

学位申請論文

口蓋残遺孔閉鎖術に対する Ti 系固体接着材の
新規活用法の検討

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯科矯正学分野

内田 健太

指導教授

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯科矯正学分野

上岡 寛

緒言

口唇裂口蓋裂（Cleft Lip and/ or Palate: CL/P）は最も頻度が高い先天性頭蓋顔面奇形の一つであり、本邦では 600 人に一人の発生頻度とされ、CL/P 患者のうち口蓋裂（CP）を伴う頻度は約 60-70%と報告されている¹⁻³⁾。CP 治療の目的は、正常な鼻咽腔閉鎖機能の獲得であるが、裂型や手術方法によっては、口蓋粘膜の後方や正中側への移動が必要となり、時として硬口蓋の骨欠損部において、組織の不足や縫合不全、組織壊死などで口蓋部に瘻孔（口蓋残遺孔）を形成することがある。口蓋残遺孔は、食物や飲料の鼻腔への漏出や気流の鼻腔への漏れによる構音異常を生じ、日常生活にも障害を生じる恐れがある⁴⁻⁸⁾。口蓋残遺孔は口蓋形成術の術後早期に発症することから、その治療には早期の閉鎖手術が望まれるところであるが、頻回の幼少期の手術では口蓋の強い瘢痕化を生じさせ、術後に上顎骨の著しい成長障害を生じさせる可能性が高い。このため、積極的な閉鎖術は行わず、成長とその障害の程度を鑑みて、再閉鎖術の時期を検討している。大きな残遺孔に対しては、オプチュレーターの使用といった非外科的治療と、粘膜骨膜弁、舌弁、脂肪組織、人工材料を用いた外科的治療が検討される⁹⁻¹⁷⁾。しかし、外科的治療での成績は決して良好ではなく、この残遺孔閉鎖術後の瘻孔再発率は 33～50%と報告されており^{10, 18, 19)}。骨欠損部での粘膜、特に瘢痕化し血流の障害を伴っている粘膜での閉鎖術の困難さが課題となっている。なお、このような口腔鼻腔瘻孔形成は口蓋裂においてみられるが、同様に口腔粘膜の欠損と骨欠損、さらにはその上方を覆う粘膜欠損から瘻孔を生じるものとして、抜歯や歯科用インプ

ラント埋入、腫瘍・嚢胞切除、薬剤や放射線療法による骨壊死などに続発して口腔鼻腔瘻孔を生じる場合がある。これらに対しても、自然閉鎖が期待できない場合は外科治療が選択されるが、健常な粘膜から作製された粘膜骨膜弁の移動術で閉鎖が行われても、骨欠損部の Dead Space の十分な血餅形成や組織化が困難となって、再度瘻孔が形成されることも多い。再発の原因となるこの骨欠損部分を補う治療が求められ、骨移植や骨補填剤、脂肪などの組織移植が行われているが、これら瘻孔閉鎖のための簡便かつ信頼性の高い医用材料や技術の開発は必要性が高いと考えられる²⁰⁻²²⁾。

これらの問題に対し、瘻孔閉鎖で用いられる人工材料（高分子シートやチタン（Ti）系生体材料）の応用が検討されてきた^{23,24)}。しかし、高分子シートの使用には強度・剛性の低さ、異物反応の可能性、経時的な劣化といった課題がある²⁵⁻²⁸⁾。一方で Ti は優れた強度と生体適合性を示すが、通常、スクリューやワイヤーなどのデバイスを用いた固定が必要であり、操作手技の煩雑さや材料/組織間の間隙形成といった問題がある^{24,29-32)}。近年、被着体と接触させるだけで生体組織との接着を実現する固体接着材が注目されているが、これまで固体接着材と硬組織との接着は報告されていない。組織と材料との直接的接着は、デバイス関連合併症の防止に寄与すると考えられ、Ti 系固体接着材の性能向上は有用なインプラント材料の選択肢となりうる。先行研究によると酸処理 Ti（AT-Ti）は、表面の高い疎水性により軟組織コラーゲンの水分子を局所的に排除し、コラーゲン粘着性と接触点数の増加を誘導する特徴を持つ³³⁾。この特徴に基づき、骨基質内のコラーゲン線維を露

出させることで AT-Ti が軟組織だけでなく骨組織とも直接的な接着を実現しうると着想した。

本研究では，AT-Ti が骨組織とも直接的な接着を生じるための骨表面のコラーゲンを露出の適切な酸処理プロセスを検討し，加えて接着した Ti 系固体接着材の骨への即時的・直接的な接着性を評価した．さらに，臨床応用を想定し，実験的に口蓋瘻孔を作成した口蓋裂瘻孔モデルラットを用いた評価を実施し，その接着性の安定性について検討した．

材料と方法

1. Ti シート，骨試料の準備

厚さ $15\text{ }\mu\text{m}$ の Commercially Pure (CP) Ti シート (Grade 1, TR2700C-H; 竹内金属箔粉工業株式会社, 東京) を使用した. 特に断りがない限り, 使用した全ての化学薬品は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した. Ti シートは $5\times 35\text{ mm}$ の小片に切断した. これらの小片はアセトンで 3 回, 次いで Milli-Q 水で 3 回洗浄した後, 風乾した. 乾燥したシートを 97 wt% H_2SO_4 と 35 wt% HCl を水で混合して調製した溶液 (最終組成: 45 wt% H_2SO_4 および 15 wt% HCl) に 70°C で 20 分浸漬し, 酸処理を施した. 酸処理後, シートを含む溶液を中和し, シートを取り出した後, 60°C で 24 時間乾燥した.

新鮮なブタ大腿骨は東京芝浦臓器株式会社 (東京) から調達し, 骨ブロック ($10\times 10\times 2\text{ mm}$) を作製した. 各骨ブロックをプラスチックチューブ内で 38%リン酸 2 mL に浸漬し, 0~300 秒間酸処理した. 酸処理後, 骨ブロックを Milli-Q 水で 5 分間, 3 回洗浄した.

