

## 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5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390355

研究課題名（和文）ナノテクノロジーの歯科保存学への展開

研究課題名（英文）Spreading Nanotechnology to Conservative Dentistry

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：今回の研究で主として検討した白金ナノコロイドは、明らかに歯質接着を向上する能力を有していることが判明した。これを使用した場合には、象牙質のコラーゲンが露出しているときに効果が得られることも、透過電子顕微鏡による超微細構造の検索で明らかになった。生体に対する影響として、細胞を用いて検討を行ったところ、スカベンジャーとしての作用が強いと考えられていたが、ある条件下では細胞のストレスを減らすことができなかった。また、白金ナノコロイドは破骨細胞の活性を低下させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using Colloidal Platinum Nano-particles (CPN) as a adhesion promoter of dental adhesives increased its bond ability to tooth surface. When observing resin dentin bonds under the transmission electron microscope, improved bond performance was found by the condition that exposure of collagen fibrils were observed at the adhesive interface. CPN is well known as the strong scavenger for oxidation stress, but under the some conditions the scavenging effect was not detected. When CPN was applied to osteoclast cell lines, suppression of the activity of the cells was found.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：ナノテクノロジー，歯質接着，生態適合性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 白金ナノコロイドを用いた研究に関しては、国内外でほとんどなくごく少数の発表が、開発者の宮本東大教授のグループにあるのみであった。これらの研究のフォーカスは、白金の持つスカベンジャーとしての能力に

注目し、生体に害の多い活性酸素の除去能力を検証した研究が主体であった。その後、白金ナノコロイドを用いた製品を開発販売するために、宮本教授のグループはベンチャー企業（株式会社アプト）を立ち上げた。そのため、白金ナノコロイドを用いた研究発表と

いうよりも、自ずと製品使用における認可取得や知的所有権の確保の方に軸足が向けられるようになってきていた。

これらの製品は、化粧品類、飲料水、あるいは口腔洗浄製品等であり、現在のところ生体に対する大きな問題が見られていないため生体適合性に問題はないものと推察される。

また、多くの基礎的な研究が宮本らによって行われて来ているが、論文として発表されたものは少ない。そのため、白金ナノコロイドを用いた基礎的な検討を行う必要性があった。

(2) 白金の持つスカベンジャーとしての作用を歯科に応用できないかという試みが、当グループで始められた。その中で、日常診療で多用されている次亜塩素酸の生み出す活性酸素が、接着を阻害したり、生体に影響を与えるという事実のもと、この活性酸素をコントロールしようという研究が始められた。具体的には、活性酸素の影響を受けやすい接着材である 4META-MMA/TBB 系のレジンを用いて白金ナノコロイドのもつ接着処理面でのスカベンジャーとしての効果を判定した。その結果、それほどの効果が見られなかったが、付随的に白金ナノコロイドをプライマーとして作用させるとその接着強さが倍増することが判明した (特許申請 2008 年)。

このような、作用をもたらす歯金ナノコロイドをどのような濃度でどのような作用時間で、あるいはどのように水洗すれば良いかについては不明であった。また、どのようなメカニズムで接着材の性能の向上がはかれるかについても不明であり、これらについての詳細な検討を加える必要性があった。

## 2. 研究の目的

(1) 白金ナノコロイドの使用条件や接着におけるメカニズムの検討を行う。

(2) 白金ナノコロイドの細胞に関する影響についての検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 接着におけるプライマーとしての白金ナノコロイドにフォーカスをおいて検討した。

まず、プライマーとしての白金ナノコロイドの至適濃度、至適作用時間、および至適水洗時間の検討を試みた。検証方法としては、マイクロテンスイル法を用いて、統計学的優位差の有無に関わらず、最も高い値を示した条件を探し出すという検討法を行った。この検証方法により、最適の条件を見出すことが可能になるはずであった。

別途に、パイロット試験として酸とナノコロイドの合材を作り、新たな処理液としての可能性を探った。

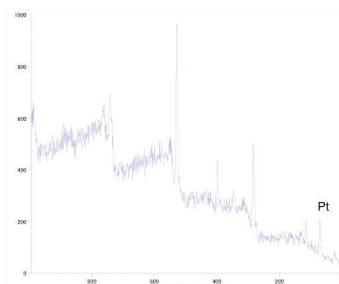
また、象牙質の接着界面の TEM 像を観察することにより、接着界面にどのような現象が起こっているかを観察し、接着メカニズムの解明の一助とすることにした。

(2) 白金ナノ粒子を歯科材料、特にコンポジット系の成分として利用した場合を想定し、他の成分から誘発される酸化ストレスを軽減できるかどうかを確認した。用いた細胞としては THP-1 ヒト単球を用い、カンファキノンや DMAEM (dimethylaminoethyl methacrylate) の存在下で ATP レベルを利用したミトコンドリア機能測定や酸化ストレスを調べるためにグルタチオンレベルを測定した。

破骨細胞への分化を制御すると推察されている RANKL レセプターの活性が活性酸素によってどのような挙動を示すかを調べるために、マウスの前破骨細胞を用いて活性酸素存在下での破骨細胞への分化を様々な濃度の白金ナノコロイドを用いて検討した。

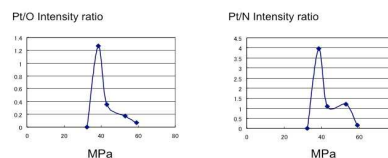
## 4. 研究成果

(1) プライマーとしての白金ナノコロイドの至適濃度、至適作用時間、および至適水洗時間の検討を様々な条件下で検討を行ったが、これらの組み合わせの数は膨大であり、全てを調べ尽くすことはできなかった。



上図はプライマー処理した象牙質表面の XPS 像で表面に微量ながら白金が存在していることが判る。

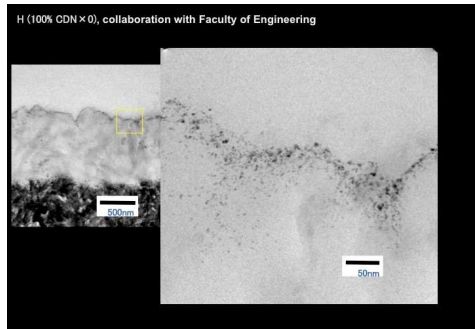
### Correlation between intensity ratio and bond strength (MPa)



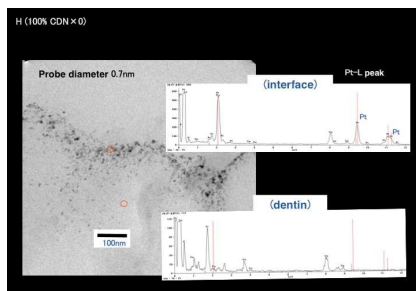
一方、上図は接着強さと象牙質表層に残存した白金との関係である。接着能力を上げる

ためには、ある範囲の白金濃度が重要であることが判った。以上をまとめると、白金ナノコロイドをプライマーとして用いた場合、得られる接着性能は濃度・作用時間・水洗時間に依存することが判明したが、最適な条件を見いだすまでには到らなかった。

接着界面のどの部分に白金が局在するかは興味深い。



上図は、接着界面の透過電子顕微鏡像である。接着界面のごく表層部に電子密度の高いドット状の構造物が認められる。



上図は、EDX を用いた分析を示している。電子密度の高いドット状の構造物は白金原子であることが示されている。

このことから、ナノサイズの白金粒子であっても、脱灰象牙質のコラーゲン線維間には浸透が困難であることが判明した。そのため、ナノコロイドの浸透していない脱灰象牙質は長期耐久性に関してどのような挙動を示すかは重要である。

予備実験では、白金ナノコロイドを用いた場合と用いない場合で、用いた場合の方が接着耐久性は倍増したが、その場合においても劣化を阻止することはできていなかった。その結果から推測されることとして、象牙質のコラーゲンの劣化に大きく影響を与える Matrix Metaroproteinase やカゼプシン等の酵素の作用を止めることはできていないと考えられる。

このような結果が得られた要因として、今回用いた象牙質酸処理材は脱灰能力が高く、

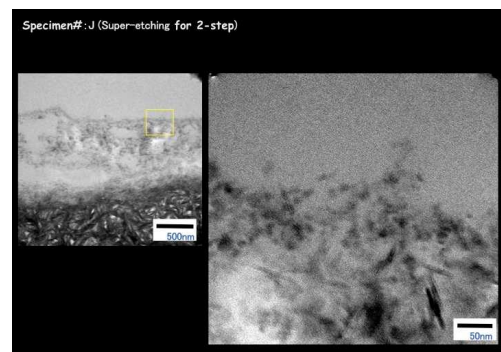
数ミクロンの幅で完全な脱灰層を作るため白金ナノコロイドのみならずレジン自体もこの脱灰象牙質に浸透が十分になされないものと考えられる。

別の予備実験から、白金ナノコロイドを用いた場合、セルフエッチング系の接着システム、とくにマイルドなセルフエッチングシステムには効果が見られなかった。脱灰象牙質を作るシステムと脱灰象牙質を作らないシステムで見られたこの違いは、露出するコラーゲン線維に白金ナノコロイドが吸着するというメカニズムに起因しているかもしれない。

脱灰をややマイルドな形態にすることができれば、新たなる検討の余地が生まれてくると考えられる。

他方、本研究における白金ナノコロイドの扱いは、3ステップシステムにおけるプライマーとしての役割を与えたものであるが、ステップ数を減じるために2ステップ化、すなわち白金ナノコロイドと酸処理材の合材を作り接着試験を行うことは極めて価値がある。

