

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592186

研究課題名(和文) 細胞生物学的特性を示すセリシン含有セメントは創傷治癒効果を有する

研究課題名(英文) Dental cements containing sericin powder with cell biological properties show effect of wound healing

研究代表者

吉田 圭一 (YOSHIDA KEIICHI)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：70230729

研究成果の概要(和文)：

本研究では、市販セルフアドヒーズブレジンセメントとレジン強化型ガラスイオノマーセメントにセリシンを添加しヌープ硬さを経時的に測定した。その結果、5.0 wt%添加した場合に、無添加のコントロールと同等の硬化特性を示すことが明らかになった。

また、ラットの上顎中切歯の歯冠形成を行い、5.0wt%濃度のセリシンを添加した、市販レジン強化型ガラスイオノマーセメントで仮封冠を仮着した。その結果、セリシン含有のレジン強化型ガラスイオノマーセメントで仮着した仮封冠では、健全歯肉のコントロールに対し、角化上皮と付着歯肉の炎症の回復は長期的にはほぼ同等であり、創傷治癒効果は十分には発揮されなかった。

研究成果の概要(英文)：

Sericin powder was added in a commercially available self-adhesive resin cement or resin-modified glass ionomer cement with various concentrations. Specimens were measured Knoop hardness from directly after specimen preparation to long-term immersion in distilled water. As a result, it was revealed that the hardening properties were equal to additive-free control when it was added 5.0% by weight in both resin cements.

In addition, after crown preparation of the rat maxillary central incisor, temporary crowns were sealed with commercially available resin-modified glass ionomer cement containing sericin 5.0% by weight. As a result, the recovery of inflammation of a cornification epithelium and the attached gingiva seated the temporary crown with sericin-containing resin-modified glass ionomer cement was equivalent to healthy gingival control group after 3-months provisional cementation. The wound healing effect was not shown enough.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科，細目：歯学，歯科医用工学・再生歯学

キーワード：セリシン、生体材料学、レジンセメント、コンポジットレジン、ヌープ硬さ、創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

カイコの繭はフィブロインとセリシンという2種類のタンパク質からできており、約4:1の割合で構成されている。カイコ体内の後部絹糸腺で合成されるフィブロインは中部絹糸腺に蓄積され、その周りを中部絹糸腺で合成されるセリシンで覆われる。フィブロインは繊維状のタンパク質で絹糸になり、セリシンは繭作り際にフィブロインを接着させ繭を形作る糊状のタンパク質である。このため、セリシンは絹糸や絹織物にする工程で洗い落とされ廃棄されていたため、長年研究の対象から除外されていた。また、セリシンはフィブロインとの分離工程における熱やアルカリ処理によって容易に変性するため、その利用範囲は限られていた。古くから製糸や絹織物工場の従業者は冬の水仕事でも、手肌がきれいであった事実が知られており、溶け出したセリシンが素手で作業を行っている人達の皮膚のケアを行っていたと考えられている。

これまでの研究で、フッ素を長期・持続的に徐放できる抗齶蝕性を有するレジンセメントや、酸化チタンの光触媒機能を利用した抗菌性の歯冠用レジンを試作してきた。そこで今回は、レジンも含めたセメントに生物学的な機能を付与できないかと思案していたところ、創傷治癒効果を有するセリシンを見出したのである。

## 2. 研究の目的

セリシンの抗炎症作用や大腸癌抑制作用、抗酸化作用、細胞増殖促進作用など報告されているが、歯科用に応用された報告はほとんどなく正に画期的な研究と考えられる。セリシンをセメントに添加することで創傷治癒効果を期待するわけであるが、具体的な応用方法は、歯牙歯頸部に直接塗布して露出させて使用する、あるいは仮封冠の仮着用セメント、さらにセメント硬化後もセリシンが極微量でも徐放することができれば合着用としても応用可能となる独創的な研究と考えられる。予想される効果としては、初期の歯肉炎や支台歯形成後の仮封冠装着時の軽微な歯肉炎の沈静作用、長期的には歯冠補綴物装着後に起こる可能性がある歯肉の退縮による二次カリエスや審美的なトラブルを解消できる可能性を秘め、研究する意義はきわめて高いと思われる。

## 3. 研究の方法

(1) セリシンを添加したセルフアドヒーズブレジンセメントの硬化特性を検討した。

当初は、まず仮封冠の仮着用セメントであるカルボキシレートセメントにセリシンを添加することを考えていたが、口腔内で長期使用することを考え、合着用セメントに添加することに変更した。市販のセルフアドヒーズ

ブレジンセメントに、市販のセリシンホープ・コクーンを1.0、2.0、3.0、5.0、10.0wt%添加した、直径10mm、厚さ2mmのディスク状の試験片を作製した。セリシンを添加したことによるセメントのヌープ硬さの影響を検討するために、室温の暗所に保管し経時的（直後、30分、1時間、3時間、1日、7日）に微小硬度計にて測定した。

次に、セリシンを1.0、2.0、5.0、10.0wt%添加した試験片を同様に作製し、1週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6か月間37°C蒸留水中に浸漬後ヌープ硬さを測定し、水中浸漬によるヌープ硬さの変化を評価した。

(2) セリシンを添加したレジン強化型グラスアイオノマーセメントの硬化特性を評価した。

セルフアドヒーズブレジンセメント同様のセリシン添加濃度の試験片を作製し、初期のヌープ硬さ、長期の水中浸漬後のヌープ硬さを検討した。

(3) セリシンを添加したセメントの創傷治癒効果を検討した。

全身麻酔下でラットの上顎中切歯の歯肉縁エナメル質に、5.0wt%添加したセルフアドヒーズブレジンセメントを塗布し硬化させた。次に、唇側歯肉縁から幅が約1mmで深さが約0.5mmの歯肉を切除し、経日的（1、3、7、14日）に歯肉の回復状態を肉眼的に観察した。反対側同名歯も同様に歯肉を切除しコントロールとした。

また、全身麻酔下でラットの上顎中切歯の歯冠形成を行い、形成前に採得した印象を利用して、即時重合レジンで仮封冠を作製した。5.0wt%濃度のセリシンを添加したレジン強化型グラスアイオノマーセメントで仮封冠を仮着した。次に、唇側歯肉縁から幅が約1mmで深さが約0.5mmの歯肉を切除した。ラットを1ヶ月と3ヶ月後に屠殺し、灌流固定後にパラフィン切片を作製し、HE染色し光学顕微鏡で観察した。反対側同名歯をコントロールとした。

(4) セリシンを添加したセメントの歯頸部周囲の細胞への影響の検討を考慮した。

ラットの前歯歯頸部歯肉を切除し、コラゲナーゼで結合組織を分解したものを、10%牛胎児血清入り培養液で培養シャーレに播種し、CO<sub>2</sub>インキュベータで培養後、細胞種を単離細胞として分離培養する。次に、セリシンを添加したレジン強化型グラスアイオノマーセメントで作製した試験片を培養液に浸漬する。ポジティブコントロールとしてFibroblast Growth Factor (FGF)を、ネガティブコントロールとしてセリシンを添加していないセメント試験片のみを用いる。各細胞種の細胞数とMTTアッセイで増殖のちがいを評価する。セリシ

ンがガラスアイオノマーセメントの構成成分であるカルシウムやアルミニウムイオンとキレート結合していれば、セリシンの創傷治癒効果を立証できるのではと考えた。しかしながら、細胞腫の分離培養の技術を持ち合わせていなかった。

#### 4. 研究成果

(1) セリシンを添加したセルフアドヒーシブレジメンセメントの硬化特性について検討を加えたところ、セリシンを 1.0~5.0wt%添加した試験片は未添加の試験片と同様な硬化特性とヌープ硬さを示した。しかしながら、10.0wt%添加した試験片ではヌープ硬さが低下した(図1)。したがって、セリシンの添加量は 5.0wt%が上限ではないかと考えられた。

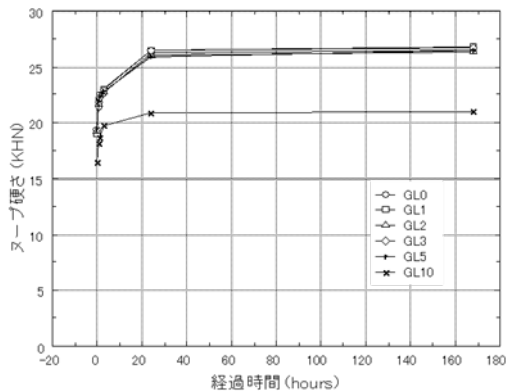


図1 セリシン添加したセルフアドヒーシブレジメンセメントのヌープ硬さの経時的変化

次に、セリシンを 1.0、2.0、5.0、10.0wt%添加した試験片の長期水中浸漬後のヌープ硬さにおいては、1.0~5.0wt%添加した試験片では、未添加のコントロールと同様、水中浸漬6ヶ月後もヌープ硬さが低下しなかったのに対し、10.0wt%添加した試験片では、3ヶ月後からヌープ硬さが低下しコントロールと比較して有意に低い値を示した(図2)。以上のことから、セルフアドヒーシブレジメンセメントに添加するセリシンは、5.0wt%が適切であると考えられた。

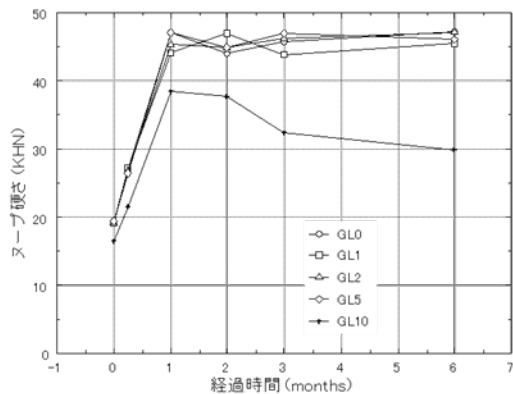


図2 セリシン含有セルフアドヒーシブレジメンセメントの水中浸漬後のヌープ硬さ

(2) セリシンを添加したレジン強化型ガラスアイオノマーセメントの硬化特性について検討を加えたところ、セルフアドヒーシブレジメンセメント同様、セリシンを 1.0~5.0wt%添加した試験片は未添加の試験片と同様な硬化特性とヌープ硬さを示した。しかしながら、10.0wt%添加した試験片ではヌープ硬さが低下した(図3)。

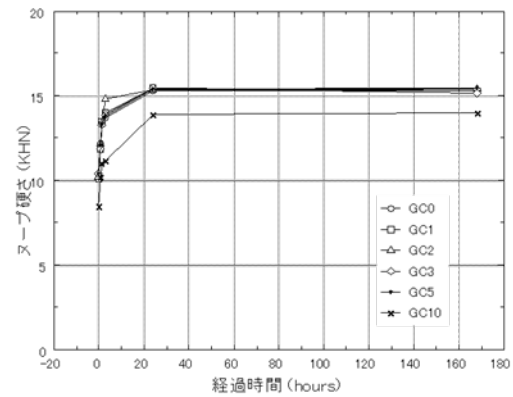


図3 セリシンを添加したレジン強化型ガラスアイオノマーセメントのヌープ硬さの経時的変化

次に、セリシンを 1.0、2.0、5.0、10.0wt%添加した試験片の長期水中浸漬後のヌープ硬さにおいては、1.0~5.0wt%添加した試験片では、未添加のコントロールと同様、6ヶ月後もヌープ硬さが低下しなかったのに対し、10.0wt%添加した試験片では、3ヶ月後からヌープ硬さが低下しコントロールと比較して有意に低い値を示した(図4)。以上のことから、レジン添加型ガラスアイオノマーセメントに添加するセリシンも、5.0wt%が適切であると考えられた。

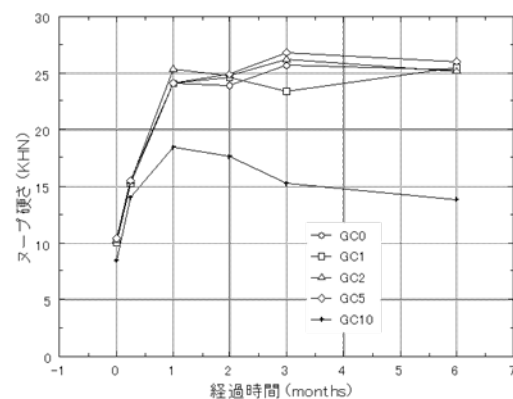


図4 セリシン含有のレジン強化型ガラスアイオノマーセメント水中浸漬後のヌープ硬さの経時的変化

(3)セリシンを添加したセメントの創傷治癒効果について検討を加えたところ、ラットのエナメル質歯肉縁に塗布し硬化させたセメントにおいては、7日後にはコントロールもセリシンを添加したセメントを塗布したものもほぼ正常に歯肉は回復した。しかしながら、それらの回復状態の差は認められなかった。

ラットの上顎中切歯にセリシン含有のレジン強化型グラスアイオノマーセメントで仮着した仮封冠においては、健全歯肉のコントロールに対し、角化上皮と付着歯肉の炎症の回復がやや早いと思われた。

したがって、創傷治癒効果を検討するためには、セメントの種類や添加方法、さらには評価方法などを考慮しなければ判断できないという結果に終わり、当初の目的は達成できなかった。

#### 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0件)

[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)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

吉田 圭一 (YOSHIDA KEIICHI)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：70230729

##### (2)研究分担者

平 曜輔 (TAIRA YOSUKE)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40226725

佛坂 斉祉 (HOTOKEZAKA HITOSHI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：90199513

鎌田 幸治 (KAMADA KOHJI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60264256

##### (3)連携研究者

該当なし