2. Ti シート，骨試料の物理化学的特性評価

未処理の Ti シート (N-Ti), 酸処理 Ti シート (AT-Ti) および骨ブロックの表面形態は, 走査電子顕微鏡 (SEM, JSM-6701F; 日本電子株式会社, 東京) を用いて観察した. 観察前に, 試料はアルミニウムスタブ上で乾燥させ, オスミウム (Neoc-Pro, メイワフォ

ーシス株式会社, 東京) でコーティングした. 元素分析は SEM (S4800, 日立ハイテク, 東京) に装着したエネルギー分散型 X 線分光法 (EDS) により実施した. この SEM はシリコンドリフト検出器 (EDAX Genesis APEX2, Ametek 社, PA, USA) を装備し, 岡山大学動物資源部門鹿田施設に設置されている.

脱灰骨ブロックのナノスケール形態および Young 率は, パルスフォースモードで動作する Atomic Force Microscope (AFM) を用いて定量化された. パルスフォースモードは, LabVIEW-FPGA プログラム (National Instruments, Austin, TX, USA) を用いて実装したフィードバック制御システムにより作動させた. マッピングは, 生理食塩水中で 40 Hz の駆動周波数にて実施した. 使用した AFM カンチレバー (OMCL-AC160TS, オリジナル, 東京, 日本) の公称ばね定数は 42 N/m, 先端半径は 7 nm 未満であった. 試料荷重力のみによるカンチレバーたわみを分離するため, カンチレバーに作用する流体力を除去した³⁴⁾. 各測定位置における荷重力と試料ステージとカンチレバー基部間の距離の関係を示す荷重-距離曲線を, Sneddon モデルを用いて解析し, 脱灰骨組織の弾性係数を以下の式で算出した:

$$F = \frac{2E \tan \alpha}{\pi(1 - \nu^2)} \delta^2$$

ここで, α は AFM 先端の半開角度, δ は先端の試料表面への押し込み深さ, ν は試料のポアソン比であり, 0.5 と仮定した³⁵⁾. 各測定位置間の間隔は 200 nm, マッピング領域は $20 \times 20 \mu\text{m}$ であった.

3. 剪断接着試験

骨試料に対し、N-Ti シートおよび AT-Ti シートを圧接、接着したのち、接着力計測（剪断接着試験）を行った。剪断接着試験は、小型卓上試験機（EZ-test; 島津製作所、京都）を用いて 150 mm/min の速度で実施した。接着強度は、デジタルマイクロメーター（MDC-25MJ; 株式会社ミットヨ、神奈川）で測定した各 Ti シートの初期幅と厚さに基づいて算出した。各サンプル群につき 4 回の測定を実施した。組織接着試験では、切断組織の過剰な生理食塩水を濾紙で除去後、Ti シートを 2×5 mm の領域で骨組織に圧接後、計測を行った。

4. ラット口蓋瘻孔閉鎖実験

Sprague-Dawley（SD）系ラットは日本エスエルシー株式会社（浜松）より購入した。すべての動物は岡山大学動物実験実施要領に基づき、岡山大学動物実験委員会（OKU-2023046）の承認を得て取り扱った。7 週齢雌ラットを用い、口蓋裂瘻孔モデルを作製した。口蓋正中の粘膜をメスで切開し、骨膜剥離器を用いて骨を露出させた。歯科用バーを用いて口蓋に直径 1 mm の穴を開け、38%リン酸で骨表面を 1 分間酸処理した後、十分に洗浄した。穴を覆うように AT-Ti シートを接着し、口蓋粘膜を縫合し創面を閉鎖した。手術後 0 日目および 7 日目にラットを屠殺し、口蓋骨を採取して 4% パラホルムアルデヒド

(PFA) で固定した。口腔顎顔面領域のマイクロ CT 画像は、Latheta LCT-200（アロカ株式会社，東京）を用いて 90 kV，110 mA，スライス幅 120 μm で撮影した。

5. 統計解析

骨ブロック幅の測定および剪断接着試験は各 4 回実施された。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で示した。複数群間の比較には、StatView-5.0 (SAS Institute Inc., NC, USA) を用いて一元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey's HSD 検定を行った。統計的有意水準は $p < 0.01$ とし評価した。

結果

1. AT-Ti シートの特性

Ti シートを $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HCl}$ 溶液で酸処理を行った。本研究で使用した厚さ $15\ \mu\text{m}$ のシートでは、25 分以上の処理により Ti シートの部分崩壊が観察された。したがって、すべての実験では 20 分間酸処理の Ti シートを使用した。酸処理後の AT-Ti シートは表面の金属光沢が失われ、暗色化が認められた (図 1A)³³⁾。先行研究より、これは接着メカニズムに関与し、より疎水性を示す TiH_2 の形成に起因したと考えられる。SEM 像では、酸処理により表面の粗造化が確認された (図 1B)。

2. 骨ブロック

ブタ大腿骨ブロックを $38\%\text{H}_3\text{PO}_4$ で処理し、骨表層脱灰を誘導した (図 2A)。SEM での骨ブロック表面の観察では酸処理後の骨表面における線維構造の増加が確認された (図 2B)、また、光学顕微鏡での骨ブロック断面の観察では、酸に接触した面に透過性の増加が認められた (図 2C)。この透過性の増加した部位の厚みを計測し、脱灰時間を比較したグラフを示す (図 2D)。このグラフから、未脱灰の場合と比較し、骨への酸処理時間が 60 秒以上で優位に脱灰されていたことが判明した。加えて EDS 分析により、脱灰により半透明層におけるカルシウム (Ca) 含有量の大幅な減少と、それに対応する炭素 (C) 含有量

の増加が確認された（図 2E）。これらの所見は、脱灰によるリン酸カルシウムの消失とそれとともにコラーゲン線維の露出を示唆している。

より詳細に骨表面の評価を行うために、AFM による観察を行ったところ、酸処理開始 10 秒以内に球状に見られる無機沈着物が消失し、コラーゲン線維が明瞭に露出した。さらに、見かけのヤング率計測では、酸処理開始後 10 秒以内に急激に低下し、その後は緩やかな減少を示した（図 3A）。処理時間経過とともに表面粗さの増加も観察された。3D 再構築後のマッピングからは、不均一な脱灰が示唆された（図 3B）。

3. 剪断接着試験

AT-Ti シートは、未処理の骨には接着せず、脱灰骨表面に圧接することで強固な接着を示した（図 4A）。骨への接着強度は骨脱灰時間の経過とともに増加し、60 秒処理後に約 200 kPa の最大値に達したが、300 秒脱灰後には骨接着強度が低下した。剪断接着試験後の Ti 表面の SEM 像から、N-Ti シートでは表面沈着物を認めなかったが、AT-Ti シートでは脱着後の表面に線維状のコラーゲンとみられる沈着物を認めた（図 4Ba, b）。

4. 動物実験

SD ラットを用い、口蓋骨に瘻孔を形成し口蓋裂瘻孔モデルを作製した、作製時の模式図を示す（図 5A）。AT-Ti シートは脱灰骨に瞬時に強固に接着し、術後 4 週目に実施したマイ

クロ CT 解析により瘻孔閉鎖の継続が確認され、AT-Ti シートが口蓋骨に強固に付着し移動していないことが示された（図 5B）。一方 N-Ti シートでは骨への接着性がなく、シートが移動しており、また、瘻孔閉鎖は認められなかった。

考察

口蓋裂残遺孔は、飲食物の鼻腔への流入や構音障害など、患者の生活の質（QOL）を低下させる^{36,37)}。これら瘻孔に対しては二次的な外科的処置を必要とすることが一般的であるが、閉鎖する粘膜の癒痕化から瘻孔を被覆する粘膜骨膜弁の可動性の低下や血流の問題から、その閉鎖術による手術成績も必ずしも高いものではない。また、それら因子のほか、瘻孔が再発する要因として瘻孔部の骨欠損が挙げられる。瘻孔閉鎖術では瘻孔周囲の粘膜を翻転して行う鼻腔側の粘膜縫合と口腔側粘膜弁の移動で行う口腔側粘膜縫合間で行うがこれら粘膜で閉鎖された下部に存在する骨欠損部に一致した Dead Space が存在する。この Dead Space の存在から閉鎖した粘膜弁への血流の回復障害を生じ、また Space での肉芽形成と癒痕拘縮によりわずかな裂開から瘻孔を容易に再発する。そのため、この Dead Space による影響を排除するため、自家骨や脂肪組織、あるいは骨補填材などの介在物を填入させることが示されている。一方、インプラント前治療で行われる骨増生治療では歯槽骨形態を維持させるためにチタンシートやメッシュによる被覆が行われており良好な成績を示している。そこで、瘻孔閉鎖術において骨欠損部分を被覆する材料としてチタン製材を応用することで Dead Space による影響を排除できるのではないかと考えるに至った。しかしながら歯槽骨増生で用いられているシートあるいはメッシュでは、スクリューなどでの固定が必要となり、広範囲な剥離が必要となるため、口蓋裂残遺孔閉鎖術には適応できない。そのため、剥離範囲を最小として骨欠損部を被覆できる、骨組織と接合性を有するチタ

ン製のシート材の開発が望ましい。本研究では、すでに軟組織と接合性を有することが確認されている AT-Ti シートについて着目し、骨表面の脱灰処理による骨への即時かつ強固な接着を実現し、瘻孔閉鎖材としての有効性を確認することを目的とした。

先行研究では、AT-Ti シートが真皮組織を含む生体軟組織に対して高い直接接着性を示すことが報告されている³⁸⁾。そのメカニズムとして、AT-Ti シートの疎水表面が局所的にコラーゲンの水分含有量を減少させ、コラーゲン粘度の急激な上昇を引き起こすことで接着に寄与することが実証されている。さらに、このコラーゲン粘度増加の背景にあるメカニズムは、コラーゲン脱水に伴う三重らせん構造の破綻により、疎水性アミノ酸（特にグリシン）が露出することにある³⁹⁻⁴¹⁾。これらの知見に基づき、本研究では骨脱灰処置を通じて骨コラーゲンの露出を試みた。歯科分野において、硬組織の脱灰はエナメル質や象牙質など歯組織へ人工材料を接着させるために広く用いられてきた。本研究では、エナメル質脱灰に用いられるものと同じ濃度の H_3PO_4 水溶液を使用した^{42,43)}。その結果、骨の無機質脱灰とコラーゲン露出が 60 秒以内という極めて短時間で認められた。脱灰処理された骨断面の観察から、この脱灰処理は主に無機成分を除去し、コラーゲンを含む基質成分の除去には働かないことが明らかとなった。重要な点として、この酸処理溶液の効果は骨表面に限定された。60 秒以内の処理では、脱灰深度は 40 μm 未満であった。この現象は骨物性、機能の維持に重要である。AFM による脱灰骨表面の解析では、処理時間の延長に伴い脱灰骨表面に残存するマトリックスが軟化することが示された。一般的に接着強度は被着

体の物理的特性に強く依存することが知られており、本研究の結果は酸処理による骨表面の性状変化が強固な接着の一因であることを示唆している。骨表面の酸処理時間の最適化により、見かけの Young 率低下に裏付けられる軟組織の露出が重要と考えられた⁴⁴⁾。

ブタ骨ブロックを用いた AT-Ti シートとの剪断接着試験の結果、想定通り AT-Ti シートは酸処理した骨に軽い圧接で瞬時に接着した。剪断接着試験では最大接着強度が約 200 kPa に達した。この接着強度は、AT-Ti シートを用いた真皮組織との接着強度である 60 kPa を上回った³⁸⁾。接着強度は被接着体の物理的特性に影響されるため、骨のような硬く強靱な材料では接着強度が高くなったと考えられる。このことは、酸処理時間が 200 秒以上になると接着強度が低下することからも裏付けられる。AT-Ti シートの接着におけるコラーゲン線維の関与は、脱着後に AT-Ti シートに付着したコラーゲン線維残渣の存在からも確認された。

