

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19283

研究課題名(和文) Ca修飾によるチタン合金表面処理法の開発と骨形成・機能安定性促進に関する基礎研究

研究課題名(英文) Development of titanium alloy surface treatment method by Ca modification and basic research on promotion of bone formation and functional stability

研究代表者

井田 裕人 (Ida, Hiroto)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20746979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Ca修飾法の有用性を確認するため、スクリュー表面構造の評価を行なった。また、スクリューをビーグル犬顎骨に埋入し、埋入・撤去トルク、動揺度の計測によるスクリューの安定性の評価、アリザリンレッド染色によるスクリュー表面付着物の評価、組織切片、動物用CTによる骨形態計測を行なった。さらに、生体毒性試験として金属試験片による溶出試験、ビーグル血液内における残留金属元素濃度の計測を行い、生体材料としての安全性を評価した。

これらの実験結果から、Ca修飾法は、酸エッチング処理を組み合わせることにより、高い骨形成能と生体内安定性を示すことが明らかとなり、有用なスクリュー表面処理方法であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、チタン合金製スクリューの周囲の骨形成を促進させ、骨結合の強くなる技術の開発が目的である。製品段階でCa修飾を行った歯科矯正用アンカースクリューは、埋入時点でチタン合金表面にCaが存在することから、埋入初期から高いアパタイト形成能を有し、骨形成能に優れた材料であることが明らかとなった。

チタン合金へのCa修飾技術を応用した材料の開発は、申請者らのグループでしか為し得ない極めて独自性を有した研究である。また、この技術を人工関節に応用すると、人工関節の挿入部が残部の骨と強固に融合することが可能となるなど、医科領域においてもより優れた生体材料としての使用が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：We reported the clinical usefulness of acid-etched pure titanium screw with calcium modification as a biomaterial. Experimental results clarified that the novel calcium modification method developed by our group showed high osteogenic activity and in vivo stability by combining acid-etching treatment, suggesting that it is a useful screw surface treatment method. Calcium modified acid-etched pure titanium has superior features as a biomaterial showing increased new bone formation and osseointegration, and no significant toxicity by accumulation of metal ions, such as Ca, Ti, Al, and V in organs. Calcium-modified acid-etched pure titanium might be particularly suitable as a biomaterial of orthodontic mini screws.

研究分野：矯正歯科

キーワード：金属表面処理 オッセオインテグレーション 生体力学的評価 生体安全性

1. 研究開始当初の背景

現在臨床の場においてはチタン合金製の生体材料が広く用いられており、主な組成としては Ti-6Al-4V 合金が用いられている。しかし、この Ti-6Al-4V 合金の問題として、歯科用インプラントは歯槽骨の吸収した高齢者を対象とする際、予後の安定性が低いこと、歯科矯正用アンカースクリューでは、動揺や脱落があること、成熟した骨でなければ安定しないこと、また整形外科インプラントは骨との接合部にゆるみが生じる可能性があることが挙げられる。骨組織への結合を向上することが可能となれば、これらの問題点は一挙に改善する。これまでのインプラント表面処理の方法として、まずアルカリ加熱処理が挙げられる。チタンが骨結合性を示すのはチタン表面が酸化チタンであることに起因する。この酸化チタン層の厚さを増大するためにアルカリ処理が考案されたが、表面がゲルとなるため骨結合力は限定的であった。これを解決するために、ゲル層を焼きしめ、加熱処理を行う方法が開発され (Nishiguchi et al. 2003 J. Biomed. Mater. Res.)、大腿骨頭置換術で用いられるシステムで実用化されている (Kawanabe et al. 2009 J. Biomed. Mater. Res.)。このアルカリ加熱処理チタンは生体内に埋入されてから、細胞活性を示す Ca がインプラント表面に結合する。すなわち生体内の Ca (血中濃度約 2.5mmol/L) によって、生体内の環境 (37°C、タンパク等が存在する) でしかインプラント表面に Ca が結合できない。もし、製品段階でインプラントに Ca を結合することができれば、アルカリ加熱処理チタン以上のアパタイトを形成する能力が期待できる。

CaSiO₃ セラミックコーティングは、Ca イオンを放出できる最も典型的なセラミック材料であり、それを応用した CaSiO₃ セラミックコーティング処理法もその有効性が報告されている。しかし CaSiO₃ は分解能 (劣化能) が高く、周囲の pH が高くなり、細胞活性が低くなり、脱落率が高くなるという報告もある (Chengtie et al. 2008 J. Biomed. Mater. Res.)。以上の報告から、骨結合が強くなるインプラント表面処理の条件として、1) 表面処理後に変性が起きないこと。2) 細胞活性を示す Ca イオンが適度に放出されること。3) 周囲の pH が上昇しないこと (細胞活性が低下する) が挙げられる。一方、粗面チタン (酸エッチングが一般的な調製法である) もアルカリ加熱処理チタンに比較して骨形成能に高い効果があることが知られている。酸エッチング処理を行ったチタン表面の細胞は、ALP、オステオカルシン陽性細胞数が多く (Zhao et al. 2005 J. Biomed. Mater. Res.)、酸エッチング処理を行なった歯科用チタンインプラントなどが臨床応用されている。そこで本研究は、我々の研究グループによって開発された表面処理方法によって作製された、Ca 修飾チタン合金および表面処理を併用した酸エッチング Ca 修飾チタン合金と、これまで臨床で用いられているチタン合金、酸エッチングチタン合金の 4 種の金属箔および歯科矯正用アンカースクリューのプロトタイプを作製し、各材料の骨形成能について in vivo、in vitro において比較検討を行う。

2. 研究の目的

本研究は、チタン合金製スクリューの周囲の骨形成を促進させ、骨結合の強くなる技術の開発を目的としている。製品段階で Ca 修飾を行った歯科矯正用アンカースクリューは、埋入時点でチタン合金表面に Ca が存在することから、埋入初期から高いアパタイト形成能

が期待でき、それにより硬組織適合性が高く、骨形成能に優れた材料であることが予想される。

3. 研究の方法

- (1) チタン合金、酸エッチングチタン合金、Ca 修飾チタン合金、酸エッチング Ca 修飾チタン合金の4種の金属箔の表面粗さの確認のために、カラー3D レーザー顕微鏡(KEYENCE VK-9700)を用いた測定を行なう。また、X線光電子分光測定(XPS)を用いて、試料表面を構成する元素の組成、化学結合状態の分析を行なう。
- (2) 上記4種の金属箔を24枚ずつ用意し、疑似体液5.0ml中に各小片を3つずつ入れ、7日後、28日後の金属片からの溶出成分の挙動をICP-MSにて観察する。pHは2.0に調整し温度は37.5で、測定は計4回行なう。
- (3) 上記4種の金属組成のスクリューの表面構造の違いについてSEMを用いて比較検討する。さらに10か月齢のビーグル犬を4匹用い、顎骨に各種スクリューをそれぞれ12本埋入し(1種のスクリューにつき1匹)埋入直後、埋入2、4、6、8週撤去群をそれぞれ設定する。撤去後の各種スクリュー表面構造と埋入前のそれらとの変化もSEMを用いた観察、比較を行い骨様沈着物の量や損傷の程度について検討する。
- (4) トルクゲージを用いて上記(3)のビーグル犬において各種スクリューの埋入トルク値および埋入直後、埋入2、4、6、8週後の撤去トルク値の測定を行う。また埋入後のスクリューの安定性を評価するため動揺度を測定する。測定方法として、スクリューと垂直にペリオテストを3か所(各120°離れた位置)から当て、その平均値を記録する。
- (5) 実験動物として10か月齢のビーグル犬を4匹用い、スクリュー埋入8週後に全身麻酔下において、トレフィンバーを用いてスクリュー1本を含む骨ブロックを摘出する。摘出した骨ブロックは樹脂包埋を行い、スクリューの長軸方向と垂直に、マイクロトームを用い、厚さ100 μ mの非脱灰切片とする。骨ブロック摘出10日前にカルセイングリーン、3日前にテトラサイクリンの静脈内投与を行い、生体染色により1日における新生骨の形成率であるMARおよび骨形成速度であるBFRを測定する。続いて切片をピラヌエバ骨染色試薬にて染色を施し、光学顕微鏡による観察を行い、骨形態計測を行う。スクリュー周囲と周囲骨との接触率BIC、およびスクリュー周囲から240 μ mの骨の面積比率BAの2種類の項目の計測を行う。
- (6) 上記(5)のビーグル犬について、スクリュー埋入8週後に μ CT(コムスキャン ScanXmate-E090)から、骨密度BV/TVを解析し、埋入周囲骨の3次元的评价を定量的に行い各種スクリュー間で比較検討する。
- (7) 上記(5)のビーグル犬について、スクリュー埋入前、埋入2、4、6、8週後に左後足伏在静脈より3.5mlの血液採取し、ICP-MSにより血液中の含有元素(Ca、Ti、Al、V)濃度の測定、比較を行うことにより生体への安全性を評価する。

