和性が損なわれずに、均一に処理することができます。
- ⑤高濃度酸エッチングでは温度と時間により、チタンの表面粗さの程度を自由に制御することができます。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。