

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861819

研究課題名(和文) 抗酸化アミノ酸を応用した新規歯科材料の開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Development of new dental material using anti-oxidant amino acid derivative

研究代表者

南川 元 (Minamikawa, Hajime)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70625607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯科材料に対するNアセチルシステイン(NAC)の影響を調べた。歯科材料によるマウス骨芽細胞に対する影響を抗酸化アミノ酸であるNACが改善することができるか検討した。NACの応用は、骨芽細胞の細胞内グルタチオンを増強しその細胞活性を改善した。また、ラット露髄モデルを作成し、NACの直接覆髄剤としての可能性を検索した。ラット上顎第一臼歯に形成した窩洞内にNAC含有コラーゲンスポンジで直接覆髄を行った。4週間後に屠殺し、H-E染色を行い光学顕微鏡下で観察した。NAC添加群では露髄面に修復象牙質誘導が認められた。NACを応用することで新しい機能を持った歯科材料の開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study tested whether N-acetyl cysteine (NAC), anti-oxidant amino acid derivative, could control the effect of dental materials on osteoblasts and dental pulp. NAC improve osteoblastic viability by application of N-acetyl cysteine with increased level of intracellular glutathione reserves. A rat model was used to examine the potential of NAC as a direct-pulp-capping agent. NAC containing-collagen sponge was placed onto the exposed pulp in maxillary first molar of 8 week-old Sprague-Dawley rats. Rats were sacrificed at 4 weeks post-operatively. Teeth were stained with hematoxylin-eosin and observed under a light microscopy. In vivo experiments, NAC induced reparative dentin. It was indicated that NAC induce dentin regeneration on dental material.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯科材料 抗酸化アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

深在性う蝕に対して、充填処置を行ったあと、疼痛などの歯髄症状を訴えることがある。切削による機械的刺激の他に、充填材料そのものの刺激が考えられる。そのため、象牙細管の直径が太い乳歯や幼若永久歯では、感染歯質除去後の窩洞が歯髄に近接している場合は、間接あるいは直接歯髄覆罩処置を行うことが推奨されている。しかし、歯髄覆罩は基本的に象牙質再生を期待するというより、歯髄を保護するという役割を主としており、水酸化カルシウムによる直接歯髄覆罩でさえデンチンブリッジの形成が見られるのは50%に満たないと報告されている (Tsaryk *et al.*, Biomaterials, 2007)。近年、生体材料が細胞に及ぼす為害作用と酸化ストレスとの関連性が指摘されている (Schweiki *et al.*, J Dent Res, 2006)。例えば、TEGDAM や HEMA 材料はなどの重合剤は、重合反応過程で過剰の活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) を発生する。この重合反応時に発生した ROS に起因する酸化ストレスが、歯髄細胞内の DNA や細胞膜などに傷害を及ぼすことが報告された (Demirci *et al.*, Dental Materials, 2007)。例えば、何らかの方法で重合時に発生する ROS を消去することが出来れば、より安全な歯科治療が可能となる。

抗酸化システイン誘導体である N-アセチルシステイン (NAC) は、直接的抗酸化能を示すだけでなく、グルタチオン (GSH) を細胞内に供給することで、細胞内の酸化還元反応を改善する性質を有している。以上のことから、申請者は、歯科材料に NAC を応用することによって、生体安全性が高く、従来の材料にない石灰化組織誘導能力という付加価値を有する充填材料の開発が可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体親和性の高い歯科材料の開発を念頭に、NAC を応用した充填材料が歯髄細胞内でおこる酸化ストレスを改善することが可能か実験動物を使用して明らかにするとともに、NAC を歯科材料に応用することにより、歯科材料としての機械的性質を損なうことがないかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 機械的強度の検討

従来型グラスアイオノマーセメント (GICs) を被験材料として用いた。

-圧縮強度試験-

NAC (10mM) を含有させた GICs で直径 6mm x 厚さ 3mm の円柱状に試料を作成し、24 時間後にダイアメトラル引張試験 (INSTRON 万能材料試験機 クロスヘッドスピード 0.5mm/min) を行う。

-接着評価試験-

NAC 無添加の GICs (Control) と NAC を GICs の練和前の液に重量に対して 10mM になるように混和した後に練和した GICs (NAC) を用意しヒト抜去歯象牙質面に築盛した。24 時間蒸留水に浸漬させた後、接着面積を約 1mm² になるようにトリミングし、微小引張り強さ (SHIMADU EZ test クロスヘッドスピード 0.5mm/min) を測定した。統計解析法として、t-test を行った。

(2) 細胞生物学的評価

-細胞接着量の評価-

GICs はメーカー指定の粉液比にて練和し、直径 6mm、厚さ 3mm の円盤状に作製した。作製した試料は、骨分化誘導培地に 1 週間浸漬し GICs 溶出液を作製した。GICs 溶出液 (GICs)、10mMNAC 添加 GIC 溶出液 (NAC) もしくは、GICs 溶出液未添加 (Control) の培養液を用い、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を培養した。播種 24 時間後の細胞接着量を WST-1 (Roche) を用いて呈色反応を行い波長 450nm にて吸光度を測定することにより検討した。総グルタチオン量は細胞播種 24 時間後に Glutathione Quantification Kit (同仁化学研究所) を用いて測定した。統計解析法として、細胞接着量測定には一元配置分散分析後にボーンフェローニ多重比較検定を行った。

-NAC のサイトカイン抑制効果の検討-

in vitro で抗酸化アミノ酸である NAC の Lipopolysaccharide (LPS) 刺激下での炎症性サイトカインへの影響を検討し、MC3T3-E1 細胞に LPS 刺激をおこない、NAC 添加したものを実験群、無添加を LPS 刺激群として、6 時間後の炎症性サイトカインである IL-6 の発現を Real-time PCR 法で検討した。

(3) ラット露髄モデルを作成。NAC の直接覆髄剤としての効果を検討

-ラット露髄モデルでの NAC の効果の検討-

全身麻酔を施した SD ラットの上顎臼歯特注のラット用クランプでラバーダムを装着し、ダイヤモンドポイントで歯髄まで穿通させ、ラット露髄モデルを作成した。この形成した窩洞内に NAC 含有コラーゲンスポンジで直接覆髄した後、4-META/MMA-TBB レジンで填塞した。4 週間後に屠殺を行い、dentin bridge の有無を病理組織学的に観察した。ヘマトキシリン-エオジン染色標本を光学顕微鏡下で観察し硬組織形成を評価した。

4. 研究成果

(1) 機械的強度の検討

ダイアメトラル引張強さは Control の GICs と比較し、NAC を含有させた GICs は平均値においてわずかに増加したが、統計学的有意差は認められなかった。(図 1)

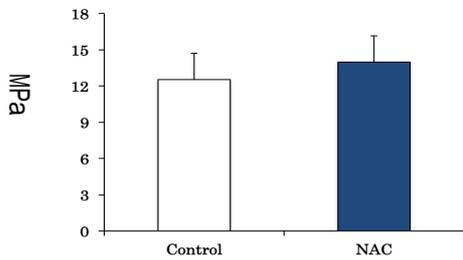


図1. ダイアメトラル試験

Control: NAC 非含有 GICs

NAC: NAC 含有 GICs

微小引張り試験においても、Control の GICs と比較して NAC を応用させた GICs の接着強度は変化せず、統計学的有意差は認められなかった。

(2) 播種 24 時間後の細胞接着量は GICs 群と比較し、NAC を添加した群では 50% 以上増加した(図2)。播種 24 時間後においても、NAC を添加した群では、Control と比較し統計学的有意差は認められなかった。また、総グルタチオン量は GI+NAC 群は GI 群と比較して有意に増加した(図3)。

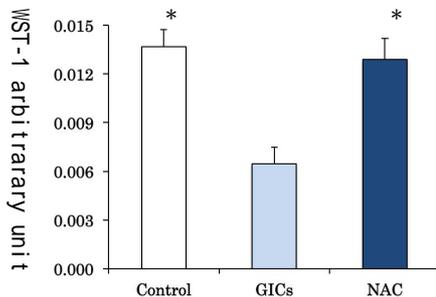


図2. 播種 24 時間後の細胞接着量

Control; GICs 溶出液未添加培養液

GI; GI 溶出液

NAC; NAC 添加 GI 溶出液

同一記号には統計学的有意差は認められなかった。

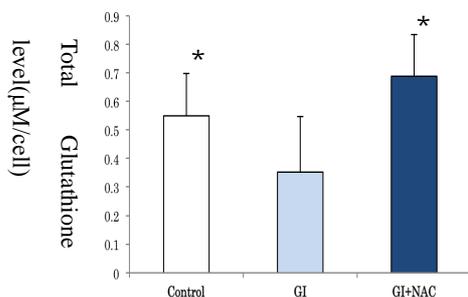


図3. 総グルタチオン量

Control; GICs 溶出液未添加培養液

GI; GI 溶出液

NAC; NAC 添加 GI 溶出液

同一記号には統計学的有意差は認められなかった。

LPS 無刺激の対照群(cont)と比較して、LPS 刺激群(LPS100 µg/ml)では、炎症性サイトカ

イン IL-6 の発現が有意に増加した。しかし、NAC を添加した群(LPS+NAC)では LPS 刺激により増強した IL-6 の発現が抑制されることがわかった。NAC が炎症性サイトカインの発現を抑制することにより抗炎症作用を示す可能性が示唆された。

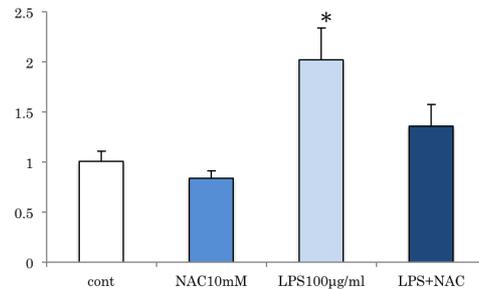


図3 LPS 刺激による播種 6 時間後の IL-6 の発現量と NAC 添加による影響

Cont: 対照群

NAC10mM: 10mM NAC のみ添加

LPS100 µg/ml: 100 µg/ml LPS を添加

LPS+NAC: 100 µg/ml LPS および 10mM NAC を添加

(3) NAC の直接覆髄剤としての効果を検討 NAC 添加群においては露髄面に修復象牙質誘導が認められた。このことにより、NAC を直接覆髄として応用できる可能性が示唆された。

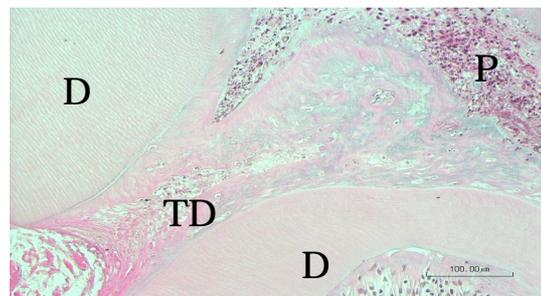


図4. 直接覆髄 4 週間後の病理組織像 (HE 染色)

Bar: 100 µm; D: dentin; TD: tertiary dentin; P: pulp

以上の結果より、NAC を応用することで、従来の材料にはない新しい機能を付加させた歯科材料の開発が示唆された。

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 1 件)

Minamikawa H, Ikeda T, Att W, Hagiwara Y, Hirota M, Tabuchi M, Aita H, Park W, Ogawa T.

Photofunctionalization increases the bioactivity and osteoconductivity of the titanium alloy Ti6Al4V.

J Biomed Mater Res A. 2014 Oct;102(10):3618-30. doi:10.1002/jbm.a.3

5030. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

Hajime MINAMIKAWA

Cellular behavior on the TiO₂ particles-containing resin-modified glass ionomer cement. NANO Korea 2015 symposium, 2015.7.1-2., Seoul, South Korea.

Koichi NAKAMURA, Shigeaki ABE, Hajime MINAMIKAWA, Yoshiaki DEYAMA and Yasutaka YAWAKA Influence of Concentration and PH on the Effect of Fluoride on Dentine 2013 International Conference on Biological, Medical and Chemical Engineering 2013.12.1-2, Hong Kong, China

遠藤 一樹, 南川 元, 八若 保孝, 中村 光一 抗酸化アミノ酸の従来型グラスアイオノマーセメントへの応用に関する基礎的研究 日本小児歯科学会第 31 回北日本地方会大会 2013 年 10 月 26 日 青森市文化観光交流施設ワラッセ (青森県・青森市)

〔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 :
出願年月日 :
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

南川 元 (MINAMIKAWA, Hajime)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号 : 7062560

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし