

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 3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390514

研究課題名（和文） 生体硬組織／材料界面のナノ・分子レベルにおける解析と制御

研究課題名（英文） Nano-scale analysis and control of biomaterial-hard tissue interfaces.

研究代表者

吉田 靖弘（YOSHIDA YASUHIRO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90281162

研究成果の概要（和文）：

生体硬組織（歯や骨）と材料とのナノ界面を包括的に解析するとともに、界面構造を機能的に制御するための技術開発を目指した。その結果、歯の接着界面で起こる機能性モノマーの分子構造とアパタイトとの反応を制御することにより、接着耐久性につながる微細構造を構築することができた。また、この分析技術を骨再生・再建に応用することにより、リン酸化多糖や光反応性ゼラチンなど医用材料開発につながる成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Hard tissue-material interfaces were comprehensively analyzed and their interfacial structures were functionally controlled. As a result of chemical investigation for tooth bonding, nano-controlled functional monomer interaction at the biomaterial-hard tissue interface can improve bond durability. The advanced analytical techniques for hard tissue-biomaterial interaction also provide a basis to develop functional materials, such as phosphorylated polysaccharides and a photo-reactive gelatin, for bone regeneration and reconstruction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生体材料学，歯科理工学，歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：界面，歯，骨，機能性モノマー，アパタイト，再生，層状構造，メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

補綴治療において生体材料は、その一翼を

担う重要な存在であり、機能向上を目指し、日夜改良・開発が続けられている。その技術

は骨セメント、人工関節など医学の分野でも応用され、学際的にも注目されている。現在、生体材料には様々な材質が用いられ、歯質接着、インプラントなど用途に応じて使い分けられるが、いずれも歯や骨、すなわち生体硬組織と結合して機能を発揮するため、両者の界面の性状が治療の成否に強く影響を及ぼす。このため『界面』は、以前より多くの歯学研究者が注目する研究対象であったが、未だ両者の界面を分子レベルで解析・制御するには至っていない。また、同じ生体硬組織でありながら、①歯質接着界面と②骨／インプラント界面は、これまで全く別物として扱われてきた。

2. 研究の目的

本研究では、成分や構造など歯と骨の類似点に着目し、以下の項目を通して、①生体硬組織／材料ナノ界面を包括的に解析するとともに、②界面の構造と機能を分子レベルで制御するための技術を開発する。

- (1) 歯質／材料界面のナノスケールにおける分析と界面の微細構造構築機序の解明
- (2) 骨（ならびに細胞）／材料界面のナノスケールにおける分析手法の確立
- (3) 光反応性ゼラチンなど研究代表者らの有するシーズについて骨再生機序を検討

3. 研究の方法

(1) 歯質／材料界面の分析

①X線光電子分光法XPS

ハイドロキシアパタイト (HAp) 表面や歯質に機能性モノマーを反応させ、余剰部分を超音波洗浄にて除去した後、両者の化学的結合状態をXPSにて分析した。

②X線回折

HAp粉体に各種機能性モノマーを反応させ、得られた混和物を粉末X線回折装置により結晶学的に比較・検討した。また、研磨した歯質に各種機能性モノマーを反応させ、その表面を薄膜X線回折装置にて結晶学的に分析した。

③核磁気共鳴吸収法NMR

HApと各種機能性モノマーの混和物を固体NMRにて測定し、機能性モノマーがHApに作用した時の化学的相互作用と反応生成物を経時的に検討した。

④水晶発振子マイクロバランス法QCM

各種機能性モノマーの吸着・解離特性をQCM

にて分子レベルかつリアルタイムで測定した。

⑤引っ張り試験

各種機能性モノマーを含有した接着システムを作製し、歯質への接着強さを測定した。

⑥形態学的観察

電界放射型走査型電子顕微鏡 (Fe-SEM) および透過電子顕微鏡 (TEM) にて破断面や界面の形態観察を行った。

⑦長期安定性の検討

サーマルサイクル試験にて、接着長期安定性を検討した。

(2) 骨組織・細胞／材料界面の分析

①各種骨系細胞による細胞接着・増殖実験

ガラスディスクならびにプラスチックディスク上にチタンや金などをコーティングしたものを準備し、細胞の接着・増殖特性を検討した。

②QCM

チタン表面における生体分子の吸着・脱離特性を、HAp、金、SiO₂、アルミナ等のセンサーと比較し、チタンに特異的に吸着する生体分子を検索した。

③形態学的観察

Fe-SEMおよびTEMにて細胞 (*in vitro*) や組織 (*in vivo*) とチタンとの界面の形態観察を行った。

(3) 新規シーズの機能評価

光反応性ゼラチンなど研究代表者らの有するシーズについて骨再生機序を検討した。

4. 研究成果

(1) 歯質／材料界面の分析

歯質接着メカニズムを解明するため、酸や機能性モノマーである4-MET, Phenyl-Pと10-MDP等の分子とアパタイト表面における化学的相互作用との関連性について分子レベルで解析し、それぞれの機能性モノマーの反応メカニズムを検討した。その結果、Phenyl-Pはアパタイト表面に吸着し、表面のカルシウムと結合したものが溶液中に解離することにより、アパタイト表面の脱灰を促進することが示唆された。また、10-MDPは反応初期でアパタイトに吸着し、層状構造をとることが明らかとなった。一方、4-METは反応の速度が遅いことがわかった。

(2) 骨組織・細胞／材料界面の分析

骨とチタンとの界面に関しては、チタン、金、アルミナ、ジルコニアなどをコーティングしたガラス面上に骨芽細胞を播種し、材料表面での挙動を観察した結果、金に比べ、チタン、アルミナおよびジルコニアは骨芽細胞の接着性に優れていた。中でもチタンは、細胞にメカニカルストレスが掛かった時に接着性が増すことも示唆された。さらに詳細な分析により、この現象は繊維芽細胞より分泌される生体分子が、チタン表面における骨芽細胞の接着や増殖を促進していることが明らかとなった。

(3) 新規シーズの機能評価

生体との界面の制御技術を確立するために開発した可視光反応性ゼラチンなどの高機能化材料を用いた基礎研究では、骨髄系幹細胞を治療部位に留める技術を確立することができ、肉眼所見ではあるが軟骨の欠損部位が形態的に完全に回復した。細胞を用いない時は肉眼的にも形態回復を得られなかったため、細胞を治療部位の生体／補填材料界面に留める技術は、再生医療において有望であると思われる。

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 29 件)

原著論文 19 件

- ① Oguri, M., Yoshida, Y., Yoshihara, K., Miyauchi, T., Nakamura, Y., Shimoda, S., Hanabusa, M., Momoi, Y., Van Meerbeek, B. Effect of functional monomer and photo-initiator on the degree of conversion of a dental adhesive. *Acta Biomaterialia* 8:1928-1934, 2012. 査読有
- ② Hirata, I., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Hiasa, K., Abe, Y., Maekawa, K., Kuboki, T., Akagawa, Y., Suzuki, K., Van Meerbeek, B., Messersmith, P.B., Okazaki, M. Real-time assessment of surface interactions with titanium passivation layer by surface plasmon resonance. *Acta Biomaterialia* 8:1260-1266, 2012. 査読有
- ③ Yoshihara, K., Yoshida, Y., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Irie, M., Ogawa, T., Van Landuyt K.L., Osaka, A., Suzuki, K., Minagi, S., Van Meerbeek, B. Nano-layering of phosphoric-acid ester monomer at enamel and dentin. *Acta Biomaterialia* 7:3187-3195, 2011. 査読有
- ④ Shintaku, Y., Murakami, T., Yanagita, T., Kawanabe, N., Fukunaga, T., Matsuzaki, K., Matsuoka, S., Yoshida, Y., Kamioka, H., Takano-Yamamoto, T., Takada, K., Yamashiro, T. Sox9 expression during fracture repair. *Cells Tissues Organs* 194:38-48, 2011. 査読有
- ⑤ Abe, Y., Hiasa, K., Hirata, I., Okazaki, Y., Nogami, K., Mizumachi, W., Yoshida, Y., Suzuki, K., Okazaki, M., Akagawa, Y. Detection of synthetic RGDS (PO₃H₂)PA peptide adsorption using a titanium surface plasmon resonance (SPR) biosensor. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22:657-661, 2011. 査読有
- ⑥ Fukuoka, A., Koshiro, K., Inoue, S., Yoshida, Y., Tanaka, T., Ikeda, T., Suzuki, K., Sano, H., Van Meerbeek, B. Hydrolytic stability of one-step self-etch adhesives bonded to dentin. *Journal of Adhesive Dentistry* 13:243-248, 2011. 査読有
- ⑦ Yoshihara, K., Yoshida, Y., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Torii, Y., Osaka, A., Suzuki, K., Minagi, S., Van Meerbeek, B., Van Landuyt K.L. Self-etch monomer-calcium salt deposition on dentin. *Journal of Dental Research* 90:602-606, 2011. 査読有
- ⑧ Nikaido, T., Ichikawa, C., Li, N., Takagaki, T., Sadr, A., Yoshida, Y., Suzuki, K., Tagami, J. Effect of functional monomers in all-in-one adhesive systems on formation of enamel/dentin acid-base resistant zone. *Dental Materials Journal* 30: 576-582, 2011. 査読有
- ⑨ Mine, A., De Munck, J., Vivan Cardoso, M., Van Landuyt, K.L., Poitevin, A., Kuboki, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Van Meerbeek, B. Enamel-smear

- compromises bonding by mild self-etch adhesives. *Journal of Dental Research* 89:1505-1509, 2010. 査読有
- ⑩ Abe, Y., Okazaki, Y., Hiasa, K., Hirata, I., Yoshida, Y., Taji, T., Suzuki, K., Okazaki, M., Akagawa, Y. Degree of immobilization of synthetic RGDS (PO₃H₂)PA peptides on titanium surfaces. *Dental Materials Journal* 29:668-672, 2010. 査読有
- ⑪ Kawahara, D., Mine, A., De Munck, J., Kuboki, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Van Meerbeek, B., Yatani, H. The quasi-3D marginal leakage of full-coverage crowns: resin coating method versus sodium hypochlorite treatment. *The International Journal of Prosthodontics* 23:406-409, 2010. 査読有
- ⑫ Son, T. I., Sakuragi, M., Takahashi, S., Obuse, S., Kang, J. H., Fujishiro, M., Matsushita, H., Gong, J., Shimizu, S., Tajima, Y., Yoshida, Y., Suzuki, K., Yamamoto, T., Nakamura, M., Ito, Y. Visible light-induced cross-linkable gelatin. *Acta Biomaterialia* 6:4005-4010, 2010. 査読有
- ⑬ Yoshihara, K., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Fukegawa, D., Hayakawa, S., Mine, A., Nakamura, M., Minagi, S., Osaka, A., Suzuki, K., Van Meerbeek, B. Nano-controlled molecular interaction at adhesive interfaces for hard-tissue reconstruction. *Acta Biomaterialia* 6:3573-3582, 2010. 査読有
- ⑭ Mine, A., De Munck, J., Van Ende, A., Cardoso, M. V., Kuboki, T., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B. TEM characterization of a silorane composite bonded to enamel/dentin. *Dental Materials* 26:524-532, 2010. 査読有
- ⑮ Mine, A., De Munck, J., Van Ende, A., Cardoso, M. V., Kuboki, T., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B. TEM characterization of a silorane composite bonded to enamel/dentin. *Dental Materials* 26:524-532, 2010. 査読有
- ⑯ Mine, A., De Munck, J., Cardoso, M. V., Van Landuyt, K. L., Poitevin, A., Kuboki, T., Yoshida, Y., Suzuki, K., Lambrechts, P., Van Meerbeek, B. Bonding effectiveness of two contemporary self-etch adhesives to enamel and dentin. *Journal of Dentistry* 37:872-883, 2009. 査読有
- ⑰ Namba, N., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Takashima, S., Matsuura-Yoshimoto, K., Maeda, H., Van Meerbeek, B., Suzuki, K., Takashiba, S. Antibacterial effect of bactericide immobilized in resin matrix. *Dental Materials* 25:424-430, 2009. 査読有
- ⑱ Maekawa, K., Shimono, K., Oshima, M., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B., Suzuki, K., Kuboki, T. Polyphosphoric acid treatment promotes bone regeneration around titanium implants. *Journal of Oral Rehabilitation* 36:362-367, 2009. 査読有
- ⑲ 福岡杏理, 小城賢一, 井上哲, 吉田靖弘, 田中享, 池田考績, 鈴木一臣, 小松久憲, 佐野英彦. スミヤー層が1ステップ接着システムの短長期的象牙質接着性能に及ぼす影響. *日本歯科保存学会誌* 52:27-38, 2009. 査読有
- 総説 10件
- ① 吉田靖弘. 生体材料は高齢者の健康維持にどのように貢献できるか. *老年歯科医学* 26:387-393, 2012. 査読無
- ② 吉田靖弘, 沖原 巧, 長岡紀幸, 井上 哲, 鳥井康弘. 誌上フォーラム: 接着試験法. 従来法—引っ張り接着強さと剪断接着強さの測定—. *接着歯学* 29:90-94, 2011. 査読無
- ③ Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., De Munck, J., Van Landuyt, K. L. State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials* 27:17-28, 2011. 査読無
- ④ 吉田靖弘, 中山陽一, 吉原久美子, 英將生, 峯篤史, 井上哲, 鈴木一臣, Van Meerbeek, B. 歯質接着における化学分析の応用. *接着歯学* 28:1-13, 2010. 査読無
- ⑤ 吉田靖弘, 鈴木一臣. 表面・界面研究が明日の歯科医療を創る. 今月の表紙. *日本歯科評論* 69:39-40. 2009. 査読無

- ⑥ 鈴木一臣, 吉田靖弘, 吉原久美子, 皆木省吾. 最新の接着技術を駆使した「G-ボンド プラス」の接着メカニズムと性能. GC CIRCLE, No. 130, 26-29, 2009. 査読無
- ⑦ 吉田靖弘. う蝕・歯周病予防のための抗菌性コーティング材の開発. 日本歯科医学会誌 28:39-43, 2009. 査読無
- ⑧ 吉田靖弘. 疑問に答えて: 著者から読者へ (DE No. 165, 166): 歯質接着界面のナノスケールにおける解析. The Journal of Dental Engineering 169:38-39, 2009. 査読無

[学会発表] (計8件)

- ① 吉田靖弘. 接着技術を活かした生体硬組織の再生・再建. 第50回臨床応用を目指した三次元臓器造形研究会. 2012年1月28日. 東京大学医学部附属病院. 東京.
- ② 吉田靖弘. リン酸化プルランを用いた高機能医用材料の開発. 第90回岡山県医用工学研究会・メディカルテクノおかやま平成23年度第2回セミナー. 2011年10月12日. 岡山.
- ③ Yoshida, Y. Phosphopullulan bioadhesive for hard-tissue reconstruction. Start-up Symposium for Innovative Materials Research “A Roadmap for the Future of Oral Biomaterials” July 2nd (Sat), 3rd (Sun), 2011. Osaka, Japan.
- ④ 吉田靖弘. 生体材料は高齢者の健康維持にどのように貢献できるか. 日本老年歯科医学会 第22回学術大会. 教育講演3. 2011年6月16-17日. 東京.
- ⑤ 吉田靖弘. 接着技術の応用による医用材料の高機能化. 日本歯科保存学2010年度会秋季学術大会 (第133回)・第12回日韓歯科保存学会学術大会. シンポジウムII 「機能性修復材料開発戦略のベクトルを探る」. 2010年10月28-29日. 岐阜.
- ⑥ 吉田靖弘. リン酸化プルランによる多目的医用材料の開発と製品化への検討. 両備櫻園記念財団平成22年度第32回研究助成金贈呈式記念講演. 2010年10月1日. 岡山.
- ⑦ Yoshida, Y., Takahata, T., Nakamura, M., Irie, M., Tanaka, M., Ozaki, T., Suzuki, K., Van Meerbeek, B.

Phosphorylated Pullulan Bioadhesive for Hard-Tissue Reconstruction. 88th General Session & Exhibition of the IADR. Jul 14-17, 2010, Barcelona, Spain.

- ⑧ 吉田靖弘. 生体硬組織/材料ナノ界面制御による医用材料の高機能化. ニューセラミックス懇話会第189回研究会・バイオ関連セラミックス分科会第27回研究会 「ハイドロキシアパタイトを制御した新しい医療用材料」. 2009年10月23日. 大阪.

[図書] (計3件)

- ① Van Meerbeek, B., Yoshida, Y. Basics in adhesion technology: In Caries management - Science and Clinical Practice. Chapter 14. pp. 228-245, 2011. 査読無
- ② Cardoso, M.V., Yoshida, Y., Van Meerbeek, B. Adhesion to tooth enamel and dentin - A view on the latest technology and future perspectives: In Statements: Diagnostics and therapy in dental medicine today and in the future. (Roulet, J.F., Kappert, H.F. Ed.) Quintessence Publishing Co, Ltd., London, UK, pp. 25-43, 2009. 査読無
- ③ 鈴木一臣, 榎本貢三, 岡崎正之, 中畠裕, 西山典宏, 編集 (幹事)・執筆: 荒木吉馬, 石川邦夫, 伊藤充雄, 川島功, 荘村泰治, 高橋英和, 土井豊, 久恒邦博, 平野進, 松家茂樹, 宮崎隆, 米山隆之 編集・執筆: 足立正徳, 新井浩一, 石田喜紀, 亀水秀男, 菊地久二, 白石孝信, 平雅之, 谷本安浩, 寺岡文雄, 長沢悠子, 納村泰弘, 早川徹, 日比野靖, 廣瀬英晴, 福島忠男, 藤島昭宏, 吉田靖弘 執筆. スタンダード歯科理工学-生体材料と歯科材料-第4版. 株式会社学建書院, 東京, pp. 1-363, 2009. 査読無

[産業財産権]

○出願状況 (計6件)

名称: リン酸化多糖の製造方法
 発明者: 沖原 巧, 亀ノ上翔吾, 吉田靖弘, 松川昭博, 難波尚子, 高柴正悟
 権利者: 岡山大学

種類：特許
番号：特願 2012-73934
出願年月日：2012年3月28日
国内外の別：国内

名称：リン酸化多糖の固相合成方法
発明者：沖原 巧，吉田靖弘，亀ノ上翔吾，井口勉，木島菜摘，難波尚子，長岡紀幸
権利者：岡山大学
種類：特許
番号：特願 2012-73933
出願年月日：2012年3月28日
国内外の別：国内

名称：生体硬組織接着用キット
発明者：吉田靖弘，田中雅人，鈴木一臣，尾崎敏文，高畑智宏，入江正郎，中村真理子，河島光伸，野尻大和，岡田浩一，長尾昌浩
権利者：岡山大学，順正学園
種類：特許
番号：PCT/JP2011/53838
出願年月日：2011年2月22日
国内外の別：国際

名称：虫歯予防剤
発明者：吉田靖弘，高柴正悟，伊東孝，今村幸治，竹内英明，岡本英治
権利者：株式会社グライエンス，岡山大学
種類：特許
番号：特願 2010-105130，特開 2011-246465
出願年月日：2010年4月30日
国内外の別：国内

名称：生体硬組織接着用キット
発明者：吉田靖弘，田中雅人，鈴木一臣，尾崎敏文，高畑智宏，入江正郎，中村真理子，河島光伸，野尻大和，岡田浩一，長尾昌浩
権利者：岡山大学，順正学園
種類：特許
番号：特願 2010-036350 (PCT/JP2011/53838に移行)
出願年月日：2010年2月22日
国内外の別：国内

名称：虫歯予防剤
発明者：高柴正悟，吉田靖弘，伊東孝，今村幸治，竹内英明，岡本英治
権利者：株式会社グライエンス，岡山大学
種類：特許

番号：PCT/JP2009/67903，W02010/050369
出願年月日：2009年10月16日
国内外の別：国際

○取得状況（計2件）

名称：チタン製インプラント及びチタン製インプラントの表面処理方法：特許番号4472267：登録日2010年3月22日
発明者：阿部泰彦，赤川安正，竹内真帆，岡崎正之，吉田靖弘，渡辺清
権利者：株式会社ジーシー
種類：特許
番号：特許番号4472267
取得年月日：2010年3月22日
国内外の別：国内

名称：口腔チタンインプラント材とその製造方法
発明者：吉田靖弘，内田幸夫
権利者：株式会社林原
種類：特許
番号：特許番号4474336
取得年月日：2010年3月12日
国内外の別：国内

〔その他〕

受賞（計4件）

- ① 吉田靖弘．(財)医科学応用研究財団平成23年調査研究助成金（2011年）
- ② 吉田靖弘．第54回日本歯科理工学会学術講演会発表優秀賞（2010年）
- ③ 吉田靖弘．(財)ホクト生物科学振興財団平成22年度研究奨励金（2010年）
- ④ 吉田靖弘．(財)両備檉園記念財団平成22年度研究助成金（2010年）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 靖弘 (YOSHIDA YASUHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：90281162

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者