

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K18984

研究課題名（和文）歯表面で歯医者自身が直接構築できる微細パターンによる歯周病治療法の開発

研究課題名（英文）Development of periodontal disease treatment methods with fine patterns that can be constructed directly by dentists themselves on the tooth surface

研究代表者

赤坂 司（Akasaka, Tsukasa）

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：00360917

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：将来的に歯周組織再生を目指して、歯表面に微細構造を容易に作製するため、いくつかの方法を試みた。歯表面の曲面に微細構造を転写するための光照射器アタッチメントの作製や細胞にやさしい構築レジン成分の選別を行った。また、マスクによる酸エッチングやレーザーとの組み合わせなどで、歯を想定したアパタイト平面に対して微細構造作製が可能が検討したが、いずれも微細構造作製には不向きであった。一方で、歯根膜の再生を目指した羽付きピラーをデザインし、細胞を配向させる機能が確認できた。以上より歯周組織再生へ向けのデザインの基礎を築くことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、生体組織（本研究では歯）の表面にてナノテクノロジーの技術を応用し微細構造を直接構築する技術の開発である。また、細胞をコントロールするデザイン（形状）の発見にあり、それぞれ新しい学問領域の開拓に繋がる。社会的意義としては、本研究成果をさらに発展させれば、歯周病治療や歯周組織再生に繋がることである。多くの成人が歯周病になるが、重度歯周病により失った歯周組織を再生するのは困難で、現在、手術以外で簡単に歯周組織を再生させる方法はない。本研究での歯表面での微細構造作製技術およびデザインは、歯周病治療や歯周組織再生を促進する効果を持つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：For future periodontal tissue regeneration, we tried several methods to easily fabricate micro/nano-scaled patterns on the tooth surface. I fabricated light illuminator attachments for transferring patterns to curved tooth surfaces and selected cell-friendly resin components for pattern fabrication. I investigated the possibility of fabricating micro/nano-scaled patterns on apatite planes using acid etching with masks and in combination with lasers. Neither method was suitable for patterns fabrication. A winged pillar was designed to regenerate the periodontal ligament and its ability to orient cells was confirmed. These results provide the basis for a design for periodontal tissue regeneration.

研究分野：歯科理工学

キーワード：ナノインプリント 歯根膜再生 マイクロ・ナノパターン アパタイトパターン コラーゲンパターン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)本課題の長期目標は「次世代ナノテク歯科治療による歯周病治療の開発」である。多くの成人が歯周病になるが、重度歯周病により失った歯周組織を再生するのは困難で、現在、手術以外で簡単に歯周組織を再生させる方法はない。

(2)マイクロ・ナノ構造の作製技術が普及し、再生医療をはじめとするバイオ分野は、今後、集中的な競争分野となることが予想される。工業的材料によるパターンとの細胞応答性は一部報告があるが、現在のところ、コラーゲンやアパタイトによるパターン化シートは報告されていない。

2. 研究の目的

本申請では、歯の表面に微細構造を直接構築できるパターン化法を探索し、細胞培養にて効果の足がかりを見出したい。その際、正常歯周組織が持つ立体構造再生を目指し、歯科材料や歯自身にて超立体微細パターン種をデザインする。本課題により、「従来型の歯科治療では、歯根膜は再生されない」という歯科の固定概念を崩し、次世代歯科治療法として確立したい。また、ナノテク工学の立場からも生体に直接パターンニングする初の試みとして新しい学問分野を切り開きたい。

3. 研究の方法

(1)ナノインプリント法またはモールディング法

操作を容易にするスタンプアタッチメントの作製

歯曲面にフィットさせる歯表面接触部と歯科用照射器に接続するアタッチメント部を CADにてデザインした。CNCフライスにてワックス切削により、モールドを作製した。得られたモールドに対し、未重合のシリコンモノマーまたはウレタンモノマーを滴下し、任意条件にて硬化させ、アタッチメントを作製した。

パターン化レジン上での細胞培養および毒性評価

歯科用充填コンポジットレジン、歯科用象牙質接着材、歯面コーティング材、歯科用接着充填材の数種を使用し、ナノインプリント法にてパターン化した。その上にヒト歯肉線維芽細胞(HGF)、ヒト歯根膜線維芽細胞(HPDLF)、ヒト骨芽細胞様細胞(Saos-2)、マウスマクロファージ(RAW264.7)を培養し、細胞増殖を光学顕微鏡下で観察することにより毒性の有無を判断した。

表面にコラーゲンを持つレジンパターンの作製

コラーゲン酸性溶液をパターン化フィルムに滴下し乾燥させ、次にコラーゲン組織化溶液に浸漬させて3重らせん構造を再形成させた。その後、凝固液に浸漬後、乾燥した。コンポジットレジンとの親和性を上げるため、コラーゲン層に少量のボンディング材を添加し、その後、コンポジットレジンを積層した。照射での硬化後、テープを貼りつけ引き剥がし、コラーゲンを表面に持つレジンパターンを作製した。

滑らかな表面を持つアパタイトパターンの作製

これまでの方法でのアパタイトパターンでは、細孔が多く空いている状態であった。そこで、完全に充填された滑らかな表面を持つようなパターン化アパタイトの調製を目指した。COPパターン化フィルムを疑似液体に浸漬し、パターンが埋まる程度に薄層アパタイトを析出させた。一方では、転写先表面(例:カバーガラスなど)にコンポジットレジンを塗布した。ここに先に得たアパタイトコート COP フィルムを被せ照射することにより硬化させた。その後、注意深くフィルムを剥離することによりアパタイトパターンを得た。

(2)エッチング・マスク法によるパターン化

微細構造を持った TEM 用グリッドを金属製エッチングマスクとした。歯を模した平面アパタイトコートガラスを作製し、エッチングマスクを押し当てた。その後、マスクの上方から歯科用エッチング材(エッチャント)を塗布し、一定時間反応後、洗浄し、表面の SEM 観察を行った。

(3)エッチング・コンタクトプリント法によるパターン化

1~50 μm レベルのピラーパターンを形状として選び、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を材料としたコンタクトスタンプを作製した。次に、エッチャントを薄く広げた平面ガラスにスタンプを押し当てることによりスタンプにエッチャントを移した。続いて、アパタイト平面パターンにスタンプを一定時間押し当てエッチングにて形状が作製できるか検討した。表面形状は SEMにて確認した。

(4)レーザー・マスク法によるパターン化

象牙質スライス上へ、マスクとして微細形状を持つTEMグリッドを置き、3000 mW出力のレーザー加工機にてレーザー照射を行った。その後、表面形状はSEMにて観察した。

(5)羽付きピラーの調製と培養

高さ150~200 μm 、直径100 μm 程度の羽付きピラー構造をCADにて数種デザインし、超精細3Dプリンターにて出力した。得られた出力物をモールドとして用いCOPフィルムへ熱転写した。その後、プラズマ処理および滅菌後、ヒト歯根膜線維芽細胞(hPDLF)を培養した。

4. 研究成果

(1)ナノインプリント法またはモールドイング法

操作を容易にするスタンプアタッチメントの作製

歯曲面へのナノインプリントのため、市販歯科用光照射器の先端に取り付け可能なナノインプリントスタンプのためのアタッチメントを設計し試作した。これにより即有の照射器が使える上に、片手でナノプリント操作が可能となったため、操作性が飛躍的に向上した。現在のナノインプリントの問題の一つとして曲面への転写が挙げられる。本研究では適用する形状が歯曲面であるため、操作性も含め非常に困難であり、これまでにアタッチメントを利用した直接のナノインプリントは報告されていない。本研究では、歯科に広く普及している歯科用光照射器にアタッチメントを装着することにより、ハンディーなナノインプリント装置へと改良を達成できた。

パターン化レジン上での細胞培養および毒性評価

歯科用の光重合型レジン系材料は、成形性や転写性が高いため、歯表面に直接マイクロ・ナノパターンを作製するのに適した材料である。しかしながら、各種材料に対し細胞増殖性や毒性に関しては、未検討である。そこで現在治療にて使用されているいくつかの光硬化型歯科材料によるパターン化および毒性のスクリーニングを検討した。その結果、材料の種類によりパターン化性および毒性に大きな差が見られた。大まかな傾向として、レジン系の材料であればパターン転写性は良好であった。細胞増殖性に対しては、歯科用接着材(ボンディング材)系統が比較的良好な結果を示したが、充填用コンポジットレジンや歯科用接着材の中にも毒性を示すものがあった。これらの結果は、歯科材料の組成が大きく影響するため、パターン化に用いる材質の選択または改良が重要であることを示している。

細胞種の影響に関しては大きな違いがあるが、骨芽細胞様細胞 Saos-2 では、接着および増殖は問題なく行えたものの細胞の接着状態が比較的弱かった。ヒト歯根膜線維芽細胞の培養の結果、幅5~10 μm 、深さ10 μm 程度のグループ構造、または直線状に並んだピラー構造が、太い配向コラーゲン線維の産生に有効であった。パターンによる細胞の移動方向制御と強く関連していると思われる。以上のことから、現在市販されているレジン系材料においてアパタイトを多く含有した、細胞との親和性が高い材料が本研究の用途に合い有望であると考えられる。

表面にコラーゲンを持つレジンパターンの作製

歯の成分がアパタイトとコラーゲンであるため、歯表面のナノパターン化の材料としてもコラーゲンやアパタイトは興味を持たれる。そこで、ナノインプリント法によるレジンパターン化の改良として、コラーゲンとの傾斜組成を持ったパターン化を検討した。その結果、コラーゲンとプライマーおよびボンディング材を用いたナノインプリントを行ったところ、最表面に3重らせん構造を保ったコラーゲンが露出した傾斜型のパターン化が達成できた。

将来的に重要となってくる課題の一つが、パターンの組成が大きく関与する生体組織との親和性である。今回の成果よりコラーゲンとの傾斜組成型パターンの作製が可能となったため、大幅に生体親和性や細胞外マトリックスとの融合能が向上することが期待できる。

滑らかな表面を持つアパタイトパターンの作製

これまでアパタイトでのパターン化は主にアパタイトセメントを用いて型内で硬化させる方法や疑似体液に浸漬し表面にアパタイトを析出させる方法が行われてきた。しかしながらこれらの方法で得られるアパタイトパターンは細孔や析出結晶の凹凸が多いため、パターン形状だけでなく、細孔や析出の凹凸が付加されている状態なので、パターン自体の効果が分かり難い欠点があった。

今回の方法で検討を行った結果、表面はアパタイトのみでできたパターンが転写でき、またその表面は滑らかであった。今後、得られたアパタイトパターンを用いてのアッセイを行い、より詳細なパターン効果を見出す予定である。

(2)エッチング・マスク法によるパターン化

歯表面自体の微細構造化の一つとして、微細マスクとエッチングで脱灰する方法が可能か検討した。アパタイト平面にマスクを置き、エッチング剤を塗布し、押し当てながら反応させたところ、微細構造のサイズが100 μm レベルのパターン化は可能であった。しかしながら、10 μm レベルでは、エッチング剤が滲むため、明白なパターンを得ることができなかった。よって明瞭

なパターン作製のためには、エッチング剤の濃度と粘度を調整して界面がはっきりした脱灰が起こす必要があると考えられる。次に、エッチングによるパターン化条件(マスクの押当圧力、エッチング時間、エッチング材の量、酸の強さなど)を、アパタイトコートガラスや象牙質を用いて検討したところ、いずれも満足いく結果は得られなかった。アパタイトの濡れ性が高くエッチングの酸が広がってしまうため、制御が困難と考えられる。他の方法の検討が必要である。

(3)エッチング・コンタクトプリントによるパターン化

歯表面自体の微細構造化の一つとして、微細構造を持ったコンタクトプリントとエッチングを組み合わせて脱灰する方法が可能か検討した。PDMS スタンプにエッチャントを塗り、アパタイト表面でコンタクトプリントを保持したままにした。その結果、アパタイトの脱灰による形状形成は確認できなかった。濡れ性がよいアパタイト表面ではエッチャントが広がること、およびコンタクトプリントではアパタイトに接するエッチャントが微量で酸が弱いため脱灰できなかったためと考えられる。他の方法の検討が必要である。

(4)レーザー・マスク法によるパターン化

歯表面自体の微細構造化の一つとして、微細構造を持ったマスクとレーザー照射を組み合わせる方法が可能か検討した。象牙質表面にマスクとしてTEMグリッドを置き、レーザー加工機にてレーザー照射した。その結果、パターンの形成には至らなかった。焦げが強く、広がるため、明白なパターン形成には至らなかったものと思われる。より精細なコントロールができるレーザー加工であれば形状形成の可能性は考えられるので、今後の課題としたい。

(5)羽付きピラーの調製と培養

人工歯根膜を材料でガイドを作り再生させることを目指し、羽付きピラーを作製した。羽付きピラーでの細胞培養の結果、2日目には一部の細胞が羽方向(平面から垂直方向)へ配向している様子が観察された。このことは、ピラーへ羽を付与した効果が発現したことを示している。一方では、COP材質では細胞の接着が弱いため、基材から細胞が剥がれる傾向があり、観察自体が不十分な状態であった。そこで、フィブロネクチンによりピラーをコートしたところ、ある程度ではあるが細部接着や配向が改善された。これらの結果は、パターンのデザインにより細胞の配向をコントロールできることを示している。今後、デザインを改良することにより機能改善を行い歯根膜再生へ繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akasaka Tsukasa, Tamai Miho, Yoshimura Yoshitaka, Ushijima Natsumi, Numamoto Shinichiro, Yokoyama Atsuro, Miyaji Hirofumi, Takata Ryo, Yamagata Shuichi, Sato Yoshiaki, Nakanishi Ko, Yoshida Yasuhiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Different micro/nano-scale patterns of surface materials influence osteoclastogenesis and actin structure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nano Research	6. 最初と最後の頁 4201 ~ 4211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12274-021-4026-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 赤坂 司, 中西 康, 吉田 靖弘	4. 巻 40
2. 論文標題 破骨細胞の吸収窩形成へのマイクロ・ナノパターンの影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本歯科理工学会誌	6. 最初と最後の頁 31-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukasa Akasaka	4. 巻 64
2. 論文標題 Surface modification of tooth by nanoimprinting and cell response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Society for Abrasive Technology	6. 最初と最後の頁 614-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沼本真一郎, 赤坂 司, 吉田靖弘, 横山敦郎
2. 発表標題 マイクロ・ナノパターンが骨系細胞に与える影響について
3. 学会等名 第 33 回代用臓器・再生医学研究会総会/日本バイオマテリアル学会北海道ブロック第 5 回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤坂 司, 中西 康, 吉田靖弘
2. 発表標題 破骨細胞の吸収窩形成へのマイクロ・ナノパターンの影響
3. 学会等名 第77回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤坂 司, 中西 康, 吉田靖弘
2. 発表標題 微細構造が破骨細胞への分化に与える影響
3. 学会等名 第34回代用臓器・再生医学研究会総会/日本バイオマテリアル学会北海道ブロック第6回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤坂 司
2. 発表標題 破骨細胞様細胞への分化を促進または阻害する微細構造表面
3. 学会等名 令和3年度北海道歯学会2月例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤坂 司, 中川 勝, 伊東駿也, 宮内昭浩
2. 発表標題 生体応用へ向けた細胞機能評価スクリーニング用マイクロ・ナノパターンの試作
3. 学会等名 令和3年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤坂 司
2. 発表標題 微細構造表面が破骨細胞分化へ及ぼす影響
3. 学会等名 令和3年度北大細胞生物研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤坂 司, 玉井美保, 吉田靖弘
2. 発表標題 破骨細胞分化誘導へのマイクロ・ナノパターンの影響
3. 学会等名 第75回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤坂 司
2. 発表標題 いろいろなマイクロ・ナノパターンの細胞培養への応用
3. 学会等名 北海道ダイバーシティ研究環境推進ネットワーク
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沼本真一郎, 赤坂 司, 吉田靖弘, 横山敦郎
2. 発表標題 マイクロ・ナノパターンが骨系細胞に与える影響について
3. 学会等名 第33回代用臓器・再生医学研究会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤坂 司
2. 発表標題 マイクロ・ナノパターニングの歯科応用へ向けて
3. 学会等名 NGL2019 次世代リソグラフィワークショップ
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 分担執筆 赤坂 司 (応用物理学会・ナノインプリント技術研究会編)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 オーム社	5. 総ページ数 800
3. 書名 ナノインプリント技術ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大学内掲載 研究内容 (赤坂 司) https://www.den.hokudai.ac.jp/seitaizaiyou/akasaka/Research Map https://researchmap.jp/read0103543/ 北海道大学 研究者総覧 https://researchers.general.hokudai.ac.jp/profile/ja.9aedc21d80a05e55520e17560c007669.html 研究者個人のホームページ https://www.den.hokudai.ac.jp/seitaizaiyou/akasaka/ResearchMap https://researchmap.jp/read0103543/</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------