

Different corrosive effects on hydroxyapatite nanocrystals and amine fluoride-based mouthwashes on dental titanium brackets: a comparative in vitro study

ハイドロキシアパタイトナノ結晶ベースのマウスウォッシュ(バイオリペア)とアミンフッ化物ベースのマウスウォッシュが歯科用チタンブラケットに与える腐食作用: In vitro 比較研究

Marco Lelli¹

Olivia Marchisio²

Ismaela Foltran¹

Annamaria Genovesi²

Giulia Montebugnoli¹

Massimo Marcaccio¹

Ugo Covani²

Norberto Roveri¹

¹Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Department of Chemistry, Bologna, Italy

²University of Pisa, Istituto Stomatologico Tirreno, Lido di Camaiore, Lucca, Italy

アブストラクト

アミンフッ化物(100 ppm F⁻)を含有した洗口液と亜鉛置換炭酸塩ハイドロキシアパタイトを含有した洗口液を使用してチタンプレート(In-vitro)で処理した。これら2種類の洗口液による処理で誘発された表面粗さの変化を評価するため、チタンプレートを走査電子顕微鏡法と原子間力顕微鏡法で解析した。フッ素入り洗口液での処理は、基準の研磨チタンプレートの観察所見と比較して、チタンブラケット表面の条痕のピークがより高く谷部がより深くなるという特徴をもたらした。この作用は、金属製デンタルインプラントに力学的脆弱性をもたらす、また、細菌増殖の原因となって感染や補綴物の汚染を促進する。一方で、亜鉛置換炭酸塩ハイドロキシアパタイトを含有した洗口液でのIn-vitro処理の場合、アパタイト相が条痕を埋め、表面粗さを低下させた。このことは、チタンデンタルインプラントの力学的挙動に影響する可能性のある表面の酸化を防止し、補綴物を汚染する細菌の増殖を抑制する。

キーワード: 洗口液、チタンブラケット、腐食、ハイドロキシアパタイト、アミンフッ化物

イントロダクション

歯科用インプラント材料としてのチタンの使用は、この材料が有害イオンを放出しないという事実や、骨がチタンインプラント表面に密着した状態で治癒するのに適した弾性率を持つという事実に加えて、この金属の熱伝導率が低いことによる。¹

チタンは高延性で、口腔内環境での繰り返し荷重に強い。この繰り返し荷重(疲労としても知られる)は、咀嚼運動によって生じ、チタンインプラント内部にマイクロクラックを発生させる可能性がある。² 過酷な口腔内環境においてチタンは常に力学的応力や熱応力に曝されている。

フッ素イオンを含有した洗口液やハミガキはオーラルケア市場で最も重要な製品のひとつである。事実、フッ素は、エナメル質の溶解を抑制しカリエスを防止する主たる方法であると考えられてきた。フッ素イオンは、ハイドロキシアパタイト結晶と相互作用してフッ化ハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})\text{F}$)あるいはフルオロアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$)を形成することができる。ハイドロキシアパタイトよりもこれらのミネラルの方が、格子エネルギーが大きく、結晶度が高く、溶解耐性も優れている。フッ素はアパタイト結晶の種子率も高める。¹

P. 308

フッ素入りハミガキのin vivo使用は、天然エナメル質ハイドロキシアパタイト内でフッ素イオンによるヒドロキシル基の部分的置換をもたらす可能性がある。^{3,4}

骨の成長を促進するF⁻の働きは広く学術文献で実証されている。¹⁶ フッ化チタンは、チタンがリン酸塩の酸素原子を共有するハイドロキシアパタイト表面に安定層を形成し、ハイドロキシアパタイト表面と共有結合する。フッ素はリン酸イオンとチタンとの直接反応を可能にし、強固で安定した結合をもたらすため、この反応にはフッ素が不可欠である。¹ 組織液に含まれる酸素やリン酸がフッ素を置換すると考えられ、リン酸がチタン表面に共有結合する。このような反応は、骨中のリン酸がチタンインプラントに強固に(共有)結合した部分で骨形成を引き起こすと考えられる。このプロセスは骨形成を触媒し、十分に石灰化した骨組織がインプラント表面近くに堆積するのを可能にする。^{5,6}

