

# 研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）  
研究開発テーマ名： MMP inhibitor 含有・抗菌性接着剤の開発  
研究代表者名： 橋本 正則 【 北海道大学大学院歯学研究科／助手 】

## 【研究のタイトル】

**MMP inhibitor 含有・抗菌性歯質接着剤の開発**

## 【研究の目的】

近年、歯質接着性レジンシステムの長期耐久性を低下させる因子として象牙質基質から放出される MMP (Matrix Metalloproteinases) の存在が指摘されている。この MMP は一種の Host-derived Enzyme である。本研究は、長期接着耐久性の向上を目的とした、MMP inhibitor (クロルヘキシジン、ジンククロライド、テトラサイクリン) 含有・抗菌性レジンシステムの開発を目的とする。

## 【研究開発テーマの詳細】

歯質接着性レジン は永久修復材料として考えられているが、他金属修復材料、メタルインレー (耐用年数・約 15 年) やアマルガム (耐用年数・約 10 年) と比較すると、その耐用年数は約 5 年程度と極めて短い。

口腔内のバクテリアや唾液中の消化酵素などがレジン・象牙質接着構造のコラーゲン線維に加水分解をもたらし接着構造を崩壊させる機序はすでに明らかとなっている。よって、食事療法や適切なブラッシングなどによる口腔衛生状態の向上によりレジン修復材の耐用年数は向上する。しかし、ヒト象牙質基質に内在する MMP は経年的に放出される一種の Host-derived Enzyme である。よって、MMP が樹脂含浸層内のコラーゲン線維を破壊するメカニズム (Bio-degradation) を口腔衛生状態の向上など人為的に阻止することは不可能であり、MMP 含有・抗菌性レジン充填材の開発が切望されている。

MMP inhibitor としては、クロルヘキシジン、ジンククロライド、テトラサイクリンが有効とされているが、ヒト象牙質基質に対する有効至適濃度やレジンモノマーとの適合性に関する報告は世界的に見ても皆無であり、それら初期設定を模索し、新規レジンシステムの開発を行う必要がある。MMP inhibitor は極めて低濃度で有効に MMP 活性を阻止することから、重合硬化後の未重合モノマー溶出というレジンの崩壊が MMP 放出というプラスの影響を作り出す。

本研究は、生化学的手法によりヒト象牙質基質の MMP に対する各 Inhibitor による有効阻止濃度を解明し、それら Inhibitor 含有のレジンシステムの重合率特性、歯質に対する接着強さ、コラーゲン線維網への浸透性などを調査し、長期接着耐久性に優れたレジンシステムを開発することが目的である。

## 【事業の背景】

近年、カリエス治療において、歯質接着性レジンが果たす役割は重要となってきた。歯質（エナメル質・象牙質）へのレジンの接着性が飛躍的に向上したため、修復法の概念が大きく変わり、その臨床応用範囲はさらに広まっている。近年のレジンシステムは操作ステップの減少により、治療時間が少なくすむことから、とりわけ小児・予防歯科領域で重要となってきた。

しかし、レジン・象牙質接着の長期耐久性に関する研究は世界的にみても極めて少ない。さらに、*in vivo* での実験結果は臨床結果と極めて高い相関をもつため重要な実験手法であるが、それについての報告も数少ないのが現状である。ヒト抜去歯を用いた *in vivo* 長期耐久性に関する研究は 2000 年の申請者らの報告が世界で始めてである。

申請者らは、これまでレジン・象牙質接着性レジンの構造解析および長期接着耐久性試験を *in vivo* および *in vitro* の両観点から包括的に行ってきた。ヒト口腔内でレジン修復され長期機能した、乳臼歯を用

いた実験 (*in vivo*) からレジン・象牙質接着構造内におけるコラーゲン線維の加水分解およびモノマー成分の溶出が劣化の主要な要因であることを走査型・透過型電子顕微鏡およびレーザーラマン分光光度計を用いて明らかにした。それら劣化によりレジン・象牙質接着強さは経年的に大きく減少する。さらに、1年以上の長期水中浸漬試験 (*in vitro*) から、ほぼ同様な結果を得ている。

