

平成30年 5月21日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07299

研究課題名(和文) DLC成膜による低摩擦矯正装置の開発と治療期間短縮への影響

研究課題名(英文) Development of low friction orthodontic appliance by deposition of a DLC coating for shortening treatment period

研究代表者

赤池 駿 (Akaike, Shun)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30781611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内で用いられる歯科矯正装置は、タンパクやプラークの付着により、摩擦が増加し治療期間が延びてしまう。

本研究では、水晶振動子マイクロバランス(QCM)法を用いてステンレス鋼(SUS)、ダイヤモンドライクカーボン(DLC)、フッ素添加DLC(F-DLC)膜へのタンパク吸着を評価した。各センサーは、表面性状の観察と表面粗さ、表面の濡れ性および表面自由エネルギーを計測した。アルブミンのDLCおよびF-DLCへの吸着量は、SUSよりも有意に低く、DLCまたはF-DLCコーティングは、歯科矯正装置へのタンパク質吸着を防止するのに有効である。その結果、矯正治療期間の短縮に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Friction increases and orthodontic appliance deteriorate in the oral environment because of protein adsorption. Thus, orthodontic appliances that are resistant to protein adsorption are desirable.

The aim of the present study was to evaluate albumin adsorption to stainless steel (SUS), diamond-like carbon (DLC) and fluorine-doped DLC (F-DLC) films using the quartz crystal microbalance (QCM) method. Each sensor was characterized surface roughness and surface wettability measurements and surface free energy calculations. Adsorbed amounts of albumin on DLC and F-DLC were significantly lower than that on SUS. Thus, DLC or F-DLC coating is effective for preventing protein adsorption on orthodontic appliances. The DLC and F-DLC coating is effective in preventing protein adsorption to the orthodontic appliance. As a result, it was suggested that it contributes to shortening the period of orthodontic treatment.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：ダイヤモンドライクカーボン アモルファスカーボン QCM 摩擦 コーティング

### 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療では、不正咬合を治療するためにマルチブラケット装置が広く使用されている。しかし、マルチブラケット装置を使用した治療ではその治療期間の長さが大きな課題であり、治療期間を短縮するための装置の研究、開発が行われてきた。

歯の移動に影響を及ぼす重要な要素は、矯正用ブラケットとワイヤーとの間の摩擦力、特に静摩擦力が歯の移動効率、ひいては治療期間に影響する。特に抜歯して治療する場合に用いられるスペースを閉じるための方法の1つであるスライディングメカニクスを効果的にコントロールするためには、太いワイヤーが望ましいが、ワイヤーを太くするとブラケットとの摩擦により力が効率良く歯に伝わらず動きが遅くなり、治療期間が延びてしまう。歯科矯正学分野では以前より摩擦を低減するための装置の開発が行われてきたが、コーティングによるアプローチはほとんどなく、また、太いワイヤーで摩擦を低減する試みもされていない。

近年、ダイヤモンドライクカーボン (DLC) は、極限の表面硬度、低摩擦係数、化学的不活性、高い耐摩耗性および優れた生体適合性などの優れた物理的性質のために、様々な産業用途に使用されている。我々は、矯正用ブラケットに摩擦の低減を目的として DLC、フッ素添加 DLC (F-DLC)、ケイ素添加 DLC (Si-DLC) 膜のコーティングを試み、その結果、ブラケットスロット全面への均質な薄膜形成に初めて成功した。

これらのコーティングブラケットは、静摩擦力測定試験において、未処理のブラケットに比べて有意な静摩擦力の減少を認め、特に F-DLC コーティングブラケットは、口腔内を想定した湿潤下の静摩擦力において最も低い静摩擦力を示し、本法で製作した F-DLC コーティングブラケットは、矯正治療期間を短縮できる矯正用ブラケットとして臨床応用できる可能性が明らかとなった。