In vivo でも、AT-Ti シートは骨に瞬時に強固な接着を示した。この接着は 4 週間後のマイクロ CT 画像結果でも確認され、接着部位における AT-Ti シートの移動を認めず、隙間ない結合が維持されていた。また、接着後に採取した組織より、AT-Ti 上は軟組織で被覆され瘻孔形成を認めなかった。AT-Ti シート周囲では炎症性所見も認められず、骨や粘膜に対する高い親和性を示したと考えられる。一方で、N-Ti シートは骨への接着性を示さず、N-

Ti シートは接着面の移動を認め、それにより粘膜弁の瘻孔閉鎖不全が生じた可能性が示唆された。

口蓋裂術後残遺孔形成の要因には、根本的には骨欠損部で行った鼻腔側、口腔側粘膜縫合部での血流障害や瘢痕拘縮などの手術的要因のほか、術前からある舌癖や吸啜時など口腔習癖による口蓋粘膜への刺激の残存がある⁴⁵⁾。また、これら因子は瘻孔閉鎖術においても、瘻孔再発の要因として挙げられ、いずれにせよ、根本的な要因である骨欠損部に対しての処理として、高強度人工材料の使用はこれらの原因に対処する有望な手段であり、高い生体適合性を有する Ti シートが一つの選択肢となる。本実験で使用した AT-Ti シートは、骨・粘膜双方への安定した持続的接着性を示し、即時固定、取り扱いの容易性、機械的強度などの有用性があることが示された。これらの特性は、骨増生のための骨増生法（GBR 法）を含む歯科・整形外科的再建・再生のための新たな生体材料としての臨床的有用性を示唆している⁴⁶⁾。一方で、酸処理時の周辺組織への侵襲性を防止する方法など、骨表面処理の最適化は、今後の重要な課題である⁴⁷⁾。

結論

AT-Ti シートと骨表面への酸処理という二つの手法を組み合わせることで、新規残遺孔閉鎖法を開発した。本手法では、金属材料の骨への結合に必要とされてきたボルト固定などの手術手技を簡略化でき、手術時間の大幅な短縮が期待される。さらに、本技術は残遺孔閉鎖にとどまらず、歯科・整形外科領域における骨増大を目的とした GBR 法や、顎変形症手術における骨片位置の調整などへの応用も想定され、新たな骨治療法として高い発展性を有すると考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体材料学分野の松本卓也教授，歯科矯正学分野の上岡寛教授に心から感謝致します．そして，様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました，岡山大学大学院学術研究院医歯薬学域歯科矯正学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます．

文献

- 1) 白砂兼光, 古郷幹彦, 白石泰夫. 口腔外科学. 第4版, 東京, 医歯薬出版株式会社, 2022, 64.
- 2) Alsaffar Z, Attack N, Copper P, Durman K, Fauzi A, Fowler P, Haworth J, Homoud N, House K, Ireland T, Ming CJ, Jopsen J, Charlotte M, Sandy J. Postgraduate Notes in Orthodontics: DDS/MOrth Programme, 9th ed. Bristol Dental Hospital, Bristol, Child Dental Health Department, 2021.
- 3) Proffit WR. Contemporary Orthodontics. 6th ed. Elsevier, Philadelphia, IL. 2018.
- 4) Goldberg WB, Ferguson FS, Miles RJ. Successful Use of a Feeding Obturator for an Infant. with a Cleft Palate. Spec Care Dent. 1988; 8: 86-89.
- 5) Osuji O. Preparation of Feeding Obturators for Infants with Cleft Lip and Palate. J. Clin Pediatr Dent. 1995; 19: 211-214.
- 6) Samant A. A One-Visit Obturator Technique for Infants with Cleft Palate. J Oral Maxillofac Surg. 1989; 47: 539-540.
- 7) Jones JE, Henderson L, Avery DR. Use of a Feeding Obturator for Infants with Severe Cleft. Lip and Palate. Spec Care Dent. 1982; 2: 116-120.
- 8) Choi BH, Kleinheinz J, Joos U, Komposch G. Sucking Efficiency of Early Orthopaedic Plate and Teats in Infants with Cleft Lip and Palate. Int. J Oral Maxillofac Surg. 1991; 20: 167-169.

- 9) Muzaffar AR, Byrd HS, Rohrich RJ, Johns DF, LeBlanc D, Beran SJ, Anderson C, Papaioannou A. Incidence of Cleft Palate Fistula: An Institutional Experience with Two-Stage. Palatal Repair Plast Reconstr. Surg. 2001; 108: 1515-1518.
- 10) Cohen SR, Kalinowski J, LaRossa D, Randall P. Cleft Palate Fistulas: A Multivariate Statistical Analysis of Prevalence, Etiology, and Surgical Management. Plast Reconstr Surg. 1991; 87: 1041-1047.
- 11) Emory RE, Clay RP, Bite U, Jackson IT. Fistula Formation and Repair after Palatal Closure: An Institutional Perspective. Plast Reconstr Surg. 1997; 99: 1535-1538.
- 12) Jeffery SL, Boorman JG, Dive DC. Use of Cartilage Grafts for Closure of Cleft Palate Fistulae. Br J of Plast Surg. 2000; 53: 551-554.
- 13) Tezel E. Buccal Mucosal Flaps: A Review. Plast Reconstr Surg. 2002; 109: 735-741.
- 14) Coghlan K, O'Regan B, Carter J. Tongue Flap Repair of Oro-Nasal Fistulae in Cleft Palate Patients. A Review of 20 Patients. J Crani-Maxill-Fac Surg. 1989; 17: 255-259.
- 15) Vandeput JJ, Droogmans B, Tanner JC. Closure of Palatal Fistulas Using a Dermis-Fat Graft. Plast Reconstr Surg. 1995; 95: 1105-1107.
- 16) Chen HC, Ganos DL, Coessens BC, Kyutoku S, Noordhoff MS. Free Forearm Flap for Closure of Difficult Oronasal Fistulas in Cleft Palate Patients. Plast Reconstr Surg. 1992; 90: 757-762.
- 17) Schwabegger AH, Hubli E, Rieger M, Gassner R, Schmidt A, Ninkovic M. Role of Free-Tissue

- Transfer in the Treatment of Recalcitrant Palatal Fistulae among Patients with Cleft Palates.
- Plast Reconstr Surg. 2004; 103: 1131-1139.
- 18) Wilhelmi BJ, Appelt EA, Hill L, Blackwell SJ. Palatal fistulas: Rare with the Two-Flap Palatoplasty Repair. Plast Reconstr Surg. 2001; 107: 315-318.
 - 19) Denny AD, Amm CA, Surgical Technique for the Correction of Postpalatoplasty Fistulae of the Hard Palate. Plast Reconstr Surg. 2005; 115: 383-387.
 - 20) Parvini P, Obreja K, Begic A, Schwarz F, Becker J, Sader R, Salti L. Decision-Making in Closure of Oroantral Communication and Fistula. Int J Implant Dent. 2019; 5: 13.
 - 21) Honda K, Nishimura K, Tsujimura T, Makoto M. Palatal Mucoperiosteal Flap for Oro-nasal Fistula Following Maxillectomy for Maxillary Sinus Cancer. Auris Nasus Larynx 2023; 50: 266-271,
 - 22) Scattarella A, Ballini A, Grassi FR, Carbonara A, Dituri A, Nardi GM, Cantore S, Pettini F. Treatment of Oroantral Fistula with Autologous Bone Graft and Application of a Non-Reabsorbable Membrane. Int J Med Sci 2010; 2: 267-271.
 - 23) Ha JH, Jeong Y, Koo YT, Jeon S, Chung J, Kim S. Effect of Collagen Matrix on Postoperative Palatal Fistula in Cleft Palate Repair. Sci Rep. 2020; 10(1): 15236.
 - 24) Lopes P, Sampaio D, Menezes B, Nascimento D, Torres B. Combined Palatal Flap and Titanium Mesh for Oroantral Fistula Closure. Ann Maxillofac Surg. 2015; 5(1): 89.
 - 25) Gareb B, Bakelen N, Verkerke G, Vissink A, Bos R, Minnen B. Comparison of the Mechanical

- Properties of Biodegradable and Titanium Osteosynthesis Systems Used in Oral and Maxillofacial Surgery. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 18143.
- 26) Gareb B, Bakelen NB, Dijkstra PU, Vissink A, Boss RRM, Minnen B. Biodegradable versus Titanium Osteosynthesis in Maxillofacial Traumatology: a Systematic Review with Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2020; 49(7): 914-931.
- 27) Bergsma JE, Bruijn W, Rozema F, Rozema R, Bos R, Boering G. Late Degradation Tissue Response to Poly(L-lactide) Bone Plates and Screws. *Biomaterials.* 1995; 16(1): 25.
- 28) Lyu S, Untereker D. Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices. *Int J Molecul Sci.* 2009; 10(9): 4033-4065.
- 29) Yoon JH, Park YW, Kim SG. Titanium Mesh and Pedicled Buccal Fat Pad for the Reconstruction of Maxillary Defect: Case Report. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2021; 43(1): 10.
- 30) Park YW, Kang HS, Lee JH. Comparative Study on Long-Term Stability in Mandibular Sagittal Split Ramus Osteotomy: Hydroxyapatite/Poly-l-Lactide Mesh versus Titanium Miniplate. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2019; 41(1): 8.
- 31) Costa DL, Torres AM, Bergamaschi IP, Kluppel LE, Oliveira R, Weber JBB. Assessment of Resorbable and Non-Resorbable Fixation Systems in Sagittal Split Ramus Osteotomy: An *In Vitro* Study. *J Maxillofac Oral Surg.* 2022; 21(3): 779-784.

- 32) Ahmed WSM. Closure of Oroantral Fistula Using Titanium Plate with Transalveolar Wiring. J Maxillofac Oral Surg. 2015; 14(1): 121-125.
- 33) Wang Y, Okada M, Xie SC, Jiao YY, Hara ES, Yanagimoto H, Fukumoto T, Matsumoto T. Immediate Soft-Tissue Adhesion and the Mechanical Properties of the Ti-6Al-4V Alloy after Long-Term Acid Treatment. J Mater Chem B. 2021; 9(39): 8348-8354.
- 34) Efremov YM, Shpichka AI, Kotova SL, Timashev PS, Viscoelastic Mapping of Cells Based on Fast Force Volume and Peak Force Tapping, Soft Matter . 2019; 15(27): 5455-5463.
- 35) Efremov YM, Okajima T, Raman A. Measuring Viscoelasticity of Soft Biological Samples Using Atomic Force Microscopy, Soft Matter. 2020; 16(1): 64-81.
- 36) Rossell-Perry P. Flap Necrosis after Palatoplasty in Patients with Cleft Palate. Biomed Res Int. 2015; 516375.
- 37) Denadai R, Zanco GL, Raposo-Amaral CA, Buzzo CL, Raposo-Amaral CE, Outcomes of Surgical Management of Palatal Fistulae in Patients with Repaired Cleft Palate. J Craniofac Surg. 2020; 31(1) : 45-50.
- 38) Okada M, Nakai A, Hara ES, Taguchi T, Nakano T, Matsumoto T. Biocompatible Nanostructured Solid Adhesives for Biological Soft Tissues. Acta Biomater. 2017; 57: 404-413.
- 39) Wess TJ, Orgel JP. Changes in Collagen Structure: Drying, Dehydrothermal Treatment and

- Relation to Long Term Deterioration. *Thermochimica Acta*. 2000; 365(1-2): 119-128.
- 40) Giannetti G, Matsumura F, Caporaletti F, Micha D, Koenderink GH, Ilie IM, Bonn M, Woutersen S, Giubertoni G. Water and Collagen: A Mystery Yet to Unfold. *Biomacromolecules*. 2025; 26(5): 2784-2799.
- 41) Simone AD, Vitagliano L, Berisio R. Role of Hydration in Collagen Triple Helix Stabilization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 372(1): 121-125.
- 42) Saker S, Özcan M, Al-Zordk W. The Impact of Etching Time and Material on Bond Strength of Self-adhesive Resin Cement to Eroded Enamel. *Dent Mater J*. 2019; 38(6): 921-927.
- 43) Legler LR, Retief DH, Bradley EL. Effects of Phosphoric Acid Concentration and Etch Duration on Enamel Depth of Etch: An in vitro study. *Amer J Orthod Dentofac. Orthoped*. 1990; 98(2): 154-160.
- 44) Yan C, Mai YW, Yuan Q, Ye L, Sun J. Effects of Substrate Materials on Fracture Toughness Measurement in Adhesive Joints. *Int J Mechanic Sci*. 2001; 43(9): 2091-2102.
- 45) Duskova M, Kotova M, Sedlackova K, Leamerova E, Horak J. Bone Reconstruction of the Maxillary Alveolus for Subsequent Insertion of a Dental Implant in Patients with Cleft Lip and Palate. *J Craniofac Surg*. 2007; 18(3): 630-638.
- 46) Lizio G, Pellegrino G, Corinaldesi G, Ferri A, Marchetti C, Felice P. Guided Bone Regeneration Using Titanium Mesh to Augment 3-dimensional Alveolar Defects Prior to

Implant Placement. A Pilot Study. *Clinic Oral Implants Res.* 2022; 33(6): 607-621.

- 47) Hartnett KM, Fulginiti LC, Modica FD. The Effects of Corrosive Substances on Human Bone, Teeth, Hair, Nails, and Soft Tissue. *J Forensic Sci.* 2011; 56(4): 954-959.

図表の説明

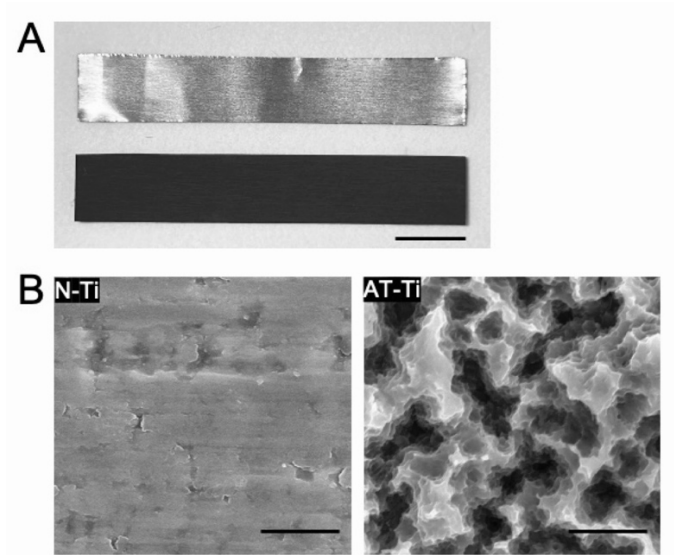


図 1 酸処理が Ti シートに及ぼす影響

A) 未処理の Ti シート (N-Ti, 上部) および酸処理後の Ti シート (AT-Ti, 下部) .

Scale bar: 5 μm .

B) B) N-Ti シート (左方) および AT-Ti (右方) の SEM 像. Scale bar: 2 μm .

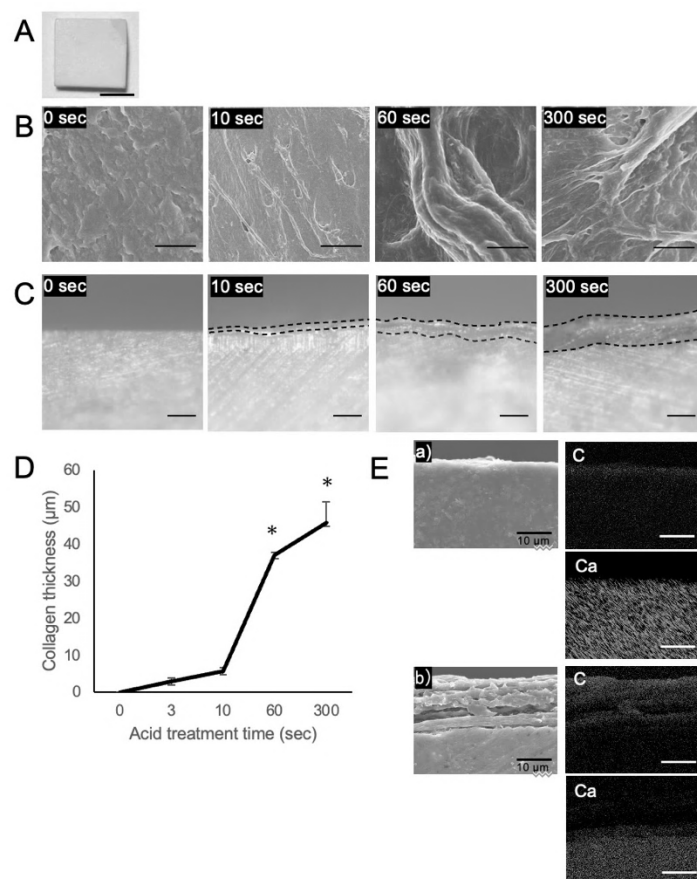


図2 骨ブロックの脱灰

A) 実験に使用した骨ブロックの写真. Scale bar: 5 mm.

B) 各脱灰時間の骨ブロック表面の SEM 像. Scale bar: 2 μm.

C) 各脱灰時間の骨ブロックの断面像. 波線部は透過性が増加している部位を示す. Scale bar: 50 μm.

D) 骨ブロック断面像得られた, 各脱灰時間と透過性が増加している部位の厚みを比較したグラフ. アスタリスク (*) は有意差を示す ($p < 0.01$). Scale bar: 50 μm.

E) 脱灰された骨ブロック断面の SEM 像（左）および EDS 像：Ca（右上）. C（右下）. E-

a) は未脱灰, E-b) は 60 秒間脱灰したサンプルである. Scale bar: 40 μm .

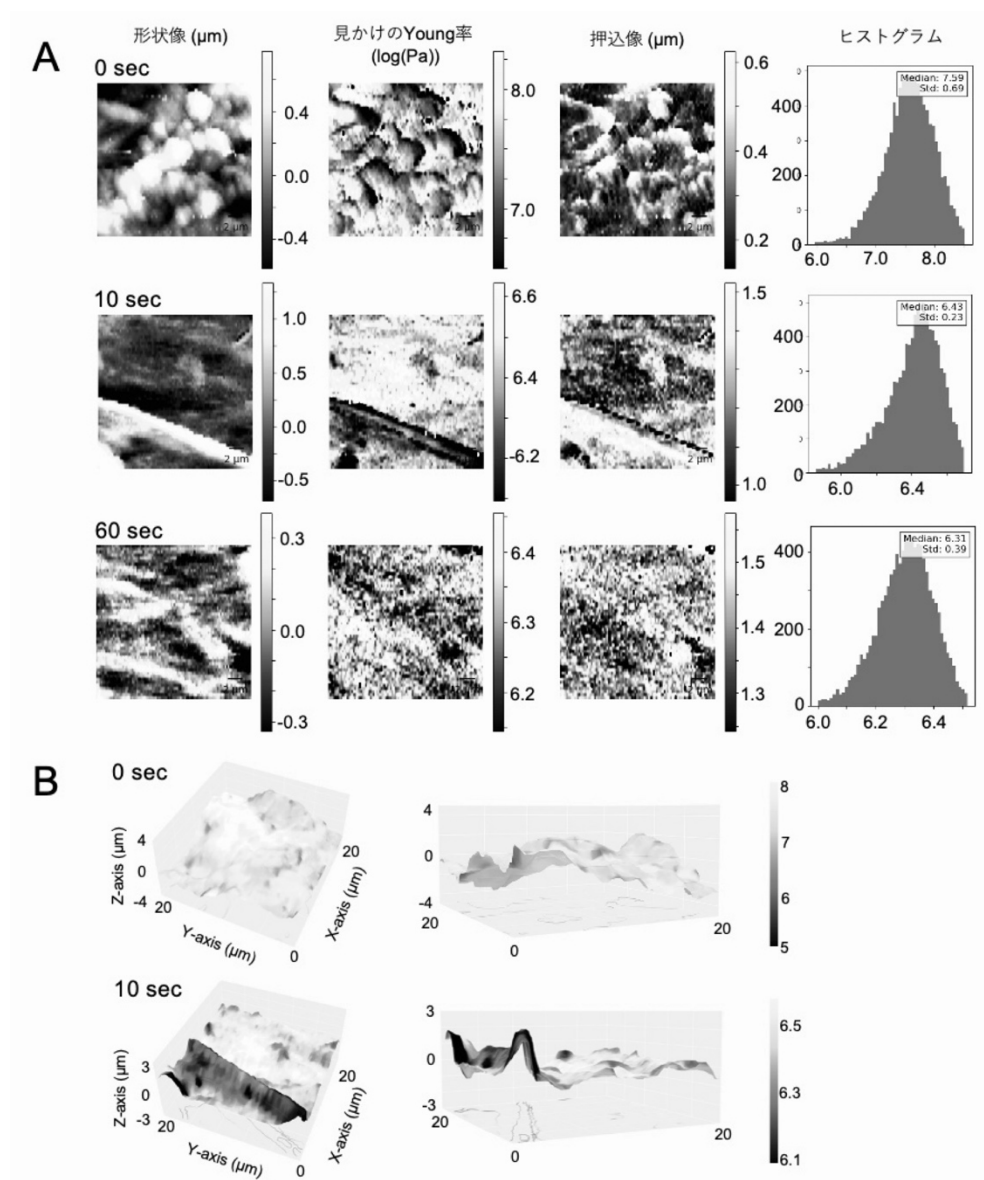


図3 AFMによる初期脱灰時の骨ブロック形態変化の評価

A) 0秒, 10秒, 60秒での各脱灰時間の骨ブロック表面のAFM像（左: 形状像, 中央: 見かけのYoung率, 右: 押し込み量）および, 見かけのYoung率を示したヒストグラム.

Scale bar: $2\mu\text{m}$.

B) 各脱灰時間の骨ブロックから得られた, 見かけのYoung率の3D再構築像.