4. 研究成果

SEMによるインプラント表面の観察において、純チタン合金製スクリューとカルシウム修飾純チタン合金製スクリュー、酸エッチング純チタン合金製スクリューと酸エッチングカルシウム修飾純チタン合金製スクリューの比較より、カルシウム修飾による表面構造の違いは観察できなかった。また、表面粗さの結果において、酸エッチング純チタン合金製スクリューと酸エッチングカルシウム修飾純チタン合金製スクリューは、純チタン合金製

スクリューとカルシウム修飾純チタン合金製スクリューよりも表面が有意に粗いことから、酸エッチング処理により表面は粗くなることが明らかとなった。酸エッチング純チタン合金製スクリューと酸エッチングカルシウム修飾純チタン合金製スクリューの間に有意差は認められなかったことから、カルシウムでスクリュー表面をコーティングしても、酸エッチングによる粗面は維持されていると考えられる。さらに、XPS 解析による結果から、純チタン合金製スクリューの表面には、確実にカルシウムが接着していることが証明された。

本研究では、酸エッチング処理スクリューは酸エッチング未処理のスクリューより高い値を示したが、全ての種類のスクリューにおいて実験期間中に脱落したものは無く、埋入トルク値の値は適切であったと考えられる。

埋入後、酸エッチングカルシウム修飾純チタン合金製スクリューは他のスクリューと比較して時間依存的な撤去トルク値の上昇、Periotest 値の減少、CT による埋入周囲骨密度の上昇が有意に認められた。さらに組織形態計測学的評価から埋入 7、28 日後ともに酸エッチングカルシウム修飾純チタン合金製スクリュー周囲には他のスクリューより有意に多くの新生骨形成が認められた。埋入 28 日後に観察したカルセインとテトラサイクリンの二重ラベリングから算出される、骨形成速度を表す MAR も有意に高い値を示した。撤去後の酸エッチングカルシウム修飾純チタン合金製スクリュー表面にはアリザリン染色された石灰化物も多く確認できた。さらに、各金属箔の疑似体液浸漬時の pH 変化では、浸漬 1 日後から 28 日後まで、上昇することなく、pH7 前後の値で一定の値を呈していた。このことから、我々の研究グループが開発したカルシウム表面処理法を適応すると、従来のカルシウム修飾法の問題点であった埋入周囲の pH 上昇による細胞活性低下を引き起こすことは無くなり、埋入周囲環境では新生骨形成が起こる環境が整っていたことも考えられる。これらのデータから、酸エッチングカルシウム修飾純チタン合金製スクリューは他のスクリューより骨組織とのオッセオインテグレーションが強固に起きていることが示唆された。

本研究では、7 日と 28 日後にカルシウムとチタンの疑似体液残留元素濃度を定量評価した。浸漬 7 日および 28 日後、疑似体液中のカルシウム残留量はすべての試験片において有意差は認められなかったことから、Ca 修飾を施行した試験片においてアパタイトの界面破壊などは起こらず、カルシウム修飾試験片からのカルシウム溶出は生じていないと考えられる。また、臓器残留元素結果より、全てのスクリューとコントロール群間において有意差は認められなかったため、埋入スクリューからの元素溶出による毒性は無いと考えられる。これらの事から、本研究に用いたスクリューは生体内において毒性を示すことは無く、特にカルシウム修飾純チタンおよび酸エッチングカルシウム修飾純チタンは、歯科用インプラントのみならず、整形外科用インプラントなど用途の医療用生体埋入材料として十分な生体安全性を有していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yujiro Doe, Hiroto Ida, Masahiro Seiryu, Toru Deguchi, Nobuo Takeshita, Satoshi Sasaki, Shutaro Sasaki, Daiki Irie, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa, Teruko Takano-Yamamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Titanium surface treatment by calcium modification with acid-etching promotes osteogenic activity and stability of dental implants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materialia	6. 最初と最後の頁 100801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mtla.2020.100801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Seiryu M, Ida H, Mayama A, Sasaki S, Sasaki S, Deguchi T, Takano-Yamamoto T.	4. 巻 90
2. 論文標題 A comparative assessment of orthodontic treatment outcomes of mild skeletal Class III malocclusion between facemask and facemask in combination with a miniscrew for anchorage in growing patients: A single-center, prospective randomized controlled trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angle Orthod.	6. 最初と最後の頁 3-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2319/101718-750.1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山本 照子 (Yamamoto Teruko)		
研究協力者	清流 正弘 (Seiryu Masahiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------