

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592789

研究課題名(和文) 垂直歯根破折の破折間隙にセメント質を誘導してレジンと結合させる治療法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative therapy of cementum to the gap of vertical root fracture and interdigitation to the resin

研究代表者

菅谷 勉 (SUGAYA, Tsutomu)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10211301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：4-META/MMA-TBBレジンに炭酸カルシウムやTCPを混和すると、いずれも濃度が高くなるにしたがってCa<sup>2+</sup>溶出量は多くなり、TCP複合化レジンが最も溶出量が多く骨との直接接触も多かった。また骨髄液中で硬化させると、表面に骨髄液成分がハイブリッドして骨との接触率を向上させた。コラーゲン膜にナノハイドロキシアパタイトを複合化し、BMPを含浸させて象牙質表面に貼付して筋に移植すると、象牙質表面への高い硬組織形成率が得られた。歯根にTCP含有レジン接着、ナノハイドロキシアパタイト複合化コラーゲン膜にBMPを含浸させてレジンに接着すると、レジン上に硬組織の形成が観察された。

研究成果の概要(英文)：4META/MMA-TBB resin and calcium carbonate or TCP were made composition, and elution of Ca<sup>2+</sup> was measured. Ca<sup>2+</sup> elution of all samples increased as the concentration becomes higher. That of beta-TCP had less than alpha-TCP and calcium carbonate. 4META/MMA-TBB resin containing alpha-TCP can facilitate direct contact between the resin and newly formed bone. The hybrid layer with the bone marrow was formed on the resin surface when resin was cured in bone marrow, and the rate of bone-resin contact improved. BMP soaked collagen membrane-nanohydroxyapatite composition was put on dentin and implanted in a femoral muscle. Then a high percentage of hard tissue formation to the dentin surface was provided. 4META/MMA-TBB resin containing alpha-TCP was adhered on root surface, and BMP soaked collagen membrane-nanohydroxyapatite composition was put on the resin. The hard tissue formation was observed on the resin.

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：4-META/MMA-TBBレジン 炭酸カルシウム TCP 骨接触率 骨形成 ハイブリッド

1. 研究開始当初の背景

垂直歯根破折は抜歯原因の大きな位置を占めるようになり、治療法を確立することが歯の保存のためには重要な課題となっている。4-META/MMA-TBB レジンを用いた歯根破折の治療は大きな成果をあげてきたが、これまでに行われた動物実験では、硬化したレジン表面にセメント質が直接結合することはない。これが、深い歯周ポケットを形成し、予後を悪化させる要因の一つと考えられる。

そこで、4-META/MMA-TBB レジンに硬組織と化学的に結合可能な炭酸カルシウムや TCP を複合化し、さらに BMP をハイブリッドさせて硬組織を誘導し、硬組織を炭酸カルシウムや TCP さらにはレジンマトリックスに結合可能な治療法を開発することが本研究の目的である。

2. 研究の目的

(1) 4-META/MMA-TBB に炭酸カルシウム、TCP を複合化し、 $Ca^{2+}$ が溶出し、硬組織形成の促進や硬組織との結合が得られる濃度を明らかにする。

(2) 4-META/MMA-TBB レジンの生体親和性は硬化条件によって異なることから、硬化条件を変えたレジン骨髄腔内に埋植し、レジン表面への骨形成に及ぼす影響を明らかにする。

(3) コラーゲン膜に BMP を含浸、炭酸カルシウムまたは TCP 複合化レジンにハイブリッドさせ、レジン表面への硬組織結合状態を評価し、BMP により誘導された硬組織とレジンとの結合状態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 4-META/MMA-TBB レジンのポリマー粉末に、炭酸カルシウム粉末を 0~80% の濃度で混合し、混合した各粉末にモノマー液とキャタリストを加えて硬化させ、硬化体の曲げ強度、象牙質に対する引っ張り強さ、水中への  $Ca^{2+}$  溶出量、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDS) 分析による硬化体表面の元素分析などを行い、 $Ca^{2+}$  が溶出し、必要な強度を有する炭酸カルシウム量を探索した。

(2) 3 種類の MMA レジンをラット大腿骨に充填し、脱灰薄切標本を作製してレジンと母床骨との接触状態、間隙部に増生した骨との接触状態を病理組織学的に評価した。

(3) 4-META/MMA-TBB レジンを骨髄液中で硬化、空气中で硬化、空気遮断下で硬化させ、ラット骨髄腔中に埋植し、試料表面への骨形成率、骨接触率などを病理組織学的に計測した。さらに、移植直後の試料表面を SEM 観察し FT-IR 分析を行った。

