

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20448

研究課題名(和文) フッ素系モノマーを応用した生体親和性と耐久性の高い硬質リライン材の開発

研究課題名(英文) Development of hard relining materials with high biocompatibility and durability by applying fluorine-based monomer

研究代表者

高瀬 一馬 (TAKASE, Kazuma)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：90736836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：3種の直接リライン材における動力学的性質および生体適合性に違いが認められた。周波数が高いほど、全ての材料は高い E' 、 E'' 、低い $\tan \delta$ を示したが、動力学的性質における周波数依存性はあまり大きいものではなかった。DMAから算出される T_g 値はDSCでのものより高くなる傾向にあった。DMAでは高い周波数で高い T_g 値を示した。DMAはDSCと比較し安定した T_g 値を得ることができた。DMAはDSCよりも常温重合レジンである直接リライン材のキャラクタリゼーション決定に有用であると考えられる。直接法と間接法では直接法の方が細胞毒性を示す傾向にあった。フッ素系モノマーは低い細胞毒性を示した。

研究成果の概要(英文)：Differences were found in the dynamic mechanical properties and biocompatibility of the three direct relining materials. As the frequency was higher, all the materials showed higher E' , E'' , and lower $\tan \delta$, but the frequency dependence in the dynamic mechanical properties was not very large. T_g values calculated from DMA tended to be higher than those in DSC. DMA showed high T_g value at high frequency. Compared with DSC, DMA was able to obtain a stable T_g value. It is thought that DMA is more useful for determining the characterization of the direct relining materials which are room temperature polymerization resin than DSC. In the direct and indirect methods, the direct method tended to show cytotoxicity. The fluorinated monomer showed low cytotoxicity.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：リライン材 動力学的性質 細胞毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、義歯使用者数は増加する傾向にあると考えられる。在宅医療が急増する中、歯科の分野でも訪問診療の数は増え、十分な治療器具がない状況での診療を余儀なくされると考えられる。そのような環境下であっても、直接リライン法は特殊な器具を必要とせず患者の QOL 向上を達成できる材料と考えられる。しかしながら、本材の問題点は MMA をモノマーとするものが多く、その細胞毒性に関しては種々の議論があるところである。さらに、その細胞毒性の評価法は ISO に準じたものが多く、多層の細胞層で構成されている生体の口腔粘膜を評価するにはやや疑問が残るところである。

2. 研究の目的

国内外において、硬質リライン材の細胞毒性に関する研究は数多く行われている。前述したとおり、その多くは ISO に準じ単層細胞での評価を行なっている。また、多層で行われている研究はその煩雑性からテクニカルディペンデンスが大きく、広く一般的に使用されるようなものではない可能性が考えられる。

我々は積層された線維芽細胞を製作することから実験を開始し、市販製品での細胞毒性について学会発表等を行ってきた。直接リライン材のモノマーである MMA は細胞毒性があることは前述の報告からも明らかである。直接法は間接法と違い口腔内にダイレクトにリライン材が入っていくため、その毒性はおおいに口腔粘膜に影響を与えるであろう。そもそも MMA は残留モノマーとして口腔内に溶出してくるため、いかに残留モノマーを少なくするかという研究も多くされている。この残留モノマーには毒性があると多くの報告が述べているが、その評価法はほぼ ISO10993-5 に準じて行われている。その代表例として挙げられるのは XTT assay と呼ばれるものではないだろうか。これはテトラゾリウム塩の還元により生細胞を解析する発色検出法で、洗浄や細胞の回収といったステップを必要としないため簡単な操作で細胞増殖能を解析可能である。細胞毒性試験を行うにあたり、重要事項の一つとして、実験系列が簡素で誰でも同じような結果が出せるようなものである必要がある。その意味では、この試験法は理にかなっていると思われる。

以上のことから、本科学研究補助金により積層培養を用いた市販硬質リライン材の細胞毒性についての研究等を行い、現行の材料よりも毒性が少ない新規リライン材の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

