

令和 2 年 8 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11542

研究課題名(和文)還元型グルタチオンの歯髄保護効果：歯科保存修復への応用

研究課題名(英文)2. Pulp protective effect of glutathione: application for operative dentistry

研究代表者

平石 典子(Hiraishi, Noriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20567747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体にも存在するグルタチオンは、非タンパク質チオールトリペプチドであり、細胞レベルで水溶性の抗酸化物質として働き、また重金属イオンをチオール基によって捕捉し、無毒化する。歯科材料に含有する重金属のヒ素と38%フッ化ジアンミン銀溶液(SDF)の毒性に注目し、細胞増殖/細胞毒性試験、細胞中のアルカリホスファターゼ活性試験をラット歯髄細胞株にて行った。ヒ素による細胞毒性試験では、50µMヒ素濃度で毒性が見られたが、5000µMの還元型グルタチオンを加えた結果、有意なヒ素の毒性軽減がみられた。SDFは10万倍希釈でも毒性が呈示されたが、50mMのグルタチオンによる毒性軽減が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内に存在する非タンパク質チオールトリペプチドであるグルタチオンは酸化ストレスや生体異物解毒機能を持つ。本課題では、特に、歯科材料に含まれるヒ素、銀イオンの重金属の歯髄細胞への影響と、グルタチオンによる解毒作用を確認した。接着レジンモノマー等の化学刺激など、歯髄組織は様々な刺激にさらされており、その対処法に、生体安全性の高いグルタチオンの臨床応用の可能性を示唆し、本来の歯髄活性のある健康で機能的な歯を保つ歯髄保存療法確立において社会的意義があるといえる。

研究成果の概要(英文)：Reduced glutathione (GSH) is the most prevalent and most important intracellular thiol-disulfide redox buffer in mammalian cells. GSH plays a major role as antioxidants that function through a variety of mechanisms such as metal chelators and radical quenchers. We investigated the effect of arsenic and silver ions on the viability, alkaline phosphatase (ALP) activity and morphology of pulpal-like cells and to evaluate the influence of application of GSH on those ions-induced cytotoxicity. The findings of this study suggest that those ions can severely disturb the viability, mineralization-ability and morphology of the pulpal-like cells while controlled concentrations of GSH mitigated those damage.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯髄細胞 還元型グルタチオン ヒ素 銀イオン 毒性試験 解毒作用

1. 研究開始当初の背景

還元型グルタチオン (GSH) は、非タンパク質チオールトリペプチドであり、生理的機能は主に、細胞レベルで、活性酸素種や過酸化物を還元して消去するという抗酸化作用を示し、また様々な金属毒物や薬物のシステイン残基のチオール基に S-S 結合 (グルタチオン抱合) することによって解毒作用を示すため。グルタチオンの歯髄細胞保護の観点から、歯科修復治療への応用に着眼した。歯科修復材料の生体安全性はこれまで注視されているが、歯科接着システムに含まれている低分子モノマーのメタクリル酸2-ヒドロキシエチル (HEMA) は歯髄へ浸透し、歯髄病変を起こす懸念がある。我々は過去に、HEMA の歯髄細胞への影響がグルタチオンにより軽減することを報告した。

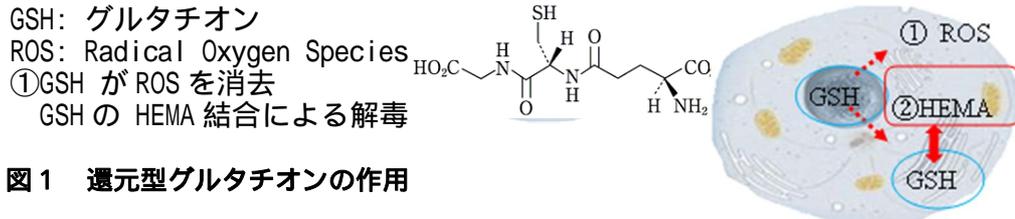


図1 還元型グルタチオンの作用

グルタチオン溶液を窩洞に処置する場合を想定し、グルタチオン 2%、5%、10% 溶液の濃度で、培養細胞レベル反応性の評価 (ラット歯髄由来細胞 RPC-C2A 使用) を行った。生体適合性のために、炎症性マーカー COX-2、iNOS 発現を予備定量評価、プロスタグランジン ELISA アッセイ等を行ったが、本来のグルタチオンの持つ還元性のため、アッセイテスト試薬選択にやや制限があり、グルタチオンの濃度、配合率の最適化は困難であった。細胞レベルでの実験でグルタチオンの使用濃度が決定できないため、深いう蝕に、直接塗布する臨床的効果を期待し、動物実験を予定していたが、実施しなかった。

そこで、注力したのは、グルタチオンの解毒作用である。グルタチオンは自らのチオール基 (SH 基) を用いて、また様々な金属毒物や薬物のシステイン残基のチオール基に S-S 結合 (グルタチオン抱合) することによって解毒作用を示す。本課題ではグルタチオンの金属毒性軽減効果を、ラット歯髄細胞を用い検討を試みた。対象にした金属は、ヒ素、銀イオンである。

2. 研究の目的

① ヒ素は、歯内治療用材料の水酸化カルシウム徐放性水硬性セメントである Mineral Trioxide Aggregate (MTA) に微量ながら含まれる。米国で開発された MTA は、逆根管充填、直接覆髄・断髄、穿孔封鎖、アベキシフィケーションなど様々な用途に臨床応用されるとともに、硬組織誘導能を有することが報告されている。一方で、製造過程でセメント中に残留する毒性の高い重金属のヒ素溶出により、歯髄への影響が懸念されており、細胞毒性が懸念されている。グルタチオンによる MTA から溶出されるヒ素の毒性を、グルタチオンでの軽減することをラット歯髄細胞株 (RPC-C2A) にて検討した。

銀イオンは、う蝕の進行や象牙質知覚過敏を抑制するサハライド (フッ化ジアンミン銀溶液) に高濃度で含まれる。近年高齢者の根面う蝕予防としてもその効果は期待され、汎用されている。一般に臨床で使用されているサハライドは、38% の高濃度であるため、強塩基性を呈し、また含有銀イオンは約 255000ppm の高濃度となる。よって、銀イオン (金属錯体) 金属毒性が、象牙細管を經由し、歯髄細胞に対し組織為害性を示していることが懸念される。本研究では、ラット歯髄細胞株にて、細胞増殖 / 細胞毒性試験、細胞中のアルカリホスファターゼ活性試験を行い、フッ化ジアンミン銀の毒性、及び還元型グルタチオンによる銀の解毒効果を検証した。

3. 研究の方法

① プロルート MTA (デンツプライ三金株式会社) 0.5g 粉中ヒ素を、蛍光 X 線分光分析装置 (X-ray Fluorescence Spectrometer HORIBA, XGT-10000WR) にて測定した。プロルート MTA 0.5g 粉と液 (精製水) を使用方法に従い練和、24 時間湿潤状態で硬化後粉碎し、0.1N 硝酸水溶液 (pH 1) 18ml にて溶解させ、20 μm ポアサイズのフィルターにて濾過し、濾過液を試験溶液とした。この試験溶液中ヒ素含有量を、誘導結合プラズマ発光分析装置 (SHIMADZU, ICPS-7000 ver. 2) にて測定した (n=3)。ラット歯髄由来細胞 (RPC-C2A) にて、ヒ素による 6 時間、24 時間培養後の細胞毒性 (5 μM, 10 μM, 50 μM) 試験を MTT アッセイキット (Roche Diagnostics 社) にて行った。毒性を提示した濃

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

度のヒ素に、5000 μM の還元型グルタチオンを加え、同様に MTT アッセイテストを行った。

38%サホライドは、1000 倍希釈、10000 倍希釈し、歯髄細胞の飼育培地培地に添加後、 $38 \times 10^{-4}\%$ 、 $38 \times 10^{-5}\%$ サホライド含有歯髄細胞飼育培地を作製した。さらに、これらサホライド希釈溶液に、それぞれに 5mM、50mM 濃度の還元型グルタチオン (富士フィルム和光純薬) を添加した培地を作製した。ラット歯髄細胞株 (RPC-C2A) を用い、6 時間、24 時間培養後、歯髄細胞の状態を確認し、アッセイ測定、Cell Counting Kit-8 (CCK, 同仁化学) TRACP & ALP Assay Kit (ALP, TAKARA、を行った。

4. 研究成果

① MTA0.5 g 粉中、0.2mg (0.04 wt%) のヒ素含量が検出された。液と練和し、24 時間湿潤状態で硬化した試料からは、 $0.866 \pm 0.324 \mu\text{g}$ の溶出ヒ素が検出された。ヒ素による細胞毒性試験では、6 時間、24 時間培養の結果はともに、50 μM ヒ素濃度で毒性が見られた。50 μM ヒ素に 5000 μM の還元型グルタチオンを加えた結果、有意な ($p < 0.001$) ヒ素の毒性軽減がみられ、培養細胞の増殖、生存形態に改善が見られた。本材の練和後作業時間は約 5 分であり、練和直後に直接露髄部を被覆した場合、その硬化時間が比較的長いことから、溶出ヒ素の歯髄組織への影響は看過できない。本研究での細胞毒性試験により、50 μM のヒ素では毒性が呈示されたが、5000 μM のグルタチオンを加えることによって、ヒ素毒性が軽減された (図 2)。MTA からのヒ素溶出の歯髄への影響は、グルタチオンにより軽減でき、歯髄反応の予後改善効果が示唆できた。この研究成果は、第 69 回日本歯科理工学会学術講演会にて口頭発表、論文は国際論文に投稿、現在査読中である。

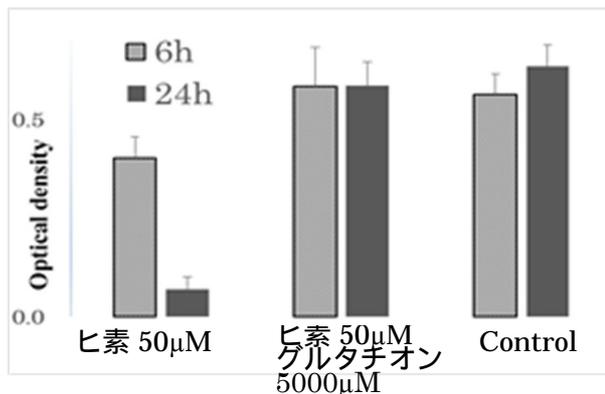


図 2 細胞毒性試験結果 (ヒ素及びグルタチオン) ヒ素の毒性はグルタチオンで緩和させた

希釈サホライドによる細胞毒性試験で、6 時間、24 時間の培養の結果はともに CCK8、ALP 試験の結果より、細胞毒性が認められた。CCK8 では 6 時間で、還元型グルタチオンの添加により有意なフッ化ジアンミン銀の毒性軽減が認められた。24 時間では 50mM のグルタチオンによる毒性軽減は認められたが、5mM のグルタチオンによる毒性軽減は認められなかった。ALP では 6 時間、24 時間ともにグルタチオンを加えた結果、有意なフッ化ジアンミン銀の毒性軽減が認められた。サホライドの $38 \times 10^{-4}\%$ 、 $38 \times 10^{-5}\%$ とかなり低い濃度でも、毒性が呈示されたため、臨床において、深い窩洞に使用した場合、象牙細管を浸透した場合は、歯髄組織への影響が想定される。一方、グルタチオン添加による、細胞毒性軽減は 5mM でみられ、50mM で顕著な解毒効果があったため (図 3)、深い窩洞にサホライド塗布する場合、解毒作用が期待できるグルタチオンの併用効能が示唆された。この成果は、日本歯科保存学会 2019 年度春季学術大会 (第 150 回)にて、標題「フッ化ジアンミン銀溶液のラット歯髄細胞への毒性・及び、グルタチオンによる解毒作用について」として発表した。論文は国際論文に投稿、現在査読中である。

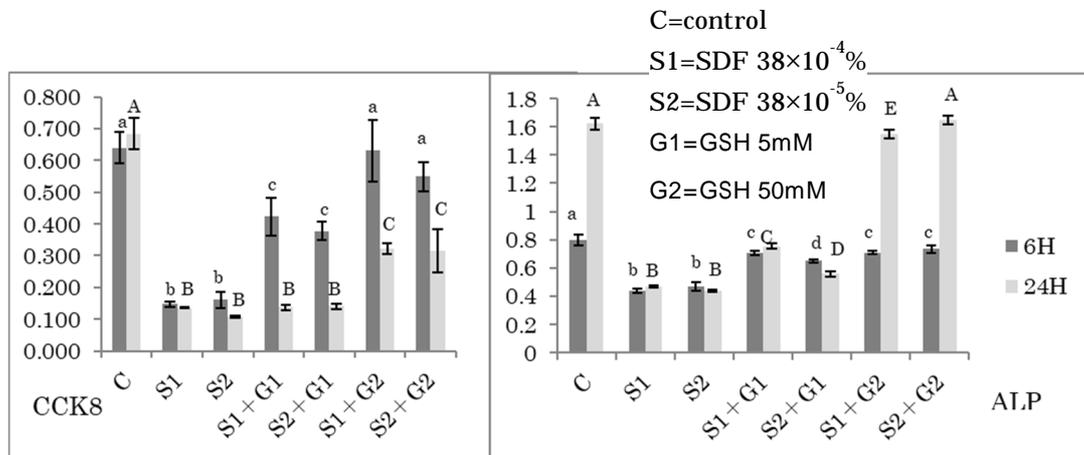


図3 細胞活性試験 希釈サホライドの毒性とグルタチオン解毒効果が見られた

その他実験

i) 金属イオン毒性試験

ストロンチウムイオンの歯髄細胞活性への影響を上記と、同様な方法で検討を加えた。ストロンチウムイオンは機能性ガラス素材である S-PRG (surface reaction-type pre-reacted glass-ionomer) フィラーからリリースされる。このフィラーからは種々のイオンが長期的に徐放されるが、深い窩洞に使用した場合、象牙細管を通じ歯髄組織への影響を想定した実験を行った。S-PRG フィラー抽出液が歯髄細胞及び象牙質窩洞へ及ぼす影響について、細胞毒性試験と顕微鏡による観察を行った。結果、希釈 S-PRG フィラー抽出液は歯髄細胞への顕著な毒性が認められず、S-PRG フィラーを含有する製品を歯髄に近接する窩洞へ用いても歯髄への影響は軽微であることが示唆された。その為、グルタチオンによる解毒作用の検討は行わなかった。この成果は、日本歯科保存学会 2019 年度春季学術大会 (第 150 回) にて発表した。論文は国際論文に投稿、現在査読中である。

ii) 金属イオン (銀、ストロンチウムイオンなど) と擬似体液の反応性沈殿物分析

歯科材料の生体安全性、臨床的適合性を考慮し、グルタチオンの金属解毒及び還元作用である。課題としては、金属イオン (銀、ストロンチウムイオンなど) の、擬似体液 (ナトリウムイオン、塩素イオン、リン酸イオン、カルシウムイオンなど含む) と反応しリン酸カルシウム系の生成沈殿物を、X 線回折解析を行った。結果、これら金属イオンは擬似体液と反応し、沈殿物として表層に蓄積され、歯髄組織までは到達しない可能性も考えられた。しかし、それら生成物は幼弱な低結晶性のアパタイトであるため、2 次的に金属イオンが歯髄組織に漏出する恐れもあり、長期的なグルタチオンの金属毒性緩和効果が臨床的には望ましいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 SAYED Mahmoud, MATSUI Naoko, HIRAIISHI Noriko, INOUE Go, NIKAIDO Toru, BURROW Michael F., TAGAMI Junji	4. 巻 38
2. 論文標題 Evaluation of discoloration of sound/demineralized root dentin with silver diamine fluoride: In-vitro study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 143 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2018-008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sayed Mahmoud, Matsui Naoko, Hiraishi Noriko, Nikaido Toru, Burrow Michael, Tagami Junji	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of Glutathione Bio-Molecule on Tooth Discoloration Associated with Silver Diammine Fluoride	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1322 ~ 1322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19051322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 SAYED Mahmoud, MATSUI Naoko, HIRAIISHI Noriko, INOUE Go, NIKAIDO Toru, BURROW Michael F., TAGAMI Junji	4. 巻 38
2. 論文標題 Evaluation of discoloration of sound/demineralized root dentin with silver diamine fluoride: <i>In-vitro</i> study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 143 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2018-008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sayed Mahmoud, Matsui Naoko, Hiraishi Noriko, Nikaido Toru, Burrow Michael, Tagami Junji	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of Glutathione Bio-Molecule on Tooth Discoloration Associated with Silver Diammine Fluoride	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1322 ~ 1322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19051322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhao Irene Shuping, Gao Sherry Shiqian, Hiraishi Noriko, Burrow Michael Francis, Duangthip Duangporn, Mei May Lei, Lo Edward Chin-Man, Chu Chun-Hung	4. 巻 68
2. 論文標題 Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Dental Journal	6. 最初と最後の頁 67~76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/idj.12320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金承建, 平石 典子, 田村 幸彦, 田上 順次
2. 発表標題 フッ化ジアンミン銀溶液のラット歯髄細胞への毒性・及び、グルタチオンによる解毒作用について
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年度春季学術大会(第150回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西牧 麻由里, 中元 絢子, 平石 典子, 田村 幸彦, 二階堂 徹, 田上 順次
2. 発表標題 S-PRGファイラー抽出液のラット歯髄細胞株・象牙質窩洞への影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年度春季学術大会(第150回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mahmoud Sayed, Noriko Hiraishi, Fumikai Hayashi2, Junji TAGAMI
2. 発表標題 Reactivity differences of SDF for Dentin/enamel Studied by Solid-state NMR
3. 学会等名 IADR/AADR/CADR General Session
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平石典子、林文晶、二階堂徹、田上 順次
2. 発表標題 固体NMRによるS-PRGリリースイオンのリン酸カルシウムアパタイトへの影響分析
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平石 典子, 田上 順次
2. 発表標題 S-PRG抽出イオンの;リン酸カルシウムアパタイトへの効果 ラット歯髄細胞株による生体適合性試験
3. 学会等名 第4回生体機能性S-PRGフィラー研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平石典子、田村幸彦、堤 祐介、埴隆夫、田上順次
2. 発表標題 MTAセメントのヒ素含有量、ラット歯髄細胞への毒性、及び、グルタチオンによる解毒作用について
3. 学会等名 第69回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 マハムドモハメドサイドアハメド、松井七生子、平石典子、井上剛、二階堂徹、田上順次
2. 発表標題 フッ化ジアンミン銀による脱灰象牙質の変色の評価
3. 学会等名 平成29年度日本歯科保存学会秋季大会(第147回)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----