

歯科矯正用アンカースクリューへの応用を目的とした

PGA/HAp 複合体の評価

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

高橋 桃子

(指導：葛西 一貴 教授)

1. 要 旨

2. 緒 言

3. 材料および方法

3-1. PGA/HAp 複合体の作製

3-2. 生物学的試験

1) *in vitro* 研究

(1) MC3T3-E1 細胞培養

(2) Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR 法)

(3) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA法)

(4) アリザリンレッド S 染色

2) *in vivo* 研究

(1) 実験動物及び飼育条件

(2) ラット頭蓋骨埋入試験

(3) μ CT による新生骨の評価

3-3. 機械的試験

1) XRD 解析

2) 3点曲げ試験

3) ダイナミック硬さ試験

3-4. 統計解析

4. 結 果

4-1. 生物学的試験

1) *in vitro* 研究

(1) COL-1, ALP および OCN の mRNA 発現

(2) COL-1, ALP および OCN のタンパク質発現

(3) アリザリンレッド S 染色

2) *in vivo* 研究

4-2. 機械的試験

1) XRD 解析

2) 曲げ強さおよび曲げ弾性率

3) ダイナミック硬さおよび弾性率

5. 考察

6. 結論

7. 参考文献

8. 図および表

要旨

アンカースクリューを固定源とした矯正治療では、様々な方向に歯を移動することが可能となり、治療効果が飛躍的に向上したが、治療中の脱落や破折といった偶発症も問題となっている。本研究では生体吸収性材料であるポリグリコール酸 (Polyglycolic acid, PGA) を主成分とし、骨適合性に優れるとともに最終的には生体内に吸収される新規なアンカースクリューの開発を行うことを目的とし、その一環として、本実験では PGA にハイドロキシアパタイト (HAp) を配合した複合体を試作し、その生物学的評価、構造解析および機械的評価を検討した。

試料は PGA を基材として、HAp を質量パーセントで 0 % (PGA100), 5 % (PGA95/HAp5), 10 % (PGA90/HAp10), 30 % (PGA70/HAp30), 50 % (PGA50/HAp50) 配合した 5 種類の複合体を作製した。骨芽細胞様細胞を *in vitro* で複合体ディスク上に培養し、骨増生の指標である I 型コラーゲン (COL-1), アルカリフォスファターゼ (ALP), オステオカルシン (OCN) の遺伝子およびタンパク質の発現を Real-time PCR 法および ELISA 法にて調べた。また、アリザリンレッド S 染色にて石灰化を可視化した。また、*in vivo* 実験としてラットを用いて試料の骨形成誘導能を評価するため、ラットの頭蓋骨に試料を埋入した後、Micro-computed tomography (μ CT) にて調査した。一方、構造解析および機械的評価として、エックス線構造解析 (XRD 解析) にて結晶相の同定を行い、加えて 3 点曲げ試験とダイナミック硬さ試験を行った。

本研究の結果、生物学的評価では HAp 濃度に依存して骨芽細胞様細胞が産生する COL-1, ALP, OCN の遺伝子発現量とタンパク質発現量が増加した。また、石灰化結節能を評価したところ、HAp の濃度依存的に増加した。*in vivo* においては、 μ CT 像にてディスク埋入直後と比較して 4 週間後にすべての群で欠損の周囲に骨の形成が確認された。新生骨の定量化では PGA/HAp 複合体群で HAp の濃度依存的に骨の増加を認め、

PGA100 と比較して PGA70/HAp30 および PGA50/HAp50 では有意な増加が認められた。機械的試験では、曲げ強度、曲げ弾性率、ダイナミック硬さおよび弾性率ともに PGA95/HAp5 は PGA100 や PGA90/HAp10 と比較し、最も高い値を示した。また、これらの PGA/HAp 複合体はヒト皮質骨に近似した値を示した。

以上の結果より、PGA/HAp 複合体は骨基質産生と石灰化を促進し、骨増生することが認められた。また、PGA/HAp 複合体は皮質骨に近似した機械的特性を持つことがわかった。以上により、PGA/HAp 複合体は生体親和性が高く、金属アレルギーの心配のない新規なアンカースクリューの材料として有用であることが示唆された。

緒言

歯科矯正治療において、固定源の確保は治療を進めていく上で最も重要な要件であり、従来より顎間固定や顎外固定が用いられてきた。しかしこれらの装置は患者の協力性に強く依存するものであり、外観の大きさや違和感も大きいものである。そこで近年、患者の協力性に影響されない確実な固定源として、矯正用アンカースクリューが広く用いられるようになった。アンカースクリューを用いた矯正ではより自由な方向に歯を移動することが可能となった。そのため、従来困難とされてきた大白歯の遠心移動や圧下移動が可能となり、治療期間の短縮、治療達成度の向上が示されてきた[1-6]。既存のアンカースクリューは主原料として硬組織に対する生体親和性が良好であるチタンバナジウム合金や純チタンが使用されているが[7, 8], Tscernitschek ら[9]はこれらの金属でも金属イオン溶出に伴う金属アレルギーについて報告している。また、アンカースクリューは偶発症として動揺や脱落率が高い問題[10]や、成長期小児においては骨が未成熟なことから脱落率が高い[11]との報告があり、使用が制限されてしまう場合もある。さらに、矯正治療終了後には骨内から除去するため、再度観血処置が必要となる。飯嶋[12]は骨内でアンカースクリューが破折してしまった場合、スクリューの挿入部位の治癒後では撤去はより難しくなると報告している。

生体内分解吸収性とは、生理的条件下で分解され、その分解物が組織内の代謝過程で吸収され、最後は体外に排泄される性質をいう。現在、医療目的における生体吸収性ポリマーは、組織の縫合に用いる縫合糸や、骨折・骨移植・骨折時の固定ネジ、細胞増殖・組織再生の足場などに用いられている。これらの材料で代表的なものとしてPGA やポリ乳酸 (PLLA) があげられる[13]。どの材料を選択するかは、治療目的として必要な機械的特性や、分解までに要する時間を基準として選択される。生体吸収性アンカースクリューの条件としては①矯正力に耐えられる強度がある、②強度が一定

期間持続したのちに、その後に吸収する、③生体為害性がないことなどが考えられる。今回、主原料として選択した PGA は生体吸収性ポリマーの中でも剛性が高いものである。PGA はエステル結合の切断によりグリコール酸に分解され、尿中に排泄されるか、もしくはクエン酸回路から二酸化炭素と水に分解されるため、生体安全性も高い材料である[13]。

HAp (ハイドロキシアパタイト) は優れた生体適合性を持つことから、生体材料として主に利用されている。HAp は骨組織内の欠損部に埋入すると、周囲骨からの新生骨の生成を阻害せず骨形成を促進することが知られている[14]。近年、HAp コーティングを施した歯科用インプラントが多用されており、HAp は術後早期から骨誘導能を持ち、骨質の乏しい部位や抜歯早期の部位にも適応できるようになった[15]。また、Hamada ら[16]は PLLA と HAp の複合体が優れた骨形成誘導能を有し、骨再生の足場として有用であると報告している。

本研究では、生体吸収性ポリマーである PGA と生体材料である HAp を複合させることで、生体適合性および機械的性質が高く、金属アレルギーの方や若年者にも適応可能な生体吸収性アンカースクリューの開発を目的とした。生物学的評価として PGA/HAp 複合体上にマウス骨芽様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を培養し、骨芽細胞の分化・増殖の指標として I 型コラーゲン (COL-1)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (OCN) の遺伝子発現とタンパク質発現を確認した。またアリザリンレッド S 染色による石灰化の検討を行った。さらに *in vivo* 実験において、ラット頭蓋骨削除に試料を埋入し Micro-computed tomography (μ CT) での新生骨の評価を行った。構造解析および機械的評価は、X 線同定装置による複合体の結晶相の同定、HAp の配合率による 3 点曲げ試験、およびダイナミック硬さ試験による機械的強度の違いについて検討を行い、アンカースクリューの応用への可能性について考察を行った。

材料及び方法

1. PGA/HAp 複合体の作製

実験に用いる材料として PGA (BioDegmer®) はビーエムジー (Kyoto, Japan) より、HAp は太平化学産業 (Osaka, Japan) より購入した。PGA と HAp を二軸押出機 (Technovel, Osaka, Japan) を用いて熔融混合することでPGA/HAp複合体ペレットを作製した。これらを真空中で 240°Cに設定した真空プレス機 (Shinto kinzoku, Osaka, Japan) を用いて、プレス成形によりペレットから PGA/HAp シートを調製した。アパタイトの混合比は、生物学的特性および機械的特性にどのように影響するかを調べるために、HAp の質量パーセントで 0 % (PGA100), 5 % (PGA95/HAp5), 10 % (PGA90/HAp10), 30 % (PGA70/HAp30), 50 % (PGA50/HAp50) の異なる混合比で作製した (Fig.1)。

2. 生物学的試験

1) *in vitro*研究

(1) MC3T3-E1細胞培養

骨芽細胞のモデルとして使用した MC3T3-E1 細胞は、理研バイオリソースセンターから購入した。培養液は 10 %ウシ胎児血清 (FCS : Cell Culture Laboratories, OH, USA) および抗生物質 (100 µg/ml ペニシリン, 50 µg/ml ゲンタマイシン, 0.3 µg/ml アンホテリシン B : Sigma Chemical Co., MO, USA) を含む α -MEM 培地 (Wako, Osaka, Japan) を用いた。細胞は 5 % CO₂ インキュベーター (Forma CO₂ incubator MIP-3326, Sanyo Electric Medical System Co., Tokyo, Japan) 内で 37°Cの条件下で培養を行った。MC3T3-E1 細胞の培養条件は 24-well microtiter plate (AGC Techno Glass, Shizuoka, Japan) 内に、プレート底面と同サイズのディスク状に成型した PGA/HAp 複合体 (直径 15

mm, 厚さ 2 mm) を配置し, α -MEM で 細胞を懸濁後 1.2×10^4 cell/well に調整し, ディスク上に播種して 1, 4, 7, 10 日間培養を行った。培養液は 1, 4, 7, 10 日に新鮮なものを入れ換え, 古い培養液はタンパク質発現解析のため -20°C で保存した。

(2) Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR 法)

total RNA の抽出は RNeasy Mini-kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いた。PrimeScript RT reagent Kit (Takara, Tokyo, Japan) を用いて, cDNA を作成し, SYBR Premix Ex Taq (Takara) 存在下でサーマルサイクラー (TP-800 Thermal Cycler Dice, Takara) を用いて real-time PCR を遂行した。PCR 反応は, DNA 変性 (95°C , 5 秒間), アニーリングおよび伸長を (60°C , 30 秒) の 2 ステップ法にて 40 サイクルおこなった。同一実験を 3 回繰り返した。また, 1 回の実験で 4 well を使用し, その平均値と使用した。COL-1, ALP, OCN ならびに GAPDH のプライマーはタカラバイオ株式会社から購入した。プライマーの塩基配列は以下の通りである。

COL-1

Forward: 5'-GACATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC-3'

Reverse: 5'-GGGACCCTTAGGCCATTGTGTA-3'

ALP

Forward: 5'-GCAGTATGAATTGAATCGGAACAAC-3'

Reverse: 5'-ATGGCCTGGTCCATCTCCAC-3'

OCN

Forward: 5'-CCAGACCTAGCAGACACCATGAG-3'

Reverse: 5'-TAGCGCCGGAGTCTGTTCAC-3'

GAPDH

Forward: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

Reverse: 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

(3) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA法)

保存しておいた培養上清中に含まれる COL-1, ALP および OCN のタンパク質量を測定した。各タンパク質量は, Collagen Type I ELISA kit (Uscn Life Science Inc., TX, USA), Alkaline phosphatase ELISA kit (Uscn Life Science Inc., TX, USA), および Osteocalcin ELISA kit (Uscn Life Science Inc. TX, USA) を用いて測定した。すべての測定手順はプロトコールに従い行い, 実験は2回繰り返す, 1回の実験で4 well 中に含まれていた培養液を測定し, その平均値を用いた。

(4) アリザリンレッド S 染色

培養中の細胞による石灰化程度を視覚化するために, アリザリンレッド S 染色を行った。24-well microtiter plate (AGC Techno Glass) 内に, プレート底面と同サイズのディスク状に成型した PGA/HAp 複合体 (直径 15 mm, 厚さ 2 mm) を配置し, 1.2×10^4 cell/well に細胞を播種して最大 14 日間培養をおこなった。ディッシュを PBS で 3 回洗浄したのち, 4 %パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し, アリザリンレッド溶液 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) で 30 分間染色し, 滅菌水で洗浄後, 染色像を倒立顕微鏡で観察した。

さらに, 石灰化の程度を数値化するため, 石灰化結節色素溶解液 (PG Research, Tokyo, Japan) を加え, プレーートを 10 分間攪拌して色素を溶出したのち, 96-well

microtiter plate (AGC Techno Glass) に溶出液を移し、マイクロプレートリーダー (SUNRISE Rainbow Thermo RC-R, Tecan, Kanagawa, Japan) を用いて波長 450 nm における吸光度を測定した。同一実験を 3 回行い、4 well を 1 群とし、その平均値を測定値とした。

2) *in vivo* 研究

(1) 実験動物及び飼育条件

本動物実験は日本大学松戸歯学部動物実験倫理に関する指針 (承認番号 第 AP13MD010 号) に準じて行った。実験には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット (Sankyo labo service, Tokyo, Japan) を合計 25 頭用いた。飼育管理を日本大学松戸歯学部実験動物センターにて行い、固形飼料、飲料水、床敷ならびにケージは全て滅菌したものを使用した。

(2) ラット頭蓋骨埋入試験

25 頭のラットはそれぞれ 1 群につき 5 頭ずつ 5 群 (PGA100 群, PGA95/HAp5 群, PGA90/HAp10 群, PGA70/HAp30 群, PGA50/HAp50 群) に分類した。埋入方法は Shinozaki ら[17]の方法を参考にした。全ての行程は、ペントバルビタールナトリウム (15 mg/kg body weight) を腹腔内投与し、全身麻酔下で実施した。ラット頭頂部の皮膚をグルコン酸クロルヘキシジンとエタノールで消毒後、剃毛し、切開線を入れ、皮膚を反転して骨膜弁を剥離反転した。トレフィンバーをマイクロモーターに装着し、注水下に円形の骨削除 (直径 8 mm) を作成し、ディスク状の PGA/HAp 複合体 (直径 4 mm, 厚さ 2 mm) を欠損部に埋入し、骨膜と皮膚をそれぞれ縫合した (Fig.2)。

(3) μ CT による新生骨の評価

新生骨の評価は, *in vivo* μ CT system (Rigaku, Tokyo, Japan) を用いて行った。埋入直後 (0 日) から 1 週ごとに, 4 週後まで 50 KV/500 μ A の線量で μ CT 撮影を行った。欠陥内の新しい骨形成の割合は, 欠損作成した時の領域の面積に対する新生骨の面積の割合で求めた。 μ CT スライス画像上で新たに形成された骨領域は, WinROOF 画像解析ソフト (Mitani, Tokyo, Japan) を用いて, 水平方向に二次元的に定量化した。すべての測定は 5 回実施した。

3. 機械的試験

(1) XRD 解析

結晶相の同定を行なうために XRD 解析を行った。試験体は長さ 10.0 mm, 幅 10.0 mm, 厚さ 3.1 mm とした。理学電機社製の湾曲結晶モノクロメーター付き RAD-B システムを X 線同定装置として用いた。XRD 測定条件は, 線源 Cu ($\text{CuK}\alpha$), 管電圧 40 kV, 管電流 20 mA, スキャンステップ 0.010° , スキャンスピード $4^\circ/\text{min}^{-1}$, 発散スリット 1° , 散乱スリット 1° , 受光スリット 0.15 mm, 走査範囲 2θ は $2\sim 70^\circ$ である。生成物の結晶相の同定は JCPDS カード (No.9-432 HAp) を用いて Hanawalt 法で行った。

(2) 3 点曲げ試験

曲げ特性を評価するために, JIS K7171[18]に準じて 3 点曲げ試験を行った。3 点曲げ試験では, 長さ 85.0 mm, 幅 12.7 mm, 厚さ 3.1 mm の PGA/HAp 試験体を用いた。3 点曲げ治具 (支点間距離 50 mm) に設置し, インストロン万能試験機 (TG-5kN, Minebea, Tokyo, Japan) を用いて負荷速度 2 mm/min で曲げ荷重を与えることにより 3 点曲げ試験を行った (Fig.3)。得られた応力-ひずみ曲線図における最大応力値を曲

げ強度とし、曲げ弾性率は初期直線部分 (比例限) の傾きから算出した。なお試験体数は 10 本とした。

(3) ダイナミック硬さ試験

複合体表面の微小特性を明らかにするために、各試験体表面に Berkovich 圧子を押し込み、負荷－除荷試験を行うことでダイナミック硬さおよび弾性率の測定を行った。試験体は長さ 10.0 mm、幅 10.0 mm、厚さ 3.1 mm とした。ダイナミック超微小硬度計 (DUH-211, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、最大荷重 196.10 mN、負荷速度 13.32 mN/秒、荷重保持時間 15 秒の条件で行った (Fig.4)。得られた微小荷重－押し込み深さ線図より、ダイナミック硬さおよび弾性率を算出した。なお試験体数は 10 個とした。

4. 統計解析

すべての結果は、各群の平均±標準偏差 (mean±S.D.) で表記した。結果については各データに対し、one way analysis of variance (ANOVA) を行い、Mann-Whitney *U* test を用いて統計分析を行い、危険率 5 %未満を有意差のあるものとした。

結果

1. 生物学的試験

1) *in vitro* 研究

(1) COL-1, ALP および OCN の mRNA 発現

PGA/HAp 複合体上の MC3T3-E1 細胞における COL-1, ALP および OCN の mRNA 発現の結果を Fig.5 に示す。COL-1 および ALP の mRNA 発現量は 7 日にピークを示し、OCN の mRNA 発現量は 10 日まで増加した。すべての群において HAp の濃度依存的に増加が認められた。

(2) COL-1, ALP および OCN のタンパク質発現

PGA/HAp 複合体上の MC3T3-E1 細胞における COL-1, ALP および OCN のタンパク質発現の結果を Fig.6 に示す。COL-1, ALP および OCN のタンパク質発現量は、コントロールである PGA100 (HAp 0%) と比較して、時間依存的、HAp の濃度依存的に増加が認められた。

(3) アリザリンレッド S 染色

PGA/HAp 複合体上の MC3T3-E1 細胞におけるアリザリンレッド S 染色の結果を Fig.7A に示す。14 日目の画像では、HAp の添加量が多くなるにつれ、赤色の石灰化結節の形成が多く認められた。また染色された石灰化結節の定量化では HAp の濃度依存的に増加が認められ、コントロールである PGA100 と比較し、すべての PGA/HAp 複合体群において有意に増加が認められた。

2) *in vivo* 研究

PGA/HAp 複合体のラット頭蓋冠への埋入 0 日後と 4 週後の μ CT 画像と新生骨の割合を示したグラフが Fig.8A, B である。PGA/HAp 群は時間依存的に欠損領域に多くの新生骨が認められた。コントロールである PGA100 群に対し, PGA70/HAp30 群, PGA50/HAp50 群はすべての週において新生骨の形成量が有意に増加した。

2. 機械的試験

1) XRD 解析

PGA/HAp 複合体の XRD 回折の結果を Fig.9 に示す。すべての条件において, PGA の回折パターンが確認された。HAp を配合した条件において, 結晶化した HAp の回折パターンが確認され, HAp の配合比の増加に伴い, 結晶化した HAp の回折線強度の増加が認められた。

2) 曲げ強さおよび曲げ弾性率

PGA/HAp 複合体と曲げ強さ, 曲げ弾性率の結果, およびヒト皮質骨および純チタンの機械的性質の比較を Table 1 に示す。純チタンおよびヒト皮質骨の機械的特性の値は文献値[19-22]であり, アンカースクリューを歯槽骨に埋入することを考慮して併記した。曲げ強度および曲げ弾性率は PGA95/HAp5 が最も大きく, PGA90/HAp10 は PGA100, PGA95/HAp5 より小さい値を示した。曲げ特性においては, PGA/HAp 複合体は純チタンと比較して低い値を示したが, ヒト皮質骨とは比較的近似した値を示した。

3) ダイナミック硬さおよび弾性率

ダイナミック硬さ、弾性率の結果を Table 1 に示す。ダイナミック硬さおよび弾性率においても PGA95/HAp5 が最も大きく、PGA100 と比較して高い値であった。また、PGA90/HAp10 においても PGA100 と比較して高い値を示した。すべての PGA/HAp 複合体において、ダイナミック硬さは純チタンに比べて低い値を示した。

考察

本研究では、*in vitro* において骨形成量の検討の方法として、PGA/HAp 複合体ディスク上における MC3T3-E1 細胞の COL-1, ALP および OCN の mRNA 発現量、タンパク発現量を測定することにより、初期の骨形成量の検討を行った。骨形成過程は、骨芽細胞は増殖期、成熟期および石灰化期の 3 つの段階に分けられるが、骨芽細胞は増殖期に COL-1、成熟期に ALP、石灰化期において細胞外基質マトリックスの OCN やオステオポンチンなどの非コラーゲン性カルシウム結合タンパク質を発現する。ALP は骨芽細胞分化過程の初期のマーカーとして知られており [23]、骨、軟骨、歯根セメント質および象牙質などの石灰化の過程において重要な役割を果たしていると報告されている [24]。また、OCN は骨芽細胞によって分泌され、石灰化期において主に発現されるため、後期段階のマーカーで知られており、HAp の結合と堆積のために必要な非コラーゲン性タンパク質である [25]。

Real-time PCR 法において COL-1 と ALP の mRNA 発現量は 7 日後に、OCN の mRNA 発現量は 10 日後に最大値を示し、HAp の濃度依存的に増加が認められた (Fig.5)。また、ELISA 法によるタンパク質発現でも時間依存的、濃度依存的に増加が認められた (Fig.6)。これらの結果から、PGA/HAp 複合体は、骨芽細胞分化の過程を促進し、COL-1、ALP および OCN の産生を介して骨形成を誘導することができることを示唆している。

アリザリンレッド S 染色は *in vitro* において石灰化を可視化し、カルシウム沈着を検討するための標準的な方法である。培養 14 日後に PGA/HAp 複合体群に顕著な染色像と石灰化結節が観察された (Fig.7A)。14 日後のアリザリンレッド S 染色像で示されるように、COL-1、ALP 産生のピークの後に骨芽細胞分化の後期である石灰化期に移行したと考えられる。また、石灰化結節は HAp の濃度依存的に増加し、PGA100 と比較して PGA/HAp 複合体群すべてにおいて有意に大きい値を示したことから、PGA/HAp 複合体は石灰化結節の形成を促進することが示唆された (Fig.7B)。

次に *in vivo* において、ラット頭蓋骨に埋入することにより μ CT にて骨形成量の評価を行った。新生骨の面積は経時的に、HAp の濃度依存的に増加することが認められた (Fig.8B)。 *in vitro* での結果が *in vivo* でも同様に認められたことから、PGA/HAp 複合体は骨芽細胞の増殖・分化と骨の石灰化を促進することが示唆された。

PGA/HAp 複合体でアンカースクリューを作製し、これを矯正治療に応用した場合、すなわち、皮質骨に埋入する際、および矯正中にはこの複合体に曲げモーメントが発生すると考えられる。そこで、PGA/HAp 複合体の曲げ試験を行うこととした。しかし、PGA70/HAp30 および PGA50/HAp50 複合体は、粘度が高く流動性が低いことにより、プレス成形法では、長さ 85.0 mm、幅 12.7 mm、厚さ 3.1 mm の大きな曲げ試験の試験体を均一に作製することができなかつたため、PGA100、PGA95/HAp5 および PGA90/HAp10 複合体について曲げ試験を行った。その結果、PGA に対する HAp の配合率を 10 %まで増加しても、曲げ強さ、曲げ弾性率の低下は認められず、PGA の機械的な強さが維持されることが明らかとなった。 *In vivo* 試験では、HAp の配合率の増加とともに新生骨生成量が増大していることから、今後 PGA70/HAp30 および PGA50/HAp50 複合体についても曲げ強さの測定が必要であると考えられる。そのため、PGA70/HAp30 および PGA50/HAp50 複合体の粘度を低下させ、流動性を向上

させる必要があり,PGA の分子量および成形法が成形体の性状に及ぼす影響についても検討する必要があると考えられる。

これまで矯正治療に使用されているチタン製のアンカースクリューでは,チタンと骨との機械的性質に差が大きいため,アンカースクリュー周囲の骨基質にマイクロクラックが生じることが報告されている[26]。しかし,本研究で作製したPGA/HAp 複合体は純チタンに比べて曲げ強度,曲げ弾性率の値は低いものの,ヒト皮質骨と近似した値を示していることから,PGA/HAp 複合体で作製したアンカースクリューに矯正力が負荷されたときに歯槽骨とPGA/HAp 複合体とは協調して変形するものと推測され,歯槽骨の破壊は起こりにくいと考えられる。

PGA に HAp を配合することによりPGA/HAp 複合体のダイナミック硬さ,弾性率とともに向上するが,その値は純チタンの値に比べて低いことから,埋入法にはセルフタッピング法が望ましいと考えられる。今後,埋入方法や,牽引方向などを検討していく必要があるものの,アンカースクリューの材料として十分な機械的強度を有し,臨床応用できる可能性が示唆された。

結論

生体吸収性のアンカースクリューの作製を目的とした材料の検討としてPGA/HAp 複合体を作製し,生物学的評価,構造解析および機械的評価を行い以下の結論を得た。

1. 生物学的評価では *in vitro* において,PGA/HAp 複合体が MC3T3-E1 細胞の COL-1, ALP, OCN の遺伝子発現,タンパク質発現および石灰化結節の形成を促進した。
in vivo においても,PGA/HAp 複合体によりラット頭蓋の骨削除に新生骨形成を認めた。PGA/HAp 複合体は HAp の濃度に依存して骨形成誘導能の上昇を認めた。

2. 機械的試験では、PGA に対する HAp 複合率を 10 %まで増加しても PGA の機械的強度は維持されることが認められた。PGA/HAp 複合体は純チタンに比較して曲げ強度、曲げ弾性率の値は低いものの、ヒト皮質骨の値には近似していることが明らかとなった。

PGA/HAp 複合体は、ヒト皮質骨と同程度の強度であることが示され、周囲に新生骨の増生を促すことによって、より生体親和性が高く強固な固定源となり、また矯正力が負荷される際に、歯槽骨と強調して変形することが考えられる。

以上の結果から、PGA/HAp 複合体は新規なアンカースクリューの材料として有用であることが示唆された。

文献

1. Kanomi R. Mini-implant for orthodontic anchorage. *J Clin Orthod* 31:763-767, 1997.
2. Freudenthaler JW, Haas R, Bantleon HP. Bicortical titanium screws for critical orthodontic anchorage in the mandible: a preliminary report on clinical applications. *Clin Oral Implants Res* 12:358-363, 2001.
3. Bae SM, Park HS, Kyung HM, Kwon OW, Sung JH. Clinical application of micro-implant anchorage. *J Clin Orthod* 36:298-302, 2002.
4. Park HS, Kyung HM, Sung JH. A simple method of molar uprighting with micro-implant anchorage. *J Clin Orthod* 36:592-596, 2001.
5. Herman RJ, Currier GF, Miyake A. Miniimplant anchorage for maxillary canine retraction: a pilot study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130:228-235, 2006.
6. Kim TW, Kim H, Lee SJ. Correction of deep overbite and gummy smile by using a mini-implant with a segmented wire in a growing Class II Division 2 patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130:676-685, 2006.
7. Yamaguchi K, Konishi H, Hara S, Motomura. Biocompatibility studies of titanium-based alloy pedicle screw and rod system: histological aspects. *Spine J* 1:260-268, 2001.
8. Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE. Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res* 54:209-215, 2001.
9. Tscernitschek H, Borchers L, Geurtsen W. Nonalloyed titanium as a bioinert metal—a review. *Quintessence Int* 36:523-530, 2005.

10. Schätzle M, Männchen R, Zwahlen M, Lang NP. Survival and failure rates of orthodontic temporary anchorage device: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20:1351-1359, 2009.
11. 日本矯正歯科学会: 歯科矯正用アンカースクリューガイドライン. 1-25, 2012.
12. 飯島雅弘. アンカースクリューの破折について. *北海道矯正歯科学会雑誌* 41:17-23, 2013.
13. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21:2335-2346, 2000.
14. 澁谷俊昭, 金山圭一. 歯槽骨欠損に対する各種人工リン酸カルシウム系材料と成長因子. *日本歯周病学会会誌* 56 : 375-378, 2014.
15. Lee SW, Hahn BD, Kang TY, Lee MJ, Choi JY, Kim MK, Kim SG. Hydroxyapatite and collagen combination-coated dental implants display better bone formation in the peri-implant area than the same combination plus bone morphogenetic protein-2-coated implants, hydroxyapatite only coated implants, and uncoated implants. *J Oral Maxillofac Surg* 72:53-60, 2014.
16. Hamada Y, Fujitani W, Kawaguchi N, Daito K, Niido T, Uchinaka A, Mori S, Kojima Y, Manabe M, Nishida K, Arita K, Nakano T, Matsuura N: The preparation of PLLA/calcium phosphate hybrid composite and its evaluation of biocompatibility. *Dent Mater J* 31:1087-1096, 2012.
17. Yosuke S, Tsukasa Y, Yuichiro Y, Hirifumi K and Tadao F. Osteogenic evaluation of DNA/protamine complex paste in rat cranial defects. *J.Hard Tissue Biology* 22: 401-408, 2013.

18. 日本規格協会: JIS K7171 プラスチック-曲げ特性の求め方.1-16, 2008.
19. Reilly DT, Burstein AH. Review article. The mechanical properties of cortical bone. *J Bone Joint Surg Am* 56:1001-1022, 1974.
20. Reilly DT, Burstein AH, Frankel VH. The elastic modulus for bone. *J Biomech* 7:271-275, 1974.
21. 江頭有三, 丸藤雅義, 前川修一郎, 田村郁, 吉田貴光. インプラント材としてのチタンの熱処理温度と疲労破壊の関係. *日口腔インプラント誌* 23:12-20, 2009.
22. 和田賢一. チタン鑄造体の曲げ特性に関する研究. *歯科材料・器械* 12: 225-241, 1993.
23. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop* 18: 444-448, 2007.
24. Beertsen W, Van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the deposition of calcified layers in relation to dentin: an in vitro study to mimic the formation of afibrillar acellular cementum. *J Dent Res* 70: 176-181, 1991.
25. Chou YF, Dunn JC, Wu BM. In vitro response of MC3T3-E1 pre-osteoblasts within three-dimensional apatite-coated PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75: 81-90, 2005.
26. Shank SB, Beck FM, D'Atri AM, Huja SS. Bone damage associated with orthodontic placement of miniscrew implants in an animal model. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 141:412-8, 2012.

図および表

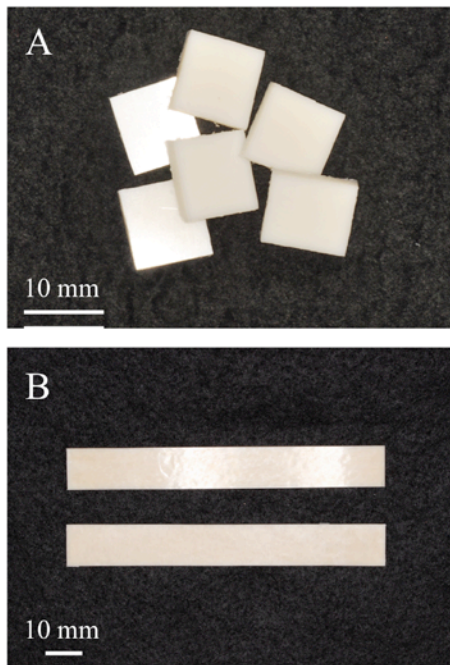


Fig.1 PGA/HAp 複合体

- (A) XRD解析, ダイナミック硬さ試験
- (B) 3点曲げ試験

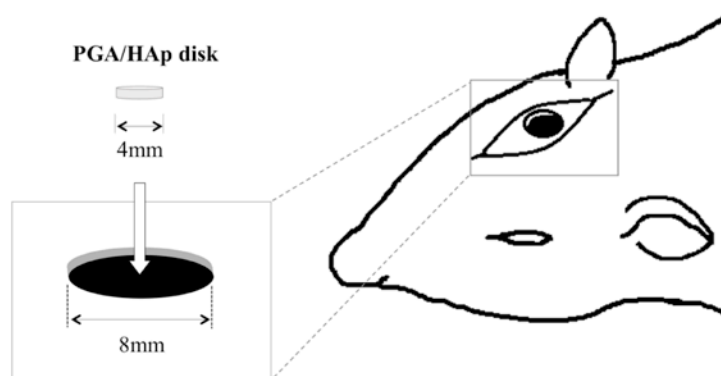


Fig.2 ラット頭蓋骨埋入試験

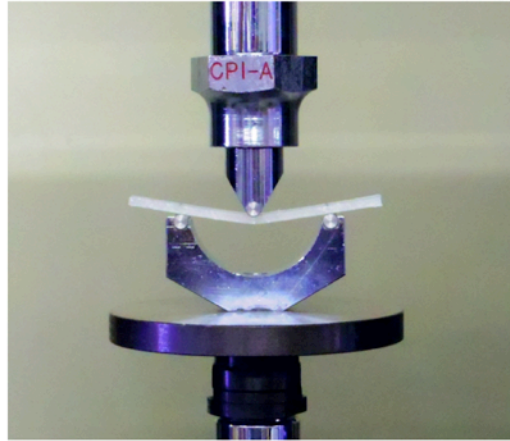


Fig.3 3点曲げ試験



Fig.4 ダイナミック硬さ試験

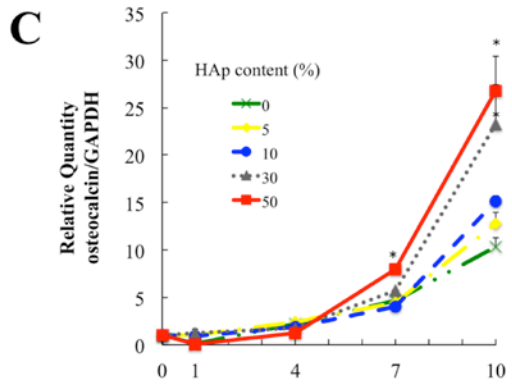
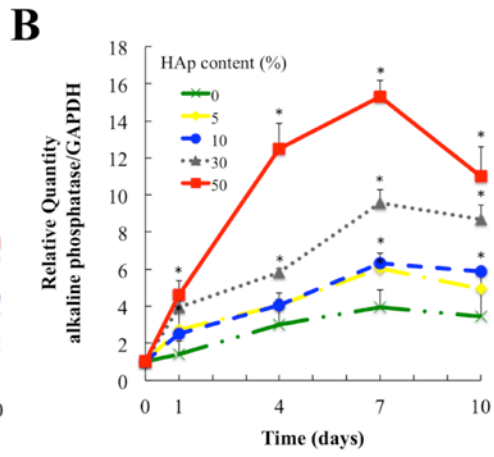
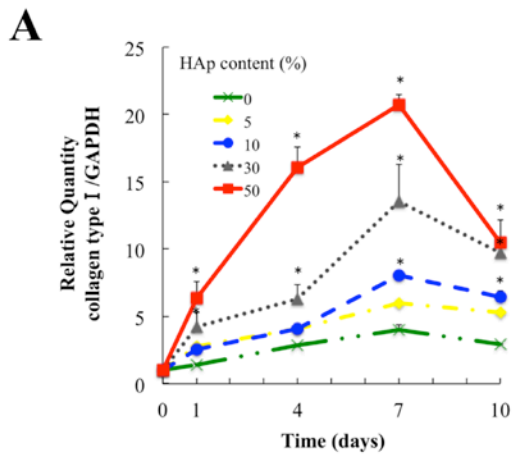


Fig.5 PGA/HApディスク上におけるMC3T3-E1細胞のCOL-1 (A), ALP (B) およびOCN (C)のmRNA発現量
PGA/HAp群のmRNA発現量はHApの濃度依存的に増加した。同日でのHAp 0%をコントロールとし、比較を行った。(*: $p < 0.05$)

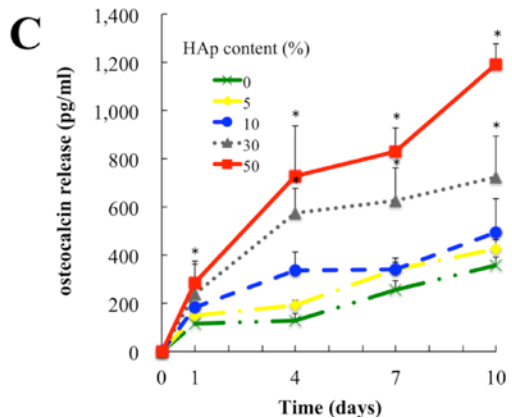
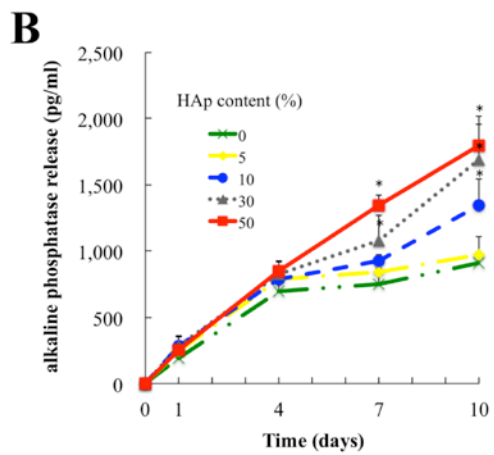
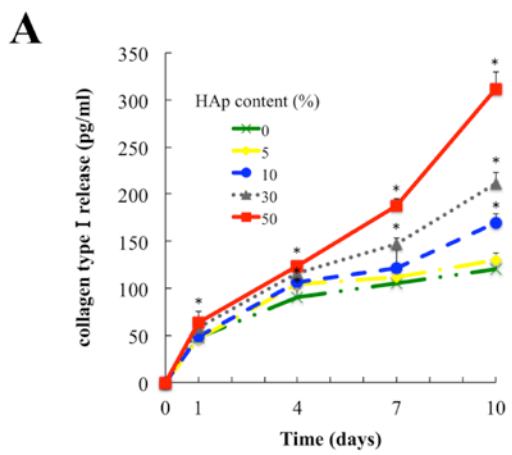


Fig.6 PGA/HApディスク上におけるMC3T3-E1細胞のCOL-1 (A), ALP (B) およびOCN (C)のタンパク発現量
PGA/HAp群のタンパク発現量はHApの濃度依存的に増加した。同日でのHAp 0%をコントロールとし、比較を行った。(*: $p < 0.05$)

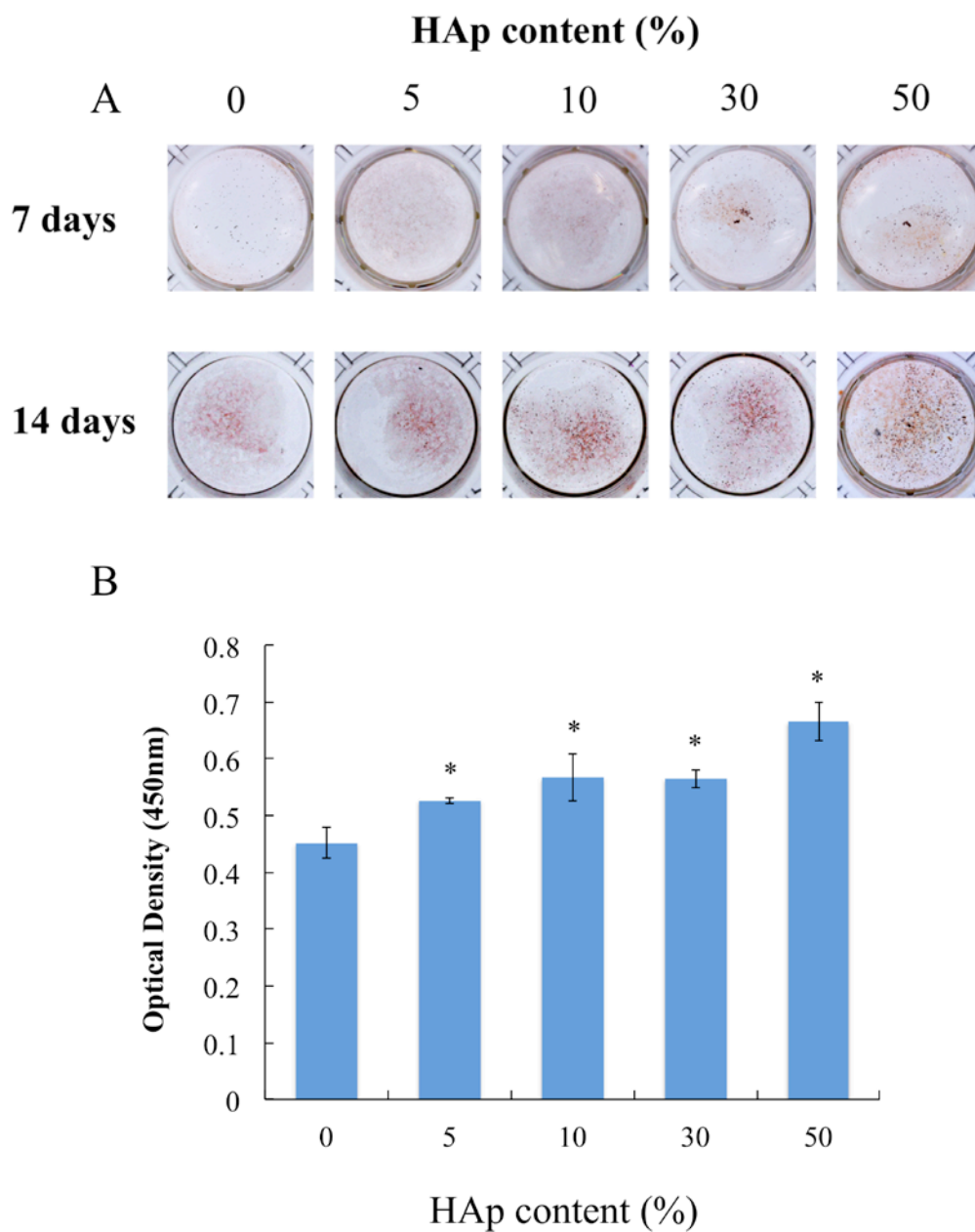


Fig.7 アリザリンレッドS染色
 PGA/HApディスク上にMC3T3-E1細胞を培養後、7日および14日後にアリザリンレッドS染色を行い、写真撮影を行った (A)。石灰化結節溶解液による色素定量化を行い、HApの濃度依存的に増加していることが示された (B)。HAp 0%をコントロールとし、比較を行った。(*: $p < 0.05$)

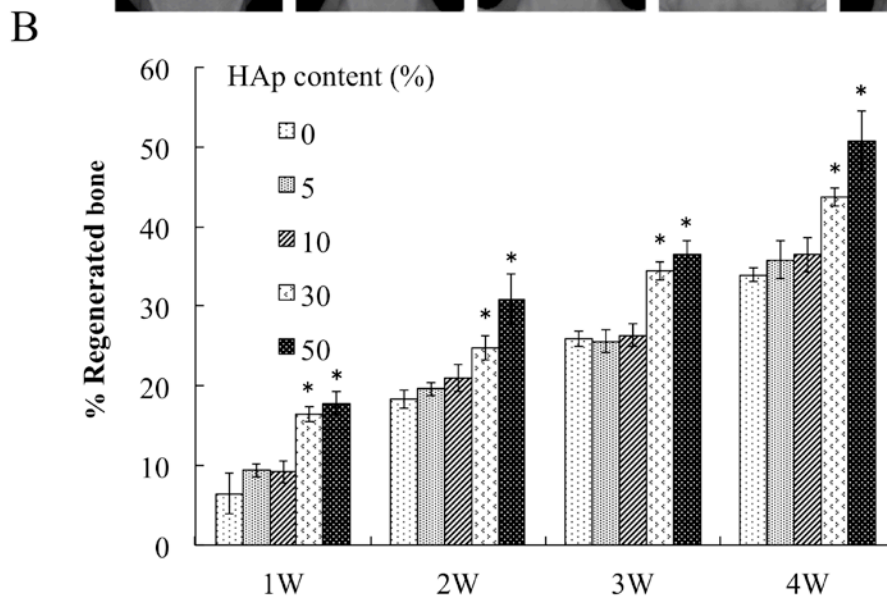
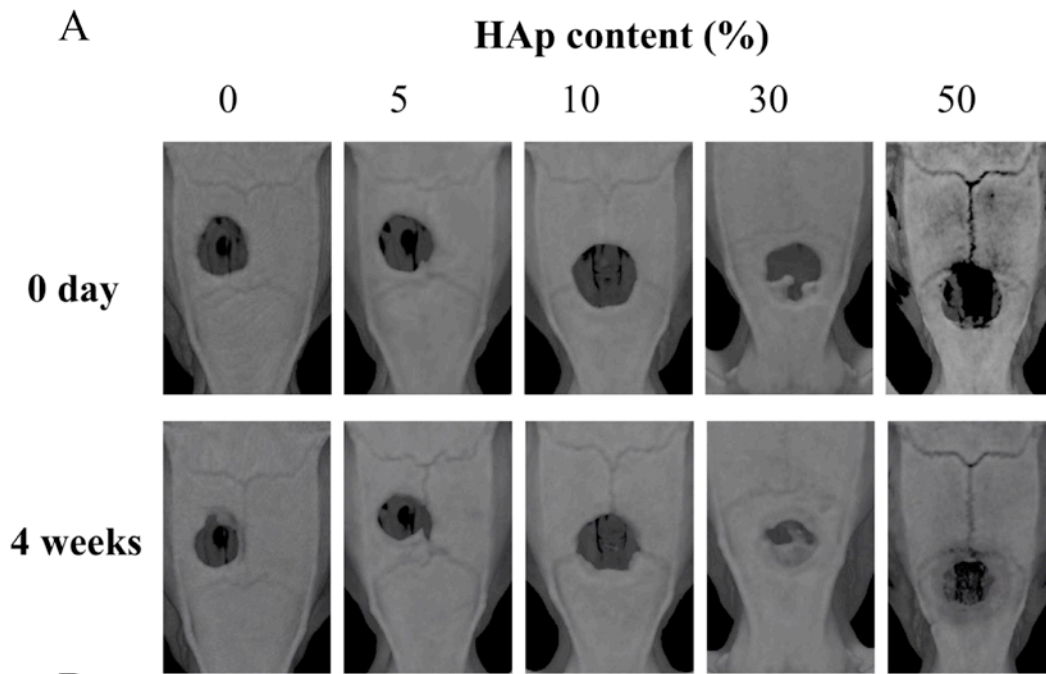


Fig.8 PGA/HApディスクのラット頭蓋骨埋入による μ CTの評価
ラットの頭蓋骨にPGA/HApディスクを埋入し、埋入直後から1週ごとに4週目まで μ CT撮影を行った。埋入直後と4週間後の μ CT像の比較では、欠損の周囲に骨の形成が認められた (A)。新生骨の定量化を示したグラフでは、4週後に最も骨が形成され、HApの濃度依存的に骨が増加した (B)。同日でのHAp 0%をコントロールとし、比較を行った。 (*: $p < 0.05$)

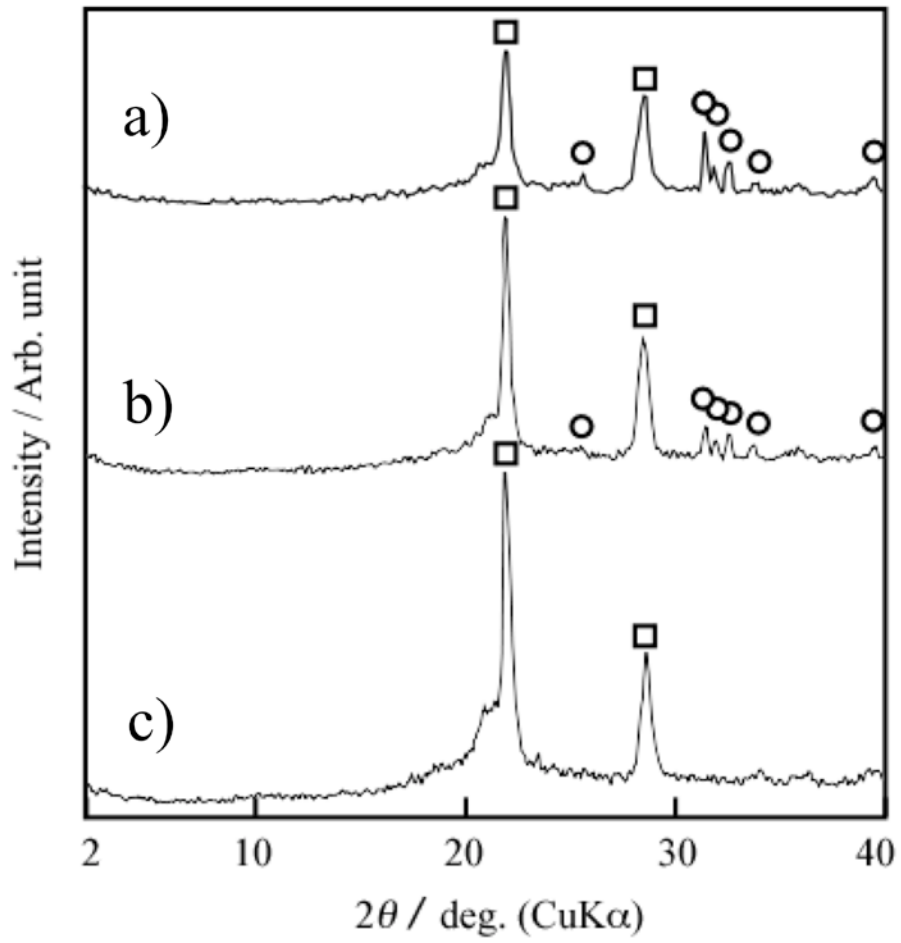


Fig.9 複合体のXRDパターン
 a) PGA90/HAp10 b) PGA95/HAp5 c) PGA100
 各シンボルはそれぞれの物質の存在を示す。
 \square : PGA \circ : HAp

Table 1 PGA/HAp複合体, ヒト皮質骨および純チタンの機械的性質

ID	3点曲げ試験		ダイナミック硬さ試験	
	曲げ強度 (MPa)	曲げ弾性率 (GPa)	ダイナミック硬さ (—)	弾性率 (GPa)
PGA100	174.0 ± 7.5	7.6 ± 0.4	28.4 ± 2.5	7.4 ± 0.5
PGA95/HAp5	178.4 ± 6.5	8.3 ± 0.4	35.8 ± 3.9	8.4 ± 0.4
PGA90/HAp10	166.0 ± 7.5	7.8 ± 0.5	32.9 ± 1.7	8.3 ± 0.3
ヒト皮質骨	164.0 ± 29 ^{*19)}	17.1 ± 3.2 ^{*20)}	—	—
純チタン	809.2 ^{*21)}	80.2 ^{*22)}	174.7 ± 5.3	112.2 ± 9.8

* 文献値