細胞毒性の評価

単層培養・積層培養での評価法の決定。

ヒト歯肉線維芽細胞を使用し、現行の市販硬質リライン材の細胞毒性について評価を行う。同時に単層培養、積層培養を併用しその評価を行う。

積層培養に関してはその作成法についても評価を行う。

評価法として2種の評価を行う。

Cell Analyzer(MUSE, Merck Millipore, 現有)

フィルター吸光マイクロプレートリーダー (Multiskan FC, Thermo, 現有)

モノマー (MMA, PMMA, TFMA, IBMA, 1,6-HDMA)

溶出成分の評価

硬質リライン材の溶出物質の評価。

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP5050, 島津製作所製, 現有)

高速液体クロマトグラフ (Class-VP, 島津製作所製, 現有)

レオロジー学的評価

・動的粘弾性的性質と経時的変化の測定
動的粘弾性測定装置 (レオバイロン DDV-25FP-W, エー・アンド・ディ社製, 現有)

・硬化挙動の測定

オシレーティングレオメーター (歯科材料用レオメーターB型, セイキ社製, 現有)

・吸水量の測定

・床用レジンとの接着性の検討

島津小型卓上試験機 (EZtest, 島津製作所製, 現有)

(Murata et al. Dynamic viscoelastic properties and the age changes of long-term soft denture liners. Biomaterials.21,1421-1427,2000)

治癒促進物質の評価

各種サイトカインの細胞への影響

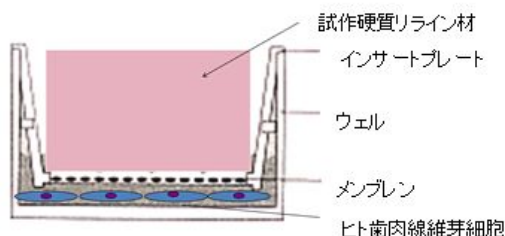
各種サイトカイン特に b-FGF に着目し、実験をすすめる。ヒト歯肉線維芽細胞およびヒト歯肉上皮細胞を培養し、細胞実験を行う。

当講座には一連の細胞培養に関する設備があり、その使用方法に関しては既に習得済みである。

試作硬質リライン材の細胞毒性試験

試作硬質リライン材の細胞毒性試験を行う。Cell Analyzer(MUSE, Merck Millipore, 現有)

フィルター吸光マイクロプレートリーダー (Multiskan FC, Thermo, 現有)



ヒト歯肉線維芽細胞を単層・積層培養後、セルカルチャーインサート(上図)を用いて細胞毒性試験を行う。細胞生存率はWST法, cell viability法により算出し, 相対評価を行っていく。毒性試験において評価方法に差異がない場合には, ISO基準での評価を行う。本実験の重要事項である新規モノマーの開発においては, 様々な方面, 例えば工学部等の意見を取り入れながら, 積極的に意見交換を行っていく。

試作硬質リライン材の臨床評価
被験者は義歯粘膜面に不適合を認める義歯装着患者)
アンケートによる患者満足度の評価(VASを用いる)
同一術者による口腔粘膜および物性の評価
コピーデンチャーを用いた義歯粘膜面の物性評価

4. 研究成果

これまでの報告より材料における成分の違いは, 機械的特性, 操作性, 耐久性, 吸水性, 成分の溶出量および義歯床に対する接着強さなどに大きく影響していると考えられていた。このうち機械的特性の試験方法として, 3点曲げ試験, スープ硬度試験, 動力学的試験などが挙げられる。しかしながら, 特に動力学的試験において計測されるガラス転移温度(Tg)に関するリライン材の研究はほとんど報告されていない。Tgの研究が進めば, その機械的物性に变化を及ぼすことが可能となり, 義歯の破折を減少させることが可能になるかもしれない。このように, ガラス転移温度は材料開発の観点からも重要なものであると考えられる。以上のことより, 測定方法がガラス転移温度の算出に影響するという仮説のもと, 動力学的試験(DMA)および示差走査熱量測定(DSC)を用い, 硬質リライン材のガラス転移温度の評価法について検討した。

Material	Batch no	Manufacturer	Composition*	
			Powder	Liquid
Kuraribase	Powder: 00076A, Liquid: 00026A	Kuraray Noritake Dental Inc., Tokyo, Japan	Poly(ethyl methacrylate)	Fluorinated monomer, Other methacrylate monomer
New Truliner	Powder: 1205-188, Liquid: 1204-150	The Henry J. Bosworth Co, Skokie, IL, USA	Poly(ethyl methacrylate)	Iso-butyl methacrylate, Dibutyl phthalate
Rebaron	Powder: 1211021, Liquid: 1106011	GC Corp., Tokyo, Japan	Poly(methyl methacrylate)	Methyl methacrylate, Dibutyl sebacate

*Composition as given by manufacturers and Reference 4)

Table1. に示す市販硬質リライン材についての評価を行った。我々の研究で, 生体適合性が他のリライン材に比べよかったフッ素含有モノマーを使用したクラリベース, iBMA含有したNew Truliner, 歯科で最も使用されているMMAを主成分としたモノマーを含有するリペロンを使用した。

Kuraribaseの温度変化によるE', E'', tan δの値をFig.1に示す。それぞれ0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10Hzでの測定を行なっている。E'では50での急激な減少が認められ, E''では60-70で急激に減少している。E', E''の両値は周波数が高くな

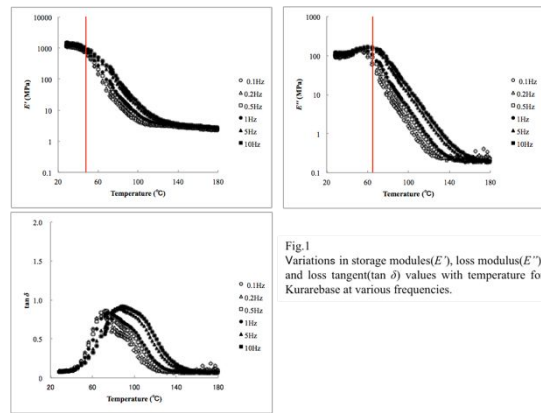


Fig.1 Variations in storage modulus(E'), loss modulus(E''), and loss tangent($\tan \delta$) values with temperature for Kuraribase at various frequencies.

ればなるほど高い値を示す傾向にあった。また, tan δ値は最大値となるまでは温度上昇と共に上昇し, そこから減少している。ガラス転位温度と呼ばれている tan δ値の最大値は, それぞれの周波数で70, 73, 77, 85, 89となっている。Tgは周波数の増加につれグラフ上で右方に移動する傾向にあると思われる。

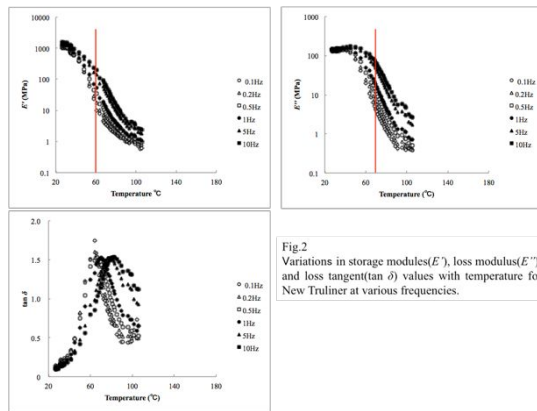


Fig.2 Variations in storage modulus(E'), loss modulus(E''), and loss tangent($\tan \delta$) values with temperature for New Truliner at various frequencies.

先程と同様に New Trulinerの温度変化によるE', E'', tan δの値をFig.2に示す。E'では60での急激な減少が認められ, E''では70-80で急激に減少している。E', E''の両値は周波数が高くなればなるほど高い値を示す傾向にあった。また, tan δ値は最大値となるまでは温度上昇と共に上昇し, そこから減少している。tan δの最大値は, それぞれの周波数で62-84となっている。Tgは周波数の増加につれグラフ上で右方に移動する傾向にあると思われる。

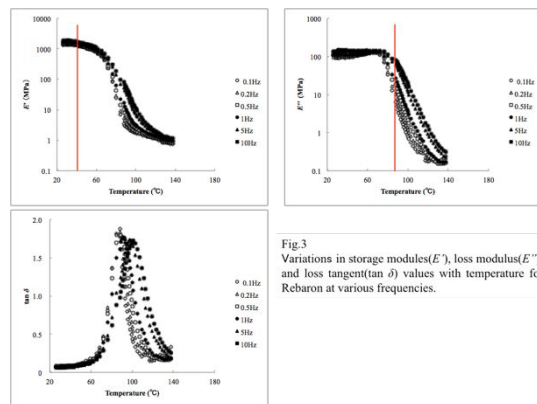


Fig.3 Variations in storage modulus(E'), loss modulus(E''), and loss tangent($\tan \delta$) values with temperature for Rebaron at various frequencies.

さらに Rebaron の温度変化による E' , E'' , $\tan \delta$ の値を Fig.3 に示す. E' では 40 での急激な減少が認められ, E'' では 90-100 で急激に減少している. E' , E'' の両値は周波数が高くなればなるほど高い値を示す傾向にあった. また, $\tan \delta$ 値は最大値となるまでは温度上昇と共に上昇し, そこから減少している. $\tan \delta$ の最大値は, それぞれの周波数で 86-99 となっている. T_g は周波数の増加につれグラフ上で右方に移動する傾向にあると思われる.

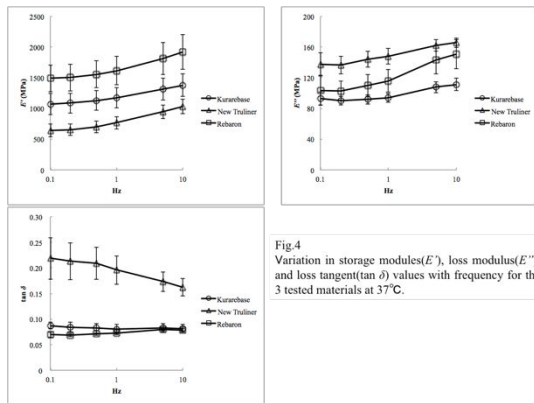


Fig.4 Variation in storage modulus(E'), loss modulus(E''), and loss tangent($\tan \delta$) values with frequency for the 3 tested materials at 37°C.

37 での異なった周波数における E' , E'' , $\tan \delta$ を Fig.4 に示す. E' , E'' は周波数の増加につれ増加している一方で $\tan \delta$ は減少している. 37 で周波数が高くなるほど, 高い E' , E'' と低い $\tan \delta$ を得たが, これは剛性が高いことを示している. 周波数が高いとより弾性的に, 周波数が低いとより粘性傾向を示すポリマー独特の特性によるものであると考えられる. 以前我々の研究で軟質裏装材の研究を行った際は, 硬質のものよりも周波数依存性が大きい傾向であった. これは架橋度や重合度によるものであると考えられる.

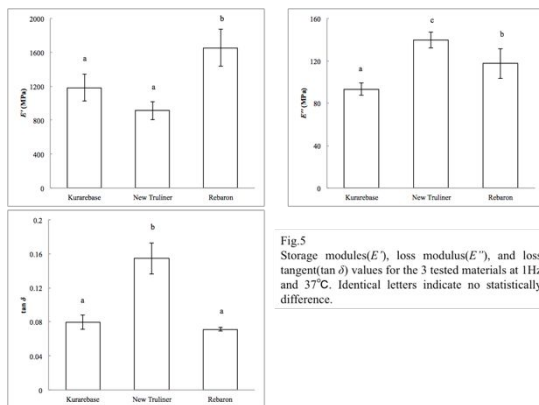


Fig.5 Storage modulus(E'), loss modulus(E''), and loss tangent($\tan \delta$) values for the 3 tested materials at 1Hz and 37°C. Identical letters indicate no statistically difference.

1Hz, 37 での E' , E'' , $\tan \delta$ を Fig.5 に示す. E' の値は E'' の値に比べ有意に大きいものとなった. Rebaron が最も高い E' 値を得たが, Kurarebase と New Truliner の間では有意差は見られなかった. E'' では New Truliner, Rebaron, Kurarebase の順で有意差を持って値が大きくなった. さらに New Truliner は最も大きい $\tan \delta$ 値を得ていたが, kurarebase と Rebaron の $\tan \delta$ には有意差がな

かった. 1Hz, 37 での E' , E'' , $\tan \delta$ は最も口腔内を模倣しているものと考えられている. 高い E' と低い $\tan \delta$ を持つ Rebaron は Kurarebase や New Truliner よりも剛性がある. つまり硬度が高い材料と言える. 一方で New Truliner は $\tan \delta$ 値が高い. これは高い E'' と低い E' によるものである. 良い意味では粘性を持つ New Truliner は咀嚼時のショックを吸収できると考えられるが, 逆を返せばたわみ易く変形しやすい. これは本剤に可塑剤である dibutyl phthalate が含有されていることと polymethyl methacrylate よりも低いガラス転移温度を有する polyethyl methacrylate が粉末の主成分として使用されているためと推測される. さらに, モノマーのタイプおよび残留モノマーの量なども影響しているものと考えられる.

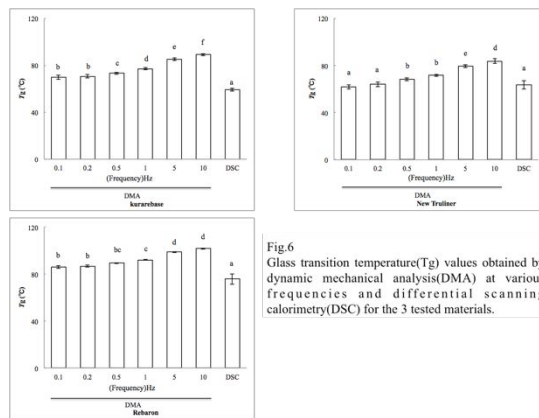


Fig.6 Glass transition temperature(T_g) values obtained by dynamic mechanical analysis(DMA) at various frequencies and differential scanning calorimetry(DSC) for the 3 tested materials.

DMA と DSC での T_g の比較を Fig.6 に示す. Rebaron は kurarebase よりも高い T_g 値をしめし, さらには New Truliner よりも全ての周波数において高い値を示した. DSC での値も同じような傾向にある. DSC での値は DMA よりも低い値が出る傾向にある. DMA による T_g は, 0.1Hz および 1Hz で, DSC よりも 2-11 および 8-18 高くなる傾向にあった. これは, DMA は機械的性質により DSC は熱量から算出されるという検出方法の違いによるものであると考えられる. 高分子材料の $\tan \delta$ により算出された T_g 値は膨張率測定や熱量計により算出される T_g より高くなるという報告もあり, これらの所見と同様の傾向であった. さらに本研究から, DSC により算出される T_g 値の標準偏差, つまりばらつきは DMA よりも大きかった. これらのことから, DMA は DSC と比較して安定した T_g 値を得られることがわかった. さらに DMA はガラス転移温度のみならず, 機械的性質も同時に測定することができる. 以上のことより, 硬質リライン材の材料学的キャラクターには, DSC よりも DMA が適していることが示唆された.

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1件)

1. Evaluation of glass transition temperature and dynamic mechanical properties of autopolymerized hard B11direct denture relines resins. Takase K, Watanabe I, Kurogi T, Murata H
Dental Materials Journal 34, 211-218, (査読有), 2015.

〔学会発表〕(計12件)

1. Will the conventional removable denture be truly unnecessary treatments for multi-tooth coloboma or edentulous patients? - As a prosthodontist - Takase K
TIDC (Tanta International Conference 2017) (Tanta Uni. Egypt)
<http://ti-dc.org>
2. 新規開発された即効性常温重合レジン
の動力学的性質およびラジカル発生量
の検討
高瀬一馬, 黒木唯文, 山田真緒, 吉田
和弘, 村田比呂司
日本歯科理工学会誌 2017 p311
(2017年10月14-15日学会発表)
3. I-BMA と ATBC を用いた光重合型軟質リ
ライン材の開発 硬化挙動についてー
森智康, 高瀬一馬, 江越貴文, 村田比
呂司
日本歯科理工学会誌 2017 p159
(2017年4月15-16日学会発表)
4. 歯科用レジンモノマーによる破骨細胞
分化に及ぼす影響
稲光宏之, 高瀬一馬, 黒木唯文, 村田
比呂司
日本補綴歯科学会誌 2016 p47 (2016
年7月9日学会発表)
5. 新規開発された暫間修復用レジンの動
力学的性質
廣沢恵介, 高瀬一馬, 吉田和弘, 黒木
唯文, 中村康司, 村田比呂司
日本補綴歯科学会誌 2016 p54 (2016
年7月9日学会発表)
6. 積層培養したヒト線維芽細胞およびヒ
ト表皮角化細胞に及ぼす義歯安定剤の
影響
山田真緒, 高瀬一馬, 黒木唯文, 三海正
人, 村田比呂司
日本補綴歯科学会誌 2016 p53 (2016
年7月9日学会発表)
7. 市販ダイナミック印象併用型リライン
材のレオロジー的性質 練和直後の硬
化特性についてー

森智康, 高瀬一馬, 吉田和弘, 黒木唯
文, 村田比呂司
日本歯科理工学会誌 2016 p99
(2016年4月16-17日学会発表)

8. 細胞層の違いによる生体適合性試験へ
の影響について
山田真緒, 高瀬一馬, 黒木唯文, 村田
比呂司
日本義歯ケア学会抄録集 2016 p15
(2016年1月24日学会発表)
9. 新規開発された速硬性常温重合レジン
の摩耗性および表面性状の検討
廣沢恵介, 高瀬一馬, 田中利佳, 吉田和
弘, 黒木唯文, 村田比呂司
日本歯科理工学会誌 2015 p357
(2015年10月3-4日学会発表)
10. 新規開発された速硬性常温重合レジン
の動力学的性質について
廣沢恵介, 高瀬一馬, 吉田和弘, 黒木
唯文, 村田比呂司
日本歯科理工学会誌 2015 p176
(2015年4月11-12日学会発表)
11. 歯科用レジンモノマーによる破骨細胞
分化に及ぼす影響と抑制経路解析への
試み
稲光宏之, 高瀬一馬, 黒木唯文, 坂井
詠子, 岡本法邦彰, 筑波隆幸, 村田比
呂司
若手補綴研究会抄録集 2015
(2015年3月21日学会発表)
12. 義歯安定剤がヒト歯肉線維芽細胞の及
ぼす影響
山田真緒, 高瀬一馬, 黒木唯文, 村田
比呂司
日本義歯ケア学会抄録集 2015 p5
(2015年1月24日学会発表)

〔図書〕(計2件)

1. シリコーンゴム印象材を用いた精密印
象採得の注意点
高瀬一馬, 村田比呂司
デンタルダイヤモンド 42(12),
139-141, 2017.
2. 総論・理論編 3 義歯の維持・安定不
良の原因と対策
村田比呂司, 高瀬一馬
村田比呂司, 馬場一美 編, 補綴臨床
別冊 なぜ壊れ, どう直すのか
DENTURE REPAIR 部分床義歯・全部床義
歯・インプラントオーバーデンチャー,
42-51, 2015.

〔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

高瀬 一馬 (TAKASE, Kazuma)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・

助教

研究者番号：90736836

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし