

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462867

研究課題名(和文) TCP複合化レジンとナノHAPコラーゲンのハイブリッドによる垂直歯根破折の治療法

研究課題名(英文) Treatment of vertical root fracture using hybrid between TCP resin composites and nanohydroxyapatite collagen

研究代表者

菅谷 勉 (SUGAYA, Tsutomu)

北海道大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：10211301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 垂直歯根破折の治療成績を向上させるために、4-META/MMA-TBBレジンに TCPを複合化し、アスコルビン酸/塩化銅またはEDCで架橋したナノハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体(nHAC)を接着させてBMPを含浸し、硬組織を異所性に誘導してレジジンに結合させる治療法をin vitro, in vivoで検討した。

その結果、アスコルビン酸/塩化銅で架橋したnHACをレジジンに接着してBMPを含浸し、結合組織内に移植すると、顕微鏡でもSEMでもレジジンと骨との界面にハイブリッド層が観察され、結合組織が介在することなくレジジンと骨の接触が認められた。

研究成果の概要(英文)： Induction of ectopic hard tissue formation and resin-bonding affinity using TCP-4META/MMA-TBB resin composites and ascorbic acid/copper chloride or EDC crosslinked nanohydroxyapatite/collagen complex (nHAC) impregnated with BMP-2 were examined in vitro and in vivo in order to improve the clinical outcome of vertical root fracture treatment.

As results, a hybrid layer was observed at the interface between resin and bone in both optical microscope and SEM observation, and direct resin-bone contact was observed without connective tissue intervention, when nHAC crosslinked with ascorbic acid/copper chloride was adhered to resin and impregnated with BMP-2 and implanted into connective tissue.

研究分野：歯周病学

キーワード：垂直歯根破折 樹脂含浸層 BMP 硬組織再生 レジン

1. 研究開始当初の背景

垂直歯根破折は抜歯原因として大きな位置を占めるようになっており、その治療法の開発は大きな課題となっている。4-META/MMA-TBB レジンで垂直歯根破折を接着する治療法は大きな効果を発揮しているが、破折線周囲の歯根膜の喪失が大きかったり破折間隙が広がったりすると、治療成績が悪化しやすいのが現状である。とくに歯頸部付近の破折間隙が広い場合や歯根膜の喪失範囲が広い場合には、深い歯周ポケットが形成されやすく予後を悪化させる大きな要因の一つになっている。したがって、歯根表面に露出している4-META/MMA-TBB レジン上にセメント質を誘導してレジンと結合させることが、垂直歯根破折治療の適応症例拡大や長期的予後の向上には重要と考えられる。GTR法やエムドゲインを用いた再生療法との併用も試みられているが、レジン上へのセメント質再生には失敗に終わっており、あらたなマテリアルが必要と考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでに4-META/MMA-TBB レジンにカルシウム化合物を複合化することによって、レジン上に硬組織形成量を増加させ、硬組織とレジンとを直接接触させることに成功している。本研究では、4-META/MMA-TBB レジンに硬組織と化学的に結合可能な α TCPを複合化し、さらにBMP含有ナノハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体(nHAC)をハイブリッドさせて、レジンマトリックス上に硬組織を誘導して結合させる治療法へと発展させる。すなわち、nHACの適切な架橋方法、およびレジンに複合化する α TCPの適切な濃度を、ハイブリッド層の元素分析やin vivoにおける硬組織形成量および誘導された硬組織とレジンとの結合状態などから明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) I型コラーゲンを塩酸に溶解し、塩化カルシウム、リン酸カリウム緩衝液およびトリス緩衝液を加えて吸引濾過、エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC)またはアスコルビン酸/塩化銅で架橋してnHACを作製した。4-META/MMA-TBB レジンに α TCPを0, 40, 60%複合化し、EDCまたはアスコルビン酸/塩化銅で架橋したnHAC上で硬化させた。硬化後試料を切断し、レジンとnHACの界面をSEM観察およびEDX、XPSで元素分析を行った。

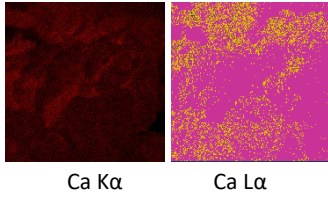
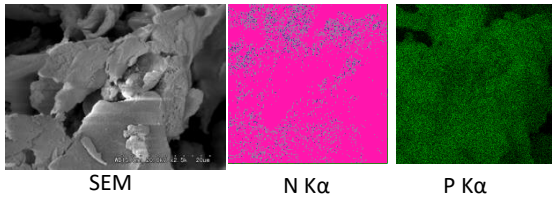
(2) 4-META/MMA-TBB レジンを硬化させて直径1mm長さ5mmの円柱形試料を作製し、表面に α TCPまたは炭酸カルシウムを0, 40, 60%複合化した4-META/MMA-TBB レジンを塗布して移植試料とした。移植試料は直ちにラット大腿骨骨髓腔に移植し固定、縫合した。術後2, 8週で脱灰薄切標本を作製し、試料表面への硬組織形成状態を光学顕微鏡で観察するとともに、レジンと新生骨基質との直接接触率を計測した。

