

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32667
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592299
 研究課題名（和文） バイオアクティブに機能するナノアパタイト層を付与した矯正用ミニスクリューの開発
 研究課題名（英文） Development of bioactive orthodontic mini-screw with nano-apatite layer
 研究代表者
 松野 智宣（MATSUNO TOMONORI）
 日本歯科大学・生命歯学部・准教授
 研究者番号：80199827

研究成果の概要（和文）：本研究ではチタン合金表面に生体活性を付与する目的で、チタン合金に 2 種類の表面処理法を開発した。まず、3% H_2O_2 とオートクレーブによる簡便な水熱酸化処理法を開発し、Ti-6Al-4V ディスク表面にナノポーラス酸化チタン層を付与した。さらに、これをリン酸カルシウム溶液に浸漬し、ナノ HA 層を付与した。これらの表面を FGF2 液でコートし、表面解析や生物活性などを評価した。その結果、細胞増殖・分化能は有意に高まり、生体活性機能を付与することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed two surface modifications of titanium alloy that improves its biofunctional activity. The surface of a Ti-6Al-4V disk was modified by applying 3% H_2O_2 hydrothermal treatment using an autoclave. A nanostructured porous network TiO_2 was observed on the treated surface. Furthermore, the TiO_2 titan disks were immersed in the supersaturated calcium phosphate solution to formed nano-apatite layer. We evaluated the surface analysis and bioactivities for FGF2 coated modified surfaces. As the results, significantly higher cell proliferation and cell differentiation were exhibited, and enhanced biofunctional activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療において、適切な固定源を確保し、コントロールすることは治療結果を左右する重要な因子のひとつで

ある。そこで、矯正用ミニスクリューが開発され、植立あるいは除去時の外科的侵襲が減少され、歯や顎の移動が正確・確実に、短時間で行えるようになった。

その反面、このミニスクリューは脱落率が10~20%と高頻度で、逆に、骨と強固に結合すると除去時にスクリューが破断するという問題点も指摘されている。現在、市販されている純チタン製のミニスクリューは骨とオッセオインテグレーションして強固な固定源として機能するが、撤去トルクが大きくなるため、除去時に破断する危険性を伴う。また、チタン合金製やステンレス製では十分なオッセオインテグレーションが生じず、機能時に脱落しやすくなり安定性に問題が残る。そのため、ミニスクリューのサイズ、形態、材質、表面処理などデザインやドリリング法、植立トルク、荷重開始時期などが理工学的・組織学的に国内外で多数検討されてきた。また、Host Factorとして患者の年齢や性別、骨質や骨量、植立部位なども検討されている。しかし、機能的な表面性状を持つミニスクリューはいまだ開発されていない。

さらに、スクリュー表面と骨とのインテグレーションのみならず、粘膜上皮とも結合するような生体とアクティブに機能するミニスクリューはない。また、チタン表面へのアパタイト層の形成は交互浸漬法が一般的だが、我々がやっているより簡便な共沈法によるナノアパタイト層を付与した矯正用ミニスクリューは見あたらない。

2. 研究の目的

そこで我々は、ミニスクリューの表面にバイオアクティブな機能を付与し、Host Factorに左右されずに、植立初期から高い固定力を保ち、かつ除去時にも過大な撤去トルクを必要としない優れたミニスクリューの開発を着想した。

つまり、本研究は機能時の十分な骨結合性と撤去時の除去性という相反する特性、さらに感染による脱落を軽減する歯肉貫通部の上皮接着機能を有するFGF-2/ナノアパタイト層を付与したセミインテグレーション型矯正用ミニスクリューを開発することが目的である。

3. 研究の方法

(1) チタン表面へのH₂O₂水熱酸化処理

直径10mm、厚さ1.0mmのTi-6Al-4Vチタンディスク表面に、#800のSiCサンドペーパーによる機械研磨を行った後、アセトンに浸漬して超音波洗浄し、さらに100%エタノール、超純水の洗浄による前処理を行った。その後、チタンディスクを50mLの3%過酸化水素水に浸漬し、オートクレーブを用いて121°C、0.2MPaで20分間の水熱処理を行い、滅菌精製水で洗浄し、50°C、1時間乾燥させた。

(2) 表面解析および細胞培養実験

H₂O₂水熱酸化処理群のコントロールは機械研磨群として、以下の項目を検討した。

① 表面解析：SEM

SPM (scanning probe microscopy)

XPS (X-ray photoelectron spectroscopy)

② 接触角測定

③ タンパク吸着試験

④ 細胞接着試験

⑤ 細胞増殖試験

(3) HA/FGF2処理の細胞培養実験

水熱酸化処理したチタンディスクをリンゲル液、バイフィル®、クリニザルツ®の医療用輸液を共沈させた溶液に37°C24時間浸漬させ、滅菌精製水で洗浄し、50°C、1時間乾燥させ、ナノHAを析出させた。その表面にFGF2 (フィブラストスプレー®)を1µg/ml 10µl滴下し、HA/FGF2処理したチタンディスクに細胞培養を行い、水熱処理、HA処理と比較して、以下の項目を検討した。

① SEM

② 細胞増殖試験

③ 細胞分化試験

(4) ミニスクリューでの3次元培養

サンドブラストと水熱酸化処理をしたミニスクリュー表面にナノHAを析出し、FGF2を担持させた。未処理、サンドブラスト処理、水熱酸化処理、HA処理、HA/FGF2処理したミニスクリューに3次元細胞培養を行い、SEMで細胞接着性を確認した。

(5) HA引き剥がし試験

チタンディスク表面に析出したナノHAと酸化チタン層との結合状態を検討するため、セロテープによる引きはがし試験を行い、SEMで観察した。

(6) ラット大腿骨へのミニスクリュー埋入試験

水熱酸化処理と水熱酸化/FGF2処理したミニスクリューをラット大腿骨に埋入し、1か月後の除去トルクと病理組織像を観察した。

4. 研究成果

(1) H₂O₂水熱酸化処理

① 表面解析

処理前は浅く滑沢な線状の表面構造を示していたが、水熱酸化処理後は粗造で多孔性のネットワーク構造を認めた。また、XPS解析では酸化チタン層が未処理は約10nmであったが、処理後は約90nmになっていた。

② 接触角測定

処理28日後でも接触角40°C以上と有意に高い親水性を示した。(n=5, p<0.01) (図3)。

③ タンパク吸着試験

24時間後の処理表面のチトクロームCの吸着量は未処理表面の6倍であり、24、72時間ともに処理表面のタンパク吸着

量は有意に高い値を示した (n=5, $p<0.01$)。

④ 細胞接着試験

処理表面で未処理に比べ、核の大きな細胞が進展していた。

⑤ 細胞増殖試験

培養 7 日で処理群は有意に高い増殖を認めた (図 4)。

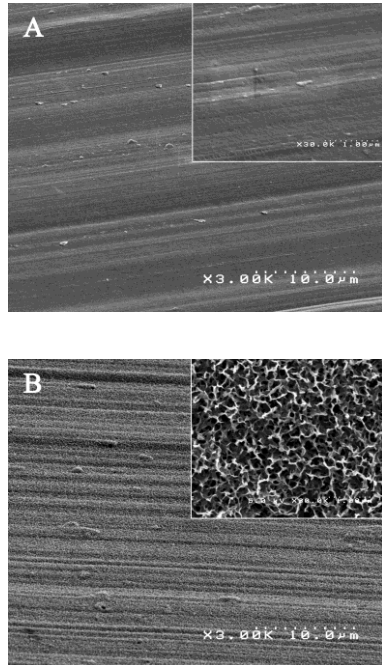


図 1 SEM 像 (A:処理前、B:処理後)

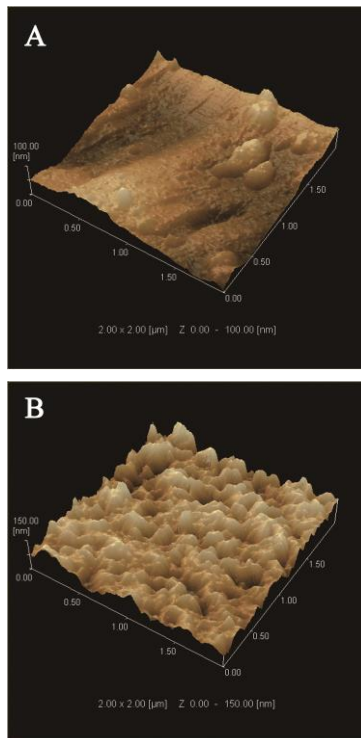


図 2 SPM 像 (A:処理前、B:処理後)

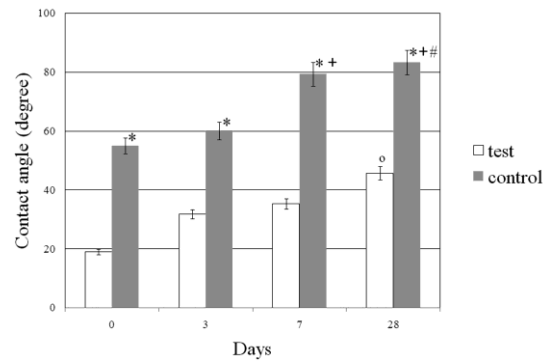


図 3 接触角の変化

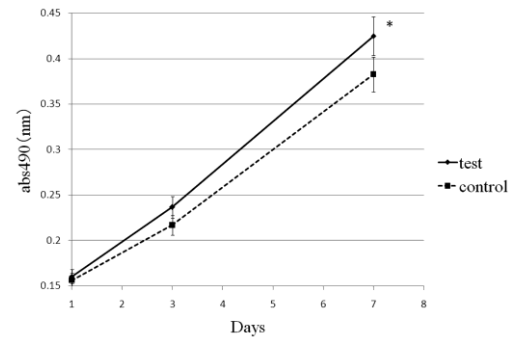


図 4 細胞増殖の変化

(2) HA 処理によるチタン表面

図 5 にナノ HA が析出したチタンディスクの SEM 像を示す。1μm 前後の HA 粒子が確認できる。

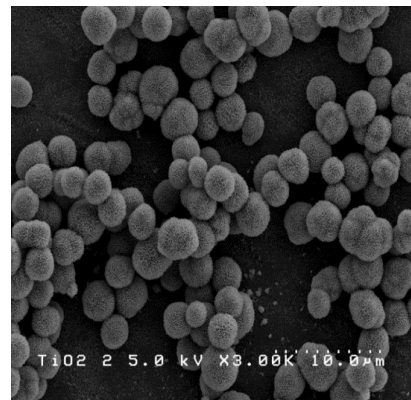


図 5 HA 析出後のチタン表面の SEM 像

(3) HA/FGF2 処理の細胞培養実験

図 6 に水熱酸化処理、HA 処理、HA/FGF2 処理後して細胞分化培養 7 日目の SEM を示す。また、図 7, 8 に細胞増殖と分化の変化を示す。HA/FGF2 処理群がいずれも有意に高い値を示した。

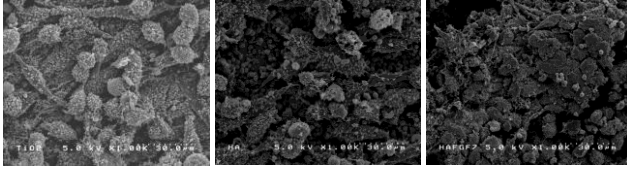


図6 細胞培養7日目のSEM像
(左から水熱酸化処理、HA処理、HA/FGF2
処理)

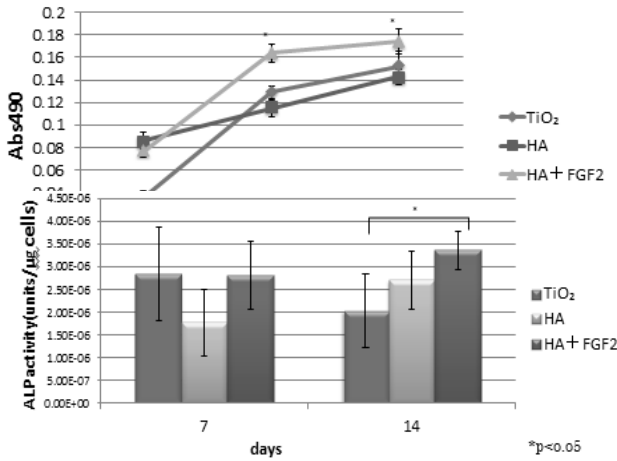


図7 細胞増殖能

図8 細胞分化能

(4) ミニスクリューでの3次元培養

図9にHAとHA/FGF2処理したミニスクリューでの3次元培養1日目のSEM像を示す。FGF2処理したものが細胞増殖している。

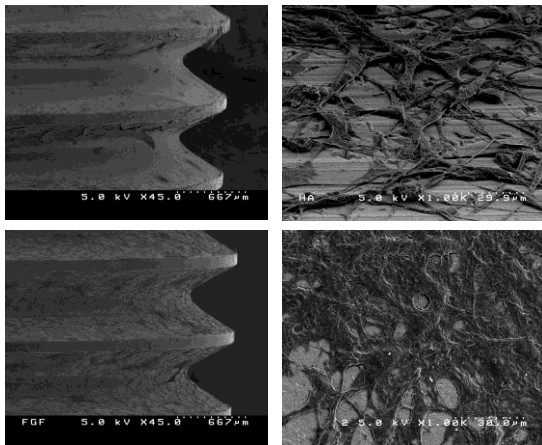


図9 ミニスクリューでの3次元培養
(上: HA処理、下: HA/FGF2処理)

(5) HA引き剥がし試験

図10にHA処理したチタンディスク表面にテープ貼付して剥がした後のSEM像を示す。

HA粒子が容易に剥離されていることが確認された。そこで、動物埋入実験ではHA処理せず、水熱酸化/FGF2処理のミニスクリューを用いることにした。

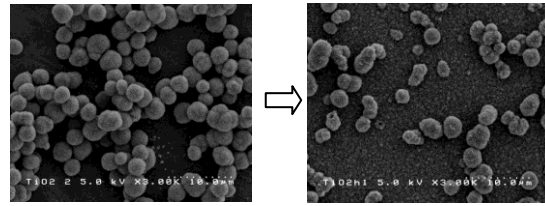


図10 引き剥がし試験

(6) 水熱酸化/FGF2処理ミニスクリューの埋入試験

図11にラット大腿骨に埋入後1か月のスクリュー除去後のHE像を示す。FGF2処理によりスクリューに接していた部位に新生骨の形成が認められる。

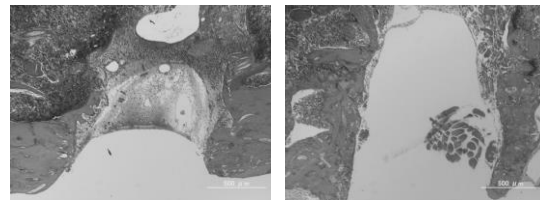


図11 スクリュー除去後のHE像
(左: 未処理、右: 水熱酸化/FGF2処理)

なお、抜去トルクではやや水熱酸化/FGF2処理群が高い値を占めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Yuya YONEYAMA, Tomonori MATSUNO, Yoshiya HASHIMOTO, Tazuko SATOH, *In vitro* evaluation of H₂O₂ hydrothermal treatment of aged titanium surface to enhance biofunctional activity, *Dental Materials Journal*, 査読有、32(1),2013,115-121
DOI: 4012/dmj.2012-087JOIJST.JSTAGE/dmj/2012-087

[学会発表] (計5件)

- ① 米山勇哉, 他, 過酸化水素水を用いた水熱処理による酸化チタン膜の形成とその表面解析、第9回日本再生歯科医学会、平成23年9月10日、大阪国際会議場
- ② 松野智宣, 他, 暫間用ミニインプラントの早期 integration のためのナノ酸化チタンフィルム形成、第15回日本学顔面イ

- ンプラント学会、平成 23 年 12 月 3, 4 日、幕張メッセ国際会議場
- ③ 齋藤沙耶, 他、Bioactive に機能する矯正用ミニスクリューの開発、第 66 回日本口腔科学会、平成 24 年 5 月 17, 18 日、広島国際会議場
 - ④ 齋藤沙耶, 他、HA/FGF2 処理によるチタン表面の bioactivity の評価、第 32 回日本歯科薬物療法学会、平成 24 年 6 月 30 日, 7 月 1 日、大阪国際会議場
 - ⑤ 齋藤沙耶, 他 bFGF2 含浸 HA 矯正用ミニスクリューの生体親和性の検討、第 16 回日本歯科薬物療法学会、平成 24 年 12 月 1, 2 日、北九州国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野智宣 (MATSUNO TOMONORI)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授
研究者番号：80199827

(2) 研究分担者

小俣和彦 (OMATA KAZUHIKO)
日本歯科大学・生命歯学部・非常勤講師
研究者番号：00434142

橋本典也 (HASHIMOTO YOSHIYA)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：20228430

佐藤田鶴子 (SATO TAZUKO)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号：40095138

山崎淳司 (YAMAZAKI ATSUSI)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：70200649

大野忠夫 (ONO TADAO)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：90160580

(3) 連携研究者

なし