(4) 炭酸カルシウム粉末を 0、30、60% の濃度で混合した 4-META/MMA-TBB レジンを、円柱形に硬化させ移植試料を作製した。この

試料をラットの大腿骨の骨髄腔に移植、2、8 週後に脱灰薄切標本を作製、試料表面への骨形成量、骨との接触率を計測した。さらに標本の一部は SEM で骨と試料との結合状態を観察した。さらに、 $\alpha$ -TCP を 4-META/MMA-TBB レジンに混合し硬化させた試料を、ラット骨髄腔に移植し、試料表面への硬組織形成量と硬組織との結合状態を炭酸カルシウム含有試料と病理組織学的に比較検討した。

(5) ナノハイドロキシアパタイトを複合化したコラーゲン膜を作製、BMP を含浸させて象牙質表面に貼付、ラット大腿筋内に移植して 2、4 週後に脱灰薄切標本を作製し、象牙質吸収量と硬組織形成量を組織計測した。

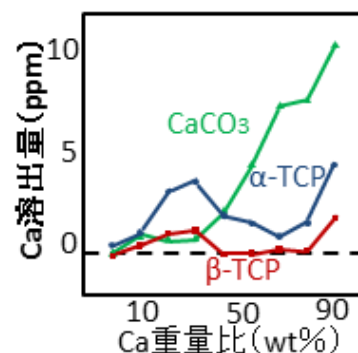
(6) ナノハイドロキシアパタイト複合化コラーゲン膜またはコラーゲン膜を 4-META/MMA-TBB レジンに接着して骨髄腔に移植し、膜吸収後のレジンと骨との接触状態を光学顕微鏡で評価した

(7) 4-META/MMA-TBB レジンに  $\alpha$  TCP、炭酸カルシウムを添加し、ラット頭蓋骨に接着、実験群は BMP 含有コラーゲン膜でレジン表面を被覆し、対照群はそのまま皮弁を縫合した。4、8 週後に脱灰薄切標本を作製して H-E 染色し、光学顕微鏡下で観察した。

(8) ビーグル犬の歯槽骨を削除して歯根を露出させ、歯根に  $\alpha$  TCP 含有 4-META/MMA-TBB レジンを接着、ナノハイドロキシアパタイト複合化コラーゲン膜に BMP を含浸させて、レジンに接着、歯肉弁を縫合した。12 週後に脱灰薄切標本を作製して H-E 染色し、病理組織学的にポケット上皮の下方増殖量、硬組織形成量、硬組織とレジンとの結合状態を病理組織学的に評価した。

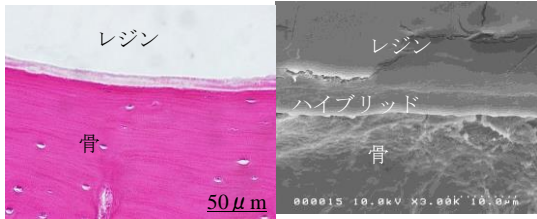
4. 研究成果

(1) 炭酸カルシウムまたは TCP 濃度が高くなるにしたがって曲げ強度は低下し、牛歯象牙質への引っ張り強さは低下、 $Ca^{2+}$  溶出量は多くなった。 $\beta$  TCP は  $\alpha$  TCP や炭酸カルシウムに比べて  $Ca^{2+}$  溶出量は少なかった。

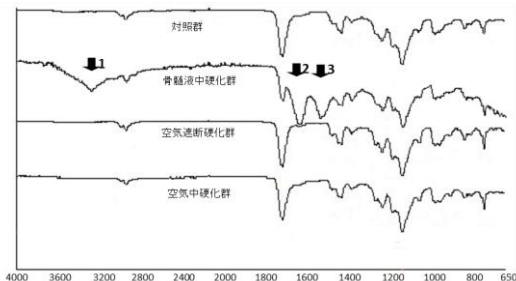
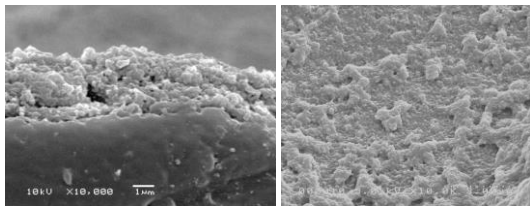


