

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15809

研究課題名(和文) 接着界面の劣化を検知して殺菌剤と再生誘導物質を徐放するインテリジェント材料の創製

研究課題名(英文) Development of new tooth adhesives with a sensing capability of debonding and release functions of antibacterial and regenerative agents

研究代表者

吉田 靖弘 (Yoshida, Yasuhiro)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：90281162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯質接着材の進歩により歯科医療は大きく発展を遂げ、今日の歯科医療にとって不可欠な存在となったが、歯質との接着界面は永久に完全な状態を保てるわけではない。歯質接着界面の劣化に伴い発生する2次う蝕を抑制するには、歯質接着面の剥離を検知して剥離時に剥離部位にのみ薬剤を放出する新しい歯質接着材を開発する必要がある。そこで本研究では、剥離に伴う変形で薬剤を徐放することで劣化センサー機能付インテリジェントマテリアルの実現を目指し、新しいDDS型フィラーの開発に取り組んだ結果、特許出願につながる成果を得た。特許公開後にデータを公表する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯質との接着界面は永久に完全な状態を保てるわけではない。歯質接着界面の劣化に伴い発生する2次う蝕を抑制するには、歯質接着面の剥離を検知して剥離時に剥離部位にのみ薬剤を放出する新しい歯質接着材を開発する必要がある。本研究では、剥離に伴う変形で薬剤を徐放することで劣化センサー機能付インテリジェントマテリアルの実現を目指し、新しいDDS型フィラーの開発に取り組んだ結果、特許出願につながる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：To prevent secondary caries through debonding of adhesives from the restored tooth surfaces, we have tried to develop new functional materials which have like a sensing capability of debonding. As new functions, adhesive materials release drugs, such as antibacterial and regenerative agents between materials and tooth surface after debonding of tooth restorations. These agents are ideally not released during the interface between adhesive material and tooth surface keeps its integrity and are released immediately after debonding. We successfully developed high functional materials and are planning to apply patents. The data should be opened to the public after its patent publication.

研究分野：歯科生体材料学

キーワード：歯質接着 デボンディング 薬剤除法 2次う蝕

1. 研究開始当初の背景

歯質接着材の進歩により歯科医療は大きく発展を遂げ、今日の歯科医療にとって不可欠な存在となった。これまで歯質接着材は、主に以下の戦略に沿って製品開発が進められてきた。

【第一世代】(接着強さの追求)

歯質接着界面の性状は、治療の成否を大きく左右する。修復物の脱落と辺縁漏洩を防ぐには、界面の接着性が鍵となる。試験方法が簡便で数値化しやすい「接着強さ」は、その主たる評価指標であり、各メーカーは「接着強さ」の高い製品の開発に注力してきた。

【第二世代】(機能性物質の添加)

接着強さの次なるターゲットとして、フッ素や殺菌剤の添加へと大きく舵は切られた。しかし、これらの機能性物質を添加する場合、「毒性」が問題となる。特に、殺菌剤は薬事申請に必要な毒性試験のクリアが難しい。今里らは「硬化時にポリマーと一体化し、抗菌性も毒性も発現しない」という材料設計で薬事認可を得て製品化に漕ぎつけた。

【次世代】(界面の劣化への対応)

劣悪な口腔内環境の下では、歯質接着界面の劣化は避けようがない。しかも、接着強さの高い現在のレジン系材料は一気に脱落することなく、部分的に接着したまま同部に留まり、2次う蝕の原因となる。この問題を解決するためには、歯質接着面の剥離を検知して剥離部位にのみ薬剤を放出し、菌の増殖や脱灰を抑制する機能が必要であるが、そのような歯質接着材は全く存在しない。界面の劣化に対応した「セルフプロテクト機能」は、未来歯科材料の理想形となるであろう。

2. 研究の目的

歯質接着面の剥離を検知して薬剤を放出し、菌の増殖や脱灰を抑制する材料があれば、究極のインテリジェントマテリアルとして臨床の場で広く受け入れられることは間違いない。本研究では、層間に殺菌剤と再生誘導物質を封入した DDS 型層状ファイラーが、剥離に伴う変形で薬剤を徐放することで劣化センサー機能を実現する。未だこのような概念で設計された材料はなく、歯科医用工学のブレイクスルーとして次世代歯科材料の設計・開発につながる。

