

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11749

研究課題名(和文) 蛍光タンパクを用いた革新的カップリング・モノマー可視化技術の開発

研究課題名(英文) Development of a visualization method of coupling monomer using fluorescent protein

研究代表者

西川 悟郎(NISHIGAWA, GORO)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：00172635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：CAD/CAM冠の材料などに使用されるハイブリッドレジンは、接着に際しカップリングモノマーを塗布することによって化学的結合力の強化が図られる。カップリングモノマーの結合状態を評価する方法としては、XPSによる分析があるが、ハイブリッドレジンの場合、材料中にメタクリレート樹脂が存在するためにXPSによる評価は困難である。また材料には製品独自のフィラーなどが含まれるため、同一材料内であってもカップリングモノマーの結合が一様とは考えにくい。

本研究ではハイブリッドレジン上のシランカップリングされた領域を、蛍光タンパクを利用して可視化する技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法を用いることにより、シランカップリングされている部分を可視化することができ、カップリング領域の定量評価も可能となるものと考えられる。また、光-電子相関顕微鏡法(CLEM)を用いれば、蛍光像とSEM像を重ね合わせることが可能である。この評価法を用いれば、各修復材料の表面汚染などによるカップリング阻害状況の様態、あるいは材料間によるカップリング特性の評価も可能となり、これらの結果と接着試験結果との相関を検討することも可能であることから、多くの研究に対して有用な方法になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Coupling monomer is applied to inner surface of fixed prosthesis fabricated with CAD/CAM hybrid resin prior to cementation to abutment tooth. However, observation method of the chemical bonding of monomers to hybrid resin materials has not been developed. In this study, silane coupling area on the hybrid resin surface was treated with fluorescent protein. This protein can be chemically bonded to coupling monomer. After rinsing the treated surface, test surface was observed using fluorescence microscope. To observe the luminous area due to the bonded fluorescent protein to monomer on the test surface, evaluation of the bonded coupling monomer to the hybrid resin can be made.

Using this method, a quantitative evaluation of silane coupling status of material surface can be performed.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：シランカップリング剤
カップリング・モノマー
蛍光タンパク
CAD/CAM
蛍光顕微鏡
電子顕微鏡
ハイブリッドレジ
接着試験
カ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

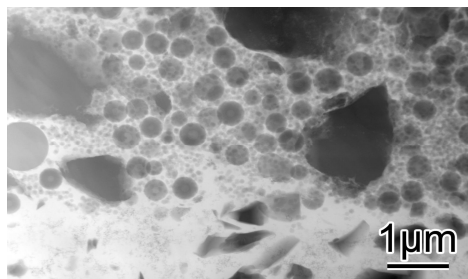
1. 研究開始当初の背景

サンドブラスト処理後の歯科用修復物表面に付着する微量のサンドブラスト粒子は単なる汚染物質とみなされ、臨床においても、あるいは研究室の実験手順においても、通常は蒸留水などによる超音波洗浄で除去される。申請者らはこの超音波洗浄処理が修復物に対するレジンセメントの接着強さを減少させる現象を報告した(Nishigawa G et.al, PLoS ONE, 2016)。しかしながら、この洗浄処理が接着強さを減少させる原因は未だに明らかではない。研究者らは超音波洗浄による接着力低下の原因を、「サンドブラスト処理による材料表面の物理的な新鮮面露出(化学的清浄化)とそれに続く蒸留水を用いた超音波洗浄による新鮮面への汚染による、カップリング・モノマー吸着量の低下」であると考えた。

それを証明するためには、材料表面へのカップリング・モノマー吸着量の定量的測定を行う必要があった。そのため蛍光タンパクを用いた革新的なカップリング・モノマー可視化技術を開発し、その技術を用いて、材料表面のカップリング・モノマー吸着量分析から証明しようと考えたことから本研究が始まったものである。

2. 研究の目的

本研究で被験材料とした CAD/CAM 冠用材料などに用いられるハイブリッドレジン、レジンセメントとの接着に際しカップリング・モノマーを塗布することによって化学的結合力の強化が図られる。カップリング・モノマーとハイブリッドレジンとの結合状態を評価する方法として XPS による分析方法があるが、ハイブリッドレジンにメタクリレート樹脂が存在するために XPS による評価は困難である。また各ハイブリッド



レジンの材料中には製品独自のフィラーなどが含まれるため、同一材料内であってもカップリング・モノマーの結合が一様とは考えにくい(図1)。本研究はハイブリッドレジン上のシランカップリングされた領域におけるカップリング・モノマーの結合様態を、カップリング・モノマーに蛍光タンパクを標識させる方法を利用して可視化することを目的とした。

図1 大白歯用 CAD/CAM ハイブリッドレジンの STEM 像

3. 研究の方法

ハイブリッドレジンブロックは ARCTICA VITA ENAMIC (カボデンタルシステムズ) を用いた。機械加工による切断の後、粒度 15µm のダイヤモンドラッピングフィルム(3M)で研磨した。水洗後、大気圧プラズマ処理(P500-SM, 魁半導体)した表面を、シランカップリング剤である 3-(トリメトキシシリル)プロピルアミン(シグマアルドリッチ)で修飾した。この表面に対し、R-Phycoerythrin Labeling Kit-NH₂(同仁化学研究所)を用いて蛍光タンパクを標識し、共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, オリンパス)にて観察した。

また、ARCTICA VITA ENAMIC を断面観察できるように機械加工の後、アルゴンイオン研磨装置(SM-09020CP, 日本電子)で断面観察試料作製し、電界放出走査電子顕微鏡(JSM-6701F, 日本電子)で観察した。

4. 研究成果

走査電子顕微鏡観察結果から、ARCTICA VITA ENAMIC の構造が 2 種類のセラミック

スが用いられ、セラミックス体の隙間に樹脂が存在することが明らかになった。共焦点レーザー顕微鏡観察では、ENAMIC は添加される重金属含有無機材料部分に自発蛍光があるものの、3-(トリメトキシシリル)プロピルアミンで修飾し、R-Phycoerythrin Labeling Kit-NH で蛍光標識した試料は、ENAMIC の大部分を占めるシリカ系マトリクスの露出部におけるシランカップリングされた部分を蛍光観察できた(図 2)。ただし、ENAMIC の自発蛍光についてはシランカップリングの評価から省く必要がある。

本手法を用いることにより、シランカップリングされている部分を可視化することができ、カップリング領域の定量評価も可能となるものと考えられる。また、光-電子相関顕微鏡法 (CLEM) を用いれば、蛍光像と SEM 像を重ね合わせることが可能である。この評価法を用いれば、各修復材料の表面汚染などによるカップリング阻害状況の様態、あるいは材料間によるカップリング特性の評価も可能となり、これらの結果と接着試験結果との相関を検討することも可能であることから、多くの研究に対して有用な方法になるものと考えられる。

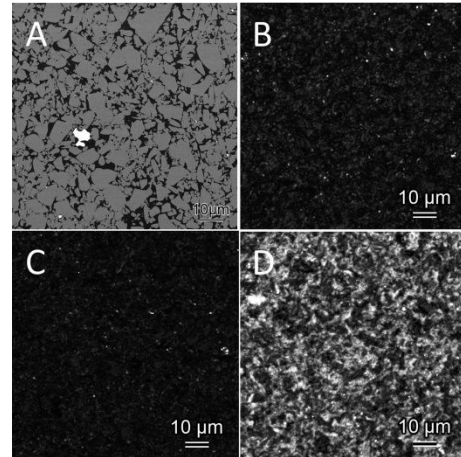


図 2 ARCTICA VITA ENAMIC の SEM 像(A: 組成像)

