

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17044

研究課題名(和文) 抗菌成分のオンデマンドリリース・リチャージ機能を備えた根面修復用セメントの開発

研究課題名(英文) Development of a dental cement for root surface restoration with the ability of on-demand release and re-uptake of an antimicrobial component

研究代表者

北川 晴朗 (Kitagawa, Haruaki)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50736246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、亜鉛含有ガラスとそれを配合する根面修復用グラスアイオノマーセメントの亜鉛イオン溶出性およびリチャージ特性を評価し、さらに口腔細菌に対する抗菌性、抗バイオフィーム効果を *in vitro* で検討した。その結果、亜鉛含有ガラス、およびそれを配合するセメントは、酸性環境で亜鉛イオンの溶出が促進され、口腔細菌に対する抗菌効果や抗バイオフィーム効果を発揮することが明らかとなった。さらに、亜鉛含有ガラス配合セメントは亜鉛イオンのリチャージが可能であり、長期的な抗菌・抗プラーク性の発現に期待できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、バイオアクティブガラスの配合によって修復材料に抗プラーク性を付与する試みが行われているが、それらのほとんどは、バイオアクティブガラスからの初期のイオン溶出に伴う一時的で非常に弱い抗菌効果をねらったものにとどまっている。本研究により、亜鉛含有ガラスを配合したセメントが、口腔細菌に対して効率的かつ長期的に抗菌効果を発現できることが明らかになったことで、多数の細菌が常在する口腔環境において確実な疾患の発生予防を実現するうえで、この修復材料がひとつの基盤技術を提示するものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, zinc ion-release and recharge properties of a zinc (Zn)-containing glass particle and glass ionomer cement for root surface restoration incorporating Zn-containing glass particles were evaluated. Also, the antibacterial activity against oral bacteria and anti-biofilm effect were assessed *in vitro*. The Zn-containing glass particle and the cement incorporating Zn-containing glass particles accelerated the release of zinc ion under acidic conditions, which induced antibacterial and anti-biofilm effects. Moreover, the cement containing Zn-containing glass particles had the ability to recharge zinc ion, suggesting that it could demonstrate long-lasting antibacterial and anti-plaque effects.

研究分野：保存修復学, 歯科材料学

キーワード：抗菌性 イオン徐放 バイオアクティブガラス 根面う蝕 歯学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、修復材料に適用するためのフィラーとして、バイオアクティブガラスが注目されている。バイオアクティブガラスを粉砕した粒子をコンポジットレジンや無機セメントに配合することで、粒子から溶出する Ca^{2+} や PO_4^{3-} 等が修復後の象牙質の再石灰化を促進し、また、それらのイオン溶出に伴う局所的な pH の上昇によって、抗菌性を示すことが報告されている。しかし、pH の上昇に基づく抗菌効果は弱いため、口腔内のように多種多様な細菌が高濃度に存在するという過酷な環境で、材料表面への細菌の付着を抑制することは困難である。さらに、ガラスからのイオン溶出は初期に限られるため、長期的な抗菌性は期待できない。

ところで、亜鉛を含有するケイ酸塩ガラスは酸性環境で溶解しやすく、溶解に伴い溶出する亜鉛イオンは、細胞壁合成阻害によって抗菌効果を発揮することが報告されている。一方、修復材料表面に付着したプラーク内、およびその周囲では、細菌の酸産生によって局所的な pH の低下が生じる。そこで、研究代表者は、亜鉛含有ガラスを配合した根面修復用セメントであれば、プラークの付着によって局所的な pH 低下が生じる材料表面から高濃度の亜鉛イオン (Zn^{2+}) をオンデマンドに溶出し、プラークの成熟を抑制できるのではないかと考えた。また、一旦 Zn^{2+} が溶出した後に亜鉛含有ガラス配合セメントに Zn^{2+} をリチャージすることができれば、 Zn^{2+} の持続的な徐放が可能となり、長期的な抗菌性発現に期待できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、プラーク付着が生じた材料表面からの Zn^{2+} のオンデマンドリリースとリチャージによる Zn^{2+} の持続徐放の実現を目指して、亜鉛含有ガラスとそれを配合する根面修復用セメントについて、 Zn^{2+} 溶出性およびリチャージ特性、ならびに口腔細菌に対する抗菌性や抗バイオフィルム効果を検討した。

3. 研究の方法

1) 亜鉛含有ガラスの Zn^{2+} 溶出性の評価および抗菌効果の検討

a) Zn^{2+} 溶出性の評価

二酸化ケイ素、酸化亜鉛、酸化カルシウム、フッ素を原料とする亜鉛含有ガラス粒子 40 mg を 300 μL の蒸留水 (pH7.0) あるいは酢酸溶液 (pH4.5) に浸漬し、37°C 下で 24 時間経過後に誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-OES) を用いて溶出した Zn^{2+} 濃度を測定した。また、口腔細菌に対する Zn^{2+} の有効濃度を確認するため、*Streptococcus mutans*、*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. oralis*、*S. mitis*、*Actinomyces naeslundii*、*Fusobacterium nucleatum* を使用し、これらの細菌に対する Zn^{2+} の最小発育阻止濃度 (MIC) を micro dilution assay にて測定した。さらに、亜鉛含有ガラス粒子を pH4.5 の酢酸溶液に 1 日、さらに蒸留水に 3 日間浸漬し、この行程を 3 回繰り返しながら計 10 日間の Zn^{2+} 溶出濃度を測定した。

b) 抗菌効果の検討

亜鉛含有ガラス粒子を 1%スクロース添加あるいは非添加の 1×10^4 CFU/mL の *S. mutans* の菌液 200 μL に浸漬し、37°C 下で 24 時間培養後、生菌数を測定した。コントロールとして、亜鉛非添加のフルオロアルミノシリケートガラスを使用した。さらに、実験 1-a) と同様にして、pH4.5 の酢酸溶液と pH7.0 の蒸留水に繰り返し浸漬した 8 日目の試料を用いて、*S. mutans* に対する抗菌性を上述と同様の方法で評価した。

2) 亜鉛含有ガラス配合セメントの Zn^{2+} 溶出・リチャージ特性、および抗菌・抗バイオフィルム効果の検討

a) Zn^{2+} 溶出性およびリチャージ特性の評価

亜鉛含有ガラス粒子を配合したガラスイオンマーセメントの粉材と液材を練和し、直径 9 mm、厚さ 2 mm の硬化ディスクを作製した。作製した試料を pH4.5 の酢酸溶液あるいは pH7.0 の蒸留水に浸漬し、37°C 下で 24 時間経過後、ICP-OES を用いて溶出 Zn^{2+} 濃度を測定した。さらに、実験 1-a) と同様にして、硬化試料を酢酸溶液と蒸留水に繰り返し浸漬しながら計 28 日間 Zn^{2+} 溶出濃度を測定した。

また、亜鉛含有ガラス配合セメントのリチャージ特性を評価するため、pH4.5 の酢酸溶液と pH7.0 の人工唾液を 7 日間断続的に滴下した亜鉛含有ガラス配合セメントを 0.1 wt% の塩化亜鉛水溶液に 5 分間浸漬し、再度人工唾液を滴下しながら人工唾液中の Zn^{2+} 濃度を測定した。

b) 抗菌・抗バイオフィルム効果の検討

実験 1-b) で使用した 7 種の口腔細菌に対する抗菌効果を検討するため、1%スクロースを添加した 1×10^6 CFU/mL の各菌液 15 μL を硬化ディスク上に播種し、37°C 下で 24 時間培養後、生菌数を測定した。さらに、実験 2-a) と同様にして酢酸溶液と蒸留水に繰り返し浸漬した 4、8、24 日目の試料を用いて、*S. mutans*、*S. oralis*、*S. mitis*、*A. naeslundii* に対する抗菌性を評価した。

また、抗バイオフィルム効果を評価するため、ヒト唾液から採取した細菌懸濁液を硬化試料上に 24 時間滴下しながら培養し、試料上に形成されたバイオフィルム中の細菌数をコロニーカウント法により測定した。さらに、バイオフィルムに LIVE/DEAD 染色を施した後、共焦点レ

ーザー顕微鏡にて観察し、バイオフィルムの厚みを算出した。

4. 研究成果

1) 亜鉛含有ガラス粒子の Zn²⁺溶出性および抗菌効果の検討

a) Zn²⁺溶出性の評価

pH4.5 および pH5.5 の酢酸溶液中での Zn²⁺溶出濃度は、蒸留水中に比べて有意に高い値を示すことが確認された ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey's HSD test; 表 1)。また、pH4.5 の酢酸溶液中での Zn²⁺溶出濃度は、pH5.5 の酢酸溶液中に比べて有意に高くなることが分かった ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey's HSD test)。すなわち、亜鉛含有ガラスは、酸性環境で Zn²⁺の溶出が促進され、pH が低くなるに従ってその溶出濃度が増加することが確認された。

また、7 種の口腔細菌に対する Zn²⁺の MIC 値は 64~128 ppm であったが、亜鉛含有ガラス粒子を pH4.5 の酢酸溶液と蒸留水に繰り返し浸漬しながら計 10 日間 Zn²⁺溶出性を評価したところ、酸性溶液に浸漬するたびに 7 種全ての口腔細菌に対する有効濃度以上の亜鉛イオンを溶出することが分かった (図 1)。

表 1. 蒸留水および酢酸溶液への Zn²⁺溶出濃度 (ppm)

蒸留水 (pH7.0)	酢酸緩衝液 (pH5.5)	酢酸緩衝液 (pH4.5)
5.9±1.9 ^a	166.9±11.2 ^b	502.8±8.5 ^c

平均±S.D. (ppm). n.d.: 検出されず。
a-c: 異なる文字間に有意差が認められる ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey's HSD test).

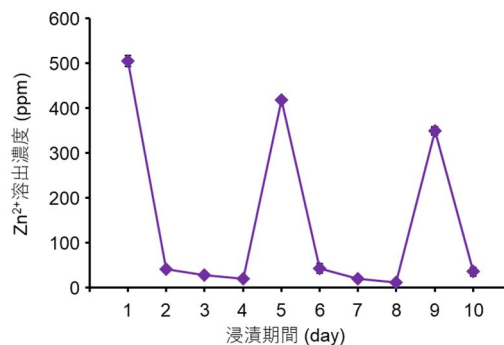


図 1. 酢酸溶液と蒸留水に繰り返し浸漬後の Zn²⁺溶出性

b) 抗菌効果の検討

亜鉛含有ガラス粒子存在下で *S. mutans* を 24 時間培養すると、亜鉛非添加のフルオロアルミノシリケートガラスの存在下や菌液のみで培養したコントロールに比べて生菌数が有意に低下することが確認された ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey's HSD test) (図 2)。また、*S. mutans* の菌液にスクロースを添加し、より強い酸性条件で培養を行ったところ、亜鉛含有ガラスは *S. mutans* に対してより効果的に抗菌性を発揮することが分かった。

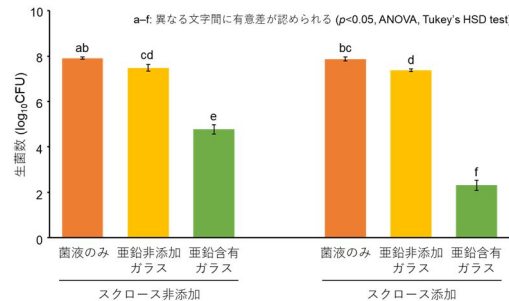


図 2. 亜鉛含有ガラス粒子存在下で 24 時間培養後の *S. mutans* の生菌数

2) 亜鉛含有ガラス粒子配合セメントの Zn²⁺溶出・リチャージ特性および抗菌・抗バイオフィルム効果の検討

a) Zn²⁺溶出・リチャージ特性の評価

亜鉛含有ガラス配合セメントを pH7.0 の蒸留水に 24 時間浸漬した後の Zn²⁺溶出濃度は 3.6 ± 0.9 ppm であったのに対して、pH4.5 の酸性溶液中では 170.4 ± 7.0 ppm であった。すなわち、亜鉛含有ガラス配合セメントからの Zn²⁺の溶出は酸性環境で促進され、その溶出濃度は口腔細菌に対する MIC 値以上であることが分かった。さらに、亜鉛含有ガラス配合セメントを pH4.5 の酢酸溶液と蒸留水に繰り返し浸漬しながら計 28 日間 Zn²⁺溶出濃度を測定したところ、亜鉛含有ガラス粒子そのものからの亜鉛イオンの溶出挙動と同様に、亜鉛含有ガラス配合セメントにおいても酢酸溶液中での Zn²⁺の溶出濃度が蒸留水中に比べて高くなることが確認された。

また、0.1 wt% の塩化亜鉛水溶液に 5 分間浸漬した後の亜鉛含有ガラス配合セメントからの Zn²⁺の溶出濃度は、塩化亜鉛水溶液に浸漬しなかった場合に比べて有意に増加し ($p < 0.05$, Student's *t*-test) Zn²⁺のリチャージによって一定濃度以上の Zn²⁺の溶出が維持されることが確認された。

b) 抗菌・抗バイオフィルム効果の検討

亜鉛含有ガラス配合硬化セメント上に 7 種の各菌液を播種して 24 時間培養すると、亜鉛含有ガラス粒子非添加のコントロールセメントに比べて、全ての細菌の生菌数が有意に低下した ($p < 0.05$, Student's *t*-test)。さらに、酢酸溶液と蒸留水に繰り返し浸漬した後の 4、8、24 日目の亜鉛含有ガラス配合セメントを用いて *S. mutans*, *S. oralis*, *S. mitis*, *A. naeslundii* に対する抗菌性を評価したところ、24 日間浸漬後の試料でも 4 種の細菌の増殖を抑制する効果を発揮することが確認された。

また、ヒト唾液から採取した細菌懸濁液を 24 時間滴下しながら培養し、亜鉛含有ガラス配合セメント上に形成されたバイオフィルムの性状を評価したところ、コントロールセメントと比べてバイオフィルム中の細菌数および厚みが有意に低下し ($p < 0.05$, Student's *t*-test)。

亜鉛含有ガラス配合セメントはバイオフィルム形成を抑制する効果を示すことが分かった。

以上より、本研究により、亜鉛含有ガラス、およびそれを配合した根面修復用セメントは、酸性環境で亜鉛イオンの溶出が促進され、口腔細菌に対して抗菌・抗バイオフィルム効果を発揮することが明らかとなった。さらに、亜鉛含有ガラス配合セメントは、亜鉛イオンのリチャージ能を有していることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Muratovska I, Kitagawa H, Hirose N, Kitagawa R, Imazato S	4. 巻 37
2. 論文標題 Antibacterial activity and dentin bonding ability of combined use of Clearfil SE Protect and sodium hypochlorite	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 460-464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2017-294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Imazato S, Kohno T, Tsuboi R, Thongthai P, Xu HHK, Kitagawa H	4. 巻 39
2. 論文標題 Cutting-edge filler technologies to release bio-active components for restorative and preventive dentistry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 69-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2019-350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu Y, Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S	4. 巻 -
2. 論文標題 Acidity-induced release of zinc ion from BioUnion filler and its inhibitory effects against Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2019-061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 板倉 裕, 平岡康弘, 北川蘭奈, 壺井莉理子, 北川晴朗, 今里 聡
2. 発表標題 抗菌剤リチャージャブルポリマー粒子の義歯床用レジンへの応用 - 粒子配合率の検討 -
3. 学会等名 日本歯科理工学会第71回春期学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Liu Y, Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S
2. 発表標題 Acidity-induced release of zinc ion from BioUnion filler and its inhibitory effects on Streptococcus mutans
3. 学会等名 日本歯科理工学会第73回春期学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川晴朗、神野友樹、壺井莉理子、今里 聡
2. 発表標題 口腔バイオフィルムを忠実に再現できるバイオリアクターの構築
3. 学会等名 日本歯科理工学会第74回秋期学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S
2. 発表標題 Anti-biofilm effects of glass ionomer cement containing BioUnion filler
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----