

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20592219

研究課題名（和文） 分子レベルにおける接着界面のバイオデグラデーションについての研究

研究課題名（英文） Nano level analysis of biodegradation on adhesive interface

研究代表者

中沖 靖子 (NAKAOKI YASUKO)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50302881

研究成果の概要（和文）： カリエス治療に汎用されるレジン系充填材料は、健全歯質の保存という観点からその長期耐久性も重要と考えられる。申請者らは、この長期耐久性を阻害する接着界面のバイオデグラデーションの本態を解明するため、抗酸化剤の機能を有するプラチナナノコロイドを用い、劣化をとどめる方策を考えた。それに際し、接着界面の分子レベルでの超微細構造の情報を得るため、非常に高分解能であるが生体、特に軟組織観察に不向きとされてきた超高压電子顕微鏡を、生体観察に応用する手技を確立した。

研究成果の概要（英文）： The durability of resinous material is one of the important factors needed to filling materials for minimal invasive caries treatment. To detect the durability-inhibitive process biodegradation, we offered the strategy using antioxidant agent Colloidal Platinum Nanoparticles. With these studies, we found out the observation technique of ultrastructural morphology on teeth using High Voltage Electron Microscope, and got atomic images of crystalline hard tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1, 100, 000	330, 000	1, 430, 000
2009年度	1, 000, 000	300, 000	1, 300, 000
2010年度	900, 000	270, 000	1, 170, 000
2011年度	500, 000	150, 000	650, 000
年度			
総計	3, 500, 000	1, 050, 000	4, 550, 000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系学

キーワード：接着界面、バイオデグラデーション、歯質、レジン、分子

## 1. 研究開始当初の背景

レジンと歯質の結合の仲立ちを果たすものとしての樹脂含浸層は、その存在が 1982 年中林により報告され（歯材器, 1982）、常に象牙質接着の拠り所とされてきた。その後 Pashley、橋本らは in vitro の系にて、象牙

質由来の酵素である matrix metalloproteinase (MMP) によってコラーゲン繊維が消化されることを確認した（J Dent Res, 2004）。同時に小城、佐野らは、サル口腔内の様々なレジン充填物の界面から 1 年

間のうちに露出コラーゲン繊維が消失してゆくことを TEM 観察した (Euro J Oral Sci, 2005)。

これら一連の研究から、充填物接着界面の劣化は、機械的物理的な要因の他に、様々な口腔内酵素の長期にわたる作用が大きいと考えられるようになった。このような経時的な劣化の経緯もしくは現象を、今日では接着界面のバイオデグラデーション (Bio-degradation) とよぶことが多い。

海外でも界面の劣化については大きな関心が向けられているが、北米、ヨーロッパいずれも *in vivo* の実験が困難であることから、その成果は限られたものとなっている。その中であってサン・パウロのグループが、バイオデグラデーションの抑制に chlorhexidine が有効であることを *in vivo* の系を用いて報告している (Carrilho et al, J Dent Res, 2007)。但し chlorhexidine は、MMP のインヒビターとして働くと同時に過敏症 (ショック症状) を引き起こすこともあるとされ、問題も多い。本研究で用いるある種の抗酸化還元触媒系物質はバイオデグラデーションの進行を止める可能性が示唆されており、これらの *in vitro* 及び *in vivo* での効果を比較検討することで、口腔内で起こるバイオデグラデーションをよりの確に再現、解析すると同時に抗酸化還元触媒系物質のデグラデーション抑制の機能確認も行うことが出来ると考えられる。

他方、接着界面における微細構造の検討も新たな局面を迎えている。最近開発されたボンディングシステムによりつくられる樹脂含浸層は、極端に薄いことが知られている。今や含浸層の厚さが  $1\ \mu\text{m}$  以下のものも出現しており、その超微細構造を解析するためには分子レベルでの研究が有用であろうと思われる。これらの検知能力を駆使することで、MMP のコラーゲンに対する作用部位の特定、またコラーゲン劣化の経緯等を分子レベルで捉えることが出来ると考える。

## 2. 研究の目的

- (1) *In vitro* にて MMP による象牙質バイオデグラデーションモデルを確立した後、MMP インヒビターもしくはデグラデーションの抑制が期待される抗酸化還元触媒系物質の効能を検討する。
- (2) *In vivo* にて、充填物界面のデグラデーション発現を *in vitro* の場合と比較検討し、あわせて MMP インヒビターや抗酸化還元触媒系物質の有無によるその発現の差異を明らかにする。

- (3) 接着界面の微細構造を分子レベルでプローブし、デグラデーションによる分子構造・原子配列の変化を解析することで劣化抑制の糸口を見出す。

## 3. 研究の方法

- (1) 初年度は *In vitro* の系の微小引張り接着試験をとおして、バイオデグラデーションモデル作製の最適条件を検討する (保存液の最適な pH 及びサーマルサイクリング回数等)。
- (2) これをもとに、次年度には MMP インヒビターもしくは抗酸化還元触媒系物質を作用させる系を絞り込む。
- (3) *In vitro* でのバイオデグラデーション抑制物質の作用を確認し、その後 *In vivo* (サル使用) においても同様の効果が発現するかを見極める。上記 *In vitro* の系にて抗酸化還元触媒系物質の効果が高ければ、生体への為害性が少ないことを考慮し *In vivo* では優先的に試用する。
- (4) また、分子レベルでの接着界面解析の前段階として、超高圧電子顕微鏡による微細構造の観察方法を確立する。観察対象が分子、原子レベルなので、歯質に機能性モノマーを作用させてアパタイト分子 (実際には Ca 原子, P 原子) 配列の変化の観察を試みる。この際、一番の難関が試料をナノ単位の厚さに研磨する技術である。熱に弱く物性的にも脆い生体に対し、試料に与えるダメージが一番小さいと考えられるイオン研磨 (高速のイオン粒子による研磨及び薄層化) を行い、原子レベルの観察が可能とされる厚さ  $10\ \text{nm}$  以下の試片とする。
- (5) 分子レベルの微細構造については上に述べた超高圧電子顕微鏡での観察法が確立され次第、実際の接着界面の解析に移る。*In vitro* 及び *In vivo* の各試料について精査し、最終的にはバイオデグラデーション制御の可能性を分子レベルで探査する。

## 4. 研究成果

- (1) 目的の重要項目の一つである MMP インヒビターもしくは抗酸化還元触媒系物質を作用させる系の検討にあたる実験として、象牙質バイオデグラデーションに対するプラチナナノコロイド (CPN) の影響を検討した。これは、当該年度の研究目的の一つである象牙質バイオデグラデーションモデルの確立後の MMP インヒビターとなる物質の効能を検討する実験の一環でもある。本実験では、健全ヒト抜去智歯を歯冠中央部で切断し、健全な象牙質を露出させた後、#600 の耐水研磨紙を用いて研磨したものを被着面

とし、Control 群として被着面を 10% クエン酸 3% 塩化第二鉄溶液(10-3 溶液)でエッチングした。また、10% CPN 群、100% CPN 群として、被着面を 10-3 溶液でエッチングし、10% または 100% の CPN (アプト、東京) を塗布した。その後、全ての象牙質被着面にスーパーボンド(サンメディカル、滋賀)を用いて PMMA ブロックを接着させた。試料は全て 1 日水中浸漬後に 1mm<sup>2</sup> の棒状にした。さらに、これらは 5°C および 55°C の水中に各 60 秒間浸漬を 1 サイクルとする TC 試験 0 回群、10000 回群、および 20000 回群に分けて行われた。TC 後の試料は、クロスヘッドスピード 1mm/min にて微小引張り接着強さを測定された。微小引張り接着強さの測定によって得られた測定値については、Games-Howell 検定を用いて有意水準 5% にて統計処理を行った。Control 群の微小引張り強さ (MTBS) は 29.3MPa (TC 0 回)、36.6MPa (TC 10,000 回)、32.8MPa (TC 20,000 回) であった。10% CPN 群の MTBS は 30.4MPa (TC 0 回)、40.3MPa (TC 10,000 回)、32.1MPa (TC 20,000 回) であった。100% CPN 群の MTBS は 24.2MPa (TC 0 回)、12.0MPa (TC 10,000 回)、10.7MPa (TC 20,000 回) であった。Control 群と 10% CPN 群は TC 試験前後で接着強さに有意差は認められなかった。なお 100% CPN 群の接着強さは TC 試験後に有意に低下した。CPN 表面処理した象牙質接着強さには濃度が影響していると考えられた。接着界面の TEM 観察では 10% CPN 群、および 100% CPN 群において、樹脂含浸層の上縁に細かい粒子状構造物の存在が認められた。以上のように、この実験では、プラチナナノコロイド水溶液にて処理した象牙質とレジンを接着させ、その試験片を長期予後の目安となる加速試験に供して接着状態の変化を観察した結果、処理液の濃度を適正に調整すればレジンとの接着界面の劣化がおさえられる可能性が示唆された。ちなみに当初の計画では適切な MMP 試薬及び材料試験片の検討を行う予定であったが、その絞り込みは困難であった。

(2) また、接着界面の微細構造の解析に関しては、前年度までの研究により物理的・化学的ダメージの少ない有効な手法が確立された。実際には、歯冠部側エナメル質から小切片を切り出し、これを TEM 用リングに樹脂系接着剤を用いて固定し 50 μm ほどの厚さに研削した後、アル

ミナ粒子にて鏡面研磨し厚み数 μm の試料と、これを更に精密イオン研磨装置にて研削を行い、中心に微小孔が作製されるまで薄化する。加速電圧 1000-1250kV にて試料の中心部の近傍をプローブし、格子像がクリアに確認される約 10-30 nm の薄層となっている部分を観察し、ここで得られた画像からシミュレーションによる計算像を得て、原子の正確な位置と種類 (原子番号) を反映する結晶構造像からそれぞれの原子のポジションを推定した。その結果、Lattice image として得られた像を Atomic image と確実に対応させる技術を得て、そこから原子の位置を正確に把握する事も出来るようになった。超高圧電顕による観察は通常の TEM の 10 倍ないし 20 倍の非常に高電圧で加速された高速の電子を利用するため、理論的にも実際にも分解能が高く、電子線の試料透過能が高く熱発生や電離が起きにくいので、それに伴う加熱や化学構造の破壊による試料の損傷が少ないという利点を持つ。精密イオン研磨法も発熱の少ない超薄化手段として有用である。以上の成果から、今後はプラチナナノコロイドの効果を原子レベルで精査することにより、生体と生体材料との分子、原子レベルの関係解析が進むであろう。

#### 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)

- (1) 五十嵐 豊、付 佳楽、角田 晋一、田中 享、中沖 靖子、佐野 英彦、プラチナナノコロイド象牙質処理が 4-META/MMA-TBB レジンのサーマルサイクリング負荷前後の接着に与える影響、北海道歯学雑誌 32 巻 2 号 177-192 (2012) 査読有り  
<http://www.hokudai.ac.jp/>
  - (2) Kachi H, Noda M, Wataha JC, Nakaoki Y, Sano H. Colloidal platinum nanoparticle increase mitochondrial stress induced by resin composite components. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011;96:193-8. 査読有り
- [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1552-4981](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552-4981)
- (3) 池田考績、神島奈穂子、中沖靖子、佐野英彦、コンポジットレジンにおける厚みの増大による色変化と透明度の関係、接着歯学 27 巻 95-100 (2009)、査読有り

http://www.adhesive-dent.com/

- (4) 中沖靖子、神島奈穂子、池田考績、井上哲、佐野英彦、新規シングルステップボンディングシステムと2種のコンポジットレジンの組み合わせによる象牙質への微小引張り接着強さ、接着歯学 26 卷 148-153 (2008)、査読有り

http://www.adhesive-dent.com/

- (5) 池田考績、神島奈穂子、中沖靖子、佐野英彦、オペクシェードが積層コンポジットレジンの色に及ぼす影響、接着歯学 26 卷 41-11 (2008)、査読有り

http://www.adhesive-dent.com/

[学会発表] (計 5 件)

- (1) NAKAOKI Y, FUKUOKA A, FU J, KAKUDA S, MATSUDA Y, OKUYAMA K, KAWAMOTO C, IKEDA T, TANAKA T, INOUE S, KOMATSU H, SANO H, Bond Strength of Newly Developed Self-Adhesive Resin Composite to Dentin, 5<sup>th</sup> CONSEURO MEETING 2011 年 10 月 14 日 The Marmara Tasken, Istanbul
- (2) NAKAOKI Y, FUKUOKA A, IGARASHI Y, FU J, KAKUDA S, MATSUDA Y, OKUYAMA K, KAWAMOTO C, IKEDA T, TANAKA T, INOUE S, KOMATSU H, SANO H, Analysis of bonding performance and adhesive interface between self-adhesive resin composite and dentin substrate, The 3rd International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials 2011 年 7 月 14 日、北海道大学 学術交流会館
- (3) 中沖靖子、福岡杏理、角田晋一、付佳楽、星加修平、松田康裕、奥山克史、川本千春、池田考績、田中享、井上哲、小松久憲、野田守、佐野英彦、High Voltage Electron Microscope による原子レベルの結晶性硬組織の観察、第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会 2011 年 6 月 10 日、東京ベイ舞浜ホテル
- (4) 中沖靖子、付佳楽、角田晋一、池田考績、田中享、井上哲、佐野英彦、接着性を有する新規充填材料の象牙質面への接着強さ第 29 回接着歯学会 2011 年 1 月 25 日岡山大学
- (5) Nakaoki Y, Sano H .Does hemostatic treatment affects dentin bond strength of self-etch adhesive? The joint meeting of the Continental European Divison (CED), the Scandinavian Division (NOF) and the Israeli Division of the IADR. 2009 Sep. 10; Munich center hall, Germany

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中沖 靖子 (NAKAOKI YASUKO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：50302881

### (2) 研究分担者

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  
野田 守 (NODA MAMORU)  
岩手医科大学・歯学部・教授  
研究者番号：10301889

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：