

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10410

研究課題名(和文) ナノ粒子による生体疑似環境下でのエナメル様構造の材料工学的な形成と抗菌性の獲得

研究課題名(英文) Creation of enamel-like structure under biological simulated environment using nanoparticles and their antibacterial properties

研究代表者

飯嶋 雅弘 (IIJIMA, Masahiro)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：20305915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオアクティブガラス(BGnp)と酸化亜鉛の混合ナノ粒子を創製し、エナメル質の再石灰化とう蝕原性細菌に対する抗菌効果を調べた。また、BGnpとオリゴペプチドの複合化を試みた。BGnpは優れた酸緩衝能を発揮し、脱灰エナメル質に対する機械的特性の改善と石灰化物様の形成を確認した。酸化亜鉛含有ナノ粒子では広範囲にわたる抗菌スペクトルを確認した。ピリジンをベースとするフォルダマーを合成し、アパタイト形成における効果的な作用を確認した。BGnpの表面に対しアデノシン三リン酸によりフォルダマーを固定化し、この複合化がBGnpの酸緩衝能には影響しないことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エナメル質初期う蝕を効率的に再石灰化させるため、比表面積効果によりミネラルの供給を飛躍的に向上させるバイオガラスのナノ粒子化を試みた。加えて、亜鉛ナノ粒子との複合化により抗菌性を獲得した。さらに、バイオガラスナノ粒子によるエナメル質の再石灰化および結晶形成機能を向上させるため、超分子的な手法により、低分子のペプチドフォルダマーとバイオガラスナノ粒子との複合体の創製を試みた。

研究成果の概要(英文)：In this study, bioactive glass (BGnp) and Zinc oxide nanoparticles were synthesized and investigated the enamel remineralization and antibacterial properties. In addition, dynamic foldamer based on hybrid peptides with nitrogenous pyridine was synthesized and surface functionalized BG was immobilized with the foldamer. The BGnp showed excellent acid buffering capacity.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：バイオガラス ナノ粒子 酸化亜鉛 ペプチド フォルダマー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マルチブラケット装置を用いた矯正治療では、ボンディングの前処理であるエッチング処理による歯質の脱灰や、装置装着に伴った自浄性の低下によってカリエスのリスクが高まることが問題点として知られており、エナメル質の脱灰抑制や再石灰化促進作用を有した機能性材料の開発が望まれている。近年、医療分野では生体活性セラミックスの研究が進んでおり、その応用範囲は広がりつつある。その中でも、1971年にLarry Henchによって開発された45S5などのバイオアクティブガラスは、優れた再石灰化促進作用を有することから、う蝕予防に役立つことが期待される。近年ではナノテクノロジーの進歩によって、材料をナノ粒子化することが可能となり、バルク体とは異なる新たな化学的特性や物理的特性を示すことが期待される。バイオアクティブガラスとともに注目されているのが、酸化亜鉛をはじめとしたセラミックナノ粒子による抗菌特性である。さらに、ペプチドなどの低分子のユニットを繰り返し連結させ、自由に人工構造と結合させた分子であるフォルダマーは、そのユニークな構造特性からドラッグデリバリーなど新たな機能性材料として期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、バイオアクティブガラス/酸化亜鉛混合ナノ粒子におけるエナメル質の再石灰化促進効果およびう蝕原性細菌に対する抗菌効果を調べた。加えて、バイオアクティブガラスナノ粒子によるエナメル質の再石灰化機能を向上させるため、低分子のペプチドフォルダマーとの複合体の創製を試みた。

3. 研究の方法

試料には市販フッ化物ゲル (F)、バイオアクティブガラスナノ粒子 (nB) およびマイクロ粒子 (μB)、キトサンナノ粒子 (C)、酸化亜鉛ナノ粒子 (Z) を準備し、さらに各試料の混合懸濁液 (nBC、nBZ、nBCZ) を調製した (表 1)。作製したナノ粒子に対しては、走査型電子顕微鏡 (SEM)、透過型電子顕微鏡による形態評価、ガス吸着法による比表面積測定、ゼータ電位測定、X線回折 (XRD) による結晶構造解析、酸緩衝能試験を行い、それらの特性を評価した。ヒト抜去歯を樹脂包埋後に、鏡面研磨してリン酸エッチングによる脱灰処理を行った。

脱灰エナメル質の再石灰化溶液への 7 時間浸漬および各試料懸濁液への 1 時間浸漬を交互に繰り返す再石灰化サイクル試験を 28 日間実施した。脱灰前後および再石灰化試験 1、7、28 日経過時の機械的特性 (硬さ、弾性係数) をナノインデンテーション試験により評価し、各試料の表面構造を SEM により観察した。さらに、これら試料懸濁液のう蝕原性細菌をはじめとした多種菌株に対する最小殺菌濃度 (MBC) を測定し、抗菌作用を評価した。

グリシン、プロライン、ピリジン、グルタミン酸、アスパラギン酸等をベースとする 5 種類フォルダマーを分子モデリングソフトウェアで設計して溶液中で合成した (図 1)。フォルダマーは核磁気共鳴分光法 (NMR) およびフーリエ変換赤外線分光法 (FTIR) の全反射測定法により分子構造を評価した。アデノシン三リン酸 (ATPS) によりバイオガラスナノ粒子 (BGnp) の表面にフォルダマーを固定化した (図 2)。合成した試料は XRD により結晶構造を同定し、FTIR にて分子構造を確認した。脱灰エナメル質の再石灰化試験については、試料をフォルダマー溶液で処理 (2 mg/mL) 後、人工唾液中に 14 日間浸漬した。

表1 エナメル質試料の再石灰化試験に用いた材料

グループ	材料	略称
1	再石灰化液への浸漬のみ	Con
2	フッ化物+塩化セチルピリニジウム配合ジェル	F
3	バイオアクティブガラスナノ粒子	nB
4	バイオアクティブガラスナノ粒子+キトサンナノ粒子	nBC
5	バイオアクティブガラスナノ粒子+酸化亜鉛ナノ粒子	nBZ
6	バイオアクティブガラスナノ粒子+キトサンナノ粒子+酸化亜鉛ナノ粒子	nBCZ
7	バイオアクティブガラスマイクロ粒子	μB

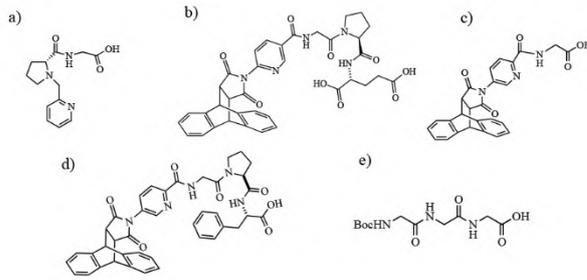


図1 分子モデリングソフトウェアで設計した5種類のフォルダマー (a, Foldamer-1; b, Foldamer-2; c, Foldamer-3; d, Foldamer-4; e, Foldamer-5)

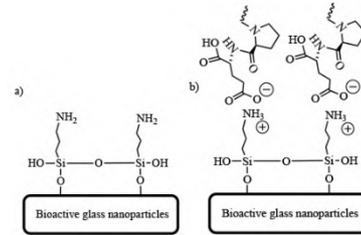


図2 アデノシン三リン酸 (ATPS) によるバイオガラスナノ粒子 (BGnp) の表面へのフォルダマー固定化の模式図
a) BGnp with an ATPS-functionalized surface
b) Ionic interaction of the foldamer peptide-based and the functionalized surfaces of the BG

4. 研究成果

作製した nB, C は非晶質構造からなる類円形の粒子であり、ナノ粒子化に伴った非常に大きな比表面積を有し、表面電荷の測定から中等度の分散安定性を有することが確認された (図3)。

さらに nB は速やかな酸緩衝能を有していた。再石灰化試験の結果、nB と μ B の比較では、荷重 10 mN、100 mN のいずれの場合においても試験 7 日以降から nB の有意な硬さの回復が確認された (図4)。

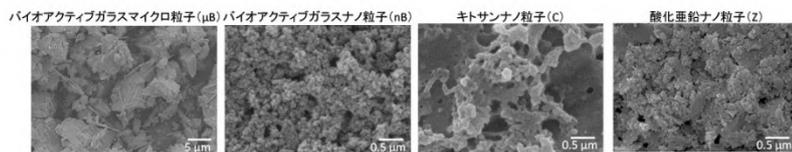


図3 各粒子の走査型電子顕微鏡像

各粒子のSEM像 (μ B:3,000倍, nB, C, Z:30,000倍)を示す。 μ Bでは丸みを帯びているものや角ばっているものなど不定形であり、粒径も数マイクロから数十マイクロと不揃いであった。nB, C, Zはすべて類円形の粒子が確認された

F とバイオアクティブガラスナノ粒子含有群 (nB, nBC, nBZ, nBCZ) の比較では、バイオアクティブガラスナノ粒子含有群を適用したエナメル質表面のより速やかな機械的特性の回復が示された (図5)。

SEM による表面性状の観察では、いずれの群においても脱灰エナメル質の粗造で多孔質な表面構造は、再石灰化試験後に石灰化物様の沈着物で覆われていることが確認された。MBC の測定では、酸化亜鉛ナノ粒子含有群 (nBZ, nBCZ) の広範囲にわたる抗菌スペクトルが確認された (図6)。これらの結果より、バイオアクティブガラスと酸化亜鉛混合ナノ粒子は脱灰抑制作用および再石灰化促進作用を示すことが考えられた。

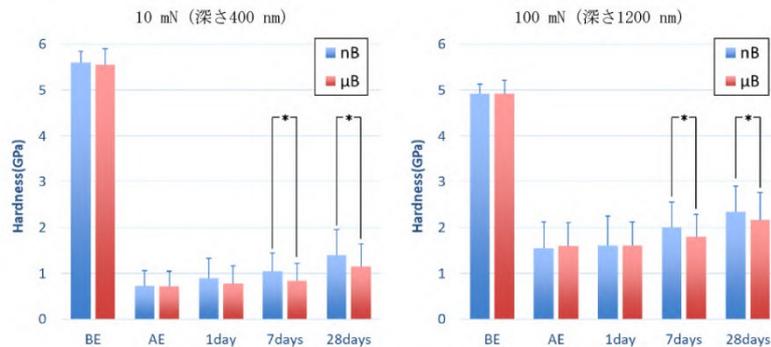


図4 脱灰前後および再石灰化試験1, 7, 28日経過時のエナメル質表面の硬さ (nB, μ Bの比較)

どちらの試料においても、リン酸エッチング処理により硬さは大きく低下した。その後再石灰化試験の経過とともに硬さは回復し、7日経過以降ではnB, μ B間に有意差が確認された (BE: 脱灰前, AE: 脱灰後, 1day, 7days, 28days: 再石灰化試験1, 7, 28日経過時)

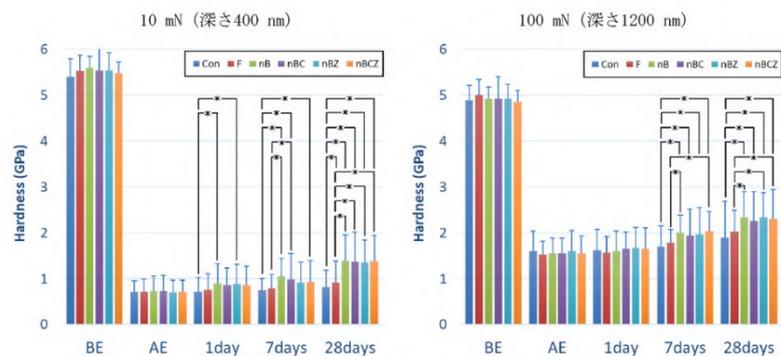


図5 脱灰前後および再石灰化試験1, 7, 28日経過時のエナメル質表面の硬さ (F, nB含有群の比較)

いずれの試料においても、リン酸エッチング処理により硬さは大きく低下した。その後再石灰化試験の経過とともに硬さは回復し、28日経過時にはnB含有群 (nB, nBC, nBZ, nBCZ) のCon, Fに対する有意差が確認された (BE: 脱灰前, AE: 脱灰後, 1day, 7days, 28days: 再石灰化試験1, 7, 28日経過時)

各試料から得られた NMR と FTIR スペクトルより、異なる末端ピリジン位置を有する 5 種類のフォルダマーの分子構造が確認された。再石灰化試験の結果では、Foldamer-2 が有意に高い硬さ値の回復を示した (図 7)。加えて、Foldamer-2 により処理したのちに人工唾液への浸漬により再石灰した試料の表面は、他の Foldamer により処理した試料と比較して、滑沢な表面状態を示した (図 8)。これより、BGnp 表面へ Foldamer-2 を固定化した場合、より高い再石灰化能が発揮されることが考えられた。

	Low High					
	F	nB	nBC	nBZ	nBCZ	μ B
<i>S. mutans</i>	0.31	>5.00	>5.00	0.16	0.16	>5.00
<i>S. sanguinis</i>	0.63	>5.00	>5.00	0.31	0.31	>5.00
<i>S. salivarius</i>	2.50	>5.00	>5.00	1.25	1.25	>5.00
<i>S. gordonii</i>	2.50	>5.00	>5.00	0.63	0.63	>5.00
<i>S. aureus</i>	1.25	>5.00	>5.00	1.25	1.25	>5.00
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2.50	>5.00	>5.00	<0.04	<0.04	>5.00
<i>P. gingivalis</i>	5.00	>5.00	>5.00	0.31	0.31	>5.00
<i>F. nucleatum</i>	5.00	>5.00	>5.00	1.25	1.25	>5.00
<i>P. intermedia</i>	5.00	>5.00	>5.00	0.16	0.16	>5.00
<i>C. albicans</i>	5.00	>5.00	>5.00	5.00	5.00	>5.00

図6 試験懸濁液による各種菌株に対する最小殺菌濃度

塩化セチルピリジニウムを含有するFおよび酸化亜鉛ナノ粒子を含有するnBZ, nBCZにおいて広範囲にわたる抗菌スペクトルが確認された

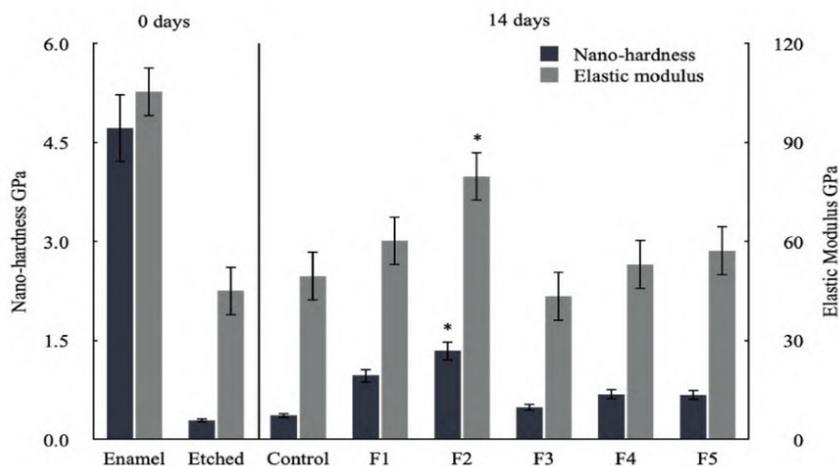


図7 フォルダマー処理後に人工唾液に浸漬したエナメル質の機械的特性(0, 14日経過時)
*Statistically significant difference by one-way analysis of variance (ANOVA); $p < 0.05$ compared with the control group.

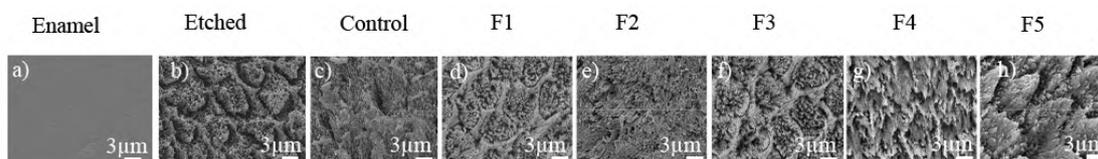


図8 エナメル質のSEM像

a), 未処理のエナメル質表面; b), 15秒エッチング; c), control (人工唾液浸漬のみ); d) Foldamer-1により処理; e), Foldamer-2により処理; f), Foldamer-3により処理; g), Foldamer-4により処理; h), Foldamer-5により処理. All treatment groups were immersed in AS for 14 days. The images were obtained under $\times 5,000$ magnification.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Nagasaki R, Ishikawa R, Ito S, Saito T, Iijima M. Effects of polishing with S-PRG filler-containing paste on enamel remineralization after orthodontic bracket debonding. *Microsc Res Tech.* 査読あり 84(2):171-179, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jemt.23575>
- ② Ishikawa R, Nagasaki R, Kawamura N, Zuñiga Heredia EZ, Nezu T, Ito S, Aita H, Iijima M. Characterization and application of bioactive glass and chitosan nanoparticles for tooth enamel remineralization. *J Biomater Tiss Eng.* 査読あり 11(7):1236-1243. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbt.2021.2703>

[学会発表] (計件)

- ① Zuñiga Heredia E, Arteaga Arteaga F, Iijima M, Sawamura M. Oligopeptide design and synthesis for enamel remineralization. 56th Japanese Peptide Symposium. Tokyo, October, 2019.
- ② Zuñiga Heredia E, Arteaga Arteaga F, Iijima M, Sawamura M. Biomimetic mineralization guide by folders based on hybrid peptides. 9th IOC, Yokohama, October, 2020.
- ③ Ishikawa R, Nagasaki R, Kawamura N, Iijima M. A study of remineralization of etched enamel using chitosan nanoparticle and bioactive glass. 9th IOC, Yokohama, October, 2020.
- ④ Zuñiga Heredia E, Arteaga Arteaga F, Iijima M, Sawamura M. Remineralization potential of bioactive glass and foldamer-based peptides on enamel. The 58th Japanese Peptide symposium. Tokyo, October, 2021.
- ⑤ Zuñiga Heredia E, Arteaga Arteaga F, Iijima M, Sawamura M. Biomimetic mineralization guided by foldamers based on hybrid peptides. International Symposium of Porous Materials. Yokohama, October, 2021.
- ⑥ Zuñiga Heredia E, Arteaga Arteaga F, Iijima M, Sawamura M. Photoswitchable azopyridine macrocyclic structure of bioactive glass for controlled release of Ca²⁺. The 102nd annual meeting of the Chemical society of Japan. Kobe, March, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryota Nagasaki, Rina Ishikawa, Shuich Ito, Takashi Saito, Masahiro Iijima	4. 巻 84(2)
2. 論文標題 Effects of polishing with S-PRG filler-containing paste on enamel remineralization after orthodontic bracket debonding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy Research and Technique	6. 最初と最後の頁 171-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jemt.23575	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Enrique Ezra Zuniga Heredia, Fernando Arteaga, Masahiro Iijima, Masaya Sawamura
2. 発表標題 Biomimetic mineralization guided by folders based on hybrid peptides
3. 学会等名 9th International Orthodontic Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rina Ishikawa, Ryota Nagasaki, Naohiko Kawamura, Masahiro Iijima
2. 発表標題 A study of remineralization of etched enamel using chitosan nanoparticle and bioactive glass
3. 学会等名 9th International Orthodontic Congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Enrique Ezra Zuniga Heredia, Fernando Arteaga Arteaga, Masahiro Iijima, Masaya Sawamura
2. 発表標題 Oligopeptide design and synthesis for enamel remineralization
3. 学会等名 56th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------