

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792023

研究課題名(和文) 歯科用セメントからの微量溶出イオンの歯髄・歯根膜細胞に対する活性化作用の検索

研究課題名(英文) Effects of ions released from dental cements on osteoblast-like cells

研究代表者

騎馬 和歌子 (Kiba, Wakako)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招聘教員

研究者番号：10523087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：Sr²⁺、Al³⁺、Na⁺、B³⁺、およびSi⁴⁺の標準溶液を、Sr(NO₃)₂、NaNO₃、H₃BO₃、Na₂SiO₃といったように、被験イオンに対するカウンターイオンを同一のものとする工夫を施して作製した。種々の濃度での各イオン液のpHが中性となるように水酸化ナトリウムで調整を行うことで、標準溶液の作製に成功した。作製した標準液を用いて、骨芽細胞様細胞の増殖と分化に対する影響を検索したところ、Sr²⁺は細胞の増殖にポジティブに働き、B₀₃₃-とF-hはネガティブに働くことが分かった。

研究成果の概要(英文)：To examine each of B₀₃₃-, Sr²⁺, Al³⁺, Na⁺, SiO₃²⁻, and F-, we succeed to make solutions with same counter ions such as H₃BO₃, Sr(NO₃)₂, Al(NO₃)₃, Na₂SiO₃, and NaF at the neutral pH. MC3T3-E1 cells were seeded and each solution was added. Cell proliferation was examined by MTT assay. Significant increase in the cell number was obtained by Sr(NO₃)₂. Culture with H₃BO₃ for 3 days and NaF demonstrated inhibition of cell proliferation in a dose-dependent manner. MC3T3-E1 cells proliferate well in the presence of Sr(NO₃)₂, indicating the positive effects of Sr²⁺ ion on osteoblasts. On the contrary, B₀₃₃- and F- appear to have negative influences on osteoblastic proliferation.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：保存修復学 歯科用修復材料 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

現在の日常臨床において広く使用されているガラスイオノマーセメント、MTA (Mineral Trioxide Aggregate)セメントあるいは S-PRG フィラー配合コンポジットレジンなどからは、Ca²⁺や F⁻イオンの他に、Sr²⁺、Si⁴⁺、Al³⁺などのイオンが微量溶出することが知られている。これらのイオンは細胞に対してさまざまな作用を示すと考えられるが、これまでの研究の多くは歯科領域とくに骨再生に関する細胞への作用を調べたもので、これらが歯髄や歯根膜の細胞にどういった影響を及ぼすのかの詳細についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、“バイオアクティブ”な作用を備えた歯科用修復材料の開発へと繋げる第一歩として、歯科用セメントからの微量溶出イオンの歯髄・歯根膜細胞の増殖・分化・石灰化に及ぼす影響を、個々のイオンごとに詳細に検索することを目的とする。

3. 研究の方法

1. イオン液の調整

Sr²⁺、Al³⁺、Na⁺、B³⁺、および Si⁴⁺の標準溶液を作製する。Sr (NO₃)₂、NaNO₃、H₃BO₃、Na₂SiO₃といったように、被験イオンに対するカウンターイオンを同一のものとする工夫を施してイオン液を作製する。種々の濃度での各イオン液の pH を pH メーターを用いて測定し、中性となるように水酸化ナトリウムで調整を行う。

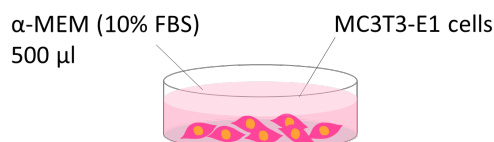
2. イオン液の骨芽細胞様細胞に対する作用の評価

細胞は、マウス由来の骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 を使用し、細胞の活性化に適したイオンの濃度を検索する。

1) MTT アッセイ

48 ウェル細胞培養プレートの各ウェルに各イオンの標準液を種々の濃度で添加した増殖培地を用いて 1 × 10⁴ cells/ウェルとなるように調整した MC3T3-E1 細胞懸濁液 500 μl を播種する。37 °C、5% CO₂ 下にて1または3日間培養を行った後、培地に MTT 含有 PBS を添加し、4 時間培養後、DMSO を添加して2時間反応させ、570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定して細胞増殖を評価する。イオンの標準液を添加せずに増殖培地を用いて培養した場合をコントロールとし、結果を比較する。

H ₃ BO ₃	200, 100, 50, 25 ppm
Sr(NO ₃) ₂	50, 25, 10, 5 ppm
Al(NO ₃) ₃	5, 2.5, 1, 0.5 ppm
Na ₂ SiO ₃	50, 25, 10, 5 ppm
NaF	200, 100, 50, 25 ppm



2) 細胞の形態観察

上記と同様の条件で培養 1 日後に位相差顕微鏡による観察を行い、初期の細胞付着状態を比較する。

3) ALP 活性測定

48 ウェル細胞培養プレートとなるように調整した MC3T3-E1 細胞懸濁液 500 μl を播種する。3 日ごとに培地を交換しながら 1, 3, 7, 14 日間培養を行った後、0.02% Triton X 含有 PBS を添加して凍結・融解を二回繰り返して細胞を破碎後、Alkaline Phosphatase Substrate Kit および BCA Protein Assay Kit を用いて測定を行い、ALP 活性を算出する。イオンの標準液を添加せずに分化誘導培地を用いて培養した場合をコントロールとし、結果を比較する。

3. S-PRG フィラーを用いた無機セメントの細胞に及ぼす影響の検討

1) S-PRG セメント試料の調製と成分溶出性の検討

フルオロボロアルミノシリケートガラスとポリアクリル酸を反応させた S-PRG フィラーには、Al³⁺、BO₃³⁻、Na⁺、SiO₃²⁻、Sr²⁺、F⁻といった多種のイオンを徐放する特徴がある。この S-PRG フィラーとポリアクリル酸/トリカルボン酸を組み合わせた S-PRG セメントを試作し、フィラー粉末と液成分を P/L 比 = 2/1 で混和して、直径 9 mm、厚さ 2 mm のディスク状硬化体を作製した。

試料を 37 °C の Milli-Q 水に浸漬し、Sr、Al、Na、B、Si 溶出濃度を ICP 発光分光分析法により、F⁻濃度をフッ素イオン電極を用いて、経時的に測定した。

2) S-PRG セメントの細胞付着性の評価

S-PRG セメント (以下 S-PRG) への骨芽細胞様細胞の付着を、光硬化型ガラスイオノマーセメント (Fuji Ionomer Type II LC, GC, 以下 RMGIC)、従来型ガラスイオノマーセメント (Fuji IX, GC, 以下 GIC)、酸化亜鉛ユーージノール系セメント (Super EBA, Bosworth, 以下 ZOE)、MTA セメント (ProRoot MTA, Dentsply, 以下 MTA) と比較した。48 ウェル細胞培養プレートの各ウェルにセメント硬化試料を置き、増殖培地を用いて 5 × 10⁴ cells/ウェルとなるように調整した MC3T3-E1 細胞懸濁液 500 μl を試料上に播種した。37 °C、5% CO₂ 下にて 24 時間培養を行った後、MTT アッセイにより試料上の細胞数を評価した。また、SEM による観察を行い、細胞付着状態を形態学的に比較した。

4. 研究成果

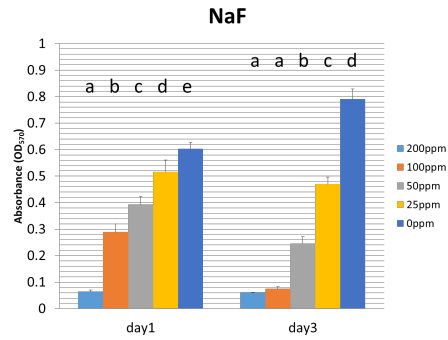
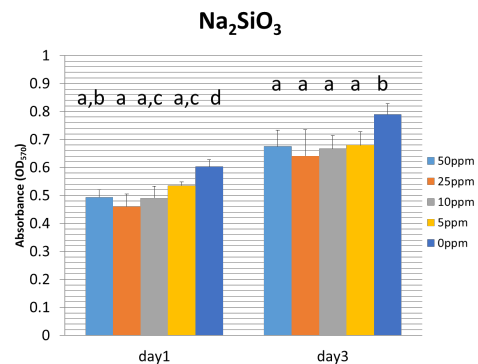
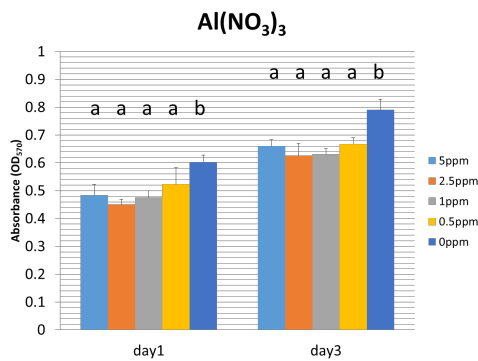
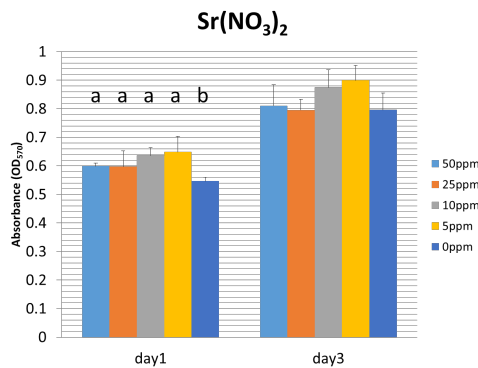
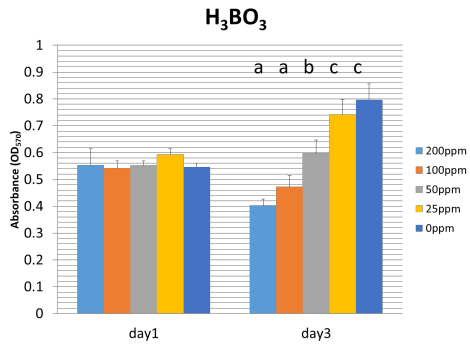
1. イオン液の調整

表のように、カウンターイオンを同一のものとし、かつ、pH が中性になるようなイオン標準液の作製に成功した。

ion	solution	pH
BO_3^-	H_3BO_3	6.13
Sr^{2+}	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$	5.50
Al^{3+}	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	5.14
SiO_3^{2-}	Na_2SiO_3	6.07
F^-	NaF	7.32

2. イオン液の骨芽細胞様細胞に対する作用の評価

1) MTT アッセイ



$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 存在下で培養した場合は、1 日後の培養において、有意な細胞増殖促進がみられた。 Na_2SiO_3 と $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 存在下ではわずかに細胞の増殖が抑制された。 H_3BO_3 for 3 days と NaF で 1 または 3 日培養後では、濃度依存的に細胞の増殖が抑制された。

2) 細胞の形態観察

$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, Na_2SiO_3 and Control では、紡錘形をした細胞突起を伸ばした細胞が観察されたが、 BO_3^{3-} と F^- では、細胞の数は少なく、円形を示していた。

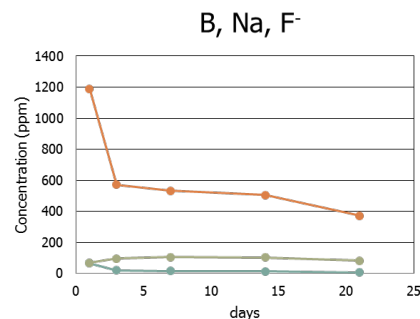
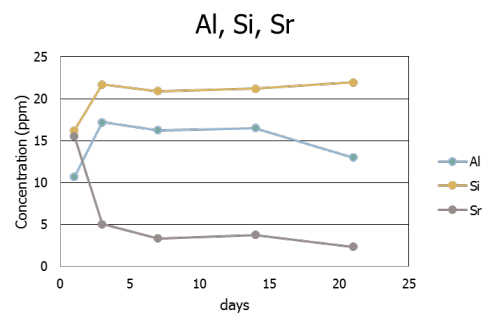
3) ALP 活性測定

細胞の分化の評価のために ALP 活性を測定したが、結果は安定せず、他の方法による分化の評価が必要であることが判った。

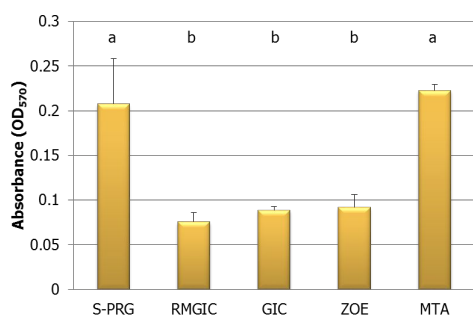
3. S-PRG フィラーを用いた無機セメントの細胞に及ぼす影響の検討

1) S-PRG セメント試料の調製と成分溶出性の検討

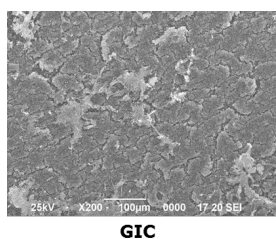
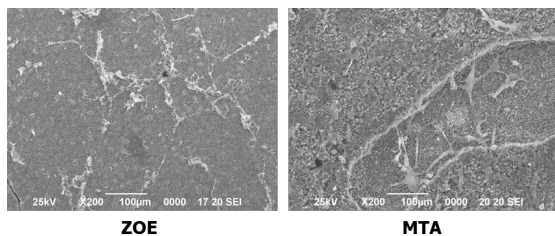
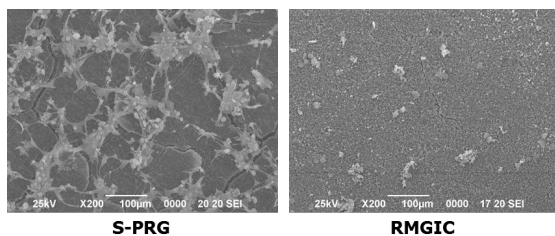
時間経過とともに溶出濃度は低下したものの、Sr を含む全ての成分とも、浸漬開始より 21 日目まで持続的な溶出が認められた。



2) S-PRG セメントの細胞附着性の評価
S-PRG では, RMGIC, GIC および ZOE と比較して有意に多くの細胞附着がみられた(n = 3, ANOVA, Sheffe ' s F-test, p < 0.05) . S-PRG と MTA 間には有意差は認められなかった .



SEM 観察によると, RMGIC, GIC および ZOE では, 突起のない不正形の萎縮した細胞が点在するのみであったが, S-PRG および MTA では, 樹状突起を進展した細胞の附着が観察された .



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 2 件)

Ma S, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Takeda K, Izutani N, Kitagawa H, Chen J. Mechanism of detoxification of the cationic antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridiniumbromide (MDPB) by N-acetyl cysteine. Dent Mater. 2013; 29: 1219-27. 査読有

騎馬和歌子, 今里聡, エビデンスに基づく

根面う蝕の治療方針 日本歯科評論 2014; 74: 37-43. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

マルチイオン徐放性 S-PRG フィラー含有試作セメントへの骨芽細胞様細胞への附着性 騎馬和歌子, 三木彩希, 今里聡, 第 61 回歯科理工学会, 東京都 タワーホール舟堀, 2013 年 4 月 13 日

W. KIBA, S. MIKI, S. IMAZATO. Effects of ions released from S-PRG filler on osteoblast-like cells. IADR-APR 2013, Aug19, Bangkok, Thai .

S-PRG フィラーから溶出する各イオンの抗菌性への関与 三木彩希, 騎馬和歌子, 北川蘭奈, 林 美加子, 今里 聡, 第 62 回日本歯科理工学会, 新潟市, 2013 年 10 月 19 日

[図書] (計 1 件)

高橋信博・恵比須繁之 監訳 山口幹代 青葉孝昭 景山正登 大野純一 岩見行晃 木本敦 稲葉大輔 佐野哲也 佐藤拓一 渡部茂 渡辺幸嗣 中條和子 鷲尾純平 飯島洋一 騎馬和歌子 吉岡靖介 前園葉月 米畑有里 西真紀子 高橋信博 翻訳: デンタルカリエス 原著 第 2 版 その病態と臨床マネージメント, 第 21 章: p335-351, 第 23 章: p391-405, 2013.

[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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

騎馬 和歌子 (KIBA WAKAKO)

大阪大学・歯学研究科・招聘教員

研究者番号 : 1 0 5 2 3 0 8 7