(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6072413号
(P6072413)

(45)発行日　平成29年2月1日(2017.2.1)　(24)登録日　平成29年1月13日(2017.1.13)

(51)Int.Cl.		F I		
A61F 2/28	(2006.01)	A61F	2/28	
A61C 8/00	(2006.01)	A61C	8/00	Z
A61L 27/00	(2006.01)	A61L	27/00	

請求項の数 19　(全 41 頁)

(21)出願番号	特願2011-538681 (P2011-538681)
(86)(22)出願日	平成21年11月24日 (2009.11.24)
(65)公表番号	特表2012-509750 (P2012-509750A)
(43)公表日	平成24年4月26日 (2012.4.26)
(86)国際出願番号	PCT/US2009/065816
(87)国際公開番号	WO2010/068468
(87)国際公開日	平成22年6月17日 (2010.6.17)
審査請求日	平成24年11月13日 (2012.11.13)
審判番号	不服2014-23964 (P2014-23964/J1)
審判請求日	平成26年11月25日 (2014.11.25)
(31)優先権主張番号	61/117,831
(32)優先日	平成20年11月25日 (2008.11.25)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　508085729
ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・カリフォルニア
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
アメリカ合衆国，９４６０７－５２００，カリフォルニア州，オークランド，１２階，フランクリン通り　１１１１
1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA, 94607-5200, US
(74)代理人　110001494
前田・鈴木国際特許業務法人

最終頁に続く

(54)【発明の名称】機能性チタンインプラントおよびそれに類する再生可能材料

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

医療用金属インプラントに機能性を付与する方法であって、

（１）機械加工、化学エッチングまたはサンドブラストされた金属インプラント表面を提供する工程と、

（２）前記金属インプラント表面を周囲条件下で紫外（ＵＶ）線により処理することで、前記金属インプラント表面に正の電荷を帯びた金属酸化物を形成する工程と、を有し、

前記金属インプラントは、チタンインプラント、チタン合金インプラント、クロム－コバルト合金インプラント、ニッケルインプラント、ニッケル合金インプラント、ステンレス鋼インプラント、ジルコニウムインプラント、アルミニウムインプラントおよびアルミニウム合金インプラントからなる一群から選択され、

前記ＵＶ線は、約１７０ｎｍから約２７０ｎｍの波長のＵＶ線および約３４０ｎｍから約３８０ｎｍの波長のＵＶ線の組み合わせである方法。

【請求項２】

処理された前記表面は、増進した割合で、タンパク質および／または細胞を引き寄せる請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記表面は、チタン表面である請求項１に記載の方法。

【請求項４】

前記チタン表面は、TiO_2を有する請求項３に記載の方法。

【請求項５】
処理された前記表面は、実質的に炭化水素を含有しない請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記インプラントは、担体材料を有する請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記インプラント表面は、酸エッチングにより加工される請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記ＵＶ線は、約１７０ｎｍから約２７０ｎｍと約３４０ｎｍから約３８０ｎｍの一群から選択される波長である請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記表面は、ＵＶＡおよびＵＶＣの組み合わせにより処理される請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
ＵＶ線による前記処理は、最長で４８時間である請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
ＵＶ線による前記処理は、３０秒、１分、５分、１５分、３０分、１時間、３時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間および４８時間の一群から選択される時間で行われる請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
前記処理された表面は、酸化金属陽イオンを有する請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記酸化金属陽イオンは、酸化チタン陽イオンである請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記細胞は、ヒト間葉幹細胞および骨芽細胞からなる一群から選択され、前記タンパク質は、ウシ血漿アルブミン、フラクションＶ、およびウシ血清フィブロネクチンからなる一群から選択される請求項２に記載の方法。
【請求項１５】
前記タンパク質および細胞は、前記インプラント表面に直接に接着する請求項２に記載の方法。
【請求項１６】
前記処理されたインプラント表面は、未処理のインプラント表面と比較して、組織－インプラント一体化および／または骨－インプラント一体化を向上することができる請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
前記処理されたインプラント表面は、未処理のインプラント表面と比較して、骨形成能力が向上している請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
前記処理されたインプラント表面は、タンパク質吸収の増加、骨芽細胞の移動の増加、骨芽細胞の接着の増加、骨芽細胞分散の増加、骨芽細胞の増殖の増加、骨芽細胞の分化の増加のいずれか、もしくはそれらの組み合わせを可能にする請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
請求項１から１８のいずれかに記載の方法を有する骨－インプラント一体化もしくは骨形成能力を向上する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２００８年１１月２５日に提出された米国特許出願第６１／１１７，８３１に基づく優先権を主張し、その内容を参考としてすべて組み込んでいる。
本願発明は、バイオメディカルに利用される医療用インプラントに関する。
【０００２】

骨粗鬆症による大腿骨頸部骨折と、膝関節および股関節の退行性変化は、よくある問題である。米国では、年間５００，０００件を超える股関節および膝関節の再構築手術が行われており、この手術には、アンカーとしてのチタンインプラントが重要な治療手段となっている。これらの領域での骨折は、本質的に骨を固定すること（例えば、固定支持など）が許容されず、通常、インプラントは、手術の直後から重力や歩行などの日常生活の活動による恒常的および／または周期的な衝撃にさらされる。このような手術における結果の問題点としては、憂慮すべき程度の障害、長期における介助、死亡率、比較的高い割合５～５０％の割合で起きる修正手術、実施的な生活の質の低下などが挙げられる。

【０００３】

他の決定要因として、これらの目的で使用されるインプラントの設置は、骨の再生能力を阻害し、また骨粗鬆症などの代謝活動およびインプラントの周囲での骨の修復を遅らせる老化などを引き起こす。したがって、罹患率を最小限にし、機能的な回復および長期的な予後を最大にするために、骨内インプラントを使用した迅速かつしっかりとした骨および関節アンカーの確立に未だかつてないほど尽力している。

【０００４】

一方で、欠損歯の再生手術として、歯科用チタンインプラントを使用することは広く認知されている。しかしながら、患者の歯の質や大きさ、全体的な状態、および年齢などを含む様々なリスクが歯科におけるインプラント治療には存在する。さらには、チタンインプラントが骨と一体化されて咬合荷重に耐えられるようになるには長い時間が必要であり（４～６ヶ月）ため、これらの有益な治療を実質的に制限してしまう。向上された骨形成（骨伝導性）能力を有するインプラントは、患者および歯科医に非常に有益である。

【０００５】

骨に加えて、骨、関節および歯の再構築治療以外の組織再生治療は、多くの問題と直面している。例えば、怪我および退行性変化後の骨の以上のための現在行われている治療は、組織再生のために成長因子などの生体分子を使用する必要がある。しかし、それでも生体分子の効果および再生可能な骨の量には限界がある。生体分子による副作用および治療に必要なコストも顕著である。

【０００６】

担体バイオ材料と共に供給することで生理活性が向上したインプラントは、組織再生に必要な生体反応を促進するのに使用できる可能性を有している。

【発明の概要】

【０００７】

ここで記載するのは、金属表面を有する医療用インプラントであって、該金属表面は、正の電荷を帯びた金属酸化物を有するインプラントを記載する。金属は、チタン、金、プラチナ、タンタラム、ニオビウム、ニッケル、鉄、クロム、コバルト、ジルコニウム、アルミニウム、およびパラジウムであってもよい。一実施形態では、該インプラントは、金属もしくは非金属の担体材料を有していてもよい。

【０００８】

一実施形態では、医療用インプラントは、チタン表面を有する。チタン表面は、TiO_2を有する。一実施形態では、チタン表面は実質的に炭化水素を含まない。

【０００９】

インプラント表面は、タンパク質および／または細胞を促進された割合で引き寄せることができる。タンパク質は、ウシ血清アルブミン、フラクションＶ、およびウシ血漿フィブロネクチンを使用してもよい。細胞は、ヒト間葉幹細胞、および骨芽細胞を使用してもよい。タンパク質もしくは細胞は、処理済みインプラント表面に、例えば架橋用二価陽イオンなどを用いないで直接、接着させてもよい。

【００１０】

インプラント表面は、組織－インプラントの一体化および／または骨－インプラント一体化を引き起こすもしくは向上することができる。インプラント表面は、以下もしくは以下の組み合わせが可能である：タンパク質吸収の増加、骨芽細胞移動の促進、骨芽細胞接

着の促進、骨芽細胞拡散の促進、骨芽細胞増殖の促進、および骨芽細胞分化の促進。

【００１１】

ここでは、医療用インプラントに機能性を付与する方法を記載し、該方法は、（１）金属インプラント表面を提供する工程と（２）該インプラント表面を処理し正の電荷を帯びた表面にする、もしくは表面の正の電荷を強める工程と、を有する。いくつかの実施形態では、該方法は、生理学的環境において正の電荷を帯びさせる。生理学的環境は、ｐＨが約７であってもよい。いくつかの実施形態では、該方法は、ｐＨが７未満もしくは７より大きくても該表面に正の電荷を帯びさせることができる。

【００１２】

一実施形態では、処理された表面は、未処理の表面と比較してタンパク質および／または細胞を向上した割合で吸着することができる。

【００１３】

一実施形態では、インプラントは、チタン表面を有する。一実施形態では、チタン表面は、二酸化チタンを有する。

【００１４】

一実施形態では、該インプラント表面は、紫外線（ＵＶ線）を照射することにより処理される。ＵＶ線は、ＵＶランプを使って照射できる。ＵＶ線は、約１０ｎｍ～４００ｎｍの波長であってもよい。いくつかの実施形態では、ＵＶ線は、約１７０ｎｍ～約２７０ｎｍもしくは約３４０ｎｍ～３８０ｎｍの波長であってもよい。いくつかの実施形態では、該表面は、約１７０ｎｍ～約２７０ｎｍの波長のＵＶ線と約３４０ｎｍ～約３８０ｎｍのＵＶ線を組み合わせて照射して処理される。

【００１５】

ＵＶ線の強度は、広範囲であってもよい。例えば、ＵＶ線強度は、０．００１ｍＷ／ｃｍ^2～１００ｍＷ／ｃｍ^{2}の範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、ＵＶ線は、約０．１ｍＷ／ｃｍ^{2}の強度であってもよく、もしくは約２ｍＷ／ｃｍ^{2}であってもよい。ＵＶ線による処理は、４８時間以内であればよく、例えば、３０秒、１分、５分、１５分、３０分、１時間、５時間、１０時間、２４時間、３６時間、および４８時間である。

【００１６】

一実施形態では、該方法は、さらに、インプラント表面に処理を施す前に、インプラント表面を加工する工程を有する。インプラント表面は、物理的な加工もしくは化学的な加工を施してもよい。物理的な加工としては、機械加工もしくはサンドブラストなどであってもよい。化学的な加工は、酸もしくはアルカリによるエッチングであってもよい。酸としては、硫酸でもよい。加工表面は、正の電荷を帯びてもよい。ＵＶ線処理は、加工された表面に正の電荷を帯びさせるのを促進する。

【００１７】

いくつかの実施形態では、処理された表面は、酸化金属陽イオンを有する。酸化金属陽イオンは、酸化チタン陽イオンであってもよい。

【００１８】

いくつかの実施形態において、処理されたインプラント表面は、ウシ血清アルブミン、フラクションＶ、ウシ血漿フィブロネクチンなどを吸着できる。一実施形態においては、処理されたインプラント表面は、ヒト間葉幹細胞および骨芽細胞を引き寄せることができる。タンパク質もしくは細胞は、例えば、架橋用二価陽イオンなどを用いずに処理されたインプラント表面に直接に接着してもよい。一実施形態では、処理されたチタン表面は、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}などの２価陽イオンを有さない。

【００１９】

処理されたインプラント表面は、インプラント部位での組織－インプラントの一体化および／または骨－インプラントの一体化を向上できる。処理されたインプラント表面は、未処理のインプラント表面と比べて骨形成能力に優れている。インプラント表面は、以下もしくは以下の組み合わせが可能である：タンパク質吸収増加、骨芽細胞移動の促進、骨芽細胞接着の促進、骨芽細胞拡散の促進、骨芽細胞増殖の促進、および骨芽細胞分化の誘

導。

【００２０】

上述の方法は、インプラントの骨形成活性を増加、インプラントの骨伝導性能力の増加、および組織－インプラントおよび／または骨－インプラントの一体化の向上などに使用できる。

【００２１】

ここに記載するのは、上述の方法により表面に機能性を有する医療用インプラントである。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１】図１は、異なる時期および紫外線照射をした場合としなかった場合における酸によりエッチングしたチタン表面の初期の生体活性を示している。　図１Ａは、チタンディスクを新しく加工した直後に使用した場合と、４週間後の場合（室温環境の暗室にて保存）と、４週間後にＵＶで処理された場合とにおける２時間、２４時間、７２時間の培養後のウシ血清アルブミン吸収率平均値±ＳＤ（標準偏差）を示す。　図１Ｂは、異なる状況下で酸によりエッチングされたチタンディスクに３時間の培養中に８μｍの孔を通って移動したヒト間葉幹細胞（ＭＳＣｓ）の量を示す。　図１Ｃは、接種してから３時間および２４時間後において、ＷＳＴ－１検知により評価されたチタンディスクに接着したヒトＭＳＣｓを示す。全てのパネルにおいて、データは平均値±ＳＤで示す（ｎ＝３）。

【図２】図２は、異なる条件で酸によりエッチングしたチタン表面に接種して３時間後のヒト間葉幹細胞の初期の分散および細胞骨格の変化を示す。異なる条件：新しく加工した表面、４週間後の表面、４週間後の表面をＵＶ線で処理。　図２Ａは、アクチンフィラメント（赤）、アンチ－パキシリン（緑）、もしくはこれらの組み合わせをローダミンファロイジンで染色した細胞の共焦点顕微鏡画像を示す。　図２Ｂは、これらの画像を使って行った細胞形態計測の評価である。データは、標準値±ＳＤ（ｎ＝１０）で示す。

【図３】図３は、生体力学プッシュインテストの評価を行った結果、新しく加工されたチタン表面とＵＶ線処理した酸によりエッチングしたチタン表面の骨－チタンの一体化が、４週間後の表面に比べて促進されていることを示す。機械加工および酸によるエッチングのインプラントのプッシュイン値は、ＵＶ線処理をした場合としなかった場合を記載している。データは平均値±ＳＤ（ｎ＝５）で示されている。

【図４】図４は、正の電荷を帯びたチタン表面のアルブミン吸収Ａおよび細胞接着Ｂの向上を示す。　図４Ａは、アルブミン培養前に２４時間イオン処理した場合としなかった場合の種々のチタン表面（新しく加工されたチタン表面、４週間後のチタン表面、４週間後にＵＶ線処理されたチタン表面）を３時間培養している間のアルブミンの吸収を示す。アルブミン培養の培地は、ｐＨ７もしくは３に調節された。　図４Ｂは、２４時間の培養において、種々のチタン表面に接着したヒトＭＳＣｓの量を示す。チタン表面は図４Ａと同様にして、準備した。培地は、ｐＨ７に調節した。データは、平均値±ＳＤ（ｎ＝３）で示す。

【図５】図５は、新たに解明された、チタン表面にタンパク質および細胞が静電気的に接着する様子を簡略化して示したものである。左側（古いチタン）および右側（新しいチタンもしくはＵＶ線処理されたチタン）は、それぞれ細胞を引き寄せず、もう一方は細胞を引き寄せる。

【図６】図６は、新しく加工されたチタン表面およびＵＶ線処理されたチタン表面向上進された生体活性を汎化したものである。　図６Ａは、新しく加工された、４週間後、４週間後にＵＶ線処理した機械加工およびサンドブラストされたチタンディスクに対して６時間のアルブミン吸収培養を行った図である。データは、平均値±ＳＤ（ｎ＝３）で示す。

図６Ｂは、新しく加工された、４週間後、４週間後にＵＶ線処理した機械加工およびサンドブラストされたチタンディスクに対して６時間のフィブロネクチンン吸収培養を行った図である。データは、平均値±ＳＤ（ｎ＝３）で示す。　図６Ｃは、ＵＶ線処理した場合としなかった場合の機械加工されたインプラントのプッシュインテストにより骨－チタ

ンの一体化を計測したものを示す。データは、平均値±ＳＤ（ｎ＝５）で示す。
【図７Ａ】図７Ａ～Ｇは、紫外線（ＵＶ線）に誘導されたチタン表面に対する骨芽細胞親和性を示す。機械加工された表面および酸によりエッチングされた表面の二つの異なる形態の表面を用意した。図７Ａは、４８時間のＵＶ線処理後に得られた超親水性のチタン表面を示す（左図）。種々の時間ＵＶ線処理をした後のH_2Oの接触角度により親水性の変化を評価した（線グラフ）。
【図７Ｂ】図７Ｂは、４８時間のＵＶ線処理後がストップしてからの暗下においてチタン表面の親水性の低下を示す。
【図７Ｃ】図７ＣおよびＤは、ＵＶ線による前処理をした場合としなかった場合でのチタン表面へのタンパク質の吸収率を示す。アルブミン（Ｃ）およびフィブロネクチン（Ｄ）は、チタン表面で２時間、６時間、２４時間培養した。
【図７Ｄ】図７ＣおよびＤは、ＵＶ線による前処理をした場合としなかった場合でのチタン表面へのタンパク質の吸収率を示す。アルブミン（Ｃ）およびフィブロネクチン（Ｄ）は、チタン表面で２時間、６時間、２４時間培養した。
【図７Ｅ】図７Ｅは、３時間および２４時間の培養後にＵＶ線処理をした場合としなかった場合のチタン表面に接着した骨芽細胞の相対的な数のＷＳＴ－１色彩測定による評価を示す。
【図７Ｆ】図７ＦおよびＧは、タンパク質および骨芽細胞に対するチタン親和性のＵＶ線処理の時間依存変化率を示す。ＵＶ線による前処理の時間に対してのチタン表面のアルブミン吸収率（Ｆ）および骨芽細胞接着率（Ｇ）をプロットしている。図７Ｃ～７Ｇまでのデータは、平均値±ＳＤ（ｎ＝３）で示されており、ＵＶ線処理を行った表面と未処理のコントロール表面では、それぞれ＊＊ｐ値＜．０１および＊ｐ値＜．０５で、有意な差があった。
【図７Ｇ】図７ＦおよびＧは、タンパク質および骨芽細胞に対するチタン親和性のＵＶ線処理の時間依存変化率を示す。ＵＶ線による前処理の時間に対してのチタン表面のアルブミン吸収率（Ｆ）および骨芽細胞接着率（Ｇ）をプロットしている。図７Ｃ～７Ｇまでのデータは、平均値±ＳＤ（ｎ＝３）で示されており、ＵＶ線処理を行った表面と未処理のコントロール表面では、それぞれ＊＊ｐ値＜．０１および＊ｐ値＜．０５で、有意な差があった。
【図８Ａ】図８Ａ～Ｃは、ＵＶ線処理されたチタン上での骨芽細胞の初期の態様を示す。図８Ａは、ＵＶ線による前処理した場合としなかった場合でのチタン表面上の初期の骨芽細胞の分散および細胞骨格の構成を示す。接種後３時間の骨芽細胞の核（青）をＤＡＰＩで、アクチンフィラメント（赤）をローダミンファロイジンにより二重染色しものの共焦点顕微鏡画像である。バーは、１０μｍである。該画像を使って細胞形態計測の評価を行なった（ヒストグラムを下に示す）。データは、平均値±ＳＤ（ｎ＝６）で示しており、＊ｐ値＜０．０５で、ＵＶ照射処理した表面と未処理のコントロール表面では有意な差があった。
【図８Ｂ】図８Ｂは、ＵＶ線処理したチタン表面としなかったチタン表面で培養２日目と５日目の骨芽細胞の密度を示す（下記のヒストグラム）。２日目に得られた細胞の蛍光画像は、細胞密度が確認できるように上部に示している。
【図８Ｃ】図８Ｃは、チタン基材上での骨芽細胞の増殖活動を２日目の培養の各細胞にＢｒｄＵを取り込ませて評価した。図８ＢおよびＣのデータは、平均値±ＳＤ（ｎ＝３）で示しており、ＵＶ線処理を行った表面と未処理のコントロール表面では、それぞれ＊＊ｐ値＜．０１および＊ｐ値＜．０５で、有意な差があった。
【図９Ａ】図９Ａ～Ｄは、ＵＶ線処理したチタン表面における向上された骨芽細胞の表現形質および促進された分化を示す。図９Ａは、骨芽細胞の初期の段階のマーカーであるアルカリホスホターゼ（ＡＬＰ）のＵＶ線により促進された活性を示す。上図では、チタン基質の上で１０日ほど培養された骨芽細胞のＡＬＰ染色を示す。培養領域においてＡＬＰ陽性領域をパーセンテージで示す（左下ヒストグラム）。細胞ごとに標準化されたＡＬＰ活性の色彩測定による定量化も示す（右下ヒストグラム）。

【図９Ｂ】図９Ｂは、骨芽細胞のミネラリゼーション能力（後期段階のマーカー）を示す。上図は、１４日間の培養後の骨芽細胞をフォンコッサ染色した図である。培養領域においてフォンコッサ陽性領域をパーセンテージで示す（左下ヒストグラム）。カルシウムの総堆積量を色彩測定により計測したものも示す（右下ヒストグラム）。

【図９Ｃ】図９ＣおよびＤは、機械加工されたチタン表面（Ｃ）と酸によりエッチングしたチタン表面（Ｄ）の上で培養した骨芽細胞における骨関連遺伝子の発現を示す。骨芽細胞は、ＵＶ線処理したチタンとＵＶ線処理しなかったチタンの上で培養し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）により遺伝子の発現を半定量化して評価した。電気泳動の画像を上図に示す。ＧＡＰＤＨｍＲＮＡの発現レベルに対する遺伝子発現の定量レベルを下に示す。Ｃ：未処理のコントロール。ＵＶ：ＵＶ線照射処理。図９Ａ～９Ｄまでのデータは、平均値±ＳＤ（ｎ＝３）で示されており、ＵＶ線処理を行った表面と未処理のコントロール表面では、それぞれ＊＊ｐ値＜．０１および＊ｐ値＜．０５で、有意な差があった。

【図９Ｄ】図９ＣおよびＤは、機械加工されたチタン表面（Ｃ）と酸によりエッチングしたチタン表面（Ｄ）の上で培養した骨芽細胞における骨関連遺伝子の発現を示す。骨芽細胞は、ＵＶ線処理したチタンとＵＶ線処理しなかったチタンの上で培養し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）により遺伝子の発現を半定量化して評価した。電気泳動の画像を上図に示す。ＧＡＰＤＨｍＲＮＡの発現レベルに対する遺伝子発現の定量レベルを下に示す。Ｃ：未処理のコントロール。ＵＶ：ＵＶ線照射処理。図９Ａ～９Ｄまでのデータは、平均値±ＳＤ（ｎ＝３）で示されており、ＵＶ線処理を行った表面と未処理のコントロール表面では、それぞれ＊＊ｐ値＜．０１および＊ｐ値＜．０５で、有意な差があった。

【図１０】図１０は、生体力学的プッシュインテストにより評価したＵＶ線処理により向上した骨－チタンの一体化を示す。機械加工および酸によるエッチングのインプラントのプッシュイン値は、ＵＶ線処理した場合としなかった場合を記載している。データは平均値±ＳＤ（ｎ＝５）で示されている。ＵＶ線処理を行った表面と未処理のコントロール表面では、それぞれ＊＊ｐ値＜．０１および＊ｐ値＜．０５で、有意な差があった。

【図１１Ａ】図１１は、ＵＶ線により促進されたインプラント周縁の骨形成を示す。図１１Ａ～Ｄは、オリジナル倍率である４０倍で、図１１Ｅ～Ｈは、２００倍で、図１１Ｉ～Ｌは４００倍で、ゴールドナートリクロム染色した酸によるエッチング処理したチタンインプラントの細胞画像を示す。なお、２週目のＵＶ線処理したインプラントは、骨とインプラントの間で軟組織が形成されるのを防ぐ激しい骨形成が行なわれおり（図１１Ｆの矢印）、これはインプラント表面に直接骨が堆積することにつながる（図１１Ｊ矢印）。これに対して、未処理のコントロールの周りの骨は分断されており（図１１Ｅ）、骨とインプラント表面の間に移動してくる軟組織を含んでおり、これは骨－インプラント表面の直接の接触を阻害している（図１１Ｉの矢印）。このようなインプラントおよび骨境界面での形態の違いは、４週目でも明らかである（図１１ＧおよびＨ）。軟組織に阻害されずにインプラント表面に沿った広範囲な骨分散は、ＵＶ線処理したインプラントの周りで確認されている（図１１ＨおよびＬ）、一方で未処理のインプラントの周りの骨の多くは、軟組織によりインプラント表面から離されている（図１１Ｇおよび図１１Ｋの矢印）。骨－インプラント接触の平均的な細胞形態計測値（図１１Ｍ）、近位領域での骨量（図１１Ｎ）、遠位領域での骨量（図１１Ｏ）および軟組織の阻害（図１１Ｐ）を示す。ＵＶ線処理を行った表面と未処理のコントロール表面では、それぞれ＊＊ｐ値＜．０１および＊ｐ値＜．０５で、有意な差があった。

【図１１Ｂ】ＵＶ線処理したインプラント周縁の２週目（Ｗ２）の骨形成の４０倍率での画像。

【図１１Ｃ】未処理のコントロールインプラント表面での４週目（Ｗ４）の骨形成の４０倍率での画像。

【図１１Ｄ】ＵＶ線処理したインプラント周縁の４週目（Ｗ４）の骨形成の４０倍率での画像。

【図１１Ｅ】未処理コントロールの周縁での骨形成の２００倍率での画像。
【図１１Ｆ】ＵＶ線処理したインプラント周縁の２週目の骨形成の２００倍率での画像。
【図１１Ｇ】未処理コントロールインプラントの周縁の骨形成の４週目の２００倍率での画像。
【図１１Ｈ】ＵＶ線処理したインプラント周縁の４週目の骨形成の２００倍率での画像。
【図１１Ｉ】未処理コントロールインプラントの周縁での軟組織による阻害の４００倍率での画像。
【図１１Ｊ】ＵＶ線処理したインプラントの骨の直接の堆積の４００倍率での画像。
【図１１Ｋ】未処理コントロールインプラントの骨が軟組織によりインプラント表面から離されている４００倍率での画像。
【図１１Ｌ】ＵＶ線処理したインプラントの広範囲な骨分散の４００倍率での画像。
【図１１Ｍ】骨－インプラント接触の平均的な細胞形態計測値。
【図１１Ｎ】近位領域での骨量。
【図１１Ｏ】遠位領域での骨量。
【図１１Ｐ】軟組織による阻害。
【図１２Ａ】図１２Ａ～Ｍは、ＵＶ線に誘導された、生物学的効果を伴うチタン表面の特性の変化を示す。図１２Ａは、機械加工されたチタン表面と酸によりエッチング処理されたチタン表面のＸ線回析（ＸＲＤ）スペクトルと、９２３Ｋおよび６７３Ｋで加熱して生成されたTiO_2純粋なルチル構造、およびルチルとアナターゼの混合構造を示す。
【図１２Ｂ】図１２Ｂは、機械加工されたチタン表面と酸によるエッチング処理されたチタン表面の光吸収スペクトラムを示す。
【図１２Ｃ】図１２Ｃは、機械加工されたチタン表面と酸によりエッチング処理されたチタン表面のＸ線光電子分光（ＸＰＳ）を示す。
【図１２Ｄ】図１２Ｄは、図１２ＣのＸＰＳＴｉ２ｐピークの拡大図である。
【図１２Ｅ】図１２Ｅ～図１２Ｇは、ＵＶ線を様々な時間照射したあとの酸によりエッチングしたチタン表面のＴｉ２ｐ（図１２Ｅ）、Ｏｌｓ（図１２Ｆ）およびＣｌｓ（図１２Ｇ）のＸＰＳの状態の変化を示す。
【図１２Ｆ】図１２Ｅ～図１２Ｇは、ＵＶ線を様々な時間照射したあとの酸によりエッチングしたチタン表面のＴｉ２ｐ（図１２Ｅ）、Ｏｌｓ（図１２Ｆ）およびＣｌｓ（図１２Ｇ）のＸＰＳの状態の変化を示す。
【図１２Ｇ】図１２Ｅ～図１２Ｇは、ＵＶ線を様々な時間照射したあとの酸によりエッチングしたチタン表面のＴｉ２ｐ（図１２Ｅ）、Ｏｌｓ（図１２Ｆ）およびＣｌｓ（図１２Ｇ）のＸＰＳの状態の変化を示す。
【図１２Ｈ】図１２Ｈは、異なる時間ＵＶ線処理した酸によりエッチングしたチタン表面の原子の変化をパーセンテージで示したものである。
【図１２Ｉ】図１２Ｉは、３時間の培養後のアルブミン吸収率を酸によりエッチングされたチタン表面炭素原子に対してプロットしたものであり、これは、顕著な逆相関の関係を示している。
【図１２Ｊ】図１２Ｊは、３時間の培養後の骨芽細胞の接着率を酸によりエッチングしたチタン表面炭素原子に対してプロットしたものであり、これは、顕著な指数関数的な関係を示している。
【図１２Ｋ】図１２Ｋおよび図１２Ｌは、アルブミン吸収率（図１２Ｋ）および骨芽細胞接着率（図１２Ｌ）を酸によりエッチングしたチタン表面上のH_2Oの接触角度に対してプロットしたものであり、これは特に目立った関連性がないことを示している。
【図１２Ｌ】図１２Ｋおよび図１２Ｌは、アルブミン吸収率（図１２Ｋ）および骨芽細胞接着率（図１２Ｌ）を酸によりエッチングしたチタン表面上のH_2Oの接触角度に対してプロットしたものであり、これは特に目立った関連性がないことを示している。
【図１２Ｍ】図１２Ｍは、タンパク質吸収および骨芽細胞の接着と分散を加速および向上させる光形成による生体親和性TiO_2のTiO_2光機能性付与の概略図を示す。
【図１３】図１３は、ＵＶ線で様々に処理されたチタン表面に接着した細胞の数を示す。

【発明を実施するための形態】
【００２３】
金属表面を有する医療用インプラント
ここに記載するのは、金属表面を有する医療用インプラントであって、前記金属表面は正の電荷を帯びた酸化金属を有する。前記金属は、チタン、金、プラチナ、タンタラム、ニオビウム、ニッケル、鉄、クロム、コバルト、ジルコニウム、アルミニウム、およびパラジウムであってもよい。いくつかの実施形態では、前記金属表面は、酸化金属陽イオンを有する。
【００２４】
チタン表面
チタン表面は、負の電荷を帯びていると考えられるため、陽イオンが、例えばCa^{2+}など、チタン表面と反応する。一方で、多くのタンパク質および生物の細胞は、生理学的条件下では、負の電荷を帯びているため、チタン表面と反発する可能性がある。
【００２５】
チタンインプラントは、整形外科および歯科の病気および問題において再構築アンカーとして使われている。インプラントアンカーの成功には、軟組織／結合組織に阻害されずにチタン表面に骨が直接堆積する規模が関係する。これを「骨－インプラント一体化」もしくは「オッセオインテグレーション」と言う。現在の整形外科および歯科のチタンインプラントは、この考え方に基づいて開発されており、「オッセオインテグレーテッド・インプラント」と呼ばれている。しかしながら、骨によりカバーされる全インプラント領域は、４５±１６％もしくは５０～７５％に留まっており、理想とする１００％を大きく下回っている。多くのインプラントは、不完全な設置もしくは骨－インプラント境界面での初期もしくは後期の破壊的変化により失敗している。インプラントの周りの全てに骨組織が形成されない理由についてはわかっていない。
【００２６】
酸化チタン（TiO_2）紫外線（ＵＶ線）誘導型超親水性は、１９９７年に発見された。半導体酸化物の光化学反応（超親水性の生成も含む）は、環境およびクリーンエネルギー科学から多くのまた幅広い注目を集めた。非常に親水性の高いチタン表面の光による形成は、光処理により形成された親水相の表面構造の変化に起因している。このモデルでは、光処理は、架橋部位において表面の酸素欠乏をつくり、これによりTi^{4+}部位をTi^{3+}部位に変化させることで解離性水吸収に好ましい状態となる。
【００２７】
本発明者らは、１）新しく加工されたチタン表面もしくは修飾されたチタン表面は、正の電荷を帯びている；２）古いチタン表面をＵＶ線で処理することで表面が正の電荷を帯び、新しく加工されたチタン表面をＵＶ線で処理するとその正電荷をより強化する；３）これらの正の電荷を帯びた表面は、タンパク質および細胞親和性を示し、ＵＶ線処理されていない古いチタン表面と比較してタンパク質および細胞親和性が実質的に増加している；４）タンパク質および細胞接着に関するこれらの新規に見出されおよび形成されたメカニズムは、タンパク質および／または細胞とチタン表面の直接の相互作用を可能にし、これには架橋用の２価陽イオン、例えばCa^{2+}などを必要としない、ということを見出した。新しい表面および生体的メカニズムは、チタンインプラントの分野において認識されてきた生体プロセスと区別できる。なぜなら、タンパク質の吸収および細胞の接着、最終的なチタン表面が、組織との一体化および再生能力において実質的に増加しているからである。
【００２８】
ＵＶ線処理は、通常の空気雰囲気条件において、例えば、真空状態や不活性ガスの注入などの他の雰囲気の設定はいらない条件において行なうことができる。チタンもしくはチタン混合金属をＵＶ線処理すると、チタン原子の価電子バンドから伝導性バンドへと電子を活性化させ、これによりチタンの表面層に陽性の孔を形成して正の電荷を表面に形成する。電子を活性化するには、３．２ｅＶのＵＶ線エネルギーが必要であり、これはＵＶＡ