3. 研究の方法

殺菌剤とフッ素を層間挿入した DDS 型層状ファイラーを作製し、接着面剥離時に薬剤を放出する劣化応答性 DDS の開発に必要な基礎的知見を集積する。

4. 研究成果

4-1 DDS 型層状ファイラー作製法の検討

本研究では、DDS 型層状ファイラーとして、膨潤性層状化合物のモンモリロナイトの層間にフッ化セチルピリジニウム (CPF) 分子を挿入した CPF 担持モンモリロナイト

(CPF-mont) を開発する。歯質接着面の劣化時に、CPF-mont から CPF が徐放されることにより、歯の脱灰と菌の増殖を同時に抑制する効果が期待される。

4-1-1 フッ化セチルピリジニウム溶液の調整

CPF は市販されていない。そこで、市販の塩化セチルピリジニウム (CPC) 一水和物を用いて、CPF に変換する 2 つの方法を検討した。

1 つ目の方法は、CPC・H₂O の溶解度の温度依存性を利用する CPF の調整方法である。CPC・H₂O は、25℃以上の水には容易に溶けるが、10℃以下ではほとんど溶解しない。そこで、CPC・H₂O (4mmol) とモル濃度が 10 倍のフッ化ナトリウム (NaF) (40mmol) を約 35℃に加熱した 80mL の蒸留水に添加し溶解した後、氷水中で約 0℃に冷却して析出物を生成させ、この析出物を遠心分離で回収した (図 1)。さらに、回収物に氷水を加え洗浄した後、40℃で 3 日間乾燥した。

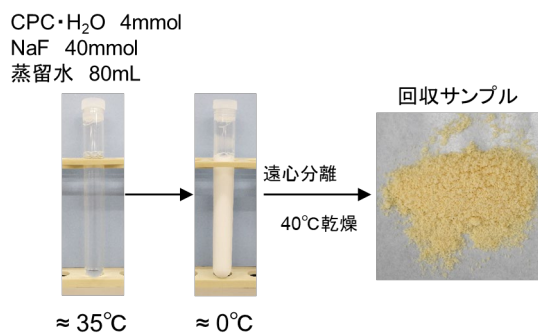


図 1 CPF 溶液調整方法 (1)

回収サンプルを室温で蒸留水に溶解し、溶液中の成分を分析した (表 1)。陽イオンの CP および Na 濃度は、それぞれ紫外可視分光法および原子吸光分光法により測定した。陰イオンの F および Cl 濃度は、イオンクロマトグラフィーにより測定した。陰イオンの F と Cl の濃度比は 38 : 62 であり、陽イオンでは 98%以上が CP (セチルピリジニウム) であることから、回収サンプルは、CPF のモル分率が 38%、CPC のモル分率が 62%となる混合物であることがわかった。CPC の約 40%を CPF に変換できたのは、CPC 中の Cl に対して 10

表 1 回収サンプルの成分分析

イオン種	濃度 (mmol/L)
CP ⁺	2.56
Na ⁺	0.058
F ⁻	1.48
Cl ⁻	2.42

倍のモル量の F を溶解させたことにより、析出する際に Cl イオンの一部が F イオンに置

換されたと考えられる。

2つ目の方法は、フッ化銀 (AgF) と塩化銀 (AgCl) の溶解度の差を利用した CPF 溶液の調整方法である。AgF の溶解度は高いが、塩化銀 (AgCl) の溶解度は極めて低い。そこで、CPC 溶液 (0.1mol/L) に CPC と同じモル量の AgF を添加した。その結果、即座に白濁し析出物が形成された (図2)。これは、溶解度が極めて低い AgCl が生成したためである。

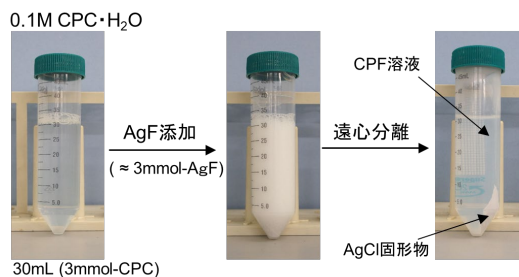


図2 CPF 溶液の調整方法 (2)

