

2019年7月1日より2020年6月30日までの1年間、国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門ナノバイオ材料応用グループ大矢根綾子先生の下でリン酸カルシウム系材料の歯科器材への応用という課題で研修を行ってきた。

人工材料基材の表面にある種のリン酸カルシウム (CaP) を形成させることにより、同基材に生体親和性をおよび骨結合能を付与できることが知られており、産業技術総合研究所ナノ材料研究部門ナノバイオ材料応用グループ大矢根綾子先生の研究室では、CaP 過飽和溶液中に設置された基材上に低エネルギー密度のパルスレーザー光を照射するプロセス (レーザー援用バイオミメティック法: LAB 法) により、種々の基材表面の目的の部位に CaP 膜を形成できることを示してきた。この技術を応用して硬化した歯科用コンポジットレジン表面への過飽和液中レーザー照射によって、照射面をセメント質の主成分であるアパタイトで被覆できることが報告されている。しかしながら、この技術では約 30 分の処理時間が必要となる。

一方、前駆体利用過飽和溶液法は被成膜基材をカルシウムイオン水溶液ならびにリン酸イオン水溶液に交互浸漬・乾燥を数回繰り返す、アパタイトの前駆体である非晶質 CaP のナノ粒子を基材表面にプレコーティングし、この基材を CaP 過飽和溶液に浸漬するとミクロン厚の低結晶性アパタイト膜が基材表面に生成する。この方法では上記の LAB 法と比較して短時間で基材表面をアパタイトで被覆することが可能となる。

そこで、1年間の国内研修ではこの前駆体利用過飽和溶液法を応用して基材表面にアパタイト膜を成膜し、歯科用コンポジットレジン表面の改質に関する研究を行った。以下に、行った研究内容を記載する。

1. 光重合型歯科用レジン表面へのマイクロ粗面アパタイト膜の液相接合

【緒言】超高齢社会となった現在、歯肉退縮 (主に歯周病に起因) による根面齶蝕が増加している。根面齶蝕は歯肉縁下まで深く進行している場合が多く、歯科用レジン等による齶窩の修復のみならず、軟組織への配慮が必要である。修復したレジンの表面をセメント質成分であるアパタイトで被覆・改質できれば、軟組織付着性の改善により予後の向上につながる可能性がある。そこで、本研究では、硬化前の光重合型レジン泥上にマイクロ粗面アパタイト膜を圧接した状態で光照射することで、レジン表面にアパタイト膜を液相接合する技術の開発を目指した。具体的には、マイクロ粗面アパタイト膜を生成させたポリエチレンテレフタレート (PET) フィルムをレジン泥に圧接し、フィルム側から光照射してレジンを硬化させた。フィルムを剥離した後、レジン表面へのアパタイト膜の接合状態を検討した。

【実験】1辺10mmの正方形に切断したPETフィルムを洗浄・乾燥後、30Pa、1.0W/cm²、30秒の条件にて酸素プラズマ処理に付した。同フィルムを、塩化カルシウム水溶液およびリン酸水素カリウム三水合物水溶液中に交互に3回浸漬した後、リン酸カルシウム過飽和溶液中に24時間浸漬することで、マイクロ粗面 (図1右) を有するアパタイト膜の生成を行った。

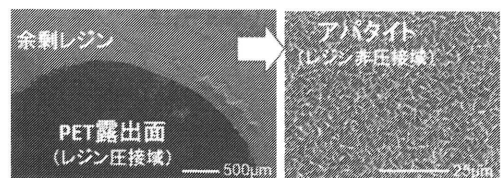


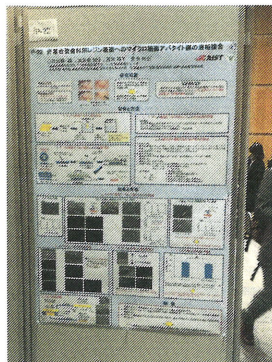
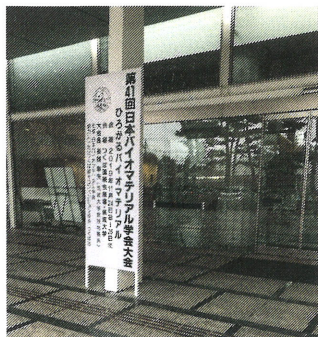
図1 光照射・剥離後PETフィルム表面のSEM像

内径5.0mm、厚さ1.6mmの金属製モールド内に光重合型高流動性コンポジットレジン (グレースフィルフロー、ジーシー) を填入した。このレジン表面に、アパタイト膜が接触するようにPETフィルムを圧接した。LED型光照射器 (ペンキュア、モリタ製作所) を用いて、フィルム側より10秒間光照射を行いレジンを硬化させた。その後、PETフィルムをレジン表面から剥離した。アパタイト膜のレジン表面への接合を確認するために、剥離後のPETフィルムおよびレジンの表面を走査電子顕微鏡 (SEM) 観察およびエネルギー分散型X線分光 (EDX) 分析により調べた。また、接合膜の密着性をScotch®テープ剥離試験により簡易評価した。

【結果と考察】アパタイト成膜フィルムを通して光照射した場合でも、レジン硬化した。剥離後のPETフィルム表面を分析したところ、レジン圧接域にはCaとPがほとんど検出されなかったことから、アパタイトではなくPETが露出していると考えられた。周囲の非圧接域には、余剰レジンとマイクロ粗面アパタイトが観察された (図1)。一方、レジン表面にはCaとPが検出されたことから、PETフィルムよりレジン表面にアパタイト膜が転写されたことが確認できた。レジン表面のアパタイト膜は緻密で平坦な表面構造を有し、レジンの表面全体を覆っていた。このアパタイト膜は、Scotch®テープ剥離試験後にもレジン表面に残存したことから、良好な膜密着性が示唆された。アパタイト膜のマイクロ凹凸面

のレジン硬化・接合によるアンカー効果が寄与している可能性がある。

以上、本法によりアパタイト膜をコンポジットレジン表面に液相接合できた。力学的性質への影響等、今後検討すべき課題は多いものの、根面齶蝕治療への応用の可能性が考えられた。



この研究内容に関して 2019 年 11 月 25~26 日につくば国際会議場で開催された第 41 回日本バイオマテリアル学会大会にて発表を行った。

2. アパタイト成膜フィルムによる光重合型歯科用レジンの簡易表面改質

【緒言】超高齢社会を迎えた我が国では、歯周病や加齢による歯肉退縮に伴う根面う蝕（歯の根元部分の虫歯）の増加が問題となっている。根面う蝕は歯肉の縁よりも内部にまで深く進行している症例が多く、歯科用レジン等によってう窩（う蝕により生じた穴）を修復するだけでなく、軟組織付着性への配慮が求められる。レジン修復面を、本来の歯根面に近いセメント質様の表面に改質できれば、軟組織付着性の改善による予後向上が期待される。近年、硬化したレジンへの過飽和液中レーザー照射によって、照射面を、セメント質の主成分であるアパタイトで被覆できることを報告した。しかしこの技術では、30分もの処理時間を必要とした。そこで本研究では、通常のレジン硬化処置（10秒程度LED照射）と同時に、レジンの表面をアパタイトで被覆する技術の開発を目指した。具体的には、マイクロ凹凸構造を有するアパタイトを透明ポリエステルフィルムの表面に成膜し、同フィルムを表面に圧接した状態で光重合型レジン泥を硬化させることで、レジン硬化体の表面にアパタイト膜を転写した。得られたレジン硬化体について、表面および表層断面の構造、曲げ強さ、ならびに細胞親和性を評価した。

【実験方法】厚さ 23 μm の透明ポリエステルフィルムを酸素プラズマ処理した後、 CaCl_2 および $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ のエタノール水溶液に3回ずつ交互に浸漬することでリン酸カルシウム足場層をプレコートした。同フィルムをリン酸カルシウム過飽和溶液に24時間浸漬し、マイクロ凹凸構造を有するアパタイト膜を表面に成膜した。金属製モールド内に填入した光重合型高流動性コンポジットレジン泥（グレースフィルフロー；ジーシー製）の表面に、レジン泥とアパタイト膜とが接触するよう前記フィルムを設置し、スライドガラスで圧接した。LED照射（10秒間）によりレジンを硬化させた後、表面よりフィルムを剥離した。レジン硬化体および剥離フィルムの表面を走査電子顕微鏡（SEM）観察ならびにエネルギー分散型X線分光（EDX）分析により調べた。また、樹脂包埋法およびイオンミリング法によりレジン硬化体の断面試料を作製し、SEM-EDX分析によりアパタイト膜との接合界面を調べた。さらに、レジン硬化体の曲げ強さをJIS T6514:2015に準じた曲げ試験により（ $n=6$ ）、細胞親和性をマウス線維芽細胞（NIH3T3）の培養により（ $n=7$ ）、それぞれ評価した。Controlとしては、通常の硬化法（アパタイト非成膜フィルム使用）で作製されたレジン硬化体を用いた。

【結果と考察】SEM観察およびEDX分析の結果、剥離後のフィルム表面に残存アパタイトは認められず、レジン硬化体の表面にアパタイト膜が完全に転写されたことを確認した。レジン硬化体の断面分析において、アパタイト膜との界面に空隙は確認されず（Fig. 1）、レジンとアパタイト膜との良好な接合が認められた。アパタイト膜を転写したレジン硬化体は、Controlと同等の曲げ強さを示した。また、7日間培養後のNIH3T3細胞は、Control表面に対しアパタイト膜を転写したレジン硬化体の表面で有意に多く、アパタイト膜による細胞親和性の向上が示唆された。

以上、通常の歯科用レジンの硬化処置で使用されるポリエステルフィルムをアパタイト成膜フィルムに置き換えるだけでレジン表面を改質できる可能性を示した。

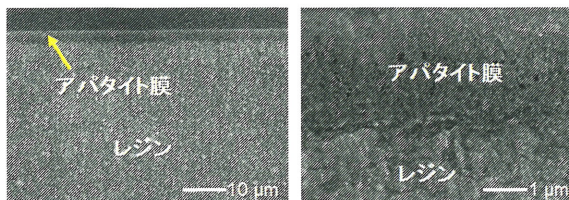


Fig. 1 Cross-sectional SEM images, at lower (left) and higher (right) magnifications, of the