(3) α TCPを0(SB群)または60%複合化(TCP群)した4-META/MMA-TBB レジンをラット頭蓋骨上に塗布し、さらにレジンが硬化する前にrhBMP-2を含浸させたコラーゲンスポンジでレジン上を被覆または被覆しない群を設定し、SB群、TCP群、SB-BMP群、TCP-BMP群の4群とした。術後4, 8週で脱灰薄切標本を作製して光学顕微鏡でレジンと骨の界面の状態を観察するとともに、レジンと新生骨の直接接触率を計測した。

(4) 4-META/MMA-TBB レジンをレジンブロックに塗布し、硬化前にEDC(EDC群)またはアスコルビン酸/塩化銅(AA群)で架橋したナノハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体(nHAC)を圧接、レジン硬化後にrhBMP-2をnHACに含浸して移植試料とした。試料をラット背部皮下結合組織内に移植、縫合し、4週後にレジンと異所性に誘導された骨との界面をSEMで観察するとともに、EDX、XPSで元素分析を行った。さらに、脱灰薄切標本を作製して光学顕微鏡でレジンと骨との界面の状態および新生骨量を計測した。

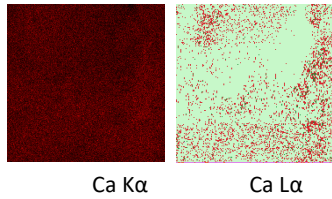
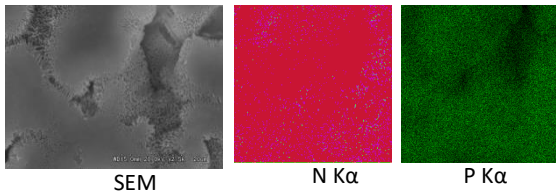
4. 研究成果

(1) 4-META/MMA-TBB レジンとnHACの界面にはレジンともnHACとも異なる層が観察され、この層からNやCa、Siが検出されたことから、レジンとnHACのハイブリッド層が形成されていると考えられた。EDC架橋とアスコルビン酸/塩化銅架橋で比較すると、SEM観察ではハイブリッド層の形態に大きな差はみられなかったが、元素分析ではEDC架橋よりアスコルビン酸/塩化銅架橋の方がCaが多い傾向が見られた。したがって、アスコルビン酸架橋nHACと α TCP60%含有4-META/MMA-TBB レジンの組み合わせが最も硬組織形成に有利と考えられた。



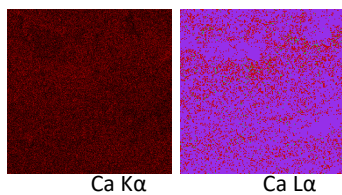
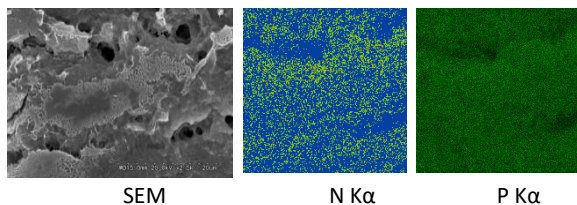
| 元素 | 重量濃度[%] | 原子数濃度[%] |
|-------|---------|----------|
| 6 C | 44.31 | 51.67 |
| 7 N | 43.48 | 43.49 |
| 14 Si | 4.31 | 0.16 |
| 15 P | 5.12 | 2.32 |
| 20 Ca | 6.76 | 2.37 |

α TCP0% アスコルビン酸架橋



| 元素 | 重量濃度[%] | 原子数濃度[%] |
|-------|---------|----------|
| 6 C | 43.49 | 52.78 |
| 7 N | 38.25 | 39.80 |
| 14 Si | 0.28 | 0.14 |
| 15 P | 6.86 | 3.23 |
| 20 Ca | 11.12 | 4.04 |

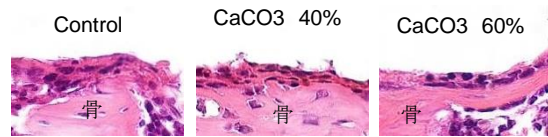
α TCP40% アスコルビン酸架橋



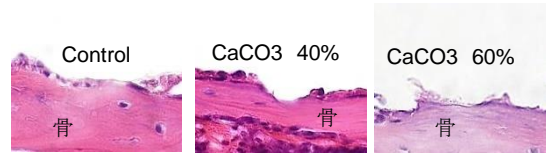
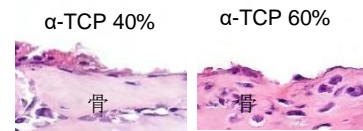
| 元素 | 重量濃度[%] | 原子数濃度[%] |
|-------|---------|----------|
| 6 C | 42.41 | 50.59 |
| 7 N | 42.69 | 43.67 |
| 14 Si | 0.44 | 0.23 |
| 15 P | 6.01 | 2.78 |
| 20 Ca | 7.44 | 2.66 |
| 83 Bi | 1.01 | 0.07 |

α TCP60% EDC 架橋

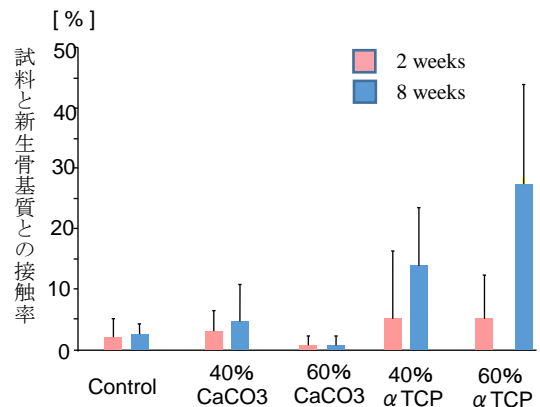
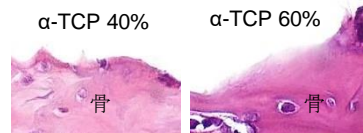
(2) CaCO₃ およびαTCP 複合化レジン、コントロールのいずれにも骨形成が観察され、試料全体を新生骨が被覆していた。試料と骨基質の直接接触はTCPを複合化した試料では継時的に増加が観察され、αTCP60%複合化レジンが最も高い接触率を示した。



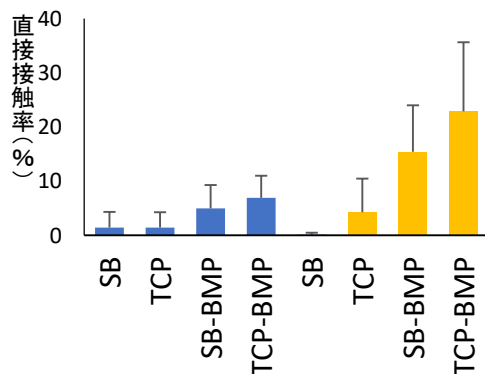
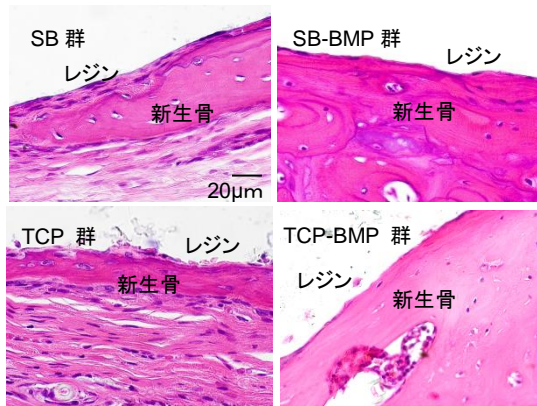
2 週後



8 週後



(3) 4群ともレジン上への新生骨形成がみられたが、BMPを併用したSB-BMP群とTCP-BMP群では全面が骨で被覆されていた。4-META/MMA-TBBレジンと新生骨との界面は、SB群やTCP群では結合組織の介在が多く観察されたが、SB-BMP群とTCP-BMP群では骨基質がレジンと直接接している部分が多く認められた。骨とレジンの直接接触率は、TCP-BMP群が他の3群に比較して有意に高い値を示した。

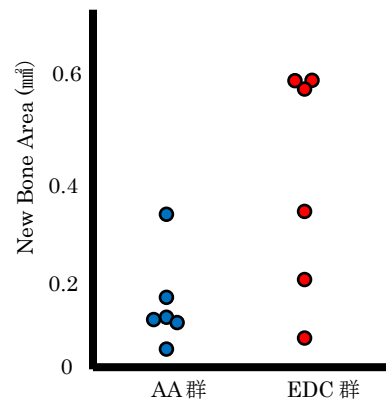
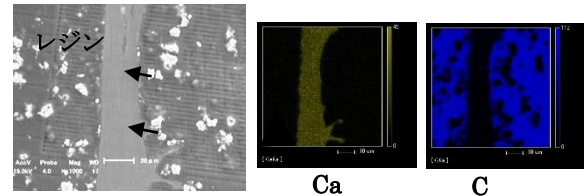
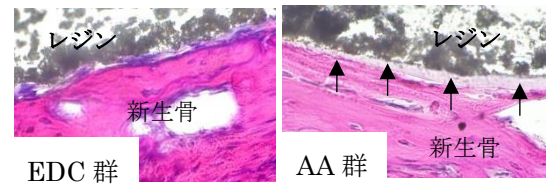


(4) EDC群、AA群のいずれにもレジンとの界面に骨が誘導された。新生骨は梁状で、類骨を含む幼弱骨であった。骨形成量はEDC群の方がAA群より多かったが、レジンと骨の界面に多くの部位で結合組織の介在がみられた。

一方、AA群ではレジンと骨との界面にレジンとも骨とも異なるハイブリッド層(矢印)と考えられる構造が観察され、結合組織が介在することなくレジンと骨が接している部分が多く認められた。SEM観察でもレジンと骨が間隙なく接しており、両者が嵌合して結合している可能性が示唆された。この結果は、AA群で架橋剤に使用したアスコルビン酸や銅がコラーゲンに残存し、レジンの重合率を向上させたためではないかと考えられた。

以上の結果から、BMPで誘導した硬組織が

レジンと結合できる可能性が示された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① 猪俣慶久、菅谷 勉、川浪雅光. α -TCP複合化4-META/MMA-TBBレジン上へのrhBMP-2による骨増生. 北海道歯誌、査読有、37:18-26, 2017.
- ② Sugaya T, Tomita M, Motoki Y, Miyaji H, Kawamami M. 2016, Influence of enamel matrix derivative on healing of root surfaces after bonding treatment and intentional replantation of vertically fractured roots. Dent Traumatol、査読有、32:397-401, 2016.
- ③ 柳沢 剛、菅谷 勉、川浪雅光. 炭酸カルシウムまたは α -TCPを複合化した4-META/MMA-TBBレジン上への新生骨の接触. 北海道歯誌、査読有、36:54-62, 2016.
- ④ Kato A, Miyaji H, Ishizuka R, Tokunaga K, Inoue K, Kosen Y, Yokoyama H, Sugaya T, Tanaka S, Sakagami R, Kawanami M. Combination of Root Surface Modification with BMP-2 and Collagen Hydrogel Scaffold Implantation for Periodontal Healing in Beagle Dogs. Open Dent J.、査読有、30:9:52-9. doi: 10.2174/1874210601509010052. eCollection 2015.
- ⑤ 川浪雅光、菅谷 勉: 4-META/TBB MMAレジンによる歯根の接着治療. 北海道歯

誌、査読有、35：2-7, 2014.

[学会発表] (計4件)

- ① 前田良子, 佐藤賢人, 河野通俊, 工藤 愛, 菅谷 勉: ナノハイドロオキシアパタイト/コラーゲンの架橋剤の違いが4-META/MMA-TBBレジン上へのBMPによる骨形成に及ぼす影響. 日本歯科保存学会、2017年6月8日、リンクステーションホール青森 (青森県・青森市).
- ② 柳沢 剛, 菅谷 勉, 工藤 愛, 佐藤賢人, 猪俣慶久, 川浪雅光: カルシウムを混和した4-META/MMA-TBBレジン上への新生骨の接触. 日本歯科保存学会、2015年6月26日、北九州国際会議場 (福岡県・北九州市).
- ③ 工藤 愛, 鷺巣太郎, 中谷充宣, 菅谷 勉. 表面処理材の濃度の違いによる4-META/MMA-TBBレジンと骨との接着強さの比較検討. 日本接着歯学会、2014年12月13-14日、ニチイ学館 (兵庫県・神戸市).
- ④ 工藤 愛, 菅谷 勉, 柳沢 剛, 猪俣慶久, 佐藤賢人, 中谷充宣, 川浪雅光: 表面処理材の濃度の違いによる4-META/MMA-TBBレジンと骨との接着状態の比較検討. 日本歯科保存学会、2014年6月20日、滋賀県立芸術劇場 (滋賀県・大津市).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/perio.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅谷 勉 (SUGAYA, Tsutomu)

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：10211301

(2) 研究分担者

中塚 愛 (NAKATSUKA, Megumi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00547648

建部 二三 (TAKEBE, Futami)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：10534448

天雲 太一 (TENKUMO, Taichi)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80451425