

チタン表面の親水性が骨芽細胞に及ぼす効果

池 田 善 之

日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅰ講座

(指導: 祇園白信仁 教授)

要旨: インプラント体表面が親水性に変化することは、インプラント体全面に血液が行き渡り易い状態にあり、細胞接着と細胞増殖および細胞分化に何らかの影響を与えることが推察される。埋入初期のインプラント体周囲に多くの骨芽細胞が接着し、その細胞が増殖および分化して骨を形成することは、骨のインプラント接触率および力学的強度を向上させ、さらに、早期のosseointegrationが可能となる。そこで、本研究はチタン表面の親水性が骨芽細胞に与える影響について明らかにすることを目的とし、グレード2の純チタンディスクおよびラット骨芽細胞をもちいて実験を行った。履歴特性を利用した水中保存は、接触角および接触面性において親水性を示した。3時間および24時間培養における骨芽細胞の細胞接着は親水性ディスクが疎水性ディスクより有意に高く、confocal画像においても細胞数の差が認められた。培養3時間および24時間後の細胞形態は両ディスク間で有意差を認めなかった。培養2日および4日後における細胞増殖は、両ディスク間で有意差を認めなかった。ALP活性およびカルシウム量は、いずれの培養期間においても両ディスク間で有意差を認めなかった。以上の結果からチタン表面の親水性は細胞の初期接着の確率を高めることによって、チタン表面構造が本来持っているosseointegration能力を向上させる可能性が示唆された。

キーワード: 親水性、チタン表面、骨インプラント結合

緒 言

歯科インプラント体は、新しい表面性状を持ったものが毎年のように開発され、そのたびにosseointegration(骨インプラント結合)が改善されたと提唱されている。チタンの表面構造は、細胞接着、増殖および分化誘導を促進する重要な役割を果たしているため酸処理、サンドブラスト処理、酸処理とサンドブラスト処理の組み合わせなど種々の表面修飾法が導入されてきた^{1,2)}。近年ではミクロサイズの粗面が開発され、骨のインプラント接触率の向上とともに、osseointegrationの力学的強度も増加されると考えられている³⁻⁷⁾。しかし、いずれのインプラント体においてもインプラント骨接触率は100%にはならず、長期の治癒期間でも50~65%⁶⁾あるいは45±16%⁸⁾と報告されている。酸処理等のチタン表面処理直後と処理後時間が経過したチタンを比較した研究では、*in vitro*において時間経過したチタンで、細胞の接着および増殖の減少が認められ、*in vivo*において骨結合速度の遅延と骨結合強度の減少が認められた⁹⁻¹³⁾。これらの結果からチタンの時間経過による老化現象がインプラント骨接触率を低下させる原因であると考えられている⁹⁻¹³⁾。

チタン老化現象の原因として、チタン表面への炭素などの有機物質の付着があり、時間の経過とともにチタン表面の炭素量が増加することが知られている¹²⁾。その解

決策としてチタン表面へ紫外線照射することでインプラント体の表面構造を作製直後の状態と同等の炭素付着量、同等かそれ以上の細胞接着と細胞増殖および早期の高い骨結合強度を得ることが判明した^{10,11,13-16)}。また、インプラント体作製直後にインプラント体を生理食塩水中に密封することによって、チタン表面への炭素の付着を防ぐ方法も開発されている^{17,18)}。いずれの方法においてもチタン表面の炭素量は減少するとされているが、視覚的に確認できる現象としてチタン表面の親水性度の変化がある。通常チタン表面は疎水性であり、大気中に保存するインプラント製品も疎水性の状態にある^{7,18)}。しかし、紫外線照射や水中保存を行った場合、インプラント体は親水性となる^{7,9-16)}。

紫外線照射によるチタンの親水性への変化は、以前から知られており¹⁹⁾、現在では、汚染浄化システムや車のミラーの曇り止めなどに応用されている^{20,21)}。しかし、疎水性から親水性への変化の機序については炭素など有機化合物が除去されたことによるもの、チタン表面の化学的変化によるもの、その両者によるものなど研究者によって意見が分かれている²²⁾。また、チタン表面は酸処理などの処理直後では親水性であるが短時間で疎水性へと変化していく¹²⁾。処理直後に水中保存など、外気に接触しない環境下では、チタン表面に炭素などの有機化合物が付着しにくく、さらに親水性を保った状態となっている^{7,17)}。しかし、親水性を保つ機序については、有機

(受付: 平成26年11月18日)