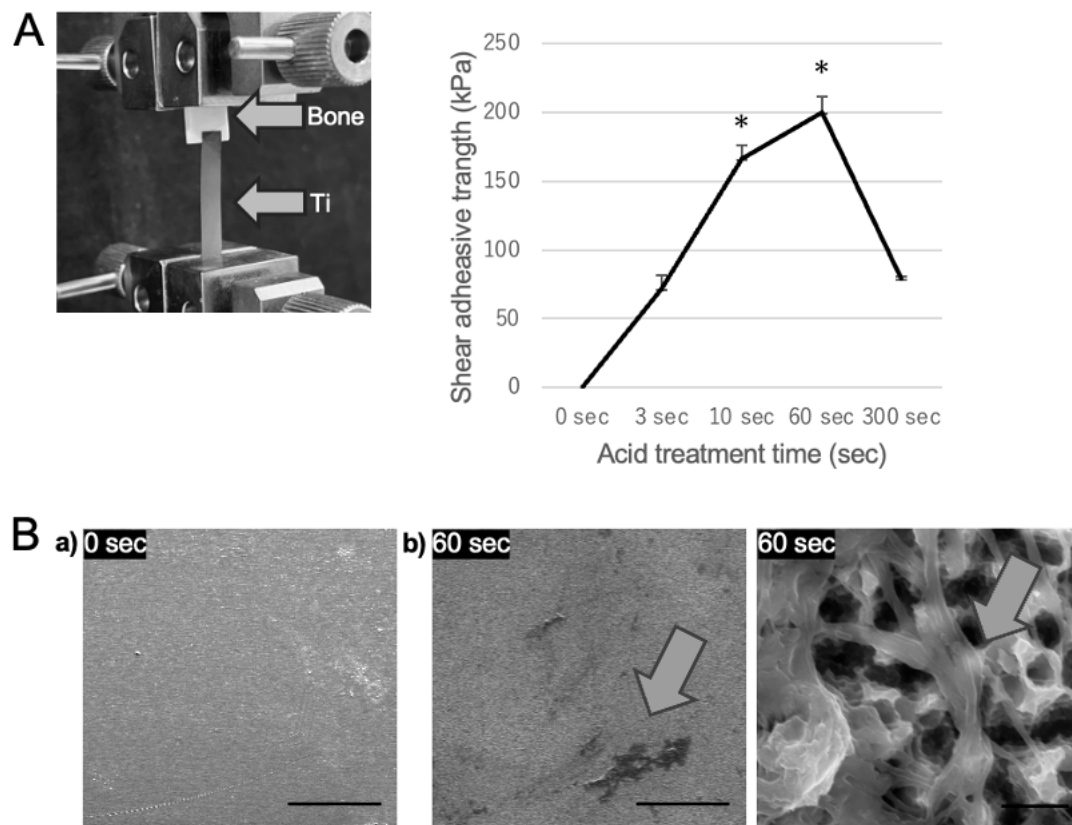


図 4 AT-Ti と骨ブロックの剪断接着試験

A) 試験機の取り付け時の様子および，AT-Ti と各時間で脱灰された骨との剪断接着試験

の結果．アスタリスク（*）は 0 秒を基準とした有意差を示す（ $p < 0.01$ ）．

B) 接着試験後の AT-Ti の SEM 像．B-a) 未処理骨との接着後の AT-Ti 表面の様子．矢印は

接着後に付着した被着体を指す．Scale bar: 400 μm ．B-b) 60 秒酸処理後の骨との接着後

の AT-Ti 表面の様子．矢印は接着後に付着した被着体を指す．左: Scale bar: 400 μm ，右:

Scale bar: 2 μm ．

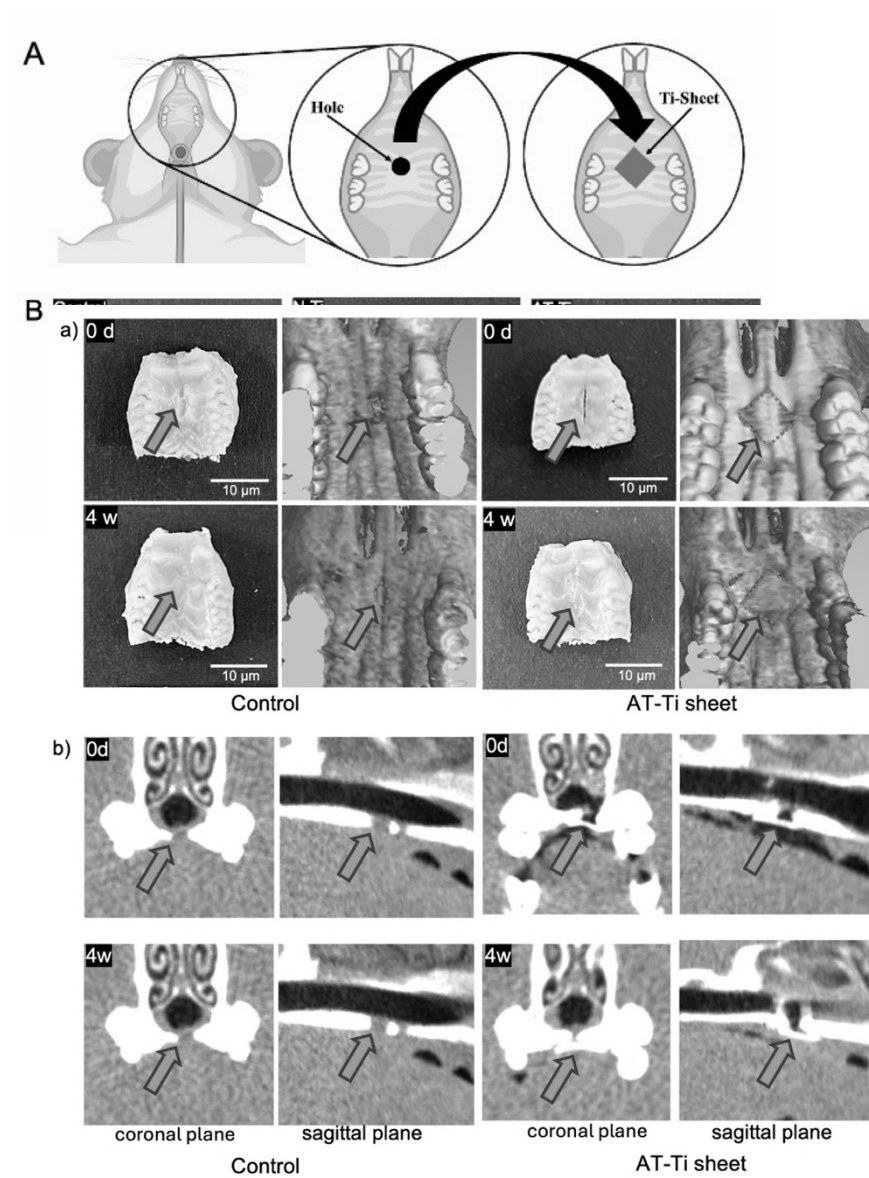


図 5 *In vivo* での接着性の確認

A) 口蓋に穴を形成し, Ti シートを固定する実験手順の模式図.

B) 摘出した口蓋骨および CT 像. B-a) 接着直後および 4 週間経過後に摘出した口蓋の様

子 (左) と, それぞれの CT 像 (右) を示す. 矢印は瘻孔部および AT-Ti シートを示

す. Scale bar: 5 mm. B-b) B-a)の CT 像より得られた冠状面断 (左) と矢状面断 (右) を示す. 矢印は瘻孔部を示す.