酸化プロセスは表面の酸化チタン層を密に凝縮でき、これによって下層にあるチタンの耐腐食安定性が改善される。^{7,8} これに対して、フッ素(F⁻)などの還元物質は逆に働く可能性があり、この層を攻撃する。⁸ 腐食は電気化学的反応で発生する。チタンは塩酸や硫酸といった強力な鉱酸を含んだ溶液による攻撃に対抗し、腐食抵抗が高いことで知られている。しかし、pH3.5以下のフッ素化媒質にチタンを接触させておくと、チタン酸化層が損傷を受け劣化する。この現象は表面輝度のロスとなって肉眼で確認できる。^{9,10} フッ化物は腐食の原因になる可能性があり、口腔内に露出した部分の表面粗さを増大させ、口腔内衛生メカニズム(ブラッシング、嚥下、歯肉溝浸出液の流れ)が行き届かない部分での微

生物の増殖を容易にしてしまう。^{2,11,12}

アノード分極や浸漬試験により、F-を含んだ溶液中でのチタン腐食はフッ酸(HF)濃度に依存することが示されている。溶液中のHF濃度が>30 ppmになると、チタン上の不動態皮膜が破壊される。

ラフサーフェイスはインプラント周囲の歯肉溝で歯垢が蓄積しやすく¹³、インプラントの中でも特にセンシティブなこの部分においては、好ましくない現象である。したがって、病的状態を招くような歯垢蓄積を防止するため¹⁴、インプラントのネックおよびアバットメントは研磨面でなくてはならない。この部分の表面は継続的なケアが極めて重要である。

フッ化物によるフッ素沈着(特に小児)や高齢者における骨疾患のリスクについては、多くの研究が示してきた。¹⁵⁻²¹ 欧州食品安全機関(EFSA)の科学諮問パネルは、最大1500 mg/Kgのフッ化物を含有する可能性のあるオーラルケア製品やハミガキを飲み込むことによるフッ素摂取のリスクについて報告している。EFSAは、1-8才のこどものフッ素摂取量は、体重1kgに対して1日あたり0.1 mg以下とすべきとしており、1-3才では1日あたり1.5mg、4-8才では1日あたり2.5mgに相当する。^{22,23}

この10年間で新しい洗口液やハミガキが市販され、日常的なフッ素の飲み込みによる健康への悪影響を避けるため、再石灰化剤としてフッ素に代わって生体模倣性のハイドロキシアパタイトのナノ結晶が使用されてきている。¹⁶

骨や歯の硬組織の無機相においてはボーンフィラーや補綴コーティングとして、また、口腔外科や整形外科の体内埋入バイオ材料として、ハイドロキシアパタイト[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] (HA)が広く研究されてきた。これは、ハイドロキシアパタイトの生体適合性、生体活性、骨伝導能によるものである。¹⁷

生体の天然ハイドロキシアパタイトは、理想的化学式Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂に基づく定比ではなく、少量ではCa²⁺がNa⁺、K⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、Sr²⁺などのイオンに置換され、PO₄³⁻やOH⁻はCO₃²⁻、HPO₄²⁻、P₂O₇⁴⁻、SiO₄⁴⁻などのアニオンに部分的に置換される場合がある。^{17,24-26}

炭酸塩は、骨—ハイドロキシアパタイト構造に存在する一般的な外来アニオンであり、4-8 wt%を占める。^{27,28} PO₄³⁻部へのCO₃²⁻基の置換(タイプB炭酸塩アパタイト)はこどもに多く、年齢が高くなるほど炭酸塩のOH⁻基置換(タイプA炭酸塩アパタイト)が多くなる。²⁹

生体模倣性炭酸塩ハイドロキシアパタイトのナノ結晶(CHA)は、ほぼ化学量論的に合成したもので、バルクのCa/Pモル比は約1.7、リン酸基を置換した炭酸塩イオンを4 ± 1 wt%含んでいる。生体模倣性のCHAナノ結晶は20 nm-100 nmに合成し(図1)、薬を運ぶため³⁰⁻³³針状とプレート状の両方の形状を持ち、表面にはアミノ酸とタンパクを浸漬している。^{26,34-36}