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

化合物がチタン表面に付着していないためなのか、親水性の履歴特性²³⁾によるものなのか明らかでない。さらに、市販されているほとんどの歯科インプラント体は疎水性であるため、疎水性と親水性のみに着目した研究を行ってこなかった。したがって、親水性がosseointegrationにどのような影響を与えているか明らかとなっていない。インプラント体表面が親水性に変化することは、インプラント体全面に血液が行き渡り易い状態であり、細胞接着と細胞増殖および細胞分化に何らかの影響を与えることが推察される。埋入初期のインプラント体周囲に多くの骨芽細胞が接着し、その細胞が増殖および分化して骨を形成することは、骨のインプラント接触率および力学的強度を向上させ、さらに、早期のosseointegrationが可能となる。

そこで、本研究ではチタン表面の親水性が骨芽細胞に与える影響について明らかにすることを目的としている。

材料および方法

1. チタン試料

グレード2の純チタンを直径20.0 mm、厚さ1.5 mmのディスク状に成型し、表面はmachined surfaceとした。試料のチタンディスクはdistilled water(DW)を用い超音波洗浄を行い、滅菌処理後15週間遮光下にて保管した。その後、親水性を持つディスクを作成するためにDWに浸漬し1週間遮光下にて保管した。チタンディスクの親水性度はDW 10 μ lをチタンディスク表面に滴下し、写真撮影後に接触角および接触面積をImageJ Ver. 1.43 u(NIH)にて測定した。

2. 細胞培養

骨芽細胞は、8週齢の雄Sprague-Dawleyラットの骨髄から採取した。採取は大腿骨を摘出し、骨の両端を切断した後に培養液を満たしたシリングを用い押し出すことで行った。採取した細胞は増殖培地[α -Minimum essential medium(α -MEM, Wako), 15%ウシ胎児血清(FBS, SIGMA), 1%ペニシリン−ストレプトマイシン溶液(Wako)]を用いて、37°C, 5%CO₂存在下で培養した。培養4日目後に100 mmセルカルチャーディッシュ(TPP)に付着した細胞のみを0.5% Trypsin-EDTA(Gibco)にて分離、継代を行った。継代培養は硬組織誘導培地(増殖培地に50 μ g/mlアスコルビン酸(Wako), 10 mm β -グリセロリン酸(Sigma), 10⁻⁸ Mデキサメタゾン(Sigma)を添加)にて行った。なお本研究は日本大学歯学部動物実験指針(AP14 D008)に従い行った。

3. 細胞接着および増殖能

細胞接着の評価は、12穴プレートに設置したチタンディスク上に細胞を播種(3.0 \times 10⁴ cells/cm²)し、3時間および24時間後にチタンディスクに接着した細胞を測

定した。測定はWST-8(Cell Counting kit-8, 同仁化学研究所)を3時間および24時間培養後の各プレートに100 μ l添加し、37°Cで4時間インキュベート後、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)にて、420 nmで吸光度を測定した。細胞増殖の評価は、12穴プレートに設置したチタンディスク上に細胞を播種し、2日間および4日間後に細胞増殖能を測定した。測定は各プレートにBrdUを添加後24時間インキュベートし、マイクロプレートリーダーにて、370 nmで吸光度を測定した。

4. 細胞形態

チタンディスク上に播種した骨芽細胞の形態は、3時間および24時間培養後、共焦点レーザー走査型顕微鏡(confocal laser scanning microscopy, SP-1, Leica)を用いて測定した。測定試料は培養後10%ホルマリンにて固定し、fluorescent dye rhodamine phalloidin(Eugene)にてアクチンfilaメントを染色した。さらに、ビンキュリンの発現および局在を観察するために一次抗体としてmouse anti-vinculin monoclonal antibody(Abcam)および二次抗体としてFITC-conjugated anti-mouse secondary antibody(Abcam)を用い染色した。染色後アクチンfilaメントおよびビンキュリン陽性部位の面積、周径、フェレ経をImageJにて測定した。

5. アルカリホスファターゼ活性

骨芽細胞のアルカリホスファターゼ(ALP)活性は5日間及び10日間培養後に測定した。チタンディスク上で培養された細胞をDWで数回洗浄後 α -ニトロフェニルリン酸錠を基質溶解液(2.0 mmol/L 塩化マグネシウム含有0.1 mol/L 炭酸塩緩衝液 pH9.8, Wako)で溶解した溶液を250 μ lずつ添加した。その後37°Cで15分間インキュベートし、マイクロプレートリーダーにて、405 nmで吸光度を測定しALP活性値を求めた。

