

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462943

研究課題名(和文) ナノ技術を応用したレジン上への歯周組織再生を伴う接着治療法の開発

研究課題名(英文) A development of the bonding treatment of vertically fractured roots with periodontal regeneration on adhesive resin using nanotechnology

研究代表者

田中 佐織 (TANAKA, SAORI)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：90344522

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)：歯根破折歯接着治療法の予知性向上を目的として、封鎖材料のレジン表面を改変し培養細胞シートを貼ることでレジン上に歯周組織再生を目指した。レジン表面をカーボンナノチューブ(CNT)とナノ-TCPでコーティングした。細胞付着試験では、CNTコートした試料に付着した細胞はコントロールと比較すると多く、細胞伸張が良好であった。また細胞増殖性試験でも高い細胞増殖性がみられた。皮下埋植試験では著明な炎症反応は認められず、CNTコートした試料に培養細胞シートを貼った試料周囲に骨様組織形成が認められた。以上よりレジン表面を改変することによりレジン上に歯周組織再生の可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：Composite resin (CR) is used the bonding treatment of vertically fractured roots and as a retrograde material following apicectomy. We aimed to the periodontal regeneration on CR. Effective biological modification of the CR surface is thus needed to improve its biocompatibility. Carbon nanotubes (CNT) and -TCP have useful properties such as promoting cell adhesion and proliferation. CR discs were coated by immersion in a dispersion of CNT and -TCP. In the cell culture assay, the CNT-CR samples exhibited abundant cells and marked adhesion of filopodia to CNT. Cell proliferation assay indicated that the CNT-CR was significantly higher than the CR. This results showed that coating the surface of CR with CNT improved their biocompatibility. In vivo studies, we observed the bone-like hard tissue formation on a CNT-CR wrapped in cultured bone marrow stromal cell sheets. Thus, this experiment might suggest a possibility of the periodontal regeneration on CR.

研究分野：歯内療法学

キーワード：ナノテクノロジー 歯周組織再生 カーボンナノチューブ ナノ-TCP 細胞培養シート レジン

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 垂直歯根破折の新しい治療法

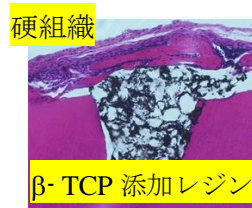
①歯根の垂直破折は、これまでは多くの場合で抜歯となっており、世界的にもその治療法に関する研究はほとんど行われていなかった。また、歯根破折面、穿孔部、逆根管充填、歯根吸収面に対して歯科材料による封鎖は行われているが、生体に接する面に歯周組織再生が観察された報告はほとんどなかった。

②1995年より接着性レジンセメント(4-META/MMA-TBB レジン、スーパーボンド C&B®)を用いて破折歯根の接着治療(破折部をレジンを封鎖することにより破折部からの漏洩による感染を防止する)を行ってきた。この治療法により5年後の生存率が70-80%と良好な成果を上げていることを報告した。これら治療の成功率向上のためには、生体に接するレジン上に歯周組織が再生することが重要である。

これまでに、垂直破折歯根接着治療において多くの場合に破折部を接着したレジンに沿って深い歯周ポケットが残存すること、また動物実験でもレジン上にセメント質の形成は認められないことを報告した。

### (2) レジン表面への歯周組織再生の試み

①これらの結果に基づいて、レジンに象牙質添加し、再生療法として臨床応用されているエムドゲインを併用して、セメント質再生の可能性について検討してきた。*In vitro*では工学的性質と生体親和性を検討した。*In vivo*では象牙質添加レジンにエムドゲインを塗布した数例のレジン上に周囲セメント質から連続する新生セメント質形成が認められたが、その量はわずかであった



(平成19~21年度「基盤研究C」(田中))。

②そこでレジンに象牙質及び、 $\beta$ -TCPを添加し、rhBMP-2と骨髄細胞培養シートを用いて、再生促進の可能性を検討した。象牙質及び $\beta$ -TCP添加レジンにrhBMP-2を塗布し培養細胞シートを貼り、ヌードマウス皮下に移植したところ、 $\beta$ -TCP添加レジン上のみ硬組織形成が認められたが(上図)、形成量はわずかであり硬組織の形成量が少ないことが問題点として残った(平成22~24年度「基盤研究C」(田中))。

## 2. 研究の目的

下図に示すようにレジン表面にカーボンナノチューブ(CNT)とナノ $\beta$ -TCPをコーティングし、その上に培養細胞シートを貼ることにより問題点を克服することができると考えた。即ち、骨誘導能を持つ $\beta$ -TCP顆粒をナノサイズ粒子にすることにより生体内でのこれらの吸収を容易にし、細胞増殖の足場を形成させ、細胞侵入や組織構築を促進させるというものである。さらにナノ $\beta$ -TCP顆粒をレジン表面へ吸着させるために細胞接着・伸展性を有するCNTでコーティング処理を行い、レジン上への細胞接着の向上を目的として行い、レジン上に歯周組織が再生する可能性があるかを明らかにする。



CNT・ナノ $\beta$ -TCP + 培養細胞シート

## 3. 研究の方法

(1) CNTとナノ $\beta$ -TCPをコーティングしたレジンの生体適合性の評価

①レジンブロックの作製とCNTとナノ $\beta$ -TCPコーティング処理

レジン(ビューティフィルフロープラス、スーパーボンドC&B)をブロック状に成型する(5×7×3mm)。耐水研磨紙#600で表面を研磨後、超音波洗浄し、各種濃度に調整したMWCNT分散液を用いてコーティング処理を行う。濃度は1, 0.5, 0.1, 0.01, 0.001wt%、時間は0, 10, 60秒を設定する。コーティング後、アルコールにて溶媒を洗浄し乾燥させ以下評価に用いる。

②CNTとナノ $\beta$ -TCPコーティング処理状態のSEM観察

通法に従って観察用試料を作製し、SEMにて付着状態を観察する。

③培養細胞を用いた細胞付着性試験

細胞にはMC3T3-E1細胞を用いる。24well plateにレジンブロックを静置し、1万個に調整したE1細胞を播種、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養を行う。培養1日後、3日後、7日後に各試料を固定し、SEMにてCNTコーティングしたレジン上の細胞の付着状態、形態、伸展の様子を観察し、コーティングしていないレジン上の細胞と比較検討する。7、14日後に、ALP活性の測定をpNPP法で行い、アリザリンレッド染色を行う。PCR法で骨形成マ

ーカーの発現を確認する。

#### ④生体適合性試験

国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を得て実験を行う。ラットに全身麻酔、局所麻酔をし、背部皮下に各 CNT コーティングしたレジンを移植する。1, 2, 3 週後に HE 染色、組織標本作製し、炎症による炎症性細胞浸潤を比較検討する。

(2) 培養歯根膜細胞シートを貼ったレジンの生体内での組織反応の検討

##### ①培養歯根膜細胞シートの作製

F344/Jc1 ラット(週令:4週令 性別:♂)の歯根膜を採取し、付着性細胞を 10%FBS と 1%抗生物質添加の MEM で培養を行い、細胞シートベースを作製する。その後、細胞  $1 \times 10^5$  cell を 1, 3, 5 日目にベースに追加播種することで多層シートの作製を行う。追加播種を開始後は、培地を ascorbic acid ( $50 \mu\text{g/ml}$ )、 $10\text{mM } \beta$ -lycerophosphate、 $100\text{nM}$  dexamethason を添加した osteogenic medium にする。培養 7 日後にスクレーパーにて細胞シートをディッシュより剥離し以下に用いる。

##### ②レジンのヌードマウスへの移植

国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を得て実験を行う。ヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nuJcl 8週令・性別♂) に全身麻酔と局所麻酔をし、背部皮下に CNT と ナノ  $\beta$ -TCP コーティングした試料に培養歯根膜細胞シートを貼り移植する。コーティング処理及びシートの有無で比較検討する。

##### ③組織標本の作製

1, 2, 3 週後に HE 染色して組織標本作製し、硬組織形成の有無、炎症による炎症性細胞浸潤の範囲を面積にて算出し、比較検討する。屠殺時に摘出した試料表面を SEM 観察し、CNT と細胞や細胞外基質との関係、また生体内において CNT が脱落していないか観察する。さらに一部の標本を ALP、BSP、OCN 免疫染色、硬組織周囲の細胞分化の程度を免疫組織学的に観察する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 生体適合性の評価 *in vitro*

##### ①試料作製とコーティング処理

肉眼観察 (図 1): CNT 処理すると表面は薄褐色に着色した。

SEM 観察 (図 2): コーティング時間 20 秒の試料はレジン上に CNT が散在しているのが認められ、CNT は付着しているがネット形成は

不十分であった。60 および 180 秒の試料ではレジンマトリックス、およびフィルター上の両方に、CNT による薄いネット構造が確認された。

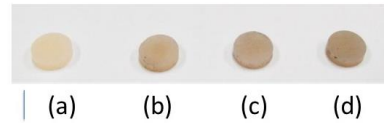


図1 CNTsコーティングしたコンポジットレジン

(a) コーティングなし (b) 20秒 (c) 60秒 (d) 180秒

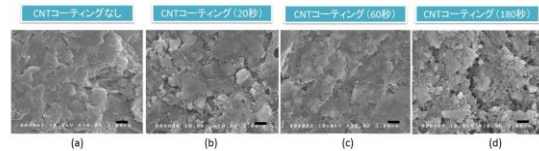
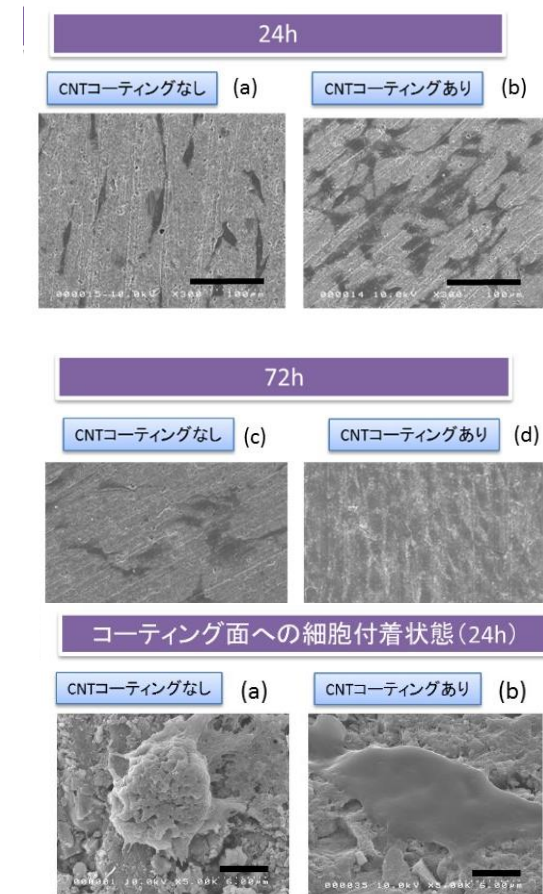


図2 CNTsコーティングのSEM画像(バーは1μm)

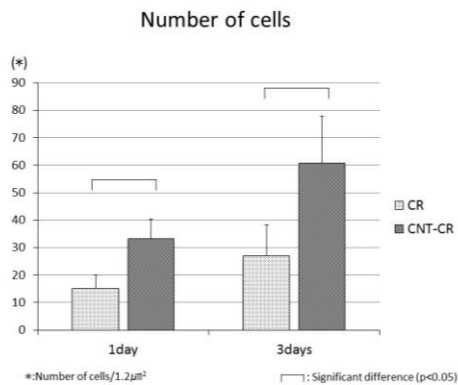
(a) なし (b) 20秒 (c) 60秒 (d) 180秒

##### ②細胞付着性試験

CNT コーティングレジンに付着した細胞はコントロールと比較して付着細胞数は多く、細胞伸張が良好であった。細胞は突起を伸ばして CNT ネットに付着しているのが観察された。72 時間後において CNT コーティングレジンへの付着細胞数は大幅に増加していた。24 時間後と比較して有意な差が認められた (下図)。

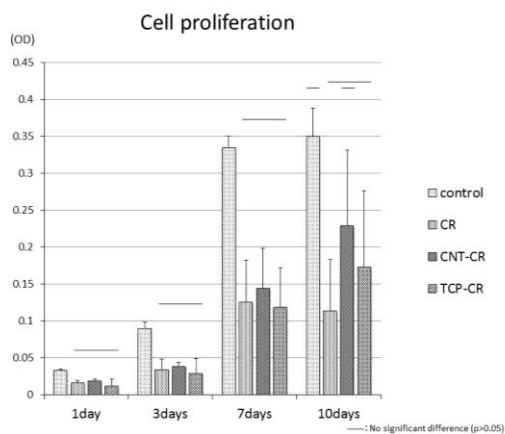


### ③細胞付着試験



### ④細胞増殖試験

CCK-8 試験の結果 10 日目の CNT は control と比較して有意な差は認められず、増殖性が高いことが示された (下図)。



### (2) 生体適合性の評価 *in vivo*

下図左: コントロール、右: CNT

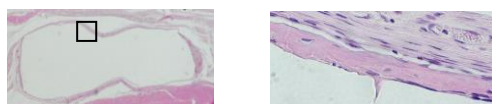


下図左: β-TCP、右 CNT+β-TCP



4 群に著明な炎症反応は認められなかった。

### (3) 培養細胞シートを貼ったレジンの生体内での反応



CNT 群では、試料周囲に骨様組織形成が認められた。β-TCP 群では、著明な組織形成は認められなかった。

以上より、カーボンナノチューブでレジンを表面を改変することにより、細胞付着・増殖が向上し、さらに細胞培養シートを応用すれば、レジン上に歯周組織形成が起こる可能性が示された。

### 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 6 件)

1. Tanaka, S., Miyaji, H., Nishida, E., Inoue, K., Miyata, S., Kato, A., Kanayama, I., Murakami, S., Kawamoto, K., Fugetsu, B., Tanaka, T., Iizuka, T., Kawanami, M., Effects of CNTs on cell proliferation, Modification of Composite Resin surface with Carbon nanotubes enhance cell proliferation, Nano Biomedicine, in press, 2016, 査読有
2. Nishida E, Miyaji H., Umeda J, K Kondoh, Takita H, Kanayama, I., Tanaka S., Kato A., Fugetsu B, Akasaka T, Kawanami M., Biological response of CNT, Biological response to nanostructure of carbon nanotube/titanium composite surfaces. Nano Biomedicine, 7:11-20, 2015, 査読有
3. Kato, A., Miyaji, H., Ishizuka, R., Tokunaga, T K, Inoue, K., Kosen, Y., Yokoyama, H, Sugaya, T, Tanaka, S., Sakagami, R, Kawanami, M, Effects of root surface modification on periodontal healing, Combination of root surface modification with BMP-2 and collagen hydrogel scaffold implantation for periodontal healing in beagle dogs. Open Dent J, 9:52-59, 2015, 査読有  
DOI:10.2174/1874210601509010052
4. Miyaji, H., Nishida, E., Umeda, J, Kondoh, K, Takita, H, Fugetsu, B, Tanaka, S., Kato, A., Akasaka, T, Kawanami, M, Effects of carbon nanotube net film, Bioactive titanium surface using carbon nanotube net film. Visual-JW 2014, Hotel hankyu expo park (Osaka), Nov 26-28, 2014, Proceedings of Visual-JW 2014, 11-12, 2014. 査読無
5. Miyaji, H., Yokoyama, H, Kosen, Y,

- Nishimura, H, Nakane, K, Tanaka, S,  
Otani, K, Inoue, K, Ibara A, Kanayama I,  
Yoshida T, Ogawa K, Nishida E, Kawanami  
M. Effects of  $\beta$ -TCP to bone formation,  
Bone augmentation in rat by highly  
porous  $\beta$ -TCP scaffolds with different  
open-cell sizes in combination with  
fibroblast growth factor-2. J Oral  
Tissue Engin, 10:172-181, 2013, 査読有
6. Ibara, A, Miyaji, H, Fugetsu, B, Nishida,  
E, Takita, H, Tanaka, S, Sugaya, T,  
Kawanami, M, Effects of nano- $\beta$ -TCP on  
biocompatibility, Osteoconductivity  
and biodegradability of collagen  
scaffold coated with nano- $\beta$ -TCP and  
fibroblast growth factor 2. J Nanomater,  
1-11, 2013, 査読有  
[学会発表] (計 3 件)
1. Nishida, E, Miyaji, H, Umeda, J, Kondoh, K,  
Takita, H, Fugetsu, B, Tanaka, S, Kato, A,  
Akasaka, T, Kawanami, M, Evaluation of  
biocompatibility of CNT,  
Biocompatibility of CNT-Ti composite  
surface with different nanomorphologies.  
93<sup>rd</sup> General Session of the IADR,  
2015. 3. 11-2015. 3. 14, Hynes Convention  
Center (Boston, USA)
2. 宮治裕史, 西田絵利香, 今村琢也, 長尾敬  
志, 田中佐織, 川浪雅光, レジン表面のナ  
ノ改変の検討, コンポジットレジン表面へ  
のマイクロ・ナノ 3 次元微細構造の付与.  
日本歯科保存学会, 2014 年 6 月 19-20 日,  
滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール (大津市)
3. 西田絵利香, 宮治裕史, 滝田裕子, 梅田純  
子, 近藤勝義, 古月文志, 田中佐織, 加藤  
昭人, 金山和泉, 川浪雅光, CNT の生体適  
合性評価, チタン表面のカーボンナノチュ  
ーブコーティングと生体適合性評価. 日本  
再生医療学会総会, 2014 年 3 月 4-6 日, 京  
都国際会議場 (京都市)

[その他]  
北海道大学大学院歯学研究科 歯周・歯内療  
法学教室ホームページ  
<http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/periodio.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 佐織 (TANAKA SAORI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号: 90344522

##### (2) 研究分担者

宮治 裕史 (MIYAJI HIROFUMI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号: 50372256

井上 加菜 (INOUE KANA)

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号: 40600127

田中 享 (TANAKA TORU)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号: 90179771

##### (3) 連携研究者

谷野 美智恵 (TANINO MISHIE)

北海道大学・医学研究科・講師

研究者番号: 90360908

加藤 昭人 (KATO AKIHITO)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号: 40507571

##### (4) 研究協力者

金山 和泉 (KANAYAMA IZUMI)

北海道大学・歯学研究科・大学院生

西田 絵利香 (NISHIDA ERIKA)

北海道大学・歯学研究科・大学院生

村上 秀輔 (MURAKMI SHUSUKE)

北海道大学・歯学研究科・大学院生

川本 康平 (KAWAMOTO KOHEI)

北海道大学・歯学研究科・大学院生

宮田 さほり (MIYATA SAORI)

北海道大学・歯学研究科・大学院生