遠心分離で回収した溶液の成分分析結果を表2に示す。分析方法が異なるため、陽イオンと陰イオンのマスバランスに差があるものの、Ag イオンは陽イオン全体の 0.2%以下、Cl イオンは 2.8%以下であった。したがって、CP-F 溶液の純度は97%以上であると考えられる。これらの結果より、高純度の CP-F 溶液の調整方法としては、CPC 溶液に CPC と同じモル量の AgF を添加する方法が好適であることがわかった。

表2 回収溶液の成分分析

イオン種	濃度 (mmol/L)
CP ⁺	98
Ag ⁺	0.2
F ⁻	150
Cl ⁻	4.3

4-1-2 フッ化セチルピリジニウム担持モンモリロナイトの合成

4-1-1 で得られた約 100% CPF 溶液を用いて CPF 担持モンモリロナイトの合成を試みた。Na 型モンモリロナイト懸濁液に CPF 溶液を添加して室温で 24 時間攪拌し、モンモリロナイト層間への CPF 担持を試みた。反応後のサンプルはメンブランフィルターでろ過・水洗して回収した後、40℃で乾燥した。CPF 溶液の添加量は、CPF 溶液中の CP⁺のモル量が Na 型モンモリロナイトの陽イオン交換容量 (CEC, 1.15mmol/g) の 1 倍、3 倍、5 倍、10 倍の条件 (CP⁺/CEC=1~10) で反応させた。CP/CEC =10 の条件では、反応溶液を 60℃に加温して行った。

合成サンプルを乳鉢で粉砕した写真を図3に示す。合成サンプルの色は薄い茶色に変化した。また、反応時の CP/CEC 比が高いほど濃く着色した。

ど濃く着色した。



図3 合成サンプル

合成サンプルの結晶構造を粉末エックス線回折法で調べた結果を図4に示す。前駆体となる Na 型モンモリロナイトの底面間隔に対するピークが 7.4° に現れるのに対して、CP⁺/CEC=1~5 で合成したサンプルでは 4.3°、CP⁺/CEC=10 で合成したサンプルでは 2.2° に現れた。ピークの低角度シフトは層間隔の拡張を示す。また、合成サンプルの熱分析において、110~1000℃範囲で重量が約 40%減少し、多くの有機物が存在することが示唆された。これらの結果より、モンモリロナイトの層間に CPF 分子が挿入されていると考えられる。また、反応温度 60℃、CP⁺/CEC=10 で合成したサンプルの方が層間隔の拡張が大きいことから、より多くの CPF 分子が挿入されていると考えられる。

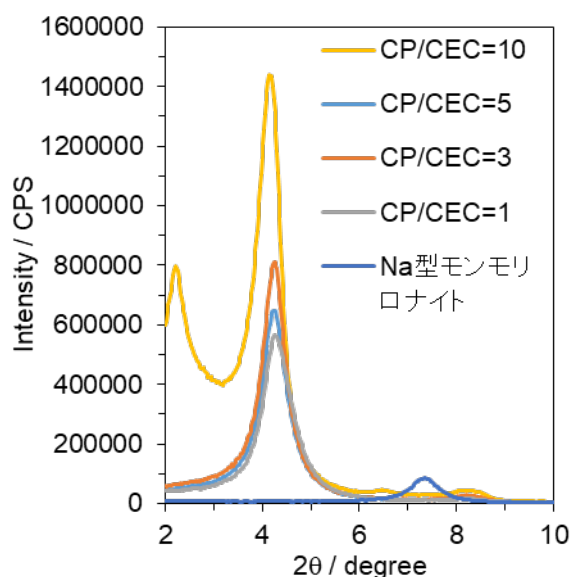


図4 合成サンプルの XRD パターン

4-2 CPF-mont からフッ素およびセチルピリジニウムの溶出挙動

内径 10mm、長さ 100mm のガラスカラム内に CP⁺/CEC=10 で合成した CPF-mont 25mg と蒸留水 5mL を封入し、37℃の恒温振とう培養器内で振とうした。24 時間振とう後、ガラスカラムの焼結フィルターを通して溶液のみ回収するとともに、新しい蒸留水 5mL を加えて、引き続き溶出試験を行った。回収溶液中の F イオンおよび CP イオン濃度をイオンクロマトグラフィーおよび紫外可視分光法により測定した (図5)。F イオンと CP イオンは同

時に溶出し、経過日数の増加に伴って溶出量が減少することがわかった。F イオンおよび CP イオンは、それぞれ歯の脱灰抑制および菌の増殖抑制に有効な成分である。歯質接着面の剥離時に CPF-mont が露出するように設計すれば、CPF-mont は歯の脱灰抑制および菌の増殖抑制のための DDS 型層状フィラーになり得ると期待できる。

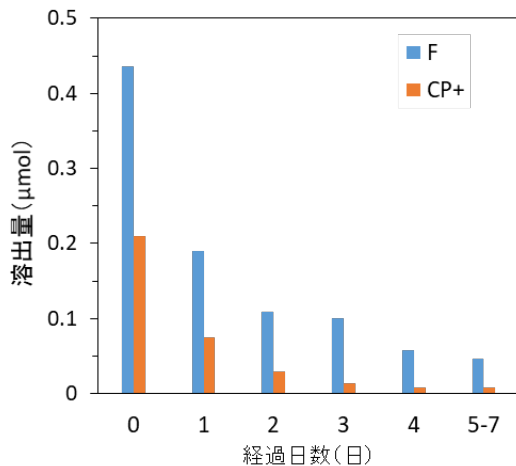
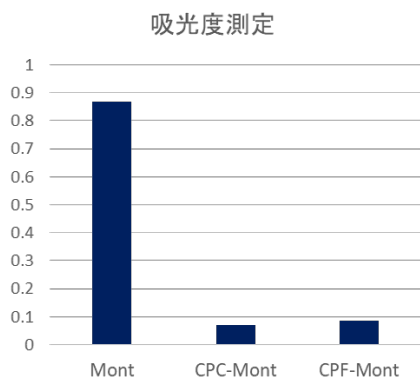


図5 CPF-mont からの F イオンおよび CP イオンの溶出挙動

4-3 CPF-mont の Streptococcus mutans (S. mutans) に対する抗菌性試験

CPF-Mont 0.003g を、3ml の 1×10^5 CFU/ml の S. mutans 添加ブレインハートインフュージョン (BHI) 培地に添加した。比較として、モンモリロナイト単体 (Mont)、CPC を担持した CPC-Mont も同様に準備した。24 時間後に、それぞれ浸漬していた培地を $100 \mu\text{l}$ 採取し、1.9ml の BHI 培地に添加し、24 時間後の濁度を測定した。その結果、CPF-Mont は、CPC-Mont



と同等の抗菌性を示した (図 6)。
図6 CPF-Mont, CPC-Mont, Mont の抗菌試験結果

4-4 CPF-Mont 添加歯質接着材の作製と歯質接着界面の観察

3% CPF-Mont となるように、1 液性市販歯質接着材 (トライエスボンド ND クイック、クラレノリタケデンタル) に添加し、試作 CPF-Mont 添加歯質接着材とした。

歯質接着界面の観察として、岡山大学病院生命倫理委員会の承認を受けたヒト抜去象牙質に、試作した 3% CPF-Mont 添加歯質接着剤を塗布し、照射器で硬化させ、コンポジットレジンで築盛した。その後、グルタルアルデヒドで固定し、エタノール脱水後、レジン包埋した。サンプルは、ウルトラミクロトームで薄切切片を作製し、透過電子顕微鏡で観察した。界面は、はがれることなく強固に接着していた。CPF-Mont の粒子も接着材層中に観察された。

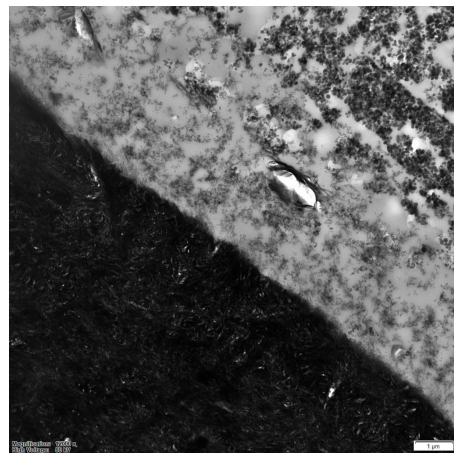


図7 CPF-Mont 象牙質接着界面の透過電子顕微鏡写真

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 11 件)

- Yoshihara K, Hayakawa S, Nagaoka N, Okihara T, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Etching efficacy of self-etching functional monomers. *Journal of Dental Research*, Accepted.
- Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Okihara T, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Chemical interaction of glycerophosphate dimethacrylate (GPDM) with hydroxyapatite and dentin. *Dental Materials*, Accepted.
- Yamane K, Mazaki T, Shiozaki Y, Yoshida A, Shinohara K, Nakamura M, Yoshida Y, Zhou D, Kitajima T, Tanaka M, Ito Y, Ozaki T, Matsukawa A. Collagen-binding hepatocyte growth factor (HGF) alone or with a gelatin-furfurylamine hydrogel enhances functional recovery in mice after spinal cord injury. *Scientific Reports* 17; 8: 917, 2018.
- Pedano M, Li X, Li S, Sun Z, Cokic S, Putzeys E, Yoshihara K, Yoshida Y, Chen Z, Van Landuyt K, Van Meerbeek B. Freshly-mixed and setting calcium-silicate cements stimulate

human dental pulp cells. *Dental Materials* 34: 797-808, 2018.

- Nagaoka N, Yoshihara K, Feitosa VP, Tamada Y, Irie M, Yoshida Y, Van Meerbeek B, Hayakawa S. Chemical interaction mechanism of 10-MDP with zirconia. *Scientific Reports* 30; 7: 45563, 2017.
- Yoshihara K, Nagaoka N, Maruo Y, Sano H, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Bacterial adhesion not inhibited by ion-releasing bioactive glass filler. *Dental Materials* 33: 723-734, 2017.
- Cardoso MV, de Rycker J, Chaudhari A, Coutinho E, Yoshida Y, Van Meerbeek B, Mesquita MF, da Silva WJ, Yoshihara K, Vandamme K, Duyck J. Titanium implant functionalization with phosphate-containing polymers may favour in vivo osseointegration *Journal of Clinical Periodontology* 44: 950-960. 2017.
- Cardoso MV, Chaudhari A, Yoshihara K, Mesquita MF, Yoshida Y, Van Meerbeek B, Vandamme K, Duyck J. Phosphorylated Pullulan Coating Enhances Titanium Implant Osseointegration in a Pig Model. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 32: 282-290, 2017.
- Yoshihara K, Nagaoka N, Maruo Y, Nishigawa G, Irie M, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Sandblasting may damage the surface of composite CAD-CAM blocks. *Dental Materials* 33: e124-e135, 2017.
- Abe S, Seitoku E, Iwadera N, Hamba Y, Yamagata S, Akasaka T, Kusaka T, Inoue S, Yawaka Y, Iida J, Sano H, Yonezawa T, Yoshida Y. Estimation of Biocompatibility of Nano-Sized Ceramic Particles with Osteoblasts, Osteosarcomas and Hepatocytes by Static and Time-Lapse Observation. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 12: 472-480, 2016.
- Yoshihara K, Nagaoka N, Sonoda A, Maruo Y, Makita Y, Okihara T, Irie M, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Effectiveness and stability of silane coupling agent incorporated in 'universal' adhesives. *Dental Materials* 32: 1218-1225, 2016.

[学会発表] (計 5 件)

- <特別講演> 吉田靖弘. 生体硬組織への接着技術を活かした医療イノベーション. 第37回整形外科バイオマテリアル研究会. 平成29年12月2日
- <招待講演> 吉田靖弘. 歯科材料の基礎研究が生んだ予防・治療イノベーション. 日本歯科医学会連合主催 大型医療研究推進フォーラム「歯科医療の未来につながる

シーズをどのように育てゆくか」. 東京. 2017年8月21日.

- <基調講演> Yoshida Y. Therapeutic innovation derived from basic research of dental materials. 2017 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. Keynote Address. San Francisco. March 22-25, 2017.
- <シンポジウム> 吉田靖弘. 接着歯学の基礎研究が生んだセラピューティック・イノベーション第35回日本接着歯学会学術大会 シンポジウム1 「新しい接着領域への飛躍」. 平成28年12月3日
- <特別講演> 吉田靖弘. 北大歯発ベンチャーの設立と医療イノベーションへの展開. 九州大学・北海道大学第12回合同活動報告会「九大・北大から世界へ 大学発ベンチャーの挑戦」東京. 平成28年11月5日.

[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：
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

吉田靖弘 (YOSHIDA, Yasuhiro)
北海道大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：90281162

(2) 研究分担者

槇田洋二 (MAKITA, Yoji)
産業技術総合研究所・健康工学研究部門・
研究グループ長
研究者番号：80357988