

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670885

研究課題名(和文) 牡蠣殻ナノ粒子とエナメル蛋白を用いたバイオミネラル化によるエナメル質修復

研究課題名(英文) Restoration of tooth enamel by biomineralization with oyster shell nano-powder and enamel matrix proteins

研究代表者

谷本 幸太郎 (Tanimoto, Kotaro)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：20322240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：リコンビナントアメロゲニンは中性溶液中で凝集体を形成した。エナメル質表面にアメロゲニンを用いたバイオミネラル化処理を行った結果、エナメル質の有意な表面粗さの減少が認められた。さらに、牡蠣殻より生成したナノサイズの粒子でエナメル質表面を処理したところ、エナメル質表面に付着させた人工プラークが高い効率で除去され、歯面清掃効果が示された。しかし、エナメル質表面のバイオミネラル化効果については安定した成果が得られなかった。今後の課題として、ナノパウダーを確実に歯面に維持させる方法と、バイオミネラル化のための更なる条件検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recombinant human amelogenin formed nanosphere in solution at neutral pH. The surface roughness of tooth enamel surface was decreased significantly by the biomineralization treatment with amelogenin. Artificial plaque was removed effectively by the treatment with oyster shell nano-powder, whereas no obvious biomineralization effects were shown. A method to maintain oyster shell nano-powder onto enamel surface is considered to be necessary, and a further investigation to find better condition for biomineralization is desired.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：バイオミネラル化

## 1. 研究開始当初の背景

初期の齲蝕は、有機酸がエナメル小柱間空隙からエナメル質に浸透することにより生じるが、歯質の実質欠損に至っていなければ、再石灰化プロセスにより自然修復する可能性がある。しかし、生体での再石灰化の条件は明確でなく、これを確実に達成する術式は確立されていなかった。

アメロゲニンは、ハイドロキシアパタイト (HAP) 結晶誘導能を有するエナメル蛋白の主成分で、疎水性部分を内側に、親水性のC末端部を外側にしたミセル構造の凝集体 (ナノスフィア) を構築し、エナメル質形成に重要な役割を果たすことが示唆されている。ナノスフィアの構築により親水性を獲得するとともに、粒子の間隙に過飽和のカルシウムおよびリン酸塩イオンが集積することにより、HAP 結晶の誘導が達成される。我々は、本申請研究以前にヒトアメロゲニンをを用いたナノスフィアの構築条件を詳細に検証するとともに、HAP 結晶誘導モデルを用いてエナメル蛋白の硬組織形成の解析を進めてきた。

さらに、本申請研究では組成や構造にエナメル質と類似点の多い牡蠣殻から製造されたナノサイズの微粒子 (牡蠣殻ナノ粒子) に着目した。牡蠣殻ナノ粒子は、牡蠣殻を瞬間高温高压処理で無菌的に微粒子に加工したものであり、主成分である炭酸カルシウムその他、マグネシウムや亜鉛を微量に含有する。アメロゲニンと牡蠣殻ナノ粒子を組み合わせた新技術によるエナメル質修復効果を検証することとした。

## 2. 研究の目的

本研究は、牡蠣殻から生成したナノサイズの HAP 粒子とエナメル蛋白アメロゲニンをを用いた生体硬組織誘導 (バイオミネラリゼーション) により、エナメル質を再生修復するまったく新しい方法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 牡蠣殻ナノ粒子表面におけるアメロゲニンによる HAP 結晶誘導の検討

HAP 結晶誘導モデルを用いて、牡蠣殻ナノ粒子表面における最適なバイオミネラリゼーション反応溶液の開発を行う。

### 2) エナメル質への牡蠣殻ナノ粒子の付着とエナメル質修復効果の検討

矯正歯科治療のため抜去された小白歯を

用いる。エナメル質のリン酸処理により均一な脱灰状態を作成し、その表面上に様々な粒径条件の牡蠣殻ナノ粒子を作用させる。

### 3) 牡蠣殻ナノ粒子とアメロゲニンをを用いたエナメル質初期齲蝕の修復効果の検討

*in vitro* の至適条件の牡蠣殻ナノ粒子とバイオミネラリゼーションによる相乗効果を検証する。

## 4. 研究成果

1) リコンビナントヒト完全長アメロゲニンを作製した。精製した蛋白は、中性水溶液に溶解させた。

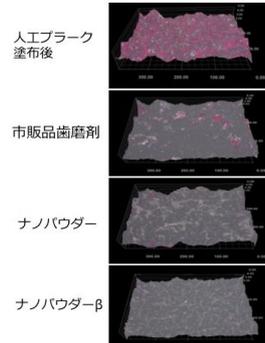
牡蠣殻ナノ粒子表面においてアメロゲニンナノスフィアによるハイドロキシアパタイト結晶誘導が可能となる至適条件を検討した。バイオミネラリゼーションの第一段階であるナノスフィア形成をレーザー光散乱検出器にて分析した。その結果、リコンビナントアメロゲニンは、中性溶液中で数十ナノメートルの凝集体を形成することが DLS 分析で示された。

また、各種濃度で条件を変えた反応液を作製し、37℃ 中性条件下で結晶成長を誘導し、原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した。その結果、エナメル質表面におけるアパタイト結晶誘導が認められた。しかし、アメロゲニンナノスフィアの牡蠣殻ナノ粒子への吸着は認められたものの、結晶成長促進への影響は不明であった。

2) 抜去歯のエナメル質表面に酸処理を施し、表面を粗造にした後、アメロゲニンをを用いたバイオミネラリゼーション処理を行った結果、AFM によりエナメル質の有意な表面粗さの減少が認められた。すなわち、バイオミネラリゼーション処理により、エナメル質表面で結晶誘導が達成され、表面粗さが改善されたと考えられた。

3) 牡蠣殻ナノ粒子でエナメル質表面を処理したところ、エナメル質表面に付着させた人工プラークが高い効率で除去され、歯面清掃効果を示された。また、その効果は粒子径をより小さくすることにより向上することが明らかとなった。

オイスターシェル・ナノパウダーβ



オイスターシェル・ナノパウダーβは、エナメル質表面の小さな窪みにも清掃効果がある

しかし、エナメル質表面のバイオミネラリゼーションによる修復効果については安定した成果が得られなかった。AFM 画像の観察により、乾燥状態では牡蠣殻ナノ粒子はエナメル質表面に留まって吸着し続けることが困難であることが示された。これは研究計画当初予期していなかったことである。この理由によりバイオミネラリゼーションによる結晶誘導課程における牡蠣殻ナノ粒子の及ぼす影響が明確にならなかったものと考えられる。

4) 牡蠣殻ナノ粒子を用いた歯面改質の試みは国内外で初めてであり、少なくともアメロゲニンの持つバイオミネラリゼーション効果と牡蠣殻ナノ粒子の持つ歯面清掃効果は期待できる。これらの相乗効果の証明にはより詳細な検討が必要である。今後の課題として、ナノパウダーを確実に歯面に維持させる方法と、安定したバイオミネラリゼーションを生じさせるための更なる条件検討が必要と考えられた。

#### 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 1 件)

沖 奈苗, 本川雅英, 國松 亮, 廣瀬尚人, 吉見友希, 谷本幸太郎, 広島大学病院矯正歯科におけるエナメル質形成不全永久歯の発現実態に関する臨床調査, Orthodontic Waves- Japanese Edition(査読有), 2014, 73, 137-142.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 谷本幸太郎: 矯正歯科治療におけるカリエスリスクへの挑戦—遺伝要因のスクリーニングとバイオミネラリゼーション治療, 2016. 3. 14, 広島矯正歯科医学会学術講演会(広島市)「広島県歯科医師会館」

2. 鷺見圭輔, 國松 亮, 廣瀬尚人, 吉見友希, 粟田哲也, 阿部崇晴, 沖田紗季, 中尾裕子, 谷本幸太郎: より細かい粒子化した牡蠣殻ナノパウダーの歯面清掃効果およびエナメル質修復効果の検討, 2015.11.18, 第74回日本矯正歯科学会大会「福岡国際会議場(福岡市)」

3. 國松 亮, 鷺見圭輔, 丹根由起, 廣瀬尚人, 光吉智美, 吉見友希, 郡司秀美, 谷本幸太郎, 牡蠣殻ナノパウダーの歯面清掃効果およびエナメル質修復効果の検討, 2014.10. 20, 第73回日本矯正歯科学会大会「幕張メッセ(千葉市)」

4. 粟田哲也, 國松 亮, 吉見友希, 廣瀬尚人, 小島俊逸, 加来真人, 平田伊佐雄, 加藤功一, 丹根一夫, 谷本幸太郎, アメロゲニンの骨芽細胞代謝調節機構への影響—エナメル自由采ペアチトを用いた骨再生療法への展開, 2014.5.29, 第38回日本口蓋裂学会「札幌コンベンションセンター(札幌市)」

〔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

谷本 幸太郎 (TANIMOTO, Kotaro)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号: 20322240

##### (2) 研究分担者

國松 亮 (KUNIMATSU, Ryo)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号: 40580915

##### (3) 研究分担者

廣瀬 尚人 (HIROSE, Naoto)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号: 50611935

##### (4) 研究分担者

鷺見 圭輔 (KEISUKE, Sumi)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助

教

研究者番号： 00707078

(5)研究分担者

吉見 友希 (YOSHIMI, Yuki)

広島大学・大学病院・歯科診療医

研究者番号： 50707081

(6)連携研究者

( )

研究者番号：