と共焦点レーザー顕微鏡像(B: Control, 蛍光標識なし, C: シラン処理なし, 蛍光標識, D: NH_2 シラン処理 + 蛍光標識)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maruo Y, Yoshihara K, Irie M, Nishigawa G, Nagaoka N, Matsumoto T, Minagi S.	4. 巻 18
2. 論文標題 Flexural properties, bond ability, and crystallographic phase of highly translucent multi-layered zirconia. Jan-Dec 2020;18:2280800020942717.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Appl Biomater Funct Mater,	6. 最初と最後の頁 20942717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2280800020942717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara K, Nagaoka N, Maruo Y, Nishigawa G, Yoshida Y, Van Meerbeek B.	4. 巻 36
2. 論文標題 Silane-coupling effect of asilane-containing self-adhesive composite cement.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 914-926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym12122947.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Irie M, Maruo Y, Nishigawa G, Yoshihara K, Matsumoto T.(12):2947.	4. 巻 12
2. 論文標題 Flexural Strength of Resin Core Build-Up Materials: Correlation to Root Dentin Shear Bond Strength and Pull-Out Force.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymers (Basel)	6. 最初と最後の頁 2947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym12122947.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉原久美子, 長岡紀幸, 丸尾幸憲, 西川悟郎, 吉田靖弘
2. 発表標題 新規シランカップリング剤添加型レジンセメントのシランカップリング効果
3. 学会等名 第128回日本補綴歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川悟郎, 丸尾幸憲, 長岡紀幸, 吉原久美子, 徳永英里, 前田直人, 入江正郎, 皆木省吾
2. 発表標題 臼歯用CAD/CAMハイブリッドレジンのナノ構造とサンドブラスト処理による影響
3. 学会等名 第128回日本補綴歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masao Irie, Yukinori Maruo, Goro Nishigawa, Shogo Minagi, Kumiko Yoshihara, Takuya Matsumoto, David Watts
2. 発表標題 Are Shear-bond-strength to Modern Ceramics and Flexural-strengths of Resin-cements Correlated?
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the IADR and The 48th Annual Meeting of the AADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川悟郎, 丸尾幸憲, 長岡紀幸, 吉原久美子, 徳永英里, 入江正郎, 皆木省吾
2. 発表標題 蛍光タンパクを用いたカッ プリングモノマー可視化技術の開発
3. 学会等名 平成31年度秋期 第74回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江正郎, 徳永英里, 丸尾幸憲, 西川悟郎, 吉原久美子, 長岡紀幸, 皆木省吾, 松本卓也
2. 発表標題 大臼歯用CAD/CAM ブロックに対するレジンセメントの接着強さの検討
3. 学会等名 第37回日本接着歯学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳永英里, 入江正郎, 西川悟郎, 丸尾幸憲, 吉原久美子, 長岡紀幸, 松本卓也, 皆木省吾
2. 発表標題 大白歯CAD/CAMハイブリッドレジンとレジンセメントの接着着耐久性
3. 学会等名 平成30年度日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江正郎, 丸尾幸憲, 西川悟郎, 皆木省吾, 松本卓也
2. 発表標題 新しい器械式練和の充填用ガラスイオノマーセメントの歯質接着性と曲げ特性
3. 学会等名 平成30年度秋期 第71回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江正郎, 丸尾幸憲, 西川悟郎, 皆木省吾, 松本卓也
2. 発表標題 亜鉛ガラス含有ガラスイオノマーセメントの歯根象牙質の窩洞辺縁部適合性と歯質接着強さ
3. 学会等名 第70回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川悟郎, 丸尾幸憲, 長岡紀幸, 吉原久美子, 徳永英里, 前田直人, 入江正郎, 皆木省吾
2. 発表標題 大白歯用CAD/CAMハイブリッドレジンのナノ構造とサンドブラスト処理による影響
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳永英里, 長岡紀幸, 西川悟郎, 丸尾幸憲, 吉原久美子, 入江正郎, 皆木省吾
2. 発表標題 CAD/CAMレジンブロックに対するシランカップリング剤と加水分解・脱水縮合触媒の影響
3. 学会等名 第36回日本接着歯学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西川悟郎, 入江正郎, 丸尾幸憲, 徳永英里, 吉原久美子, 長岡紀幸, 松本卓也, 皆木省吾
2. 発表標題 歯根象牙質と直接法レジンコア材料との接着性耐久性
3. 学会等名 第36回日本接着歯学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長岡 紀幸 (NAGAOKA NORIYUKI) (70304326)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	丸尾 幸憲 (MARUO YUKINORI) (60314697)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	入江 正郎 (IRIE MASAO) (90105594)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・非常勤研究員 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	皆木 省吾 (MINAGI SHOGO) (80190693)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関