生体模倣性CHA(図2)はマイクロサイズの結晶クラスタに凝集でき、このクラスタの表面積は約80 m²/gのナノ構造で、ハミガキや洗口液の石灰化剤として使用できる。³⁷

最近になって、CHAナノ構造結晶には、日常的に使用することで生体のエナメル質や象牙質の表面に

生体模倣性のミネラル沈着を生成する能力があることをIn vitro^{37,38}やIn vivo^{3,4}で検証するための化学的・物理的実験アプローチがとられるようになってきた。¹¹

P. 309

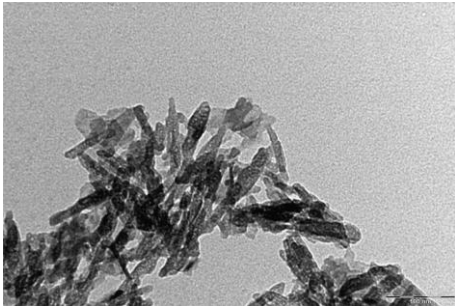


図1 生体模倣性CHAナノ結晶のTEM画像
短縮形: CHA, 炭酸塩ハイドロキシアパタイト; TEM, 透過電子顕微鏡法

脱灰したエナメル質や象牙質のスラブを合成の生体模倣性ハイドロキシアパタイトナノ結晶を用いてIn vitroで数分間処理し、表面を化学的、物理的に分析した。CHAは表面を再石灰化させ、エナメル質や象牙質の表面に生体模倣性のアパタイトコーティングを形成する。エナメル質に存在する天然のハイドロキシアパタイトに酷似した新しいナノ構造のハイドロキシアパタイト粒子は、その化学的・物理的性質によって、エナメル質を迅速に再石灰化させる。³⁹ したがって、我々の実験結果は歯の劣化が防止できることを示している。

組成、構造、サイズ、形態という点で生体を模倣して合成したCHAは、歯の硬組織表面に化学的に結合でき、キズを埋めて、生体模倣性のアパタイトコーティングを生成し、エナメル質表面の構造を保護する。^{3,40,41}

ハミガキや洗口液など、CHAを使用したオーラルケア製品が市販されており、チタンの補綴物とも接触する。



図2 凝集した生体模倣性CHAナノ結晶のTEM画像
短縮形: CHA, 炭酸塩ハイドロキシアパタイト; TEM, 透過電子顕微鏡法

本研究の目的は、ナノ構造のCHA入り洗口液がチタンインプラントに与える作用をフッ素入り洗口液と比較して評価することである。

本研究では、表面粗さを直接的に定性解析可能な走査電子顕微鏡法(SEM)と原子間力顕微鏡法(AFM)を用いて、F-ならびにCHAがチタンブラケットの表面に与える作用をIn vitroで分析した。

資料と方法

In vitro試験

加工の異なる4種類のチタン、すなわち、研磨加工、ブラスティング加工、マシン加工、酸エッチングしたチタンを試験した。全てのサンプルはチタングレードのプレートで、厚さは3mm、直径は6mmである。In vitro試験は、それぞれの種類のチタンについて6個のサンプルで実施した。pH4.3–5.5のアミンフッ化物入り洗口液と比較するため、ナノ結晶CHA入り洗口液を用いて、研磨したチタンブラケットを室温で試験した。使用する洗口液の活性部分である生体模倣性CHAの化学量論的組成は $\text{Ca}(10-x)\text{Zn}_x(\text{PO}_4)(6-y)(\text{CO}_3)_y(\text{OH})_2$ であり、ここで、 x は0.1、 y は0.4である。

適切な口腔内衛生をシミュレートするため、30日間にわたって、1日2回、1回あたり60秒ずつ、それぞれのプレートサンプルを洗口液に浸漬した。In vivoでの通常のハミガキ行動にならって、一回の処理ごとにチタンプレートを流水ですすいだ。

形態観察

エネルギー分散型検出器(EDAX) Inca 250 (Oxford, UL)を搭載したCarl-Zeiss EVO, 40 XVP (Oberkochen, Germany)を用い、25 KVでの二次電子を使用して各種の倍率でSEM観察を実施した。

AFMはチタンプレートサンプルのサブストレート上で直に実施した。AFMイメージングにはDigital Instruments Nanoscope IIIa Multimode SPM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA)を使用した。高度なアナログ回路設計やデジタル回路設計とイノベーティブなソフトウェアおよびハードウェアにより、走査型プローブ顕微鏡(SPM)の精密なマルチタスクコントロールが可能である。^{42,43} コンタクトモードのサンプルはJ scannerと窒化ケイ素チップ(200 lm long、公称バネ定数0.06 N/m)を使用した。

結果

研磨、ブラスティング、マシン加工、酸エッチングによるチタンプレート表面のSEM分析結果を示す。その画像を図3A-Dに示す。

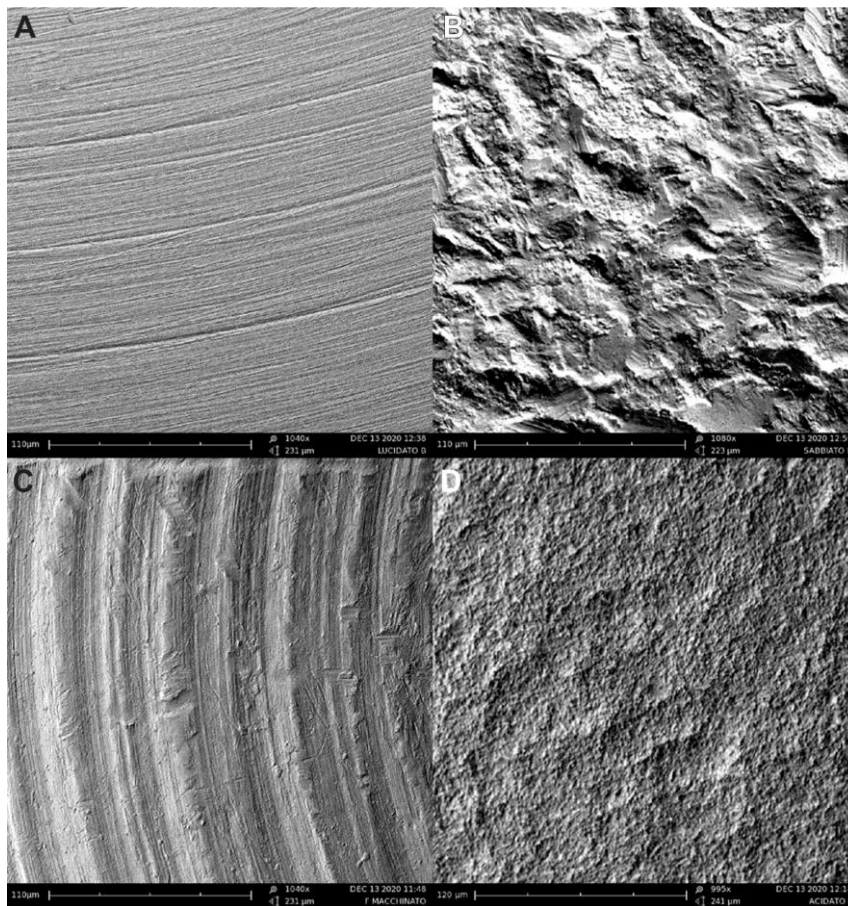


図3 暫定選択に使用した研磨チタンディスク、ブラスティングチタンディスク、マシン加工チタンディスク、酸エッチングチタンディスク各々の表面のSEM画像。(A) 研磨加工のチタン表面、(B) ブラスティング加工のチタン表面、(C) マシン加工のチタン表面、(D) 酸エッチングのチタン表面

短縮形: SEM, 走査電子顕微鏡法

図3は、ブラスティング、マシン加工、酸エッチングによるチタンプレート表面が不均質であるのに対して、研磨プレートの表面(図3-A)は溝が浅く、よって、滑沢であることを示している。表面粗さが非常に少なく均質な表面を持つ研磨チタンプレートが本研究には適していると考えられる。

研磨チタンプレートの比較サンプルを、2種類の洗口液による毎日の処理の前後にSEMで観察した。アミノフッ化物(100 ppm F-)を含有した洗口液と亜鉛置換CHAを含有した洗口液を使用し、それらが

チタンプレート表面に与える作用の違いを調査した。

2種類の洗口液によるIn vitro処理後のSEM観察では、フッ素入り洗口液で処理したチタンプレート(図4A)とCHA入り洗口液で処理したチタンプレート(図4C)の間に明らかな違いが見られた。事実、アミンフッ化物入り洗口液で処理した後のチタン表面の粗さは、基準チタンプレートの粗さ(図3A)より増大している。

対照的に、CHA入り洗口液はチタン表面に存在する谷や溝を被覆すると思われ、表面粗さが基準チタンプレートよりも明らかに低下している。

フッ素入り洗口液で処理した後のチタン表面のEDAX元素分析では、チタンと関連付けられるピークは一つしか見られない(図4B)。CHA入り洗口液での処理後にEDAXを実施すると、同等の観察でカルシウムイオンやリン酸イオンに関連付けられるピークが観察され、ハイドロキシアパタイトの化学量論的モル比の1.7と一致する(図4D)。

さらに詳細な結果を得るため、2種類の洗口液で処理したチタンブラケットをAFM法で観察した。

P. 311

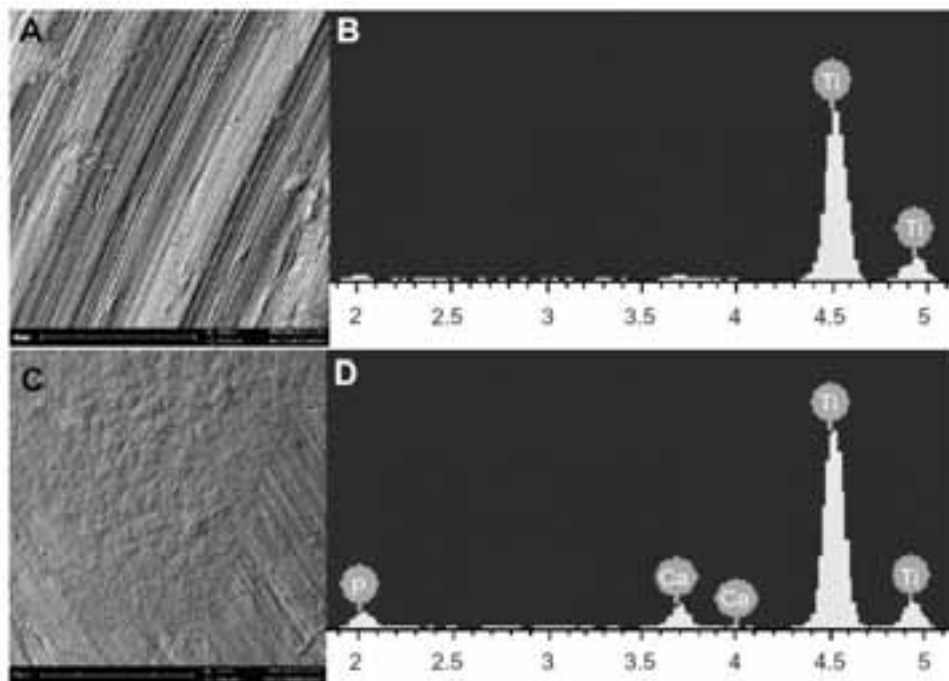


図4 洗口液処理後のチタン表面のSEM画像 (A)フッ素入り洗口液で処理したチタン表面、(B)フッ素入り洗口液で処理したチタン表面のEDAXプローブによる元素分析、(C)CHA入り洗口液で処理したチタン表面、(D)CHA入り洗口液で処理したチタン表面のEDAXプローブによる元素分析

短縮形:CHA, 炭酸塩ハイドロキシアパタイト; EDAX, エネルギー分散型検出器、F-, フッ化物、SEM, 走査電子顕微鏡法.

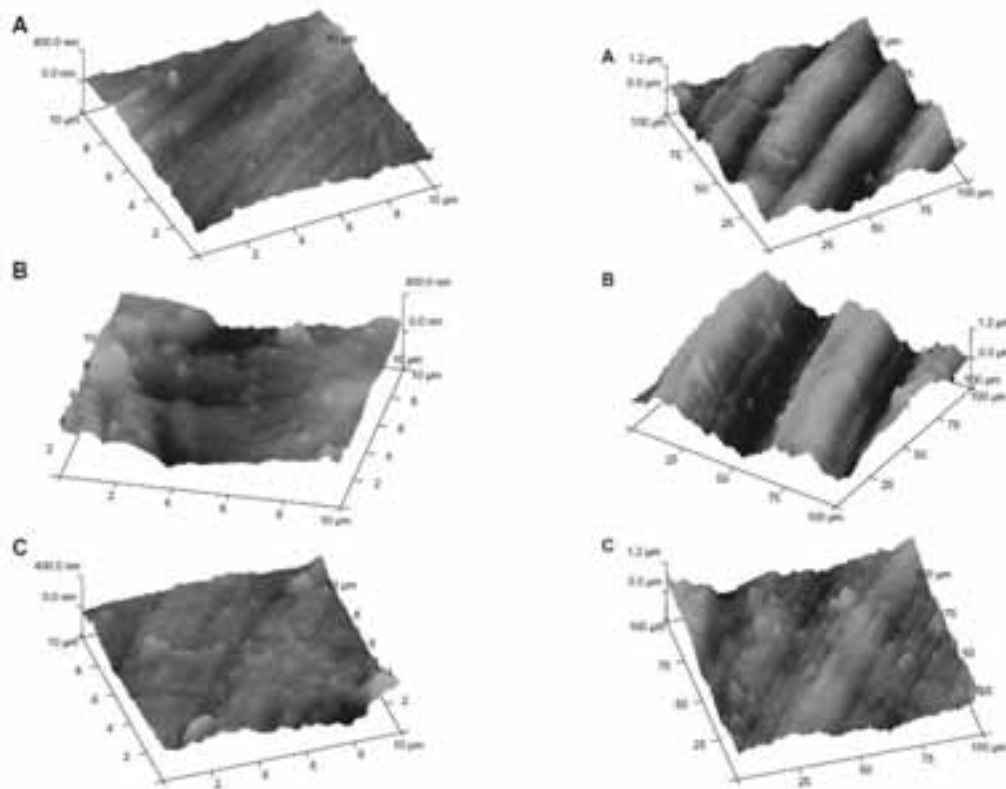


図5(左側3つ) チタンディスク10 × 10 μm切片的AFM解析、(A) 基準チタンプレート、(B) フッ素入り洗口液で処理したチタンプレート、(C) CHA入り洗口液で処理したチタンプレート
 短縮形: AFM, 原子間力顕微鏡法; CHA, 炭酸塩ハイドロキシアパタイト; F-, フッ化物

図6(右側3つ) チタンディスク100 × 100μm切片的AFM解析、(A) 基準チタンプレート、(B) フッ素入り洗口液で処理したチタンプレート、(C) CHA入り洗口液で処理したチタンプレート
 短縮形: AFM, 原子間力顕微鏡法; CHA, 炭酸塩ハイドロキシアパタイト; F-, フッ化物

P. 312

2種類の洗口液で処理したチタンプレートを切片で観察した。試験したプレート切片は10 × 10 μm幅のものとは100 × 100 μm幅のものである。図5は10 × 10 μm幅の切片のAFM画像、図6は100 × 100 μm幅の切片のAFM画像である。

10 × 10 μm幅サンプルの場合、AFM法では表面のナノ粗さを高精度で測定しているのに対して、100 × 100 μmサンプルでは粗さの増大を高精度で評価可能である。

図5Aと図6Aはチタン基準表面のAFM画像である。図5Bと図6Bはフッ素入り洗口液で処理したチタン面のAFM画像であり、図5Cと図6CのAFM画像は、CHA入り洗口液がチタン面に与える作用を示している。AFM画像に対して実施した数値解析を表1と表2に示す。

