

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11124

研究課題名(和文) バイオアクティブ材料の開発および長期耐久性向上に関する研究

研究課題名(英文) Development of bioactive materials and improvement on long-term durability

研究代表者

伊藤 修一 (ITO, Shuichi)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：50382495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯科臨床では接着性修復材料が多用されているが、長期耐久性など改善すべき点も残されている。そこで、接着性モノマーである4-METにCaを結合させたCa塩(MDCP)を開発し、ワンステップボンディング材(HC)へ添加することにより、長期耐久性の向上や象牙質石灰化能の発現などについて実験を行った。HCと比べて象牙質接着において良好なボンディング層が形成され、初期接着強さが増大した。硬化後のボンディング材の耐溶解性および接着の耐久性が向上した。MDP-Caは4-MET-Caと異なる機構で接着性向上に寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The adhesive restorative material is essential for dental treatment. However, there are some points to be improved in the material such as long-term durability. Recently, the development of adherent monomer, 4-MET linked with calcium (4-MET-Ca) were blended the one step bonding (HC). This study aims to develop MDP-Ca newly, and to investigate of new bonding material (MDCP) that MDP-Ca was blended into the all-in-one self-adhesive material comprising 4-META. MDCP formed excellent bonding layer, showed high adhesive ability compared to the control. MDCP was improved dissolution resistance and long-term durability of cured bonding material. Compared to the CMET, MDCP was no significant but showed superiority. It was suggested that MDP-Ca improved the adhesion strength in a different manner from 4-MET-Ca.

研究分野：歯科保存学

キーワード：象牙質 再石灰化 バイオアクティブ材料

## 1. 研究開始当初の背景

### - 接着性修復材の変遷と課題 -

近年、歯科保存修復学の分野において歯の象牙質に対する接着性材料が著しく進歩し、歯科臨床において、より頻繁に使用されている。従来は浸透性、接着性に重点を置いて接着性モノマーの開発が行われてきたが、抗菌性のモノマーの配合など接着性修復材の多機能化が進んでいる。しかしながら、接着修復物の脱落、修復物周囲の2次カリエスなど長期的な耐久性には、まだまだ改善すべき点が多い。脱灰象牙質においてボンディング材が浸透していないナノリーケージが存在し、この部分から経時的に修復材の崩壊が始まるということが報告されている(Sano et al. Oper Dent 20, 1995)。また、これまで我々は、ボンディング材が吸水により、経時的に崩壊することを報告した(Ito et al. Biomaterials 26, 2005)。これらの研究を通して、象牙質接着界面が再石灰化することができれば、修復材の耐久性が向上するという考えに至り、これまでの研究成果より得た、科学的な根拠・技術をもとに再石灰化誘導能を有する接着性モノマーを開発し特許を出願した(特願 2005-175439)。これらの象牙質再石灰化誘導について報告した(Ito et al. J Biomed Mater Res A, 2012)。また、各種イオンを徐放するフィラーに着目し、その象牙質再石灰化能について、報告してきた(Ito et al. J Dent 39, 2011)。しかしながら、これらの製品化を行うためには、新たな接着性モノマーの開発やその組み合わせによる、詳細な組成の検討、被着体である象牙質コラーゲンに対する相互作用などの評価を行うことが必要である。これらの知識・技術の蓄積をもとに、長期耐久性を持ったバイオアクティブ材料を開発することができれば、保存修復治療のみならず口腔全体の健康に寄与することができる。

## 2. 研究の目的

近年、歯科用接着性修復材の分野において、優れた浸透性、接着性を持つ接着性モノマーに重きがおかれ開発が行われてきた。しかしながら、その耐久性には、改善の余地が大いにあることを明らかにし、象牙質石灰化能を有する接着性モノマーの開発およびそれらを含むバイオアクティブ材料の開発に取り組んできた。さらに研究成果を発展させるために、より強力な再石灰化能と接着性を持った接着性モノマーの開発及びこれらを用いた修復材による象牙質再石灰化能、長期耐久性の評価、重合率などの物性の評価を行う。また、これに加えて、被着体である象牙質コラーゲンへの影響を評価することにより、開発してきた接着性モノマーおよび新規に開発する接着性モノマーを組み合わせることにより、象牙質再石灰化能と接着能及び長期耐久性を兼ね備えたバイオアクティブ修復材の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### 1. 新規接着性モノマーの合成及び試作ボンディング材および修復材の作製