しかしながら、口腔内で使用される矯正器具は、唾液タンパク質および口腔内細菌に絶えず曝露されている。口腔内環境では、歯科矯正用ブラケットやワイヤーの摩擦が増加し、タンパク質吸着のために劣化し、続いて歯科矯正装置上のペリクルとプラーク形成につながる。さらに、唾液タンパク質の吸着または付着は、バイオフィルム形成の初期段階であると推定されている。したがって、タンパク質吸着に耐性のある歯列矯正装置が望ましい。しかし、DLC 膜および F-DLC 膜に対するタンパク質吸着の評価はまだ行われていない。

赤外反射分光法、偏光解析法および表面プラズモン共鳴法などの方法がタンパク質の吸着を分析するために使用されている。その中でも、水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法は、水晶振動子の振動周波数の差を測定することにより、物質表面へのタンパク質の吸

着を検出するための方法である。分子が水晶振動子に結合すると、振動周波数は結晶表面に結合したタンパク質の量に対して減少する。吉田らは、QCM 法によりペリクルタンパク質の歯科材料への吸着を評価し、ペリクルタンパク質の吸着挙動がタンパク質および物質の種類によって影響を受けることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ステンレス鋼 (SUS)、DLC および F-DLC 表面へのタンパク質吸着を QCM 法で評価することである。タンパク質としては、唾液タンパク質の主要成分であるアルブミンを用いて吸着挙動を評価した。また、アルブミン吸着に対する表面自由エネルギーの影響を主に分析した。本研究の帰無仮説は、異なる表面、すなわち SUS、DLC および F-DLC がアルブミン吸着に影響しないとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料作製

QCM 測定のために Au センサーにステンレス鋼 304 (SUS)、DLC または F-DLC で成膜した。SUS センサーは、SUS304 ターゲットを用いたスパッタコーティングによって蒸着し、各 DLC コーティングは、直流パルスプラズマ化学気相成長法 (DC パルス PECVD; NPS-330, Nanotec) によって蒸着した DLC および F-DLC コーティングのための原料ガスは、それぞれ  $C_2H_2$  および  $C_6F_6$  を用いた。PECVD 法は、プラズマによって原料ガスを励起させてイオン化し、得られた正に帯電したイオンは、負に印加された基板に引き付けられることにより成膜する方法である。

#### (2) 表面性状の評価

各センサーの表面形態および表面粗さの計測のため、原子間力顕微鏡 (AFM; Nanosurf Easyscan 2, Nanosurf AG) 観察を行った。AFM は、大気中、タッピングモードで行い、イメージングには約 190kHz の共振周波数を有するタッピングモードシリコンプローブ (Tap190AL-G, 力接触 48N / m; BudgetSensors) を使用した。AFM 画像は、 $5 \times 5 \mu m^2$  の面積で計測を行った。表面粗さ (算術平均高さ) は、AFM に付属のソフトウェア (Nanosurf Easyscan 2) を用いて算出した。全ての測定は 3 回ずつ行った。

各センサー表面の表面の濡れ性は、接触角計 (DMe-201, 協和界面科学 (株)) を用いて測定し、蒸留水による接触角 (WCA) およびジヨードメタンによる接触角 (DCA) を測定して、そこから表面自由エネルギーを算出した。接触角測定はすべて、各センサーに紫外線 (UV オゾン洗浄剤, BioForce Nanosciences Holdings Inc.) を 20 分照射後に行い、液滴体積は  $0.5 \mu L$  とした。測定は同じ室温および湿度で 3 回行った。

Owens-Wendt 理論により、全表面自由エネ

ルギー (  $\gamma_L^{total}$  ) および分散表面成分 (  $\gamma_L^d$  ) および水素結合成分 (  $\gamma_L^h$  ) を以下の式に従って計算した .

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2 \left( \sqrt{\gamma_L^d \gamma_S^d} + \sqrt{\gamma_L^p \gamma_S^p} \right)$$

ここで,  $\gamma_L$  と  $\gamma_S$  はそれぞれ液体表面張力と固体表面エネルギーであり, 水とジヨードメタンの  $\gamma_L^d$  は 21.8 と 49.5 mN/m であり, 水とジヨードメタンの  $\gamma_L^h$  はそれぞれ 51.0 と 1.3 mN/m である .

### (3) QCM 測定

測定は 500  $\mu$ L のセンサーセルを備える 27 MHz の QCM ( AT カットモード ; AFFINIXQN  $\mu$  , ULVAC Inc. ) を使用した . 各センサーのセンサーセルは, QCM 装置のセルソケットに取り付けられ, 次いで, 温度制御システムおよび攪拌棒を装着した . 温度は 25  $\pm$  1  $^{\circ}$ C に維持し, セル中の溶液を測定中に 1,000rpm で攪拌した .

ウシ血清アルブミン ( BSA ; 和光純薬株式会社 ) を濃度 1mg/mL のリン酸緩衝生理食塩水 ( PBS ) 溶液 ( pH = 7.4 ) に溶解した . センサーセルを取り付ける前に, 各センサーを 1% ドデシル硫酸ナトリウム溶液で洗浄し, 次いで紫外線 ( BioForce Nanosciences Holdings Inc. ) で 20 分間照射した . センサーセルを取り付けた後, 500  $\mu$ L の PBS をセンサーセルに添加した . 周波数シフトの安定化後, 1mg/mL BSA 溶液 ( 0.5  $\mu$ L ) をセンサーセル内の PBS 溶液に注入した . BSA 注入後 120 分まで周波数低下を計測した .

BSA 注入後 120 分でのアルブミン吸着量は, Sauerbrey の式により以下のように計算した .

$$\Delta F = - \frac{2F_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

ここで,  $F$  は測定周波数シフト ( Hz ),  $m$  は質量変化 ( g ),  $F_0$  は水晶の基本周波数 ( 27  $\times$  10<sup>6</sup> Hz ),  $A$  は電極面積 ( 0.049cm<sup>2</sup> ),  $\rho_q$  は密度 ( 2.65gcm<sup>-3</sup> ),  $\mu_q$  は水晶のせん断弾性率 ( 2.95  $\times$  10<sup>11</sup> dyn<sup>cm</sup>-<sup>2</sup> ) である . 27MHz では, 1Hz の周波数の減少は Sauerbrey の式によると約 0.62ng/cm<sup>2</sup> の質量変化に対応する . 吸着時間に対する  $\Delta F$  曲線のカーブフィッティングにより, 10 分間の注入中の見かけの反応速度  $k_{obs}$  を以下の式を用いて得た .

$$\Delta F_t = \Delta F_{\infty} (1 - e^{-k_{obs} t})$$

### (4) 統計分析

統計解析は, SPSS ( Windows , IBM Japan , Tokyo , Japan のバージョン 16.0J ) ソフトウェアを用いて行った . 表面粗さ, 接触角, 表面自由エネルギーおよび QCM データの平均および標準偏差 ( SD ) を計算した . 各センサー

の結果を, 一元配置分散分析 ( ANOVA ) および Tukey 検定を用いて比較した .  $p < 0.05$  のとき統計的有意差があると判断した .

## 4 . 研究成果

### (1) 表面性状の評価

SUS 表面には針状の構造が観察され, AFM 観察により球状の粒子が DLC 表面と F-DLC 表面に観察された . SUS と DLC (  $p < 0.05$  ) と SUS と F-DLC (  $p < 0.05$  ) の間には表面粗さに有意差が認められた ( 表 1 ) . しかし, DLC と F-DLC の間には表面粗さの有意差は認められなかった (  $p > 0.05$  ) .

表 1 . 各センサーの表面粗さ ( Sa )

センサー	Sa ( nm )
SUS	4.38 ( 0.18 )
DLC	3.02 ( 0.39 )
F-DLC	2.48 ( 0.29 )

接触角測定の結果および表面自由エネルギーの計算をそれぞれ表 2 および表 3 に示す . 3 種類のセンサーセルの間で WCA に有意差があった (  $p < 0.05$  ) . しかし, DCA については, SUS と DLC との間には有意差は認められなかった (  $p > 0.05$  ) . F-DLC は, SUS および DLC より有意に大きな WCA および DCA 値を示した (  $p < 0.05$  ) .

表 2 . 各センサーの濡れ性

センサー	WCA ( 度 )	DCA ( 度 )
SUS	54.3 ( 3.7 )	39.6 ( 1.0 )
DLC	71.9 ( 2.7 )	34.8 ( 2.2 )
F-DLC	87.7 ( 1.7 )	51.0 ( 2.2 )

表 3 . 各センサーの表面自由エネルギー

センサー	d	h	total
	( mN/m )	( mN/m )	( mN/m )
SUS	32.5 ( 1.8 )	19.0 ( 3.2 )	51.4 ( 1.5 )
DLC	37.9 ( 0.3 )	5.9 ( 0.8 ) <sup>b</sup>	43.8 ( 0.6 )
F-DLC	28.7 ( 2.4 )	3.3 ( 1.1 )	32.0 ( 1.3 )

分散性表面成分 (  $\gamma_L^d$  ) に関して, DLC は SUS (  $p < 0.05$  ) より有意に大きな値を示し, F-DLC は DLC よりも有意に小さい値を示した (  $p < 0.05$  ) ( 表 3 ) . DLC と F-DLC の水素結合成分 (  $\gamma_L^h$  ) は SUS と比較して有意に低下した (  $p > 0.05$  ) . さらに, DLC および F-DLC の全表面自由エネルギー (  $\gamma_L^{total}$  ) は, SUS のものよりも有意に小さかった (  $p > 0.05$  ) .

### (2) QCM 測定

全ての測定において, アルブミン注入後に周波数低下が観察された 図 1 に示すように, SUS は, DLC および F-DLC よりも, より迅速

かつより大きな周波数減少を示した。計算された BSA の吸着量を表 4 に示す。DLC および F-DLC の BSA 吸着量は、SUS の BSA 吸着量よりも有意に低かった ( $p < 0.05$ )。しかし、DLC と F-DLC の BSA 吸着量に有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。

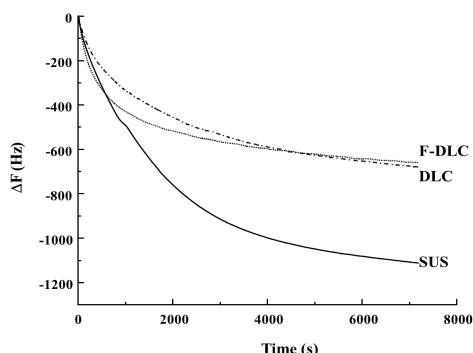


図 1. タンパク注入後の周波数の変化

表 4 アルブミンの吸着量と  $k_{obs}$

センサー	吸着量 (ng/cm <sup>2</sup> )	$k_{obs}$ ( $\times 10^3$ )
SUS	621.2 (62.0)	2.2 (0.6)
DLC	461.2 (35.1)	2.9 (0.7)
F-DLC	419.7 (43.3)	4.2 (0.3)

見かけの反応速度  $k_{obs}$  は、アルブミン注入後の吸着速度を示す。表 4 に示すように、F-DLC の  $k_{obs}$  は SUS および DLC の  $k_{obs}$  よりも有意に大きかった ( $p < 0.05$ )。しかし、SUS と DLC の間に有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。

### (3) 考察

本研究では、SUS、DLC、F-DLC へのタンパク質吸着を QCM 法にて評価した。我々は、表面性状の違いがタンパク質の吸着挙動に影響を与えることを明らかにした。DLC および F-DLC は、その表面へのアルブミン吸着量が有意に小さかった。したがって、異なる表面、すなわち SUS、DLC および F-DLC がアルブミン吸着に影響を与えないという帰無仮説は棄却された。

石原らは F-DLC の表面自由エネルギーは DLC の表面自由エネルギーよりも低く、DLC の抗菌活性はフッ素の取り込みによって改善されると報告している。本研究では、表面自由エネルギーも SUS、DLC、F-DLC の順で減少した。

疎水性相互作用は、ペリクル形成の原動力として重要な役割を果たし、より多くの唾液タンパク質が疎水性表面に吸着する。さらに、Wei らは、アルブミンは疎水性表面へのより大きな吸着を示すと報告している。DLC および F-DLC は著しく疎水性の表面を有する。しかし、DLC および F-DLC のアルブミン吸着量は、SUS よりも有意に低かった。

物質の表面自由エネルギーがタンパク質

の吸着に影響を与えることはよく知られている。本研究では、低い表面自由エネルギーを有する DLC および F-DLC に吸着するアルブミンは少なかった。Baier らは、材料の表面自由エネルギーが 20~30mN/m であるとき、生体分子と材料との間の最小限の相互作用が得られると報告した。DLC および F-DLC の全表面自由エネルギーは約 30~40mN/m である。したがって、アルブミンと DLC または F-DLC との相互作用は弱く、吸着が減少する可能性が示唆される。

本研究では、表面自由エネルギーとアルブミン吸着量との関係を分析した。図 2 に示すように、全表面自由エネルギーとアルブミン吸着量の間には正の相関が見られたが、相関は直線的ではなかった ( $r^2 = 0.83$ )。しかし、水素結合成分とアルブミン吸着量 ( $r^2 = 0.99$ ) との間には線形相関が認められた。分散表面成分とアルブミン吸着量との間に相関はなかった。Michiardi らは、酸化ニッケル-チタン合金表面へのタンパク質吸着に及ぼす表面自由エネルギーの影響を調べた。彼らは、より高い自由エネルギーを有する表面がより多くのアルブミン吸着量を生成し、アルブミン吸着は、研究された表面の極性成分と優れた直線相関を有する表面エネルギーと直接的に関連することを見出した。我々の結果はその結果と一致する。したがって、水素結合相互作用は、3 つの異なる表面、SUS、DLC および F-DLC へのアルブミン吸着に關すると考えられる。

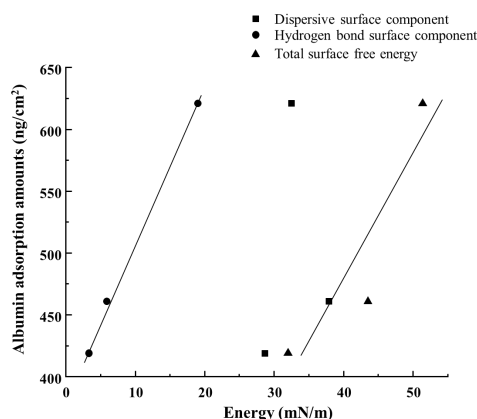


図 2. アルブミンの吸着量と濡れ性の関係

$k_{obs}$  の値が大きいくほど反応速度が速いこと、すなわちアルブミンの吸着がより速いことを示す。我々は、DLC および SUS よりも F-DLC へのアルブミンのより迅速な吸着を観察した。 $k_{obs}$  と表面自由エネルギーとの間の相関分析は、 $k_{obs}$  と全表面自由エネルギー ( $r^2 = 0.99$ ) との間には直線的相関が存在することを示した (図 3)。この場合、 $k_{obs}$  と水素結合成分 ( $r^2 = 0.75$ ) との間にはわずかに直線的な相関が存在したが、分散表面成分 ( $r^2 = 0.30$ ) では相関は認められなかった。

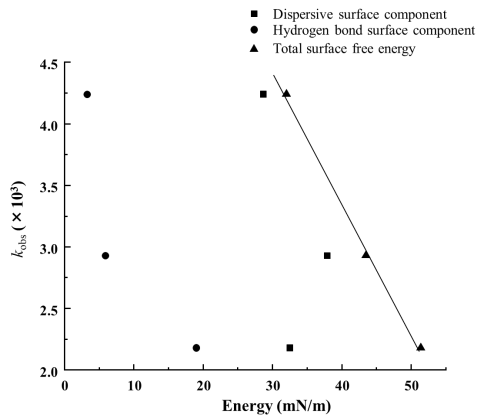


図3.  $k_{obs}$  と濡れ性の関係

表面粗さもタンパク質の吸着に影響するとされる。一般に、粗面化された表面は、材料表面上のタンパク質吸着を増加させる。SUSと比較したDLCおよびF-DLCのより滑らかな表面は、その表面上のアルブミン吸着の減少の潜在的説明の1つである。

表面電荷または化学組成物などの様々な因子も、物質へのタンパク質吸着に影響を及ぼす。吉田らは、試験した材料の見かけのゼータ電位を測定し、チタンまたはジルコニアへのラクトフェリン吸着は主に静電相互作用の影響を受けると推測した。タンパク質吸着の詳細な分析には、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

#### (4) 結論

本研究では、SUS、DLCおよびF-DLC膜へのアルブミン吸着を、QCM法を用いて評価した。DLCおよびF-DLCに対するアルブミンの吸着量は、SUSに対する吸着量よりも有意に低かった。さらに、F-DLCの見かけの反応速度、 $k_{obs}$ は、SUSおよびDLCのものよりも顕著に大きかった。我々の結果はDLCまたはF-DLCの総表面自由エネルギーが、アルブミン吸着量および $k_{obs}$ に有意に低いことを明らかにした。アルブミン吸着量と総表面自由エネルギーの水素結合成分との間には明確な相関が認められた。したがってDLCまたはF-DLCコーティングは、歯科矯正装置へのタンパク質の付着を防止するのに有効であり、その結果、ペリクルの蓄積の減少による歯科矯正ワイヤーとブラケットとの間の摩擦を減少させる可能性が示唆された。

DLCコーティングまたはF-DLCコーティングを成膜した歯科矯正装置により治療期間の短縮が実現できれば、不正咬合を自覚していても歯科矯正治療を受けることが出来なかった患者も安心して、より高度な治療を受けることが可能になると期待される。

#### <引用文献>

吉田ら, Adsorption analysis of lactoferrin to titanium, stainless steel, zirconia, and polymethyl

methacrylate using the quartz crystal microbalance method. *BioMed Res Int* 2016; 2016: 3961286.

石原ら, Antibacterial activity of fluorine incorporated DLC films. *Diam Relat Mater* 2006; 15: 1011-1014.

Weiら, Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater.* 2009; 4: 045002.

Baierら, Initial events in interactions of blood with a foreign surface. *J Biomed Mater Res* 1969; 3: 191-206.

Michiardiら, The influence of surface energy on competitive protein adsorption on oxidized NiTi surfaces. *Biomaterials* 2007; 28: 586-594.

#### 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)

〔学会発表〕(計1件)

石毛 遥, 赤池 駿, DLC およびフッ化物添加 DLC コーティングへのタンパク質付着のQCM法による評価, 第76回日本矯正歯科学会学術大会, 2017年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

赤池 駿 (AKAIKE, Shun)  
鶴見大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号: 30781611

##### (2) 研究協力者

早川 徹 (HAYAKAWA, Tohru)

平田 敦 (HIRATA, Atsushi)

平塚 傑工 (HIRATSUKA, Masanori)

石毛 遥 (ISHIGE, Haruka)