

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

## 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍)	田井康晴(神奈川県)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	甲第496号
学位授与年月日	平成31年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学位論文題目	Electron Microscopic Study on the Formation of Hardened Molds of Calcium Phosphate Crystals Containing Gelatin (ゼラチン含有リン酸カルシウム硬化体の形成に関する電子顕微鏡的研究) Journal of Hard Tissue Biology 第28巻 第2号 165頁~173頁掲載 平成31年4月発行
論文審査委員	主査 教授 山本雄嗣 副査 教授 山越康雄 副査 教授 細矢哲康

## 内容の要旨

## 【緒言】

近年、生体の硬組織である骨や歯の補填材料に関する多くの研究が報告されている。骨の補填材料には吸収性や非吸収性の生体親和性材料が数多く開発され、すでに広く臨床に用いられている。しかし、歯の補填材料には、長期にわたり金属やレジンなどが使用され、生体親和性材料の開発にはいたっていない。

硬組織の構成成分は、リン酸カルシウムのアパタイト、有機質ならびに水であるが、歯においては、さらにエナメル質、象牙質、セメント質の3種類から構成され、それぞれ成分割合は異なっている。また代謝系で比較すると、骨はリモデリングが繰り返されるのに対し、歯は加齢や周囲環境によって石灰化が亢進するのみである。したがって、歯の補填材料としての生体親和性材料の開発研究では、これらの代謝系の特徴を十分に考慮する必要がある。石灰化に関する研究は多いが、中でも hidroksiapatit (以下 HAP) の前駆物質である、非晶質リン酸カルシウム (以下 ACP) や、リン酸オクタカルシウム (以下 OCP) やリン酸テトラカルシウム (以下 TCP) 等のリン酸カルシウム結晶に関する研究が盛んであり、近年、常温における ACP から HAP の転換に関して報告がなされた。

本研究では、象牙質をモデルとした生体親和性補填材料の開発のために、種々の基礎的データを得ることを目的に *in vitro* で以下のような項目に関して観察した。

すなわち、リン酸カルシウム結晶の合成時に、有機質(ゼラチン)を添加した場合の結晶の形態ならびにサイズについて、ゼラチン含有リン酸カルシウム結晶による硬化体の機械的強度について、さらに ACP 含有の上記硬化体が蒸留水あるいはフッ化物水溶液と反応した場合についても観察した。

## 【材料と方法】

7通りの方法で合成したリン酸カルシウム結晶および非晶質リン酸カルシウム (ACP) から、試料として以下の乾燥粉末を得た。

- ① 80℃で合成したアパタイト (80℃-HAP)
- ② 60℃で合成したアパタイト (60℃-HAP)
- ③ 60℃でフッ化物を添加して合成したフッ素化アパタイト (60℃-FAP)

60℃以下の条件で

- ④ 1%ゼラチン溶液中で合成したアパタイト (1% GHA)
- ⑤ 10%ゼラチン溶液中で合成したアパタイト (10% GHA)
- ⑥ フッ化物を添加し、1%ゼラチン溶液中で合成したフッ素化アパタイト (1% GFA)
- ⑦ フッ化物を添加し、10%ゼラチン溶液中で合成したフッ素化アパタイト (10% GFA)
- ⑧ 常温にて合成した ACP

ACP (⑧) を除く7種の乾燥粉末は、X線回折によって粉末中のアパタイト含有率を測定した。また、全ての粉末をコロジオンメッシュに滴下し、結晶の形態について透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

7種の乾燥粉末を用いて真空加圧法で硬化体を成型し、超薄切切片 (約60 nm) を作製して結晶の形態ならびにサイズをTEMにて観察した。さらに、ゼラチン含有試料については機械的強度を観察するために、密度ならびに切削動力値を測定した。切削動力値に関しては、同サイズに加工したヒト象牙質と比較した。

次に、10% GHA (⑤) および10% GFA (⑦) とACPの割合が9:1 (重量比) になるように粉末を調整し、GHA・ACP硬化体ならびにGFA・ACP硬化体を作製した。これらの硬化体を蒸留水あるいは1 ppm NaF水溶液に60分浸漬し、同様に超薄切切片を作製して結晶の形態ならびにサイズをTEMにて観察した。なお、結晶サイズに関しては、統計学的検索を行った。

#### 【結 果】

7種の乾燥粉末におけるアパタイトの含有率は80℃-HAPが93%で最も高く、60℃-FAPが89%、10% GFAが86%、1% GFAが76%であった。また、1% GHAは64%、60℃-HAPは63%、10% GHAは59%であった。なお、すべての試料においてOCPならびにTCPが確認された。結晶形態は、80℃-HAPと60℃-HAPで柱あるいは針状の結晶が観察され、1% GHAと10% GHAでは小型の針状結晶、1% GFAと10% GFAでは粒状の結晶が認められた。

硬化体のa軸における結晶サイズは、10% GHAが1% GHAに比べ有意に大きかった。また、1% GHAおよび1% GFAは、それぞれ60℃-HAPと60℃-FAPに比べて有意に小さかった。しかし60℃-FAPと10% GFAには有意差は認められなかった。なおc軸においては、1% GHAと10% GHAに有意差は認められなかった。しかし、10% GFAは1% GFAよりも有意に大きかった。また、各ゼラチン濃度においてGFAはGHAよりも有意に小さかった。

本研究で作製した硬化体の密度は近似しており、平均密度は $2.02 \pm 0.074$  (mg/mm<sup>3</sup>) であった。切削動力値の測定では、10% GFAは他の硬化体に比較して、切削器具の回転トルク値を示すX軸が5.720 N、器具の送りを示すY軸が4.116 N、軸方向の切削を示すZ軸が3.474 Nで大きな切削動力が必要であった。なお、象牙質はX軸が4.442 N、Y軸が2.417 N、Z軸が3.108 Nであり、X軸では1% GHAが、Y軸では10% GHAが、Z軸では10% GFAが類似の数値を示した。

GHA・ACPならびにGFA・ACP硬化体は、蒸留水およびフッ化物水溶液に浸漬することで結晶の凝集が観察された。各条件における結晶サイズは、a軸において有意差はないが、c軸においては、GHA・ACP硬化体を1 ppm NaF水溶液に浸漬することで有意に大きくなり、GFA・ACP硬化体では、蒸留水ならびに1 ppm NaF水溶液への浸漬で有意に小さくなった。

#### 【考 察】

アパタイトの含有率は合成温度の低下に伴って減少するが、80℃に比べ60℃での合成であってもアパタイト減少率が僅かであったのは、フッ化物の添加によりアパタイトの析出が活発になったためと思われる。アパタイト結晶は成熟することで柱状の形態を呈するが、粒状の形態を示した試料は添加されたフッ化物によりc軸が短くなったためと考えられる。

アパタイト結晶はフッ化物の添加により安定するが、ゼラチンの影響によって大きさが縮小する結果が認められたことから、これまで報告されている結晶成長の抑制以上の影響がおよんでいることが推察された。また、GHA・ACP硬化体においては、フッ化物水溶液の浸漬のみで結晶が大きくなる状況が認められたが、これはACPからHAPが直接析出したためと思われる。

10% GFAが最も高い機械的強度を示したのは、TEM観察で認められた。他と比較して均一な粒状結晶の配列によると考えられる。象牙質の切削動力値が、軸により異なった硬化体と類似した結果を示したのは、象牙細管の走行をはじめとした象牙質の構造によるものと考えられる。さらに、象牙質の切削方向を含めた比較と検討が必要である。

#### 【結 論】

本研究の結果から、補填材料としての機械的強度を得るためには、10%ゼラチンとフッ素化アパタイトの組合せが良好であり、充填後の経時的な石灰化には、ACP添加とフッ化物水溶液への浸漬が有効であることが示唆された。これらの構成

による生体親和性補填材料の開発は、歯科臨床にとって有用性が高いと思われる。

### 審査の結果の要旨

現在用いられている生体硬組織への補填材料は、骨に対しては数多くの吸収性または非吸収性の生体親和性材料が開発されて臨床応用されているが、歯に対する材料は金属やレジンといった材料が用いられ、生体親和性材料が歯質修復材料に応用されてはいない。

そこで本研究は、生体親和性歯質修復材の開発を目標に、リン酸カルシウム結晶の合成への有機質（ゼラチン）の影響、ゼラチン含有リン酸カルシウム結晶硬化体の機械的強度、蒸留水あるいはフッ化物水溶液による硬化体結晶への影響について検討を行ない、その基礎的データの獲得を目的とした。

合成温度、ゼラチンの有無とゼラチン溶液の濃度、フッ化物添加の有無から7条件でリン酸カルシウムを合成し、X線回折によって合成粉末中のアパタイト含有率を測定した。また、粉末中の結晶形態を透過型電子顕微鏡（TEM）で観察した。次にこの粉末を真空加圧して硬化体を成型、その超薄切片で再び結晶形態をTEM観察した。さらにゼラチン含有試料については、強度評価のために密度と切削動力値を測定した。切削動力値は、同形態のヒト象牙質と比較した。次にアパタイトもしくはフッ素化アパタイトと非晶質リン酸カルシウム（ACP）の混合粉末を調整し、硬化体を作製した。これらの硬化体を蒸留水あるいは1 ppmNaF水溶液に60分浸漬した後、超薄切片を作製し、その結晶形態をTEM観察した。なお、TEM観察によって得られた結晶サイズは統計学的比較を行った。

その結果、本研究では以下のことが明らかとなった。

1. 歯質修復材料としての機械的強度を獲得するためには、10%ゼラチンとフッ素化アパタイトの組み合わせが適していた。
2. ゼラチン含有リン酸カルシウム硬化体の経時的な石灰化にはACP添加とフッ化物水溶液への浸漬が有効であった。

現在臨床で使用されている金属や有機・無機混合材料は、生体内にて劣化していくのみであるのに対し、本研究では周囲歯質とともに石灰化亢進を示す歯質修復材の可能性が示されており、これは生体活性を示す新しい歯質修復材開発の基礎を築いたものと考えられ、歯質修復の発展に大きく貢献するものである。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。