基準チタン表面の10 × 10 μm切片ならびにフッ素入り洗口液、CHA入り洗口液で処理した後の10 × 10 μm切片で、二乗平均平方根(Rq)、ピーク最大値(Rp)、谷の最大値(Rv)を測定した(表1)。また、基準チタン表面の100 × 100 μm切片ならびにフッ素入り洗口液、CHA入り洗口液で処理した後の100 × 100 μm切片でも、Rq、Rp、Rvを測定した(表2)。

考察

フッ素入り洗口液とCHA入り洗口液でIn vitro処理した後の研磨チタンブラケットの表面について形態観察を行った。2種類の洗口液で処理したチタンプレートとSEM法とAFM法で解析した。2種類の洗口液での処理で誘発される表面のナノラフネスの変化ならびにその増大(表2に示すRq, Rp, Rvの値について)を明確かつ高精度で評価するため、2種類(10 × 10 μm と 100 × 100 μm)の大きさのチタン切片を使用した。

表1 チタンディスクのAFM解析 10 × 10 μm切片

10 × 10 μm切片	二乗平均平方根(Rq)	ピーク最大値(Rp)	谷の最大値(Rv)
研磨チタンディスク(基準)	93nm	350 nm	-140 nm
フッ素入り洗口液処理ディスク	92nm	460 nm	-230 nm
CHA入り洗口液処理ディスク	56 nm	300 nm	-120 nm

短縮形: AFM: 原子間力顕微鏡法、CHA 炭酸塩ハイドロキシアパタイト、F⁻ フッ化物

表2 チタンディスクのAFM解析 100 × 100 μm切片

100 × 100 μm切片	二乗平均平方根(Rq)	ピーク最大値(Rp)	谷の最大値(Rv)
研磨チタンディスク(基準)	280nm	700 nm	-740 nm
フッ素入り洗口液処理ディスク	460nm	840 nm	-940 nm
CHA入り洗口液処理ディスク	235 nm	620 nm	-520 nm

短縮形: AFM: 原子間力顕微鏡法、CHA 炭酸塩ハイドロキシアパタイト、F⁻ フッ化物

フッ素入り洗口液での処理は、基準の研磨チタンプレートで観察された粗さと比較して、チタンブラケット表面の条痕のピークが高く谷が深いという特徴のある粗さをもたらした。対照的に、CHA入り洗口液での処理は、基準の研磨チタンディスクで観察された粗さと比較して、チタンブラケット表面の条痕のピークが平滑で谷も浅いという特徴のある粗さを生成した。これらの所見は、ハイドロキシアパタイトが付着することでチタン表面の条痕が埋まり、表面粗さが低下するという事で説明できる。EDAX解析ではカルシウムとリン酸が、洗口液中に存在するCHAの特徴であるモル比1.7で存在することが明らかになった。

アミンF-を含有する洗口液でのIn vitro処理により誘発される表面粗さの増大(表1、表2)は、チタンブラケットの力学的挙動を変化させ、金属製デンタルインプラントを力学的に脆弱化する。条痕の深さが増すと、細菌が増殖しやすくなり、感染ならびに補綴物の汚染や動揺が促進されてしまう。⁴⁴ 対照的に、CHA入り洗口液でのIn vitro処理は、条痕が埋まることで表面粗さが低下する(表1、表2)。このハイドロキシアパタイト付着は、チタンブラケットの力学的挙動を損なうような表面の酸化を防止する。また、チタン表面にハイドロキシアパタイトコーティングができることで、補綴物を汚染する細菌の増殖を防止できる。さらに、細菌プラークは酸性であるため、チタンインプラント上に存在する亜鉛置換CHAを可溶化させる。^{40,41,45} 一方で、我々のデータは、金属製デンタルインプラントの劣化やその後の細菌による汚染を防止するため、洗口液中のF-の存在は避けるべきであることを示している。他方で、CHA入り洗口液は金属製デンタルインプラントの劣化や細菌膜の形成を防止する。

P. 313

結論

アミンF-を含有する洗口液ならびにCHAを含有する洗口液でIn vitro処理した後の研磨チタンブラケット表面の形態解析は、洗口液中にF-が存在すると金属製デンタルインプラントに力学的脆弱性や細菌汚染を誘発することを示唆している。洗口液中の亜鉛置換CHAの存在は、金属製デンタルインプラントの劣化や細菌による汚染を防止する。