と呼ばれるおおよそ３６５ｎｍの波長に該当する。これに対し、ピークの波長が２６０ｎｍより短いＵＶＣでは、炭化水素の直接の分解が行なわれる。この炭素除去メカニズムは、チタン表面にＵＶＡが貫通するのに役立ち、正電荷を形成する効率を上げ、結果的に形成された正電荷を露出するのを促進および向上する。

【００２９】

いかなる理論に制限されることなく、ＵＶＡ（約３４０ｎｍ～約３８０ｎｍ）およびＵＶＣ（約１７０ｎｍ～約２７０ｎｍ）の組み合わせが使用された。

【００３０】

ＵＶ線処理されたチタンに仲介された骨－チタン一体化の向上は実質的であることが証明された。例えば、酸によりエッチングしたインプラントの生体医療アンカーは、２週目における治癒の初期の回復において３倍以上増加された。プッシュイン値のこの３倍増の値は、同じ動物モデルの８週目でも得られた。換言すると、ＵＶ線処理され酸によりエッチングされたインプラントで得られたプッシュイン値は、ＵＶ線未処理で酸によるエッチングがされたインプラントの８週目と同等であり、すなわちＵＶ線処理された表面は４倍の早さで骨－インプラント一体化を達成したことを示している。ＵＶ促進されたチタンは、軟組織にほぼ邪魔されることなく骨－チタンの直接の接触の最適なレベル（実質的に１００％）を達成可能にしている。これらのｉｎ　ｖｉｖｏでの達成は、ＵＶ線処理したチタン表面上での以下の生物学的にプロセスによる（１）タンパク質吸収の増加；（２）骨芽細胞移動の増加；（３）骨芽細胞接着の増加；（４）骨芽細胞分散の促進；（５）骨芽細胞の増殖増加；（６）骨芽細胞分化の促進。

【００３１】

これらのプロセスは、独立でも独立でなくてもよい。例えば、タンパク質吸収の増加が、タンパク質および細胞インテグリンの相互作用の促進を介して骨芽細胞接着を向上することができる。骨芽細胞増殖の増加は細胞－細胞の相互作用の増加により分化の向上を引き起こすこともできる。

【００３２】

ＵＶ線処理された表面はフィブロネクチンの吸収が増加しているため、ＲＧＤ接着インテグリンを持つ他の細胞も表面に引き寄せられる。興味深いことに、軟組織による阻害は、ＵＶ線処理されたチタンの周囲で実質的に減少していた。

【００３３】

より多くの骨をより早く形成するためには、骨芽細胞の増殖と分化の割合の逆相関の関係を克服する必要がある。これは、チタンインプラントの周囲で骨を形成する際にも該当する。例えば、機械加工された滑らかな表面に比べてミクロ－ラフニングされたチタン表面が有利であり、これは、組織－チタンの機械的な相互嵌合（ｉｎｔｅｒｌｏｃｋ）を増加するからだけでなく、骨芽細胞分化も促進し、結果的に骨形成をより早くする。しかしながら、骨質量は、機械加工された表面の周りよりも小さく、これは骨芽細胞増殖が減少しているからである。より粗化している酸によりエッチングした表面は、滑らかな機械加工された表面に比べて相対的に細胞密度および増殖活動が減少している。より粗化した表面を有する基材材料は、一般的に細胞増殖を減少させ、ここでは、細胞内の状態は、細胞サイクルのＧ１期の進行を遅らせるもしくは制限していることに関連している可能性がある。ＵＶ線処理された表面で細胞分散が促進されているということは、細胞内の状態が解消されたことをしていている可能性がある。細胞増殖は、細胞サイクルのＳ期をターゲットにするＢｒｄＵアッセイでのみ評価している。

【００３４】

細胞サイクルの様々な周期における細胞を識別するための解析と、さらにそれらの形と細胞内の状態を解析することは、骨芽細胞増殖の調整にＵＶ線処理がどのように働くかをみるために役立つ。ＡＬＰ活性および遺伝子発現が若干上がっている結果に示すように、骨芽細胞の増殖割合および骨芽細胞分化割合が上がっていることがわかる。これは、ＵＶ線処理された表面が分化を犠牲にすることなく、骨芽細胞の増殖を増加させることを可能にする。この生物学的利点は、ＵＶ線処理された表面の周囲の骨質量が約２倍に増えてい

ることを示す細胞形態計測結果でも明らかである。

【００３５】

ＵＶ線により向上された細胞の接着および増殖と骨－インプラント接着割合は、アナターゼTiO_2結晶を作るための熱処理を伴うチタンテトライソパーオキシドの堆積でも示されている。本願発明では、光誘導型生物学的効果が、酸化チタンを堆積することなく、また焼結せずにチタンバルクの表面でも得られることを明らかにした。

【００３６】

その他に見出された顕著なものとしては、２４時間のＵＶ線処理されたインプラントの骨－インプラント接触が２８％で、ＵＶ未処理に関しては１７％であるアナターゼTiO_2結晶に比べて本願発明は、骨－インプラントの接触に著しい増加が見られた。４８時間のＵＶ線処理は、本研究の２週目の初期治癒段階で、骨－インプラント接触を２．５倍に増加させた。ＵＶ線処理の強度、波長および時間、さらに使用したチタンの表面化学の違いなどが、異なる生物学的効果に影響を与えた。ｉｎ　ｖｉｖｏの研究に先立ち、機械加工されたおよび酸によりエッチングされた表面に超親水性を発生させるには、４８時間のＵＶ線処理が必要であることが確認されており、２４時間から４８時間のＵＶ線処理の間において生物学的効果が、例えば細胞接着能力など、増加した。

【００３７】

促進および向上されたタンパク質吸収および細胞接着などが表しているように、光により発生する生物学的効果は、超親水性の発生と関連しており、さらに原子炭素の割合の低下とも関連している。これらの物理化学的変化がTiO_2の光触媒現象によるものかどうかを確認するために、本研究で使用されたチタン表面を入念に調べた。３００～３５０ｎｍでの吸収バンドは、使用したチタンサンプルでも確認され、これはTiO_2半導体に典型的である。ＸＰＳスペクトラムは、$2p_{3/2}$のピークをおおよそ４５８．５ｅＶにおいて示したが、４５３．８ｅＶについては、機械加工および酸によりエッチングした表面の双方において示されなかった（図６Ｄ）；ＴｉおよびＴｉO_2の$2p_{3/2}$のピークはそれぞれ４５３．８ｅＶと４５８．５ｅＶであることが知られている。さらには、Ti^{3+}および／またはTi^{0}などの還元された種類に使われるショルダーピークは、いずれのチタンディスクにおいても低エネルギー領域では見られなかった。これらのデータは、これらの基材の表面付近は完全に酸化して化学量論的なＴｉO_2の薄い層を形成していることを示し、またＵＶ線量の増加とともに減少する炭素割合は、炭化水素の光触媒除去によるものであることを示している。さらには、機械加工された表面に比べて、酸によりエッチングされた表面で$2p_{3/2}$のピークが、やや高いエネルギーの方へシフトしているデータは、酸によりエッチングされた表面では酸化層がより厚い可能性を示している。これにより、酸によりエッチングされた表面の方がＵＶ線に対する反応の顕著な物理化学的変化に説明できる。

【００３８】

親水性のレベルではなく、炭化水素のレベルは、タンパク質吸収および細胞接着の割合と強く関係していた。この発見から、インプラント時のＴｉO_2に吸収される炭化水素の量は、骨芽細胞の初期の親和性を決定するのに重要であり、さらに結果的にはｉｎ　ｖｉｖｏでの骨の形態を識別するのを可能にし、さらに骨－インプラント一体化を決定するのに重要であると考えられる。コントロールのチタン表面ではタンパク質吸収のレベルおよび細胞接着の数は、ＵＶ線処理された表面のそれと比べて低く、培養を延長した後でも低く、これは、初期の生物学的環境に起因する著しい長期的効果を示している。現在、医療目的および研究目的で使用されているチタンインプラントは、炭化水素のコンタミが確認されている。チタン表面への有機分子の蓄積は、特にカルボニル部位を持つものは、通常の環境では避けられないと考えられる。これは、前述したように比較的低い骨－チタンの接触（４５～７５％）について説明ができる。本願発明は、骨－チタンの接触を、チタンインプラントをＵＶ線で処理することにより、１００％近くまで上げられることを示している。

【００３９】

テストされたタンパク質および骨芽細胞は負の電荷を帯びている。TiO_2表面を覆う酸素含有炭化水素が、ＵＶ線処理により取り除かれると、Ti^{4+}が露出する。これにより、タンパク質および細胞と、このような陽イオンなどの間の相互反応を促進することが出来る。炭化水素の光分解と関連するTiO_2表面の生体親和性の形成を、模式図で図６Ｍに示す。

【００４０】

失敗率を最小にし、罹患率を小さくし、手術後の機能性を最大にするために、歯科および整形外科の双方の分野において、オッセオインプラント治療に関して様々な努力が行われている。一つの問題として、リハビリテーションのためのインプラントの設置では、再生能力および代謝活動が壊れている骨という問題があり、特にこれらは、骨－チタン一体化を遅らせ、さらに妨げることになる。他の問題として、いくつかのインプラント処置におけるアクリル系骨セメントの使用は、インプラントの生体適合性および長期の予測を本質的に制限してしまうということがある。骨－セメントの合併症を避けるために、セメントフリーなインプラントを使う傾向がある。これらの疫学的、外科的、および社会的問題から、より多能的で、さらによりよい生涯の予測ができる新たなインプラント治療を開発しようとすることは十分理解できることである。本願発明に示すＵＶ線を使用したチタンの物理化学的変化から得られる最大の利点は、骨－チタン一体化の確立において４倍の速さに相当する初期治癒段階においてのインプラントの３倍の強さでの固定である。オッセオインテグレーション能力の向上が、機械加工された表面および酸によりエッチングされた表面の双方で確認されたことから、この技術は、現在可能なチタンインプラントの主なものを有する他の表面タイプにも広げて使えることが予想できる。この技術は、簡単、高効率、および低コストであることから、歯、顔面、および整形外科のインプラント治療で、すぐにそして広い範囲で使うことが出来る。

【００４１】

ここに記載するのは、インプラントに機能性を付与する方法であって（１）インプラント表面を提供する工程と、（２）該インプラント表面を処理することにより、表面に正の電荷を帯びさせるもしくは表面の正の電荷を増強する工程と、を有する。いくつかの実施形態では、該方法は、生理的条件下で正の電荷を帯びさせ、もしくは増強する。生理的条件は、ｐＨが約７であってもよい。いくつかの実施形態では、該方法は、ｐＨ７未満もしくはｐＨ７より高くても正電荷を帯びさせるもしくは増強する。

【００４２】

一実施形態について、前記インプラントはチタン表面を有する。一実施形態において、前記インプラントは、金属もしくは非金属の担体材料を有する。チタン表面は、TiO_2を有する。いくつかの実施形態において、処理された表面は、実質的に炭化水素を含まない。いくつかの実施形態において、処理された表面は、酸化チタン陽イオンを有する。

【００４３】

チタン表面における炭素の原子割合は、未処理もしくは古いチタン表面が５０％より多いのに対して、２０％未満に抑えることができる。

【００４４】

インプラント表面は、紫外線（ＵＶ線）を当てることにより処理される。ＵＶ線は、ＵＶランプを使って照射出来る。ＵＶ線は、約１０ｎｍ～約４００ｎｍの波長であってもよい。いくつかの実施形態では、ＵＶ線は、約１７０ｎｍ～約２７０ｎｍの波長でもよく、もしくは約３４０ｎｍ～約３８０ｎｍの波長であってもよい。いくつかの実施形態では、該表面は、約１７０ｎｍ～約２７０ｎｍの波長のＵＶ線と、約３４０ｎｍ～約３８０ｎｍの波長のＵＶ線を組み合わせて処理されてもよい。

【００４５】

ＵＶ線の強度は、広範囲であってよい。例えば、ＵＶ線の強度は、０．００１ｍＷ／ｃｍ^{2}と１００ｍＷ／ｃｍ^{2}の間であってもよい。いくつかの実施形態では、ＵＶ線の強度は、約０．１ｍＷ／ｃｍ^{2}もしくは約２ｍＷ／ｃｍ^{2}であってよい。

【００４６】

ＵＶ線での処理は、４８時間以内でもよく、例えば、３０秒、１分、５分、１５分、３０分、１時間、５時間、１０時間、２４時間、３６時間および４８時間などでもよい。

【００４７】

一実施形態では、該方法は、インプラント表面を処理する前にインプラント表面を加工する工程をさらに含む。インプラント表面は、物理的に加工されてもよく、または化学的に加工されてもよい。物理的加工としては、機械加工もしくはサンドブラストなどがある。化学的加工としては、酸もしくは塩基によるエッチングなどがある。酸は、硫酸であってもよい。新たに加工された表面は、正電荷を帯びていてもよい。ＵＶ線処理は、加工された表面の正電荷を増強する。

【００４８】

一実施形態では、処理された表面は、向上された割合でタンパク質および細胞を引き寄せることができる。ここで言う「向上された割合」とは、処理されたインプラント表面は、対応する未処理のインプラント表面と比較して細胞もしくはタンパク質を引き寄せる割合が高いことを言う。未処理のインプラント表面は、新たに加工された表面を含み、「古い表面」は、例えば、１日、３日、１週間、２週間、３週間、４週間など加工されてから時間経過したものをいう。向上された割合は、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％などの、対応する未処理の表面に引き寄せられるタンパク質もしくは細胞の割合より高いものをいう。

【００４９】

ここで使われているように、「向上した」とは、「改善された」や「増加」したなどと同じように使われてよい。向上したとは、数値において、より速くなった、より強化した、より高くなったという意味である。

【００５０】

タンパク質は、ウシ血清アルブミン、フラクションＶ、およびウシ血漿フィブロネクチンであってもよい。細胞は、ヒト間葉幹細胞および骨芽細胞であってもよい。タンパク質および細胞は、例えば架橋用２価陽イオンなどなしに、処理された表面に直接に接着してもよい。一実施形態では、処理された表面は、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}等を含まない。

【００５１】

処理されたインプラント表面は、インプラント部位において、組織－インプラント一体化および／または骨－インプラント一体化を向上することができる。処理された表面は、未処理のインプラント表面よりも向上した骨形成能力を有する。処理された表面は、対応する未処理の表面と比較して、組織－インプラント一体化、骨－インプラント一体化、もしくは骨形成能力を例えば、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、５００％などの割合で向上することができる。

【００５２】

処理されたインプラント表面は、以下が可能である：未処理の表面と比較して、タンパク質吸収の増加、骨芽細胞移動の増加、骨芽細胞接着の増加、骨芽細胞分散の促進、骨芽細胞増殖の増加、および骨芽細胞分化の促進。各活性は、例えば、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、５００％などの割合で向上することができる。

【００５３】

ここに記載するのは、前述した方法により機能性が付与された表面を有するインプラントである。一実施形態では、医療用インプラントは、チタン表面を有する。チタン表面は、正電荷を帯びたTiO_2を有する。一実施形態では、チタン表面は、実質的に炭化水素を含まない。

【００５４】

インプラントは、さらに担体材料を有する。一実施形態では、該担体材料は、金属である。一実施形態では、該担体材料は、非金属である。

【００５５】

インプラント表面は、タンパク質もしくは細胞を向上された割合で引き寄せることができる。ここで言う「向上された割合」とは、正電荷を帯びていない、もしくは正電荷が弱い表面に比べてインプラント表面が細胞もしくはタンパク質を引き寄せる割合が高いことを言う。向上された割合は、対応する正電荷を帯びていない、もしくは正電荷が弱い表面に比べて５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、５００％などの割合で高いことをいう。

【００５６】

該インプラント表面は、ウシ血清アルブミン、フラクションＶ、およびウシ血漿フィブロネクチンなどのタンパク質を引き寄せることが出来る。インプラント表面は、ヒト間葉幹細胞および骨芽細胞などの細胞を引き寄せることができる。

【００５７】

インプラント表面は、組織－インプラント一体化および／または骨－インプラント一体化を可能にする。インプラント表面は、正電荷を帯びていないもしくは正電荷が弱い表面に比べて５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、５００％などの割合で、骨－インプラント一体化、組織－インプラント一体化、もしくは骨形成活性を向上することができる。

【００５８】

インプラント表面は、以下が可能である：正電荷を帯びていないもしくは正電荷が弱い表面と比較して、タンパク質吸収の増加、骨芽細胞移動の増加、骨芽細胞接着の増加、骨芽細胞分散の促進、骨芽細胞増殖の増加、および骨芽細胞分化の促進。各活性は、例えば、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、５００％などの割合で向上することができる。

【００５９】

ここに記載するのは、向上した生体活性、タンパク質および生物学的細胞の吸着を示す新規なチタン表面である。チタン表面は、正電荷を帯びており、新しい層のチタンにＵＶ線処理するおよび／または表面をＵＶ線で処理することで形成される。新しいチタン層の照射には、新たに表面を加工する、例えば機械加工、エッチング、サンドブラストおよびそれらの組み合わせなどを含み、さらに古い表面を再加工することも含む。本願発明は、歯科および整形外科的なインプラントにおいてすぐにおよび広い範囲で使用でき、さらには簡単で、高効果的、および低コストなことから、骨再生治療および骨工学の分野にも使用できる。

【００６０】

チタンのＵＶ線処理は、骨伝導性能力を向上することがわかっている。チタン基材上の骨芽細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏの様々な行動および機能におけるチタンへのＵＶ線処理の効果と、ｉｎ　ｖｉｖｏでの骨－チタン一体化の可能性および骨伝導性の向上の原因であるＵＶ線処理チタン表面の要因について検討した。

【００６１】

ここで記載するのは、チタンの骨伝導性能力を向上する方法と、該方法を使って、骨伝導性能力が向上したチタン表面についてである。機械加工されたチタンサンプルおよび酸によりエッチングされたチタンサンプルを４８時間以内の種々の時間でＵＶ線により処理した。どちらの表面についても、ＵＶ線処理は、ラットの骨髄由来の骨芽細胞の接着、分散、増殖、および分化の割合を増加させており、さらにタンパク質吸収能力も３倍増加していた。ラットモデルのｉｎ　ｖｉｖｏの細胞形態計測では、ＵＶ線処理されたインプラントでは、軟組織に邪魔されることなく広い範囲で骨形成が起きている明かになっており

、これは、４週目の治癒段階において１００％近くまで骨－インプラント接触を最大にしている。

【００６２】

インプラントの生体工学テストは、ＵＶ線処理がインプラントの固定を４倍早めたことを明かにした。タンパク質吸収および細胞接着の割合は、TiO_2上における炭素のＵＶ線量対応原子割合と強く関連していたが、炭化水素の状態とは関連していなかった。ＵＶ線でのチタンの前処理は、TiO_2表面から炭化水素を取り除くＵＶ触媒進行性除去と関連して、骨伝導性能力を実質的に向上しており、これは、より速いおよびより完全な骨－インプラント一体化を可能にするチタンの光による機能性付与を示唆している。

【００６３】

チタン表面のＵＶ線処理は、チタン表面の骨伝導性能力を著しく増加させた。新しい骨形成は、実質的に軟組織の妨害を受けずに、ＵＶ線処理されたインプラントにおいて広範囲で起き、これは４週目の治癒段階で１００％近くまで骨－インプラント接触を最大にしているが、反対に未処理のインプラントでは、骨－インプラントの接触は、約５０％だった。ＵＶ線処理は、骨－チタン一体化の強度を２週目の治癒段階において３倍強めた。ＵＶ線処理された表面は、骨芽細胞の接着、分散、増殖および分化の向上と、さらにタンパク質吸収の増加に示されるように、骨芽細胞親和的環境を作った。タンパク質吸収および細胞接着の割合は、TiO_2上における炭素のＵＶ線量対応原子割合と強く関連していたが、炭化水素の状態とは関連していなかった。このチタン生体活性のＵＶ介在型の向上は、機械加工されたインプラント表面および酸によりエッチングされた表面の異なる形態の表面でも示された。したがって、ここでは、より速くまた完璧な骨－チタン一体化を可能にするチタンの光による機能性付与の方法を提供する。

【００６４】

医療用インプラント

医療用インプラントは、金属インプラントでも非金属インプラントでもよい。いくつかの実施形態では、医療用インプラントは、チタンインプラントなどの金属インプラントであり、例えば、欠損歯と置換する（歯科インプラント）ものや、または病気、骨折もしくは移植した骨などに使われるチタンインプラントである。他の金属インプラントの例として、チタン合金インプラント、クロム－コバルト合金インプラント、プラチナおよびプラチナ合金インプラント、ニッケルおよびニッケル合金インプラント、ステンレス鋼インプラント、ジルコニウム、クロム－コバルト合金、金もしくは金合金インプラントおよびアルミもしくはアルミ合金インプラントを含むが、これらに限定されるわけではない。

【００６５】

ここに記載する金属インプラントは、チタンインプラントおよび非チタンインプラントを含む。チタンインプラントは、チタンおよびチタンを含む合金から作られた歯もしくは骨の代替物を含む。チタン骨代替物としては、例えば、膝関節および股関節補綴物、大腿骨頸部の代替物、背骨の代替物および修復、首骨の代替物および修復、顎骨の修復、固定、および増強、移植した骨の固定、およびその他の四肢の補綴物などを含む。非チタン金属インプラントは、金、プラチナ、タンタラム、ニオビウム、ニッケル、鉄、クロム、チタン、チタン合金、酸化チタン、コバルト、ジルコニウム、酸化ジルコニウム、マグネシウム、アルミニウム、パラジウム、および例えばステンレス鋼やそれらの組み合わせなどのこれらの合金などから形成される歯もしくは骨のインプラントを含む。他の合金の例として、チタン－ニッケル合金、ニチノール、クロム－コバルト合金、ステンレス鋼もしくはこれらの組み合わせ等がある。いくつかの実施形態では、金属インプラントは、上述の金属を特定的に除外できる。

【００６６】

非金属インプラントは、例えば、セラミックインプラント、リン酸カルシウムもしくはポリマーインプラントを含む。使用可能なポリマーインプラントは、たとえば生分解性ポリマーインプラントなどの生体適合インプラントのいずれであってもよい。セラミックインプラントとしては、例えば、バイオガラスおよび二酸化ケイ素ガラスなどを含む。リン

酸カルシウムガラスは、例えば、ヒドロキシアパタイト、トリカルシウムホスフェート（ＴＣＰ）などを含む。ポリマーインプラントの例としては、例えばポリ乳酸・グリコール酸（ＰＬＧＡ）、ポリメタクリレートおよびポリアクリレートなどのポリアクリル酸塩、およびポリ乳酸（ＰＬＡ）インプラントなどを含む。

【００６７】

いくつかの実施形態では、該インプラントは、金属インプラントおよび骨－セメント材料を有する。骨セメント材料は、当該技術分野において知られた骨セメント材料であればなんでもよい。骨セメント材料のいくつかの例としては、ポリアクリル酸塩、またはポリメチルメタクリレート（ＰＭＭＡ）／メチルメタクリレート（ＭＭＡ）などのポリメタクリル酸系材料、ＰＬＡもしくはＰＬＧＡなどのポリエステル系材料、バイオガラス、セラミックス、リン酸カルシウム系材料、カルシウム系材料、およびこれらの組み合わせを含むが、これに限定されるわけではない。いくつかの実施形態では、医療用インプラントは、以下に記載するいずれのポリマーであってもよい。いくつかの実施形態では、医療用インプラントの前述の材料を特定的に除外してもよい。

【００６８】

「骨伝導性能力」もしくは「骨伝導性」とは、骨形成能力のことを言う。また、インプラントにより医療用インプラントに対する向上された骨一体化能力のことも言う。骨一体化能力とは、医療用インプラントが生体の骨に一体化していく能力を言う。組織一体化能力とは、医療用インプラントが生体組織に一体化していく能力を言う。

【００６９】

ＵＶ線照射

ここで言う「ＵＶ線を照射する」とは、「光活性化」、「光放射」、「光照射」、「ＵＶ線活性化」、「ＵＶ線放射」、もしくは「ＵＶ線照射」と同じように使うことができる。４００ｎｍから１０ｎｍの波長を持つ放射線をＵＶ線と一般的に呼ぶ。

【００７０】

医療用インプラントは、滅菌の有無にかかわらず放射してもよい。通常の技術常識を有する者であれば、ＵＶ放射中に医療用インプラントを滅菌できる。

【００７１】

本願発明の一概念において、医療用インプラントに放射するための施設もしくは装置が提供された。一実施形態では、該施設もしくは装置は、医療用インプラントを置くチャンバーと、高エネルギー線の光源と、および放射をオンもしくはオフにするスイッチと、を含む。該施設もしくは装置は、さらにタイマーをふくんでもよい。いくつかの実施形態では、該施設もしくは装置は、医療用インプラントもしくはＵＶ線源を回転もしくはスピンさせてインプラントに完全に放射するメカニズムをさらに含む。もしくは、医療用インプラントを置くチャンバーは、医療用インプラントに異なる角度、例えば３６０度のどの角度でもよい、から放射できるようにする反射面を有していてもよい。いくつかの実施形態では、該施設もしくは装置は、向上された骨一体化能力を保存するメカニズム、例えば、光の複数照射、放射透過性のインプラントパッケージ、パッキング、および船舶を含んでもよい。

【００７２】

医療用途

ここに記載する医療用インプラントは、哺乳類の被験対象に医療用インプラントを移植したことによる医学的症状を処理、予防、改善、もしくは軽減することに使うことができる。哺乳類の被験対象は、ヒトまたは、犬、猫、馬、牝牛、牡牛、もしくはサルなどの脊椎動物であってもよい。

【００７３】

ここで提供するインプラントを使って処理もしくは予防出来る医学的症状の典型例は、欠損歯または、大腿骨頚部骨折、欠損歯などの骨関連症状、大腿骨頚部骨折、首の骨の骨折、手首関節骨折、脊椎骨折／障害もしくは椎間板ヘルニア、膝関節リュウマチなどの関節の骨折および退行性変化、例えばガン、怪我、全身性代謝異常、感染症もしくは老化お

よびこれらの組み合わせになどの障害または症状より引き起こされる骨およびその他の組織の異常もしくは欠損などの整形外科的固定の必要があるものや骨関連症状などを含む。

【００７４】

いくつかの実施形態では、ここで提供する医療用インプラントは、欠損歯または、大腿骨頚部骨折、欠損歯などの骨関連症状、大腿骨頚部骨折、首の骨の骨折、手首関節骨折、脊椎骨折／障害もしくは椎間板ヘルニア、膝関節リュウマチなどの関節の骨折および退行性変化、例えばガン、怪我、全身性代謝異常、感染症、老化および四肢切断などの障害または症状とこれらの組み合わせより引き起こされる骨およびその他の組織の異常もしくは欠損などの整形外科的固定の必要があるものや骨関連症状などの医学的症状の処理、予防、改善、軽減するのに使うことができる。

【００７５】

本願発明の特定の実施形態について説明してきたが、本願発明の技術的範囲を超えない範囲において、種々の変更および変形が可能である。したがって、添付の請求の範囲は、本願発明の範囲および精神の範囲において、これらの変更および変形を含むものである。

【実施例】

【００７６】

チタンサンプル、表面解析およびＵＶ線処理

円柱型インプラント（直径１ｍｍ、長さ２ｍｍ）とディスク（直径２０ｍｍ、厚さ１．５ｍｍ）について、商業的に純粋なチタンで２種類の表面を用意した。一つは、ろくろで回転し機械加工された表面を有し、もう一方は、６７％H_2SO_4を１２０℃で７５秒かけ酸によりエッチングした。さらに、機械加工された表面とサンドブラストされた表面を用意した。すべての表面を分光光度計（ＵＶ－２２００Ａ、島津社製、東京、日本）、およびＸ線回析（ＸＲＤ）（ＸＲＤ－６１００、島津社製、東京、日本）を使ってそれぞれ光学的特性および結晶構造を調べた。チタン表面の親水性状態は、１μｌの水滴の接触角度を接触角計（ＣＡ－Ｘ、協和界面科学、東京、日本）を使って調べた。全ての作業は、２０℃、湿度４６％に管理された環境下のクラス１０クリーンルームで行なわれた。

【００７７】

チタン表面の化学組成は、光電子分光（ＥＳＣＡ）により評価した。ＥＳＣＡは、高減圧化（$6x10^{-7}$Ｐａ）Ｘ線光電子分光（ＸＰＳ）（ＥＳＣＡ３２００、島津社製、東京、日本）を使って行なわれた。最大で４８時間の種々の時間ＵＶ線で処理されたチタンディスクおよび円柱型インプラントは、表面の特性および生物学的可能性について未処理のコントロールと比較した。ＵＶ線処理は、１５Ｗの殺菌ランプ（Ｔｏｓｈｉｂａ、東京、日本）；強度；ｃａ．０．１ｍＷ／cm^2（ＵＶＡ：λ＝３６０±２０ｎｍ）および２ｍＷ／cm^2（ＵＶＣ：λ＝２５０±２０ｎｍ）を使って行なわれた。

【００７８】

ＵＶＡおよびＵＶＣを個別に使ってチタン表面の活性能力もテストした。

【００７９】

ＵＶ線処理は、例えば減圧もしくは不活性ガスの注入などのいかなる雰囲気設定を行なわずに通常の空気状態において行なえる。チタンもしくはチタン含有金属をＵＶ線処理すると、チタン原子の価電子バンドの電子を伝道バンドへと蜂起させ、これによりチタンの表面層に陽性の穴を形成し、そして表面に正電荷を帯びさせる。この電子の蜂起を起こすためには、３．２ｅＶのＵＶ線エネルギーが必要であり、これは３６５ｎｍの波長に相当し、ＵＶＡと呼ばれる。反対に、炭化水素の直接的な分解は、ＵＶＣにより行なわれ、このピーク波長は２６０ｎｍである。この炭素除去は、チタン表面にＵＶＡが通過するのを助長し、正電荷の形成の効率を上げ、結果的に形成された正電荷を露出するのを早める。

【００８０】

いかなる理論に限定されることなく、ＵＶＡ（約３４０ｎｍ～約３８０ｎｍ）およびＵＶＣ（約１７０ｎｍ～約２７０ｎｍ）の組み合わせが使われた。

【００８１】

タンパク質吸収の計測

ウシ血清アルブミン、フラクションＶ（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ、ロックフォード、イリノイ州）およびウシ血漿フィブロネクチン（シグマ－アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州）がモデルタンパク質として使われた。３００ｍｌのタンパク質溶液（１ｍｇ／ｍｌ　タンパク質／生理食塩水）をＴｉディスクの上にピペットを使って広げた。３７℃の滅菌加湿された条件において複数の異なる時間培養した後（例えば、２、６、２４もしくは７２時間の培養）、非接着タンパク質を除去し、０．９％塩化ナトリウムを含む生理食塩水を使って２回洗浄した。最初の培養液（２００μｌ）と除去された溶液を２００μｌのマイクロビシンコニン酸（ｍｉｃｒｏｂｉｃｉｎｃｈｏｎｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ、ロックフォード、イリノイ州）と混ぜ、３７℃で６０分培養した。５６２ｎｍでマイクロプレートリーダーを使ってタンパク質の定量化を行なった。

【００８２】

ヒト間葉幹細胞

ヒト間葉幹細胞（ＭＳＣｓ）（Ｐｏｉｅｔｉｃｓ細胞、Ｃａｍｂｒｅｘ　Ｂｉｏ　Ｓｃｉｅｎｃｅ社、ウォーカーズビル、イーストルサーフォード、ニュージャージー州）は、ＭＳＣ基礎培地および成長サプリメント（ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔｓ）から成るＭＳＣ成長培地で培養した。成長サプリメントは、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、Ｌ－グルタミンおよびペニシリン／ストレプトマイシンを含む。細胞は、加湿雰囲気、９５％空気、５％CO_2、３７℃において培養した。８０％の細胞飽和度の最終パッセージにおいて、細胞は、０．２５％トリプシン－１ｍＭＥＤＴＡ－４Ｎａを使って剥離し、Ｔｉディスクの上に3×10^4セル／cm^2の密度で植種した。培地は、３日ごとに新しくした。

【００８３】

骨芽細胞培養

Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ系ラットの大腿骨から分離した骨髄細胞を、１５％のウシ胎仔血清、５０μｇ／ｍｌのアスコルビン酸、１０ｍＭのＮａ－β－グリセロリン酸、10^{-8}Ｍのデキサメタゾン、および抗生物質－抗カビ性溶液を添加したアルファー－ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ’ｓ培地に入れた。細胞は、加湿された９５％空気、５％CO_2、において３７℃で培養された。８０％細胞飽和度において、０．２５％トリプシン－１ｍＭＥＤＴＡ－４Ｎａを使って細胞を剥離し、細胞密度3×10^4セル／cm^2において、機械加工もしくは酸によりエッチングされたチタンディスクの上にＵＶ線未処理およびＵＶ線処理を施して乗せた。培養培地は、３日ごとに新しくした。

【００８４】

移動アッセイ

ヒトＭＳＣｓのチタン表面への移動は、デュアルチャンバー移動アッセイ（３４５－０２４Ｋ、Ｔｒｅｖｉｇｅｎ、ゲチスバーグ、メリーランド州）を使って試験した。細胞は、上段のチャンバーに入れた。Ｔｉディスクは、下段のチャンバーの底に置いた。３７℃において３時間培養した後８μｍの直径を有するポリエステル膜を通過して下段のチャンバーへ移動した細胞の割合をカルセイン－ＡＭにより染色した後プレートリーダーで分析した。

【００８５】

細胞接着、密度、増殖アッセイ

細胞の最初の接着は、３時間および２４時間培養後にチタン表面に接着した細胞の数を測定して評価した。さらに、増殖した細胞は、培養２日目および５日目に細胞密度として定量化した。これらの定量化は、ＷＳＴ－１系の吸光光度分析機（ＷＳＴ－１、ロッシュアプライドサイエンス社製、マンハイム、ドイツ）を使って行われた。培地ウェルは、１００μｌテトラゾリウム塩（ＷＳＴ－１）試薬と共に４時間３７℃で培養した。ホルマザン産物は、４２０ｎｍでＥＬＩＳＡリーダーを使って計測した。さらに、細胞はカルセイン－ＡＭで染色し、蛍光顕微鏡のもとで観察して細胞密度を確認した。

【００８６】

細胞の増殖活動は、ＤＮＡ合成時におけるＢｒｄＵの取り込み量により計測した。培養

２日目に、１００μｌの１００ｍＭＢｒｄＵ溶液（ロッシュアプライドサイエンス社製、マンハイム、ドイツ）を培地ウェルに添加し、１０時間培養した。細胞をトリプトシン処理し、ＤＮＡ変性後、培地は、ペルオキシターゼを共役した抗ＢｒｄＵで９０分間培養され、発色のためにテトラメチルベンジンと反応させた。ＥＬＩＳＡリーダー（Ｓｙｎｅｒｇｙ　ＨＴ、ＢｉｏＴｅｋ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，ウィノースキ、バーモント州）を使って、３７０ｎｍでの吸収を計測した。

【００８７】

細胞形態および形態計測

共焦点レーザー走査顕微鏡を使って、ヒトＭＳＣｓの形態および細胞骨格構造を確かめた。培養してから3時間後、細胞は、１０％ホルマリンに固定され、さらに蛍光色素、ローダミンファロイジン（アクチンフィラメントは赤、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅ、ＯＲ）を使って染色した。培地は、マウス抗パキシリンモノクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）で抗体染色し、ＦＩＴＣ共役抗マウス二次抗体（Ａｂｃａｍ、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）を添加した。細胞の面積、周縁、およびフェレ径は、画像分析器により定量化して解析した（ＩｍａｇｅＪ、ＮＩＨ、ベセスダ、メリーランド州）。

【００８８】

3時間の培養後、骨芽細胞を１０％ホルマリンで固定し、蛍光色素、ＤＡＰＩ（細胞核が青、ヴェクター、カリフォルニア州）とローダミンファロイジン（アクチンフィラメントは赤、ＭｉｃｒｏＰｒｏｂｅ、ＯＲ）で染色した。共焦点レーザー走査顕微鏡を使って、細胞の形態および細胞骨格構造を確かめた。細胞の面積、周縁、およびフェレ径は、画像分析器により定量化して解析した（ＩｍａｇｅＪ、ＮＩＨ、ベセスダ、メリーランド州）。

【００８９】

アルカリホスホターゼ（ＡＬＰ）活性

培養した骨芽細胞のＡＬＰ活性を培地面積および吸光光度分析アッセイにより確かめた。培養された骨芽細胞は、ハンクス溶液により２回洗浄され、０．９ｍＭナフトールＡＳ－ＭＸリン酸塩と１．８ｍＭファストレッドＴＲを含んだ１２０ｍＭトリスバッファー（ｐＨ８．４）で３７℃で３０分間培養した。染色された画像におけるＡＬＰ陽性領域は、画像分析ソフトウェア（Ｉｍａｇｅ　Ｐｒｏ－ｐｌｕｓ、Ｍｅｄｉａ　Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ、シルバースプリングス、メリーランド州、アメリカ合衆国）を使い、［（染色面積／全培養器面積）ｘ１００］（％）として計算された。吸光光度分析のために、培地は、ｄｄH_2Oで洗浄し、２５０μｌのｐ－ニトロフェニルリン酸塩（ＬａｂＡｓｓａｙ　ＡＴＰ、和光純薬工業株式会社、リッチモンド、ヴァージニア州）を加えて３ＴＣで１５分培養した。ＡＬＰ活性は、酵素反応を介して放出されたニトロフェノールの量により評価し、ＥＬＩＳＡリーダー（Ｓｙｎｅｒｇｙ　ＨＴ、ＢｉｏＴｅｋ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，ウィノースキ、バーモント州）を使って４０５ｎｍの波長で計測した。

【００９０】

ミネラリゼーションアッセイ

培養した骨芽細胞のミネラリゼーション能力は、ミネラル化された塊領域を吸光光度分析アッセイを使い確かめた。骨芽細胞のミネラル化した塊は、フォンコッサ染色により可視化した。培養物は、５０％エタノール／１８％ホルムアルデヒド溶液で３０分固定した。培養物は、５％硝酸銀と共にＵＶ線下で３０分培養した。培養物は、ｄｄH_2Oで２回洗浄し、５％チオ硫酸ナトリウム溶液で２～５培養した。ミネラル化された塊領域は、画像分析ソフトウェア（Ｉｍａｇｅ　Ｐｒｏ－ｐｌｕｓ、Ｍｅｄｉａ　Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ、シルバースプリングス、メリーランド州、アメリカ合衆国）を使い、［（染色面積／全培養器面積）ｘ１００］（％）として計算された。カルシウム堆積の吸光光度検出には、培養物をＰＢＳで洗浄し、１ｍｌの０．５ＭＨＣｌ溶液で緩やかに振りながら一晩培養した。アルカリ性の溶媒（カルシウム結合と緩衝試薬、シグマ、セントルイス、ミズーリ州）の中で、該溶液をオルト－クレゾールフタレインコンプレキソンと混ぜ、赤いカル

シウム－クレゾールフタレインコンプレキソン複合体を形成した。発色強度は、ＥＬＩＳＡリーダー（Ｓｙｎｅｒｇｙ　ＨＴ、ＢｉｏＴｅｋ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，ウィノースキ、バーモント州）により５７５ｎｍでの吸収を計測した。

【００９１】

遺伝子発現解析

遺伝子発現は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）を使って半定量化した。トリゾール（インビトロジェン、カールスバッド、カルフォルニア州）と精製コラム（ＲＮｅａｓｙ、キアゲン、バレンシア、カルフォルニア州）を使って、トータルＲＮＡを培養物の中から抽出した。ＤＮＡｓｅＩ処理の後、０．５μｇのトータルＲＮＡの逆転写をオリゴ（ｄＴ）プライマー（クロンテック、カールスバッド、カルフォルニア州）の存在下で、ＭＭＬＶ逆転写酵素（クロンテック、カールスバッド、カルフォルニア州）を使って行った。ＰＣＲ反応は、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（ＥＸ　Ｔａｑ、タカラバイオ、マディソン、ワシントン州）を使用して行い、プライマーデザインおよび前述したＰＣＲ条件において、コラーゲンＩ、オステオポンチンおよびオステオカルシンｍＲＮＡを検出した。ＰＣＲ産物は、エチレンブロマイド染色した１．５％アガロースゲルで可視化した。バンドの強度は、ＵＶ線の下で定量化され、ＧＡＰＤＨｍＲＮＡに対して標準化した。

【００９２】

手術

８週目のオスのＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットを１～２％イソフルラン吸引により麻酔した。足を剃り、１０％プロビドン－ヨウ素溶液でこすり洗った後、大腿骨の皮膚の切開および筋肉の切断を介して遠位領域を注意深く露出した。大腿骨の遠位領域として、インプラントの設置に平らな表面を選択した。大腿骨の遠位先端から９ｍｍのところに、０．８ｍｍラウンドバーを使ってドリルし、リーマー（＃ＩＳＯ　０９０および１００）を使って拡張してインプラント部位を用意した。滅菌された等張塩溶液による大量の灌水は、冷却と洗浄に使われた。大腿骨の各側に一つの円柱型のインプラントを入れた。そして、手術部位を、層状に閉じた。筋肉と皮膚は、再吸収可能な糸により別々に縫い合わされた。カルフォルニア大学ロサンゼルス校（ＵＣＬＡ）の動物実験委員会の委員長によりこのプロトコルは認証されており、すべての実験は、アメリカ合衆国農務省の動物実験ガイドラインに従って行われた。

【００９３】

インプラントの生体力学的プッシュインテスト

インプラントの生体力学的プッシュインテストは、骨－インプラント一体化の生体力学的強度を評価するために使われた。円柱型インプラントを含んだ大腿骨を採取し、インプラントレベルの上面とともに自家重合樹脂に埋め込んだ。インプラントがインプラント側面および底部からの骨皮質サポートを受けてないことを確かめるためにＭｉｃｒｏＣＴを使用した。２０００Ｎのロードセルとプッシングロッド（直径＝０．８ｍｍ）を備えた試験機（インストロン　５５４４　電気機械的万能試験機、インストロン、カントン、マサチューセッツ州）を使い、先端速度１ｍｍ／分でインプラントに垂直で下向きに負荷をかけた。プッシュインテストは、荷重変位曲線のピークを計測することに決定された。

【００９４】

細胞の準備

酸によりエッチングされたインプラントを有する大腿骨を採取し、１０％緩衝ホルマリンに４℃で２週間固定した。試験片は、段階的に上がるアルコールによる洗浄で脱水され、光硬化形エポキシ樹脂（テクノビット７２００ＶＬＣ、ヘレウスクルツァー、ウェルヘイム、ドイツ）に脱カルシウム処理なしで埋めこまれた。埋め込まれた試験片は、インプラントの先端部から０．５ｍｍのところで、円柱型インプラントの長軸に対して垂直にのこ引きされた。試験片は、３０μｍの厚さに研削システム（Ｅｘａｋｔ　Ａｐｐａｒａｔｅｂａｕ、Ｎｏｒｄｅｒｓｔｅｄｔ、ドイツ）を使って研削された。研削片は、ゴールドナートリクロム染色により染色し、光学顕微鏡で観察した。

【００９５】

細胞形態計測

４０倍率のレンズと４倍ズームのコンピューターのスクリーンは画像を使って、コンピューターによる細胞形態計測をした（Ｉｍａｇｅ　Ｐｒｏ－ｐｌｕｓ、Ｍｅｄｉａ　Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ、シルバースプリングス、メリーランド州）。細胞構造を詳細に特定するために、最高で４００倍率の電子顕微鏡を使用した。インプラント関連骨と非インプラント関連骨の区別についてはすでに述べた。この方法に従い、インプラントを囲む組織を以下に記載のように２つのゾーンに分けた：（ｉ）インプラント表面から５０μｍ以内の近位領域および周縁部（ｉｉ）インプラント表面から５０μｍから２００μｍ以内の遠位領域および周縁部。以下の変数について解析した：

骨－インプラント接触率（％）＝（骨－インプラント接触の長さの合計）／（インプラントの円周）ｘ１００、ここでの骨－インプラント接触は、軟組織に邪魔されることなくインプラント表面から２０μｍ以内の領域にある骨組織との境界面を言う。

近位領域での骨量（％）＝（近位領域での骨面積）／（近位領域の面積）ｘ１００

遠位領域での骨量（％）＝（遠位領域での骨面積）／（遠位領域の面積）ｘ１００

軟組織の干渉（％）＝（骨とインプラントの間に干渉する軟組織の長さの合計）／（インプラントを囲む骨の長さの合計）ｘ１００

【００９６】

統計解析

１０個のセルサンプルが必要な細胞形態計測以外は、３つのサンプルを細胞培養観察に使った。培養時間と異なる年齢のチタン表面のＵＶ線処理の有りと無しでの効果をＴｗｏ－ｗａｙ　ＡＮＯＶＡを行なって確認した。必要であれば、ｐｏｓｔ　ｈｏｃ　Ｂｏｎｆｅｒｏｎｉ試験を行い、新しい加工表面、４週目の表面、ＵＶ線処理された４週目の表面の差を調べてもよく、ｐ値＜０．０５であれば統計的に有意な差があると考えられる。データが、１時点のみであったら、Ｏｏｎｅ　ｗａｙ　ＡＮＯＶＡを使い、試験グループの差を確かめた。未処理のコントロールとＵＶ線処理されたグループの差を調べるためにＴ－テストも行なわれた。アルブミン吸収と細胞接着、炭素の原子割合とH_2Oの接触角度での相互関係を調べ、最小二乗平均近似により回帰曲線式をもとめた。

【００９７】

結果

１．新しく加工されたチタン表面およびＵＶ線処理されたチタン表面における促進および向上されたタンパク質吸収

Ｔｗｏ－ｗａｙ　ＡＮＯＶＡは、試験グループ間においてアルブミン吸収は、著しく差が出たことを示した（ｐ値＜０．０１；図１Ａ）：新たに酸によるエッチングで加工された表面（加工直後）、４週目の表面（つまり、４週間保管）、ＵＶ線処理した４週目の表面。２時間の培養後、４週目のチタン表面では、培養したアルブミンのうち、おおよそ１０％のアルブミンだけが吸収されたが、新たに加工された表面では、おおよそ６０％のアルブミンが吸収された（ｐ値＜０．０１；Ｂｏｎｆｅｒｏｎｉ法）。アルブミン吸収の量は、７２時間の培養後でも４週目の表面では、新たに加工された表面と比較して４０％以下だった（ｐ値＜０．０１）。ＵＶ線処理した４週目の表面は、培養２時間後および２４時間後でも新たに加工した表面と同等のアルブミン吸収量を示し、７２時間後では、より優れた水準を示した（ｐ値＜０．０５）。

【００９８】

２．新しく加工されたチタン表面とＵＶ線処理したチタン表面における向上された幹細胞の移動および接着

８μｍの孔を通過して移動したヒト間葉幹細胞（ＭＳＣｓ）の数は、培養条件により著しい差が出た（ｐ値＜０．０１、１－ｗａｙ　ＡＮＯＶＡ；図１Ｂ）。３時間の培養後の４週目の表面に移動した細胞の数は、新しく加工した表面で観察された数の５０％であり、ＵＶ線処理された４週目の表面で観察された数の２５％だった（ｐ値＜０．０１）。ＵＶ線処理された４週目の表面では、新しく加工した表面の２倍の細胞移動を示した（ｐ値＜０．０１）。

【００９９】
Ｔｉ表面に接着したヒトＭＳＣｓ細胞の数は、以下の順番に多くなっていた：ＵＶ線処理した４週目の表面＞新しく加工された表面＞４週目の表面（ｐ値＜０．０１；２－ｗａｙ　ＡＮＯＶＡ；図１Ｃ）。４週目の表面に接着した細胞の数は、新しく加工した表面の５０％以下だった。ＵＶ線処理した４週目の表面は、２４時間後で、新しく加工した表面よりも実質的に高い細胞接着を示した（１２０％以上）（ｐ値＜０．０１）。
【０１００】
３．新しく加工した表面とＵＶ線処理したＴｉ表面の加速した細胞分散および細胞骨格の発達
アクチンフィラメント染色（ローダミンファロイジン）したヒトＭＳＣｓの３時間の培養後の低倍率の画像では、ＵＶ線処理した４週目の表面で細胞の数が一番多く、４週目の表面で一番少なかったことを示しており、これは細胞接着アッセイの結果と同じである（図２Ａ）。アクチン染色した高倍率の画像では、新しく加工した表面とＵＶ線処理した４週目の表面の細胞では、複数の方向に伸びる突起が明らかに大きく、それに対して４週目の表面の細胞は、丸いままで細胞骨格の発達も少しであった。新しく加工された表面およびＵＶ線処理された４週目の表面の細胞では、細胞接着および癒着を調節するタンパク質であるパキシリンが細胞の形に沿って強く局地的にあることが観察された。特に、ＵＶ線処理した４週目の表面の細胞では、濃い細胞原形質の陽性染色が見られた。
【０１０１】
細胞形態計測の評価の面積、周縁、およびフェレ直径は、３つのＴｉ基材においてこれらのパラメーターについ著しく有意な差を示した（ＡＮＯＶＡ、ｐ値＜０．０１；図２Ｂ）。これらのパラメーターは、新しく加工された表面およびＵＶ線処理した表面では、４週目の表面と比べて５～８倍大きかった（Ｂｏｎｆｅｒｏｎｉ法；ｐ値＜０．０１）。新しく加工された表面とＵＶ線処理した表面とでは、目立った差はなかった。
【０１０２】
４．新しく加工した表面とＵＶ線処理したＴｉ表面での向上したｉｎ　ｖｉｖｏの骨－チタン一体化
ｉｎ　ｖｉｖｏでのインプラント固定は、耐負荷装置としてのチタンインプラントの医療用能力としてもっとも重要な要因である。チタンインプラントのｉｎ　ｖｉｖｏでの安定性は、ラットモデルでの生体力学的プッシュインテストで調べた。円柱型インプラントをラットの大腿骨に入れた。ラットｉｎ　ｖｉｖｏモデルでのプッシュインテストで計測した骨－チタン一体化の強度は、４週目の表面に比べて、新しく加工された表面とＵＶ線処理した表面とでは、２週目の初期の治癒段階で、それぞれ２．８倍および３．１倍であった。
【０１０３】
図３は、生体力学的プッシュインテストにより評価された、４週目の表面と比べて、新しく加工された表面とＵＶ線処理した表面とで向上した骨－チタン一体化を示している。
【０１０４】
５．新しく加工されたチタンとＵＶ線処理したチタンの表面における正電荷を帯びた表面でのたんぱく質の引寄せ
図４Ａは、培地のｐＨの条件が異なる種々のチタン表面に対するアルブミン吸収を示す。ｐＨ７の未処理の４週目のチタン表面での吸収は、１０～１５％と限られていた。通常手に入るチタンの表面およびアルブミンは、生体的ｐＨでは、双方ともに負の電荷を帯びており、これはチタン‐アルブミンの相互作用を阻害するため、この結果は予想できた。４週目の表面が、アルブミン吸収の前に、$CaCl_2$などの２価の陽イオンで処理されたときのみ、アルブミンの吸収は増加した。これは、一価の陰イオンであるチタン表面に堆積した二価の陽イオンが、陰性のアルブミン分子とチタン表面の間で架橋の役割を果たすことから説明ができる。
【０１０５】
反対に、前述したように、新しく加工した表面およびＵＶ線処理した表面は、未処理の

表面と比較して、高い吸収率を示しており、ｐＨ７においておれぞれ＞３５％もしくは＞５５％であった（ｐ値＜０．０１；未処理のグループは、図４Ａ）。しかしながら、ｐＨ３で用意した培地では、これらの表面でのたんぱく質吸収は、未処理の４週目と同程度に低かった。これは、アルブミンの等電位ｐＨが、４．７～４．９であるからであり、アルブミンは、中性‐塩基性転移をおこし、ｐＨ３のように低い値では、正の電荷を帯びる。一方で、アルブミンは、ｐＨ７のような高ｐＨ値では、中性‐酸性転移を起こし、負の電荷を帯びる。これらの結果は、新しく加工した表面およびＵＶ線処理した表面は、正の電荷を帯びていることを示しており、さらにｐＨの値によって異なるタンパク質を引寄せる特性があることを示している。さらには、ＮａＣｌおよびＣａＣｌ$_2$溶液などの一価の陰イオンでこれらの表面を処理し、これらの表面の正電荷を中和すると、未処理の４週目の表面の基準線と比較して、これらのアルブミン吸収は、増加しなかったことから、これらの表面の正電荷特性が確認された。

【０１０６】

新しく加工した表面およびＵＶ線処理した表面は、これらのイオン処理の後、正の電荷を維持することができ、さらにｐＨ３でも表面炭素を低レベルに維持することができる。これらの結果は、表面の正電荷は、タンパク質吸収、超親水性の効果および炭素レベルの無効化などのチタン表面の生体活性を主に調節することを示している。

【０１０７】

６．新しく加工したチタンおよびＵＶ線処理したチタンの正電荷を帯びた表面の細胞の吸着

図４Ｂは、図４Ａと同様にして用意された種々のチタン表面に接着したヒト間葉幹細胞（ＭＳＣｓ）の数を示す。

【０１０８】

この実験は、生体的ｐＨ７で行われた。チタン表面と細胞の反発力が双方ともに負の電荷を帯びているため４週目の表面に接着する細胞の数は限られていると予想された。反対に、４週目の表面と比較して、新しく加工された表面とＵＶ線処理した表面では、接着した細胞は多いことが予想された。新しく加工された表面とＵＶ線処理した表面に接着した細胞の数は、Cl^-などの陰イオンで処理すると、未処理の４週目の表面の基準線まで低下した。すでに公知のことを考慮すると、生物学的細胞は、負の電荷を帯びており、新しく加工された表面とＵＶ線で処理された表面は、正の電荷を帯びていることから、細胞‐チタン一体化が向上した。

【０１０９】

新しく加工したチタン表面およびＵＶ線処理したチタン表面は、これらのイオン処理の後、負の電荷を維持することができ、さらにｐＨ３でも表面炭素を低レベルに維持することができる。これらの結果は、表面の正電荷は、タンパク質吸収、超親水性の効果および炭素レベルの無効化などのチタン表面の生体活性を主に調節することを示している。

【０１１０】

チタン表面へのタンパク質および細胞の接着のメカニズムは、図に記載している（図５）。左側の図（古いチタン）は、チタン表面の周りで起きているメカニズムを示している。該メカニズムでは、負のタンパク質を吸収し、そしてそれに続いてタンパク質のＲＧＤ配列を介して細胞を吸収するためには、細胞接着は、Ca^{2+}などの二価の陽イオンに架橋されなければならない。また、Na^+およびK^+などの一価の陽イオンの競合結合は、Ca^{2+}結合のためのチタン表面の陰イオン部位をブロックしてしまう。結果的に、チタン表面に結合できる細胞の数が減ってしまう。

【０１１１】

右側の図（新しい、もしくはＵＶ線処理されたチタン）は、細胞反発性から細胞親和性に変化したチタン表面である本願テスト結果に基づく新規なメカニズムを表す。新しく加工した表面とＵＶ線処理した表面の静電気的正電荷により、二価の陽イオンの助けなしに、負の電荷を帯びたタンパク質と細胞はチタン表面に直接に接着し、結果として表面に接着する細胞の数が増える。

【０１１２】
７．新しく加工したチタン表面およびＵＶ線処理したチタン表面のタンパク質の一般化および細胞親和性
酸によりエッチングされたチタン表面に加えて、機械加工された表面およびサンドブラストされたチタン表面を試験し、新しく加工された表面およびＵＶ線処理した表面の考えられる有利な点を検証した（図６Ａ）。４週目の表面は、新しく用意された表面と比較して２０～４５％のアルブミン吸収を示した。４週目のチタン表面のＵＶ線処理は、機械加工により新しく加工された表面と同程度の吸収率まで増加し、または、サンドブラストにより新しく加工された表面より高かった。
【０１１３】
フィブロネクチン吸収の割合においても同様な傾向がみられた（図６Ｂ）。吸収率は、すべての表面の形態をテストし、ＵＶ線処理した４週目のＴｉ、新しく加工されたＴｉ、および４週目のＴｉの順に高かった（ｐ値＜０．０１）。
【０１１４】
骨‐チタン一体化のｉｎ　ｖｉｖｏでの達成を、機械加工されたチタンを使ってテストした。ＵＶ線処理した機械加工された表面では、骨‐チタン一体化の強度が、２週目および４週目の治癒段階において著しく増加した（ｐ値＜０．０５；図６Ｃ）。
【０１１５】
これらの結果は、新しく加工チタン表面およびＵＶ線処理した表面の生物学的利点は、異なる表面加工にも共通であり、さらに異なるタンパク質においても効果があることを示している。
【０１１６】
８．チタンの光誘導型超親水性
チタンディスクへの４８時間のＵＶ線処理の後、H_2O滴の接触角度は、機械加工および酸によるエッチングされた表面でそれぞれ５３．５°と８８．４°だったものが、０°まで下がった。これは、疎水性の表面から超親水性の表面へと変化したことを示唆している（図７Ａ）。超親水性は、酸によりエッチングした表面ではさらに早く形成された。酸によりエッチングした表面では、１時間のＵＶ線処理が必要であったが、機械加工された表面では４８時間必要であった（図７Ａ）。４８時間のＵＶ線照射後、超親水性状態は、酸によりエッチングした表面では、より長く持続し、さらにH_2O滴の接触角度が０°のまま暗下で７日間持続した（図７Ｂ）。反対に、機械加工した表面では、超親水性は、すぐに消え始めた。
【０１１７】
９．チタンのＵＶ線により向上したタンパク質吸収
双方の表面タイプ（機械加工された表面および酸によりエッチングした表面）において、ＵＶ線処理は、アルブミンおよびフィブロネクチンの吸収を促進した（図７Ｃおよび７Ｄ）。例えば、アルブミン吸収率は、２時間の培養後＜１０％であったが、ＵＶ線処理した後は、４８時間のＵＶ線処理後のチタン表面では、５０～６０％に増加した（ｐ値＜０．０１）（図７Ｃ）。どちらのタンパク質についても、機械加工された表面よりも酸によりエッチングされた表面のほうが、ＵＶ線処理の効果が大きかった（ｐ値＜０．０１）。未処理の表面でのこれらのタンパク質の量は、２４時間の培養後であってもＵＶ線処理した表面よりも少なく、ＵＶ線処理がタンパク質の吸収をほぼ１００％で促進および増加させることを示している（図７ＣおよびＤ）。
【０１１８】
１０．ＵＶ線処理したチタンにおける向上した骨芽細胞接着
３時間の培養後、機械加工された表面と酸によりエッチングされた表面の双方において、ＵＶ線処理した表面で接着した細胞の数は、未処理のコントロール表面と比較して、３倍から５倍多かった（図７Ｅ）。ＵＶ線に誘導された細胞接着の効果は、２４時間経ってもあった。
【０１１９】

１１．ＵＶ線量に依存する生物学的効果
ＵＶ線により促進されたタンパク質の吸収および骨芽細胞の接着を確認するために、ＵＶ線量に依存するタンパク質の吸収と骨芽細胞の接着をテストした。酸によりエッチングしたチタン表面を最高４８時間までの種々の異なる時間ＵＶ線により処理した。ＵＶ線量は、タンパク質および細胞接着に異なる効果を与えた（図７Ｆおよび７Ｇ）。アルブミン吸収率の増加はすばやく起き、その後１時間のＵＶ線処理で飽和した。細胞接着率は、４８時間のＵＶ線処理とともに著しく増加し続けた（ｐ値＜０．０１）。

【０１２０】
１２．ＵＶ線処理したチタンでの骨芽細胞の向上した増殖および促進された分散
機械加工されたコントロール表面での骨芽細胞の分散と細胞骨格の発達は、機械加工から３時間後のトレースに沿って等方的だった。これらの細胞では、細胞突起はあまり発達しなかった。反対に、ＵＶ線処理した機械加工された表面上の細胞は、側足状の細胞突起を複数の方角に発達させた（図８Ａの画像）。ＵＶ線処理した酸によりエッチングされた表面は、未処理の酸によりエッチングされた表面と比べて、細胞が明らかに大きく、また細胞突起がより長く伸びていた。細胞の面積、周縁、およびフェレー直径の細胞形態計測の評価では、ＵＶ線処理したチタン表面にこれらのパラメーターがより優れた結果を示した（図８Ａのヒストグラム）。

【０１２１】
細胞密度は、培養２日後および５日後において、ＵＶ線未処理の機械加工された表面および酸によりエッチングされた表面と比べて、ＵＶ線処理した表面で恒常的に大きく（図８Ｂのヒストグラム）、これはカルセイン染色後の細胞の蛍光画像の結果と一致している（図８Ｂの上図）。２日目の培養において細胞のＢｒｄＵの取り込み量は、ＵＶ線処理した表面でより多く、これは、骨芽細胞増殖の増加を示している（図８Ｃ）。

【０１２２】
１３．ＵＶ線処理したチタン上での向上した骨芽細胞の表現型
１０日目において、コントロール表面と比較して、ＵＶ線処理した機械加工された表面および酸によりエッチングされた表面では、ＡＬＰ陽性領域は２倍以上であった（図９Ａの上図と下段ヒストグラム）。加えて、細胞の数により光学的に定量化され標準化されたＡＬＰ活性は、ＵＶ線処理した表面おいて、著しく高かった（図９Ａの右下ヒストグラム）。

【０１２３】
培養１４日目および２８日目において、フォンコッサ染色により検知されたミネラル化された塊の領域も、ＵＶ線処理されたチタン表面においてより大きかった；これは、酸によりエッチングされた表面でより顕著であり、１４日目で１２０％の増加を示した（図９Ｂの上段画像および左下ヒストグラム）。カルシウムの全堆積量は、フォンコッサ染色の結果と一致した（図９Ｂの右下ヒストグラム）。ＲＴ－ＰＣＲ解析は、全培養期間を通して、コラーゲンＩ、オステオポンチン、およびオステオカルチンの発現に関し、ＵＶ線処理のした培養としなかった培養で同じ様な結果を出しており、もしくはある時点では、ＵＶ線処理した表面で＜３０％と発現量が増加していた（図９ＣおよびＤ）。

【０１２４】
１４．ＵＶ線により向上したｉｎ　ｖｉｖｏのインプラント固定
プッシュインテストにより計測された骨－チタン一体化の強度は、２週目の初期治癒段階において、ＵＶ線処理した機械加工された表面と酸によりエッチングされた表面とでそれぞれ１．８倍と３．１倍であった（図１０）。後期治癒段階（４週目）において、ＵＶ線処理したインプラントのオッセオインテグレーションの強度は、ＵＶ線未処理のインプラントに対して、機械加工された表面および酸によりエッチングされた表面でそれぞれ５０％および６０％優れていた。

【０１２５】
１５．ＵＶ線処理したインプラントの周りの骨形態
２週目において、コントロールとＵＶ線処理した酸によりエッチングしたインプラント

の双方で、インプラント表面から比較的離れたところに織られたような未熟な骨組織の形成が見られた（図１１Ａおよび１１Ｂ）。インプラント表面の隣接する領域を観察したところ、二つのインプラントでは骨の形態に違いがあった。骨形成は、ＵＶ線処理したインプラントの周りでより著しく起きていた（図１１Ｅおよび１１Ｆ）。他の顕著な違いとして、軟組織による妨害の範囲がある。未処理のコントロールインプラントの周りの骨組織は、骨とインプラントの間に軟組織があり（図１１Ｉ）、これは、ＵＶ線処理したインプラント周りではあまり観察されなかった（図１１Ｊ）。４週目未処理のコントロールのいくつかの部位において、骨とインプラントの間に繊維性の結合組織による阻害が確認されたが（図１１Ｃ、Ｇ、Ｋ）、反対に、ＵＶ線処理したインプラントは、骨が直接堆積していた（図１１Ｄ、１１Ｈ、１１Ｌ）。

【０１２６】

骨の細胞形態では、ＵＶ線処理した酸によりエッチングされたインプラントの骨－インプラントの接触割合は、常にコントロールのそれよりも大きかった（２週目で２．５倍、４週目で１．９倍）（図）１１Ｍ）。骨－インプラント接触領域の割合は、ＵＶ線処理した表面で９８．２％であった。インプラント表面の近位領域での骨量は、ＵＶ線処理したインプラントは、常にコントロールインプラントより大きかった（図１１Ｎ）。反対に遠位領域においては、ＵＶ線による骨量の違いはなかったことから、ＵＶ線により向上する骨形成は、インプラント表面に隣接部位に特異的であることを示している（図１１Ｏ）。ＵＶ線処理により軟組織による阻害の著しい減少が確認された（図１１Ｐ）。ＵＶ線処理した表面は、４週目において、骨－インプラント境界面での軟組織による阻害を完全にブロックしており、未処理の表面の骨の＞２０％では、２週目よ４週目においてチタンの境界面で軟組織による阻害があった。

【０１２７】

１６．チタン上の炭素原子と骨芽細胞およびタンパク質の吸着との逆相関関係

ＸＲＤ解析では、機械加工された表面および酸によりエッチングされた表面の双方において、２５°および２８°のピークを示さなかったことが分かり、これらのピークは、アナターゼおよびルチル型のTiO_2結晶に典型的に見られるものである。これらの表面では、Ｔｉ金属に由来する回析パターンしか示さなかった。しかしながら、双方のチタンディスクのＵＶ－ＶＩＳ吸収スペクトルでは、３００～３５０ｎｍでの吸収バンドを示した（図１２Ｂ）。酸によりエッチングした表面の吸収端部は、機械加工された表面よりも若干長い波長内にあった。

【０１２８】

Ｘ線光電子分光（ＸＰＳ）スペクトルは、Ｔｉ２ｐ、ＯＩｓおよびＣｌｓのピークを双方のチタン表面で示したものの、その他のピークはなかったことから、これは、これらの元素以外の分純物の汚染がないこと示している（図１２Ｃ）Ｔｉ２ｐの細長いスペクトラルは、低エネルギー領域でのショルダーピークなしで$2p_{3/2}$の明かなピークを約４５８．５ｅＶで示している（図１２Ｄ）。酸によりエッチングされた表面の$2p_{3/2}$のピークは、機械加工された表面と比較して、若干高くなっている。

【０１２９】

酸によりエッチングした表面を化学分析し、その向上した生物学的活性の要因を特定した。ＸＰＳスペクトルは、ＣｌｓピークがＵＶ線処理の時間と共に減少するが、反対にＴｉ２ＰおよびＯｌｓピークは増加することを明らかにしている（図１２Ｅ、１２Ｆ、１２Ｇ）。特に、酸素含有炭化水素物に帰因する約２８８ｅＶでのショルダーピークは、TiO_2表面で強く吸収され消滅した。炭素の原子割合は、４８時間のＵＶ線処理において＞５０％から＜２０％へと減少し続けた（図１２Ｈ）。最小二乗平均近似は、高い決定係数と共に（R^2＝０．９３０）炭素の原子割合とチタン表面へのアルブミン吸収量との間に負の直線的な相互関係を示した；チタン表面に炭素が少なければ少ないほど、表面にアルブミンが多く吸収された（図１２Ｉ）。骨芽細胞の接着率は、異なる逆行パターンを示し；炭素の除去に伴い指数関数的に増加した（図１２Ｊ）。接触角度は、アルブミン吸収の割合もしくは細胞接着の割合とは特に相互関係はなかった（図１２Ｋおよび１２Ｌ）。

【０１３０】
１７．表面に正電荷を帯びさせ、細胞を引き寄せるためのＵＶＡおよびＵＶＣの組み合わせの効果的な使い方
図１３に示すように、ＵＶＡ単独もしくはＵＶＣ単独の使用と比較して、ＵＶＡおよびＵＶＣの光源を組み合わせると細胞接着が、最も増加した。
【０１３１】
参考文献

1. Campion, E. W., Jette, A. M., Cleary, P. D. & Harris, B. A. Hip fracture: a prospective study of hospital course, complications, and costs. J Gen Intern Med 2, 78-82 (1987).

2. Guccione, A. A., Fagerson, T. L. & Anderson, J. J. Regaining functional independence in the acute care setting following hip fracture. Phys Ther 76, 818-26 (1996).

3. Bhandari, M. et al. Predictors of in-hospital mortality following operative management of hip fractures. Int J Surg Investig 1, 319-26 (1999).

4. Melton, L. J., 3rd et al. Fractures attributable to osteoporosis: report from the National Osteoporosis Foundation. J Bone Miner Res 12, 16-23 (1997).

5. Espehaug, B., Furnes, O., Havelin, L. I., Engesaeter, L. B. & Vollset, S. E. The type of cement and failure of total hip replacements. J Bone Joint Surg Br 84, 832-8 (2002).

6. Hudson, J. I. et al. Eight-year outcome associated with clinical options in the management of femoral neck fractures. Clin Orthop Relat Res, 59-66 (1998).

7. Lu-Yao, G. L., Keller, R. B., Littenberg, B. & Wennberg, J. E. Outcomes after displaced fractures of the femoral neck. A meta-analysis of one hundred and six published reports. J Bone Joint Surg Am 76, 15-25 (1994).

8. Tidermark, J., Ponzer, S., Svensson, O., Soderqvist, A. & Tornkvist, H. Internal fixation compared with total hip replacement for displaced femoral neck fractures in the elderly. A randomised, controlled trial. J Bone Joint Surg Br 85, 380-8 (2003).

9. Ravikumar, K. J. & Marsh, G. Internal fixation versus hemiarthroplasty versus total hip arthroplasty for displaced subcapital fractures of femur--13 year results of a prospective randomised study. Injury 31, 793-7 (2000).

10. Tidermark, J., Zethraeus, N., Svensson, O., Tornkvist, H. & Ponzer, S. Quality of life related to fracture displacement among elderly patients with femoral neck fractures treated with internal fixation. 2002. J Orthop Trauma 17, S17-21 (2003).

11. LeGeros, R. Z. & Craig, R. G. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. J Bone Miner Res 8 Suppl 2, S583-96 (1993).

12. Puleo, D. A. & Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials 20, 2311-21 (1999).

13. Pilliar, R. M. Cementless implant fixation--toward improved reliability. Orthop Clin North Am 36, 113-9 (2005).

14. Ozawa, S. et al. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. Bone 30, 137-43 (2002).

15. Yamazaki, M. et al. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 87, 411-8 (1999).

16. Takeshita, F., Murai, K., Ayukawa, Y. & Suetsugu, T. Effects of aging on titanium implants inserted into the tibiae of female rats using light microscopy, SEM, and image processing. J Biomed Mater Res 34, 1-8 (1997).

17. Zhang, H., Lewis, C. G., Aronow, M. S. & Gronowicz, G. A. The effects of patient age on human osteoblasts' response to Ti-6Al-4V implants in vitro. J Orthop Res 22, 30-8 (2004).

18. Geertman, M. E. et al. Two-center clinical trial of implant-retained mandibular overdentures versus complete dentures-chewing ability. Community Dent Oral Epidemiol 24, 79-84 (1996).

19. Carlsson, G. E. & Lindquist, L. W. Ten-year longitudinal study of masticatory function in edentulous patients treated with fixed complete dentures on osseointegrated implants. Int J Prosthodont 7, 448-53 (1994).

20. Pera, P., Bassi, F., Schierano, G., Appendino, P. & Preti, G. Implant anchored complete mandibular denture: evaluation of masticatory efficiency, oral function and degree of satisfaction. J Oral Rehabil 25, 462-7 (1998).

21. van Kampen, F. M., van der Bilt, A., Cune, M. S., Fontijn-Tekamp, F. A. & Bosman, F. Masticatory function with implant-supported overdentures. J Dent Res 83, 708-11 (2004).

22. Nowjack-Raymer, R. E. & Sheiham, A. Association of edentulism and diet and nutrition in US adults. J Dent Res 82, 123-6 (2003).

23. Heydecke, G., McFarland, D. H., Feine, J. S. & Lund, J. P. Speech with maxillary implant prostheses: ratings of articulation. J Dent Res 83, 236-40 (2004).

24. Mclas, F., Marcenes, W. & Wright, P. S. Oral health impact on daily performance in patients with implant-stabilized overdentures and patients with conventional complete dentures. Int J Oral Maxillofac Implants 16, 700-12 (2001).

25. van Steenberghe, D., Jacobs, R., Desnyder, M., Maffei, G. & Quirynen, M. The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. Clin Oral Implants Res 13, 617-22 (2002).

26. Nevins, M. L., Karimbux, N. Y., Weber, H. P., Giannobile, W. V. & Fiorellini, J. P. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. Int J Oral Maxillofac Implants 13, 620-9 (1998).

27. Doundoulakis, J. H., Eckert, S. E., Lindquist, C. C. & Jeffcoat, M. K. The implant-supported overdenture as an alternative to the complete mandibular denture. J Am Dent Assoc 134, 1455-8 (2003).

28. Annual industry report. US markets for dental implants: Executive summary. Implant Dent 12, 108-111 (2003).

29. Ellingsen, J. E. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO2. Biomaterials 12, 593-6 (1991).

30. Klinger, A., Steinberg, D., Kohavi, D. & Sela, M. N. Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro. J Biomed Mater Res 36, 387-92 (1997).

31. Ogawa, T. et al. Biomechanical evaluation of osseous implants having different surface topographies in rats. J Dent Res 79, 1857-63 (2000).

32. Ray NF, Chan JK, Thamer M, Melton LJ, 3rd. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. J Bone Miner Res 1997;12:24-35.

33. Jones LC, Hungerford DS. Cement disease. Clin Orthop Relat Res 1987:192-206.

34. Espehaug B, Fumes O, Havelin LI, Engesaeter LB, Vollset SE. The type ofcement and failure of total hip replacements. J Bone Joint Surg Br 2002;84:832-8.

35. Bhandari M, Koo H, Saunders L, Shaughnessy SG, Dunlop RB, Schemitsch EH. Predictors of in-hospital mortality following operative management of hip fractures. Int J Surg Investig 1999;1:319-26.

36. Lamade WR, Friedl W, Schmid B, Meeder PJ. Bone cement implantation syndrome. A prospective randomised trial for use ofantihistamine blockade. Arch Orthop Trauma Surg 1995;114:335-9.

37. Takeshita F, Murai K, Ayukawa Y, Suetsugu T. Effects of aging on titanium implants inserted into the tibiae of female rats using light microscopy, SEM, and image processing. J Biomed Mater Res 1997;34:1-8.

38. Nowjack-Raymer RE, Sheiham A. Association of edentulism and diet and nutrition in US adults. J Dent Res 2003;82:123-6.

39. Weinlaender M, Kenney EB, Lekovic V, Beumer J, 3rd, Moy PK, Lewis S. Histomorphometry of bone apposition around three types of endosseous dental implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1992;7:491-6.

40. Berglundh T, Abrahamsson I, Albouy JP, Lindhe J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. Clin Oral Implants Res 2007; 18:147-52.

41. Ogawa T, Nishimura I. Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extra cellular matrix genes. Int J Oral Maxillofac Implants 2003;18:200-10.

42. De Maeztu MA, Braceras I, Alava JJ, 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 2008;37:441-7.

43. Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. Int J Oral Maxillofac Implants 2005;20:569-77.

44. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Failure patterns of four osseointegrated oral implant systems. J Mater Sci Mater Med 1997;8:843-7.

45. Chuang SK, Wei LJ, Douglass CW, Dodson TB. Risk factors for dental implant failure: a strategy for the analysis of clustered failure-time observations. J Dent Res 2002;81:572-7.

46. Wang R, Hashimoto K, Fujishima A. Light-induced amphiphilic surfaces. Nature 1997; 388:431-32.

47. Keleher J, Bashant J, Heldt N, Johnson L, Li YZ. Photo-catalytic preparation of silver-coated TiO2 particles for antibacterial applications. World J Microb Biot 2002;18:133-39.

48. Nakashima T, Ohko Y, Kubota Y, Fujishima A. Photocatalytic decomposition of estrogens in aquatic environment by reciprocating immersion of TiO2-modified polytetrafluoroethylene mesh sheets. J Photoch Photobio A 2003;160:115-20.

49. Saruwatari L, Aita H, Butz F, Nakamura HK, Ouyang J, Yang Y; et al. Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro-and ultrastructure. J Bone Miner Res 2005;20:2002-16.

50. Ogawa T, Ozawa S, Shih JH, Ryu KH, Sukotjo C, Yang JM, et al. Biomechanical evaluation of osseous implants having different surface topographies in rats. J Dent Res 2000;79:1857-63.

51. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocr Rev 1993;14:424-42.

52. Siddhanti SR, Quarles LD. Molecular to pharmacologic control of osteoblast proliferation and differentiation. J Cell Biochem 1994; 55:310-20.

53. Alborzi A, Mac K, Glackin CA, Murray SS, Zernik JH. Endochondral and intramembranous fetal bone development: osteoblastic cell proliferation, and expression of alkaline phosphatase, m-twist, and histone H4. J Craniofac Genet Dev Biol 1996;16:94-106.

54. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype invitro:reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and

differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol 1990;143:420-30.

55. Ogawa T, Sukotjo C, Nishimura I. Modulated bone matrix-related gene expression is associated with differences in interfacial strength of different implant surface roughness. J Prosthodont 2002;11:241-7.

56. Takeuchi K, Saruwatari L, Nakamura HK, Yang JM, Ogawa T. Enhanced intrinsic biomechanical properties of osteoblastic mineralized tissue on roughened titanium surface. J Biomed Mater Res A 2005 ;72A:296-305.

57. Bachle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. Clin Oral Implants Res 2004;15:683-92.

58. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. J Biomed Mater Res A 2005;74:49-58.

59. Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochran DL, et al. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. Calcif Tissue Int 2002;71:519-29.

60. Washburn NR, Yamada KM, Simon CG, Jr., Kennedy SB, Amis EJ. High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity:influence of nanometer-scale roughness on proliferation. Biomaterials 2004;25:1215-24.

61. Zapata P, Su J, Garcia Al, Meredith JC. Quantitative high-throughput screening of osteoblast attachment, spreading, and proliferation on demixed polymer blend micropatterns. Biomacromolecules 2007;8:1907-17.

62. Huang S, Chen CS, Ingber DE. Control of cyclin Dl, p27(Kipl), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. Mol Biol Cell 1998;9:3179-93.

63. Sawase T, Jimbo R, Baba K, Shibata Y, Ikeda T, Atsuta M. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. Clin Oral Implan Res 2008;19:491-96.

64. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer Al, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. J Dent Res 2004;83:529-33.

65. Massaro C, Rotolo P, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M, et al. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. J Mater Sci Mater Med 2002;13:535-48.

66. Takeuchi M, Sakamoto K, Martra G, Coluccia S, Anpo M. Mechanism of photoinduced superhydrophilicity on the TiO_2 photocatalyst surface. J Phys Chem B 2005;109:15422-28.

67. Kikuchi L, Park JY, Victor C, Davies JE. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. Biomaterials 2005;26:5285-95.

68. Uetsuka H, Onishi H, Henderson MA, White JM. Photoinduced redox reaction coupled with limited electron mobility at metal oxide surface. J Phys Chem B 2004;108:10621-24.

69. Henderson MA, White JM, Uetsuka H, Onishi H. Selectivity changes during organic photooxidation on TiO_2: Role of 0-2 pressure and organic coverage. J Catal 2006;238:153-64.

70. Kojima N, Ozawa S, Miyata Y, Hasegawa H, Tanaka Y, Ogawa T. High-throughput gene expression analysis in bone healing around titanium implants by DNA microarray. Clin Oral Implants Res 2008;19:173-81.

71. Brunski JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. Intl Oral Maxillofac Implants 2000;15:15-46.

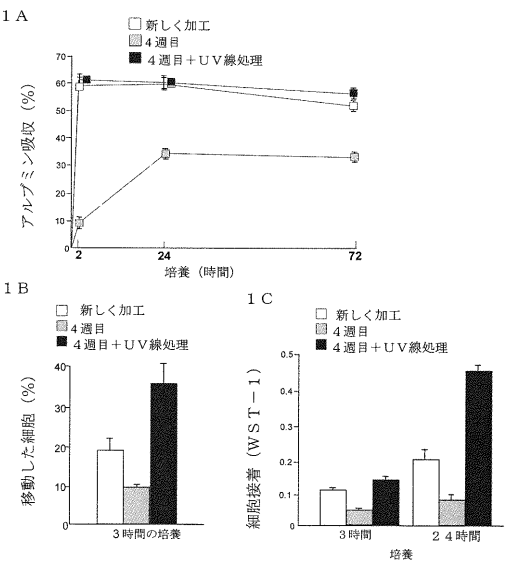
72. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. Int J Oral Maxillofac Implants 2000;15:675-90.

73. Ogawa T, Nishimura I. Genes differentially expressed in titanium implant healing. J Dent Res 2006;85:566-70.

74. Shalabi MM, Gortemaker A, Van't HofMA, Jansen JA, Creugers NH. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. J Dent Res 2006;85:496-500.

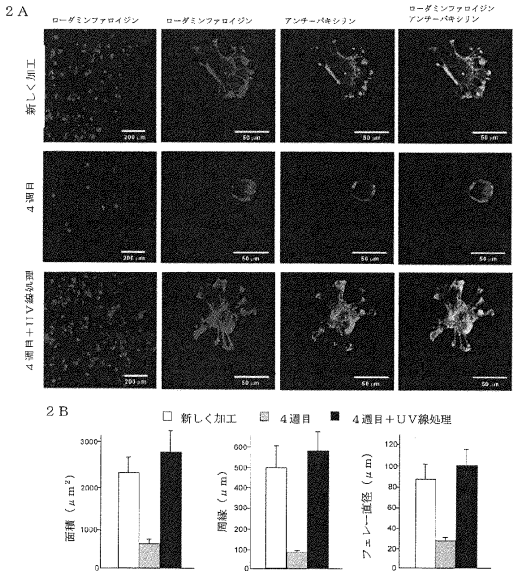
【図１】

図１



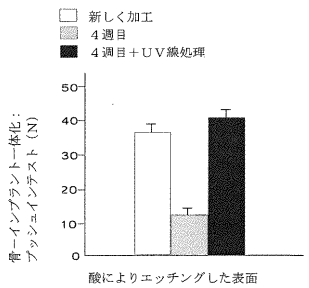
【図２】

図２



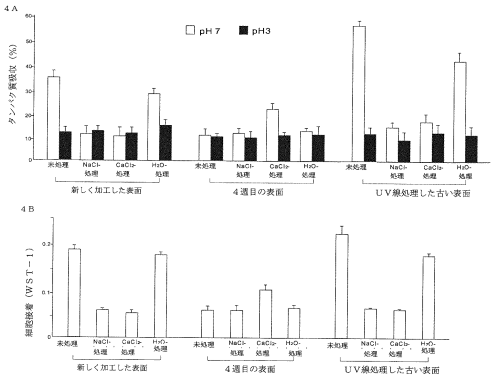
【図３】

図３



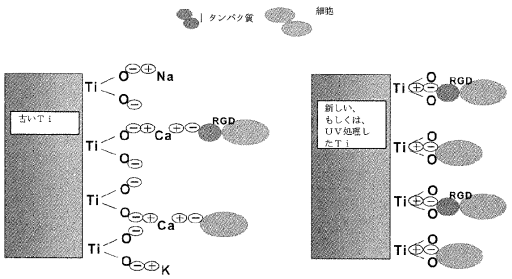
【図４】

図４



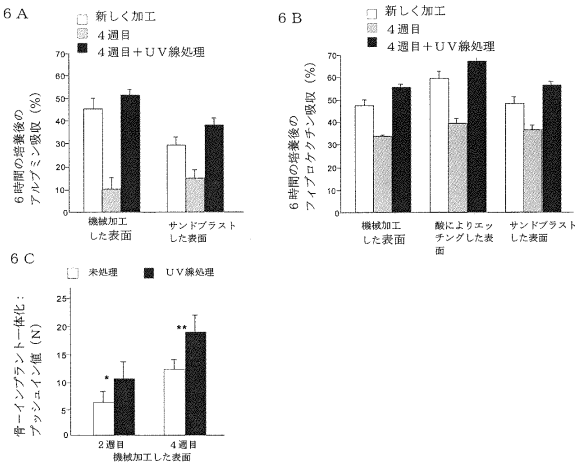
【図５】

図５



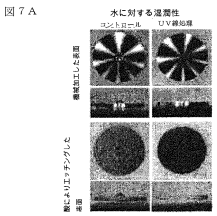
【図６】

図６



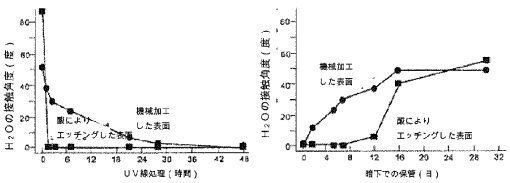
【図７Ａ】

図７Ａ



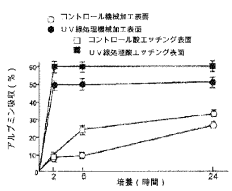
【図７Ｂ】

図７Ｂ



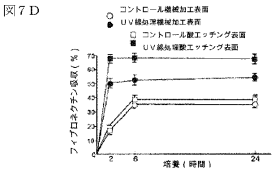
【図７Ｃ】

図７Ｃ



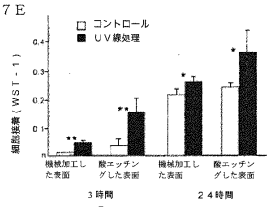
【図７Ｄ】

図７Ｄ



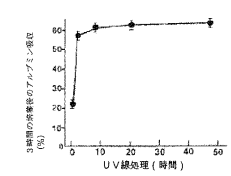
【図７Ｅ】

図７Ｅ



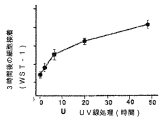
【図７Ｆ】

図７Ｆ



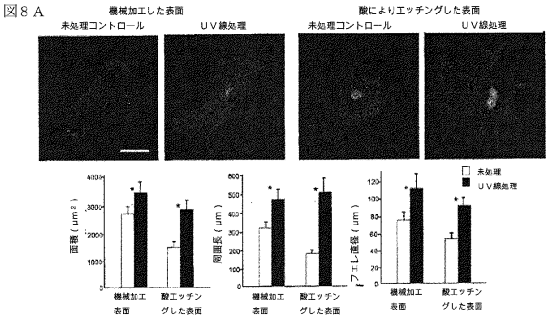
【図７Ｇ】

図７Ｇ



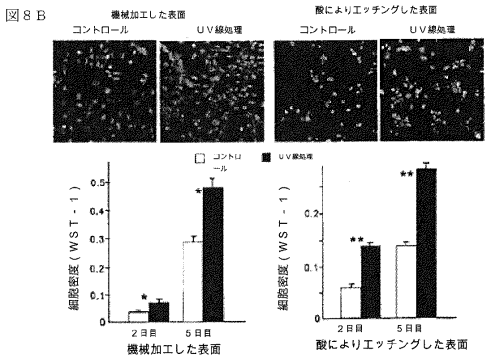
【図８Ａ】

図８Ａ



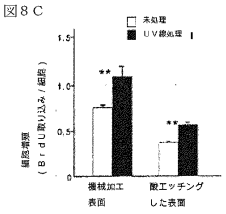
【図８Ｂ】

図８Ｂ



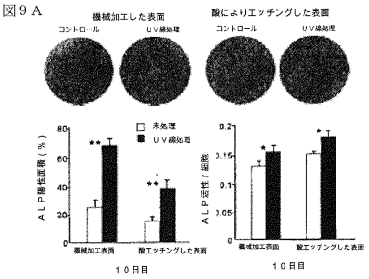
【図８Ｃ】

図８Ｃ



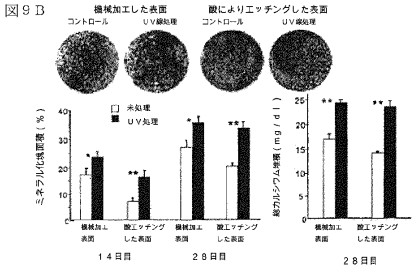
【図９Ａ】

図９Ａ



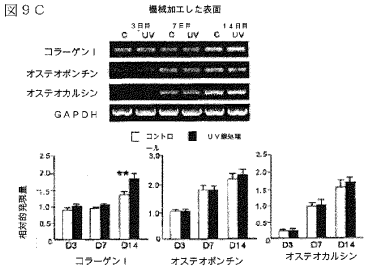
【図９Ｂ】

図９Ｂ



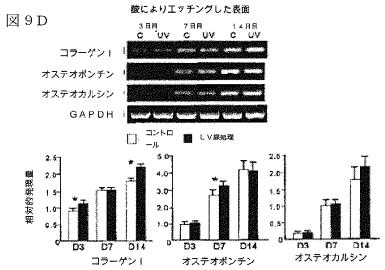
【図９Ｃ】

図９Ｃ



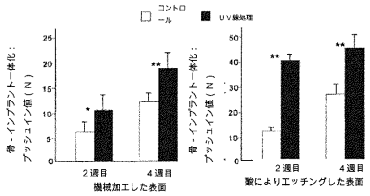
【図９Ｄ】

図９Ｄ



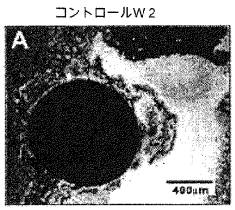
【図１０】

図１０



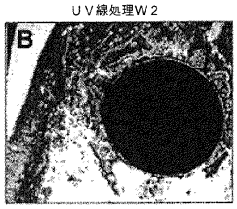
【図１１Ａ】

図１１Ａ



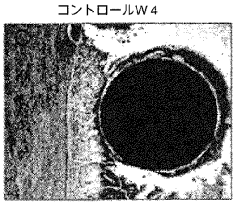
【図１１Ｂ】

図１１Ｂ



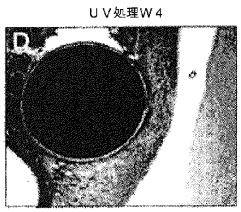
【図１１Ｃ】

図１１Ｃ



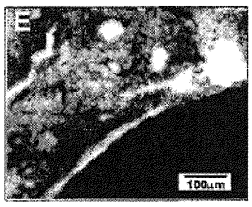
【図１１Ｄ】

図１１Ｄ



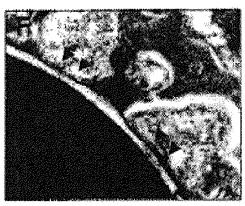
【図１１Ｅ】

図１１Ｅ



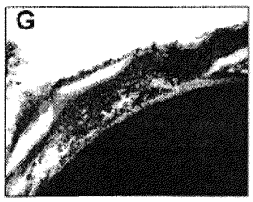
【図１１Ｆ】

図１１Ｆ



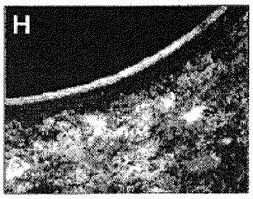
【図１１Ｇ】

図１１Ｇ



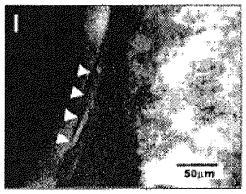
【図１１Ｈ】

図１１Ｈ



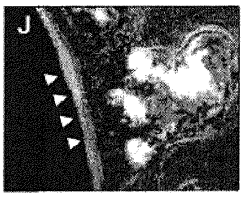
【図１１Ｉ】

図１１Ｉ



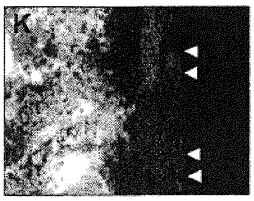
【図１１Ｊ】

図１１Ｊ



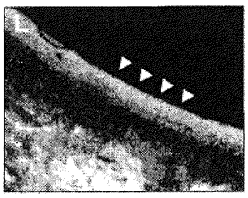
【図１１Ｋ】

図１１Ｋ



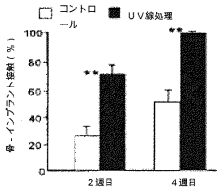
【図１１Ｌ】

図１１Ｌ



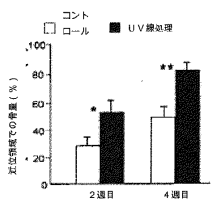
【図１１Ｍ】

図１１Ｍ



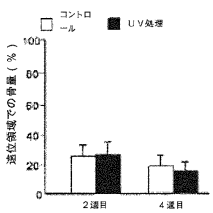
【図１１Ｎ】

図１１Ｎ



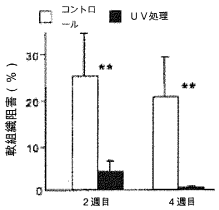
【図１１Ｏ】

図１１Ｏ



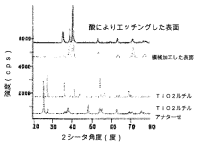
【図１１Ｐ】

図１１Ｐ



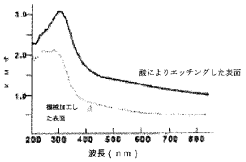
【図１２Ａ】

図１２Ａ



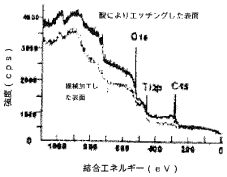
【図１２Ｂ】

図１２Ｂ



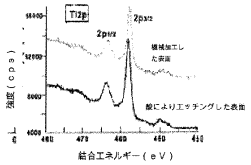
【図１２Ｃ】

図１２Ｃ



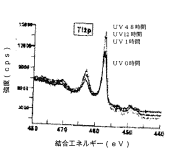
【図１２Ｄ】

図１２Ｄ



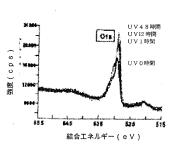
【図１２Ｅ】

図１２Ｅ



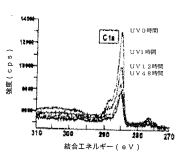
【図１２Ｆ】

図１２Ｆ



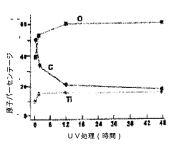
【図１２Ｇ】

図１２Ｇ



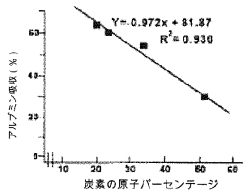
【図１２Ｈ】

図１２Ｈ



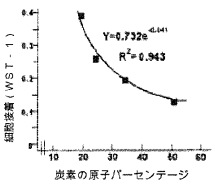
【図１２Ｉ】

図１２Ｉ



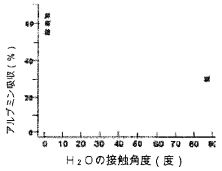
【図１２Ｊ】

図１２Ｊ



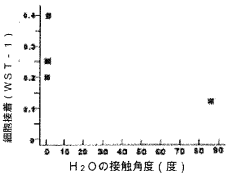
【図１２Ｋ】

図１２Ｋ



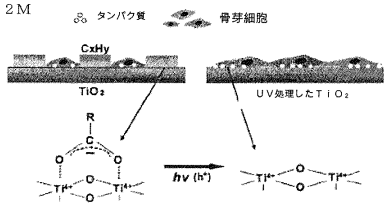
【図１２Ｌ】

図１２Ｌ



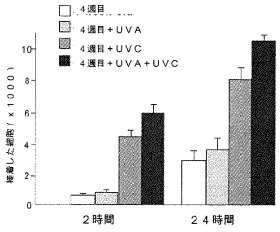
【図１２Ｍ】

図１２Ｍ



【図１３】

図１３



フロントページの続き

(72)発明者　小川　隆広
アメリカ合衆国，９０５０３　カリフォルニア州，トランセ，＃１１６　プラザ　デル　アモ　２８８９

合議体
審判長　内藤　真徳
審判官　熊倉　強
審判官　関谷　一夫

(56)参考文献　特表２００８－５３２６４０（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５０５３０７（ＪＰ，Ａ）
特開２００８－８０１０２（ＪＰ，Ａ）
特開２００８－８０１１３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５０８９４２（ＪＰ，Ａ）
特開２００３－９５９５８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61F 2/28
A61C 8/00
A61L 27/00