

## チタン表面へのグロー放電処理効果と持続性に関する研究

田中 謙光<sup>1,2)</sup> 高橋 哲<sup>1)</sup> 山内 健介<sup>1,2)</sup>  
宮崎 敏樹<sup>3)</sup> 後藤 哲哉<sup>4)</sup>

### The Effect and Continuousness of Glow-Discharge on a Titanium Surface

TANAKA Kenko<sup>1,2)</sup>, TAKAHASHI Tetsu<sup>1)</sup>, YAMAUCHI Kensuke<sup>1,2)</sup>,  
MIYAZAKI Toshiki<sup>3)</sup> and GOTO Tetsuya<sup>4)</sup>

The initial adhesion of cells to the implant surface and the subsequent behavior of the cells are important for their biocompatibility. This study investigated the continuousness of the effects of glow-discharge (GD) treatment on the adhesion of cells to titanium.

Polished titanium plates (30 mm in diameter, 2 mm in thickness) were treated with GD. Human gingival fibroblast (hGF) cells were seeded on each treated sample. After 6 h of culture, cells were fixed and stained with TRITC-phalloidin to count the number of attached cells. After 24 h of culture, the cells were fixed and incubated with antibody against vinculin to examine the formation of focal adhesion. Titanium disks were treated using GD in a plasma chamber for 20–240 s. To compare with the effects of ultraviolet (UV) treatment, the titanium disks were exposed to UV for 6–48 h. Untreated titanium disks were used as controls (CON). The hydrophilic status of the titanium surfaces was analyzed by XPS analysis, and the wettability was examined by the spread of 5  $\mu$ L of

H<sub>2</sub>O. Titanium disks treated with GD were in the air for 0–6 h after the treatment to examine the continuousness of the effects of GD treatment. The maximum wettability was observed by GD treatment for 120 s, whereas the maximum wettability by UV treatment was observed by the 48 h of UV treatment. The effect of GD decreased by half at 1 h after GD treatment and converged with the CON level at 6 h. The number of hGF cells attached to GD and UV after 6 h of incubation was significantly greater than that attached to CON. The number of vinculin immuno-positive focal adhesion per cell was significantly greater on GD and UV treated disks than on CON disks. Neither the number of attached cells nor focal adhesion formation showed significant differences between GD and UV.

These findings demonstrated that only 2 min of GD treatment on the titanium surfaces caused similar wettability and cell attachment as 48 h of UV treatment. However, the effect of GD treatment disappeared within 6 h

---

GD : glow discharge, UV : ultra violet, XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy, hGF : human gingival fibroblast

<sup>1)</sup>東北大学大学院歯学研究科口腔病態外科学講座顎顔面・口腔外科学分野

<sup>2)</sup>東北大学病院歯科インプラントセンター

<sup>3)</sup>九州工業大学院生命体工学研究科生体機能応用工学専攻生体メカニクス講座生体機能材料工学研究室

<sup>4)</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科機能形態学分野

<sup>1)</sup>Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Medicine and Surgery, Tohoku University Graduate School of Dentistry

<sup>2)</sup>Dental Implant Center, Tohoku University Hospital

<sup>3)</sup>Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

<sup>4)</sup>Department of Oral Anatomy and Biology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

平成 25 年 8 月 22 日受付

in the air. The present study suggests that GD treatment is quite easy but titanium implants treated with GD should be used as soon as possible after GD treatment.

## 緒 言

チタンインプラントは、骨とのオッセオインテグレーションを獲得することからインプラント材料として広く利用されている<sup>1,2)</sup>。インプラント周囲組織の早期創傷治癒には、骨芽細胞のみならず、歯肉組織を構成する歯肉線維芽細胞のインプラント体への早期接着・増殖、分化が重要な因子である。細胞のインプラント表面への接着、増殖、分化はインプラント表面形状および表面性状に影響される。これまでの多くの研究で、チタン表面改良によって *in vitro*, *in vivo* において生体適合性を高めたとの報告がある<sup>3,4)</sup>。また、表面性状は表面エネルギーと表面荷電など表面の物理化学性質を示し、表面官能基の形成状況に影響を受ける。表面の性質は、インプラント体表面に対するタンパク吸着や細胞接着に影響を及ぼすことが報告されている<sup>5-7)</sup>。

グロー放電プラズマ処理 (Glow-Discharge Plasma Treatment, 以下 GD) は、プラズマクリーニングとも呼ばれ、低温プラズマを用いて、試料表面の有機汚染物質や薄い酸化皮膜を取り除くのに有用性が高いとの報告がある<sup>8-10)</sup>。低温プラズマによるイオンと電子の衝突にて、表面性状が試料の微細構造の変化なく親水性の向上を示している。また、チタンインプラントに関しては、チタン表面への細胞の初期細胞接着および分化を促進することが示されている<sup>5-7)</sup>。しかしながら、グロー放電処理チタンへの初期細胞接着については、分子レベルのメカニズムは不明な点も多く<sup>11,12)</sup>、その効果がどれくらい持続するかもよく分かっていない。

接着斑キナーゼ (Focal Adhesion Kinase, 以下 FAK)、ビンキュリン、およびアクチンフィラメントのような細胞接着関連分子は、インテグリンを介した細胞骨格とシグナル伝達分子による基質での細胞の接着に関わっている<sup>13)</sup>。FAK とビンキュリンは、接着斑の細胞質ドメインに関与しており、接着斑の形成に

**Key words :** glow discharge, ultra violet, titanium, stability, cell attachment

よる細胞骨格アクチンフィラメントへの細胞表面上のインテグリンからのシグナル伝達を行っている。ビンキュリンは、接着斑複合体構成分子 (タリン, パキシリン,  $\alpha$ -アクチニン, テンシンなど) として主要な構成成分である。アクチンは、細胞骨格の1つであり、ストレスファイバーを形成する。アクチンはまた、接着斑複合体構成分子と結合しており、インテグリンを介してシグナル伝達に関与しており、細胞の形態変化や遊走に重要な働きを行う<sup>14,15)</sup>。

一方、紫外線 (Ultra Violet, 以下 UV) は、チタン表面を親水性へ変化させることが明らかになっている<sup>16)</sup>。また、UV 処理されたチタンの表面効果は *in vitro* にてチタン板上の細胞接着、細胞伸展、細胞増殖、活性化を、*in vivo* にて骨芽細胞の増加と骨とチタンの結合を高めることが報告されている<sup>17,18)</sup>。紫外線照射と GD 処理はいずれもチタン表面を親水性に変えるが、その効果がどの程度持続するかについては明らかではない。

本研究では、機械研磨チタンに対して行った GD 処理がどの程度持続するかを調べるために、GD 処理したチタン板のぬれ効果の変化を調べるとともに、ヒト歯肉線維芽細胞 (hGF 細胞) を播種して初期接着の変化を分子レベルで経時的に調べ、UV 処理と比較検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 標本作製と表面処理

材料として純チタンディスク (直径 2 mm, 厚さ 30 mm) (>99.8%, 株式会社ニラコ, 東京) を用いた。チタンを 600 グリッドダイヤモンドペーパーにて研磨を行った。アセトン, エタノール, 蒸留水中でそれぞれ 60 分超音波洗浄した。洗浄後は、クリーンベンチ内で 24 時間乾燥し、保管した。

GD 処理には CUTE-MP/R (Femto Science, Hwaseong, Korea) を使用した。GD 処理はチタンをチャンバー内にて  $8 \times 10^{-3}$  Torr まで減圧し、真空

内で出力 70 W にて行った。また、UV はチタンへ 15 W 殺菌ランプ（東芝，東京）にて  $51 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  (253.7 nm) 紫外線放射強度の条件にて照射し，処理を行った。チタンに対する GD 処理は 20, 40, 80, 120, 180, 240 秒間行い，紫外線照射 6, 12, 24, 48 時間行ってその効果を確認した。非処理のチタン板を対照群 (CON) とした。

## 2. 表面評価

GD 処理後のチタン表面の化学状態を検討するために，エックス線光電子分光 (XPS) 分析による評価を行った。GD 処理は 120 秒，UV 照射は 48 時間行ったチタン板 (各 5 枚) を用いた。XPS 分析は，XPS 分析装置 (KRATOS AXIS-His, 島津製作所, 京都) を用いて，エックス線源に Mg-K $\alpha$  線 (120 W) を用い，分析エリア  $1 \times 1 \text{ mm}$ ，分析深さ 3 nm で測定を行った。帯電補正は C1s ピークトップの結合エネルギー値を 284.6 eV とみなして行った。

GD 処理後のチタン表面の親水性を調べるために，各処理を行ったチタン板に  $5 \mu\text{L}$  の水滴を滴下し，水滴の広がりを観察した (各 5 枚)。また，GD 処理後にチタンへの処理効果についての性状変化を調べるために，GD 処理を 120 秒行った後，室温で大気中に 0, 10, 30, 60 分放置し，処理効果の性状変化を観察した。水滴の広がり の計測には光学顕微鏡 (Handy Scope 130 s, Science-Eye, 埼玉) を使用した。水滴の広がり の領域のデジタル写真 ( $\times 5$ ) は，Photoshop CS software (Adobe, Mountain View, CA, USA) を使用し，領域分析を行った。水滴の広がり の領域の大きさは，NIH Image (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>) を使用し，計測を行った。

## 3. 細胞培養

培養細胞として hGF 細胞を用いた。hGF 細胞は九州歯科大学附属病院を受診した患者で歯科矯正治療のため便宜抜去時の抜歯窩周囲の歯肉部分から分離培養した。なお，hGF 細胞の使用に関しては九州歯科大学倫理委員会の承認を受け，個々の患者に関しては同意書をもって承諾を受けた。培地は， $\alpha$ MEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) に 10%FBS (Gibco)，抗生物質 ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  penicillin G (和光, 大阪)， $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicin (Gibco)， $0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$  Fungizone (Gib-

co) を添加し用いた。細胞は  $\text{CO}_2$  インキュベータにて  $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  下で培養し，0.25%trypsin (Gibco) で分離，継代を行い，実験に使用した。

## 4. 細胞接着，伸展，ビンキュリン発現

GD 処理を 120 秒，UV 照射を 48 時間行ったチタン板 (各 5 枚) に細胞を  $5 \times 10^4$  個播種を行った。培養 6 時間後に，各試験板に接着した細胞は，3 回 cytoskeleton-stabilizing (以下 CS) バッファーで 3 回洗浄後，4%ホルマリンで固定した。続いて，再度 CS バッファーにて 3 回洗浄後，TRITC ファロイジン (1:40 希釈) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) にて 30 分間， $37^\circ\text{C}$  でインキュベートした。0.1 M PBS (-) にて洗浄後，細胞を蛍光封入剤として 1,4-diazabicyclo (2, 2, 2) octane 4-diazabicyclo (2, 2, 2) (100 mg/mL) (Sigma, St.Louis, USA) を含むグリセロール-PBS にて封入した。

また，培養 24 時間後に，ビンキュリン発現と局在，細胞伸展を蛍光顕微鏡の観察にて分析した。蛍光染色はマウス抗ビンキュリン一次抗体 (AnaSpec, San Jose, USA)，抗マウス二次抗体に結合した FITC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) によって行った。0.1 MPBS 洗浄後に，細胞は蛍光封入剤として 1,4-diazabicyclo (2, 2, 2) octane 4-diazabicyclo (2, 2, 2) (100 mg/mL) (Sigma) を含むグリセロール-PBS にて封入した。蛍光顕微鏡 (Olympus Optical, Tokyo) にて細胞を無作為に 10 カ所 (各計測範囲は  $350 \times 450 \mu\text{m}$ ) 選択し，細胞数の計測を行い，Photoshop CS software にて伸展面積，形態の解析を行った。

## 5. 統計的分析

データは，StatView (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) を使用し分析した。分散分析 (ANOVA) にて GD 群，UV 群，CON 群の細胞数，ビンキュリン発現，伸展面積を評価した。有意差を多重比較検定 (Post-hoc test, Scheffe) によって行った。

## 結 果

### 1. 細胞接着試験

培養 6 時間後の細胞接着のアクチン蛍光顕微鏡像を図 1a~c に示す。各試験片上で，hGF 細胞を 6 時間

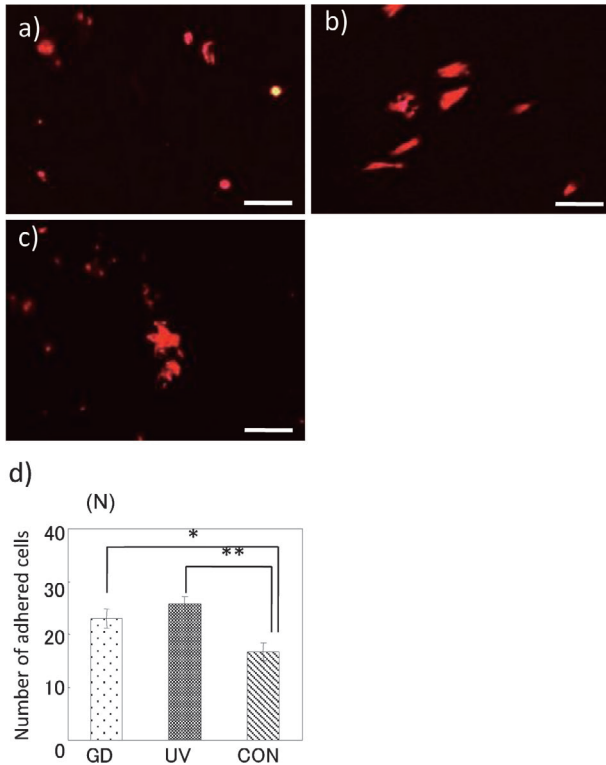


図1 GDもしくはUV処理後の培養歯肉線維芽細胞の初期接着

120秒GD処理(a), 24時間UV処理(b), 未処理(c)の試料上で6時間, 歯肉線維芽細胞を培養したときのアクチン蛍光顕微鏡像。(d)単位面積(350×450 $\mu\text{m}$ )あたりの接着細胞数。グラフは平均値±標準偏差を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , スケールバー=20 $\mu\text{m}$ 。

培養した細胞接着数は, CON群と比較し, GD群において1.7倍, UV群は2.3倍の細胞数接着数の増大を認めた( $p < 0.05$ , 0.01; 図1d)。GD群は, UV群の細胞接着数と有意差は認められなかった。

## 2. ビンキュリンの発現と細胞伸展

抗ビンキュリン免疫染色後のhGFの蛍光顕微鏡画像を図2a~cに示す。24時間培養後, 細胞の大きさや形がCON群と比較し明らかな違いが認められた。ビンキュリン発現は, CON群, GD群, UV群の細胞に認められた。CON群のチタン表面のhGFは先端にビンキュリンの特定の局在を伴う細胞骨格が認められた。GD群とUV群は細胞骨格先端のビンキュリンのより広範囲で細胞の輪郭に沿ってより隣接していることが確認された。ビンキュリン発現はCON群と比較してGD群にて1.8倍, UV群にて1.6倍の発現の有

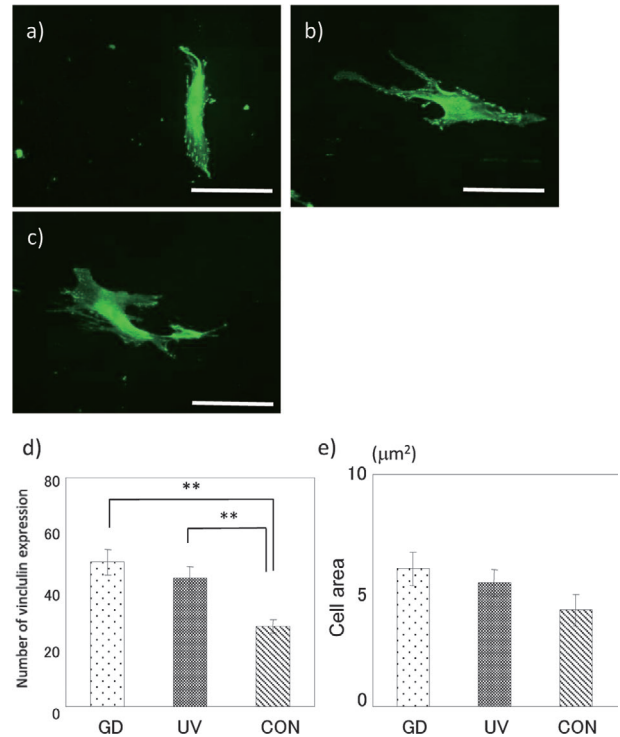


図2 GDもしくはUV処理後の培養歯肉線維芽細胞の接着斑の発現

120秒GD処理(a), 24時間UV処理(b), 未処理(c)の試料上で6時間, 歯肉線維芽細胞を培養したときのビンキュリン免疫蛍光顕微鏡像。1細胞あたりのビンキュリン免疫陽性接着斑数(d), および細胞伸展面積(e)。グラフは平均値±標準偏差を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , スケールバー=10 $\mu\text{m}$ 。

意的な増加を認めた( $p < 0.01$ ; 図2d)。細胞伸展に関しては, CON群と比較しGD群にて1.4倍, UV群にて1.3倍の発現の増加を認めたが有意差は認められなかった(図2e)。

## 3. GD処理後のぬれ性への効果

それぞれのUV処理, GD処理後に5 $\mu\text{L}$ の水を滴下した広がり画像を比較にてぬれ性を評価した(図3a)。UV群は48時間処理したもので平均92.9 $\text{mm}^2$ , GD群は240秒処理したもので平均107.6 $\text{mm}^2$ であり, CON群は平均約9.3 $\text{mm}^2$ であった(図3b)。これらの結果は, CON群の疎水性状態がGD処理とUV処理にて親水性状態に変化したことが示された。なお, ぬれ性はUV処理48時間とGD処理120秒はほぼ同程度を示したため, UV処理とGD処理の比較の実験ではこれら処理時間の試料を用いた。



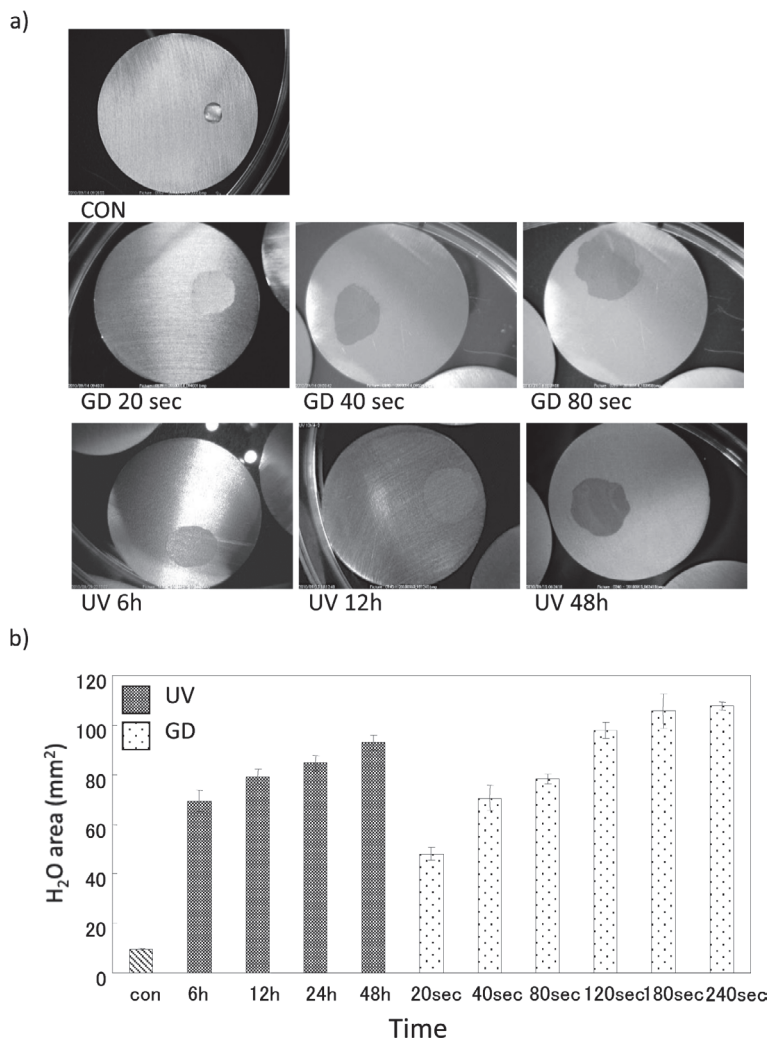


図3 GDもしくはUV処理時間によるぬれ性の変化

a) チタン表面の水滴の実体顕微鏡像。未処理 (CON), GD 処理 (GD) 20 秒, 40 秒, および 80 秒, UV 処理 (UV) 6 時間, 12 時間, および 24 時間を示す。b) 各処理時間において  $5\mu\text{L}$  の水を滴下したときの水滴の面積。グラフは平均値  $\pm$  標準偏差を示す。

#### 4. エックス線光電子分光 (XPS) 分析

120 秒 GD 処理 (図 4a) および 48 時間 UV 処理 (図 4b) 直後のチタン板表面の O1s スペクトルの例を示す。O1s スペクトルのピークを分離すると, 530 eV 付近に  $\text{TiO}_2$  の 531.8 eV 付近にブリッジ (酸性) 水酸基 OH (a) が, 533 eV 付近にターミナル (塩基性) 水酸基 OH (b) のピークが UV, GD とともに認められた。江黒らの報告をもとに<sup>19)</sup>, スペクトルの全体の面積に対する OH (a) と OH (b) の面積比 (図 4c) と存在比 (図 4d) を求めたところ, GD 処理は UV 処理と比較し面積比では同程度の存在比では UV よりも高い水酸基量を認めた。

#### 5. GD 処理後のぬれ性の変化

次に, 120 秒 GD 処理後の 1 時間大気中に放置した場合の変化について評価を行った。実体顕微鏡像では, ぬれ性は処理直後と比較して 10 分後にはすでに有意に減少し, 1 時間後にはほぼ 3 分の 1 に減少していた (図 5)。XPS 分析において O1s スペクトルのピークを分離すると, 530 eV 付近に  $\text{TiO}_2$  の 531.8 eV 付近にブリッジ (酸性) 水酸基 OH (a) が, 533 eV 付近にターミナル (塩基性) 水酸基 OH (b) のピークが認められた (図 6a)。120 秒の GD 処理直後 (図 4a) と比べ, GD 処理後に 1 時間放置した試料では OH (a), OH (b) のピーク値の低下が認められた。これらの

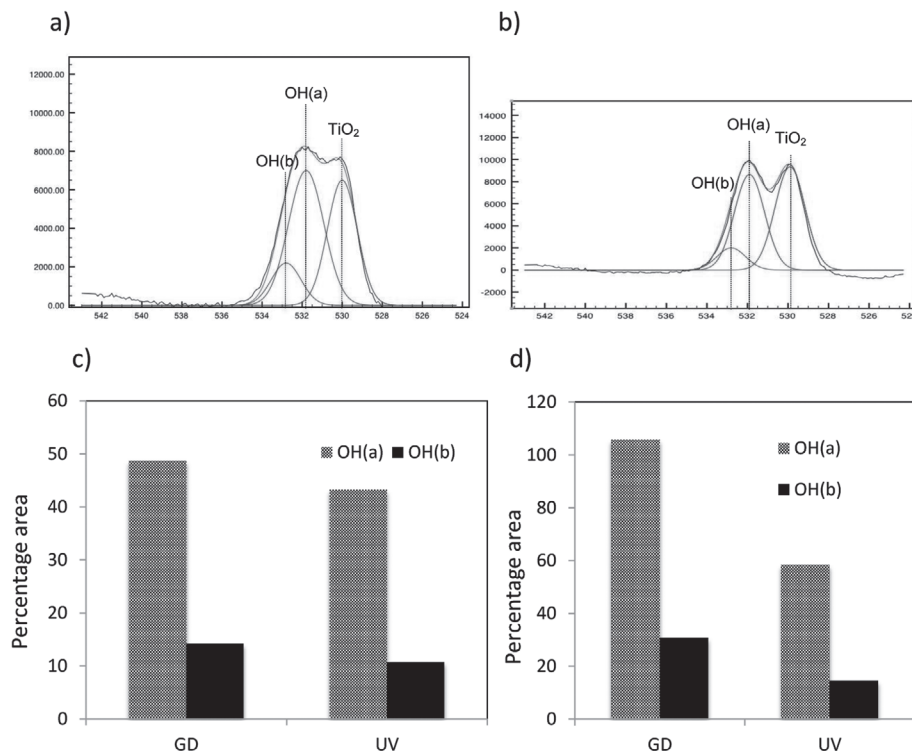


図4 XPS分析によるGD処理およびUV処理後の試料表面のO1sスペクトル分析120秒GD処理(a)および48時間UV処理(b)直後のチタン板表面のO1sのピーク分離例。GD、UV処理後のOH(a)とOH(b)の面積比(c)、GDとUVのOH(a)とOH(b)の存在比(d)を示す。

スペクトルの全体の面積に対するOH(a)とOH(b)の面積比から算出したOH基の存在比は、GD直後と比較して放置により減少を認め、親水性の低下を認めた(図6c, d)。

## 考 察

本研究にて、われわれはGD処理によるチタンの表面性状の変化を、hGF細胞の接着、ぬれ性の変化、およびXPS解析にて示した。すなわち2分間のGD処理にて48時間のUV処理と同様の良好な親水性を引き起こすが、その効果は短時間で減弱することが明らかとなった。

われわれは、3つの異なった処理表面(GD群、UV群、CON群)に対してhGF細胞の接着を評価し、試料基質と細胞動態の間において相関を調べた。細胞増殖と分化のためには細胞基質接着が重要であることは広く認識されている。今回の研究では、GD群とUV群の細胞接着数が高く、CON群では低いことが示された。また、多くの研究者がグロー放電<sup>5,6,20~25)</sup>とUV

処理<sup>16,17,26)</sup>したチタン上でより多くの細胞接着数が増加したと報告されている。これらの結果より、GD処理によって処理されていないチタンよりhGF細胞の接着性が上昇することが示された。

ビンキュリンはインテグリンを介した細胞骨格分子類の階層構造の接続分子類の1つである。いくつかの結合部位(タリン、パキシリン、 $\alpha$ -アクチニン、アクチン結合部位)をもち<sup>13~15,27,28)</sup>、インテグリンの細胞内ドメインに結合するタリンと細胞骨格であるアクチンの結合の両方に関与する<sup>29)</sup>。すなわちビンキュリンの発現の増加はインテグリンを介して細胞接着を強めるタリンが活性化されているとともに、その活性化したタリンと細胞骨格であるアクチンフィラメントの増加を示すものである。今回の研究では、ビンキュリン陽性の接着斑数はCONと比較しGD群とUV群では有意に増加した。この結果は、GD処理やUV処理によってチタン表面に細胞接着の足場となる細胞外マトリックスの付着が増加し、細胞のインテグリンが結合するとともに、細胞内でもビンキュリンを介したタリンの活性化と細胞内骨格の形成が生じたものと推測さ

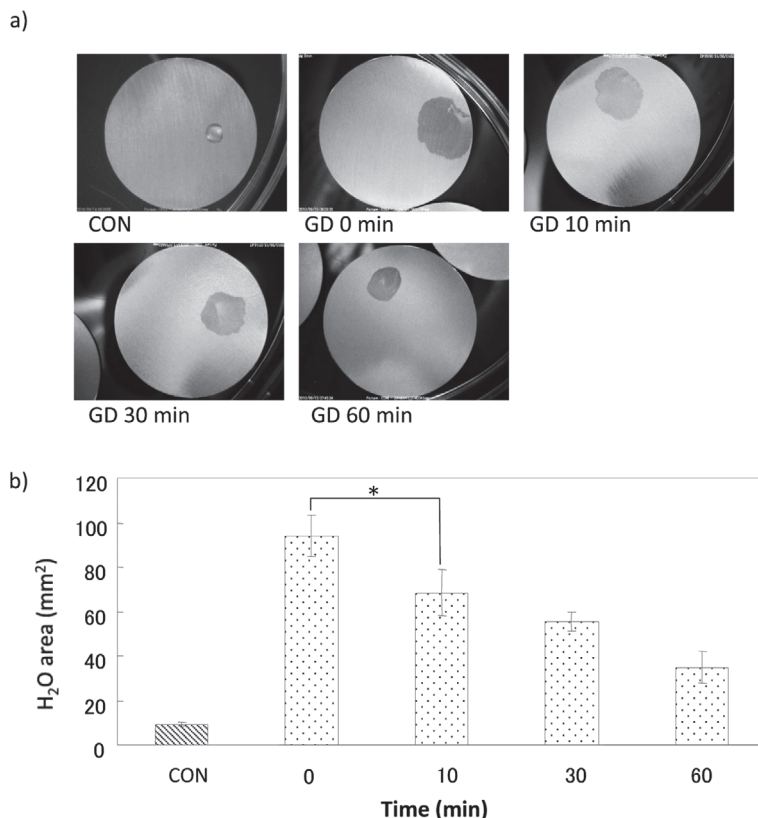


図5 GD処理後大気中に放置した試料のぬれ性の経時的変化

a) チタン表面の水滴の実体顕微鏡像. 未処理 (CON), GD 処理 (GD) 後0分, 10分, 30分および80分を示す. b) 各時間において5  $\mu$ Lの水を滴下したときの水滴の面積の経時的変化. グラフは平均値  $\pm$  標準偏差を示す. \* $p < 0.05$ .

れる. また, GD 群, UV 群のほうが CON 群よりピンキュリンの蛍光染色が明瞭であることは, 接着斑を構成する分子であるピンキュリンが多く存在することを示し, より強固な接着が生じていることを示すものである.

TRITC ラベルされたファロイジンによって染色されたアクチンは細胞伸展, 細胞形態を評価するために使用した<sup>13-15)</sup>. 今回の実験では有意差は認められなかったが, GD 群, UV 群では CON 群に比べ細胞面積の増加が認められた. また, GD 群, UV 群の細胞においては接着斑構造をもつラメリポディア構造が認められたことは, 細胞が伸展もしくは遊走状態にあることを示している. さらに GD 群の細胞は, より明瞭なストレスファイバー形成が認められた. このような細胞, 分子レベルでの GD 処理の影響は, 結果として GD 処理チタン周囲における細胞の運動性が上昇し, 早期にチタン周囲を細胞が覆い, 組織修復が迅速化する

るものと考えられる.

GD 処理は, 有機物の除去による形態変化とイオン組成を変えることで親水性を増加させることが知られている<sup>9,10)</sup>. GD 処理は, チタン表面に OH 基が豊富な親水性の状態を作りだし, それによってチタン表面は水分が吸着しやすい状態になったと考えられる. 今回の研究において, ぬれ性をぬれ面積で評価を行ったが, GD 処理によって親水性を示す結果が得られた. ぬれ性を接触角で評価している報告は多いが<sup>30,31)</sup>, 今回の結果では接触角とぬれ面積には, 親水性を示す指標として相関関係があることを示唆している. ただし, 同様に GD 処理を試みた Itahashi らの報告<sup>32)</sup>によると, GD 処理後においても 532 eV のピークは処理前に比べてさほど増大していなかった. この報告では, GD 処理から XPS への導入まですべて不活性ガス中で行っており, 一方本研究では, XPS 装置の測定チャンバーへの輸送やサンプル導入作業などで数分

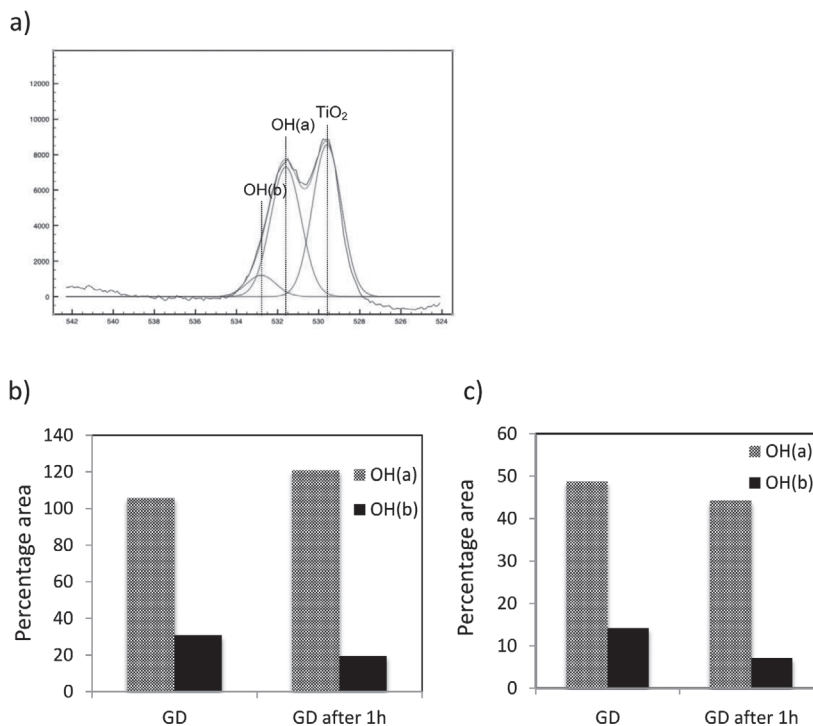


図6 XPS分析による、120秒GD処理後60分大気中に放置した場合の試料表面のO1sスペクトル分析

a) GD処理の1時間放置後のO1sのピーク分離例, b) GD処理直後とGD処理後1時間放置後のOH(a)とOH(b)の面積比, c) GD処理直後とGD処理後1時間放置後のOH(a)とOH(b)の存在比を示す。

空気中を通っているために、空気中の水分の吸着などにより、このような違いが生じているものと推測される。

GD処理におけるTiO<sub>2</sub>膜表面の親水性の増大は、プラズマ内の酸素ラジカルによってTiO<sub>2</sub>表面上に誘導された非化学量論的TiO<sub>x</sub>のような親水性官能基の構成に関係している可能性があるとして報告されている<sup>22)</sup>。GD処理はTi<sup>3+</sup>とOH基をTiO<sub>2</sub>表面に形成し、TiO<sub>2</sub>膜(TiO<sub>2</sub>→[Ti<sup>3+</sup>-O<sup>-</sup>]+OH+H)を構成する生体親和性と光触媒活性の両方の利点に寄与すると考えられた。また、波長250nm以下のUV照射で有機化合物を分解する酸化チタン(アナターゼ型)では、波長が387nm以下(UVA)での光触媒反応により、OHラジカルおよび空気中の水分子が解離吸着して水酸基を形成すると報告されている<sup>17,18)</sup>。今回の実験ではXPS解析によりGD処理後の親水性の低下が示された。過去の報告では、Kummerら<sup>33)</sup>がGD処理は接触角に対してすぐに親水性を示したが、48時間後ではコントロール値へ戻ったと報告した。今回の結果では、GD処理の効果は大気中では10分で減弱し、6

時間で消失することが明らかとなった。GD処理後のXPS解析により、532.5eV付近のOH基によると推測されるピークが1時間後には顕著に減少していた。このことは、GD処理後1時間ではプラズマ処理による活性状態はかなり失われていると考えられた。これは、2つのTi-OH基の再結合によりTi-O-Ti基が生成したか、あるいはTi-OH基にカルボキシル基を有する空気中の有機物が結合して親水性が損なわれたためと考えられる。

まとめると、GD処理は短時間でチタン表面を親水性にし、細胞接着を増加させたが、その効果は大気中では1時間で半減し、6時間で消失した。これらの結果は、チタンインプラントの表面処理にGD処理を行う場合は、効果が失われる前のインプラント埋入直前10分以内に処理を行うことが望ましいことを示唆するものである。

## 結 論

本研究により、2分間のGD処理は48時間のUV



処理と同様のチタン表面に対して水酸基の増加による親水性増加によって、ぬれ効果の増大を示し、接着斑数の増加を伴う細胞接着の増加をもたらすことを示した。しかしながら、このGD処理の効果は、処理後10分で減弱し、6時間放置すると消失することが明らかとなった。

## 文 献

- 1) Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999 ; 20 : 2311-2321.
- 2) Gronowicz G, McCarthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials : integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res* 1996 ; 14 : 878-887.
- 3) Kodama T, Goto T, Miyazaki T, Takahashi T. Bone formation on apatite-coated titanium incorporated with bone morphogenetic protein and heparin. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008 ; 23 : 1013-1019.
- 4) Ishibe T, Goto T, Kodama T, Miyazaki T, Kobayashi S, Takahashi T. Bone formation on apatite-coated titanium with incorporated BMP-2/heparin in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009 ; 108 : 867-875.
- 5) 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* 2002 ; 17 : 771-777.
- 6) Youngblood T, Ong JL. Effect of plasma-glow discharge as a sterilization of titanium surfaces. *Implant Dent* 2003 ; 12 : 54-60.
- 7) Rapuano BE, MacDonald DE. Surface oxide net charge of a titanium alloy : modulation of fibronectin-activated attachment and spreading of osteogenic cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011 ; 82 : 95-103.
- 8) Linkow LI, Giauque F. Introduction to plasma glow discharge treatment of dental implants. *Implant Soc* 1993 ; 4 : 15-16.
- 9) Aronsson BO, Lausmaa J, Kasemo B. Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1997 ; 35 : 49-73.
- 10) MacDonald DE, Rapuano BE, Schniepp HC. Surface oxide net charge of a titanium alloy : comparison between effects of treatment with heat or radiofrequency plasma glow discharge. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011 ; 82 : 173-181.
- 11) Shibata Y, Miyazaki T. Anode glow discharge plasma treatment enhances calcium phosphate adsorption onto titanium plates. *J Dent Res* 2002 ; 81 : 841-844.
- 12) Serro AP, Saramago B. Influence of sterilization on the mineralization of titanium implants induced by incubation in various biological model fluids. *Biomaterials* 2003 ; 24 : 4749-4760.
- 13) Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000 ; 21 : 667-681.
- 14) Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 2007 ; 179 : 1043-1057.
- 15) Goldmann WH, Ingber DE. Intact vinculin protein is required for control of cell shape, cell mechanics, and race-dependent lamellipodia formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 290 : 749-755.
- 16) Wang R, Hashimoto K, Fujishima A. Light-induced amphiphilic surfaces. *Nature* 1997 ; 388 : 431-432.
- 17) 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* 2009 ; 30 : 1015-1025.
- 18) Ueno T, Yamada M, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. Effect of ultraviolet photoactivation of titanium on osseointegration in a rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010 ; 25 : 287-294.
- 19) 江黒 徹, 村田 功, 大橋 功, 前川修一郎, 吉成正雄. チタンの親水性に及ぼす表面形状と表面化学修飾の影響. *日口腔インプラント誌* 2011 ; 24 : 215-224.
- 20) Kroeze RJ, Helder MN, Roos WH, Wuite GJ, Bank RA, Smit TH. The effect of ethylene oxide, glow discharge and electron beam on the surface characteristics of poly (L-lactide-co-caprolactone) and the corresponding cellular response of adipose stem cells. *Acta Biomater* 2010 ; 6 : 2060-2065.
- 21) Van den Dolder J, Spauwen PH, Jansen JA. Evaluation of various seeding techniques for culturing osteogenic cells on titanium fiber mesh. *Tissue Eng* 2003 ; 9 : 315-325.
- 22) Navaneetha Pandiyaraj K, Selvarajan V, Rhee YH, Kim HW, Pavese M. Effect of DC glow discharge plasma treatment on PET/TiO<sub>2</sub> thin film surfaces for enhancement of bioactivity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010 ; 79 : 53-60.
- 23) Kawai H, Shibata Y, Miyazaki T. Glow discharge plasma pretreatment enhances osteoclast differentiation and survival on titanium plates. *Biomaterials* 2004 ; 25 : 1805-1811.
- 24) Martinesi M, Bruni S, Stio M, Treves C, Borgioli F. In vitro interaction between surface-treated Ti-6Al-4V titanium alloy and human peripheral blood mononuclear cells.

- J Biomed Mater Res A 2005 ; 74 : 197-207.
- 25) Jansen JA, van der Waerden JP, de Groot K. Effect of surface treatments on attachment and growth of epithelial cells. *Biomaterials* 1989 ; 10 : 604-608.
- 26) Contreras RG, Adachi K, Yokote Y, Sakagami H, Hibino Y, Nakajima H, Shimada J. Quantification of enhanced osteoblastic adhesion to ultraviolet-treated titanium plate. *In Vivo* 2010 ; 24 : 519-523.
- 27) Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways : the road taken. *Science* 1995 14 ; 268 : 233-239.
- 28) Gilmore AP, Burridge K. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 1996 ; 381 : 531-535.
- 29) Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. Integrin function : molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 1995 ; 131 : 791-805.
- 30) 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* 2009 ; 5 : 3247-3257.
- 31) 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* 2009 ; 30 : 4268-4276.
- 32) Itahashi H. In vitro cell attachment to titanium surfaces with glow discharge treatments. *J Jpn Soc for Dent Mater and Device* 1996 ; 15 : 116-131
- 33) Kummer FJ, Ricci JL, Blumenthal NC. RF plasma treatment of metallic implant surfaces. *J Appl Biomater* 1992 ; 3 : 39-44.