攪拌装置、冷却管、温度計および滴下ロートを取り付けた反応装置に 4-MET を入れ、さらにエタノールを添加し冷却しながら攪拌する。この溶液に 2 モルの MDP に対して 1 モルの水酸化カルシウム水溶液を滴下し、得られる試料を濃縮した後、得られた白色の固体を室温で真空乾燥した。これを遊星ボールミルでさらに粉碎し、#280 篩で分級する。この後、生成物の NMR 分析および元素分析を行い同定する。また、以前に作製した 4-MET-Ca と新たに作製する MDP-Ca の配合量を変えた修復材を作製し、最適な配合量明らかにした。

### 2. 試作ボンディング材および修復材のヒドロキシプロリン量の測定

象牙質接着の長期耐久性を考えた場合、象牙質コラーゲンの加水分解を抑える事が重要である。そこで、指標となるコラーゲンアミノ酸ヒドロキシプロリン量を測定する。北海道医療大学倫理委員会にて承認され、本研究の内容を説明し、同意を得た患者様の矯正治療の理由により抜去したう蝕を有しないヒト小臼歯を本研究に使用した。象牙質を粉碎し 12N HCL に浸漬させ 120 分、3 時間高压状態にさせる。その後、試作ボンディング材、修復材で処理し、1, 3, 6 か月水中浸漬する。その後、遠心分離することで、上清を取り出し、ヒドロキシプロリン測定キットを用いて、ヒドロキシプロリン量の測定を行った。

### 3. ボンディング材および修復材の象牙質石灰化に対する影響

試作ボンディング材、修復材として、MDP-Ca、4-MET-Ca を種々の割合で配合したものをを用いた。これを 37℃にてハイドロキシアパタイト(HAP)に対する飽和度 7.41、7.59 および 7.74 を有するカルシウム・リン酸溶液中でインキュベートすることにより、再石灰化能の評価を行う。さらに、上記のボンディング材、修復材硬化物を蒸留水中に 4 日間浸漬して得られた溶液を 25, 50, 75, 100%濃度で添加する。同時にこれらの溶出液の溶出イオンを ICP(ICPS-8000, Shimadzu)で分析する。それぞれの試料により誘導された石灰化物中のカルシウム量を原子吸光分析(5100, Perkin-Elmer)により経時的に測定する。また、インキュベート 24 時間後に得られた試料に関して、走査型電子顕微鏡(SSX-550, 島津製作所)(SEM)により石灰化物の形態学的観察を行ない、微小領域 X 線回折装置(Rint 2000, 理学電気)により結晶の分析を行った。結晶構造解析システム(JADE ver8.5 MDI 社)により結晶の分析を行った。

### 4. 象牙質コラーゲンへの浸透性の検討

被着モデル系として、試作ボンディング材、修復材と型コラーゲンを用いて熱分析を行い、モノマーの浸透性とコラーゲン高次構造の関連性について検討を行った。試料として、ヒト象牙質脱灰コラーゲンと同型の型

コラーゲン (calfskin collagen, Sigma) を用いた。これらを、試作ボンディング材、修復材存在下で示差走査熱量測定装置 (DSC, Pyris 1 DSC, Perkin Elmer) を用い、20 ~ 60 まで 5 /min の昇温速度で測定した。熱曲線に現われた吸熱ピークでの温度を変性温度 Td と定義した。

#### 5. 象牙質接着界面の超微小硬さの測定

抜去歯の歯冠半分を歯軸に対して垂直に切断した。また歯頸部より 3mm のところで歯根を切断した。象牙質内に 3×3×1mm の窩洞形成を行い、その後 24 時間乳酸を用いて脱灰した。その後、再石灰化誘導能を有する接着性モノマーを用いたボンディング材、修復材を充填した。コンポジットレジンを用いてアクリル板に接着し、実験装置に装着した。これらの試料を 24h, 3 ヶ月, 6 ヶ月, 12 ヶ月後取り出した。超微小押し込み試験機, ENT-1100 (Elonix) を用いて、象牙質・樹脂含浸層・アドヒージプレジンの移行部の硬さ、相対ヤング率の測定を行った。

#### 6. 微小引張り試験の測定

実験 1 で作製した試料を実験に用いた。歯軸に対して平行に硬組織薄切器を用いてマイクロテンスイルテスト試料を調製した。試料を無作為に抽出し、クロスヘッドスピード 1mm/min にて微小引張り接着強さの測定を行う。それぞれの群につき 15 個の試験片を測定し、引張り接着強さを求めた。

