

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293403

研究課題名(和文) 自己防御システム誘導型の新規材料の開発

研究課題名(英文) Development of the self-defense inducing material

研究代表者

佐野 英彦 (Sano, Hidehiko)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90205998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：白金ナノコロイドをプライマーとして用い、う蝕象牙質に対してクリアフィルSE2を用いたがその効果は見られなかった。また、エッチング材と白金ナノコロイドを合わせて2ステップ化した場合、象牙質の湿潤状態に影響されたが効果は見られた。

白金ナノコロイドをHela細胞に用いた場合に、Immunoblotを行うと、クロモグラニンAおよびその関連のタンパクが、白金ナノコロイドの濃度依存性に発現した。このような、細胞からの抗菌タンパクの発現に関してはメカニズムは不明のため、今後の研究でそれを解明していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：When using Colloidal Platinum Nanoparticles (CPN) as a primer solution, bonding to caries-affected dentin with Clearfil SE2 did not show improvement in bond strength. Two step dentin conditioner created with the combination of acid and CPN was effective for improving bond strength but affected by the moisture of dentin to be bonded.

When CPN was applied to Hela cells, immunoblot demonstrated the expression of Chromogranin A and its related proteins, showing the level of the expression was in proportion to the concentration of CPN. So far, it is not clear the mechanism of the expression of the antibacterial proteins. Future study is important disclose the mechanism of the phenomenon.

研究分野：歯科保存学

キーワード：ナノテクノロジー 歯質接着 抗菌タンパク

1. 研究開始当初の背景

今までの研究から、4META-MMA/TBB レジンに白金ナノコロイド (CPN) をプライマーとして作用させた場合、その接着性が向上することが知られている。

図1は樹脂、含浸層における CPN の局在を示す TEM 像を示す。図1中における左側の図の象牙質と MMA/TBB レジンの間にみられるのが樹脂含浸層で、四角で囲まれた樹脂含浸層上部を拡大したものが右側の図

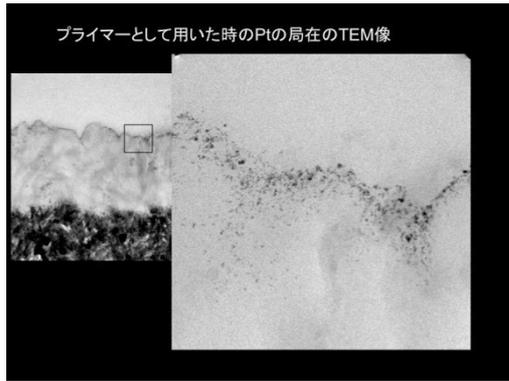


図 1

である。この象牙質は 4META-MMA/TBB レジン用の 10-3 水溶液で処理されているため、脱灰象牙質中にはハイドロキシアパタイトの残存は僅かなものとなっている。そのため、この樹脂含浸層中ではコラーゲン線維とレジンが主体であることがわかる。この像を見ると、樹脂含浸層上部に小さな黒い点で表されている像が CPN と考えられる。このことから、CPN は樹脂含浸層のコラーゲン線維に選択的に吸着し、水洗やレジンの処理では除去されることなく、残存していたものと推定される。このように、CPN はコロイドを覆っているクエン酸塩あるいはナノレベルでの原子間の相互作用によってコラーゲンへの吸着を引き起こしていることが推定される。

ここで、CPN が 4META-MMA/TBB レジン以外の接着システムにおいて同様な効果を与えるかについては不明であり、健全歯ではなく中間的に脱灰したう蝕象牙質内層のコラーゲンに吸着して接着強さが向上するかに関しては不明であった。

加えて、CPN は 4META-MMA/TBB レジンに対してプライマーとして用いた場合に有効であったが、ステップを簡略化する上で酸と CPN を混合した場合の検討はなされておらず、不明であった。

また、CPN は飲料水や化粧品等で使われているため、その用途においては安全性は確認されていた。しかし、これを生体内で応用する際に、生体に対しての影響に関しては当時不明であった。そのため、生体適合性の検討は、CPN の臨床応用に向けては必須の条件であった。

2. 研究の目的

以下に示すような検討を行うことを目的

とした。

(1) 白金ナノコロイドの様々な条件下における象牙質接着性の検討

う蝕象牙質内層に関する接着性の検討

3ステップから2ステップへのステップの簡略化への検討

(2) 白金ナノコロイドの生体に関する影響
ラット頭蓋骨埋入試験による生体適合性の検討

培養細胞に対する白金ナノコロイドの影響

3. 研究の方法

(1) 白金ナノコロイドの様々な条件下における象牙質接着性の検討

う蝕象牙質内層に関する接着性の検討

CPN とセルフエッチング系接着材が、う蝕象牙質内層への接着にどのような影響を与えるかを検討するために、CPN をプライマーとして、クリアフィル SE2 を接着材として実験を行った。

4 のクロラミン T 水溶液中に保存された、中等度のう蝕を有する抜去歯を用いた。まず、エアタービンに装着されたダイヤモンドポイントを用いて窩を開拓し、引き続き、う蝕検知液とスプーンエキスカベーターを用いてう蝕象牙質外層を除去した。う蝕象牙質内層に関しては、ハンディータイプの硬さ測定器を用いて、そのヌーブ硬さを測定した。う蝕象牙質内層であるかどうかの判断材料としては、ヌーブ硬さで概ね 25 以上、またう蝕検知液の染色で淡いピンク染とした。その後、窩洞外壁を可及的に除去し、比較的平坦な面を示す窩底部象牙質を露出させた。これは、引き続き行われるコンポジットレジン充填の際に発生する重合収縮の影響を減じるように、C-factor を可及的に小さくするためである。

実験群としては、以下の4群によって検討した。

(1) 健全象牙質にクリアフィル SE2 を用いた群 (SE2)

(2) 健全象牙質に CPN をプライマーとして用いた後に、クリアフィル SE2 を用いた群 (SE2+CPN)

(3) う蝕象牙質内層にクリアフィル SE2 を用いた群 (CAD)

(4) う蝕象牙質内層に CPN をプライマーとして用いた後に、クリアフィル SE2 を用いた群 (CAD+CPN)

各群により処理された象牙質試料は接着材の光硬化後、クリアフィル APX を用いてレジン築成され、37 水中に 24 時間保管された。その後、ノトリミングテクニックによる試片作成後、クロスヘッドスピード 1 mm/min にてマイクロテンサイルテストを行った。また、接着界面の SEM 像と TEM 像の観察も合わせて行った。

ステップの簡略化への検討

3ステップでのアプローチを簡略化して

2ステップ化するためには、エッチング溶液にCPNを混合すること、すなわちエッチング+ボンディングというアプローチで可能ではないかという仮説のもとに実験を開始した。この際、エッチングを行う2ステップ化であるため、象牙質の湿潤状態の有無に関する検討も必要であるため、この検討も加えることにした。

接着材としては、クラレノリタケデンタル社の試作ボンディング材 KUB-100 (以下 KUB)、充填材として同社のクリアフィル AP-X(以下 AP-X)、表面処理材として同社の K エッチャント GEL (以下 Ech) とアプト社から提供された CPN 原液とリン酸を混和して 35%リン酸としたものをそれぞれ用いた。

健全ヒト抜去歯の歯冠部中央を歯軸に対して垂直に精密低速切断機 (Isomet) を用いて切断し、象牙質面を露出させた後に研磨紙 #600 で研削・水洗したものを被着面とした。歯面処理は以下(1)から(5)の方法で行った。

- (1) NE:KUB を塗布 10 秒、乾燥 5 秒、光照射 10 秒(メーカーの指示どおり:コントロール)
- (2) CPN-D : CP30 秒塗布、30 秒水洗して 10 秒エアブロー、KUB を NE と同様に使用
- (3) CPN-W : CPN-D と同様の操作だが、CPN 塗布・水洗後エアブローなし
- (4) ED : Etch 30 秒塗布、30 秒水洗、10 秒エアブロー、KUB を NE と同様に使用
- (5) EW : ED と同様の操作だが、エッチング・水洗後エアブローなし

上記各処理後に、AP-X を約 4mm の高さに積層充填し、37 °C の水中に保管した。24 時間後 Isomet により象牙質接着界面が 1mm² となる角柱型ビームを作製し、小型卓上試験機 EZ-test (島津製作所) を用いて微小引張り試験をクロスヘッドスピード 1mm/min の条件にて行った。

(2) 白金ナノコロイドの生体に関する影響
ラット頭蓋骨埋入試験による生体適合性の検討

10 週齢のウイスター系ラット() の頭蓋骨に埋入試験を行い生体適合性の検討を行った。まず、腹腔内麻酔下にラットの頭皮を剥離し頭蓋骨を露出し、その頭蓋骨にバーにて埋入窩を 2 カ所形成した。実験群としては、スポンゼルに白金ナノコロイド原液を浸したものを、コントロール群としてはスポンゼルに生理的食塩水を浸したものを埋入窩に埋入後、再び頭皮で覆い縫合した。埋入 2 日後、4 日後、7 日後および 14 日後に、ラットを屠殺した。その後、頭蓋骨ごと固定・脱灰したのち、通法によりパラフィン包埋を行った。包埋された試料はナイフで薄切され、HE 染色を行った後に、組織学的検討を行った。

培養細胞に対する影響

HeLa 細胞に対して CPN を作用させてどのような現象が観察されるかという試みを行った。

4. 研究成果

(1) 白金ナノコロイドの様々な条件下における象牙質接着性の検討

う蝕象牙質内層に関する接着性の検討

図 2 に接着試験の結果と窩底部のヌープ硬さを示す。ヌープ硬さに関しては、CAD と CAD+CPN の間では有意差がなかった。

SE2+CPN と CPN の間では統計学的な有意差

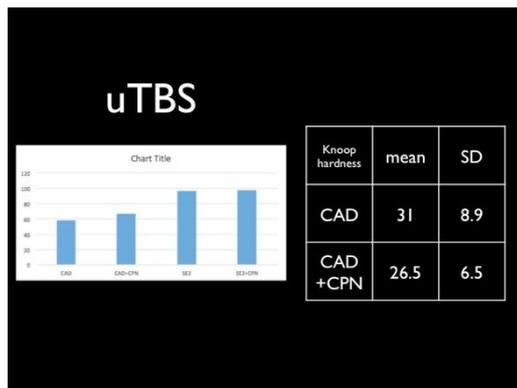


図 2

は認められなかった。また、CAD+CPN と CAD の間においても、統計学的な有意差は認められなかった。他方、SE2+CPN と CPN および CAD+CPN と CAD の間においては統計学的な有意差が認められた。すなわち、今回の実験では、従来から報告されているように、SE2 のう蝕象牙質内層に関する接着強さは有意に低くなることが再確認された。また、CPN を用いた場合には、健全象牙質やう蝕象牙質といった被着面に対しては、積極的な接着強さの向上は見られないものの接着強さに悪影響も与えていないことが判明した。

う蝕象牙質内層は段階的に硬さが変化しているが、比較的急性に経緯したう蝕におけるう蝕象牙質内層は硬さの変化が急で象牙細管内の結晶構造も顕著でないことが多い。そのため、比較的急性に経緯したう蝕における内層に対して、う蝕除去時に深く削りこんでしまう可能性が考えられる。

深く削りこんでしまうことに加えて、象牙細管の結晶の形成が不十分であれば、形成されるレジスタグが太く長くなる可能性も考えられる。

このように今回の実験結果から、う蝕象牙質内層の取り扱いが極めて重要であることが示唆されている。今後、う蝕象牙質内層を扱いながらその接着性を検討する場合、対象となるう蝕象牙質の硬さに関して十分な注意をはらい、ヌープ硬さで 20 に近いところのう蝕象牙質も検討対象に入れる必要がある。

また、比較的急性な経緯をたどったと思われるう蝕象牙質のみならず、慢性的な経過を示したう蝕象牙質を用いることも大切である。慢性的な経過を示したう蝕象牙質では、う蝕象牙質内層の厚みがあり試料の作成が容易であり、透明層の形成が顕著であるため、今回と異なった結果が得られることも十分

に考えられる。

そのため、十分にコントロールされたう蝕を有する抜去歯の収集、およびう蝕象牙質表層除去のシステマチックな方策が新たに必要になると考えられる。

ステップの簡略化への検討

図3に示すように、各条件における微小引張接着強さは、NEが 28.2 ± 14.2 (MPa)、CPN-Dが 57.1 ± 16.0 (MPa)、CPN-Wが 43.1 ± 13.8 (MPa)、EDが 25.7 ± 12.8 (MPa)、EWが 31.7 ± 13.2 (MPa)であった。CPN-Dは、EDおよび

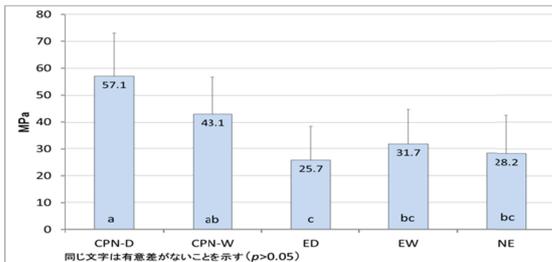


図3

NEと比べて有意に高い接着強さを示した。CPNを用いていないED、EWとNE間に有意差は認められなかった。

このことから今回用いたKUBに対してCPNは接着強さを向上したが、その効果は被着象牙質面の湿潤状態により影響を受ける可能性が示された。また、どのようなメカニズムによってこのような実験結果が得られたかは今後の検討を要する。加えて、他のユニバーサルタイプ1ステップボンディング材に対して同様な効果が認められるかに関してさらなる検討が必要である。

一方、モイストボンディングに関しては、テクニックセンシティブティーが高く、術者による違いによるデータのばらつき、同一術者においても習熟度の影響などによるデータの変化なども認められるため、結果に関わるデータの扱いに関しては注意を要すると考えている。

(2) 白金ナノコロイドの生体に関する影響 ラット頭蓋骨埋入試験による生体適合性の検討

図4に埋入2日後のコントロール群とCPN群の組織像を示す。

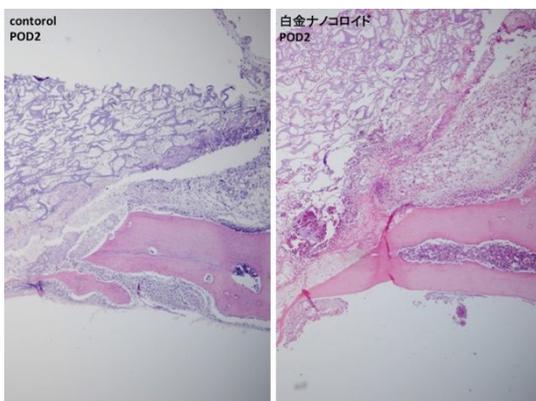


図4

埋入窩近辺に炎症性の細胞浸潤がともに認められるが、コントロール群とCPN群ともに大きな違いが認められなかった。

図5に埋入4日後のコントロール群とCPN群の組織像を示す。これらの組織像を比較すると、コントロール群とCPN群の間に大きな差は認められなかった。

図6に埋入14日後の組織像を示す(埋入7日後は省略した)。コントロール群とCPN群ともに炎症性の変化が軽減していた像が観

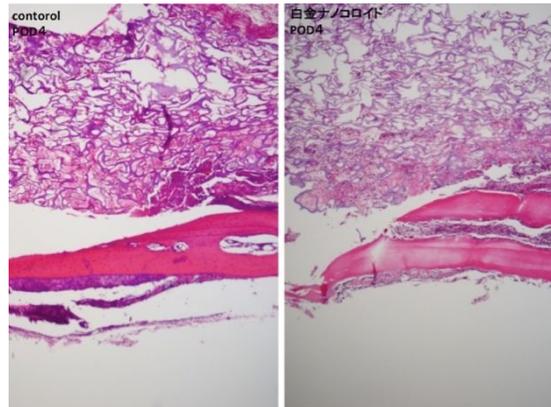


図5

察された。また、両群ともに骨の新生が認められているが、骨の新生の度合いに関しては、コントロール群とCPN群ともに差は認められなかった。

今回の埋入試験の結果から、CPNは生体親和性に優れていることが判明した。また、CPNは創傷治癒に対して阻害要因にならないこ

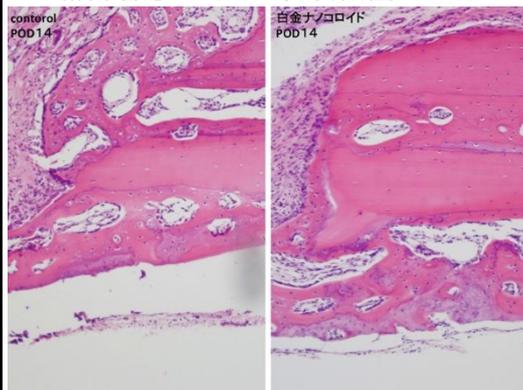


図6

とが明らかになった。

以上のin vivoの結果から、CPNをプライマーあるいは酸処理剤の成分として用いた場合、生体に対する為害性は少ないと考えられた。

培養細胞に対する影響

図7を見ると、Immunoblotによって、CgAおよびCgA関連の抗菌タンパクが、CPNの濃度依存性に発現することが判明した。また比較的低濃度のCPNを作用してもCgAが発現することも確認できた。また、CPNは培養細胞に関して何ら問題となるような反応を惹起していないことも確認できた。

このような細胞からの抗菌タンパクの発現機構に関しては、現時点ではそのメカニズムは不明である。今後は、このメカニズムの

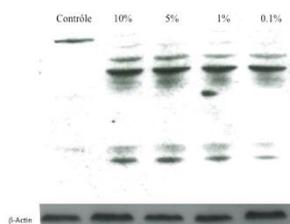


図 7

解明に関する検討を加える必要がある。

また、どのような細胞を用いた場合に、このような抗菌タンパクの発現が見られるかについても不明であり、今後の検討を有する。

抗菌タンパク発現のメカニズムを解明するためのツールとして、3次元コンフォーカルマイクロスコープを用いることができる。これを用いると、細胞が生きたままに観察することができ、ナノ物質が細胞膜表面に局在しているか、あるいは細胞内部に取り込まれているかの検討が行える。予備実験としてこ

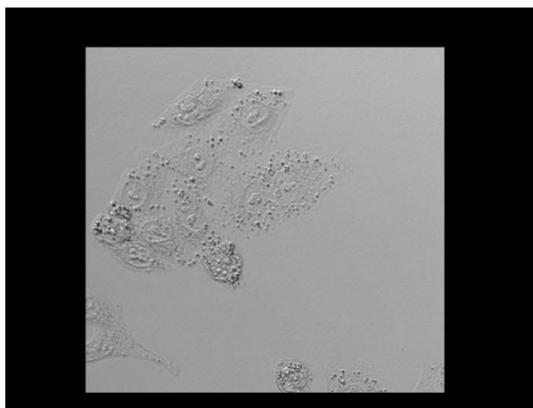


図 8

の3次元コンフォーカルマイクロスコープを用いて、培養細胞にCPNを作用させて観察を行った(図8)。

現時点では、確証はないものの、図8を見る限り、細胞内にCPNを取り込んでいる可能性は否定できない。この辺りに関しても、形態学と分子生物学的なアプローチのもとに解明していく予定である。

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)

Katsumata A, Ting SC, Hoshika S, Ikeda T, Tanaka T, Carvalho RM, Sano H. Bond

performance of "Touch and Cure" adhesives on resin core systems. *Dental Material J*, 35(3) 386-391, 2016.

Okuyama K, Kadowaki Y, Matsuda Y, Hashimoto N, Oki S, Yamamoto H, Tamaki Y, Sano H. Efficacy of a new filler-containing root coating material for dentin remineralization. *Am J Dent*, 29(4) 213-218, 2016.

Abe S, Kawano S, Toida Y, Nakamura M, Inoue S, Sano H 他. Electronic states of alkyl-radical-functionalized C-20 fullerene using density functional theory. *Jpn J Appl Phys*. 55(3), Special Issue 2, 2016.

Abe, S, Seitoku E, Lwadera N, Hamba Y, Yamagata S, Akasaka T, Kusaka T, Inoue S, Yawaka Y, Iida J, Sano H 他. Estimation of Biocompatibility of Nano-Sized Ceramic Particles with Osteoblasts, Osteosarcomas and Hepatocytes by Static and Time-Lapse Observation. *J Biomed Nanotechnol*. 12(3) 472-480, 2016.

Shibata S, Vieira LCC, Baratieri LN, Fu J, Hoshika S, Matsuda Y, Sano H. Evaluation of microtensile bond strength of self-etching adhesives on normal and caries-affected dentin. *Dental Material J*. 35(2) 166-173, 2016.

Saikaew P, Chowdhury AFMA, Fukuyama M, Kakuda S, Carvalho RM. Sano H. The effect of dentine surface preparation and reduced application time of adhesive on bonding strength. *J Dent* 47(1) 63-70, 2016

Funato Y, Matsuda Y, Okuyama K, Yamamoto H, Komatsu H, Sano H. A new technique for analyzing trace element uptake by human enamel. *Dent Mater J*. 34(2) 240-245, 2015.

Kakuda S, Sidhu SK, Sano H. Buffering or non-buffering; an action of pit-and-fissure sealants. *J Dent* 43(10) 1285-1289. 2015.

Ting S, Chowdhury AA, Pan F, Fu J, Sun J, Kakuda S, Hoshika S, Matsuda Y, Ikeda T, Nakaoki Y, Abe S, Yoshida Y, Sano H. Effect of remaining dentin thickness on microtensile bond strength of current adhesive systems. *Dent Mater J*. 34(2) 181-188. 2015.

Kawano S, Fu J, Saikaew P, Chowdhury AA, Fukuzawa N, Kadowaki Y, Kakuda S, Hoshika S, Nakaoki Y, Ikeda T, Tanaka T, Sano H. Microtensile bond strength of a newly developed resin cement to dentin. *Dent Mater J*. 2015 34(1) 61-69. 2015.

[学会発表](計 8件)

Saikaew P, Matsumoto M, Sano H. Does Reduced Adhesives Application Time Affect Long-term Dentin Bond Strength? IADR, San

Francisco, Mar 22, 2017.

Kawano S, Toida Y, Ting S, Saikaew P, Chowdhury AFM, Kakuda S, ABE S, Shimada Y, Selimovic D, Yoshida Y, Sano H. Pulp Responses to Direct Pulp Capping Material Contains Phosphorylated Pullulan. IADR, San Francisco, Mar 25, 2017.

Denis Selimovic. Future perspectives in adhesive technology in biomaterial science. 日本接着歯学会学術大会. 北海道大学(北海道・札幌市). 12月3日 2016年.

アハメッド ズバエル, 松本真理子, リミ シャンミン アクター, イアムサード ピンピニー, 戸井田 侑, セリモビッチ デニス, 佐野英彦. 様々な厚さの象牙質を用いた新規微小引張試験に関する研究. 日本接着歯学会学術大会. 北海道大学(北海道・札幌市). 12月3日 2016年.

松本真理子, サイケオ ピポップ, イアムサード ピンピニー, 角田晋一, 星加修平, 川本千春, 池田孝績, 田中 享, セリモビッチ デニス, 佐野英彦. スミヤ層の違いがユニバーサル型ワンステップセルフエッチングアドヒーズの象牙質接着性能に及ぼす影響. 日本接着歯学会学術大会. 北海道大学(北海道・札幌市). 12月3日 2016年.

勝俣愛一郎, サイケオ ピポップ, 丁 世俊, 川野晋平, 松本真理子, 角田晋一, 星加知宏, 星加修平, 池田孝績, 田中 享, 佐野英彦, 西谷佳浩. 新規ユニバーサルボンドの象牙質微小引張り接着強さ. 日本接着歯学会学術大会. 北海道大学(北海道・札幌市). 12月3日 2016年.

白金ナノコロイドによる抗菌タンパク質前駆体の誘導. デニス セリモビッチ, 佐野英彦. 日本歯科保存学会秋季学術大会. キッセイ文化ホール(長野県・松本市). 10月28日 2016年.

CAD/CAM レジンブロック-象牙質接着に接着性レジンセメントの厚みが及ぼす影響. アハメッド ズバエル, 松本真理子, 戸井田 侑, 丁 世俊, 川野晋平, リミ シャンミン アクター, サイケオ ピポップ, 角田晋一, 星加修平, 川本千春, 池田孝績, 田中 享, デニス セリモビッチ, 佐野英彦. 日本歯科保存学会秋季学術大会. キッセイ文化ホール(長野県・松本市). 10月28日 2016年.

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 英彦 (HIDEHIKO Sano)
北海道大学・歯学研究科・教授
研究者番号: 90205998

(2)研究分担者

松田 康裕 (MATSUDA Yasuhiro)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号: 50431317

(3)連携研究者

セリモビッチ デニス (SELIMOVIC Denis)
北海道大学・歯学研究科・准教授
研究者番号: 20777776