

チタンディスクの研磨条件が ヒト歯肉線維芽細胞接着に及ぼす影響

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

柳澤 直毅

(指導：飯沼 利光 教授, 池田 貴之 専任講師)

目 次

	ページ
概 要	1～2
緒 言	3～5
材料および方法	6～9
結 果	10～12
考 察	13～16
結 論	17
謝 辞	18
文 献	19～25
表および図	26～34

本論文は Biomimetics に掲載された，論文 [Yanagisawa N, Ikeda T, Takatsu M, Urata K, Nishio K, Tanaka H, Kawato T, Iinuma T \(2022\) Human gingival fibroblast attachment to smooth titanium disks with different surface roughnesses. Biomimetics 7, 164.](#) を基幹論文とし，新たにエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置による表面元素の解析のデータを追加して総括したものである。

概 要

細菌感染を主因とするインプラント周囲炎は、オッセオインテグレーションを破壊するため、歯科インプラント治療における主要な問題の一つとされ、軟組織の退縮や骨吸収を起こすことでインプラント体が露出し、審美的問題を惹起するが、インプラントネック部周囲の軟組織による強固な封鎖を獲得することで、インプラント周囲炎予防に有利に働くと考えられる。そこで本研究は、チタンディスクの表面平滑度が周囲軟組織に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。電解複合研磨 (electrolytic composite polishing, ECP)、バフ研磨 (sisal buffing, SB)、ヘアライン研磨 (hairline polishing, HP)、レーザー切断 (laser cutting, LC) 計4種類の研磨条件の異なるチタンディスクを製作、表面粗さ7項目を測定した。ECP, SB, HP, LCにおいて、Raはそれぞれ0.075 μm , 0.217 μm , 0.671 μm , 1.024 μm , Saは0.005 μm , 0.115 μm , 0.500 μm , 0.676 μm であり、ECPにおいて顕著に表面粗さが小さくなることを認めた。さらにECP, SB, HP, LCのWsk値は、それぞれ0.521, 1.018, 0.678, 0.558であった。ECPとSBの平滑面は凹面に偏っており、HPとLCの平滑面は凸面への偏りを認めた。ECP, SB, HP, LCのRku値は、それぞれ2.984, 11.774, 14.182, 26.232であった。ECPのみが表面の微細な突起の先端も平坦で、等方的な超平滑面を認めた。接触角は、ECPが60.1°, SBが66.3°, HPが68.4°, LCが79.3°であり、各

チタンディスクは疎水性を有することを認めた。エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いた表面元素解析では TiO_2 および FeO_2 のみ検出され、細胞接着に影響を及ぼす可能性のある表面元素は検出されなかった。ヒト歯肉線維芽細胞を各ディスク上で 24 時間および 48 時間培養し、細胞接着および細胞増殖を評価したところ、有意差は認められなかった。Ra や Sa 等の表面粗さの違いは、細胞接着に影響を与えないことから、ECP をインプラントネック部等に適用することで、細菌の付着を防止しつつ、周囲軟組織形成に必要な一定の細胞接着を達成する可能性が示唆された。

緒 言

インプラント治療は、体内に人工物を埋め込む治療の総称で、主に歯科や整形外科分野等で行われている。歯科インプラントは、欠損した歯の機能を回復させることを主たる目的とし、口腔という多数の細菌が存在する特殊な環境で使用することが前提となる。歯科インプラントを長期間安定した状態に保つためには、歯槽骨の十分な骨量に加え、骨とインプラントとの結合（オッセオインテグレーション）の獲得が重要となる[1-4]。このため、強固なオッセオインテグレーションの獲得を目的とし、インプラント体表面の改善に関する研究が数多く行われてきた[1,3,5-12]。一方で、細菌感染を主因とするインプラント周囲炎は、オッセオインテグレーションを破壊するため、歯科インプラント治療における主要な問題の一つとされ、軟組織の退縮と骨吸収を起こすことでインプラント体が露出し、審美的問題を惹起する。細菌数は歯肉縁上部では 1×10^9 個以上とされ、健康な歯肉溝では 1×10^3 個、歯周ポケットでは 1×10^8 個とされている[13]。そのため、これらの細菌からインプラント周囲組織を保護することが、インプラント周囲炎予防の鍵とされている[14-17]。

これに関し、インプラントネック部周囲に対する結合組織の付着は、インプラントアバットメントや補綴装置の周囲を封鎖し、細菌の侵入を防ぐ可能性がある[18]。抜歯直後における組織の治癒は、抜歯窩が血栓で満たされた後、肉芽組織がその密度を徐々に高めながら 2~7 日以内に置き換わる[19]。歯周外科手術後の初期上皮に

よる治癒には7~14週間を要するが、インプラントやアバットメント周囲の結合組織の成熟に伴う封鎖には6~8週間が必要とされることから[20]、結合組織とチタン材料の接触は、インプラント周囲の封鎖を確立するために重要な要素である。そこで、本研究は、チタン製インプラント粘膜接触部に焦点を当て、チタンの表面性状と粘膜接触部位における線維芽細胞との関係を検討した。さらに、細菌やバイオフィルムの付着は表面粗さと正の相関があるため、唾液中に曝露される部分は研磨して平滑にする必要がある[21,22]。しかし、機械研磨によるチタン表面には、研磨状態によって凹凸やうねりが存在する。これは、チタンの低い熱伝導率により、研磨工具に熱が集中し、研磨効率が低下することや、研磨時におけるチタン表面のうねりの制御の困難さに起因している[23]。

このように、歯科インプラントの粘膜接触面は、細菌の付着を防ぎつつ、軟組織によって強固に封鎖し、細菌付着を防ぐ目的でインプラントネック部の粘膜接触面を平滑にする必要がある。一方、細胞接着を促進するためには、細胞接着に有利な粗面が必要であるという相反する状況にある。これまで、インプラント表面性状と細胞接着との相関を調べた研究は数多く存在するが[3,9,16,17]、粘膜接触面の表面性状が細胞接着に与える様々な影響については未だ不明な点が多い。そこで本研究は、チタン表面の表面粗さが細胞接着に与える影響を明らかにすることを目的として、電解複合研磨 (electrolytic composite polishing, ECP)、バフ研磨 (sisal buffing, SB)、ヘアライン研磨 (hairline polishing, HP)、レーザー切断 (laser cutting, LC) で製作

したチタン表面へのヒト歯肉線維芽細胞の接着について検討した。

材料および方法

1. チタンディスクと表面処理

チタンディスク（直径 20 mm, 厚さ 1.5 mm）はグレード 2 純チタンディスク（降伏強度（0.2%オフセット）；39900 psi, 引張強度；49900 psi, 規格；ASTM B348 Gr2）（スタンダードテストピース, 神奈川）を使用した。ディスクは、直径 20 mm のチタンシリンダーを出力 500 W, 周波数 20000 Hz のレーザー（トルンプジャパン, 神奈川）で切断して作製した。

チタンディスクは、ECP, SB, HP, LC の 4 種類の研磨方法を用いて作製した。ECP は、電解研磨による電気化学的研磨と研磨剤による物理的研磨を複合して同時に行う研磨法（中野科学, 新潟）である。SB は研磨ホイール（3M ジャパン, 東京）を用い、回転数 3000-3600/ min で行った。HP は Scotch Brite AVF320 スクラブ（3M ジャパン）を用い、ベルト回転数 11.7 m/s で単一方向に研磨を行った。またレーザーで切り出したままのチタンディスクを LC とした。その後、時間依存的に生物学的な性能の劣化を起こすチタンの特性を標準化するために、チタンディスクをオートクレーブ滅菌（121°C, 20 分）し、暗所で 4 週間保管した。このうち 36 枚は表面性状分析, 36 枚は濡れ性の測定, 72 枚はヒト歯肉線維芽細胞接着試験, そして 12 枚は表面元素分析として、計 156 枚のチタンディスクを本研究で使用した。

2. チタンディスクの表面性状と濡れ性の測定

カラー3D レーザー走査型顕微鏡 (VK-X3000, キーエンス, 大阪) を用いて, ディスクの表面粗さと形態を無作為に選択した3点の位置で測定した。表面粗さは, 算術平均粗さ (Ra), 最大高さ (Rp), 最大深さ (Rv), 三次元算術平均粗さ (Sa), ひずみ度 (Wsk), 尖度 (Rku), 表面性状のアスペクト比 (Str) を用いて測定した。濡れ性は 10 μ L の再重蒸留水 (DDH₂O) 滴下時の接触角および拡がり面積で評価した。接触角は接触角計 (CA-X, 協和界面科学, 埼玉) を用いて測定し, さらに滴下写真から ImageJ (NIH, Bethesda, ML, USA) を用いて拡がり面積を測定した。

3. チタンディスクの表面元素分析

エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX-700/800, 島津製作所, 東京) を用いてチタンディスク上の表面元素解析を行った。使用した装置の検出可能元素は Na-U であり, コリメータを直径 10 mm, 真空雰囲気下において電圧 50 kV, 電流 100 μ A の X 線を使用し, 取込範囲を 0~40 keV として測定を行った。

4. ヒト歯肉線維芽細胞の培養

ヒト歯肉線維芽細胞 (Human gingival fibroblast primary cell, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) を, 95%の空気と5%のCO₂を含む加湿下, 37°C で培養した。細胞は, ウシ胎児血清 (FBS, Gibco-BRL, Rockville, MD, USA), 線

維芽細胞増殖サプリメント (FGS, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) および抗生物質 (ペニシリン/ストレプトマイシン, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 添加の高グルコース (25 mM) ダルベッコ改変イーグル培地で増殖させた。80%コンフルエント後, 0.10%トリプシンおよび 1 mM EDTA-4Na 溶液を用いて細胞を剥離し, 3×10^4 cell/cm²の密度で 12 ウェル培養プレートに設置したチタンディスク上に播種した。なお, 培地は 3 日ごとに交換した。

5. 細胞接着試験および細胞増殖試験

チタンディスクへの細胞接着の評価として, 主成分の水溶性テトラゾリウム塩を細胞内酵素がフォルマザンに分解することを利用した試薬である WST-8 (Cell Counting Kit-8, 同仁化学研究所, 熊本) を用いて 24 時間培養後のチタンディスク表面上の細胞数を測定した。また, 細胞増殖の評価として, 48 時間培養後の細胞数を測定した。12 ウェル培養プレート (内径 22.2 mm) に設置したチタンディスク上に線維芽細胞を 3×10^4 cell/cm²の密度で播種し, 24 時間および 48 時間培養後, チタンディスクを新しい 12 ウェル培養プレートに移し, 100 μ L の WST-8 を各プレートに添加, 1 時間反応後, 上澄み液を 96 ウェル培養プレートに分注し, ELISA リーダー (Spectra Max ABS, MOLECULAR DEVICES, 東京) を用いて 420 nm の波長で吸光度を測定した。

6. 統計学的解析

各研磨条件のチタンディスクの表面粗さ試験，濡れ性，および細胞接着試験には ECP, SB, HP, LC, で作製したディスクそれぞれ 9 枚を用いた ($n = 9$)。分析は一元配置分散分析により，各研磨条件間における平均値の差異の有無を求め，統計学的有意性は $P < 0.05$ とし，事後検定には Tukey 多重比較検定を用いた。また，表面粗さと細胞接着の関係は相関分析を行った。なお，統計解析は IBM SPSS Statistics version 20 (IBM, Armonk, USA) を用いて行った。

結 果

1. 表面性状

異なる研磨方法で作製したチタンディスクの表面は全て平滑面を呈し、ECP 処理したディスクは光沢のある鏡面を呈した (図 1a, 上段)。カラー3D レーザー走査型顕微鏡像では、ECP で凹凸は認められなかったが、SB と HP では溝を認め、HP ではさらに凹凸を認めた。LC では溝は認められないが、多数の大きな凹凸が認められた。

(図 1a, 中段)。3次元画像からは、これらの特徴がより明確に示された (図 1a, 下段)。表面粗さ (Ra, Rp, Rv, Sa) では、各パラメータの値はECP, SB, HP, LCの順で大きくなり、すべての群間で有意差を認めた。(図 1b)。

表 1 に各研磨条件の Wsk, Rku, Str の結果を示す。ECP と SB の場合、 $Wsk > 0$ であり、凹凸の数値を平均した平均線に対してうねりが下方に偏っている一方、HP と LC は $Wsk < 0$ であり、平均線に対してうねりが上方に偏っている。ECP は $Rku < 3$ の条件を満たすため、表面に存在する微細な突起の先端も平坦であった。Str は 1 に近い値を示す ECP, LC で等方性の表面性状を認め、0 に近い値を示す SB で異方性の表面性状を認めた。また、HP は等方性と異方性の中間的性質を認めた。

2. 濡れ性

チタン表面の濡れ性は、研磨条件の異なるチタンディスクすべてにおいて疎水性

を示し、10 μ L の DDH₂O が拡散することなく半球状に留まった (図 2a)。接触角は、最も小さい ECP で 63°、最も大きな LC で 80°であり (図 3)、LC の接触角と面積は他のディスク群と比較して有意差を認めた (図 2b, 3b)。また、ECP の接触角と面積は HP と LC と比較して有意差を認めた。

3. EDX による表面元素の分析

EDX を用いた ECP, SB, HP, LC 上の表面元素の分析結果を示す (図 4)。ECP では TiO₂ 99.80%, FeO₂ 0.10%, SB では TiO₂ 99.85%, FeO₂ 0.05%, HP では TiO₂ 99.81%, FeO₂ 0.06%, LC では TiO₂ 99.80%, FeO₂ 0.06% の表面元素が検出された (表 2)。

4. ヒト歯肉線維芽細胞接着および増殖の結果

24 時間および 48 時間培養後、チタンディスクの表面上におけるヒト歯肉線維芽細胞の細胞接着と細胞増殖の結果を示す (図 5)。24 時間および 48 時間では、各群間に有意差は認められなかった。

5. 表面粗さとヒト歯肉線維芽細胞の接着および増殖との相関

表面粗さ (Ra, Rp, Rv, Sa) と細胞接着の相関関係を把握するため、相関分析により検討した結果、24 時間培養後の表面粗さパラメータと初期細胞接着量との間に

弱い正の相関が観察された ($Ra : r = 0.326$, $Rp : r = 0.334$, $Rv : r = 0.324$, $Sa : r = 0.303$) (図 6)。しかし, 48 時間培養後では相関が認められなかった ($Ra : r = 0.086$, $Rp : r = 0.016$, $Rv : r = 0.028$, $Sa : r = 0.034$) (図 7)。

考 察

本研究では、研磨条件の異なるチタンの表面性状を調べるとともに、ヒト歯肉線維芽細胞接着との関係性を評価した。

一般的にインプラント体は、埋入部の結合組織を貫通してアバットメントや上部構造とつながるため、インプラントネック部分は、プラークやバイオフィルムの汚染にさらされるリスクが高くなる。そのため、歯槽粘膜などの結合組織でしっかりと覆われる必要がある。このようにインプラントネック部周辺の線維芽細胞に富んだ組織は、外部との封鎖を維持するために重要な役割を担っているため[24,25]、インプラントネック部には、プラークやバイオフィルムに対して抵抗性があり、かつ線維芽細胞と容易に接着出来ることが求められる。

これまでのチタン表面性状に関する研究において[1,3,5-12]、粗面に対する検討で対照群として用いられてきた平滑なチタンディスクは、実際にはいくつかの表面粗さに分類ができる。Albrektsson TらはSa分類を、smooth (Sa < 0.5 μm)、minimally rough (Sa = 0.5~1.0 μm)、moderately rough (Sa = 1.0~2.0 μm)、rough (Sa > 2.0 μm)の4段階に分類しているが、本研究で用いた平滑チタンディスクは、LCを除いて全てsmoothに分類される。一方Raでは、これらは最も平滑とされるナノ粗さ (Ra = 1~100 nm) に分類され、LCもsmoothに分類される[26,27]。本研究結果から、ECPは凹凸が少なく、表面の微細な突起の先端も平坦であるため、等方的な超平滑面と判

断された。

チタンディスクの親水性が初期の細胞接着に与える影響を検討した先行研究では、親水性が高いほど骨芽細胞の接着に有利であるとの結果を得ており[11,28-32]、インプラント体に親水性を付与することで、血液との濡れが増し、細胞接着に有利に働く。しかし本研究では、ECPはLCより高い親水性を示すものの、親水性であると判断される基準値を満たさなかったことから、細胞接着に対する効果は限局的と考えられた。

細胞接着の障害因子として表面元素による影響が挙げられるが[33]、本研究結果ではグレード2チタンに含有される表面元素以外は検出されなかった。先行研究では、汚染されたインプラント表面で検出されたアルミニウム、バナジウム、カルシウム、リン等の表面元素が細胞接着に悪影響を与える可能性を報告しているが[33]、本研究ではこれらの元素はチタンディスク表面から検出されず、しかもチタンディスクの研磨時に用いる研磨材等により付着する可能性があるるとされる元素も残留していなかった。このことから、本研究では、チタンディスクへの線維芽細胞接着を障害する表面元素の影響はなかったと考えられた。

細胞接着試験の結果から、ヒト歯肉線維芽細胞を平滑面で24時間培養した際のRa, Rp, Rv, Saと細胞接着は弱い正の相関($r = 0.3 \sim 0.5$)を示した。このことから本研究では、チタンの表面粗さは細胞数の違いに影響を及ぼすと考えられたが、その相関は弱く、48時間培養後で相関は消失した。これに関し先行研究は、プラズマ処理

により、表面粗さを変化させたチタンディスク上で線維芽細胞を培養したところ、時間の経過とともに細胞数の違いは消失し、24時間以降の結果では細胞増殖と表面粗さとの相関が認められなかったと報告している[34,35]。この結果は、本研究と同様であった。臨床的にも、抜歯直後の抜歯窩は血栓で満たされ、肉芽組織の密度が徐々に高まり、2~7日以内に置き換わった後に、表層が上皮組織に置換され始めることが明らかになっており、この際の線維芽細胞の旺盛な増殖能が報告されている[19]。以上のことから、上皮組織の再生には、結合組織封鎖を形成する初期の段階で、線維芽細胞の接着と増殖を阻害しないことが重要と考えられる。

前述したように、結合組織性接着部位に接しているインプラントネック部は、プラークやバイオフィームに対する抵抗性と線維芽細胞が接着しやすいという相反する性質を持つことが望ましい。よってチタン表面の粗面化を行えば、線維芽細胞の接着性を高めることが可能であるが、インプラント体の粗面が口腔内に露出するとプラークやバイオフィームが形成するため[36-38]、その対策が重要となる[20,36-39]。一方、これまでの研究では、表面が平滑になるに従い、細胞接着は少なくなるとの結果を得ているが[34]、今回の結果から、インプラントネック部平滑面の研磨条件に関わらず、細胞接着が一定であった。これは、ナノサイズの表面粗さ、プラズマ処理を施した平滑面が、線維芽細胞の接着に影響を与えないとした先行研究結果と同様の結果であり、チタン表面の平滑化が線維芽細胞の接着に及ぼす影響は少ない可能性を示している[40]。とくに本研究では、研究で用いた4種類の平滑面間におけ

る表面粗さの差は、平滑面と粗面との表面粗さを検討した過去の研究と比較し、表面粗さの差が小さかったため、細胞接着に対する影響が小さくなったと考えられる。

一方、インプラント周囲炎の観点から、インプラント表面の粗さは付着する細菌量と密接な相関があり、インプラント表面を粗面とすると接触面積が大きくなるため、細菌の付着に有利に働く。先行研究で、人工的に研磨されたインプラント体表面ではバイオフィルムが減少することや、細菌の付着を減少させる Ra の閾値は 0.2 μm 以下と報告されており [41-44]、本研究で用いた 4 種類のチタンディスクでは ECP のみがこの条件を満たした。

チタン表面における平滑度の研究には、いくつかの限界が考えられる。その一つは、短期間で細胞が高いコンフルエンスに達するため、長期培養後の比較対象の評価が困難であることである。インプラント周囲軟組織による強固な封鎖を獲得し、インプラント周囲炎のリスクを低減できる新たなインプラントネック部の開発に向けた *in vivo* での検討が必要と考える。

結 論

チタンの研磨条件がヒト歯肉線維芽細胞接着に及ぼす影響を検討した結果、以下の結論を得た。

1. ECP は凹凸が少なく，表面の微細な突起の先端も平坦であり，等方的な超平滑面を示し，さらに親水性が最も高かった。
2. 24 時間培養後のヒト歯肉線維芽細胞における，表面粗さと細胞接着数は弱い正の相関を示したが，48 時間培養後では相関は消失した。

謝 辞

日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座の飯沼利光教授，日本大学歯学部衛生学講座の川戸貴行教授，日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座の池田貴之専任講師に，多大なるご指導を賜りましたことに対し，この誌上を持ちまして深く感謝の意を申し上げます。

文 献

1. Ogawa T, Nishimura I. Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003, 18, 200-210.
2. 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, 173-181.
3. Att W, Hori N, Takeuchi M, Ouyang J, Yang Y, Anpo M, Ogawa T. Time-dependent degradation of titanium osteoconductivity: an implication of biological aging of implant materials. *Biomaterials* 2009, 30, 5352-5363.
4. Minamikawa H, Att W, Ikeda T, Hirota M, Ogawa T. Long-term progressive degradation of the biological capability of titanium. *Materials (Basel)* 2016, 9, 102.
5. Ogawa T, Ozawa S, Shih JH, Ryu KH, Sukotjo C, Yang JM, Nishimura I. Biomechanical evaluation of osseous implants having different surface topographies in rats. *J Dent Res* 2000, 79, 1857-1863.
6. Bereznai M. Surface modifications induced by ns and sub-ps excimer laser pulses on titanium implant material. *Biomaterials* 2003, 24, 4197-4203.
7. Gotz HE, Muller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG, Stangl R. Effect of surface

- finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials* 2004, 25, 4057-4064.
8. Guilherme AS, Henriques GE, Zavanelli RA, Mesquita MF. Surface roughness and fatigue performance of commercially pure titanium and Ti-6Al-4V alloy after different polishing protocols. *J Prosthet Dent* 2005, 93, 3783-3785.
 9. Att W, Takeuchi M, Suzuki T, Kubo K, Anpo M, Ogawa T. Enhanced osteoblast function on ultraviolet light-treated zirconia. *Biomaterials* 2009, 30, 1273-1280.
 10. 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.
 11. Ueno T, Yamada M, Suzuki T, Minamikawa H, Sato N, Hori N, Takeuchi K, Hattori M, Ogawa T. Enhancement of bone-titanium integration profile with UV-photofunctionalized titanium in a gap healing model. *Biomaterials* 2010, 31, 1546-1557.
 12. Lin Z, Rios HF, Volk SL, Sugai JV, Jin Q, Giannobile WV. Gene expression dynamics during bone healing and osseointegration. *J Periodontol* 2011, 82, 1007-1017.
 13. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979, 6, 351-382.
 14. Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol* 2011, 38, 203-213.

15. Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2012, 23, 67-76.
16. Marín-Pareja N, Salvagni E, Guillem-Martí J, Aparicio C, Ginebra MP. Collagen-functionalised titanium surfaces for biological sealing of dental implants: effect of immobilisation process on fibroblasts response. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, 122, 601-610.
17. Gómez-Florit M, Xing R, Ramis JM, Taxt-Lamolle S, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Monjo M. Human gingival fibroblasts function is stimulated on machined hydroxide titanium zirconium dental implants. *J Dent* 2014, 42, 30-38.
18. Squier CA, Collins P. The relationship between soft tissue attachment, epithelial downgrowth and surface porosity. *J Periodontal Res* 1981, 16, 434-440.
19. Pippi R. Post-surgical clinical monitoring of soft tissue wound healing in periodontal and implant surgery. *Int J Med Sci* 2017, 14, 721-728.
20. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995, 268, 233-239.
21. Gatewood RR, Cobb CM, Killoy WJ. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 1993, 4, 53-64.
22. Quirynen M, Soete MD, Steenberghe DV. Infectious risks for oral implants: a review of

- the literature. *Clin Oral Implants Res* 2002, 13, 1-19.
23. Escaich C, Shi Z, Baron L, Balazinski M. Machining of titanium metal matrix composites: progress overview. *Materials (Basel)* 2020,13, 5011.
 24. Abrahamsson I, Berglundh T, Moon IS, Lindhe J. Peri-implant tissues at submerged and non-submerged titanium implants. *J Clin Periodontol* 1999, 26, 600-607.
 25. Moon IS, Berglundh T, Abrahamsson I, Linder E, Lindhe J. The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. an experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 1999, 26, 658-663.
 26. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: part 1-review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004, 17, 536-543.
 27. Guéhenec LL, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007, 23, 844-854.
 28. 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.
 29. Hori N, Att W, Ueno T, Sato N, Yamada M, Saruwatari L, Suzuki T, Ogawa T. Age-dependent degradation of the protein adsorption capacity of titanium. *J Dent Res* 2009, 88, 663-667.

30. Okubo T, Ikeda T, Saruta J, Tsukimura N, Hirota M, Ogawa T. Compromised epithelial cell attachment after polishing titanium surface and its restoration by UV-treatment. *Materials (Basel)* 2020, 13, 3946.
31. Nakhaei K, Ishijima M, Ikeda T, Ghassemi A, Saruta J, Ogawa T. Ultraviolet light treatment of titanium enhances attachment, adhesion, and retention of human oral epithelial cells via decarbonization. *Materials (Basel)* 2020, 14, 151.
32. Ikeda T, Okubo T, Saruta J, Hirota M, Kitajima H, Yanagisawa N, Ogawa T. Osteoblast attachment compromised by high and low temperature of titanium and its restoration by UV photofunctionalization. *Materials (Basel)* 2021, 14, 5493.
33. Balderrama ÍDF, Cardoso MV, Stuani VT, Oliveira RC, Matos AA, Greggi SLA, and Sant'Ana ACP. Residual decontamination chemical agents negatively affect adhesion and proliferation of osteoblast-like cells on implant surface. *Int J Implant Dent* 2020, 6, 84.
34. Guehenec LL, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater* 2008, 4, 535-543.
35. Canullo L, Genova T, Trujillo EG, Pradies G, Petrillo S, Muzzi M, Carossa S, Mussano F. Fibroblast interaction with different abutment surfaces: in vitro study. *Int J Mol Sci* 2020, 21, 1919.
36. Amoroso PF, Adams RJ, Waters MG, Williams DW. Titanium surface modification and

- its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 2006, 17, 633-637.
37. Martines RT, Sendyk WR, Gromatzky A, Cury PR. Sandblasted/acid-etched vs smooth-surface implants: implant clinical reaction to experimentally induced peri-implantitis in beagle dogs. *J Oral Implantol* 2008, 34, 185-189.
 38. Brum RS, Apaza-Bedoya K, Labes LG, Volpato CAM, Pimenta AL, Benfatti CAM. Early biofilm formation on rough and smooth titanium specimens: a systematic review of clinical studies. *J Oral Maxillofac Res* 2021, 12, e1.
 39. Weber HP, Fiorellini JP. The biology and morphology of the implant-tissue interface. *Alpha Omegan* 1992, 85, 61-64.
 40. Kubo K, Tsukimura N, Iwasa F, Ueno T, Saruwatari L, Aita H, Chiou WA, Ogawa T. Cellular behavior on TiO₂ nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. *Biomaterials* 2009, 30, 5319-5329.
 41. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997, 13, 258-269.
 42. Teughels W, Assche NV, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 2006, 17, 68-81.
 43. Yoda I, Koseki H, Tomita M, Shida T, Horiuchi H, Sakoda H, Osaki M. Effect of surface

roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiol* 2014, 14, 234.

44. McGaffey M, Linden AZ, Bachynski N, Oblak M, James F, Weese JS. Manual polishing of 3D printed metals produced by laser powder bed fusion reduces biofilm formation. *PLoS One* 2019, 14, e0212995.

表および図

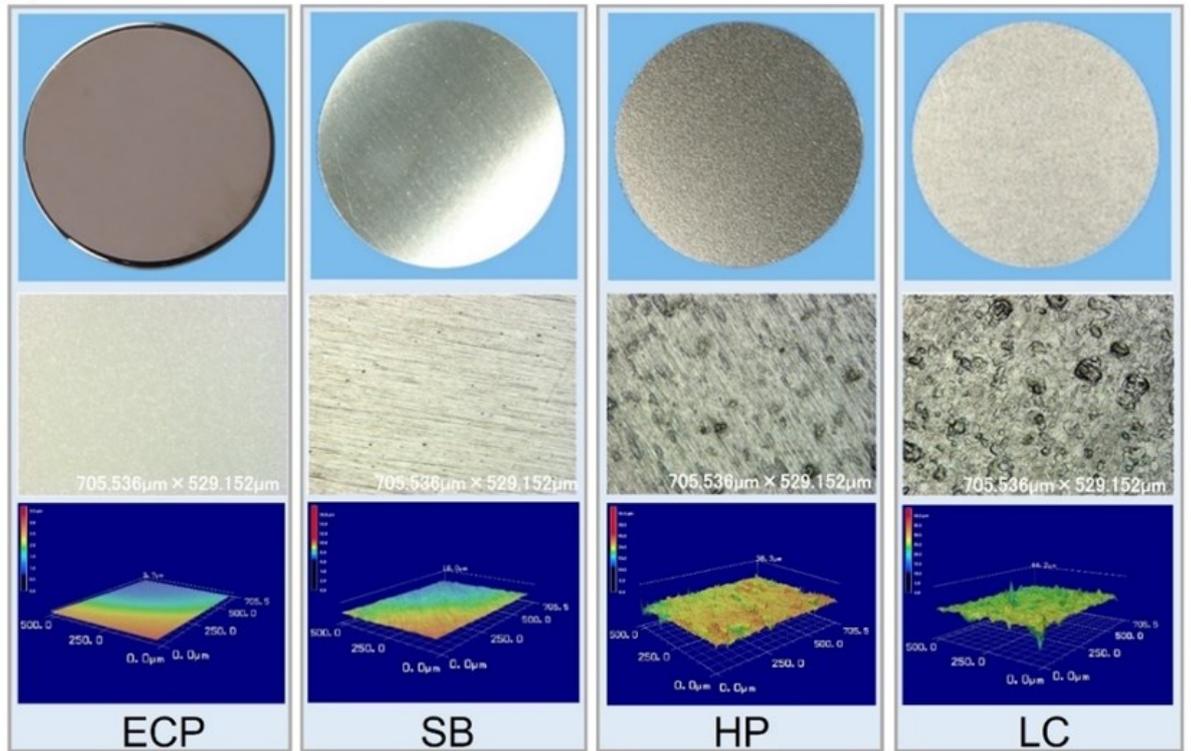
表1 各チタンディスクのひずみ度 (Wsk), とがり度 (Rku), 表面性状の均一性 (Str)

	Wsk	Rku	Str
ECP	0.5213 ± 0.2252	2.984 ± 1.7168	0.8167 ± 0.0971
SB	1.0183 ± 0.8523	11.7790 ± 22.8187	0.0328 ± 0.0059
HP	-0.6783 ± 0.3770	14.1829 ± 3.1957	0.4243 ± 0.0847
LC	-0.5584 ± 0.2525	26.2324 ± 2.7717	0.8306 ± 0.0418

表2 検出元素量 (wt%)

	ECP	SB	HP	LC
TiO ₂	99.80%	99.85%	99.81%	99.80%
FeO ₂	0.10%	0.05%	0.06%	0.06%

(a)



(b)

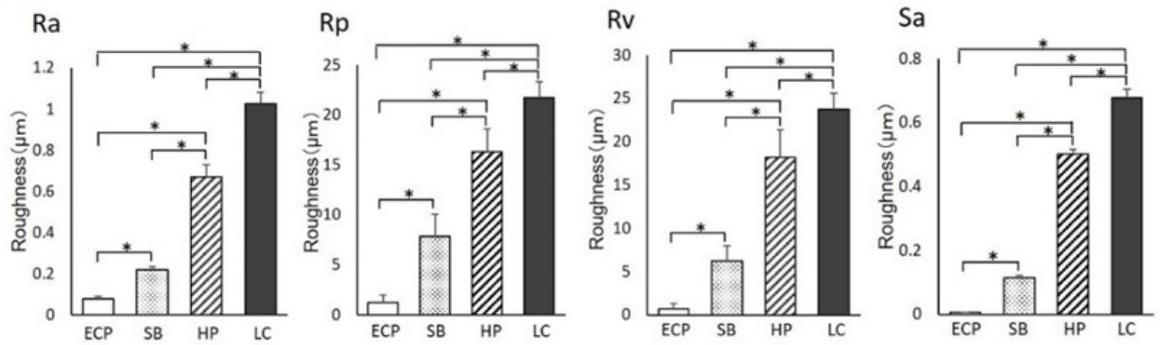


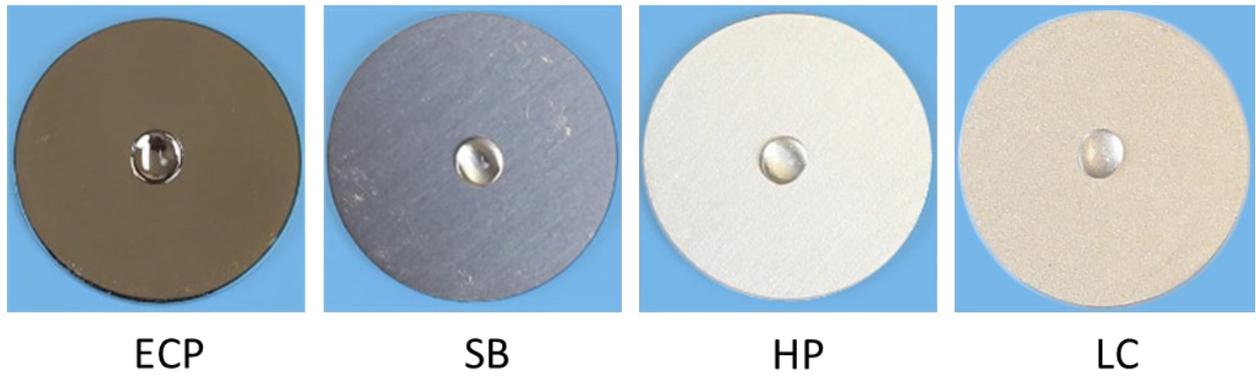
図 1 各チタンディスクの表面性状および表面粗さ

(a)上段：研磨条件の異なるチタンディスク画像 中段：カラー3D レーザー

走査型顕微鏡画像 下段：3D 解析画像, (b)：各チタンディスクの Ra, Rp,

Rv, Sa ($n = 9$, in each). * $p < 0.05$

(a)



(b)

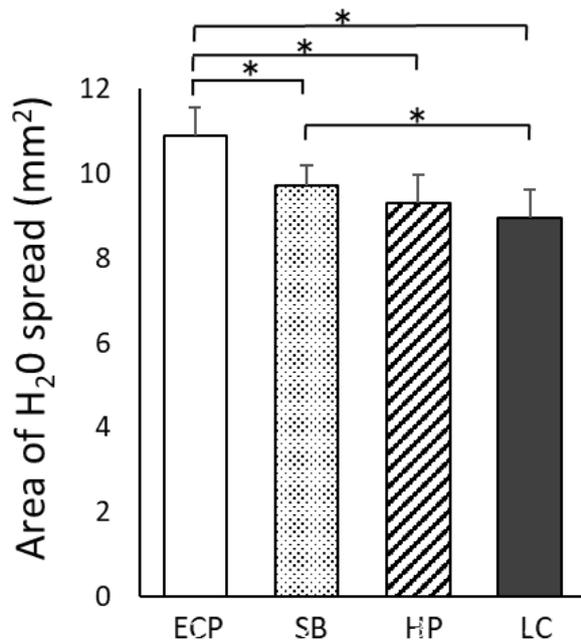
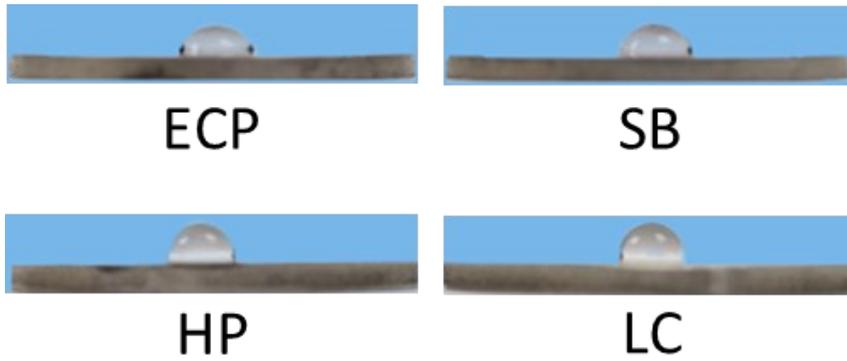


図2 各チタンディスクの濡れ性（拡がり面積）

(a)：チタンディスク（直径 20 mm）に 10 μ L の再重蒸留水（DDH₂O）滴下時の画像

（上方面観），（b）：滴下時の拡がり面積（ $n = 9$, in each）. * $p < 0.05$

(a)



(b)

