

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22592107

研究課題名（和文）白金ナノコロイドを応用した低細胞ストレス修復法の確立

研究課題名（英文）Development of the method for biocompatible resin composite system utilizing with colloidal platinum nano-particles.

研究代表者 野田 守 (NODA MAMORU)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：10301889

研究成果の概要（和文）：う蝕治療で多く用いられている光重合型コンポジットレジン（ラジカル）を利用して重合硬化する歯科材料である。しかしながら、過剰なラジカルは細胞にとってストレスとなり、細胞障害の原因となることがある。本研究では抗酸化作用をもちラジカル捕捉能があるとされている白金ナノコロイドを利用して光重合型コンポジットレジンの重合に用いられているラジカルによる細胞ストレスを低減させる方法について検討を加えた。

研究成果の概要（英文）：

Light cured dental resin composites were cured by utilizing free radicals. However, the radical sometimes alter intracellular metabolism and shows toxic effect. In the present study, the possibility of colloidal platinum nanoparticles, which have an ability to scavenge free radicals, to decrease cellular stress during curing light cured resin composites was investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：保存修復学

1. 研究開始当初の背景

光重合型コンポジットレジン（ラジカル）は保存領域で広く用いられている材料である。特に象牙質への接着力が飛躍的に向上したことと、臼歯部においても審美的な修復への需要が高まっていることが大きな要因となり、適応症例が拡大している歯科材料といえる。

しかしながら、光重合型コンポジットレジン（ラジカル）は半完成品であり、実際に口腔内で重合硬

化されて初めて完成した修復物となる。象牙質に用いられる場合はその環境では、象牙細管からの浸出液などがあり、重合率は 60%程度と言われている。従って、未反応のモノマーが歯髄をはじめとする周囲細胞に様々な影響を与えることが示唆されている。そして複数のモノマーによる相加相乗的な細胞内代謝経路への複雑な作用があることを我々は報告してきた。さらに重合に利用されるラ

ジカルが細胞内代謝経路、とりわけ細胞防御機構に重要なGSH活性に阻害的に働くことを明らかにした。このようなことから口腔内で重合硬化させなければならない光重合型コンポジットレジンが周囲細胞に多くの細胞性ストレスを与えていることが考えられた。

白金ナノコロイドは抗酸化作用が有り、細胞内で有害に働くフリーラジカルを捕捉することで効果を発揮すると報告されている。そこで本研究では白金ナノコロイドを用いて、光重合型コンポジットレジンの重合硬化に利用されているフリーラジカルを細胞外で捕捉することで、コンポジットレジンの有する細胞ストレスを低下させ、生体により優しいコンポジットレジン修復法を確立することが生体親和性に優れた材料を利用した修復法の開発につながるのではないかと考えられ本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

光重合型コンポジットレジンに感光剤としてカンファーキノン、重合開始材としてⅢ級アミンであるジメチルアミノエチルメタクリレートによりラジカルを発生させている。本研究では、

(1) カンファーキノンとジメチルアミノエチルメタクリレートに460nmの光を照射してラジカルを発生させた時の細胞代謝活性の変化を調べる。

(2) このラジカル発生系に白金ナノコロイドを添加した場合の細胞代謝活性を測定する。

ことで、ラジカル発生系の細胞内代謝活性への影響と白金ナノコロイドによるラジカル捕捉能を定量的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法および結果

(1) 細胞

ヒト由来単球細胞 THP-1 (ATCC TIB 202) を RPMI1640 培地(10%FBS、200mM glutamine 100unit/mL penicillin、100μg/mL streptomycin、50μM β-mercaptoethanol 添加)で培養して使用した。

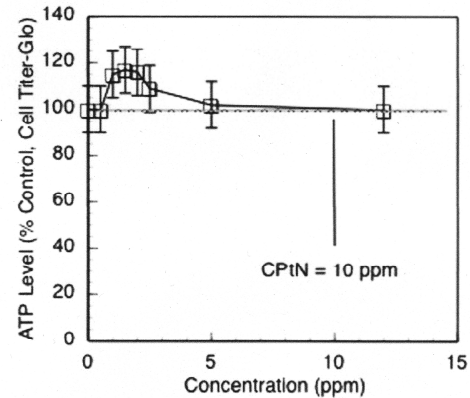
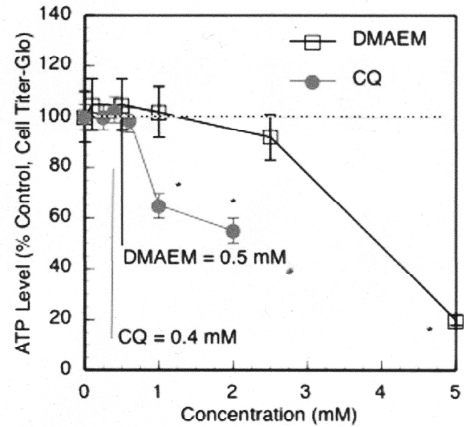
(2) ラジカル発生系の細胞内代謝への影響

