

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659886

研究課題名（和文）コラーゲンの高分子修飾と高密度石灰化ハイブリッドSuper Dentinの誘導形成

研究課題名（英文）Immobilization of collagen using adhesive monomer and guided formation of highly mineralized hybrid “Super Dentin”

研究代表者

田上 順次（TAGAMI JYUNJI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50171567

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、歯質接着性モノマーをI型コラーゲンに作用させ、その石灰化を調査することにある。10MDP エタノール溶液ならびに10MDPを含有するセルフエッチングプライマーをブタ由来のI型コラーゲンスポンジに作用させた。作用期間1日間または10日間とし、pH5-5.5ならびにpH8-8.5の条件で、コントロール群を含めて石灰化溶液に作用させた。石灰化溶液に浸漬した後、沈着物のICP-AESによる定量分析と、XRDによる定性分析を行った。また、コラーゲンの石灰化物の形態をTEMにより観察した。結果、I型コラーゲンにMDPを作用させたところ、MDPがカルシウムを吸着することによってアモルファスな塩が沈着し、pH条件の違いによってDCPDやハイドロキシアパタイトに転化するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The objectives of this study were to examine the capacity of the dental adhesive monomer to react with type I collagen and evaluate the potential on the mineralization. 10-MDP (10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate) ethanol solution and a self-etch dental adhesive primer that contains 10-MDP (Calerfil SE Bond Primer) were employed in this study, either of which was applied to type I collagen sponge derived from porcine dermis. The samples including control were divided into 4 groups in compliance with the pH of the liquid (pH 5-5.5 or pH 8-8.5) and experimental period (1 day or 10 days), and immersed into the mineralization solution. After the immersion, mineral density of type I collagen was measured quantitatively using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). X-ray diffraction (XRD) was used for the qualitative analysis on the mineral deposition. TEM observation was additionally performed on the mineralized collagen morphologically. The results indicated that when MDP processing is applied to type I collagen, first calcium is adsorbed by MDP, an amorphous salt is then produced, and after a length of time depending on the pH of the mineralization fluid, this salt is converted to DCPD and hydroxyapatite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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、接着性モノマー

### 1. 研究開始当初の背景

象牙質の有機質の 90%を構成する I 型コラーゲンは、非コラーゲン性タンパク質を介して、六方晶系のヒドロキシアパタイトを基本とするリン酸カルシウムが配列、結晶化しているといわれている。コラーゲンの石灰化に関与する非コラーゲン性タンパク質として、その 60%にリン・タンパク質であるホスホリンが含まれており、分子内のリン酸基がアパタイトの核形成を促進する起始点として、注目されている。ところで、象牙質う蝕の治療には、コンポジットレジン修復がおこなわれるが、その歯質接着偉材にはリン酸基やカルボキシル基をもつモノマーが含まれており、アパタイトとの高い親和性を有している。コンポジットレジン接着した象牙質との接着界面の超微細構造を観察すると、レジンの浸透した樹脂含浸層の下層に、モノマーとアパタイトの反応物と推定される、酸一塩基耐性を有する一層がみられ、これを報告してきた (Super Dentin)。また、接着性モノマーによって処理した I 型コラーゲンは、アパタイト結晶を seeding させるエピキタシーの母体として用いる可能性があり、予備実験を進めた結果、プライマー処理したコラーゲンに、アパタイトが沈着することを確認した。したがって、接着性モノマーを用いることにより、コラーゲンのみならず、沈着したリン酸カルシウム系結晶にも変化が生じて高密度に石灰化し、耐酸塩基性を有する象牙質やエナメル質を形成することが可能と思われる。

### 2. 研究の目的

本研究は、二次う蝕予防、知覚過敏抑制を効率的に実現させる方法として、高分子を作用させることにより、象牙質ならびにエナメル質を高度に石灰化し強化する方法を検討することを目的として、計画された。I 型コラーゲンや脱灰象牙質またはエナメル質などに、リン酸基やカルボキシル基などを有する高分子を作用させ、より高度な石灰化を誘導する方法を、in vitro の条件で調査した。

3. 研究の方法

### 3. 研究の方法

クラレノリタケデンタル社から提供された 10-MDP (10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate) エタノール溶液と、10-MDP を含むセルフエッチアドヒーズのプライマーを実験に使用した。

2 L の水に対して、199.1mmol の  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (和光純薬) を混和し (約 99.6mM)、スターラーで強く攪拌して分散させた。この  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  サスペンションの 1000 ml に対して、59.7 mM の  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を 1000ml 混和し、石灰化液とした。石灰化液を、恒温槽を用いて 36 °C に保ちながら、pH 5-5.5 と、pH 8-8.5 の 2 つの条件に設定した。2 つの異なる pH 条件は、pH メーターに接続した 1 N HCl と 0.5 N NaOH の自動滴下によって行った。また、2 つの条件の石灰化液には、99.6mM の  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  サスペンションと 59.7mM の  $\text{H}_3\text{PO}_4$  水溶液を、それぞれチューブポンプを用いて 1ml/min のスピードで継続して滴下した。

24well 用に成形されたブタ由来の I 型コラーゲンスポンジ (新田ゼラチン社) を実験に使用し、石灰化を行った。3 つの濃度の MDP エタノール溶液 (1%、5%、20%) またはクリアフィル SE のプライマー (クラレノリタケデンタル社) のいずれかを、コントロール群の無処理のサンプルを除き、コラーゲンスポンジの大きさに応じて 4-5 滴滴下し、スポンジ全体に作用させた。滴下後、作用させた余剰な溶液は、吸水紙を軽圧で抑えて取り

除き、その後、コラーゲンのサンプルを室温中に 24 時間放置した。コントロール群のサンプルは、石灰化の促進を目的とした溶液を作用させるかわりに、生理食塩水を作用させ、同様の手順で実験を行った。コラーゲンのサンプルは、コントロールを含め、4 つの実験群とし、溶液の pH (pH5-5.5 と pH8-8.5) と実験期間 (1 日と 10 日) の違いによって振り分け、先に作成しておいた石灰化液に浸漬した。

所定の実験期間浸漬させた後に、サンプルを溶液から取出し、次の分析を行った。

### ICP-AES 分析

1 日間または 10 日間の浸漬後、コラーゲンサンプルを 105°C のデシケーター中において 3 時間乾燥し、乾燥重量を測定した。その後、600 °C の電気炉にて 8 時間灰化させ、灰分の質量を測定した。サンプルから得られた灰分は、硝酸を用いて加熱溶解し、その後イットリウム標準液を添加して調整した。

灰分に含まれているカルシウムとリンの定量を、ICP 発光分光分析法 (ICP-AES, IRIS advantage/AP, Thermo Fisher Scientific 社) により測定した。その測定条件を、表 1 に示す。カルシウムとリンの推奨されている波長の強さを測定した。なお、それぞれの実験群のサンプル数は 10 とし、それぞれの実験群におけるカルシウムとリンの重量を、有意水準  $p = 0.05$  で、ノンパラメトリックに統計処理を行った。

### XRD 分析

石灰化処理をおこなったコラーゲンにみられる沈着物に対する定性的分析として、粉末 X 線回折 (XRD) を行った。10 日間石灰化溶液に浸漬したサンプルを 100%アセトンに 1 日浸漬し、脱水して石灰化反応を停止させ、

ドラフトチャンバーに 2 日間放置して溶液を蒸発させ、乾燥した。乾燥させたサンプルは、XRD 分析を適切に行えるように 2 枚のスライドガラスを用いて強圧でプレスし、クリップを用いて 12 時間固定し、サンプルの可及的平坦面を作成した。

垂直マウントのディフラクションシステム (DMAX 2000, Rigaku, Danvers) を用い、40 kV、40 mA で照射した  $\text{CuK}\alpha$  線によって得られる XRD パターンを計測した。サンプルのスキャンは、コネクティングモードで 2 $\theta$  が 0.05 ラジアンから 0.7 ラジアンの範囲で行い、得られたシグナルの強さの変化をストリップチャーターの記録計に記録した。

### TEM 観察

石灰化溶液から取り出したサンプルの一部は、2.5 % グルタルアルデヒドのリン酸緩衝液と 1 % 酸化オスミウムのリン酸緩衝溶液 で二重固定を行った。その後、試料を濃度勾配のエタノールを用いて脱水し、エポキシレジン (Epon 812) に包埋した。包埋した試料から、光学顕微鏡観察用に厚さ 1  $\mu\text{m}$  の切片を切り出し、0.5 % トルイジンブルー 溶液により 30 秒間染色した。その後、厚さ 90 nm の超薄切切片をダイヤモンドナイフにより作成した。超薄切切片にウラン鉛二重染色を行った後、透過型電子顕微鏡 (H-7100、日立) により観察した。

コラーゲンに沈着した石灰化物に対し、TEM を用いて暗視野での制限視野電子回折 (SAED) を行った。得られたディフラクションパターンの 面間隔 d-spacing を、金標準試料から得られた d-spacing と比較し、算出して求めた。

## 4. 研究成果

### ICP-AES analysis

浸漬 1 日間後と 10 日間後における試料 1

gあたりのCaとPの沈着量を、表にmg単位で示す。

**pH 5-5.5**

Ca (mg/g)	1day	10days	P (mg/g)	1day	10days
control	15.0	48.0	control	10.7	23.4
MDP1%	27.9	82.6	MDP1%	17.0	39.2
MDP5%	28.5	63.1	MDP5%	22.0	32.2
MDP20%	49.9	70.3	MDP20%	46.4	47.8
SE Bond	48.9	73.9	SE Bond	49.8	55.9

**pH 8-8.5**

Ca (mg/g)	1day	10days	P (mg/g)	1day	10days
control	53.2	57.8	control	24.9	25.4
MDP1%	48.3	111.9	MDP1%	22.3	46.9
MDP5%	40.3	80.0	MDP5%	23.5	36.4
MDP20%	45.1	88.6	MDP20%	34.3	51.1
SE Bond	46.1	58.8	SE Bond	41.7	37.7

コラーゲンに沈着するCaとPの量を1日後と10日後で比較すると、一般に、pH5-5.5とpH8-8.5の両条件下において1日後でも沈着がみられたが、その量は10日後に増加していた。MDPを作用させた群では、10日後のCaの沈着量の増加には有意差がみられた(Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ )。一方、pH8-8.5におけるコントロール群のCaの増加量と、pH5-5.5におけるコントロール群とMDP20%群のPの増加量には有意差がなかった。

また、MDPを作用させた場合、その濃度の違いによる影響をみると、CaとPの沈着量に変化がみられた。1日後のpH5-5.5の群と、10日後のpH5-5.5とpH8-8.5の群に有意差がみられた(Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ )。1日後のpH8-8.5のサンプルでは、コントロールのほうがMDP処理またはSEボンドのサン

プルよりも多くのCaの沈着がみられたが、有意差はなかった(Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ )。

溶液のpHによる影響を比較すると、CaとPの沈着に違いがみられた。1日後では、コントロール、MDP1%、MDP10%において、pH8-8.5のほうがpH5-5.5よりも多くのCaとPが沈着していた。しかしながら、MDP20%とSEボンドのサンプルは、有意差はなかったものの、逆にpH5-5.5のほうがpH8-8.5よりも多くのCaとPの沈着がみられた(Mann-Whitney U test,  $p > 0.05$ )。10日間浸漬させた場合、

pH8-8.5の条件では、MDP処理を行ったすべての群においてCaの沈着がpH5-5.5よりも有意に多かった。また、同じ条件でのPには有意差はなかった(Mann-Whitney U test,  $p > 0.05$ )。SEボンド群のみ、10日後においてもpH5-5.5のほうがCaとPの沈着が多くみられた。

**XRD analysis**

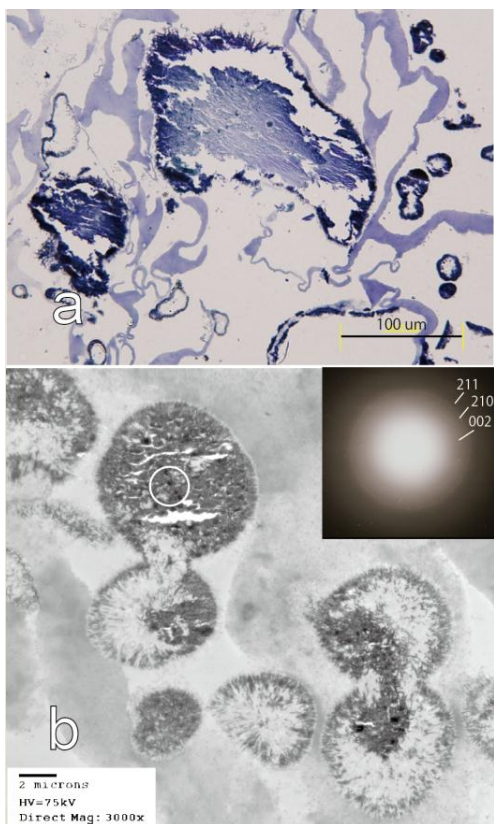
10日間溶液に浸漬した1型コラーゲンのXRDパターンをみると、HAとDCPDの生成物がみられた。DCPDのピークはpH5-5.5においてHAよりも強くみられ、またpH8-8.5ではHAのピークのほうがつよくみられた。

コラーゲンにMDPを作用させた場合、MDP-Caの生成物がpH5-5.5とpH8-8.5のどちらの条件においてもみることができた。

**TEM observation**

低倍で観察すると、コラーゲンの表面に、大きさの異なる球状の生成物が島状に生成している様子がみられた(a)。高倍で観察すると、小さな球状生成物の内部において、カールしたプレート状の小片をTEMによって確認することができた(b)。これらの小さな

プレート状の生成物は、コラーゲンと接しながら、顆粒状に散らばっていた。この結晶のコラーゲンに対する方向性はみられなかった。pH8-8.5 のサンプルのうち、いくつかの結晶から得られたディフラクションパターンには、アパタイトと思われる 002 と 211 のプレーンがみられた。しかしながら、MDP を作用させた pH5-5.5 と pH8-8.5 のほとんどのサンプルにおいて、このようなプレーンは不鮮明であり、アモルファスな結晶沈着物が多く含まれていると考えられた。



a. メチレンブルー染色  
b. TEM 観察

#### 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 1 件)

1. Mandurah MM, Sadr A, Shimada Y, Kitasako Y, Nakashima S, Bakhsh TA, Tagami J, Sumi Y. Monitoring remineralization of enamel subsurface lesions by optical coherence tomography. Journal of Biomedical Optics 18(4): 046006,

2013.

[学会発表] (計 5 件)

1. 島田康史、市野瀬志津子、Sadr Alireza、Nazari Amir、中川寿一、田上順次、Eidelman Naomi、高木章三、Chow C Laurence. I 型コラーゲンの接着モノマー修飾と石灰化ハイブリッドの誘導形成. 日本歯科保存学会 2011 年度春季学術大会、2011 年 6 月 9-10 日
2. マンドウラモナ、サダルアリレザ、北迫勇一、中嶋省志、島田康史、田上順次、角保徳、田中智子. エナメル質表層部の POs-Ca ならびに POs-Ca+F による再石灰化：ナノインデンテーション及び SS-OCT による評価. 日本歯科保存学会春季学術大、2012 年 6 月 28-29 日
3. Mandurah M, Sadr A, Nakashima S, Bakhsh T, Shimada Y, Tagami J, Sumi Y. Enamel lesion remineralization evaluated by nanoindentation and optical coherence tomography. IADR general session, Seattle, 2013.
4. Bakhsh TA, Sadr A, Shimada Y, Mandurah M, Alsayed EZ, Tagami J, Sumi Y. Non-destructive evaluation of internal cavity adaptation in class II resin composite. IADR general session, Seattle, 2013.
5. Aramaki O, Kawashima N, Shimada Y, Suzuki N, Otsuki M, SudaH, Tagami J. Identification of several subpopulations of DCs in rodent dental pulp. IADR general session, Seattle, 2013.

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田上順次 ( TAGAMI JUNJI )  
東京医科歯科大学・教授  
研究者番号：50171567

### (2) 研究分担者

島田康史 ( SHIMADA YASUSHI )  
東京医科歯科大学・助教  
研究者番号：60282761