

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390484

研究課題名（和文） 象牙質再生療法へのナノバイオ技術の応用

研究課題名（英文） Application of Nanofioscience to Dentin Regenerative Theraysy

研究代表者

吉山 昌宏（YOSHIYAMA MASAHIRO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10201071

研究成果の概要（和文）：脱灰象牙質再石化能と修復象牙質再生能を併せ持つ象牙質再生療法を開発することを目的として、コラーゲン固定化エチレンビニルアルコール共重合体（EVA+C）添加型スーパーボンド石灰化誘導促進接着剤（RMSB）を試作し、サルの上顎前歯の露髄面に適用した結果、1ヶ月後に石灰化組織が密で厚く外向性に修復象牙質が形成されることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The mineralization accelerating adhesion materials that added EVA+C (RMSB) were produced experimentally, and we studied the bond strength and biocompatibility. Bond strength decreased with increase of the EVA+C addition ratio. The RMSB group showed a tendency to growth similar to Control at the early phase, and cell count was higher than an SB ( Superbond ) at high ratio of EVA+C group. SBP30 and 7P ( SB/EVA+C = 40wt%/60wt% ) showed a high bond strength and a good cell proliferation. Invivo, 7P had weaker inflammation than an SB and mineralized tissue formation was good. High adhesive property and biocompatibility was obtained by RMSB-7P.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	9,800,000	2,940,000	12,740,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：保存修復学，象牙質再生療法，EVA+C，修復象牙質

## 1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

再生医学が21世紀医療の可能性を拓くものとして脚光を浴びている現在、保存修復学に

においても象牙質再生医療法の開発が急務である。この象牙質生成法には、う蝕によって脱灰された歯質をできるだけ切削せず再石灰化させ可及的保存を図る脱灰象牙質再石灰化療

法とバイオ技術を応用した生物学的覆髄療法の二つの概念が存在するが、両者を同時に可能にする治療法は見出されていない。申請者らは、う蝕変性象牙質へのレジン接着性の研究を世界に先駆けて行っており、接着性レジンを用いて残留する可能性のあるう蝕細菌を封鎖し、感染脱灰象牙質の可及的保存を図るモディファイド・シールド・レストレーション (MSR法)を提唱している ( J Dent Res, 81, 8, P556-560, 2002 )。

また申請者らはバイオ技術を応用してコーゲンを固定化した親水性モノマーであるエチレン・ビニルアルコール共重合体 ( EVA ) 微粒子 ( EVA+C ) のヒト歯髄細胞培養を検討し、極めて良好な親和性を確かめるとともに、EVA+C 配合培養システムや創傷被覆材 ( アルギン酸ゲル ) を用いてサルやビーグル犬の露髄面に充填し、歯髄のみならず欠損窩洞内側にも修復象牙質が再生してくることを見出している ( 再生歯誌, 2, 2, P137-137, 2004: J Oral Tissue Eng, 4, 1, P17-24, 2006)。さらに、ナノ技術を応用して単分散性ハイドロオキシ・アパタイトナノ粒子 ( HAPナノ粒子、粒径30~90nm ) 配合象牙細管封鎖材を開発し、新規象牙質知覚過敏治療材として既に特許申請している ( 科学技術振興機構整理番号, A121 P304 )。このHAPナノ粒子は生体内分解速度を抑制することも可能であり、ヒト歯髄細胞への極めて高い親和性と象牙芽細胞分可能を有することを確認している。 ( J Oral Res, in press )。

## 2. 研究の目的

本研究では、脱灰象牙質再石灰化可能と修復象牙質再生能を併せ持つ象牙質再生療法を開発することを目的として、ナノバイオ技術を応用してEVA+C微粒子やHAPナノ粒子を配合したボンディング材 ( ナノバイオ接着シス

テム) を調製し、ナノバイオ接着システムの設計・試作を行うとともに、そのう蝕象牙質や人工脱灰象牙質への接着性、侵透性や再石灰化能およびヒト歯髄培養細胞への影響を *in vitro* で検討する。さらに、サルを応用した *in vivo* 動物実験において、人工脱灰象牙質窩洞および露髄窩洞に最適なナノバイオ接着システムを応用し、長期経過観察後に接着界面の劣化に深く関与するとして注目されているマトリックスメタルプロテアーゼ ( MMP ) の酸素活性についても検討する。

## 3. 研究の方法

### ( 1 ) 材料

前処理材として表面処理剤グリーン ( 10% クエン酸-3%塩化第二鉄水溶液, サンメディカル: Green), 試作セルフエッチングプライマー ( 4-MET, ジメタクリレート, 水, アセトン他, サンメディカル試作: SBP30 ) を用いた。また接着剤は、スーパーボンド C&B ( サンメディカル: SB ), および試作接着材 ( サンメディカル試作: RMSB ) として RMSB-6P ( SB粉末 / EVA+C = 60wt%/40wt%: 6P), RMSB-7P ( SB粉末 / EVA+C=40wt% / 60wt%: 7P ), RMSB-8P ( SB粉末 / EVA+C=20wt% / 80wt%: 8P ) の3種を用いた。培養細胞はマウス象牙芽細胞様細胞 ( MDPC-23 ) を使用した。実験動物は体重約3.5Kg, 推定年齢 6 歳のカニクイザル ( adult ♀ ) を用いた。

### ( 2 ) 接着強さ試験

ヒト健全抜去歯を用い、歯冠部中央象牙質平坦面をモデルトリマーにて露出後、#600SiCにて表面性状を整え被着面とした。接着対象はアクリルブロックとし、歯質と同様に#600SiC 研磨紙にて表面性状を整えた。実験群は前処理2 種、接着材4 種を組み合わせた8 群とした。Green 処理は塗布 10 秒後水洗、乾燥の順で行い、SBP30 処理は塗布 20 秒後

にマイルドエアーで乾燥した。その後、SB は通法に従い、RMSB も SB に準じた方法で接着操作を行った。24時間 37°C 水中保管を行った後、低速ダイヤモンドホイール ISOMET を用いて接着界面が 1mm X 1mm となるように短冊状の切片を作成し、クロスヘッドスピード 1mm / 1min で微小引張り接着強さ (MPa) を測定した (EZ-Test, 島津)。試料数は各群 10 とした。測定値は、one-way ANOVA および Tukey's test を用いて有意水準 1% で統計処理を行った。

### (3) 細胞増殖試験

MDPC-23 細胞を  $\alpha$ -MEM (GIBCO) に 10%Fetal Bovine Serum (FBS, ニチレイ) および 100U/ml Penicillin-Streptomycin (GIBCO) を加えた培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて Semi-Confluent まで培養し、その後、各実験群へと播種した。実験群は SB、6P、7P、8P および培地のみ (Control) の5群とした。MDPC-23 細胞を培地に 1.0 X 10<sup>5</sup>cells / mL となるように調整し、12穴プレートに各 1mL 播種した。直後にコントロール群を除いた各群の培地中に直径 6mm 高さ2mm の SB および 6P、7P、8P の円盤状試料を静かに加え、1, 2, 4, 7日間、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養し、細胞数を Hemocytometer にて計測した。

### (4) 動物実験

実験時にはカニクイザルに全身麻酔としてケタラル筋注用 50 mg / mL (三共) の筋注 50mg / Kg、および侵潤麻酔として 2% リドカイン0.9mL を行った。ダイヤモンドバーを用いて、健全永久歯の歯質側側歯頸部に直径約 0.2mm の実験的露髄部を作成した。止血後、接着強さ試験と同様に SBP30 処理を行った後、SB と 7P を用いて窩洞を封鎖した。この操作を抜去 3日前と 1ヶ月前に行い、そ

れぞれ 3day 群、1month 群とした。実験終了後、ラボナール (田辺製薬) の静注で動物を安楽死させた。その後対象歯を抜去し、10%中性緩衝ホルマリン液にて 48時間固定を行い、10%EDTA 脱灰液にて 30日間脱灰した。露髄部組織はパラフィン包埋を行い、厚さ約 6  $\mu$ m に薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) を施し、光学顕微鏡にて形態観察を行った。

本研究は岡山大学動物実験規則および国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に基づいて実施された。