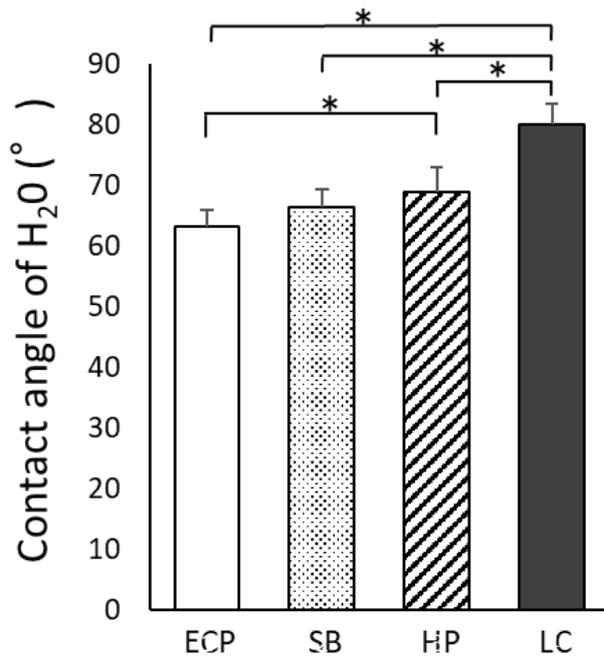


図3 各チタンディスクの濡れ性試験（接触角）

(a)：チタンディスク（直径 20 mm）に 10 μ L の再重蒸留水（DDH₂O）滴下時の画像

（側方面観），(b)：滴下時の接触角（ $n = 9$, in each）. * $p < 0.05$

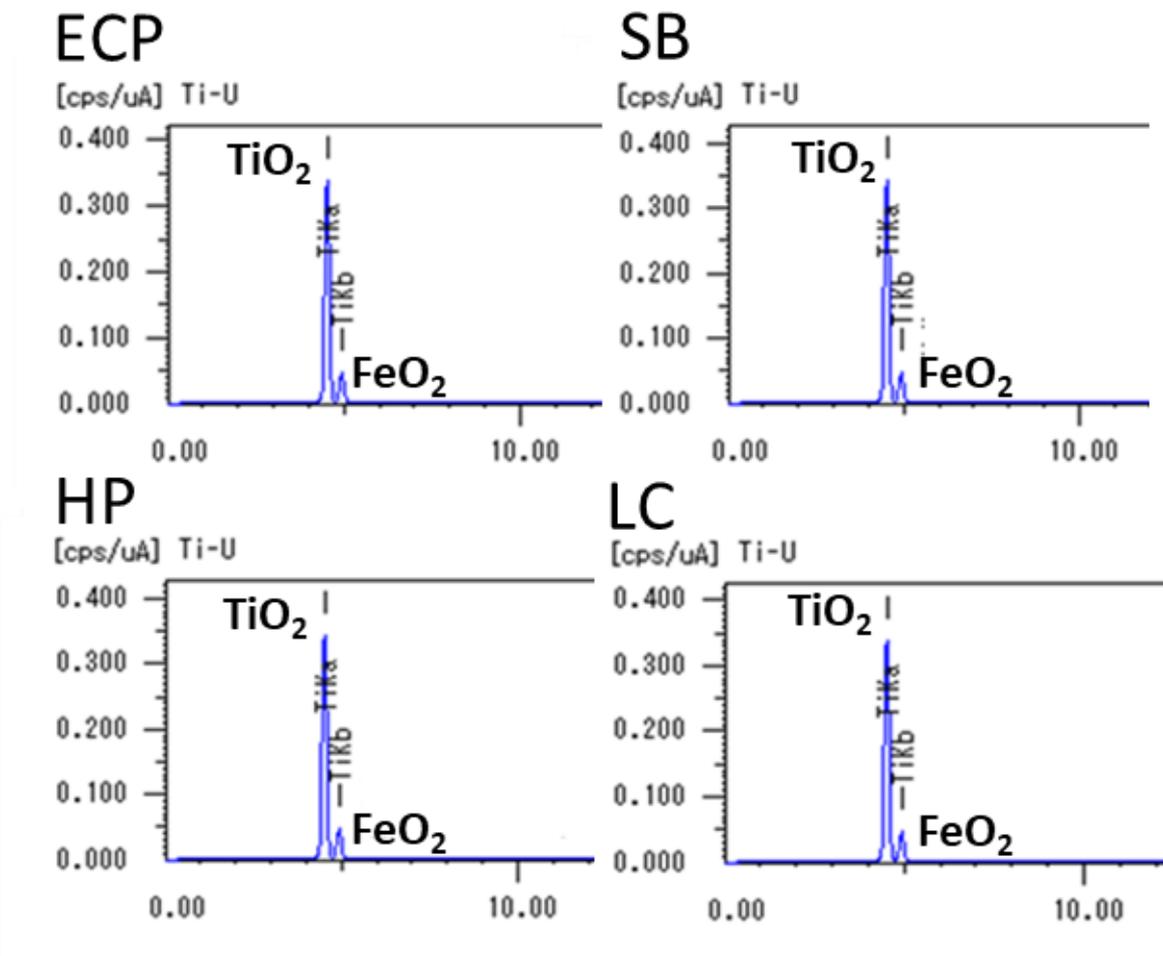


図4 EDXを用いたECP, SB, HP, LCの検出元素の定性分析図

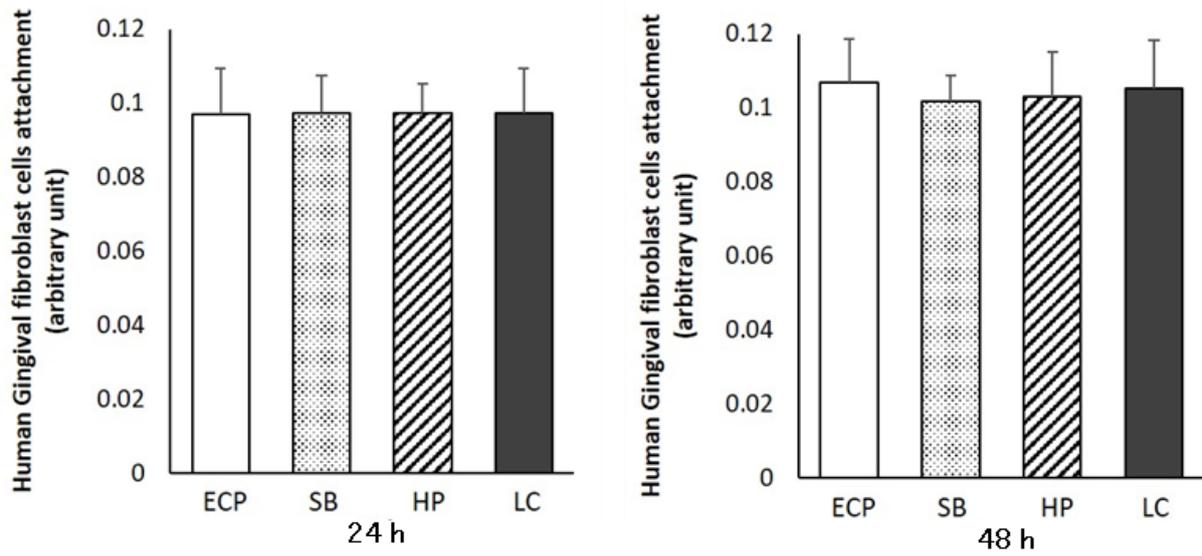


図 5 各チタンディスク上での 24 時間培養後のヒト歯肉線維芽細胞の接着試験および、48 時間培養後の細胞増殖試験結果 ($n = 9$, in each). * $p < 0.05$

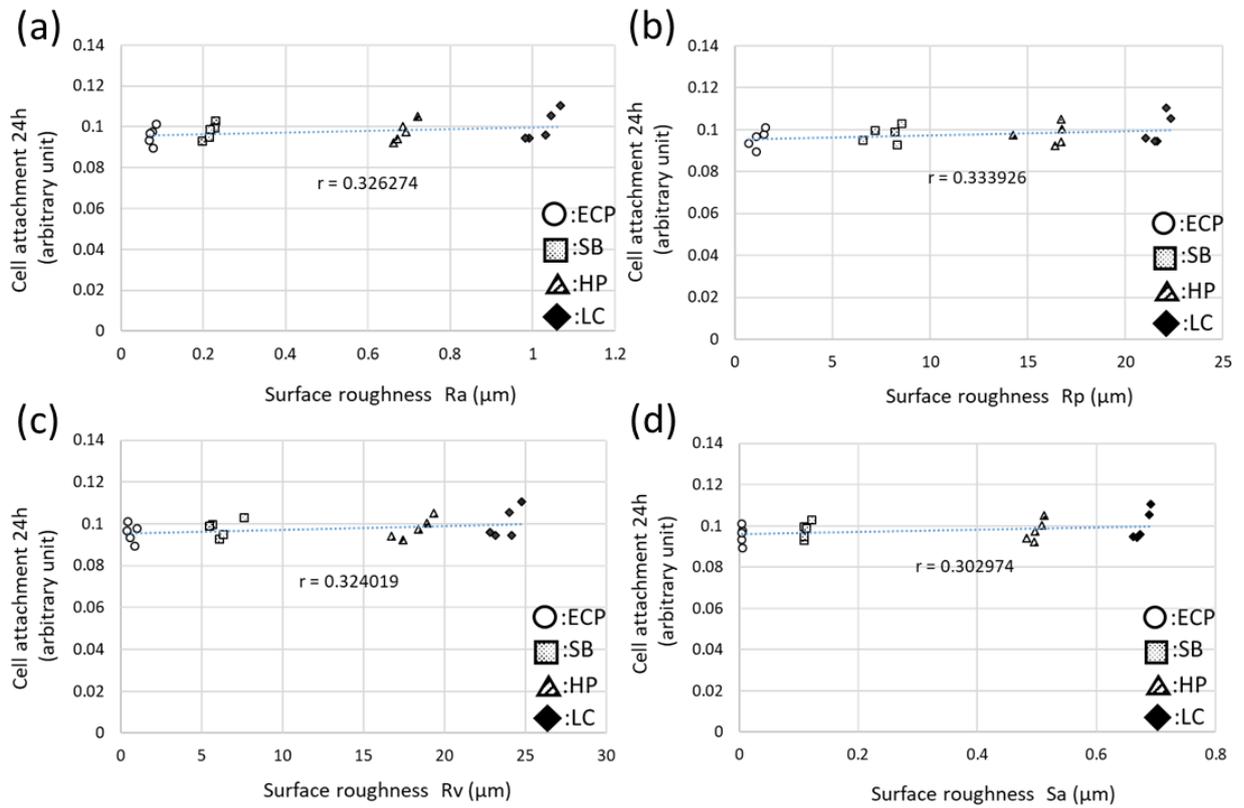


図 6 24 時間培養後のヒト歯肉線維芽細胞の接着と表面粗さ (R_a , R_p , R_v , S_a) の
 相関

(a) : R_a ($r = 0.326$) ,(b) : R_p ($r = 0.334$) ,(c) : R_v ($r = 0.324$) ,(d) : S_a ($r = 0.303$).

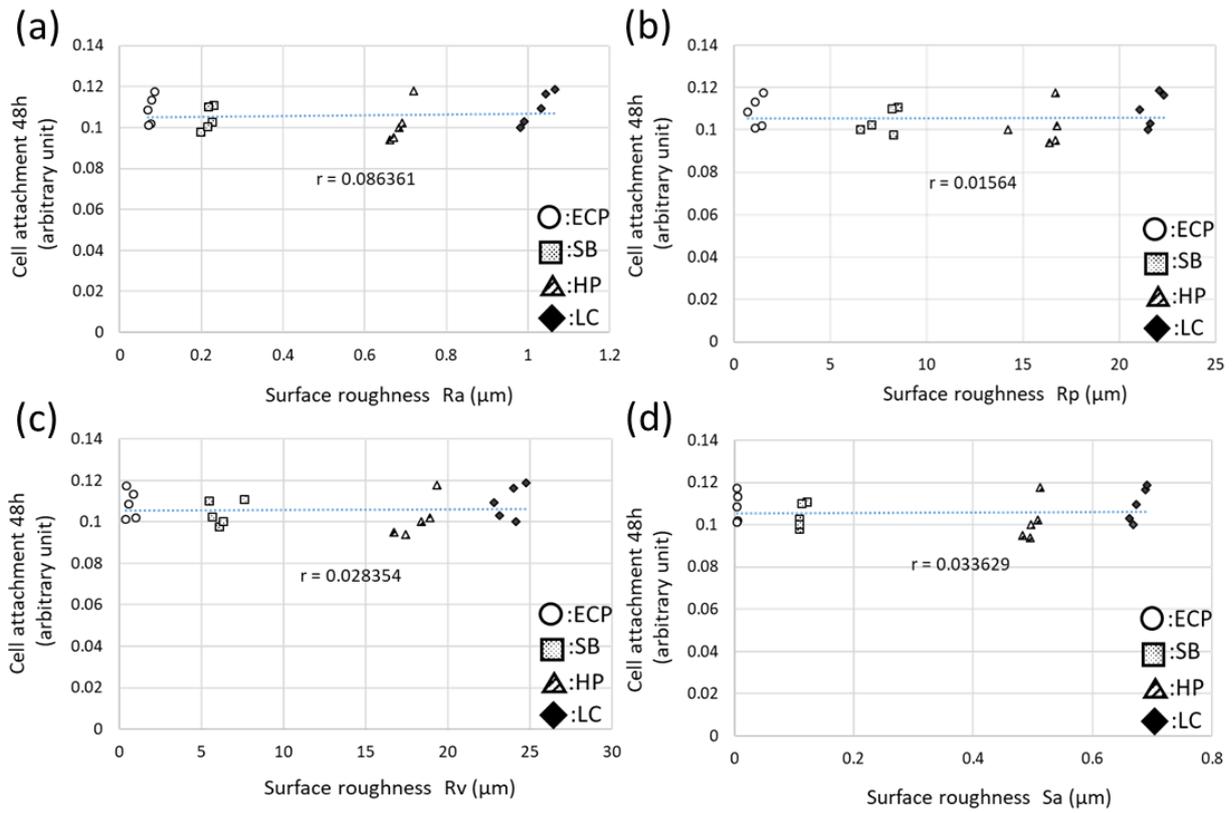


図 7 48 時間培養後のヒト歯肉線維芽細胞の増殖と表面粗さ (Ra, Rp, Rv, Sa) の
 相関

(a) : Ra ($r=0.086$) ,(b) : Rp ($r=0.016$) ,(c) : Rv ($r=0.028$) ,(d) : Sa ($r=0.034$).