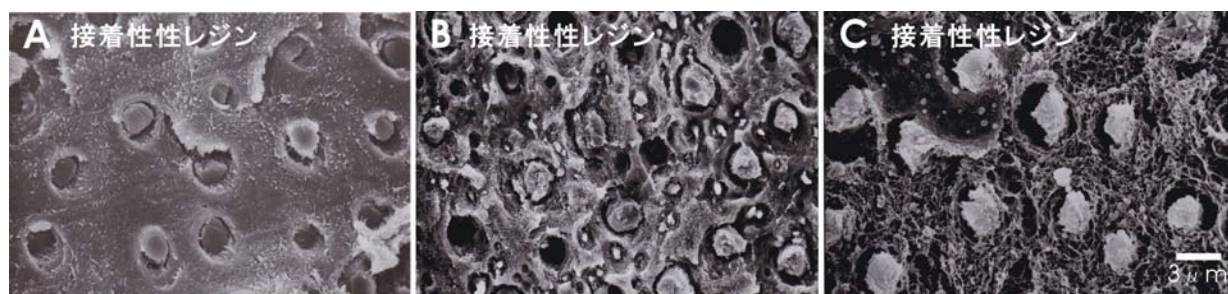
下記にレジン・象牙質接着構造体の劣化メカニズムを記す。

(1) 露出コラーゲン線維層の加水分解

(2) ボンディングレジンの加水分解

(3) コンポジットレジンのマトリックスとフィラー間におけるシランカップリング剤の消失

上記に示した劣化機序には接着構造の加水分解による劣化は界面内に起こる水分の流動性が重要となる。申請者らは、水透過性試験機により接着構造内の水分流動はレジンシステムの相違により大きく異なり (Total-etching および self-etching primer system の比較)、さらに厚さ約  $15\mu\text{m}$  のボンディングレジン層は透過膜であることを明らかにしている。このような、水分流動性は接着性レジンに含まれている溶媒 (水、アセトンおよびエタノール) の含有量およびレジンポリマーの重合度により大きく左右されている。



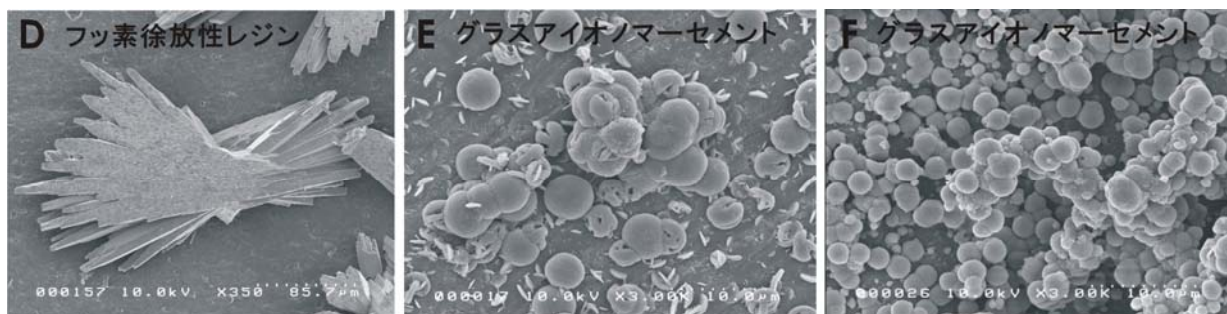
A 接着性レジン  
接着24時間後の正常な樹脂含浸層

B 接着性レジン  
コラーゲン線維の加水分解を呈した樹脂含浸層 (1年間口腔内)

C 接着性レジン  
レジン線維の加水分解を呈した樹脂含浸層 (1年間水中浸漬)

接着構造の加水分解による劣化は界面内に起こる水分の流動性が重要となる。申請者らは、水透過性試験機により接着構造内の水分流動は接着構造により異なり、さらに厚さ約  $15\mu\text{m}$  のボンディングレジン層は透過膜であることを明らかにしている。このような、水分流動性は接着性レジンに含まれている溶媒 (水、アセトンおよびエタノール) の含有量およびレジンポリマーの重合度により大きく左右されている。このような、接着構造への水分の浸透によりレジン成分の加水分解が誘発される。

このように、接着性レジンシステムは長期的には劣化し、2次カリエスの誘発や修復物の脱離などを併発する。しかし、申請者が行ったグラスアイオノマーセメント長期的変化に関する研究 (3年間の水中浸漬) においてはグラスアイオノマーセメントやフッ素徐放性レジンにおいて、修復物と歯質とのギャップに再石灰化による結晶形成を観察している (図D, E, F)。



象牙質とフッ素徐放性修復材料の界面に形成された石灰化物 (3年間水中浸漬)

これら、結晶形成は修復物または歯質から放出される各種イオンが歯質とのギャップにおいて過飽和となり再析出しているためであると推測される。これらのことから、現在使用されているグラスイオノマーセメントやレジン系修復材料においても自己修復機能を要しているものと推測される。しかし、接着性レジンシステムにおいてはそのような自己修復性についての報告は全くないのが現状である。

#### 【材料と方法】

##### —材料—

#### 【接着性レジンシステム】

Bis-GMA, HEMA, を主組成とした試作接着性レジンに各異なる濃度の MMP inhibitor (クロルヘキシジン、ジンククロライド、テトラサイクリン) を含有した抗菌性レジンシステムの作製。

#### 【試験歯】

##### ヒト小臼歯・抜去歯

- ・ カリエスに罹患していないもの（健全歯）。
- ・ 矯正治療が必要のため、抜去が必要となったもの。
- ・ 患者から十分なインフォームドコンセントが得られたもの。
- ・ 大学内の倫理審査委員会の認証を受けたもの。

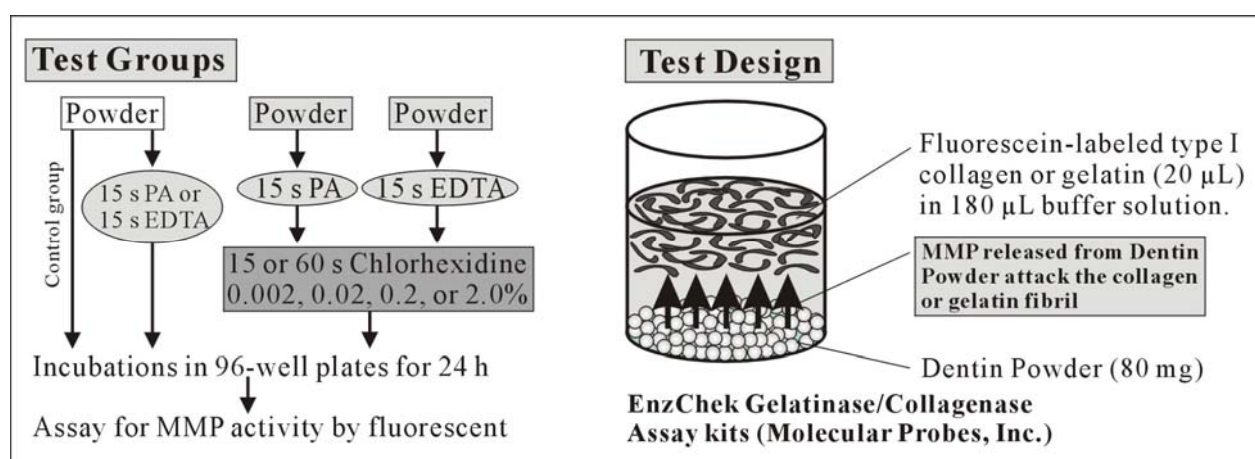
（以上 4 条件を満たすヒト小臼歯・抜去歯を実験に供する）

##### —方法—

#### 【Inhibitor の象牙質基質由来の MMP 阻止濃度】

抜去歯のエナメル質および軟組織（歯髄、歯根膜）を除去後、次亜塩素酸ナトリウム、アセトン処理を行う。次に粉砕機を用いて歯冠・歯根象牙質から粒子径約 50  $\mu$  の Dentin Powder（象牙質粒）を作製する。80 mg・Dentin Powder を 180  $\mu$ L・緩衝液で調整後、20  $\mu$ L の蛍光色素によりラベルされたコラーゲン線維を用いて、各種条件で象牙質基質から放出される MMP 活性を比色計にて測定する。

本実験（MMP 活性の測定）の概略図を下記に示した。



#### 【試作レジンシステムの接着強さの測定および破断面の走査型電子顕微鏡観察】

各 MMP inhibitor の至適濃度で作製されたレジン・象牙質接着試験片の接着強さを Microtensile Bond Test をもちいて測定する。さらに試験終了後、破断面を走査型電子顕微鏡で観察する。

- ・ MMP inhibitor の至適濃度と接着強さの相関性を考察する。

### 【接着界面の透過型電子顕微鏡観察】

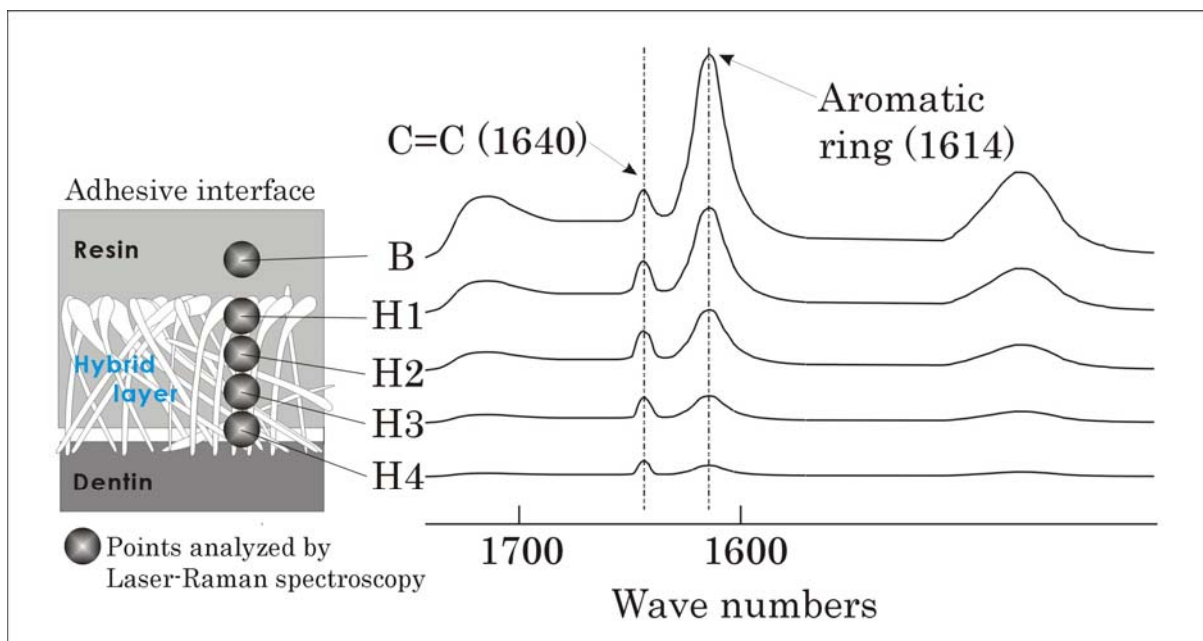
レジン・象牙質接着試験片を固定、脱水、乾燥し、ミクロトームを用いて超薄切片を作成し、染色後、透過型電子顕微鏡を用いて観察する。レジン・象牙質接着試験片を硝酸銀溶液に浸漬し、接着界面内（樹脂含浸層およびボンディングレジン層）における欠損（Nanoleakage および Water tree）について硝酸銀をトレーサーとして染め出し、透過型電子顕微鏡を用いて観察する。非常に微小な硝酸銀粒子はナノサイズのスペースであり樹脂含浸層およびレジン層に形成される Nanoleakage および Water tree を有効に染色する。

- ・ Nanoleakage および Water tree の形態的特長を評価する。

### 【接着界面のレーザーラマン分光分析】

レーザーラマン分光分析においては試料を固定、脱水および乾燥する必要はなく、抜去レジン修復歯を接着界面と垂直に切り出し、研磨した試料を試験に供することが可能である。また厚さ数  $\mu\text{m}$  の樹脂含浸層を解析可能な分析機器はレーザーラマン分光光度計（最小分解能  $1\ \mu\text{m}$ ）しかなく、接着構造をレーザービーム径約  $1\ \mu\text{m}$  に絞りレーザーラマン分光分析を行う。上層からボンディングレジン層—樹脂含浸層—象牙質層の順にレーザービームを  $1\ \mu\text{m}$  ずつ移動し測定を行う。下記に実験方法の概略図を示す。

- ・ レジンの接着界面での相対的重合度を定量化する。



### 【実験の総括】

上記実験結果から、(1) レジンに含有された Inhibitor が有効至適濃度内、(2) 良好なレジンの重合率、(3) 高い接着強さ、(4) 接着界面内の微小欠損の少ない：の条件を持つレジンシステムが歯科臨床応用可能となる。

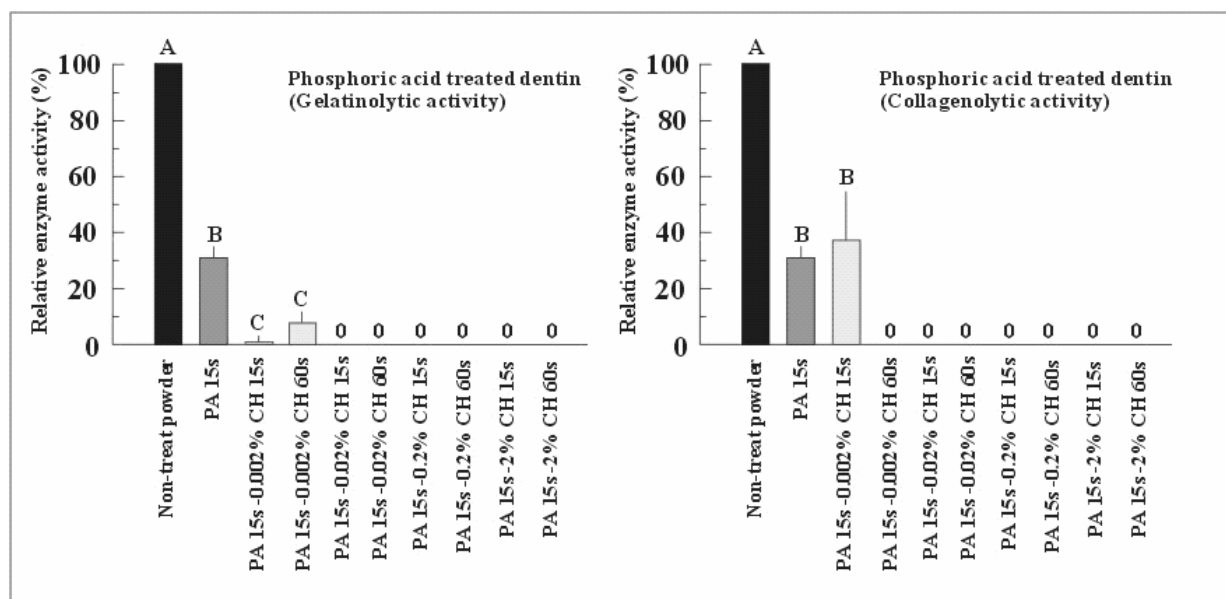
### 【結果および考察】

#### 【Inhibitor の象牙質由来の MMP 阻止濃度】

MMP assay-kit により象牙質基質から微量ではあるがヒトコラーゲン線維を消化する濃度の MMP 活性が認められた。ごく微量な MMP 活性であっても長期的（1～10年の臨床使用）には徐々にではあるが接着構造を崩壊するには十分な濃度であるとかんがえることができる。さらに、クロルヘキシジン、ジンク

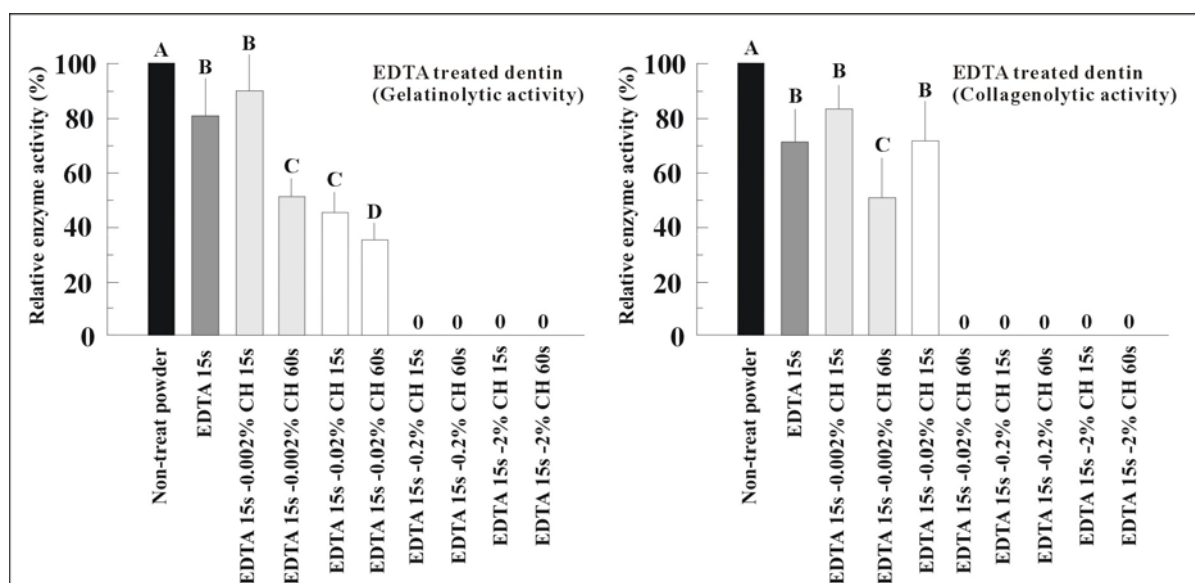


クロライドをごく微量に含有した場合においても MMP 活性を充分（完全）に阻止することが判明した。実験結果を下記に示す。



コントロール群（non-treat powder）と比較し（%）クロルヘキシジン（CH）処理をした群において、MMP 活性は有効に阻止されている。PA はリン酸を用いて象牙質粒を前処理した群である。

クロルヘキシジン（CH）濃度が 0.02% 以上において MMP 活性は消失する。



コントロール群（non-treat powder）と比較し（%）クロルヘキシジン（CH）処理をした群において、MMP 活性は有効に阻止されている。EDTA は EDTA を用いて象牙質粒を前処理した群である。

クロルヘキシジン（CH）濃度が 0.2% 以上において MMP 活性は消失する。

ジンククロライドにおいてもほぼ同様な結果を得ている（データ示さず、実験継続中）。

#### 【接着強さの測定および破断面の SEM 観察】

各 MMP inhibitor の至適濃度で作製されたレジン・象牙質接着試験片の接着強さは臨床で現在使用されているレジシステムにおいて接着強さを低下させる可能性があるが、本実験で使用した試作レジシステム（Bis-GMA/HEMA 系）の初期接着強さ（接着操作 24 時間後）には全く影響を与えなかった（ $p > 0.05$ ）にて各グループで有意差が認められなかった：コントロール； $40.5 \pm 10.1$  MPa, 抗菌剤含有群； $38.5 \sim$

44.0 MPa)。さらに、破断面の SEM 観察においても各グループにおいて明確な形態的变化は全く認められなかった。接着強さが変化しない場合、通常 SEM 観察などの形態観察においても相違は認められない。

#### 【接着界面の TEM 観察】

各抗菌性薬剤を含有したレジン・象牙質接着界面の超薄切片を作成し（非含有をコントロール試料とした）、透過型電子顕微鏡観察を行ったが、SEM 観察の結果と同様に形態的变化はほとんど認められなかった。接着試験片を硝酸銀溶液に浸漬し、接着界面欠損を硝酸銀トレーサーで染め出したナノリーケージ解析においても微小欠損の量的・形態的相違はまったく認められなかった。硝酸銀により染色された形態的特徴はスポット、レテキュラー、ウォーターツリーなど現在確認されている欠損形態と相違はない。

#### 【接着界面のレーザーラマン分光分析】

ラマン分析の結果においては、実験データは充分ではないが（現在施行中）、レジン・象牙質接着界面においてレジンと象牙質での境界のレジンの重合率の低下が認められる場合があるが、ごく微小な層での重合阻害であり、抗菌剤による阻害の可能性も否定はできないが、接着操作時の象牙質表層の水分により阻害されている可能性が極めて大きいと推測される。形態的相違（SEM, TEM 観察）が認められないことから、MMP inhibitor による重合阻害の影響はないと考えるのが妥当である。

#### 【総括、研究の成果】

クロルヘキシジンやジンククロライドは微量で MMP 活性を阻止することができ、またそれらを微量に含有したレジンシステムの接着強さ、形態的变化は全く認められないことから、本研究で試作した MMP inhibitor 含有・抗菌性接着性レジンシステムの臨床応用の可能性が示唆された。

#### 【今後の展望】

本研究で試作した MMP inhibitor 含有・抗菌性接着性レジンシステムの臨床応用の可能性が示唆された。しかしこれらデータは接着操作 24 時間後の機械的、形態的特徴を主とするものであることから、今後、長期水中浸漬試験（水中浸漬 1 年以上）や in vivo（サル、ビーグル犬）での長期的臨床有効性に関する検索が必要であると思われる。現在、長期水中浸漬試験用試験片を作製しデータの収集を行う予定である。