

令和元年5月27日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04954

研究課題名(和文) 仮像形成相転移を利用したエナメル質類似組織の構築

研究課題名(英文) Artificial enamel induced by phase transformation of amorphous nanoparticles

研究代表者

小沼 一雄 (Kazuo, Onuma)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：70356731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アモルファスリン酸カルシウムのナノ粒子(直径80nm以下)を圧縮成形基板とし、それをリン酸カルシウム溶液に浸漬するだけの簡単な手法で、基板上に人工エナメル質の厚層(数10ミクロン以上)を迅速形成することに成功した。形成した層は、太さ数十～数100nm、長さ数ミクロンのアパタイトナノロッド結晶が一方向に配列した自然歯エナメル質と全く同等の組織からなり、結晶の平均Ca/Pモル比もエナメル質アパタイトに酷似していた。また、基板として用いたアモルファスナノ粒子は相転移によりアパタイトナノ結晶へと変化するが、その形態及び化学組成は自然歯象牙質と同等であった。本手法により、歯の迅速再生の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の虫歯治療法は、う蝕領域を削って高分子(レジン)を充填するものである。同手法の最大の欠点は、充填物と歯を構成するアパタイト結晶との物性の相違により、接着部分に経時的に隙間が生じて二次う蝕が発生することである。この問題を根本的に解決するには、修復領域にエナメル質あるいは象牙質と同等の組織を作るしかない。我々はアモルファスリン酸カルシウムナノ粒子を用いて、エナメル質および象牙質類似組織を迅速形成することに初めて成功した。

本手法は細胞を全く使用しないため、極めて安価且つ簡便にう蝕部分を修復できる。ヒトの歯と完全な同等物による修復は「歯の再生」であり、今後の歯科治療を根本的に変革する可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Amorphous calcium phosphate nanoparticles (< 80 nm in size) were synthesized to use for regeneration of human tooth enamel and dentin. Nanoparticles were compression-molded to prepare a substrate, which was immersed into the calcium phosphate solution at 37°C. Immersion after ~20 h, thick calcium phosphate layer (more than a few 10 micron-meter) formed on the substrate. The layer consisted of accumulated apatite nanorod crystals (a few 10 to 100 nm thick and a few micron-meter long), which were oriented to c-axis perpendicular to the substrate surface. This morphology was essentially the same as that of human tooth enamel. The average Ca/P molar ratio of each crystal was also close to that of human enamel apatite.

The amorphous nanoparticles in the substrate were transformed into the apatite nano-crystals after immersion. The morphology and chemical composition of apatite nano-crystals were consistent to those of human dentin, suggesting the possibility of rapid tooth regeneration.

研究分野：結晶成長学

キーワード：人工エナメル質 アモルファスナノ粒子 圧縮成形基板 アパタイト 相転移 選択的方位結晶成長
人工象牙質 リン酸八カルシウム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯はヒトの生命維持に必要な食物の咀嚼を担う重要器官であり、欠損によってその能力が喪失すると、種々の内蔵疾患や痴呆を引き起こす原因になる(Simons, Lancet 1996)。近未来の超高齢化社会において、ヒトが高い QOL を維持して活動的に過ごすためには、十分な数の自然歯を保持して食物を摂取することが必須である。しかし、細胞による代謝がないヒト永久歯のエナメル質は、一度欠損すると物理的修復を行う以外に再生の手段はない。歯科分野で通常使用される修復材は人体に無害な貴金属(金など)、あるいは有機高分子(コンポジットレジン)であるが、これらの物質はエナメル質の主成分であるアパタイト結晶と熱膨張率や弾性率が大きく異なるため、経時的に本来のエナメル質との間に空隙を生じて、二次虫歯発生の原因になる。この問題は歯科治療の根本に関わるが、未だ解決されていない。理想的には、高結晶性アパタイト群を同一結晶方位で最密充填させてヒトエナメル質類似のマクロ構造を欠損部に形成すれば、歯は完全修復可能である。しかし、アパタイトの極端に遅い結晶成長速度や低結晶性などが障壁になり、十分な量の結晶群を患部に直接形成することはできていない。今日までに、欠損部が微小な初期虫歯を対象とした場合 (Yamagishi *et al.* Nature 2005, Li *et al.* J. Mat. Chem. 2007, Fan *et al.* Biomaterials 2009) を除き、人工的にエナメル質マクロ構造を再現できた研究例は皆無である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト歯エナメル質類似構造、すなわちナノメートルからミクロンメートルサイズの高結晶性アパタイトが c 軸方向に配向して密充填した組織、を *in vitro* で迅速再現する技術を開発することにある。また、開発した技術を歯科臨床現場で実際の虫歯治療に応用するため、乗り越えるべきいくつかの障壁(例えば象牙質がう蝕された C2以上の虫歯への応用展開)への対応も含めて、エナメル質だけでなく象牙質類似構造の再現も視野に入れる。

3. 研究の方法

課題提案当初は、アパタイト結晶の前駆体であるリン酸八カルシウム(OCP)結晶を育成し、その結晶基板の上にアパタイトが仮像形成することを利用して、一方向配列したエナメル質類似アパタイト結晶群を形成する計画を立てた。しかし、その後の研究により、アモルファスリン酸カルシウム(ACP)ナノ粒子からのアパタイト結晶への相転移を利用すると、OCP を基板とした場合より 1000 倍以上速くアパタイト結晶が形成することが判明した。そこで ACP ナノ粒子を 20MPa で圧縮成形して基板化し、それを擬似生理環境場(37°C)でリン酸カルシウム溶液に浸漬する簡便なプロセスで、エナメル質類似構造の再現を試みた。ACP ナノ粒子は、適宜濃度の塩化カルシウム溶液とリン酸カリウム溶液の混合で形成可能である。

4. 研究成果

(1)人工エナメル質の迅速形成。ACP 基板を 37°Cのリン酸カルシウム溶液に約 20 時間浸漬するだけで、基板の上に c 軸配向したアパタイトナノロッド(幅 100 nm 程度、長さ数 μm)の密充填構造を形成することに成功した(図 1a-c)。この時のアパタイト層厚は 20-30 μm であり、擬似生理環境場で形成された過去の如何なるアパタイト結晶成長速度よりも、約 1 桁速い。また、X 線回折測定及び透過電子顕微鏡観察(電子線回折測定を含む)の結果、アパタイト層は極めて結晶性が高く(図 2a-c)、ヒト歯エナメル質に酷似することが明らかになった。更に、エネルギー分散 X 線分光分析による化学組成解析から、成長層の平均 Ca/P モル比は 1.64 ± 0.02 で、エナメル質アパタイトの化学組成と非常に良く一致することがわかった。成長層の平均 Young 率と平均硬度もそれぞれ $63.4 \pm 9.2\text{GPa}$ 、 $2.87 \pm 0.41\text{GPa}$ で、自然歯エナメル質の機械的特性に匹敵した。

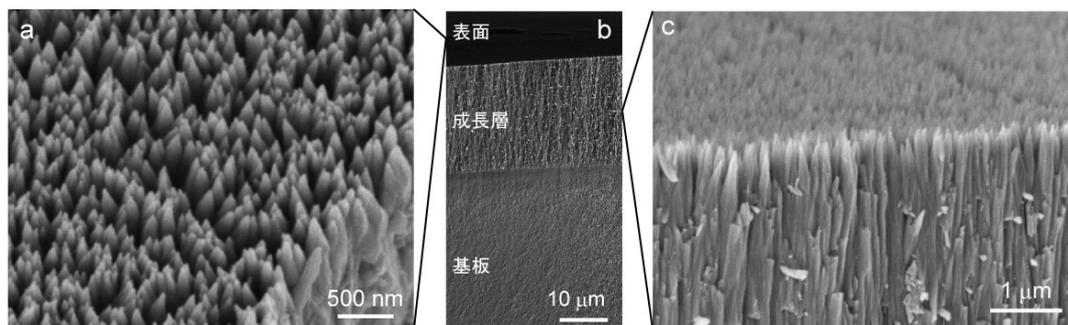
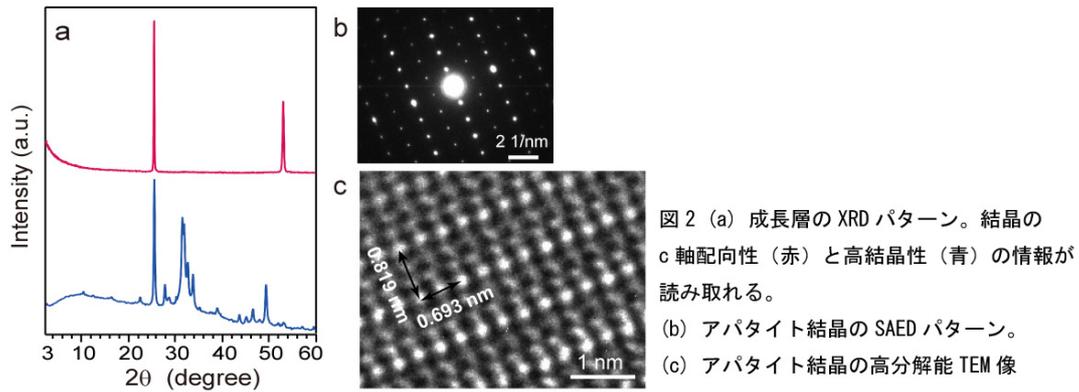


図 1 (a) 成長層の表面鳥瞰 SEM 像 (b) 断面 SEM 像 (c) 成長層の断面拡大 SEM 像



(2) 人工エナメル質を構成する個々のアパタイト結晶のサイズコントロール。通常、結晶のサイズを変化させるには、結晶が成長する環境場(今回の場合はリン酸カルシウム溶液の組成)を劇的に変える必要がある。しかしACP基板を利用したエナメル質形成法では、基板成形時の圧縮圧力を変えるだけで「同一化学組成の溶液であってもアパタイト結晶のサイズを任意にコントロールできる」ことが明らかになった。基板成形圧力を5MPaから60MPaに増加すると、人工エナメル質層中のアパタイト結晶の太さは約1/3になる(図3)。この知見は、人工エナメル質の機械的強度を(歯の修復部位に応じて)コントロールしなくてはならない際に、極めて重要になる。

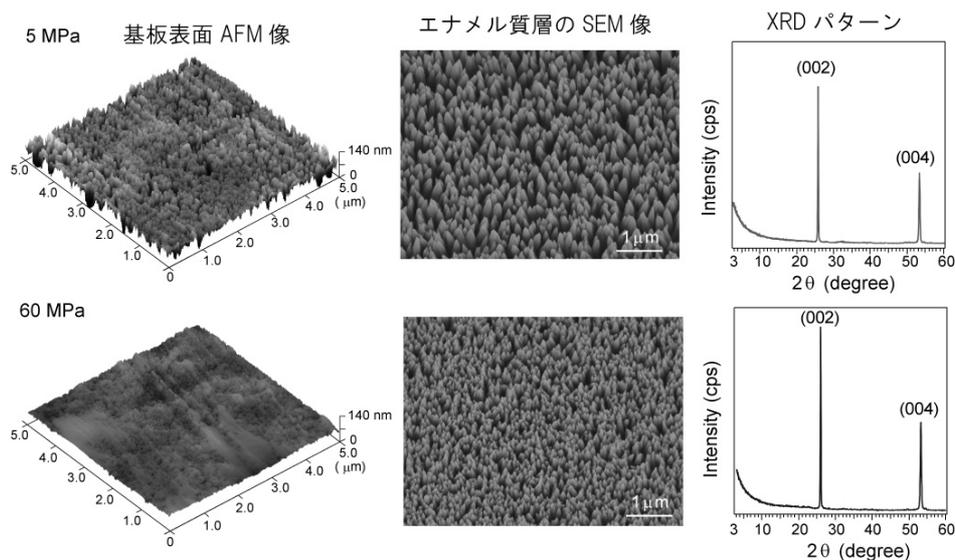


図3 ACP基板成形圧力の変化による人工エナメル質層の変化。圧力が12倍増加すると結晶太さは約1/3になる。

(3) 人工象牙質の迅速形成。ACP基板をリン酸カルシウム溶液に浸漬すると、「基板自体が象牙質様アパタイトに変化する」ことが判明した。図4は象牙芽細胞から形成したアパタイト結晶群(a)と、ACP基板中のナノ粒子がアパタイトに相転移した後(b)の比較図である。両者共に、ナノファイバー状のアパタイト結晶(図中の白実線矢印)とナノ粒子状アパタイト結晶(図中の白破線矢印)がランダム方位で集合した形態を呈していることがわかる。細胞経由で象牙質様アパタイト結晶を作成するためには2週間程度必要であるが、ACPナノ粒子からの相転移を利用した場合には僅か20分で完了する。ヒト歯象牙質にはアパタイト以外に多量のコラーゲンが含まれるが(約60%)、これに対してはACPナノ粒子を作成する際に、溶液中にコラーゲンを適宜混在させれば良いことも明らかになった。すなわち、ACPナノ粒子を圧縮成形して基板化する今回の手法で、エナメル質から象牙質まで全て再生可能ことが示された。この結果は、虫歯治療法が今後劇的に変わる可能性を意味する。

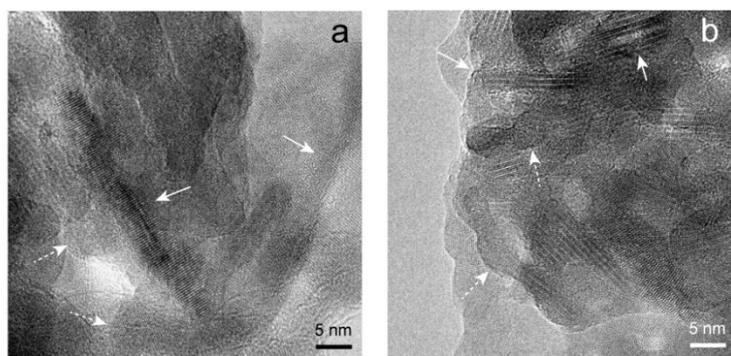


図4 豚歯髄から抽出した細胞を象牙芽細胞に分化した系から析出したアパタイト結晶群 (a) と ACP ナノ粒子が相転移により変化したアパタイト結晶群 (b)。両者は同一の形態を取る。白実線矢印はファイバー（ロッド）状結晶で、白破線矢印は粒子状結晶を示す。

(4) 高機能代替骨材料創製への応用。ACP ナノ粒子圧縮成形基板の開発によって研究が予想以上に進展したため、人工エナメル質形成に用いた手法を高機能人工骨材料創製へと応用展開した。人工骨材料として長い実績と安全性を持つものは β 型リン酸三カルシウム(β -TCP)であるが、OCP 結晶が破骨細胞及び骨芽細胞の骨新生サイクルに極めて高い効率を持つことが近年の研究で示されている。しかしOCP 結晶は、骨代替材として使用可能なサイズのバルク体を作成するのが極めて困難であり、その準備に多大な時間と労力を要する。我々は、代替骨材料と細胞との反応は材料表面のみで良いことに注目し、信頼性のある β -TCP 基板の上に OCP 結晶層をコーティングするアイデアを得た。具体的には、人工エナメル質作成時と同様に β -TCP 粒子を圧縮成形基板とし、OCP 結晶成長に好適なリン酸カルシウム溶液に浸漬する。この手法により、世界で初めて β -TCP 上に OCP 結晶層を形成することに成功した。この時、成長した OCP 結晶の構造は基板粒子のサイズによって大きな影響を受ける。特に平均粒子サイズが 500 nm を下回ると、[100]方向に軸長が変調されたリン酸欠損 OCP 結晶が形成することが判明した。このタイプの OCP は骨細胞特性が特に優れることがわかっているが、形成過程をコントロールすることは従来不可能であった。今回、 β -TCP 粒子のナノ化と圧縮成形基板化の手法により、この壁を突破した。更に透過電子顕微鏡観察の結果、OCP の構造が変調を受ける理由は、基板と OCP の間に buffer 層として薄いアパタイト層が形成するためと判明した(図 5a-c)。

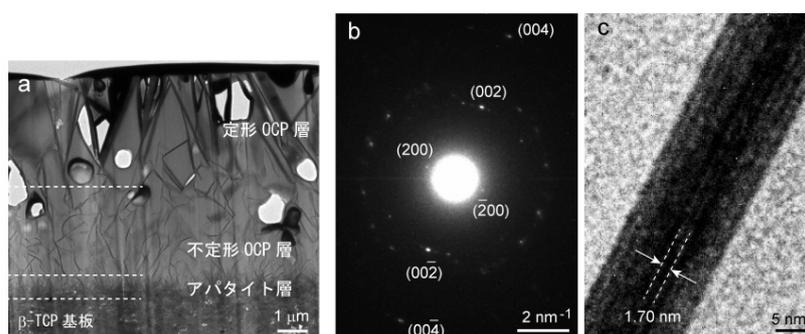


図5 (a) β -TCP ナノ粒子基板上に成長した OCP 結晶層の断面 TEM 像。不定形 OCP 層中において結晶構造と化学組成の大きな変調が起こる。(b) 不定形 OCP 層中の結晶の SAED パターンと (c) 結晶の高分解能 TEM 像。OCP [100] 方向の軸長が収縮する。

5. 主な発表論文等

(1) “Potential for drug repositioning of midazolam for dentin regeneration”

T. Karakida, K. Onuma, M. M. Saito, R. Yamamoto, T. Chiba, R. Chiba, Y. Hidaka, K. Fujii, H. Kawahara, Y. Yamakoshi, *International Journal of Molecular Science* vol.20 (2019) 670–689.
DOI: 10.3390/ijms20030670

- (2) “Octacalcium phosphate overgrowth on β -tricalcium phosphate substrate in metastable calcium phosphate solution”
M. Iijima, K. Onuma, *Proceedings of Biomineralization XIV, Biomineralization-From Molecular and Nano-structural Analyses to Environmental Science* (2019) 267-272.
<https://www.springer.com/us/book/9789811310010>
- (3) “Roles of fluoride on octacalcium phosphate and apatite formation on amorphous calcium phosphate substrate”
M. Iijima, K. Onuma, *Crystal Growth & Design* vol.18 (2018) 2279-2288.
DOI: 10.1021/acs.cgd.7b01717
- (4) “Particle-size-dependent octacalcium phosphate overgrowth on β -tricalcium phosphate substrate in calcium phosphate solution”
M. Iijima, K. Onuma, *Ceramics International* vol.44 (2018) 2146-2157.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.10.167>
- (5) “Nanoparticles in β -tricalcium phosphate substrate enhance modulation of structure and composition of an octacalcium phosphate grown layer”
K. Onuma, M. Iijima, *CrystEngComm* vol.19 (2017) 6660-6672.
DOI: 10.1039/c7ce01563a
- (6) “Artificial enamel induced by phase transformation of amorphous nanoparticles”
K. Onuma, M. Iijima, *Scientific Reports* vol.7 (2017) 2711-2720.
DOI:10.1038/s41598-017-02949-w

[雑誌論文] (計 6 件)

- (7) 小沼一雄、伊中浩治、杉本泰伸、“特異的アルカリ金属塩類が起こすリゾチームの結晶化-時間分割 X 線小角散乱法による機構検証” 第 7 回あいちシンクロトロン光センター事業成果発表会(2019)
- (8) K. Onuma, M. Iijima, “Oriented hydroxyapatite nanorod array on amorphous nanoparticle substrate”
Biomineralization XIV(2017).
- (9) M. Iijima, K. Onuma, “Octacalcium phosphate overgrowth on β -tricalcium phosphate substrate in metastable calcium phosphate solution”
Biomineralization XIV(2017).

[学会発表] (計 5 件、その他 2 件 (国内学会 1、国際学会 1) を含む)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：アモルファスナノ粒子の相転移を利用した人工エナメル質の迅速形成技術開発

発明者：小沼一雄

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：通常出願

番号：PCT/JP2018/012146

出願年：2018 年

国内外の別： 国外(WIPO)→国内へ移行(2019 年)

名称： β -TCP 基板上への OCP 結晶層の作成及び成長層の構造と組成の制御方法

発明者：小沼一雄

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：通常出願

番号：PCT/JP2018/036409

出願年：2018 年

国内外の別： 国外(WIPO)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山越康雄

ローマ字氏名：Yasuo Yamakoshi

所属研究機関名：鶴見大学歯学部

部局名：生化学講座

職名：教授

研究者番号（8桁）：20182470

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：飯島まゆみ

ローマ字氏名：Mayumi Iijima