6. カルシウム量

培養10日目および20日目に細胞層をPBSで洗浄後、1 M HClを1 ml添加して室温で24時間脱灰処理を行い、その後DWを50 μ lずつ加え2時間静置した。この検体液とカルシウムEテストワコー(Wako)を用いて検体(標準液50 μ l, 緩衝液2 ml, 発色試薬1 ml)と、標準(標準液50 μ l, 緩衝液2 ml, 発色試薬1 ml)を調整し、マイクロプレートリーダーにて、610 nmで吸光度を測定した。得られた値からカルシウム濃度[(mg/dl) = 検体 / 標準 \times 10]を算出した。

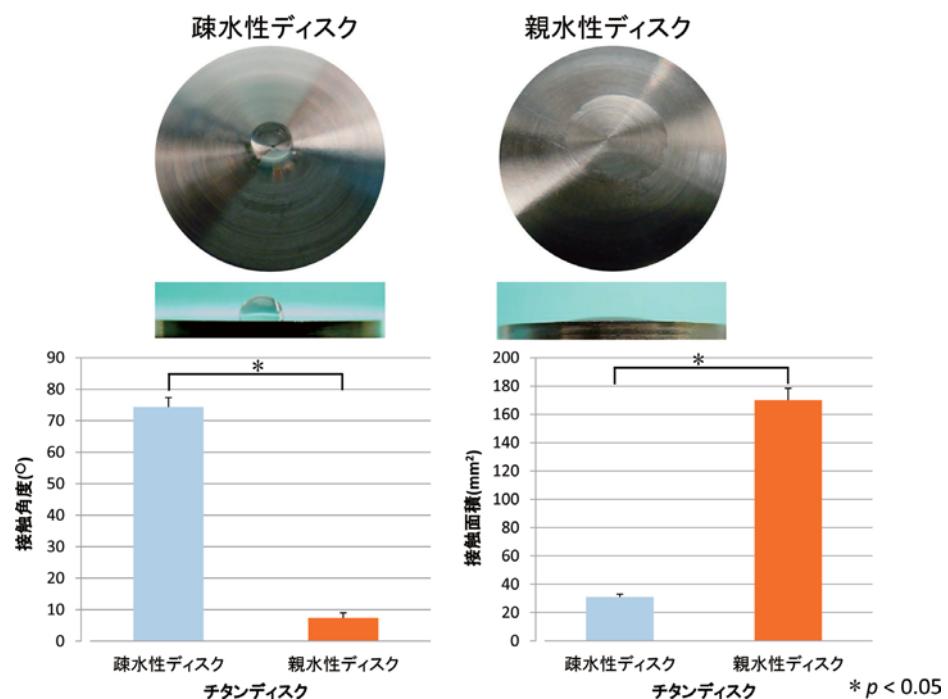
7. 統計学的解析

親水性度、細胞接着、細胞増殖、ALP活性およびカルシウム量は各群(疎水性ディスクおよび親水性ディスク)3枚の異なるディスクを用いその結果を分析した(n = 3)。細胞形態測定は各群9個の細胞を用いてその結果を分析した(n = 9)。分析はStudent *t*-testを用い有意水準は5%とした。

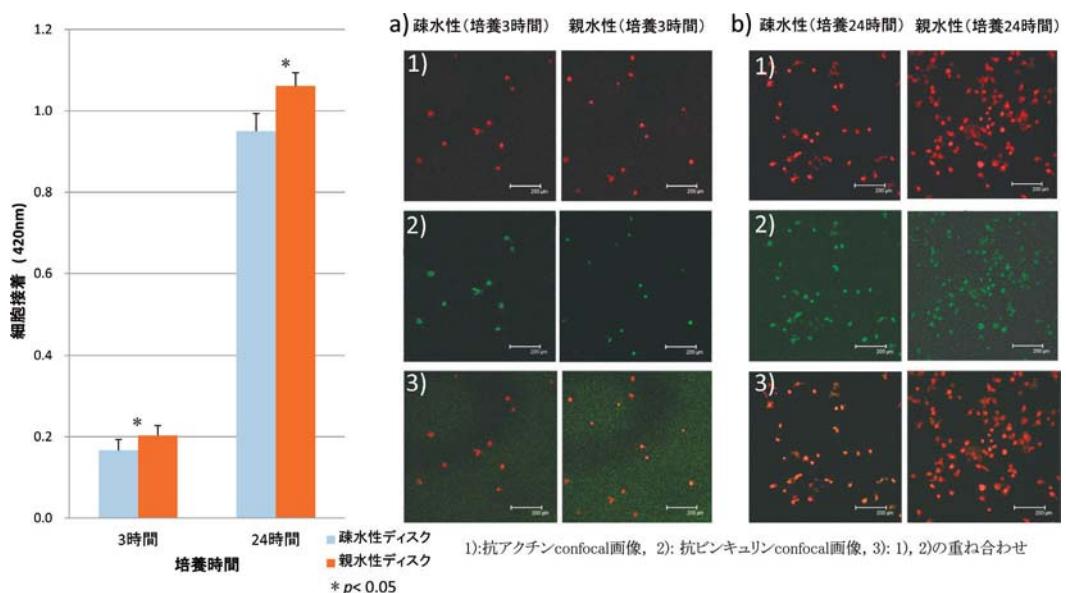
結 果

1. チタンディスクの親水性度

疎水性ディスクおよび親水性ディスク表面に $10\ \mu\text{l}$ の DW を滴下した画像から明らかなように、疎水性ディスクでは水が球体を形成しており、親水性ディスクではディスク表面に広がっていた。接触角は疎水性ディスクが 5 倍以上有意に大きく、接触面積は親水性ディスクが 8 倍有意に大きかった(第 1 図)。



第 1 図 チタンディスクの親水性度



第 2 図 骨芽細胞の細胞接着

2. 細胞接着および細胞増殖能

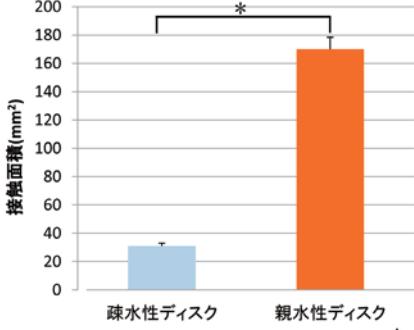
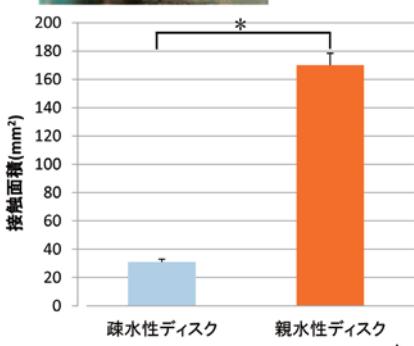
3 時間および 24 時間培養における骨芽細胞の細胞接着は親水性ディスクが疎水性ディスクより有意に高く、confocal 画像においても細胞数の差が認められた(第 2 図)。

しかし、培養 2 日および 4 日後における細胞増殖は、両ディスク間で有意差を認めなかった(第 3 図)。

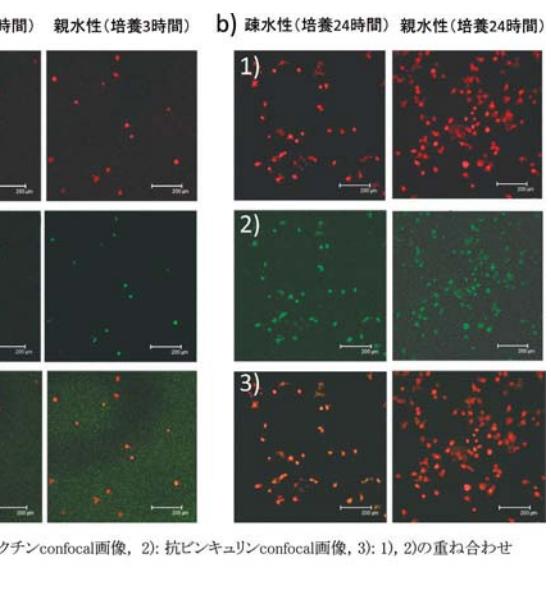
3. 細胞形態

Confocal 画像から培養 3 時間および 24 時間後の細胞

親水性ディスク



第 1 図 チタンディスクの親水性度



第 2 図 骨芽細胞の細胞接着

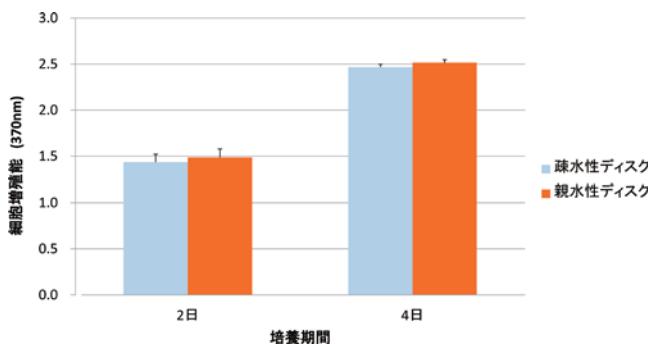
形態は両ディスク間でほぼ同様の形態および大きさであり、ImageJを用いた測定結果においても面積、周径、フェレ径で有意差を認めなかった。また、アクチンおよびビンキュリンの発現においても有意差を認めなかった(第4図)。

4. ALP活性

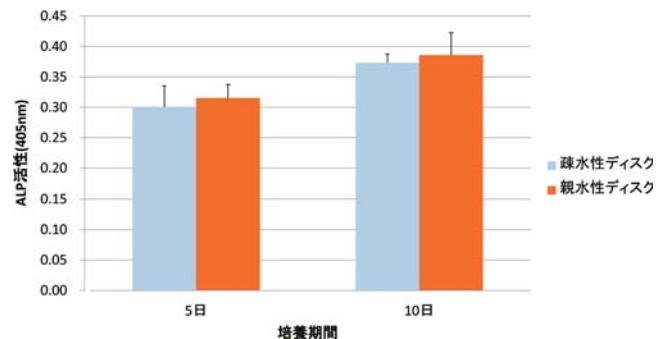
培養5日および10日後のALP活性は、親水性ディスクが疎水性ディスクより高い傾向を示したが、有意差は認められなかった(第5図)。

5. カルシウム量

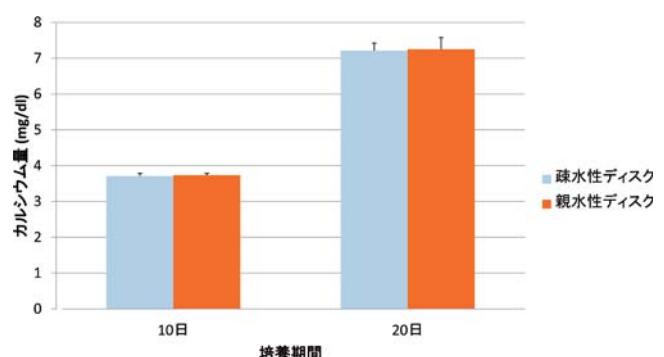
培養10日および20日後のカルシウム沈着量は両ディスク間で有意差を認めなかった。(第6図)



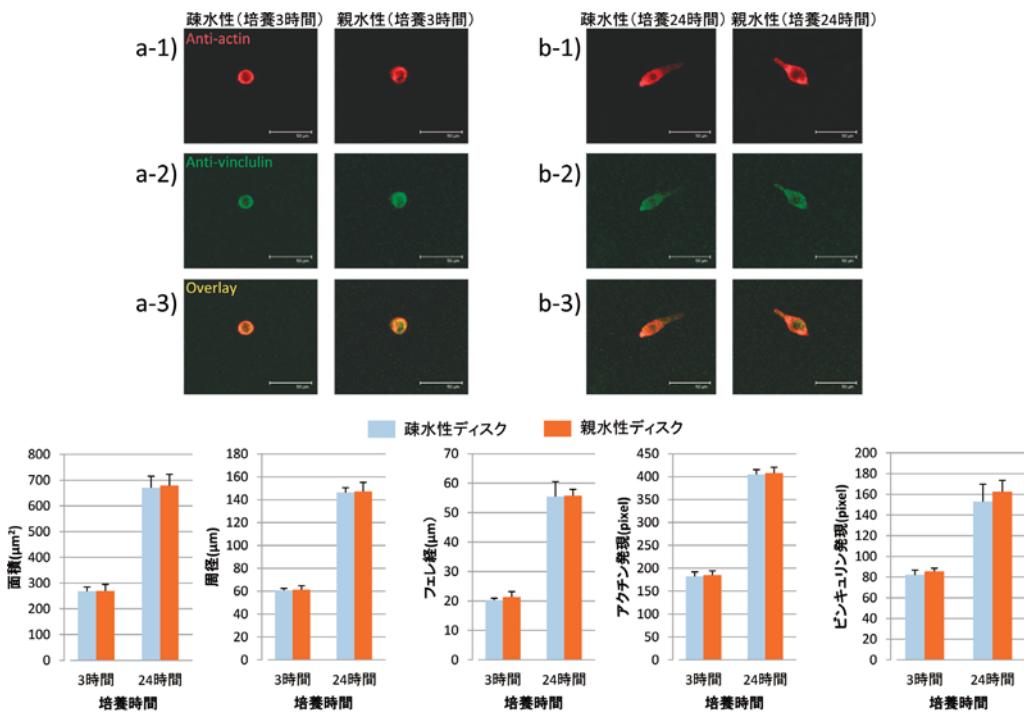
第3図 骨芽細胞の細胞増殖



第5図 骨芽細胞のALP活性



第6図 骨芽細胞のカルシウム量



第4図 骨芽細胞の細胞形態

a-1): 培養3時間後の抗アクチン confocal 画像, a-2): 抗ビンキュリン confocal 画像, a-3): a-1), a-2)の重ね合わせ
 b-1): 培養24時間後の抗アクチン confocal 画像, b-2): 抗ビンキュリン confocal 画像, b-3): b-1), b-2)の重ね合わせ

考 察

チタン表面は絶えず有機化合物を吸収することが知られている²⁴⁻²⁶⁾。歯科インプラントに使用されるチタン表面においても同様で、インプラント体が製作されてから臨床で使用するまでの間に炭化水素によって汚染された状態となっている^{7,14)}。製品化されたインプラント体のチタン表面炭素比は多くが35～55%の範囲にあるが、最大で75%に達しているものもある^{17,27-29)}。このチタン表面炭素比は時間の経過とともに増加し、それに伴いチタン表面の親水性度の低下、骨芽細胞の接着量、増殖能およびALP活性や石灰化度の低下が認められるようになる。また、時間経過に伴いインプラントの骨結合強度が低下することから、インプラントの時間経過は生物学的な機能低下を引き起こしていると考えられる⁹⁻¹³⁾。この機能低下の解決方法として開発された紫外線照射および水中保存法は、未処理の時間経過したインプラントと比較して、チタン表面上の細胞活性が高まることから、有機化合物の除去がインプラント体のosseointegrationに有用であることが多くの研究でも明らかにされている^{7,9-13)}。しかし、紫外線照射および水中保存法は常にチタン表面の親水性を獲得させるにも関わらず、チタン表面の親水性がosseointegrationに如何なる影響を及ぼすかについては明らかにされてこなかった。

チタン表面の親水性が与える影響の有無や、その役割を明らかにすることは、次世代のインプラント体開発の方向性を決定する上で重要であると考えられる。本研究はチタン表面の親水性が担う役割について明らかにすることを目的としているため、紫外線照射処理やチタン表面作製直後の生理食塩水保存などのチタン表面処理によって得られる親水チタンディスクではなく、親水性の履歴特性を利用した親水性チタンディスクを用いて実験を行うこととした。その結果、機械研磨チタン表面は遮光保存では接触角度74.36°(±2.9)で疎水性であるのに対して水中保存では7.39(±1.6)と親水性となり、接触面積は約8倍となった。したがって、履歴特性を利用した水中保存においてもチタン表面を親水性とすることが可能であることが明らかとなった。

接触角(θ)は固体表面の親水性度を表す指標であり、平滑な固体表面での接触角は単位面積あたりの表面張力の釣り合いできまり、Youngの式： $\cos\theta = (\gamma_{sl} - \gamma_{sg})/\gamma_{lg}$ として表される。 γ_{sl} は固体／液体、 γ_{sg} は固体／気体、 γ_{lg} は液体／気体の単位面積あたりの表面張力である。固体の表面に粗さ r がある場合は γ_{sl} 、 γ_{sg} がそれぞれ r 倍されるため、接触角 $\cos\theta x$ はWenzelの式： $\cos\theta x = r(\gamma_{sl} - \gamma_{sg})/\gamma_{lg} = r\cos\theta$ として表される。すなわち、粗さのある表面において平滑面での接触角が疎水性の場合はより大きく、親水性の場合はより小さくなる^{22,23)}。

本研究では親水性の影響のみを明確にするため、細胞分化などに影響を与える凹凸の大きな粗面ではなく、粗さは持つが平滑面に近い機械研磨面ディスクを使用した。このチタンディスクを使用して細胞接着試験を行ったところ、細胞接着は培養3時間および24時間において親水性ディスクが疎水性ディスクを有意に上回る結果となった。細胞接着実験に用いたWST-8は、主成分であるテトラゾリウム塩を細胞内の酵素がフォルマザンに分解することを利用した試薬で、得られる吸光度は細胞数と強く相関するといわれている³⁰⁾。本試薬による結果は、細胞の酵素活性に左右されるため、何らかの理由で細胞の酵素活性が高い場合は、実際の細胞数よりも高値を示す可能性がある。そこで、弱拡のconfocal画像で視覚的に確認したところ、親水性ディスクにおいて細胞数が多いことが確認でき、このことからチタンの親水性は初期細胞接着に有利な影響を与えることが示唆された。しかし、この初期接着細胞数の差は、これまで報告されている紫外線照射処理した親水性チタンディスクと疎水性チタンディスクとの結果^{10,11,13-16)}よりも差が少ない。この理由として、紫外線処理における有機物除去や化学的変化の影響に加え、本実験でのチタンディスクが親水性であったのに対し紫外線照射チタンディスクの親水性が接触角0°であったことも影響している可能性も考えられた。

BrdUを用いた細胞増殖測定では、両者に差が認められなかった。BrdUは細胞のS期に取り込むチミジンの代わりにピリミジンアナログであるBrdUを取り込まれ、これを測定することで、DNA合成期の細胞増殖を定量する方法である³¹⁻³³⁾。したがって、両者に差がないことは、チタンディスクの親水性は細胞の増殖能に影響を与えないことを示している。

初期に細胞が接着した際の細胞形態、アクチンおよびビンキュリの発現を検討したところ、全ての項目で差を認めなかった。形態に差がなくアクチンおよびビンキュリの発現に差がないことからチタンディスクの親水性は細胞の接着力に影響しないことが判明した。このことから親水性はチタンディスク上への細胞接着を強固にしているのではなく、初期接着の確率を高めていると考えられた。

ALP活性およびカルシウム量は細胞の骨芽細胞分化のマーカーであるため、この両者に有意差がないことは、親水性は骨芽細胞の分化に影響しないと考えられた。

臨床に用いるインプラント体は、通常粗面処理が行われているため水中保存されている場合および紫外線照射で親水性が高くなる^{22,23)}。さらに、インプラント表面の表面積が増すことから、親水性によって高まる細胞接着の確率は本実験より大きくなることが予想される。チタン表面の粗面構造は複雑な形態をしているため、疎水性

のままでは最深部や微細な表面に血液が侵入できない。血液が接触していない表面に細胞は接着できず、結果として骨が形成されることになる。このことから、本実験において示された、親水性チタンディスクの初期細胞接着の向上は、チタン表面構造が本来持っている osseointegration 能力を発揮するための重要な因子の一つであると考えられる。

紫外線処理によるチタン表面での生物学的活性は主として有機化合物の除去により直接チタン表面と細胞が接触できることに加え、チタン表面の電荷の変化などが細胞をチタン表面に引きつける結果、早期に強い osseointegration を獲得すると言われている⁹⁻¹⁶⁾。紫外線照射ではチタン表面が他の物質を介在することなく親水性になるため、チタン表面と細胞が直接接触できる。したがって、本研究結果は、紫外線照射による細胞の初期細胞接着の確率を高め、osseointegration の向上につながることを強く示唆するものである。

一方、表面処理後水中保存されたチタンを直ちに有機物質の付着を防止する方法で保管した場合は、親水性を獲得したチタンの細部まで細胞が到達することが可能となり、その結果強い osseointegration が得られると言われている^{7,17)}。チタン表面の有機物質を除去した状態での細胞接着は、紫外線処理の場合と同様の考え方であるが、効果の要因の一つとして親水性を挙げている点が異なっている。親水性であることで表面構造の細部に細胞が到達する確率が上がることは、本実験の結果からも予想できるが、チタン表面に直接細胞が接着するという点において、チタン表面と細胞間に介在する水分が不利になる可能性も考えられる。

今後、酸処理表面やサンドブラスト処理表面などの強い粗面をもつチタンを用い親水性の影響を検討することで、より詳細な親水性の効果が明らかになると考えられる。

結論

親水性の履歴特性を利用した親水性チタンディスクおよび骨芽細胞を用いてチタン表面の親水性が細胞に与える影響を検討したところ、以下の結論を得た。

1. 親水性は細胞の初期接着の確率を高めた。
2. 親水性は細胞増殖および細胞形態に影響しなかった。
3. 親水性は細胞分化に影響しなかった。

以上のことから、チタン表面の親水性は細胞の初期接着の確率を高めることによって、その後の細胞増殖や細胞分化の促進に繋がり、チタン表面構造が本来持っている osseointegration 能力を向上させる可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究に際し終始懇篤なるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部祇園白信仁教授、また専攻の立場からご指導賜りました日本大学歯学部鈴木直人教授、石上友彦教授および高橋富久教授に深く感謝の意を表します。また本研究に対し日頃、ご助言ご鞭撻を頂きました本学歯科補綴学第Ⅰ講座医局員各位に深く感謝の意を表します。本研究の一部は、平成26年度日本大学歯学部佐藤研究費、平成26年度日本大学大学院歯学研究科研究費(学生研究費)、平成26年度科学研究費補助金「基盤研究(C)」および平成26年度総合歯学研究所研究費(一般研究B)の助成により行われた。

文献

- 1) Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD (2000) Implant materials, designs, and surface topographies: Their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15, 675-690.
- 2) Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y (2007) Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 23, 844-854.
- 3) Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A (1997) Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 8, 442-447.
- 4) Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran D.L, Schenk R.K, Hirt HP, Sneti D, Nolte LP (1999) Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 45, 75-83.
- 5) Ogawa T, Ozawa S, Shih JH, Ryu KH, Sukoco C, Yang JM, Nishimura I (2000) Biomechanical evaluation of osseous implants having different surface topographies in rats. *J Dent Res* 79, 1857-1863.
- 6) Ogawa T, Nishimura I (2003) Different bone integration profiles of turned and acidetched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18, 200-210.
- 7) Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk R.K, Denzer A.J, Cochran D.L, Hoffmann B, Lussi A and Steinemann S.G (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 83, 529-533.
- 8) Weinlaender M, Kenney EB, Lekovic V, Beumer 3rd J, Moy PK, Lewis S (1992) Histomorphometry of bone apposition around three types of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7, 491-496.
- 9) Hori N, Att W, Ueno T, Sato N, Yamada M, Saruwatari L, Suzuki T, Ogawa T (2009) Age-dependent degradation of the protein adsorption capacity of titanium. *J Dent Res* 88, 663-667.
- 10) Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa T (2009) The effect of UVphotofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys. *Biomaterials* 30, 4268-4276.
- 11) Suzuki T, Hori N, Att W, Kubo K, Iwasa F, Ueno T, Maeda H, Ogawa T (2009) Ultraviolet treatment overcomes time-related degrading bioactivity of titanium. *Tissue Eng Part A* 15, 3679-3688.
- 12) Att W, Hori N, Takeuchi M, Ouyang J, Yang Y, Anpo M,

- Ogawa T (2009) Time-dependent degradation of titanium osteoconductivity: an implication of biological aging of implant materials. *Biomaterials* 30, 5352–5363.
- 13) Hori N, Ueno T, Suzuki T, Yamada M, Att W, Okada S, Ohno A, Aita H, Kimoto K, Ogawa T (2010) Ultraviolet light treatment for the restoration of age-related degradation of titanium bioactivity. *Int J Oral Maxillofac Implants* 25, 49–62.
- 14) Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T (2009) The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials* 30, 1015–1025.
- 15) Aita H, Att W, Ueno T, Yamada M, Hori N, Iwasa F, Tsukimura N, Ogawa T (2009) Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation. *Acta Biomater* 5, 3247–3257.
- 16) Ikeda T, Hagiwara Y, Hirota M, Tabuchi M, Yamada M, Sugita Y and Ogawa T (2014) Effect of photofunctionalization on fluoride-treated nanofeatured titanium. *J Biomater Appl* 28, 1200–1212.
- 17) Massaro C, Rotolo P, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M, Textor M, Spencer ND, Brunette DM (2002) Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. *J Mater Sci Mater Med* 13, 535–548.
- 18) Lang N P, Salvi G E, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt D D. (2011) Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Impl Res* 22, 349–356.
- 19) Wang R, Hashimoto K, Fujishima A (1997) Light-induced amphiphilic surfaces. *Nature* 388, 431–432.
- 20) Keleher J, Bashant J, Heldt N, Johnson L, Li YZ (2002) Photocatalytic preparation of silver-coated TiO_2 particles for antibacterial applications. *World J Microbiol Biotechnol* 18, 133–139.
- 21) Nakashima T, Ohko Y, Kubota Y, Fujishima A (2003) Photocatalytic decomposition of estrogens in aquatic environment by reciprocating immersion of TiO_2 -modified polytetrafluoroethylene mesh sheets. *J Photochem Photobiol A Chem* 160, 115–120.
- 22) 橋本和仁, 入江 寛(2004)酸化チタン表面の光誘起親水性化反応. *表面化学* 25, 252-259.
- 23) 小野 周(1990)表面張力. 第9版, 共立出版, 東京, 71-85.
- 24) Kasemo B, Lausmaa J (1988) Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *J Biomed Mater Res* 22, 145–158.
- 25) Kilpadi DV, Lemons JE, Liu J, Raikar GN, Weimer JJ, Vohra Y (2000) Cleaning and heat-treatment effects on unalloyed titanium implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15, 219–230.
- 26) Serro AP, Saramago B (2003) Influence of sterilization on the mineralization of titanium implants induced by incubation in various biological model fluids. *Biomaterials* 24, 4749–4760.
- 27) Morra M, Cassinelli C, Bruzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, Fini M (2003) Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18, 40–45.
- 28) Wennerberg A, Albrektsson T (2010) On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 25, 63–74.
- 29) Pae A, Kim SS, Kim HS, Woo YH (2011) Osteoblast-like cell attachment and proliferation on turned, blasted, and anodized titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 26, 475–481.
- 30) Cook JA, Mitchell JB (1989) Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 179, 1–7.
- 31) Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S (1985) Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* 82, 169–179.
- 32) Magaud JP, Sargent I, Mason DY (1988) Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J Immunol Methods* 106, 95–100.
- 33) Huong PL, Kolk AH, Eggelte TA, Verstijnen CP, Gilis H, Hendriks JT (1991) Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. An easy and low cost alternative to radioactive thymidine incorporation. *J Immunol Methods* 140, 243–248.

