

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05349

研究課題名(和文) アパタイトからリン酸八カルシウムへの逆方向相転移を利用した根面う蝕修復剤の創製

研究課題名(英文) Root-carries repair agent developed using reverse phase transformation from apatite to octacalcium phosphate

研究代表者

小沼 一雄 (Onuma, Kazuo)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：70356731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：物理的に不可能と考えられていた準安定相から安定相への逆方向相転移を、リン酸八カルシウム結晶(OCP)とアパタイト結晶(HAP)間で起こすことに成功した。この逆方向相転移はOCPとHAPの特定の結晶面の構造がコヒーレントな性質を持つこと、及び両結晶の成長速度が極端に異なることのキネティック効果が相乗して生ずる。逆方向相転移は特定のフッ素イオン濃度環境下で起こり、HAP(100)面をOCP(100)面に完全変化させることに成功した。この現象を利用すれば、HAPの表面をOCP化した状態でう蝕患部に充填し、湿潤環境で再度HAPに順方向相転移させることで、充填剤と歯質の強力な接着が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最も大きな学術的意義は、熱力学的に不可能と考えられていた安定相から準安定相への逆方向相転移が、特定の条件下で現実に行われることを実証したことである。安定相アパタイト(HAP)と準安定相リン酸八カルシウム(OCP)間で起こる逆方向相転移は、両結晶の(100)面が構造を共有したコヒーレントな性質を持つこと、及び両結晶の成長速度の差が大きいことの相乗効果で発現する。静的要因と動的要因が相互作用し、特定のフッ素イオン濃度溶液中で観察されるこの現象は、世界初の知見である。本研究の社会的意義は、HAPを用いた根面う蝕の治療に初めて現実的な手法を提示したことであり、歯科治療の発展に大きく寄与する。

研究成果の概要(英文)：A reversed phase transformation from a metastable phase to a stable phase has been successfully achieved between octacalcium phosphate (OCP) and apatite crystals (HAP), which has been believed to be physically impossible.

This reverse phase transformation is attributed to the coherent structures between OCP (100) and HAP (100) faces, coupled with the kinetic effect of the extremely different growth rates of the two crystals.

The reverse phase transformation occurs under the particular fluoride concentration in a calcium phosphate solution, and a complete change of the HAP(100) face into the OCP(100) face has been confirmed. By utilizing this phenomenon, strong adhesion between the filling material and the affected tooth can be achieved by filling the caries affected area using HAP with OCP surface, and then by the forward phase transformation to HAP again in a wet environment.

研究分野：結晶工学

キーワード：逆方向相転移 アパタイト リン酸八カルシウム フッ素 コヒーレント構造 成長速度

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会が到来している現在、高齢者が歯を喪失する要因の一つが、歯肉の後退に伴う根面う蝕である。根面う蝕は歯の根元であるエナメル質 - セメント質境界付近が、歯肉外に露出した際に外的要因により腐食を受けるもので、進行すると歯が不安定になり抜歯に繋がる。従来の根面う蝕治療法は、通常のうち蝕治療法と同様に高分子レジンを用いて患部に塗布するものであった。しかしレジンと歯質との物性(熱膨張率や弾性率)の違いにより、長期間患部を接着保護することが困難であり、経時的に塗布物が剥落してゆく欠点がある。一方で、歯の無機主要構成成分は水酸アパタイト(以下、HAP)結晶であるため、う蝕領域をHAPにより修復できれば、元の歯質と完全一体化して半永久的な修復が可能である。これは単なる修復治療ではなく、歯の再生と見なすことも出来る。しかし、HAPを用いて根面う蝕の治療に成功した研究例は、未だ報告されていない。その最も大きな理由は、HAPの極めて低い溶解度をもたらす生理環境下での低反応性にある。すなわち、う蝕領域にペースト状HAPを塗布しても決して歯と一体化接合せず、レジン塗布の場合と同様に、時間経過とともに剥離を起こしてしまう。HAPペーストを用いた現在の根面う蝕治療は極めて短期間内(概ね1か月)での患部の保護にとどまり、繰り返して同じ治療を行うことが前提となっている。この状況は患者に多大な時間と費用を要求する。また、同じ治療の繰り返しは、精神的にも大きな負担となる。今日の歯科治療では根面う蝕の根本的修復法が存在せず、今後の社会情勢を鑑みたとき、可及的速やかに解決すべき課題の一つとなっている。

2. 研究の目的

本研究の大目的は、未だ成功例がないサブミリメートル厚を持つHAP層による、根面う蝕治療法の基礎手段を開発することにある。本来、歯質と一体化することのないHAP厚膜をう蝕領域に強固に結合させるためには、「一度HAPが溶解した後に、う蝕領域で再結晶化する」過程を経る以外ない。しかしHAPは酸性環境下でしか溶解を起こさず、その環境を患部で作出す事は、う蝕を更に進行させることに繋がる。この状況を回避する手段として、「HAP結晶の表面のみを溶解性の高い準安定リン酸カルシウム結晶に変化させる」概念を立案した。HAP結晶表面が準安定相に変化した複合構造体ペーストをう蝕領域に充填すれば、生理湿潤環境(中性pH)で表面のみが溶解し、HAPに再度相転移する過程で歯質と完全一体化することが期待できる。上記の仮定に基づき、本研究の目的を達成するための具体的な到達目標として、表面層のみを準安定リン酸カルシウム相に変化させたHAPを開発することを掲げた。この目標に到達するためには、従来の常識に反して熱力学的安定相であるHAPから準安定相リン酸カルシウムへの逆方向相転移を起こす必要がある。そこで細分化した研究目標として、(1)逆方向相転移を起こすことが可能な準安定リン酸カルシウムの発見、(2)逆方向相転移のための具体的な環境条件の確立、及び(3)逆方向相転移のメカニズムの探索、を設定した。

3. 研究の方法

事前の予備実験から、生理環境場で出現するHAPの準安定相中で、リン酸八カルシウム(OCP)が本研究で求める準安定リン酸カルシウムに最適と結論した。OCPはその結晶構造中にHAP構造を含むため、本来、湿潤環境(溶液中)で容易にHAPに相転移する物質である。しかし、中性近傍のリン酸カルシウム溶液中にフッ素が含まれていた場合、OCPは本来の順方向相転移(OCP-HAP)からは予想されない挙動を示し、OCPのまま長時間に渡って安定成長する現象を確認した。そこで具体的な研究方法として、以下の過程を実行した。

(1) 弱酸性から中性のリン酸カルシウム溶液中にフッ素イオンを様々な濃度で混入し、形成した結晶の種類を経時的に追跡した。X線回折法によるマクロレベルでの結晶相評価、走査型電子顕微鏡(SEM)、及び透過電子顕微鏡(TEM)を用いた形態観察とナノレベル構造評価、制限視野電子線回折法によるミクロレベルでの結晶相評価、エネルギー分散型X線分光分析法による結晶の化学組成分析等を経て、厳密な結晶相の同定を行った。

(2) 上記の評価で決定された結晶成長条件(具体的には溶液中のフッ素イオン濃度)下で、HAP結晶表面層の時間変化をナノレベルで解析した。具体的には、アモルファスリン酸カルシウム高圧圧縮基板を用いて表面にc軸配向HAPを形成させ、フッ素イオン含有リン酸カルシウム溶液中でのHAP表面の時間変化をTEMにより追跡した。

(3) 得られたTEMの結果から、結晶表面での構造変化のモデル化を行った。VESTAアプリケーションを用いた結晶構造の視覚化を通じて、HAP結晶表面での変化を説明するモデルを確立した。

4. 研究成果

以下の成果を得た。

(1) 弱酸性リン酸カルシウム溶液中にフッ素イオンが存在すると、最終的に優勢となる結晶相が変化する。すなわち、フッ素イオン濃度が 1 ppm 以上では HAP のみが形成して成長を続け、主結晶相となる。一方で、フッ素イオン濃度が 0.7 ppm 以下では OCP のみが成長し、主結晶相となる。そして、その間の濃度領域である 0.8 ppm では、HAP と OCP の成長が拮抗して、時間経過とともに主結晶相が変化した。成長開始後約 30 分までは、ナノロッド状の結晶が一方方向に融合した形態を取る HAP 結晶群が優先的に成長するが(図 1a)、1 - 1.5 時間後にはロッド状 HAP の融合境界が不鮮明になり、板状に変化して表面にストリーク状の特徴的な形態が残った(図 1b)。更に成長開始 3 時間後には、全ての結晶相が板状 OCP に変化し、20 時間後には巨大板状 OCP 結晶が形成した。

(2) 形成結晶の表面層を TEM 観察、及び電子線回折測定により詳細に分析した結果、成長開始 1.5 時間後に観察されたストリーク状形態(図 1b 矢印)は、元々のロッド状 HAP(図 1a)の残渣であり、板状結晶自体は OCP へと変化していることが判明した。すなわち、初期に形成したロッド状 HAP が融合した結晶群上に OCP が形成し、経時的に結晶全体を OCP に変化させていることになる。この時、結晶中に含有されるフッ素濃度も変化し、初期 HAP 結晶中に含まれていた約 1.5 at.% のフッ素は OCP 結晶の成長と共に減少し、約 3 時間後の OCP 結晶にはほとんど含まれないことが分かった。これは、OCP が本質的に低フッ素濃度環境下でしか安定成長できないことと整合する。

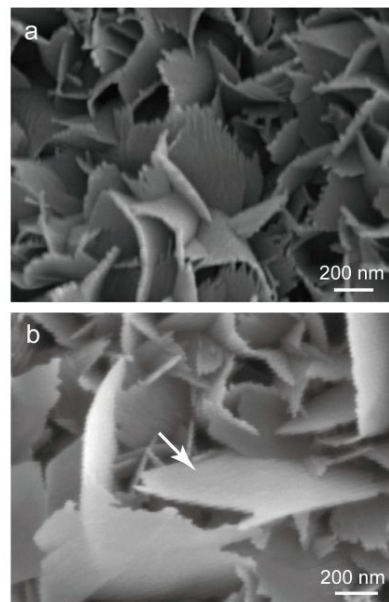


図 1 : SEM による形成結晶の観察
(a) 1 h 後 - ロッド状 HAP の集合体
(b) 1.5 h 後 - 板状結晶に変化、表面にストリーク形態が残る

(3) 電子線回折パターンの経時変化解析、及び高分解能 TEM による結晶格子縞解析の結果、成長開始後に形成したロッド状 HAP は c 軸方向に伸長した結晶群であり、結晶同士が同一方位で融合した結果、大面積の{100}面を持つ集合形態を呈することが判明した。この集合結晶面上に形成した OCP は、{100}面が HAP 結晶面と接合した形態を取る。結晶全体が最終的に完全な OCP に変化したことから、HAP{100}面が OCP{100}面に変化する、安定相から準安定相への逆方向相転移が現実に行き起きていると結論した。

(4) HAP{100}面と OCP{100}面の結晶構造を詳細に検討した結果、「両結晶面は構造を一部共有したコヒーレントな関係を持つ」ことが判明した。このため、両結晶面の表面エネルギー差は非常に低い。HAP{100}面が成長しているとき、それは同時に OCP{100}面が成長していることを見出すことができる。更に、本研究で用いた溶液環境下では、OCP の成長速度は HAP の成長速度より数倍速い。このキネティック効果が両結晶の{100}面のコヒーレントな性質と相乗して、HAP 上への OCP の結晶成長が進行すると結論された。また、結晶構造シミュレーションからは、OCP(100)面が HAP(100)面上に成長する場合に安定化することが示された(図 2)。

以上の結果から、本研究の目的である、表面層を準安定リン酸カルシウムに変化させた HAP 結晶群の安定形成を達成し、根面う蝕治療に応用可能な基礎手段を確立した。

安定相から準安定相への逆相転移を実証した本研究は世界初の成果であり、学術的に極めて大きなインパクトを持つ。今後の課題・展望として、得られた複合構造体 HAP をう蝕治療に応用する際の「現実的な使用条件」を確立する必要がある。

すなわち、HAP 結晶表面に形成した OCP 層が患部で再度 HAP に迅速転移して歯質と完全一体化するために必要な、ペースト用溶媒の探索が最大の課題であろう。

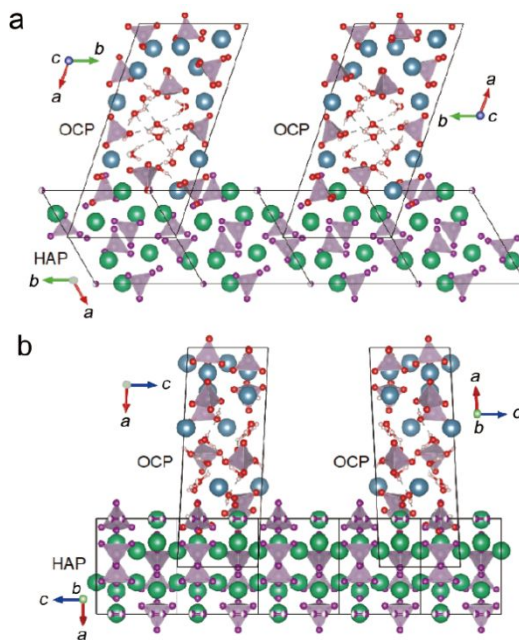


図 2 : OCP と HAP の構造関係図
HAP{100}面上に OCP{100}面が構造を共有したエピタキシャル関係で接合する。
(a) : 両結晶の c 軸に平行方向からの投影図
(b) : 両結晶の c 軸に垂直方向からの投影図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mari M. Saito, Kazuo Onuma, Yasuo Yamakoshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Cementum is key to periodontal tissue regeneration: A review on apatite microstructures for creation of novel cementum-based dental implants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 genesis (The Journal of Genetics and Development)	6. 最初と最後の頁 e23514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23514	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 Masahiro Yabe, Takeo Karakida, Kazuo Onuma, Ryuji Yamamoto, Risako Chiba-Ohkuma, Sakurako Asada, Yasuo Yamakoshi, Kazuhiro Gomi	4. 巻 156
2. 論文標題 Synergistic effect of FGF-2 and TGF- β 1 on the mineralization of human umbilical cord perivascular cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2023.105826	査読の有無 有
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 Kazuo Onuma, Pal Aniruddha, Miyabi Makino, Ikuko Sakamaki, Maki Nakamura, Saori Tanaka, Hirofumi Miyaji, Ayako Oyane	4. 巻 38
2. 論文標題 Rapid regeneration of artificial enamel using laser-assisted biomineralization: With and without mesoscale hierarchy in hydroxyapatite rods	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Materials Today Communications	6. 最初と最後の頁 108030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mtcomm.2024.108030	査読の有無 有
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 Y. Yamakoshi, R. Chiba-Ohkuma, Y. Hidaka, K. Onuma, R. Yamamoto, M. M. Saito, T. Karakida	4. 巻 64
2. 論文標題 Repurposing MDZ as a tool for tissue regeneration in dental cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 37-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.10.005	査読の有無 有
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 Kazuo Onuma, Mari M. Saito, Yasuo Yamakoshi, Mayumi Iijima, Yu Sogo, Koichi Momma	4. 巻 125
2. 論文標題 Coherent surface structure induces unique epitaxial overgrowth of metastable octacalcium phosphate on stable hydroxyapatite at critical fluoride concentration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 333-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2021.02.024	査読の有無 有
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 Mari M. Saito, Kazuo Onuma, Ryuji Yamamoto, Yasuo Yamakoshi	4. 巻 121
2. 論文標題 New insights into bioactivity of ceria-stabilized zirconia: Direct bonding to bone-like hydroxyapatite at nanoscale	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science & Engineering C	6. 最初と最後の頁 111665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2020.111665	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	斉藤 まり (Saito Mari) (60739332)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	

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
---------	---------