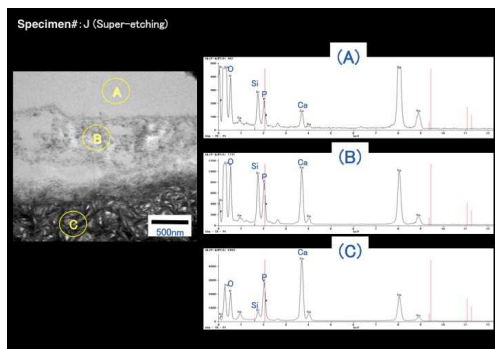
そこで、35%リン酸水溶液となるような配合を行った合材を作ることにした。この際、配合率は白金ナノコロイドの量が多めとなるような設計となった。これを象牙質酸処理材として、デュアルキュア型2ステップ対応接着システム、あるいは試作のマルチタイプ1ステップシステムに応用したところ、格段の接着性能が得られた。



そのときの接着界面を透過電子顕微鏡にて撮影された像が上図である。接着材層と健全象牙質の間に、およそ1.5ミクロンほどの厚みの樹脂含浸層が認められ、通常のリン酸処理された象牙質で見られる樹脂含浸層よりも厚みが薄い樹脂含浸層が形成されていることが判った。その樹脂含浸層中に、電子密度の高い構造物が分散されているような像が観察された。

この構造物がどのような由来のものであるかを調べるために、同様な透過電子顕微鏡に備え付けられたEDXをもちいて元素分析を

行った。



上図はその分析結果を示す。この分析の結果、電子密度の高い構造物は白金ではなく、ハイドロキシアパタイトであることが推察された。白金ナノコロイドとリン酸との合材は、象牙質の過度の脱灰を防ぎマイルドな作用を示すことが示唆された。このような働きは、今後新たな歯質処理材の開発にあたって大きく貢献すると考えられる。

(2) 先ず、THP-1 ヒト単球を用いた場合、白金ナノコロイドの存在下で、カンファキノンとDMAEMとの間でどのような作用を調べた。カンファキノンは光重合レジンの重合開始材であり、青い光を当てたときに反応シラジカルが発生することが知られている。加えて、カンファキノンとDMAEM存在下で、青い光を当てる、あるいは当てない場合異なった結果となると考えられる。その際、白金ナノコロイドが酸化ストレスやミトコンドリアのストレスを緩和するという予想であった。しかし結果としては、白金ナノコロイドは今回の実験条件下では上記のようなストレス緩和作用が見られないこととなった。

白金ナノコロイドは、酸化ストレスを緩和する作用があるとされていたが、今回の結果からは全ての酸化ストレスを緩和することは無いことが推測される。

白金ナノコロイドはアスコルビン酸を超えるレベルでreactive oxygen species (ROS)を抑制すると言われているが、それ以外の酸化ストレスに関してどのような作用があるかの詳細な検討は将来における研究で検証して行く必要がある。

マウスの前破骨細胞を用いた研究では、白金ナノコロイドの持つ作用について、新たな知見が得られた。

白金ナノコロイドは、RANKLによって引き起こされる破骨細胞の生成する数を、白金ナノコロイドの濃度依存的に抑制するが、細胞の活性自体には影響を与えてはいなかった。加えて、白金ナノコロイドは、RANKLによって発現される mRNA を発現させる遺伝子をブ

ロックすることが判った。

このような、白金ナノコロイドの持つ特性は、生体内で何らかの有益な作用をもたらす薬物の開発に寄与する可能性があることが示唆されている。

今後は、さらに多くの種類の細胞を用い、白金ナノコロイド生体に対してどのような作用をもたらすかの検討が必要である。

その結果をもとに、白金ナノコロイドを用いた材料をどのように生体で利用できるかを検討し、加えて in vivo での組織反応の観察や免疫組織学的な検討が必要になると考えられる。

具体的には、口腔から消化管への影響のある使用法（洗口材、プライマー、歯面処理材）や生体内での使用（根管洗浄材や根管充填材）に対しての十分な安全性を保証するような研究を加えて行く必要がある。この過程を経て、臨床で安全・安心に使用できるナノテクノロジーの応用が図れる。

## 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10件）（全て査読あり）

① Kakuda S, Fu J, Nakaoki Y, IKEDA T, Tnaka T, Sano H. improved long-term bonding performance of an experimental all-in-one adhesive. DENTAL MATERIALS JOURNAL, 32, 2013, in press.

② Fu J, Kakuda S, Pan F, Hoshika S, Ting S, Fukuoka A, Bao Y, Ikeda T, Nakaoki Y, Selimovic D, Sano H, K Sidhu S. Bonding performance of a newly developed step-less all-in-one system on dentin. DENTAL MATERIALS JOURNAL, 32, 203-11, 2013.

③ Fu J, Pan F, Kakuda S, K Sidhu S, Ikeda T, Nakaoki Y, Selimovic D, Sano H. The effect of air-blowing duration on all-in-one systems. DENTAL MATERIALS JOURNAL, 31, 1075-81, 2012.

④ Kachi H, Noda M, Wataha JC, Nakaoki Y, Sano H. Colloidal platinum nanoparticles increase mitochondrial stress induced by resin composite components. JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B-APPLIED BIOMATERIALS, 95B, 193-198, 2011

⑤ Hoshika S, Nagano F, Tanaka T, Wada T, Asakura K, Koshiro K, Selimovic D,

Miyamoto Y, Sidhu SK, Sano H. Expansion of nanotechnology for dentistry: effect of colloidal platinum nanoparticles on dentin adhesion mediated by 4-META/MMA-TBB JOURNAL OF ADHESIVE DENTISTRY, 13, 411-416, 2011.

⑥ Okuyama K, Komatsu H, Yamamoto H, Pereira PNR, Bedran-Russo, Nomachi M, Sato, T, Sano H. Fluorine analysis of human dentin surrounding resin composite after fluoride application by mu-PIGE/PIXE analysis. NUCLEAR INSTRUMENTS & METHODS IN PHYSICS RESEARCH SECTION B-BEAM INTERACTIONS WITH MATERIALS AND ATOMS, 269, 2269-2273, 2011

⑦ Hydrolytic Stability of One-step Self-etching Adhesives Bonded to Dentin Fukuoka A, Koshiro K, Inoue S, Yoshida Y, Tanaka T, Ikeda T, Suzuki K, Sano H, Van Meerbeek B. JOURNAL OF ADHESIVE DENTISTRY, 13, 243-248, 2011

⑧ Nomura M, Yoshimura Y, Kikuri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Koshiro K, Sano H, Suzuki K, Inoue N. Platinum Nanoparticles Suppress Osteoclastogenesis Through Scavenging of Reactive Oxygen Species Produced in RAW264.7 Cells. JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL SCIENCES, 117 243-252, 2011

⑨ Hoshika S, Nagano F, Tanaka T, Ikeda T, Wada T, Asakura K, Koshiro K, Selimovic D, Miyamoto Y, Sidhu S, Sano H. Effect of application time of colloidal platinum nanoparticles on the microtensile bond strength to dentin DENTAL MATERIALS JOURNAL, 29, 682-689, 2010.

⑩ Soell M, Hemmerle J, Hannig M, Haikel Y, Sano H, Selimovic D. Molecular force probe measurement of antigen I/II-matrix protein interactions. EUROPEAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES, 118, 590-595, 2010.

[学会発表] (計6件)

① Ting S, Fu J, Pan F, Nakaoki Y, Ikeda T, Tanaka T, Sano H. Effect Of Different RDT On  $\mu$ TBS Of Current Adhesive Systems. International Association for Dental Research 2013. Washington State Convention Center, Seattle, USA

3.20-25

② Fu J, Pan F, Ting S, Ikeda T, Nakaoki Y, Sano H. Bond durability of four contemporary self-etching systems. International Association for Dental Research 2013. State Convention Center, Seattle, USA 3.20-25

③ Fu J, Feng P, Ting S, Kakuda S, Nakaoki Y, Ikeda T, Tanaka T, Sano H. Bond durability of four contemporary self-etching system. The American Association for Dental Research 2012. Tampa Convention Center, Tampa. USA. 2012.03.21-24

④ Pan F, Ting S, Kakuda S, Nakaoki Y, Ikeda T, Tanaka T, Sano H. The effects of different coating time on one-and two-step self-etching adhesives. Japan-China Dental Conference 2012, 四川大学、中国四川 2012.04.26-28

⑤ Fu J, Pan F, Fukuoka A, Matsuda Y, Ikeda T, Kawamoto C, Inoue S, Kakuda S, Ting S, Tanaka T, Komatsu H, Sano H. Bonding performance between Two-step and Newly Developed One-step Self-etching Adhesives. 5th Conseo Meeting 2011 on Prevention Restoration and Aesthetics. Istanbul, Turkey. 2011.10.13

⑥ Fu J, Pan F, Ting S, Nakaoki Y, Ikeda T, Tanaka T, Sano H. The effect of air-blowing duration on three contemporary all-in-one systems. 45th Meeting of the Continental European Division of the International Association of Dental Research with the Scandinavian Division. Semmelweis University, Budapest, Hungary. 2011.08.31

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

井上 哲 (INOUE SATOSHI)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：80184745

野田 守 (NODA MAMORU)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：10301889

### (3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：