THP-1 細胞にカンファーキノン(0-5 mM)、ジメチルアミノエチルメタクリレート(0-2 mM)を、濃度を変えて加え、24 時間後に SDH 活性を測定した。

(3) 白金ナノコロイドの細胞内代謝活性への影響

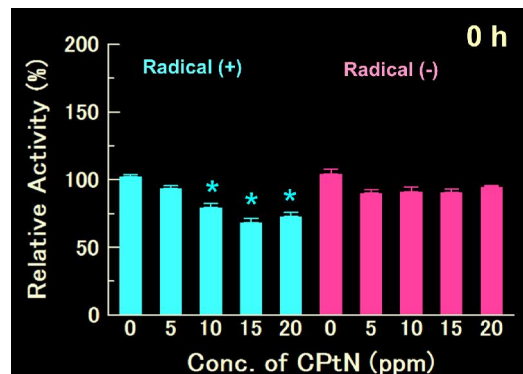
THP-1 細胞に白金ナノコロイド(0-20 ppm)、を、濃度を変えて加え、24 時間後に SDH 活性を測定した。

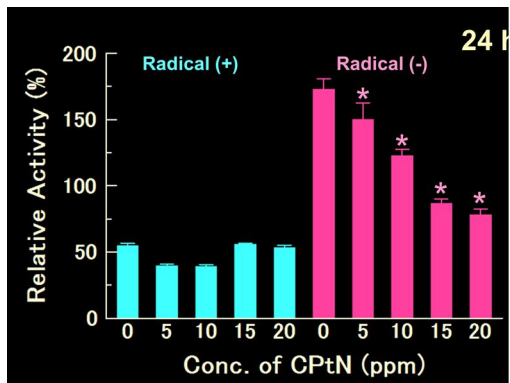
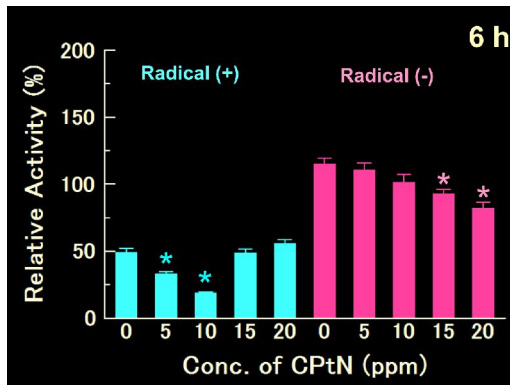
(2)および(3)の結果を下記に示す。



これらの結果から、ラジカルを発生させるために用いるカンファーキノンとジメチルアミノエチルメタクリレートの添加濃度は見かけ上、細胞活性に影響を与えない濃度として、カンファーキノン0.4mM、ジメチルアミノエチルメタクリレートを0.5mMとした。

(4) 白金ナノコロイドのラジカル捕捉能
カンファーキノン0.4mM、ジメチルアミノエチルメタクリレート0.5mMを添加した THP-1 細胞に白金ナノコロイドを濃度を変えて (0-20ppm) 加えた後、光照射器で40秒光照射を行いラジカルを発生させた。そして6時間後と24時間後にSDH活性を測定した。





これらの結果から、白金ナノコロイドは単独では細胞代謝活性に影響を与えないが、カンファーキノン、ジメチルアミノエチルメタクリレートと共存すると細胞代謝活性に抑制的に作用した。さらに、ラジカルを発生させた場合は、細胞活性は約50%に低下した。また、白金ナノコロイド添加しても細胞代謝活性の低下を抑制することはできなかった。むしろ、カンファーキノン、ジメチルアミノエチルメタクリレートと相加的に細胞代謝に抑制的に影響していることが示唆された。以上の事から、細胞外で生じる光重合型コンポジットレジンの重合に利用されているフリーラジカルを白金ナノコロイドにより捕捉除去することが非常に困難であることが示唆された。

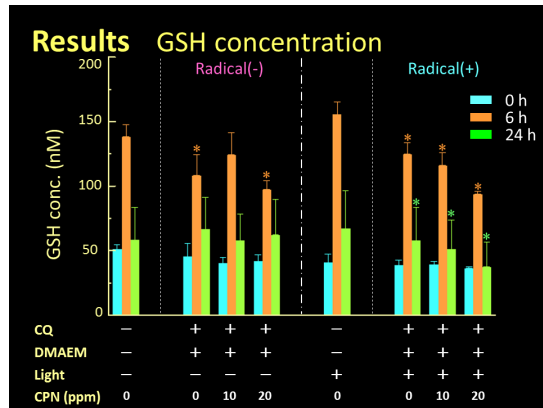
しかしながら、フリーラジカルや白金ナノコロイドが細胞内への代謝活性に影響していることは明らかとなり細胞内でどのような作用をしているかを検討することは必要と考えられた。

(5) フリーラジカルおよび白金ナノコロイドの細胞内グルタチオン濃度に及ぼす影響

細胞外で発生したラジカルが細胞内解毒機構で重要な役割を担っているグルタチオン系にどのように影響しているか、また、白金ナノコロイドにより細胞内で補足されているかを検討するために、細胞内グルタチオン

濃度への影響を測定した。

カンファーキノン 0.4mM、ジメチルアミノエチルメタクリレート 0.5mM を添加した THP-1 細胞に白金ナノコロイド (0、10、20ppm) を加えた後、光照射器で 40 秒照射によりラジカルを発生させ、6 時間後と 24 時間後に細胞内 GSH 濃度を測定した。



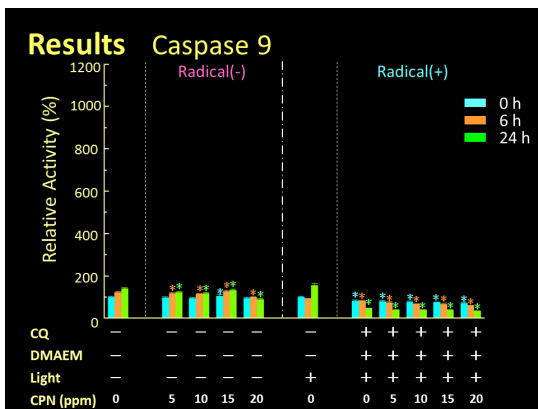
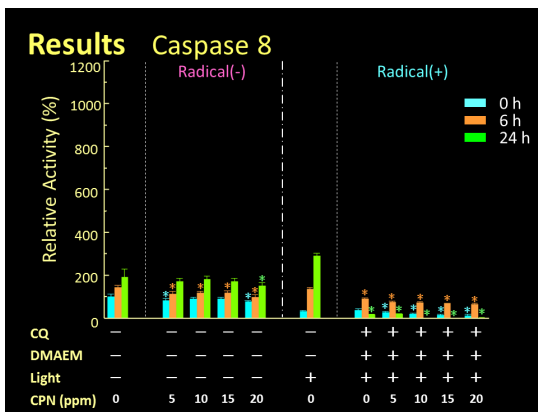
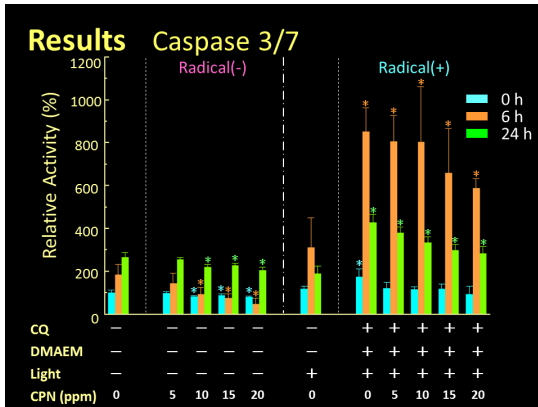
細胞内 GSH 濃度は細胞刺激の有無にかかわらず変動していた。ラジカルが発生していない条件ではカンファーキノン並びにジメチルアミノエチルメタクリレートの存在、および白金ナノコロイド濃度によって細胞内 GSH 濃度が一定の傾向を持って変化する現象は認められなかった。ラジカルを発生させた場合は GSH の濃度が低下する傾向が有意認められた。このことから、細胞内において白金ナノコロイドがラジカルを捕捉することで細胞解毒機構である GSH 合成系に影響を及ぼしていないと考えられた。しかしながら、ラジカルが細胞内代謝活性や GSH 濃度に抑制的に作用していることが明らかとなった。特に細胞の防御機構に対して抑制的に働きかけていることが示唆された。

(6) フリーラジカルのアポトーシス誘導経路に及ぼす影響

細胞外で生じたフリーラジカルにより細胞内代謝活性が低下するものの、細胞防御機構として重要な役割を担っている細胞内グルタチオン濃度に影響は認められなかった事から、ラジカルがどのように細胞に影響を及ぼしているかを検討する必要があると思われる。そこで、アポトーシス誘導経路に影響を及ぼしているかについて調べた。

カンファーキノン 0.4mM、ジメチルアミノエチルメタクリレート 0.5mM を添加した THP-1 細胞に白金ナノコロイド (0-20ppm) を加え、光照射器で 40 秒照射を行いラジカルを発生させ、6 時間後と 24 時間後にアポトー

シス誘導に關与する Caspase3/7、Caspase8
ならびに Caspase9 の活性を測定した。



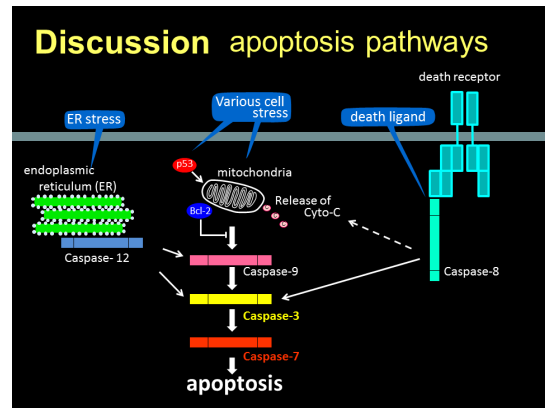
ラジカル発生条件下では、Caspase3/7
が6時間後に顕著に上昇を示した。しかしな
がら、Caspase 8、Caspase 9 の活性上昇は認
められなかった。

アポトーシスが誘導される経路には主と
して右図に示された経路が報告されている
が、最終的には Caspase 3/7 が活性化されて
アポトーシスが誘導される。従って、本研究
の結果では Caspase 3/7 が有意に活性上昇を
示したことから、細胞外で発生したフリーラ
ジカルによって、THP-1 細胞にアポトーシス
が誘導されることが示唆された。

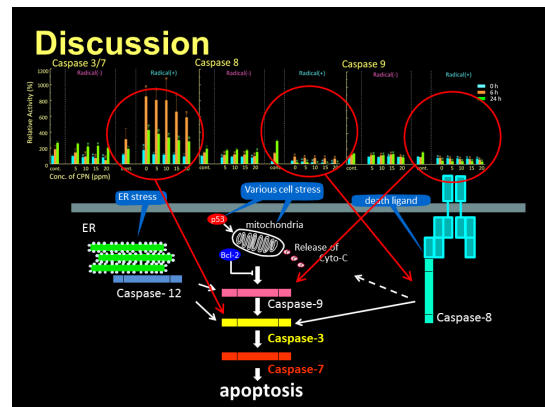
アポトーシスを誘導する経路は、

- ① 様々な細胞内ストレスがミトコンドリアを介して伝達され、Caspase-9 が活性化して、Caspase 3/7 活性化を介して誘導される経路
- ② 細胞外からの刺激に対して death receptor を介して Caspase 8 が活性化して Caspase3/7 活性化へと伝達誘導される経路
- ③ 小胞体を介して Caspase 12 の活性化により Caspase 9 あるいは Caspase 3 が活性化して誘導される経路 (ヒトでの報告はない)

が知られている (下図参照)。



本研究では、Caspase 8 ならびに Caspase
9 の活性上昇が認められなかったことから、
①あるいは②によるアポトーシス誘導では
ないことが示唆された (下図参照)。



これらの結果から、細胞外で発生したラジ
カルが細胞内に侵入し、Caspase 12 の関与
した経路あるいはこれまで報告のない経路
でアポトーシスを誘導していることが示唆
された。

4. 研究成果

本研究では、齲蝕治療に広く用いられる光重合型コンポジットレジン中のラジカルによる細胞ストレスを低減させることでより生体親和性の高い修復システムを構築することを目的として研究をおこなった。

その方法としてラジカルを捕捉して抗酸化作用があるといわれている白金ナノコロイドの応用の可能性について検討した。その結果、細胞内外において白金ナノコロイドがカンファーキノン並びにジメチルアミノエチルメタクリレートによって生じたフリーラジカルに対して捕捉作用を示す可能性は低いと思われた。

しかしながら、生じたフリーラジカルが細胞内に侵入してこれまで報告されていない誘導経路でアポトーシスを誘導することが示唆された。

従って、この誘導経路をさらに研究して、ラジカルがどのように作用するかを明らかにすることで、より生体親和性の高い日買い重合型コンポジットレジンの開発に貢献できるものとする。

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1件)

Kachi H, Noda M, Wataha JC, Nakaoki Y, Sano H.

Colloidal platinum nanoparticles increase mitochondrial stress induced by resin composite components. (査読有)

J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011, (2):193-8.

[学会発表] (計1件)

H. Kachi, M. Noda, Y. Nakaoki, H. Sano
#3675 Effect of Colloidal Platinum Nano-particles on Monocytes.

IADR, Barcelona, Spain

July 16, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 守 (NODA MAMORU)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：10301889

(2) 研究分担者

佐野 英彦 (SANO HIDEHIKO)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：90205998

(3) 連携研究者

中沖 靖子 (NAKAOKI YASUKO)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50302881