#### 7. 象牙質接着界面の TEM 観察

2.5% グルタルアルデヒド含有 0.1mol/l カコジル酸緩衝液 (pH7.4, 4 ) にて 1 日固定した後、0.1mol/l カコジル酸緩衝液で洗浄した。その後試料をエタノール上昇系列にて脱水した。試料はエポキシ樹脂 (Epon 812, Polysciences, USA) で包埋する。包埋した試料はウルトラマイクローム (Ultracut UCT, Leica, Austria) を用い、ダイヤモンドナイフ (Diatome, Switzerland) にて 70 ~ 80nm の厚さに超薄切する。この試料を透過型電子顕微鏡 (H-800, 日立製作所) にて、75kV の加速電圧で接着界面の観察を行った。

#### 8. 長期浸漬における測定

長期の石灰化溶液を用いた生理学的圧力下での象牙質接着界面の超微小硬さの測定、微小引張り強さの測定、TEM 観察を行った。これにより、長期の接着界面の評価を行った。

#### 4. 研究成果

象牙質再石灰化能と接着能及び長期耐久性を兼ね備えたバイオアクティブ修復材の開発を行うことを目的として研究を行った。まず、新規接着性モノマーの合成及び試作ボンディング材および修復材料の作製を行った。攪拌装置、冷却管、温度計および滴下ロートを取り付けた反応装置に 4-MET を入れ、さらにエタノールを添加し冷却しながら攪拌する。この溶液に 2 モルの MDP に対して 1 モルの水酸化カルシウム水溶液を滴下し、得られる試料を濃縮した後、得られた白色の固体を

室温で真空乾燥する。これを遊星ボールミルでさらに粉碎し、#280 篩で分級する。この後、生成物の NMR 分析および元素分析を行い同定する。また、以前に作製した 4-MET-Ca と新たに作製する MDP-Ca の配合量を変えた修復材料を作製した。ワンステップボンディング材に 4-MET-Ca, MDP, 及び 4-MET-Ca, MDP の配合量を変えたものを試作した。その後、通法に従い、象牙質に対する接着強さをマイクロテンスイル試験にて評価を行った。また、微小引張り強さの測定後の破断面を SEM (S-3500N, 日立) にて観察し、接着界面の破壊様式を分析した。微小引張り試験において、全て試料間で有意差は認められなかった。しかしながら、破断面の観察において、MDP 含有の試料はコンポジットレジンでの凝集破壊が観察された。このことから、4-META と MDP の相互作用により、象牙質接着界面に影響を及ぼしていることが示唆された。また、試作ボンディング材の硬化体を作製後、1 週間水中保管し溶出液を作製した。この溶出液中に脱灰象牙質を 2 ヶ月間保管し、TEM 観察にて、コラーゲンに対する影響を評価した。コントロールと比較して、コラーゲンの加水分解を抑制する像が観察されたことから、新規接着性モノマーが、有機質にて影響を与える事が示唆された。

象牙質再石灰化能と接着能及び長期耐久性を兼ね備えたバイオアクティブ修復材の開発を行うことを目的として研究を行った。昨年度、調整を行った、4-MET-Ca, MDP-Ca を配合したボンディング材を用いて、微小引張り試験を、24 時間後、3 ヶ月の試料について測定を行った。その結果、3 ヶ月の試料において、コントロール、4-MET-Ca と比較して、MDP-Ca を配合した試料が有意に高い値を示した。このことから、MDP-Ca を配合することにより、新規接着性モノマーが、長期耐久性に影響を与えることが示唆された。また、試作ボンディング材の硬化体を作製後、1 週間水中保管し溶出液を作製した。この溶出液中に脱灰象牙質を 2 ヶ月間、及び 1 年間保管し、TEM 観察にて、コラーゲンに対する影を評価した。保管 2 ヶ月経過後の試料においては、溶出液保管後の試料では、コラーゲンの横紋構造が残存していたが、水中保管の試料においては、横紋構造の消失が認められた。また、1 年経過後の試料においても、同様な像が観察

された。これらの結果は、ボンディング材からの溶出イオンが、象牙質コラーゲンの加水分解に対して、何らかの影響を与えていることを示した。コントロールと比較して、コラーゲンの加水分解を抑制する像が観察されたことから、新規接着性モノマーが、有機質に対して影響を与える事が示唆された。コラーゲンに対する影響を調べるために、象牙質粉碎試料を用いてヒドロキシプロリン量計測を行った。その結果、試料保管 1 年後の試料において、ヒドロキシプロリンの溶出量は、水中保管が、ボンディング材溶出液浸漬試料

よりも有意に高い値を示した。これらの結果から、ボンディング材溶出液に浸漬したことで、脱灰コラーゲン表面に各種イオンが沈着し、酸処理に対する耐酸性を発揮してコラーゲンが分解されなかったことが示唆された。

象牙質再石灰化能と接着能及び長期耐久性を兼ね備えたバイオアクティブ修復材の開発を行うことを目的として研究を行った。一昨年度、調整を行った、4-MET-Ca, MDP-Ca を配合したボンディング材を用いて微小引っ張り試験を、6 ヶ月、1 年間水中保管した試料について測定を行った。その結果、すべて期間の試料において、コントロール、4-MET-Ca と比較して、MDP-Ca を配合した試料が有意に高い値を示した。このことから、MDP-Ca を配合することにより、新規接着性モノマーが、長期耐久性に影響を与えることが示唆された。また、象牙質接着界面における形態変化に対する評価を行った。健全象牙質面に上記のボンディング材処理した試料を作製した。試料は、37 ℃、人工唾液中に浸漬前(0 日)、浸漬 24 時間、1 週間、1 か月間保管した。切断面にイオンエッチング処理 SEM を用いて接着界面の観察を行なった。その結果、MDP-Ca 配合ボンディング材では、人工唾液浸漬前では、ボンディング層全域に多孔性の構造物が確認された。人工唾液浸漬 24 時間後にイオンエッチングに耐性を認める部分が SEM にて確認された。浸漬 1 週間後および 1 か月後には全域においてイオンエッチングに耐性を認めた。コントロールにおいては、全期間において、イオンエッチングに対して、耐性を認めなかった。一方、ボンディング材の吸水率および溶解率の測定を行った。その結果、MDP-Ca を配合することにより、吸水率および溶解率が低下することがわかった。これらの結果から、ボンディング材に MDP-Ca を添加したことで、象牙質に対する長期接着耐久性が向上し、イオンエッチングに対しても耐性を認めたことから、ボンディング材の機械的物性に対して影響を与えることが示唆された。

#### 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 5 件)

Kawamura N, Iijima M, Ito S, Brantley WA, Alpati SB, Muguruma T, Kawaguchi K, Saito T, Mizoguchi I. Wear Characteristics and inhibition of enamel demineralization by resin-based coating materials. 査読有, Eur J Oral Sci, 125 巻, 160-167, 2017.

伊藤修一. 象牙質再石灰化を誘導する材料. 査読有, 日本歯科保存誌, 60 巻, 267 - 269, 2017.

白井要, 伊藤修一, 中塚侑子, 清水伸太

郎, 河野舞, 齋藤隆史, 長澤 敏行, 古市保志. S-PRG フィラー含有根管貼薬剤が根尖孔外に及ぼす影響に関する *in vitro* での検討. 査読有. 日歯保存誌, 60 巻, 69-77, 2017.

Iijima M, Kawaguchi K, Kawamura N, Ito S, Saito T, Mizoguchi I. The effects of single application of pastes containing ion-releasing particles on enamel demineralization. 査読有. Dent Mater J, 36 巻, 461-468, 2017.

飯嶋雅弘, 伊藤修一, 川村尚彦, 齋藤隆史, 溝口 到. CO2レーザー照射とガラスイオノマーセメントによる象牙質の再石灰化. 査読有, 日本レーザー歯学会誌, 27巻, 101-107, 2016.

#### 〔学会発表〕(計 18 件)

油井知雄, 伊藤修一, 齋藤隆史. S-PRG フィラー溶出液が象牙芽細胞前駆細胞に与える影響. 第 3 回生体機能性材料 S-PRG フィラー研究会, 2018 年 2 月 23 日(京都府, 京都市)

油井知雄, 泉川昌宣, 松田康裕, 伊藤修一, 齋藤隆史. S-PRG フィラー溶出液が象牙芽細胞前駆細胞に与える影響. 第 147 回日本歯科保存学会, 2017 年 10 月 26 日~27 日, (岩手県, 盛岡市)

松田康裕, 奥山克史, 山本洋子, 泉川昌宣, 油井知雄, 伊藤修一, 林美加子, 齋藤隆史. ゲル状フッ化物含有知覚過敏抑制材料による象牙質再石灰化の検討. 第 15 回日本再生歯科医学会学術大会, 2017 年 10 月 21 日(大阪市, 大阪府)

Iijima M, Kawaguchi K, Kawamura N, Ishikawa R, Ito S, Saito T, Mizoguchi I. In vitro Effect of S-PRG containing paste in dentin remineralization. The 95<sup>th</sup> IADR, Mar 22 ~ 24, 2017, (San Francisco, USA)

Ito S. Possibility of bioactive materials containing Surface Pre-Reacted Glass-ionomer filler. International Dental Materials Congress 2016, Nov 4-6, 2016, (Bali, Indonesia)

Matsuda Y, Okuyama K, Yamamoto H, Ooki S, Izumikawa M, Yui T, Ito S, Sano H, Saito T. Demineralize prevention of dentin with S-PRG varnish via automatic pH-cycling. 146th scientific meeting of the Korean Academy of Conservative Dentistry (KACD) Oct 21<sup>st</sup>-23<sup>rd</sup> 2016 (Seoul, Korea)

伊藤修一. ホワイトニングが歯質に与える影響. 第 27 回日本歯科審美学会 シ

ンポジウム, 2016年8月26~28日, (北海道, 札幌市)

ALapati SB, Iijima M, Brantley WA, Ito S, Muguruma T, Saito T, Mizoguchi I. *In vitro* Investigation of Nanoproperties at Dentin-Pulp Capping Material Interface. 94<sup>th</sup>IADR, June22-25, 2016, (Seoul, Korea)

Kawamura N, Iijima M, Kawaguchi K, Alapati SB, Brantley WA, Ito S, Muguruma T, Saito T, Mizoguchi I. Wear Characteristics of Resin-based Coating Materials. 94<sup>th</sup>IADR, June 22-25, 2016, (Seoul, Korea)

近藤有紀, 伊藤修一, 植原 治, 倉重圭史, 齋藤隆史, 齋藤正人. 新規バイオアクティブセメントのイオン放出および生物学的性質の比較検討. 第144回日本歯科保存学会, 2016年6月9日~10日, (栃木県, 宇都宮市)

松田康裕, 奥山克史, 山本洋子, 大木彩子, 泉川昌宣, 油井知雄, 伊藤修一, 佐野英彦, 齋藤隆史. フッ化物含有知覚過敏抑制材による象牙質表面の脱灰抑制効果. 第144回日本歯科保存学会, 2016年6月9日~10日, (栃木県, 宇都宮市)

近藤有紀, 伊藤修一, 佐藤夕紀, 植原 治, 倉重圭史, 齋藤隆史, 齋藤正人. 新規バイオアクティブセメントのバイオフィルム形成抑制能および細胞増殖活性に対する影響. 第54回日本小児歯科学会, 2016年5月26~28日, (東京都, 文京区)

藤田裕介, 伊藤修一, 村井雄司, 近藤有紀, 齋藤隆史, 齋藤正人. ボンディング材における接着性モノマー添加による象牙質接着性に対する影響. 第54回日本小児歯科学会, 2016年5月26~28日, (東京都, 文京区)

伊藤修一. 予防的保存修復治療の考え方. 第13回顕微鏡歯科学会, 2016年4月23日~24日(北海道, 札幌市)

尾形美和, 伊藤修一, 齋藤隆史. イオン徐放性歯磨剤のエナメル質着色に対する影響. 第26回日本歯科審美学会, 2015年11月22, 23日, (東京都, 千代田区)

白井要, 植原治, 伊藤修一, 齋藤隆史, 古市保志. S-PRG フィラー含有根管貼薬剤のCandida albicans に対する効果について. 第142回日本歯科保存学会, 2015年6月25~26日, (福岡県, 北九州市)

飯嶋雅弘, 伊藤修一, 齋藤隆史, 溝口 到. CO<sub>2</sub> レーザー照射とフッ化物塗布を

併用したエナメル質の脱灰抑制. 第27回日本レーザー歯学会, 2015年6月6~7日, (北海道, 札幌市)

近藤有紀, 伊藤修一, 高田一江, 植原治, 倉重圭史, 齋藤隆史, 齋藤正人. 新規バイオアクティブセメントの物理化学的特性について. 第53回日本小児歯科学会, 2015年5月21~22日(広島県, 広島市)

〔図書〕(計 1 件)

伊藤修一, 齋藤隆史. 接着歯学 第3章 接着材料を用いた窩形成前病変への対応, 日本接着歯学会編. 医歯薬出版, 2015, P6-7.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 修一 (ITO, Shuichi)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 50382495

### (2) 研究分担者

飯嶋 雅弘 (IJIMA, Masahiro)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 20305915

齋藤 正人 (SAITOH, Masato)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号: 50337036

齋藤 隆史 (SAITO, Takashi)  
北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：40265070

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )