

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10018

研究課題名（和文）先端ナノ解析技術を融合したカップリングモノマーの可視化

研究課題名（英文）Visually inspection of silane coupling agents using nano level technology

研究代表者

西川 悟郎（Nishigawa, Goro）

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：00172635

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）：申請者らは、ハイブリッドレジン上のカップリングモノマーの結合様態をカップリングモノマーに蛍光タンパクを標識させ、蛍光顕微鏡で観察する方法を利用して可視化する方法を考案した。これらの成果を基に、試料表面に蛍光タンパクのラベリングを行い、SEM、XPS解析と共焦点レーザー顕微鏡観察などの種々の観察方法への対応を可能とした試料を得るための試作を行った。試作した薄膜化試料を用いてTEM、STEM、EDS解析像を行い、蛍光タンパクのラベリング領域とこれらの画像のマッピングを試みた。その結果から蛍光タンパクの結合した領域の材料特有の表面に対する分布様態を検討する可能性を示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々なフィラーを含むハイブリッドレジン表面に対するシランカップリング剤の結合の様態を、結合させた蛍光タンパクを観察することによりその領域の大きさや強さを視覚的に捉え計測することにより、シランカップリング剤の効果向上技術の開発に寄与するものとなる。

研究成果の概要（英文）： We reported the visually observing method of silane coupling agents bonded to the hybrid resin for dental materials using fluorescent protein. If the evaluation method of the area of bonded silane coupling agents on the resin surface with various components could be developed, it will be useful to silane coupling agents bonding research. In this research, area of fluorescent protein bonded to silane coupling agents on the hybrid resin and area of the hybrid resin surface observed with nano level microscope was overlapped.

研究分野：歯科補綴学分野

キーワード：シランカップリング剤 ハイブリッドレジン 蛍光タンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタルフリー修復材料の接着にシランカップリング剤は、機能性モノマーや金属プライマーと同じく、材料表面の化学的結合を發揮させる有用な手段の一つである。しかしながら、修復材表面の新鮮面は他の化学物質を容易に吸着し化学的な汚染を招く。サンドブラスト後の蒸留水による超音波洗浄でさえもジルコニア表面の化学的汚染を招く。そしてこの汚染はシランカップリング剤の吸着を阻害し、接着強さを減少させる可能性があることを申請者らは報告した(Nishigawa et.al, PLoS ONE, 2016)。しかしながら、歯科材料に対するシランカップリング剤の吸着様態の計測は困難であり、代わりに歯科用セメントとの接着強さの計測値の比較によっての請者らは、セラミックに対する化学的な汚染によるシランカップリング剤の吸着の阻害状況を確認するために、材料表面に吸着したシランカップリング剤に蛍光タンパクを付着させて蛍光顕微鏡で観察を可能とするシランカップリング剤の可視化技術を開発し既に報告した(西川悟郎 他, 補綴誌, 2020)。

この技術で視覚的に捉えた修復剤表面の吸着カップリング剤の蛍光領域と、修復材料表面に露出した各フィラーの細緻な SEM 表面画像を重ね合わせて観察することができれば、シランカップリング剤のフィラーサイズでの詳細な検討が可能となる。本研究はこれらの研究経過を背景とするものである。

2. 研究の目的

シランカップリング剤の材料表面への結合の評価方法としてはエックス線光電子分光(XPS)による分析が可能ではある。しかしハイブリッドレジンなどの場合には材料中のメタクリレート樹脂の存在により XPS による評価は困難である。したがって接着試験により評価されているのが現状である。申請者らは蛍光タンパクを利用してシランカップリング剤の吸着能の視覚的観察を可能とする独自の技術を開発した。本研究課題はこの可視化技術を基に光-電子相関顕微鏡法(CLEM)に発展させてシランカップリング剤の吸着状況をフィラーサイズレベルで評価可能とすることを目的とするものである。

この評価方法を用いることによって修復材料ごとのシランカップリング剤との結合特性の材料成分による違いや汚染による影響の観察が可能となる。さらに接着試験結果との相関を求めることによって臨床的に有用な情報が得られるものと考えられる。歯科領域で使用されるハイブリッドレジン表面に吸着したシランカップリング剤に蛍光タンパクを結合させ、研究者らが開発した技術で視覚的に捉えた修復剤表面の吸着カップリング剤の蛍光領域と修復材料表面に露出した各フィラーの細緻な SEM 表面画像を重ね合わせて観察させることによって、シランカップリング剤のハイブリッドレジンに対する吸着特性のフィラーサイズでの詳細な検討を可能とする。

3. 研究の方法

ハイブリッドレジンの SEM 観察：

ハイブリッドレジンプロックとして ARCTICA VITA ENAMIC(カボデンタルシステムズ)を用いた。レジンプロックを断面観察できるように機械加工の後、アルゴンイオン研磨装置で断面観察試料を作製し、電界放出走査電子顕微鏡で観察した。

蛍光ラベリングと蛍光像の観察：

レジンプロックを機械加工による切断の後、粒度 15 μ m のダイヤモンドラッピングフィルムで

研磨，水洗後，大気圧プラズマ処理した表面をシランカップリング剤 3-(トリメトキシシリル)プロピルアミンで修飾した．この表面に対し， R-Phycoerythrin Labeling Kit-NH₂を用いて蛍光タンパクのラベリングを行い，共焦点レーザー顕微鏡（FV1000，オリンパス）にて観察した．
画像の重ね合わせ：

CLEM システムにより，材料表面を共焦点レーザー顕微鏡により蛍光観察した後，観察位置情報を SEM のステージ位置情報と同期させ，同一箇所を観察を試みた．

4．研究成果

上記研究手順から以下に示すように，蛍光画像と光-電子相関顕微鏡法（CLEM）を融合させたナノ解析技術による評価を可能とした．

CLEM システムにより，材料表面を共焦点レーザー顕微鏡により蛍光観察した後，観察位置情報を SEM のステージ位置情報と同期させ，同一箇所を観察を可能とした．SEM 像は蛍光観察像よりも高分解能であり材料を詳細に観察できる．しかしカップリングモノマーが結合した部分のみを可視化することはできない．一方，蛍光顕微鏡像はカップリングモノマーが結合した部分を蛍光染色することで可視化できるが，空間分解能は SEM に比べて低い．同一箇所を 2 つの方法で観察した像を重ねあわせることで，カップリングモノマーが結合した部分を詳細に解析することを可能とした．

ハイブリッドレジンやジルコニアは，アルミナや複数のフィラーを含有する複合材である．材料中に複雑な形態の無機質フィラーとメタクリレート樹脂が混在していることが認められた，そして同一材料表面においても不均一な吸着様態も認められた．すなわち本ハイブリッドレジン材料に MDP やシランを含むプライマーを作用させて蛍光顕微鏡の空間分解能（サブミクロンオーダー）で観察した結果，材料が含む異なる構成材質の部分にモノマーの吸着する程度に差があることを今回観察できた．

本研究で開発した方法は，あらゆる補綴材料に応用が可能である．この評価方法を用いることによって修復材料ごとのシランカップリング剤との結合特性の材料成分による違いや汚染による影響の観察が可能である．

<引用文献>

Nishigawa G, Maruo Y, Irie M, Maeda N, Yoshihara K, Nagaoka N, Matsumoto T, Minagi S. Various effects of sandblasting of dental restorative materials. PLoS ONE 11(1): e0147077.doi:10.1371/journal.pone.0147077 Published: January 14, 2016

西川悟郎，丸尾幸憲，長岡紀幸，吉原久美子，徳永英里，入江正郎，皆木省吾．蛍光ラベリングによるカップリングモノマー可視化技術の開発．第 129 回日本補綴歯科学会学術大会 博多．2020 年 6 月 27，28 日（日本補綴歯科学会誌 12・129 回特別号 P-72）

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Irie M, Okada M, Yoshimoto A, Maruo Y, Nishigawa G, Matsumoto T	4. 巻 41(3)
2. 論文標題 Shear bond strength of resin cement on moist dentin and its relation to the flexural strength of resin cement	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 429-439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-278	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 Tsujiimoto A, Irie M, Teixeira ECN, Jurado CA, Maruo Y, Nishigawa G, Matsumoto T, Garcia-Godoy F	4. 巻 2021 Aug 6;13(16):2613.
2. 論文標題 Relationships between Flexural and Bonding Properties, Marginal Adaptation, and Polymerization Shrinkage in Flowable Composite Restorations for Dental Application	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymers(Basel)	6. 最初と最後の頁 2613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym13162613.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 入江正郎 , 丸尾幸憲 , 西川悟郎 , 松本卓也
2. 発表標題 新しい合着用レジン添加型ガラスアイオノマーセメント：接着強さと曲げ特性
3. 学会等名 令和 4 年度春期 第 79 回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 入江正郎 , 丸尾幸憲 , 西川悟郎 , 松本卓也
2. 発表標題 新規開発の仮封材： 級窩洞辺縁部適合性と圧縮強さ
3. 学会等名 令和 3 年度秋期 第 78 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 吉實 舞, 丸尾幸憲, 西川悟郎, 入江正郎, 松本卓也
2. 発表標題 前歯用CAD/CAMレジンプロックに対するレジンセメントの接着強さ
3. 学会等名 令和5年度日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 入江正郎, 丸尾幸憲, 西川悟郎, 松本卓也
2. 発表標題 合着用レジン添加型ガラスアイオノマーセメントのセラミックスへの接着強さと曲げ強さ
3. 学会等名 第82回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2024年

〔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	長岡 紀幸 (Nagaoka Noriyuki) (70304326)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	丸尾 幸憲 (Maruo Yukinori) (60314697)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	吉原 久美子 (Yoshihara Kumiko) (90631581)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	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	入江 正郎 (Irie Masao) (90105594)	岡山大学・歯学部・博士研究員 (15301)	

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