

令和元年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11538

研究課題名(和文) 生体内でレジン上に歯周組織形成を実現！～接着治療の予知性向上を目指して～

研究課題名(英文) Create periodontal tissue formation on composite resin! for improvement of reliability of bonding treatment

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：レジン表面に歯周組織形成を目指し、レーザー援用バイオミメティック法(LAB法)を用いたレジン表面の改変を検討した。LAB法を応用すると、レジン表面にマイクロスケールの板状結晶よりなるCaP析出物の形成が認められた。その後擬似体液に浸漬すると、析出したCaP上に緻密なアパタイト層が形成された。レジン表面のCaPと生理活性物質であるフィブロネクチン(Fn)を複合化処理すると、CaP-Fn処理した試料は、CaP処理のみ、及び処理なしの試料と比較して、明らかに多数の細胞が付着していた。以上より、レジン表面へLAB法を応用すれば、表面の生体適合性を改良し、新しい歯周組織再生の方法となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

垂直歯根破折接着治療、穿孔部封鎖処置等の予知性を向上させることを目的として行った。レーザー援用バイオミメティック法により、修復用レジンの表面を改良し、細胞を誘導し、レジン上に歯周組織形成を目指した。レジン表面にヒトの歯や骨の成分であるアパタイトを付着させることに成功した。また擬似体液を作用させる実験も行い、生体親和性と骨結合能を持つことが明らかになった。さらに生理活性物質のフィブロネクチンを複合化させると、レジン表面に多数の細胞付着が観察された。以上よりレジン上に歯周組織形成が起こる可能性が示された。保存困難とされていた歯を長期に機能させることが出来れば、国民の健康に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Composite resin (CR) is applied as a bonding treatment and as a root perforation. However, CR surface rarely reconstructs periodontal attachment apparatus.

The laser-assisted biomimetic (LAB) process. This may improve the biocompatibility of CR through the surface modification. This study aimed to develop a technique to produce the osteoconductive resin surfaces through calcium phosphate (CaP) coating using LAB process. The LAB-processed substrate was immersed for 3 days in a simulated body fluid (SBF) for the preliminary osteoconductivity assessment. According to the results of the microscopic observation and the EDX analysis, nano- and micro-structured CaP layers were formed on the CR surfaces, after the LAB process. Thus, this study might suggest a possibility of the periodontal tissue formation on CR. The LAB process is a potential new tool to create a cementum-like osteoconductive surface on dental composite resins.

研究分野：歯内療法学

キーワード：レーザー援用バイオミネラリゼーション法 歯周組織再生 レジン 骨類似アパタイト 生理活性物質 接着治療法 垂直歯根破折

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

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。

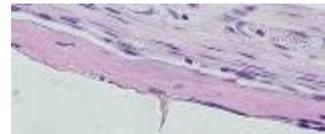
これまでに、垂直破折歯根接着治療において多くの場合に破折部を接着したレジンに沿って深い歯周ポケットが残存すること、また動物実験でもレジン上にセメント質の形成は認められないことを報告した。

(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*では理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、 β -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 β -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、 β -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））。

③そこで、レジン表面にカーボンナノチューブ（CNT）とナノ β -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、その可能性を検討した。CNTコーティングした試料は細胞付着性及び増殖性が高く、さら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、カーボンナノチューブでレジン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（平成25～27年度「基盤研究C」（田中））。しかしながら、歯周組織再生の可能性は見出したが、その形成量は少なかった。これはレジン表面に占める象牙質、 β -TCPの面積が少ないこと、増殖因子の担持・徐放スピードのコントロールが困難であることが問題点と考えた。



2. 研究の目的

生体親和性が良好な骨類似アパタイトを液相レーザープロセス併用バイオミネラリゼーション法によりレジン全面へコーティングし、ナノ構造を有するレジン表面へ生理活性物質を複合化すれば、表面吸着に比べて増殖因子の担持量が増加し、徐放挙動が制御できるようになり、問題点を克服できると考えた。レーザー併用バイオミネラリゼーション法を用いて、レジンに生体親和性が良好な骨類似アパタイトをコーティングし、レジン上に歯周組織再生を実現することを目的とした。



※バイオミネラリゼーション法、別名バイオメテック（生体模倣を意味する）法：バイオメディカル材料の製造や生体材料の機能を向上させる技術で、バイオミネラリゼーション法とは生体内での実際の骨形成を模し、過飽和リン酸カルシウム溶液に材料を浸漬し、化学的にナノ構造を有する骨類似アパタイトを析出させる方法

3. 研究の方法

(1) レーザー併用バイオミネラリゼーション法(LAB法)を用いたCR表面へのCaP析出の検討
 CRの種類とレーザー波長を変えて検討した。CRにはUniFil Flow(UF, 色調A3;GC), Beautiful flow plus (BF, 色調A3およびCV;松風)を用い、直径6mm、厚さ1mmの型枠にCRを流し込み、表面をストリップスにて圧接しながら光重合処理をしてディスク状試料3種(UFA3, BFCV, BFA3)を作製した。各ディスクをCaP過飽和水溶液中に浸漬し、Nd:YAGレーザー(30Hz)の第3高調波(355nm, UV光), あるいは第2高調波(532nm, VIS光)を集光せずに、4W/cm²で30分照射した。照射後のCR表面をSEMにて形態観察し、EDXにて元素分析を行った。



(2) LAB法処理後のCRに対して疑似体液(SBF)試験を行い、処理面のアパタイト形成能を調べることで、その骨結合能について検討した。直径6mm、厚さ1mmの型枠にCRを流し込み、表面をストリップスにて圧接しながら光重合処理をしてディスク状試料を作製した。CaP飽和液(5ml)中に浸漬し、Nd:YAGレーザー(30Hz)の第2高調波(532nm, VIS光)を集光せずに、4W/cm²で30分照射した。アパタイト形成能を評価するために、試料をSBF(pH7.4)中に37°Cで3日間浸漬し、その表面をSEM観察した。

(3) 初期細胞付着促進を目的とした生理活性物質の複合化の検討
 フィブロネクチン(Fn)の複合化は生理食塩水(142mM NaCl, 40mM Tris HCl, pH7.4)にFnを20μg/mLに調整し、0.7mL中に30min浸漬後、洗浄した。細胞はMC3T3-E1細胞を用いた。48well plateにレジンプロックを静置し、2000cell/500μlに調整したMC3T3-E1細胞を播種、37°C、5%CO₂条件下で培養を行い、培養1日後に各試料を固定し、蛍光染色後試料上の細胞の付着状態、形態、伸展の様子を観察し、無処理、CaP処理、CaP-Fn処理した試料上の細胞と比較検討した。

(4) 生体適合試験

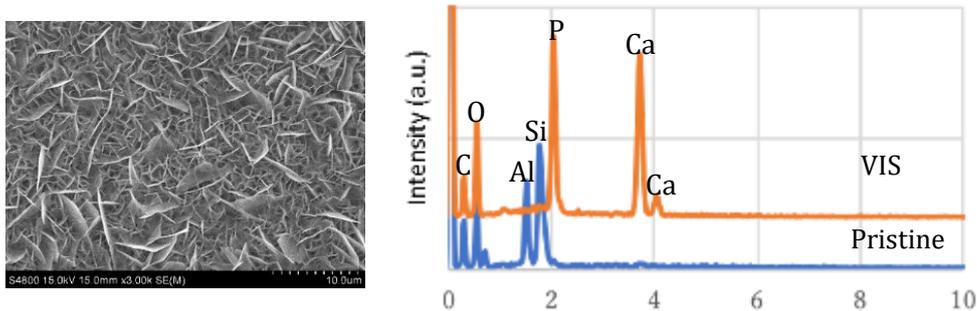
北海道大学の倫理委員会の承認を受けて実施した。

ラットに全身麻酔および局所麻酔を施し、無処理、CaP処理、CaP-Fn処理、3種類のCRを背部皮下に移植した。2週後に安楽死させ、試料周囲の組織標本作製し、HE染色して炎症の範囲を比較検討した。

4. 研究成果

(1) レーザー併用バイオミネラリゼーション法を用いたCR表面へのCaP析出の検討

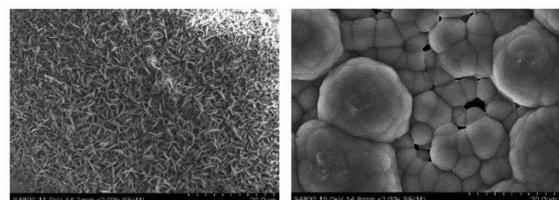
SEM観察の結果、UVレーザー照射ではすべてのサンプルで析出物は認められなかった。一方、VISレーザー照射ではすべての群で析出物が観察された。UFA3では析出物がわずかにしか観察されなかったのに対し、BFCV, BFA3ではマイクロスケールの鱗片状の析出物が多く認められ、特にBFA3では表面の70%程度が析出物に被覆されたケースも観察された。EDX分析の結果、これらの析出物からはCaとPを検出した(下図)



(2) 骨結合能についての検討

レーザー照射後の試料上に、マイクロスケールの板状結晶よりなるCaP析出物が認められた。SBF浸漬後は、板状結晶の上に緻密なアパタイト層が形成された。

SBF浸漬前(左)浸漬後(右)CR表面のSEM像



(3) 初期の細胞付着促進を目的とした生理活性物質の複合化の検討

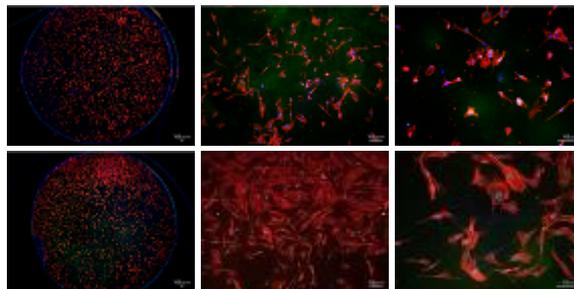
培養1日後の細胞付着状態

図の上から

無処理、CaP処理、CaP-Fn処理



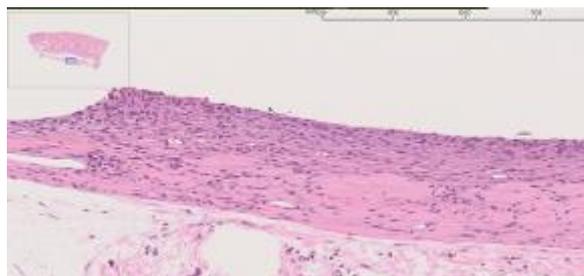
CaP-Fn処理した試料上に明らかに多数の細胞が付着しているのが観察される。フィブロネクチンを複合化することにより初期細胞付着が促進された。



(4) 生体適合試験

右図はCaP-Fn処理した標本

無処理、CaP処理、CaP-Fn処理、3群ともに著明な炎症初見は観察されなかった。生体適合性は良好であることを認めた。



以上より、レーザー併用バイオミネラリゼーション法/生理活性物質を複合化により、レジン表面を改変することに成功した。これにより細胞付着性が向上し、生体適合性も良好なことが示され、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

〔雑誌論文〕(計2件)

①J Nathanael, A Oyane, M Nakamura, K Koga, E Nishida, S Tanaka, H Miyaji. Calcium phosphate coating on dental composite resins by a laser-assisted biomimetic process. Heliyon, 4(8), e00734 (1-16), 2018. 査読有
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00734>

②S Miyata, H Miyaji, H Kawasaki, E Nishida, K Shitomi, T Akasaka, S Tanaka, T Iizuka, T Sugaya. Antibacterial and cytotoxic effects of photoexcited Au clusters via blue high-power or white low-power light-emitting diode irradiation Biology, Engineering and Medicine. DOI: 10.15761/BEM.1000126. 2017. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

①Saori Tanaka, Hirofumi Miyaji, Erika Nishida, A. J Nathanael, Maki Nakamura, Ayako Oyane, Toru Tanaka Satoshi Inoue. Calcium phosphate coating on human dentin and composite resin surface by laser-assisted biomimetic process. 20th KACD-JSCD Scientific Joint Meeting 2018年.

②田中佐織, 宮治裕史, 西田絵利香, A. Joseph NATHANAEL, 中村真紀, 大矢根綾子, 田中 享, 飯田俊二, 高師則行, 井上 哲. レーザー援用バイオミメティック法によるレジン表面の改変とアパタイト形成能評価. 日本総合歯科学会 2017年.

③西田絵利香, 宮治裕史, A. J NATHANAEL, 中村真紀, 大矢根綾子, 田中佐織, 田中 享, 加藤昭人, 菅谷 勉. レーザー援用バイオミメティック法によるレジン表面へのリン酸カルシウムの析出. 日本歯科保存学会, 2016年.

④宮田さほり, 宮治裕史, 佐伯 歩, 川崎英也, 田中佐織, 菅谷 勉. 金クラスターを用いた抗菌的光線力学療法の開発 -歯周病原菌に対する抗菌効果と細胞親和性-. 日本歯科保存学会, 2016年.

〔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：
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：
国内外の別：

〔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/perio.html>
6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮治 裕史

ローマ字氏名：MIYAJI HIROFUMI

所属研究機関名：北海道大学

部局名：北海道大学病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：50372256

研究分担者氏名：田中 享

ローマ字氏名：TANAKA TORU

所属研究機関名：北海道大学

部局名：北海道大学病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：90344522

研究分担者氏名：西田絵利香

ローマ字氏名：NISHIDA ERIKA

所属研究機関名：北海道大学

部局名：北海道大学病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：50779882

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大矢根綾子

ローマ字氏名：OYANE AYAKO

研究協力者氏名：中村真紀

ローマ字氏名：NAKAMURA MAKI

研究協力者氏名：AJ Nathanael

ローマ字氏名：AJ Nathanael

研究協力者氏名：加藤 昭人

ローマ字氏名：KATO AKIHITO

研究協力者氏名：宮田さほり

ローマ字氏名：MIYATA SAORI
研究協力者氏名：眞弓佳代子
ローマ字氏名：MAYUMI KAYOKO

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。