

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462959

研究課題名(和文) 象牙質内因性マトリックスメタロプロテアーゼ活性を抑制する接着修復法の開発

研究課題名(英文) The development of a new dental adhesive restoration to reduce dentin endogenous matrix metalloproteinases activity.

研究代表者

西谷 佳浩 (Nishitani, Yoshihiro)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：60325123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：コンポジットレジン修復治療後の再治療を少なくするための接着修復法を確立することを目的として、接着性能を低下することなく、象牙質MMPs活性を抑制する新たな接着システムについて検討を行った。その結果、生体に応用可能な架橋剤であるジエチレントリアミン五酢酸を配合することによって目的を達成できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of establishing a dental adhesive methods to reduce the re-treatment after the resin composite treatment, without lowering the adhesive performance, it was examined a new adhesive system to reduce the dentin MMPs activity. As a result, the possibility of achieving the purpose by adding diethylene triamine pentaacetic acid is a crosslinking agent that can be applied clinically.

研究分野：保存修復学

キーワード：接着歯学 象牙質 マトリックスメタロプロテアーゼ レジン

1. 研究開始当初の背景

接着修復治療後に接着界面が劣化する原因として象牙質内因性 MMPs の活性化が注目されている。これまでに MMPs 活性を阻害する試みがなされているものの、未だ解決されていないのが現状である。それらの試みは MMPs の活性を抑制する、あるいは不活化するための検討であり、以下の3つに分類される。(1) MMPs は立体構造を維持するためにカルシウムを必要とすることから、歯面処理に EDTA でカルシウムをキレートする方法が提案されているが、脱灰能が弱いことから歯面処理時間が長くなってしまふ欠点がある (Sauro S et al, *J Dent*, 37,279-288, 2009)。(2) MMPs をグルタルアルデヒドを用いて架橋することによって不活化する方法については、MMPs を効果的に不活化することが可能であるものの、生体内に余剰のグルタルアルデヒドが残留した場合の毒性が危惧される (Lynn L et al, *J Biomed Mater Res*, 24, 1185-1201, 2009)。(3) MMPs に非特異的なインヒビターであるクロルヘキシジン (CHX) を用いて亜鉛をキレートして酵素活性を阻害する方法については、長期間持続的に作用することが明らかとなっている (Breschi L et al, *Dent Mater*, 26, 571-578, 2009) が、歯面処理直後には効果が得られない。CHX をオールインワン接着システム中に配合して応用した場合にも、同様の効果が得られることを申請者は見出しているものの、CHX による方法は、MMPs 活性の抑制が行われるのみであり、修復治療の際に MMPs を不活化しない限り接着界面の劣化が生じるリスクは完全には解決されない。すなわち、歯面処理時に象牙質内因性の MMPs を架橋して不活化し、さらにバックアップ機能として低濃度のクロルヘキシジンを接着システム中に配合する方法が理想と言える。しかしながら、このような観点から接着界面の MMPs 活性を抑制する検討は全くされておらず、この点に関する情報を得ることは急務であると考えられることから、これまでに架橋剤の1つである 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) に着目し、EDC の架橋効果による初期の MMPs 活性阻害を検討してきた。その結果、セルフエッチングアドヒーズに EDC を 3%以上配合した場合には MMPs 活性の抑制が行えるものの、本来の接着強さが低下することが明らかとなった。クロルヘキシジンの配合については 0.5%以下の配合濃度においては接着性を低下することなく長期水中浸漬後の MMPs 活性阻害に寄与することが明らかとなった。3%以上の EDC 配合によって接着性が低下する原因として、EDC は pH4~5 で効果的に作用する架橋剤であることから、pH2~3 の酸性下で作用させるセルフエッチングアドヒーズに配合して応用する場合には、多量の EDC が必要となり、

セルフエッチングアドヒーズの重合を阻害することが考えられた。

2. 研究の目的

コンポジットレジンを用いた接着修復治療では、術後数年以上経過した症例において、修復物周辺から発生する二次う蝕を主とした再治療の必要に迫られる機会が多い。その原因の一つとして、歯面処理時に活性化された象牙質内因性マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) が周辺の象牙質コラーゲンを加水分解する結果、接着界面の劣化が生じることがあげられる。そこで、今回は酸性モノマーと pH が近似しており、かつ生体内へ造影剤として使用されている Diethylene Triamine Pentaacetic Acid (DTPA) に着目し、DTPA のキレート効果による初期の MMPs 活性阻害および CHX による長期間かつ持続的な MMPs 活性阻害を同時に行うことによって、象牙質接着界面の劣化を抑制する接着修復法を開発することを目的とした。すなわち、造影剤として既に臨床応用されているキレート剤である Diethylene Triamine Pentaacetic Acid (DTPA) を配合したセルフエッチング接着システムを試作し、歯面処理時に象牙質 MMPs を不活化した場合の接着直後から 2 年後までの MMPs 活性および接着性能について長期的な検討を行うことによって、象牙質接着性を損なわず、かつ MMPs 活性を抑制する接着修復法を確立することを目的とする。

セルフエッチングシステムに MMPs を不活化させる Diethylene Triamine Pentaacetic Acid (DTPA) を配合する試みは世界初の試みであることから、平成 25 年度で歯面処理直後における象牙質接着性を低下することなく、かつ MMPs 活性阻害が可能な DTPA の適正濃度を確定する。DTPA 配合量に応じて変化する pH を調整するためには、芳香族アミンの量を調節する予定である。26 年度では、確定した条件の試作接着システムを用いて 2 年間水中浸漬用接着試験用試料および MMPs 活性測定用試料を作製する。

水中浸漬期間を 24 ヶ月間までとし、27 年度内に測定を終了する。

さらに得られた結果をもとに DTPA 濃度の至適濃度を解析する。研究の総括として、歯面処理時に MMPs を不活化し、かつ長期間にわたり MMP 活性を抑制できる接着システムを確定する。

現在の接着修復材料は歯質への接着力を向上させることに重点を置いて開発されている。その結果、修復直後の接着性は良好であり、強固なものとなっている。しかしながら、早いものでは 1 年経過後に形態学的な観点から接着界面の劣化が生じることが *in vivo* あるいは *in vitro* の研究で報告されている。この問題に対して接着性を低下させることなく、象牙質内因性の MMPs を初期の段階である歯面処理時に不活化し、さらにその後

長期にわたり抑制を行う試みは、国の内外を通じて本研究が初めてであり、特に独創的な点である。本研究の結果から接着修復後の象牙質 MMPs 活性を抑制する方法が明らかとなり、さらに接着耐久性を損なう事なく MMPs 活性を抑制する修復材料が開発された場合、これまで長期に渡り再治療を余儀なくされた症例が今後は激減することになり、現在までの接着修復治療に対して変革をもたらす研究となる。

3. 研究の方法

研究に用いる DTPA 配合光硬化型接着システム(セルフエッチングアドヒーズ)を設計し、初期の象牙質接着性を損なわず MMPs 活性を抑制する DTPA の適正濃度の検討を行う。確定した濃度の DTPA を配合した接着システムで 24 ヶ月後までの水中浸漬用試料についても作製し、水中浸漬後の MMPs 活性および接着強さを測定し、酸処理後の象牙質 MMPs 活性に対して接着システム中の DTPA の抑制効果について解析する。

(1) 象牙質試料の作製

ヒト抜去歯を注水下でエアタービンを用いて、エナメル質とセメント質を完全に除去した象牙質を作製する。それらを脱水して液体窒素にて凍結後、凍結粉碎機にて球径 180 μ m 以下の象牙質粉末とする。

(2) 光硬化型象牙質接着システムの作製

4MET を接着性モノマーとして、UDMA/水/アセトンで構成される光硬化型レジンを作製する。光重合開始剤としてカンファーキノンおよびスルフィン酸芳香族アミンを添加する。試作した接着システムに 0.1~2.0% DTPA を配合したものを本実験で使用する。(L-28)

(3) 象牙質接着強さの測定

歯冠部健全象牙質平坦面を上記の接着システムにて処理してコンポジットレジンにて接着した試料を象牙質接着試験用試料とする。得られた試料を精密低速切断機(Isomet, Buehler)にて 1mm 幅に薄切した後、人工唾液に浸漬して 24 時間経過後の象牙質接着強さを測定する。また接着試験後の試料体については、イオンコーター(1B-3, エイコー)にて金蒸着を施し、破断面形態を SEM にて解析する。

(4) 象牙質 MMPs 活性の測定

象牙質粉末を酸処理のみ行ったものと酸処理後に上記で作製したレジンでコーティングしたものとについて Type Collagenase Assay KIT を用いて、MMPs 活性値を測定する。すなわち、各条件下での象牙質 MMPs が 24 時間後に示す Type コラーゲン分解能をマイクロプレートリーダーにて測定する。

(5) 長期水中浸漬用試料の作製

象牙質接着強さおよび MMPs 活性について得られた結果を解析し、DTPA 配合濃度を確定

した接着システムを用いて長期水中浸漬用の接着試料および MMPs 活性測定用試料を作製する。試料を人工体液に浸漬し、一定期間経過後の象牙質接着強さを測定する。水中浸漬期間は 24 ヶ月間までとする。

(6) 長期水中浸漬後の象牙質接着強さおよび象牙質 MMPs 活性の測定

作製した長期水中浸漬用試料の適用期間が 24 ヶ月間までの試料について象牙質接着強さおよび象牙質 MMPs 活性を測定する。

(7) DTPA による MMPs 抑制効果の解析

接着耐久性に最も優れる DTPA 配合濃度を解析する。また接着試験用試料体については、破断面の解析用にイオンコーターにて金蒸着したものを SEM にて観察する。

(8) 象牙質接着界面の劣化を抑制する接着システムの設計

長期水中浸漬後の MMPs 活性および象牙質接着試験の解析から得られるデータを総合的に解析する。以上の結果を踏まえて、長期間安定した強固な接着力を有し、かつ MMPs 活性を抑制する接着システムを設計する。

4. 研究成果

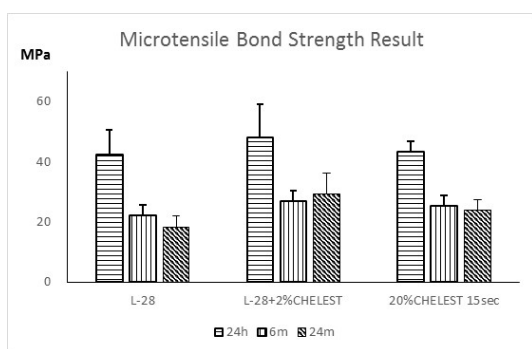
(1) 歯面処理直後における象牙質接着性を低下することなく、かつ MMPs 活性阻害が可能な DTPA 適正濃度を確定するための実験に使用する光硬化型象牙質接着システムの有効性について検討を行った結果、4MET を接着性モノマーとして、UDMA/水/アセトンで構成される光硬化型レジんに光重合開始剤としてカンファーキノンおよびスルフィン酸芳香族アミンを添加することによって、実験に応用可能な接着システムであることが確認できた。無機フィラー配合の有無については、接着強さに影響しないものの、無機フィラーを配合しない場合は相分離が生じやすいことが明らかとなったことから、本研究においては無機フィラーを配合した。

(2) 光硬化型象牙質接着システムへの DTPA の配合量については、2%の配合量を境にそれ以上の配合では著しい接着強さの低下を認めた。20%DTPA 溶液を歯面処理時の前処理剤として応用した場合についても接着強さは低下しなかった。(コントロール 24h; 42.6 MPa, L-28+2%DTPA; 48.3 MPa, 20%DTPA-L-28; 43.3 MPa)

Type 1 collagenase Assay Kit を用いて DTPA で象牙質を処理した場合の象牙質 MMPs 活性については、2~20%DTPA 溶液で十分な抑制効果が得られることが明らかとなった。さらに DTPA による抑制効果は、比較的速やかに生じており、1 分間を超えた処理時間の延長による抑制効果の増加は認めなかった。

(3) 20%DTPA 溶液を前処理剤として応用した場合と、2%DTPA を配合した場合の試作レジジン接着システムにおける象牙質引張接着強さおよび象牙質 MMPs 活性抑制効果について、24 ヶ月間までの長期水中浸漬後の試料を用いて検討を行った結果、観察期間 6 ヶ月までの

試料については、コントロールと比較して象牙質引張接着強さの低下は抑制され、象牙質 MMPs 活性についても抑制されることが明らかとなった。一方で、24ヶ月間までの試料については、象牙質引張接着強さの低下は抑制されたが、象牙質 MMPs 活性の抑制については6ヶ月間までの試料と差が無かった。
(コントロール; 234RFU/10mg-24h, 66 RFU/10mg-6M, 210RFU/10mg-24M, L-28+2%DTPA; 250RFU/10mg-24h, 51 RFU/10mg-6M, 95RFU/10mg-24M)



さらに、水中に長期間暴露された象牙質 MMPs は変性する可能性が考えられた。この改善策としては、象牙質 MMPs 活性を加速させるような条件を設定することによって、短期間の水中浸漬においても酵素活性およびその活性阻害を評価できるような検討が必要と考えられた。

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3件)

(1) Hoshika Tomohiro, Nishitani Yoshihiro, Takahashi Kei, Ogata Haruka, Ohara Naoko, Kajihara Takehiro, Yoshiyama Masahiro. Mineralization of resin using experimental adhesives containing hydroxyapatite in long term. Journal of Oral Tissue Engineering. 査読有, Vol.13(2015), p85-95.

URL; <http://www.jarde.jp/index-e.html>

(2) Hoshika Tomohiro, Nishitani Yoshihiro, Yoshiyama Masahiro, Key WO 3rd, Brantley W, Agee Kelli, Breschi L, Cadenaro M, Tay Franklin, Rueggeberg F, Pashley David. Effects of quaternary ammonium-methacrylates on the mechanical properties of unfilled resins. Dental Materials. 査読有, Vol.30(2014), p1213-1223.

DOI; 10.1016/j.dental.2014.08.365.

(3) Nishitani Yoshihiro, Hosaka Keiichi, Hoshika Tomohiro, Yoshiyama Masahiro, Pashley David. Effects of chlorhexidine in self-etching adhesive: 24 hours results. Dental Materials Journal. 査読有,

Vol.32(2013), p420-424.
DOI; 10.4012/dmj.2012-199

[学会発表](計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西谷 佳浩 (NISHITANI, Yoshihiro)
鹿児島大学・学術研究院医歯学域歯学系・教授
研究者番号: 60325123

(2) 研究分担者

吉山 昌宏 (YOSHIYAMA, Masahiro)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 10201071

(3) 連携研究者

()

研究者番号: