

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592894

研究課題名(和文)象牙質基質由来MMP活性を抑制する銀系バイオガラス含有レジン素材の開発

研究課題名(英文)Development of resin contained Ag-doped bioglass that inhibit MMP activity of dentin

研究代表者

橋本 正則 (HASHIMOTO, Masanori)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：00337164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：銀系バイオガラスを作製し、それらのMMP活性抑制効果およびRAW264に対する細胞毒性を調べた。銀系バイオガラス(酸化銀3%配合)は象牙質由来のMMP-2およびMMP-9活性を抑制した。しかし、細胞毒性の発現も認められた。これらの結果は、溶出した銀イオンの作用による。今後、ガラスの銀含有量およびイオン溶出量を調整することによって、MMP活性の抑制効果を増強し、さらに、細胞毒性を低下させたバイオガラスを作製する必要がある。

研究成果の概要(英文)： We evaluated the effects of a Ag-doped bioglass on inhibition of MMP and cytotoxicity to cells (RAW264). Ag-doped bioglass with 3% Ag₂O inhibited the activity of MMP-2 and MMP-9 derived from dentin. However, this bioglass also showed cytotoxic effects. These findings may be attributed to the release of ions from bioglass. Further studies are required to optimize the bioglass composition for controlled release of ions to increase the inhibition effect of MMP activity and decrease the cytotoxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：MMP バイオガラス 劣化 レジン接着

1. 研究開始当初の背景

口腔内のバクテリアや唾液中の消化酵素などがレジン・象牙質接着における主要な接着構造である樹脂含浸層のコラーゲン線維網を加水分解し、接着構造を崩壊させる機序を申請者は *in vitro* だけでなく *in vivo* の実験系を用いて明らかにしてきた。食事療法や適切なブラッシングなどによって口腔衛生状態が改善することで、レジン修復材の耐久性は向上する。しかし、ヒト象牙質基質に内在する MMP (マトリックスメタロプロテアーゼ) (MMP-1, 2, 8, 9 など) は、微量ではあるが経年的に放出される一種の酵素である。したがって、MMP による樹脂含浸層のバイオデградーションを阻止するために、象牙質基質由来の MMP 活性を抑制する新規材料の開発が国際的に切望されている。

2. 研究の目的

歯科用レジン系材料の長期接着耐久性の向上を目指して、ヒト象牙質基質由来 MMP 活性を抑制する銀系バイオガラス添加レジン材料の開発を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

【試験試料の作製】

- レジンマトリックス: Bis-GMA, TEGDMA, HEMA 系レジンの調整
- 銀系バイオアクティブガラス ($\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$) の作製
高温電気炉にてバイオガラスを作製し、粉碎機にて粒子径 15 - 40 μm のガラス粒子を作製する。レジンとバイオガラス粒子を配合・調整し、試験試料 (銀系バイオガラス添加レジン) を作製し、一定期間 (1~200 日) 各種試験溶液 (蒸留水、人工唾液、疑似体液など) に浸漬する。

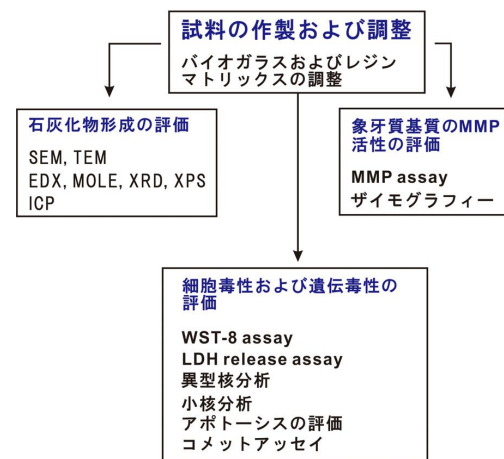
【石灰化物の分析】

試験試料を長期浸漬後、試料表面に形成された石灰化物の定量を行うとともに、形態観察 (SEM, TEM) および分子構造の解析 (EDX, MOLE, XRD, XPS) を行う。さらに試験溶液へ溶出したイオン濃度の測定 (ICP) を行う。下記に示した実験機器を使用する。走査型電子顕微鏡 (SEM)、エネルギー分散 X 線分光器 (EDX)、透過型電子顕微鏡、レーザーラマン分光光度計、X 線回折装置、X 線光電子分光装置 (XPS)、プラズマ発光分光分析装置 (ICP)

【細胞毒性および遺伝毒性の評価】

試験試料を培養液に調整し、その培養液を細胞に曝露する。一定時間経過後、細胞毒性試験 (WST-8 assay, LDH assay)、遺伝子発現 (定量 PCR 装置、フローサイトメーター)、形態観察 (SEM, TEM, 共焦点レーザー顕微鏡) および遺伝毒性の解析 (異型核分析、小核分析、アポトーシス分析、コメットアッセイ) を行う。

実験方法の概略図



4. 研究成果

銀系バイオガラス添加レジン材料を作製したが、ガラス粒子のレジン内での分散性に改良する必要があると考えられた。レジン・象牙質接着構造内のコラーゲン線維の加水分解を引き起こす象牙質基質由来の MMP

活性を有効的に阻止することは、MMPアッセイにより明らかであった。さらに、ザイモグラフィを用いてMMP活性に関する実験を行い、再現性を確かめたが、MMPアッセイと同様な結果が得られた。さらに、比較的短期間にて、人工体液、人工唾液および蒸留水中においても石灰化物を形成することが明らかとなった。形成された石灰化物は炭酸カルシウムを主体とする化合物であるが(XRD, XPS)、石灰化度がエナメル質に近いものもあった(MOLE)。さらに、バイオガラスそのものは骨芽細胞の骨誘導能(ALP活性)を向上させる機能を有するが、銀を添加したバイオガラスにおいては、骨誘導能に与える影響は、濃度依存性があるため、これについてはさらに詳細な検討が必要であると考えている。修復物周囲から起こる劣化は酵素(MMP)によるコラーゲン線維の加水分解によって引き起こされるが、レジン材料の銀含有のバイオガラスから放出される銀イオンは微量にてMMP活性を抑制し、酵素反応による加水分解を阻止することができると考えられる。さらに銀イオンは口腔内細菌に対しても抗菌性を有することは古くから知られている。しかし、これら材料はMMP活性を抑制し抗菌性も有するが、高濃度では炎症性反応(定量PCR)を惹起し、細胞・遺伝毒性(WST-8、LDH)を有する欠点を持つ。また、細胞核に対する障害作用も認められることから、細胞毒性だけでなく遺伝毒性(異型核分析、小核分析、アポトーシスおよびコメットアッセイなど)に関する継続研究が必要である。さらに、それらを軽減させるためのバイオガラスおよびレジンマトリックスの組成改良または新規材料の応用などが必要であると考えられた。現在は、本研究の継続とともに、各種金属ナノ粒子を用いたMMP活性抑制および遺伝毒性を中心とする細胞応答に関する研究を行っている。

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 7件)

Hashimoto M, Toshima H, Yonezawa T, Kawai K, Narushima T, Kaga M, Endo K (2014).

Responses of RAW264.7 macrophages to water-dispersible gold and silver nanoparticles stabilized by metal-carbon σ -bonds.

Journal of Biomedical Materials Research: Part A 102(6): 1838-1849.

Hashimoto M, Toshima H, Yonezawa T, Kawai K, Iijima M, Endo K (2014).

Evaluation of silver nanoparticle toxicity to RAW264.7 cells in a three-dimensional cell culture.

Journal of Biomaterials and Tissue Engineering 4(1): 1-8.

Kaga M, Kakuda S, Ida Y, Toshima H, Hashimoto M, Endo K, Sano H (2014).

Inhibition of enamel demineralization by buffering effect of S-PRG filler-containing dental sealant.

European Journal of Oral Sciences 122(1): 78-83.

Kakino K, Endo K, Hashimoto M, Furuta K, Ohno H (2014).

Visualization study on distortion of a metal frame by polymerization shrinkage and thermal contraction of resin.

Dental Materials Journal 33(1): 118-124.

Iijima M, Hashimoto M, Nakagaki S, Muguruma T, Kohda N, Endo K, Mizoguchi I (2014).

Bioactive glass coating of orthodontic material for the recovery of mechanical properties of etched enamel.

Journal of Biomaterials and Tissue

Engineering 4(4): 1-7.

Hashimoto M, Toshima H, Yonezawa T, Kawai K, Narushima T, Kaga M, Endo K (2013).

Micromorphological cellular responses of MC3T3-E1 and RAW264.7 after exposure to water-dispersible silver nanoparticles stabilized by metal-carbon σ -bonds.

Dental Materials Journal 32(5): 1-9.

Iijima M, Hashimoto M, Kohda N, Nakagaki S, Muguruma T, Endo K, Mizoguchi I (2013).

Crystal growth on bioactive glass sputter-coated alumina in artificial saliva.

Dental Materials Journal 32(5): 775-780.

〔学会発表〕(計22件)

橋本正則、戸島洋和、長野二三、井田有亮、遠藤一彦。

ナノメタル粒子曝露後の細胞の形態変化
北海道医療大学歯学会第31回学術大会
(3月9日、2013、札幌市)

橋本正則、戸島洋和、米澤 徹、河合功治、加我正行、遠藤一彦。

ナノ銀粒子が細胞に与える影響 2次元および3次元培養の比較
第61回日本歯科理工学会学術講演会(4月13日、2013、東京都)

戸島洋和、橋本正則、長野二三、加我正行、遠藤一彦。

ポルトランドセメント粉末に対するマクロファージ様細胞の反応

第61回日本歯科理工学会学術講演会(4月13日、2013、東京都)

角田晋一、加我正行、井田有亮、戸島洋和、橋本正則、遠藤一彦、佐野英彦。

多種イオンを徐放するシーラント材による脱灰抑制の検討

第61回日本歯科理工学会学術講演会(4月13日、2013、東京都)

建部二三、赤沼正康、橋本正則、井田有亮、越智守生、遠藤一彦。

酸性フッ化物溶液による口腔インプラントアバットメント材料の腐食とラクトフェリン吸着による細菌付着抑制について

第61回日本歯科理工学会学術講演会(4月14日、2013、東京都)

戸島洋和、橋本正則、井田有亮、建部二三、遠藤一彦。

ポルトランドセメント粉末の細胞に対する遺伝毒性

平成25年度・日本歯科理工学会 北海道・東北地方会夏期セミナー(9月1日、2013、盛岡市)

橋本正則、戸島洋和、井田有亮、建部二三、遠藤一彦。

酸化ナノ粒子の細胞毒性と遺伝毒性

第62回日本歯科理工学会学術講演会(10月20日、2013、新潟市)

伊藤修一、橋本正則、齋 富美子、斎藤隆史。

人口唾液保管8年による疎水性レジンが象牙質接着強さに与える影響

日本接着歯学会第30回学術大会(1月21日、2012、函館市)

王 蘋、付 佳楽、加我正行、橋本正則、佐野英彦、八若保孝。

機能性微粒子(S-PRGフィラー)含有シーラント材の牛歯エナメル質接着

日本接着歯学会第30回学術大会(1月21日、2012、函館市)

加我正行、王 蘋、付 佳楽、橋本正則、八若保孝。

機能性微粒子(S-PRGフィラー)含有シーラント材のイオン溶出による酸緩衝能効果

日本接着歯学会第30回学術大会(1月21日、2012、函館市)

戸島洋和、橋本正則、長野二三、井田有亮、遠藤一彦。

ポルトランドセメント溶出物の分析と細胞の活性に与える影響

北海道医療大学歯学会第30回学術大会(3月3日、2012、札幌市)

橋本正則、戸島洋和、米澤 徹、河合功治、加我正行、遠藤一彦。

水溶性モノマー結合銀ナノ粒子の細胞に対する影響

第59回日本歯科理工学会学術講演会(4月14日、2012、徳島市)

戸島洋和、橋本正則、長野二三、井田有亮、遠藤一彦。

ポルトランドセメントの溶出成分が骨芽細胞様細胞の活性に及ぼす影響

第59回日本歯科理工学会学術講演会(4月14日、2012、徳島市)

長野二三、井田有亮、橋本正則、遠藤一彦。

歯科用インプラントアバットメント材料の表面に結合したラクトフェリンによる細菌の付着抑制に関する検討

第59回日本歯科理工学会学術講演会(4月14日、2012、徳島市)

加我正行、井田有亮、戸島洋和、橋本正則、遠藤一彦。

S-PRG微粒子含有シーラント材の酸緩衝能

第59回日本歯科理工学会学術講演会(4月15日、2012、徳島市)

伊藤修一、橋本正則、斎藤隆史。

人口唾液保管8年がワンステップボンディング材の長期耐久性に与える影響

第59回日本歯科理工学会学術講演会(4月15日、2012、徳島市)

Ida Y, Ohno H, Nagano F, Hashimoto M, Toshima H, Endo K.

14K gold alloy with sponge-like surface as a novel material for porcelain fused metal restorations.

Japan-China Dental Conference 2012 (April, 27,

2012, Chengdu, China)

遠藤一彦、飯嶋雅弘、井田有亮、橋本正則、長野二三、戸島洋和、溝口 到。

DL C膜をコーティングした純チタンの疑似体液中における腐食挙動

第60回日本歯科理工学会学術講演会(10月13日、2012、福岡市)

橋本正則、戸島洋和、米澤 徹、河合功治、加我正行、遠藤一彦。

水分散性ナノメタル粒子のマクロファージに対する影響

第60回日本歯科理工学会学術講演会(10月13日、2012、福岡市)

井田有亮、大野弘機、柿崎 税、長野二三、橋本正則、戸島洋和、遠藤一彦。

スポンジ状の表面構造を有する14K金合金の陶材焼付用合金への応用

第60回日本歯科理工学会学術講演会(10月13日、2012、福岡市)

21 長野二三、橋本正則、井田有亮、戸島洋和、遠藤一彦。

ラクトフェリン吸着による口腔インプラントアバットメントへの細菌の付着抑制

第60回日本歯科理工学会学術講演会(10月13日、2012、福岡市)

22 加我正行、角田晋一、井田有亮、戸島洋和、橋本正則、佐野英彦、遠藤一彦。

S-PRGフィラー含有シーラント材の牛歯エナメル質脱灰抑制

第60回日本歯科理工学会学術講演会(10月14日、2012、福岡市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 正則 (HASHIMOTO, Masanori)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：00337164

(2)研究分担者

遠藤 一彦 (ENDO, Kazuhiko)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：70168821

(3)連携研究者

()

研究者番号：