(2) 移植した 3 種類の MMA レジンの中で、4-META/MMA-TBB レジンは母床骨との接触率が約 60% で、他の 2 種の MMA レジンの約 10% に比べて有意に高かった。レジンと骨の界面には塩酸と次亜塩素酸ナトリウムに溶解しない厚さ  $5\mu m$  程度の層が観察された。

さらにレジンと母床骨との間隙に増生した骨とレジンの直接接触は、4-META/MMA-TBB レジンでのみわずかに観察された。これは TBB を重合開始剤としていることで、水分のある骨表面からラジカルが発生することが大きな要因であると考えられた。

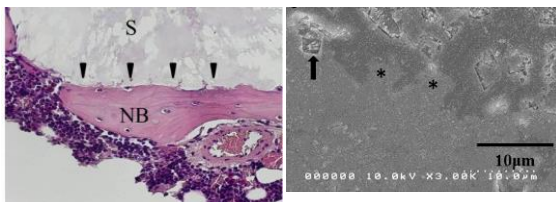


(3) 4-META/MMA-TBB レジンを骨髄液中で硬化させた試料と骨の接触率は、空气中で硬化あるいは空気遮断下で硬化させた試料と比較して有意に大きかった。骨髄液中で硬化させた試料表面には、SEM で厚さ 2-3 μm の粗造な層がみられた。この層には FT-IR 分析でアミド特性吸収帯のバンドがみられたことから、骨髄液成分がレジンにハイブリッドしていると考えられ、これが骨との接触率を向上させたと考えられた。

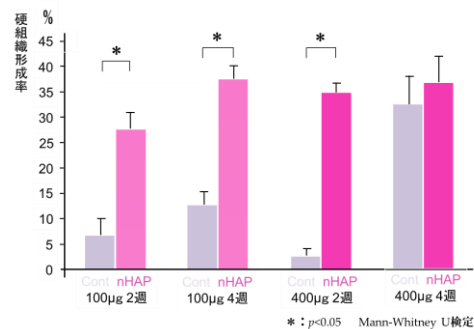
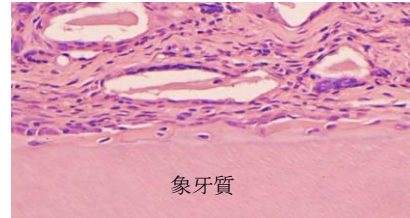


(4) 炭酸カルシウムを混合した試料と骨との接触率は、炭酸カルシウム含有量が 0% に比較して 60%の方が有意に高い値を示した。炭酸カルシウムを 60%含有する試料では、SEM 観察でレジンと新生骨との間に間隙が認められない部分が観察された。

αTCP を混和した試料では、炭酸カルシウムより試料と骨との近接が早期に生じ、直接接触も多かったことから、αTCP を混和することは、硬組織との結合をより促進させる可能性が示された。

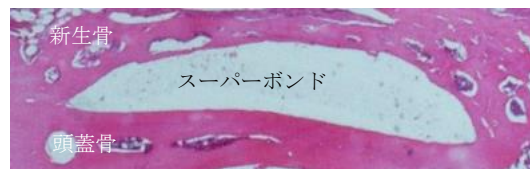


(5) 硬組織形成率は、2, 4 週後ともナノハイドロキシアパタイト複合化したコラーゲン膜群の方が高かった ( $p < 0.05$ )。象牙質吸収率は、同じ観察期間及び濃度において両群間に有意差は認められなかった。象牙質吸収率に有意差はなかったことから、ナノハイドロキシアパタイトを複合化させることによって、低濃度の BMP で硬組織形成を促進することが可能なことが示された。



(6) ナノハイドロキシアパタイト複合化コラーゲン膜およびコラーゲン膜のいずれも試料と骨が直接接している部分が観察され、両方の膜とも吸収されて骨と置換し、骨とレジンとが結合可能と考えられた。

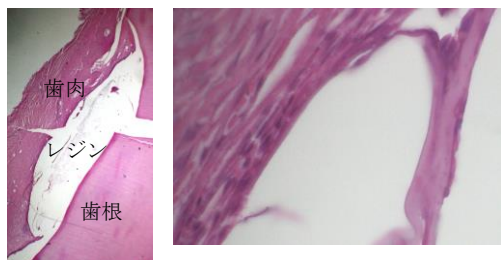
(7) 炭酸カルシウム、αTCP のいずれを含有したレジンも頭蓋骨との接着状態に差はなく、骨細胞の消失や委縮もみられなかった。実験群は 4 週でレジンと皮下結合組織との間を骨が全面被覆しており、骨とレジンが直接接触している部分も見られ、その割合は炭酸カルシウムより αTCP の方が多かった。8 週間には新生骨は成熟し緻密になっていた。対照群はレジン上面への骨形成はきわめてわずかな量で、αTCP と炭酸カルシウムは同程度であった。



(8) 歯根に接着した αTCP 含有 4-META/MMA-TBB レジン上に硬組織の形成が観察された。硬組織は歯槽骨やセメント質とは連続性がなく、無構造で 30 μm 程度の厚みであった。この硬組織は歯肉結合組織により異所性に形成されたもので、周囲に上皮組織はなく、ポケット上皮の下方増殖



を抑制するのに効果があると考えられた。しかしその量は十分ではなく、臨床応用にはさらに形成量を増加させることが必要と考えられた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- ① 洲崎真希、菅谷 勉、川浪雅光：4-META/MMA-TBB レジンの硬化条件がレジン表面への骨形成に及ぼす影響。北海道歯学雑誌、査読有、34：65-76、2014。  
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/45748>
- ② Ibara A, Miyaji H, Fugetsu B, Nshida E, Takita H, Tanaka S, Sugaya T, Kawanami M: Osteoinductivity and biodegradability of collagen scaffold coated with Nano- $\beta$ -TCP and fibroblast growth factor 2. J Nanomater、査読有、1-11、2014。  
doi:10.1155/2013/639502.
- ③ Tamagawa H, Tenkumo T, Sugaya T, Kawanami M: Effect of nano-hydroxyapatite on bone morphogenetic protein-2-induced hard tissue formation and dentin resorption on a dentin surface. Applied Surface Science、査読有、262：140-145、2012。  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.103>
- ④ Morishita T, Sugaya T, Nakatsuka M, Sunosaki M, Kawanami M: Connective tissue reaction and bone-cement contact after implantation of PMMA resin cements. J Oral Tissue Engin、査読有、10：1-12、2012。  
<http://www.jarde.jp/zasshi/e/10-1-1e.html>
- ⑤ Kosen Y, Miyaji H, Kato A, Sugaya T, Kawanami M: Application of collagen hydrogel/sponge scaffold facilitates periodontal wound healing in class II furcation defects in beagle dogs. J Periodontal Res、査読有、47：626-634、2012. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2012.01475.x
- ⑥ 逸見 優、菅谷 勉、中塚 愛、川浪雅光：炭酸カルシウムが 4-META/MMA-TBB レジン上への骨形成に与える影響。北海道

歯学雑誌、査読有、32、114-123、2012。  
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/48703>

〔学会発表〕(計5件)

- ① 柳沢 剛、菅谷 勉、中塚 愛、川浪雅光：カルシウムを混和した 4-META/MMA-TBB レジン上への骨形成。日本歯科保存学会、2013年10月25日。秋田市。
- ② 洲崎真希、菅谷 勉、中塚 愛、柳沢 剛、川浪雅光：骨髄液内で硬化させた 4-META/MMA-TBB レジン表面への硬組織形成。日本歯科保存学会、2013年6月28日。福岡市。
- ③ 井原朝子、宮治裕史、井上加菜、光銭裕太、金山和泉、吉田 崇、菅谷 勉、田中佐織、川浪雅光：ナノ $\beta$ -TCP/コラーゲンスキャホールドの作製と骨再生療法への応用。日本歯科保存学会、2012年11月22日。広島市。
- ④ 森下 長、中塚 愛、洲崎真希、菅谷 勉、川浪雅光：歯科用接着性レジンセメントの骨セメントへの応用。日本バイオマテリアル学会、2011年11月22日。京都市。
- ⑤ 井原朝子、宮治裕史、古月文志、野田坂佳伸、大谷香織、井上加菜、光銭裕太、金山和泉、吉田 崇、田中佐織、菅谷 勉、川浪雅光：ナノ $\beta$ -TCP配合コラーゲンスキャホールドの作製と評価。日本バイオマテリアル学会大会、2011年11月21日。京都市。
- ⑥ 玉川博貴、西尾啓英、中澤篤史、菅谷 勉、川浪雅光：ナノハイドロキシアパタイトが BMP-2 による硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響。日本歯科保存学会、2011年10月22日。大阪市。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/perio.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅谷 勉 (SUGAYA, Tsutomu)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：10211301

(2) 研究分担者

天雲太一 (TENKUMO, Taichi)  
北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究  
員  
研究者番号：80451425  
(平成24年7月9日付削除)

中塚 愛 (NAKATSUKA, Megumi)  
北海道大学・大学病院・助教  
研究者番号：00547648