### 4. 研究成果

微小引張り接着強さ試験の結果を表1に示す。Green 処理群では EVA+C 添加率の増加に伴う接着強さの低下が大きく、8P では SB、6P と比較して優位に低い値であった。SBP30 処理群では Green 処理群に比べ接着強さの低下は小さい傾向にあり、すべての群で有意な差は見られなかった。また、Green 処理と SBP30 処理について比較すると8Pのみ、Green 処理とSBP30 処理で有意な差が認められ、他の材料では有意な差は認められなかった。傾向として、いずれの表面処理を用いた場合でも EVA+C 添加率の増加に伴い接着強さは低下していたが、SBP30 処理を行った場合、低下率は抑えられていた。

細胞増殖試験の結果を図1に示す。培養2日目まではすべての実験群で Control 群と同等、または上回る細胞数であったが、4日目で EVA+C 添加率に比例した細胞数を示し、7日目では Control、7P、8P 群の細胞数が多いグループと、SB、6P の細胞数が少ないグループの2グループに分類された。

動物実験での露髄部の組織像を図2に示す。SB3-day 群 (図 2A) では露髄部表層に壊死層が見られ、周囲には著明な炎症性細胞侵

潤が認められた。それに対して、7P-3day 群（図 2B）では壊死層、炎症像ともに認められなかった。また、SB-1month 群（図 2C）、7P-1month 群（図 2D）では、ともに歯髄組織に炎症所見は認められなかったものの、7P 群において、露髄部に肥厚した硬組織形成を認め、SB 群ではこれは見られなかった。

表1 RMSBの微小引張り接着強さ

	SB	6P	7P	8P
Green	33.76 ± 14.12 <sup>a</sup>	26.58 ± 8.02 <sup>a</sup>	22.61 ± 11.07 <sup>ab</sup>	11.54 ± 4.47 <sup>b</sup>
SBP30	33.76 ± 7.72 <sup>a</sup>	30.49 ± 7.79 <sup>a</sup>	27.89 ± 2.73 <sup>a</sup>	26.16 ± 8.46 <sup>a</sup>

Mean ± SD (MPa)  
異符号間で有意差あり (P < 0.01)

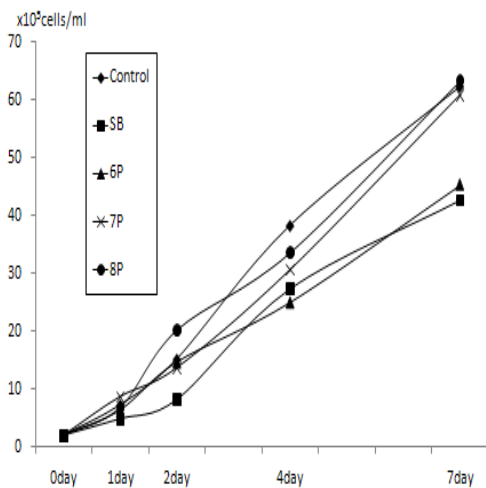


図1 RMSB適用時の細胞数の変化

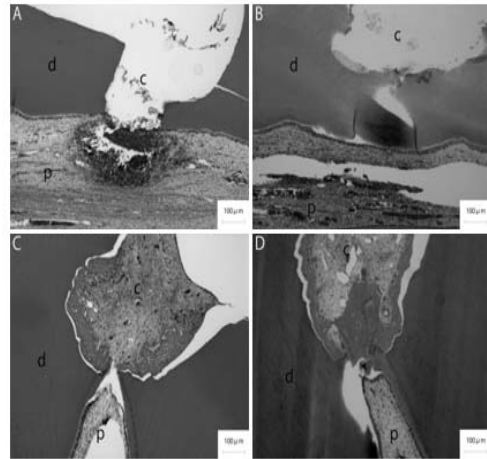


図2 RMSB適用後の組織像

以上の結果から SBP30 処理を行うことで、接着強さの低下率は軽減した。また、細胞増殖に与える影響は、初期段階ではすべての RMSB でコントロールと同等に良好であり、特に EVA+C の添加比率が高い群では SB ( Superbond ) より増殖に与える影響は少なかった。以上より、7P ( SB 粉末/ EVA+C = 40wt%/60wt% ) が良好な接着性と生体親和性を有していることが示唆された。動物実験では、7P は SB に比べ、炎症が軽微で石灰化傾向も強かった。結論として、SB に適切な比率で EVA+C を添加することで高い接着性と生体親和性を得られ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 ( 6 ) 件

- ① 吉山昌宏、齋藤隆史  
象牙質・歯髄複合再生療法の現状と展望  
-オーバービューとそのねらい-  
日本歯科評論 ( 通刊第 808 号 )、査読有  
70(2)、2010、133-134
- ② 西谷佳浩、吉山昌宏、山路公造  
象牙質再生と再建のハーモナイゼーション  
日本歯科評論 ( 通刊第 808 号 )、査読有  
70(2)、2010-2、151-154
- ③ 神農泰生、岸本麻実、穴吹優佳、山路公造、西谷佳浩、田中亨、佐野英彦、吉山昌宏  
コラーゲン固定化エチレン-ビニルアルコール共重合体 ( EVA+C ) 添加試作石灰化誘導促進性接着材の接着強さと生体親和性  
日本再生歯科医学会誌、査読有、7(1)、  
2009、56-63

- ④ K. Hosaka, Y. Nishitani, M. Yoshiyama, *et al*,  
Durability of Resin-Dentin Bonds to Water-vs. Ethanol-saturated Dentin  
J Dent Res、査読有、88(2)、2009、146-151
- ⑤ 伊澤俊次、山路公造、星加知宏、中田貴、神農泰生、西谷佳浩、吉山昌宏  
ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙芽細胞分化と象牙質再生  
日本再生歯科医学会誌、査読有、7(1):47-55、2009
- ⑥ Kozo YAMAJI, Gen HORIKAWA, Yoshihiro NISHITANI, Shunji IZAWA and Masahiro YOSHIYAMA.  
Dentin Regeneration by Direct Pulp Capping using rhBMP-2  
J Oral Tissue Engin、査読有、2008;5(3):145-149

[ 学会発表 ] 計 ( 4 ) 件

- ① Y. Shinno, K. Yamaji, Y. Nishitani, T. Tanaka, H. Sano, M. Yoshiyama.  
Bond strength and bio-compatibility of experimental adhesives added collagen immobilized poly ethylene-co-vinyl alcohol ( EVA+C )  
The 11<sup>th</sup> Joint Meeting between KACD and JSCD、2009、韓国濟州島
- ② 西谷佳浩、吉山昌宏  
象牙質再生と再建のハーモナイゼーション、第 130 回日本歯科保存学会、2009/9/6/11、札幌
- ③ 神農泰生、吉山昌宏 他  
コラーゲン固定化エチレン-ビニルアルコール共重合体 ( EVA+C ) 添加試作石灰化誘導促進性接着剤の接着強さと生体親和性に関する基礎的研究  
第 129 回 日本歯科保存学会、2008/11/7、富山
- ④ 伊澤俊次、山路公造、西谷佳浩、吉山昌宏 他  
骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙芽細胞分化象牙質再生に関する研究  
第 6 回 日本再生歯科医学会、2008/9/13

[ 図書 ] 計 ( 3 ) 件

- ① 吉山昌宏 他、医歯薬出版、保存修復クリニカルガイド、2009、134-137
- ② 吉山昌宏 他、株式会社 永末書店、MI 時代の歯科知識-プラークコントロールサイエンス&プラクティス-、2009、47-71
- ③ 吉山昌宏 他、口腔保健協会、接着ここが知りたい、2008、54-56

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉山 昌宏 (YOSHIYAMA MASAHIRO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：10201071

(2) 研究分担者

西谷 佳浩 (NISHITANI YOSHIHIRO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：60325123

山路 公造 (YAMAJI KOZO)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：30374531

伊澤 俊次 (IZAWA SHUNJI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：20273998

神農 泰生 (SHINNO YASUO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：60403490

土居 潤一 (DOI JUNICHI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90379842

大前 正範 (OHMAE MASANORI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：10403487

(3) 連携研究者

佐野 英彦 (SANO HIDEHIKO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：90205998