

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792268

研究課題名（和文） 硬組織形成を誘導し、直接結合可能な高機能レジンの開発

研究課題名（英文） Development a resin that induces hard tissue formation that remains in direct contact with the surface of the resin

研究代表者

中塚 愛 (NAKATSUKA MEGUMI)

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号：00547648

研究成果の概要（和文）：硬化したレジン表面に硬組織の形成を誘導し、さらに新生硬組織と直接結合可能なレジンを作製することを目的とし、炭酸カルシウムを4-META/MMA-TBB レジンに加えて複合化した。0～80%の濃度で混合し、物性とCa<sup>2+</sup>溶出量を計測した結果、濃度が高くなるとCa<sup>2+</sup>溶出量は多くなるが物性は低下した。実験動物に移植し組織学的に評価した結果、濃度が高いほど新生硬組織とレジンとの接触率は増加した。物性と硬組織形成の促進効果から、濃度は60%が適当と考えられた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop a resin that induces hard tissue formation that remains in direct contact with the surface of the resin. We prepared 4-META/MMA-TBB resin containing 0%~80% calcium carbonate and evaluated its mechanical properties and Ca<sup>2+</sup> depletion from the surface. Consequently, Ca<sup>2+</sup> depletion increased and the mechanical properties became inferior with an increase in the concentration of calcium carbonate. We then transplanted the new resin in experimental animals and histomorphologically evaluated the hard tissue formation. Direct contact and interdigitation were observed between the resin and newly-formed hard tissue as the concentration of calcium carbonate increased. Based on these results, 4-META/MMA-TBB resin containing 60% calcium carbonate was the most appropriate, judging from the mechanical properties and induction of new hard tissue formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：レジン、生体活性材料、硬組織誘導

## 1. 研究開始当初の背景

歯科で使用されている4-META/MMA-TBBレジン（スーパーボンドC&B®）は象牙質やセメント質への優れた接着性に長期の実績があり、また生体親和性にも優れていることが明らかにされ、歯根端切除や再植時のroot-end sealing、根管充填、歯根破折の接着治療に応用されている。

しかし、硬化したレジン上にセメント質など硬組織の形成は認められず、幅の広い破折間隙がある場合や歯頸部に大きな穿孔がある場合には、上皮が根尖側移動して歯周ポケットを形成しやすく、深いポケットの存在は予後不良となる原因の一つと考えられている。

骨は象牙質やセメント質と同様にコラー

ゲンとハイドロキシアパタイトを主成分とすることから、4-META/MMA-TBB レジンにも接着し生体親和性が維持されると考え、ラット頭蓋皮質骨に 4-META/MMA-TBB レジンを接着させ検討を行った。その結果、骨とレジンは樹脂含浸層を形成して皮質骨に接着し、その構造は 12 ヶ月後も維持されていた。またレジンが接着した皮質骨は正常なリモデリングが行われていた。さらに硬化したレジン表面を被覆していた結合組織とレジンの間には新生骨が増生し、新生骨は結合組織を介さず直接レジンに接していた。しかし、レジン上面に増生した骨は、増生速度が遅く、さらに SEM で観察するとレジンと新生骨の間に間隙が見られ直接結合は得られていなかった。すなわち、牽引力やせん断力が加わった場合には、その力を伝達するような結合は得られていないと考えられた。

レジン上にセメント質など硬組織が誘導できれば、破折歯根の接着治療の際に、幅の広い破折間隙がある場合や歯頸部に大きな穿孔がある場合でも、上皮の増殖を抑制してポケット形成を阻止したり、咬合力を骨に伝えるための構造が回復でき、治療成績の向上や、適応症例の拡大につながると考えられる。骨再生、骨造成に大きな効果が期待でき、歯科領域だけでなく整形外科や形成外科、脳外科など骨セメントを使用する多領域での応用が期待される。

そこで、4-META/MMA-TBB レジンの優れた接着性や生体親和性を生かしながら、表面に骨やセメント質を誘導して結合させるためには、硬組織形成を促進し、直接硬組織と結合する材料と 4-META/MMA-TBB レジンとを複合化させることが有効ではないかと考えた。その材料として、炭酸カルシウム、 $\alpha$ -TCP、 $\beta$ -TCP に着目した。良好な骨誘導能を有するという報告があり、また生体に為害性がなく、入手しやすいことから臨床応用しやすい材料と考えられた。そこで、それぞれを比較することにより、さらに効率良く硬組織形成を促進し、結合率を高める複合化レジンを開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、4-META/MMA-TBB レジンに生体活性を有する炭酸カルシウム、 $\alpha$ -TCP、 $\beta$ -TCP を加えて複合化することにより、歯や人工材料、骨に接着すると同時に、硬化したレジン表面に硬組織の形成を誘導し、さらに新生硬組織が直接結合可能なレジンを開発することである。

まず、工学的分析から、必要な強度をもち、 $\text{Ca}^{2+}$  が溶出する複合化レジンを探し、動物実験を行って生体親和性が高く、骨形成の促進、骨との結合に最も効果的なレジンを選定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規複合化レジン の 工 学 的 分 析

#### ① 試料作製

4-META/MMA-TBB レジン (スーパーボンド C & B<sup>®</sup>) (サンメディカル) のポリマーに炭酸カルシウム、 $\alpha$ -TCP、 $\beta$ -TCP を、それぞれ 0、20、40、60、80% の重量比で混和し、合計 13 種類のポリマーを作製した。混和したポリマー粉末 3/4 カップ、モノマー液 4 滴、キャタリスト 1 滴の割合で加えて硬化させた。

#### ② 曲げ強度、接着強さの計測

各硬化体の 3 点曲げ試験をオートグラフで計測した。また、牛歯象牙質面を研磨し、10% クエン酸 3% 塩化第二鉄溶液 (表面処理材グリーン<sup>®</sup>) で処理後、試料と直径 4.8mm で接着、引っ張り試験を行い、破断面を SEM にて観察した。

#### ③ $\text{Ca}^{2+}$ 溶出量の計測

各試料を  $\phi 20.0 \times 2.0 \text{mm}$  に硬化させ、純水に浸漬して溶出する  $\text{Ca}^{2+}$  量を高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法にて測定した。

#### ④ 試料表面の元素分析

エネルギー分散型 X 線分光法 (EDS) により硬化体表面の Ca、炭素などの元素を分析した。

### (2) 各複合化レジン表面への骨形成量および結合状態の検討

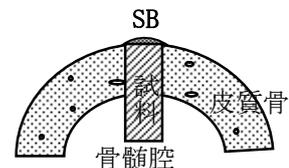
工学的分析より適当と思われた混合材料と濃度で行った。

#### ① 試料作製

各ポリマーにモノマー液とキャタリストを加えて硬化させ、 $\phi 1.0 \text{mm} \times 5.0 \text{mm}$  円柱形試料をそれぞれ作製した。

#### ② 移植方法

実験動物には、10 週齢の Wistar 系雄性ラットを使用、大腿骨中央部の骨膜を剥離し、直径 1mm のフィッシャーバーを用いて大腿骨骨髓腔に 2 箇所穿孔した。各試料を骨髓腔内に位置するように移植し、試料を骨表面に固定した。



#### ③ 評価方法

観察期間は 2、4、8 週とした。アセトンでスーパーボンド C & B<sup>®</sup> を溶解させた後、脱灰薄切標本作製、H-E 染色を行った。骨基質の厚み、試料と骨基質との距離、骨基質形成率、試料と骨基質の接触率を評価した。8 週群のみ、試験片中央部で切断して研磨し、未脱灰 SEM 標本作製して、試料と新生骨との界面を観察した。

### (3) 新規複合化レジンに歯根象牙質に接着した場合の硬組織誘導効果の検討

#### ①試料作製

ラットに移植し効果が高かった混合材料と濃度を選択した。各ポリマーにモノマー液とキャタリストを加えて硬化させ、φ1.0 mmの薄い円盤状試料をそれぞれ作製した。

#### ②実験方法

成ビーグル犬(雄, 約10kg)の上顎両側第一、二、三前臼歯、下顎両側第一、二、三、四前臼歯を用いた。被験歯の頰側歯肉歯槽粘膜を部分層弁で剥離、骨面から骨膜を除去し、裂開状骨欠損を歯根の近心隅角から遠心隅角、CEJから根尖側に5mmの範囲で作製した。露出した歯根のセメント質を除去し、直径3 mmの窩洞を形成。窩洞を表面処理材グリーン®で5秒間処理し、水洗、乾燥後、各レジンで作製した試料を同じレジンを用いて窩洞に接着した。その後歯肉弁を復位縫合した。

#### ③組織学的観察

観察期間は4、8週とした。脱灰薄切標本を作製し、レジン表面への新生硬組織形成状態(形成量、レジンとの接触率)を観察した。

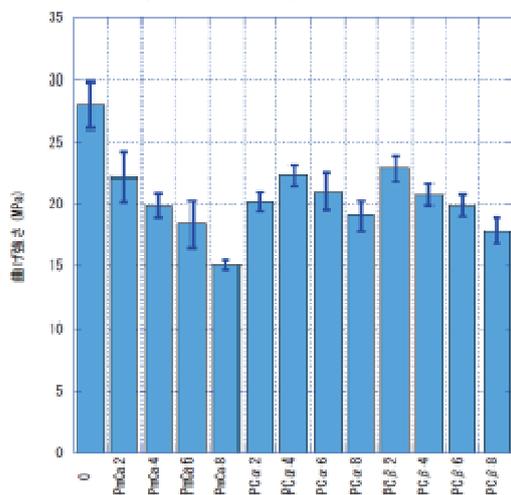
以上の結果から、レジン表面に効率的に硬組織を誘導でき、直接結合できる複合化レジンを明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) 理工学的分析

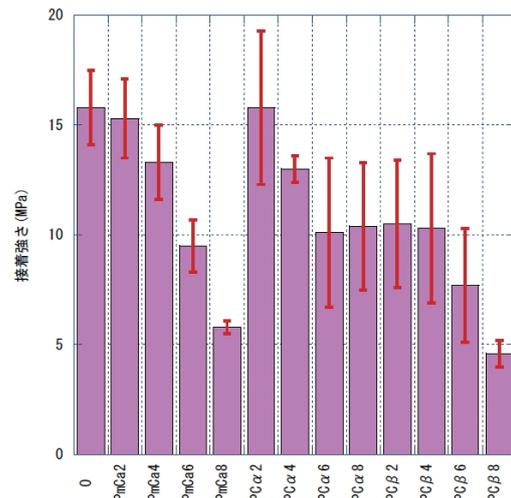
#### ①曲げ強度

すべての混合材料で、濃度が高くなるに従い曲げ強度は低下した。



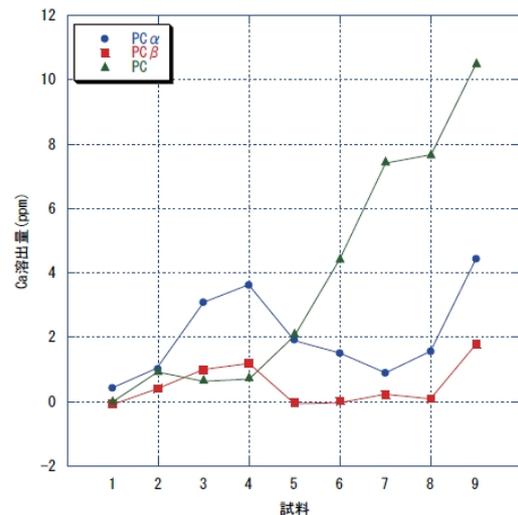
#### ②接着強さ

牛歯象牙質への接着強さは、β-TCPを混合したものが、他2つと比較して有意に低下した。また、すべての混合材料で、濃度が高くなるに従い接着強さは低下し、濃度60%で約6割となった。



#### ③Ca<sup>2+</sup>溶出量

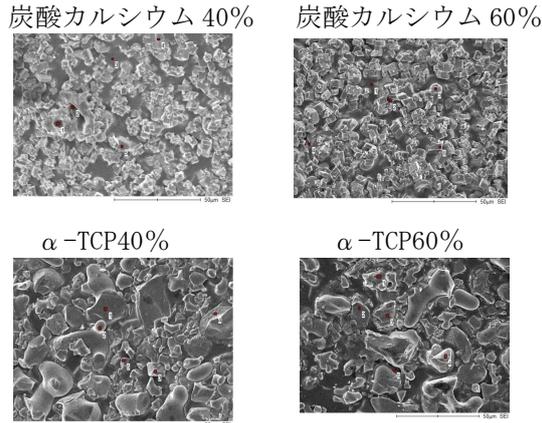
β-TCP混合試料では他2つと比較しCa<sup>2+</sup>溶出量は少なかった。α-TCP混合試料では40%でのCa<sup>2+</sup>溶出量が多かった。炭酸カルシウム混合試料では濃度が40%を超えるとCa<sup>2+</sup>溶出量は急激に増加し、濃度が高くなるほどCa<sup>2+</sup>溶出量は多くなった。



炭酸カルシウム混合試料のFTIR分析から、硬化体表面は、炭酸カルシウム混合量に反比例した厚さ1 μm以下のレジン樹脂膜が炭酸カルシウムを覆う形態、もしくはその添加量に比例して炭酸カルシウムの結晶が硬化体表面から剥き出している形態になっていることが明らかになった。また、炭酸カルシウム40%以上の硬化体を水に浸すと、硬化体表面の薄いレジン樹脂膜から水が浸透してCa<sup>2+</sup>を溶出するか、あるいは硬化体表面に剥き出しになっている炭酸カルシウムの結晶に水が作用してCa<sup>2+</sup>を溶出し、その溶出量は混合量に比例して増加すると考えられた。

以上より、接着強さなど物性が許容でき、Ca<sup>2+</sup>溶出量が多い、炭酸カルシウム濃度40%、60%とα-TCP濃度40%、60%が混合材料として適当と考えられた。

硬化体の SEM 像



(2) ラット骨髄腔内での複合化レジン表面への骨形成量および結合状態の検討

① 光学顕微鏡観察

術後 2 週で、すべての試料周囲に炎症性細胞の浸潤や多核巨細胞は認められなかった。0%では、試料は軟組織に被包され、軟組織の外周には新生骨の形成がみられた (Fig. 1)。炭酸カルシウム 40%では、その外側に 0%よりやや厚い新生骨の形成が見られたが、その構造は幼弱な梁状であった。試料と骨との間の軟組織の幅は 0%よりも薄かったが、類円形の細胞と扁平な細胞が認められた。炭酸カルシウム 60%では、新生骨の厚みは 0%、40%と比較するとやや厚く、その構造は緻密であった。試料と新生骨との距離はかなり近接しており、1~数層の扁平な細胞が観察されるのみであった (Fig. 2)。α-TCP40%では、試料の外側に新生骨の形成がみられ、試料と骨の間には結合組織は認められず、扁平な細胞の層が認められた。細胞の層は炭酸カルシウム 60%に比較して厚くなっていた (Fig. 3)。α-TCP60%では、α-TCP40%と比較すると新生骨と試料の間の細胞の層が薄く、骨形成量は多かった (Fig. 4)。

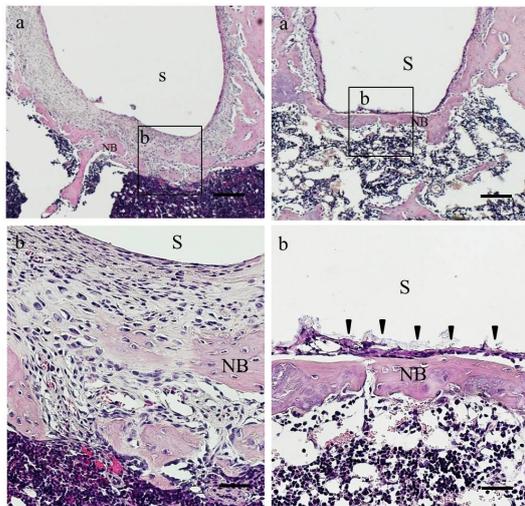


Fig. 1

Fig. 2

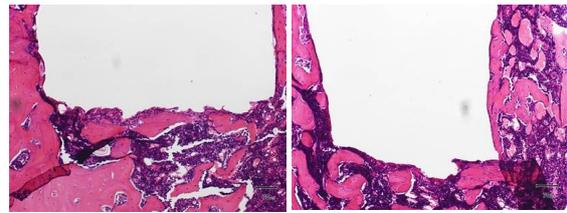


Fig. 3

Fig. 4

術後 4 週では、すべての試料周囲で新生骨形成量は増加し、試料との距離は小さくなっていた。0%では試料と新生骨が直接接している部分は見られず、炭酸カルシウム 60%混合レジンが α-TCP 混合レジンより、介在する軟組織が少なく、試料と骨の接触率が高かったが、その値は小さかった。

術後 8 週でも、すべての試料周囲で炎症性細胞浸潤は認めなかった。0%では新生骨は緻密化し、新生骨と試料は近接していたが、直接接している部分は見られず、1~数層の扁平な細胞が介在していた (Fig. 5)。炭酸カルシウム 40%でも新生骨の緻密化が認められ、骨基質と試料が直接接している部分がわずかに認められ、直接接していない部分でもわずかに細胞が介在するのみであった。炭酸カルシウム 60%では新生骨の厚さが最も大きく、骨は緻密化し、新生骨と試料は近接して骨基質が試料と直接接している部分が多く観察された。接していない部分では、わずかに細胞が散在しているのみであった (Fig. 6)。

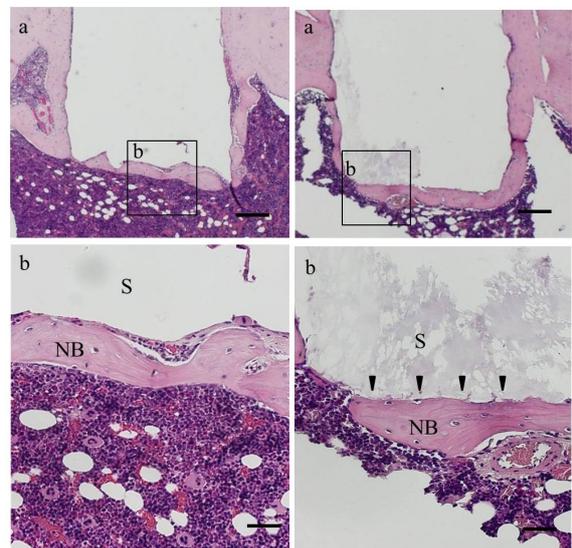


Fig. 5

Fig. 6

α-TCP40%、60%でも緻密化した新生骨が見られ厚みが増し、骨に接触している部分もわずかに認められたが、炭酸カルシウム 60%に比較すると少なく、数層の細胞の層が見られる部分が多かった (Fig. 7, Fig. 8)。

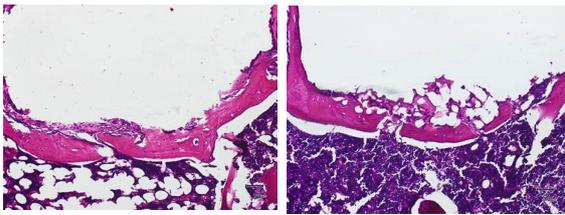


Fig. 7  $\alpha$ -TCP40%      Fig. 8  $\alpha$ -TCP60%

・骨基質形成率

2 週後、すべての試料間で有意差は認められなかった。4、6 週後と、それぞれ増加がみられたが、試料間での有意差は認められなかった。

・試料と骨基質の距離

2 週後、0%は  $40.5 \pm 27 \mu\text{m}$ 、炭酸カルシウム 60%は  $10.2 \pm 6.1 \mu\text{m}$  と最も小さく、有意差が認められた。8 週後では、すべての試料で減少が認められた。炭酸カルシウム 60%が  $3.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$  と最も小さい値となった。

・試料と骨基質の接触率

0%では 8 週後でも接触率は 0%であった。 $\alpha$ -TCP、炭酸カルシウムを混合すると接触率は増加し、8 週後の 60%炭酸カルシウム混合レジンでは  $18.3 \pm 8.9 \mu\text{m}$  と最も高かった。

②SEM 観察像

最も新生骨との接触率が高かった観察期間 8 週炭酸カルシウム 60%の SEM 観察を行った。試料表面に炭酸カルシウムの露出が多数観察された部分で、露出した炭酸カルシウムが骨基質と直接接して間隙が認められない部分が多かった。また、試料表面には数  $\mu\text{m}$  の立方体の陥凹が認められ、陥凹部には新生骨が増生して、レジンあるいは炭酸カルシウムと間隙なく直接接していた。このような陥凹部や炭酸カルシウムが露出して骨基質と間隙なく接している部分では、その周囲のレジンと骨基質の間にも間隙がみられない部位が多かった (Fig. 9)。

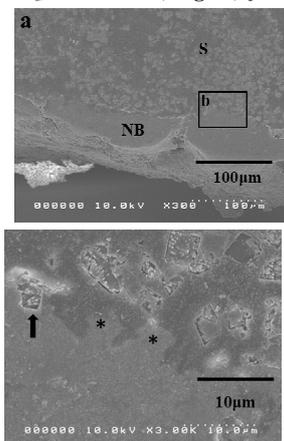


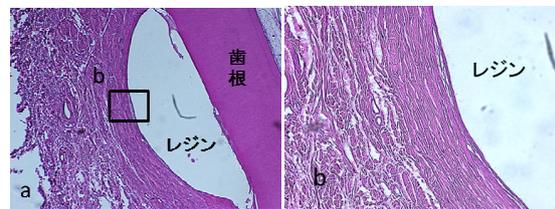
Fig. 9

増生した骨基質がレジンの陥凹部に入り込んで結合 (\*), 露出した炭酸カルシウムと骨基質が結合 (↑)

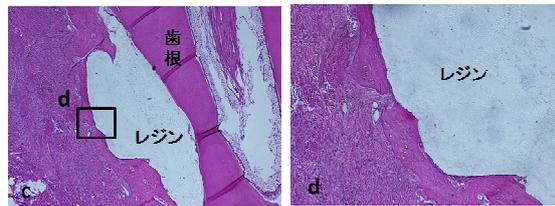
以上より、 $\alpha$ -TCP より炭酸カルシウムを混合した方が、新生骨とレジンとの直接接触が高くなると思われた。

(3) ビーグル犬歯根象牙質での硬組織形成状態の検討

炭酸カルシウムを 0%、40%、60%混合した試料を作製し、ビーグル犬のセメント質を除去した象牙質に接着した。4 週後では、どの試料でも、レジン表面に硬組織の形成は認められなかった。8 週後、0%ではレジン上に新生硬組織の形成は認められなかった。40%、60%炭酸カルシウム混合レジンでは、レジン表面に新生硬組織の形成が認められ、試料全体を覆っているものも認められた。レジンと新生硬組織間に結合組織の形成は認められず、直接接していない部分でもわずかに細胞が認められるのみであった。40%と比較すると、60%の新生硬組織量の方が多く、直接接触している部分が多かった。



8 週 0%



8 週 60%炭酸カルシウム

以上より、4-META/MMA-TBB レジンに炭酸カルシウムを添加すると、硬化したレジン上に新生硬組織が形成されて直接結合する可能性が示唆された。そして、許容できる物性を有し、硬組織の誘導効果を得るには混合濃度は 60%が適当と考えられた。しかし、硬組織と直接結合している部分は不十分であり、炭酸カルシウムとレジンとの結合も得られていないことから、今後、炭酸カルシウムの粒子サイズや、炭酸カルシウムをレジンコーティングしてポリマー粉末に混和するとともに、BMP などの成長因子を併用して、効率的に硬組織を誘導して結合させる方法などを検討する必要があると考えている。

## 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2件)

(1) Takeru Morishita, Tsutomu

Sugaya, Megumi Nakatsuka, Masamitsu

Kawanami ; Connective tissue reaction and Bone-cement Contact after Implantation of PMMA Resin Cements. Journal of Oral Tissue Enginnering 査読あり、10 巻、2012 年、1-12

(2) 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 査読あり、32 巻 2012 年、114-123

〔学会発表〕(計3件)

(1) 洲崎 真希、菅谷 勉、中塚 愛、柳澤 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 27 日-6 月 28 日、福岡国際会議場 (福岡県)

(2) 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 9 月 29 日-9 月 30 日、京都テルサ (京都府)

(3) 逸見 優、菅谷 勉、中塚 愛、中澤 篤史、洲崎 真希、川浪 雅光 ; 炭酸カルシウム添加 4-META/MMA-TBB レジン表面への骨形成. 日本歯科保存学会、2011 年 6 月 9 日-6 月 10 日、東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート (千葉県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中塚 愛 (NAKATSUKA MEGUMI)

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号 : 00547648

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし