

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09937

研究課題名（和文）感染制御能と硬組織誘導能をマルチ発現するZn-Sr/Liガラスの創製

研究課題名（英文）Development of Zn-Sr/Li glass with the ability to control infection and promote hard tissue regeneration

研究代表者

北川 晴朗（Kitagawa, Haruaki）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50736246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗菌効果と硬組織誘導能をマルチ発現する技術の確立を目指して、亜鉛含有ガラスとストロンチウム/リチウム含有ガラスを試作し、各ガラスの溶解性やイオン徐放性、および細菌・細胞に与える作用を検討した。その結果、亜鉛含有ガラスは短時間で溶解して高濃度の亜鉛を溶出し、象牙細管内に侵入した細菌に対して殺菌効果を発揮するのに対して、ストロンチウム含有ガラスは緩徐な溶解によりストロンチウムを長期徐放し、骨分化を促進する作用を發揮することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオセラミックスは、優れた生体親和性に加え、硬組織誘導能を示すことから、覆髄材や逆根管充填材として使用されている。しかし、pH上昇によってある程度の抗菌性を發揮するバイオセラミックスは、象牙細管内に侵入した細菌を駆除できるほどの高い抗菌性を有していない。また、抗菌成分の溶出は、硬組織形成を促す細胞に対してネガティブな作用に繋がるため、抗菌効果と硬組織誘導能という相容れない作用を共に発現させる技術は見出されていない。本研究により確立した、抗菌効果と硬組織形成作用を段階的に発現する技術を応用することで、歯質での細菌感染を制御しつつ、良好な硬組織の治癒を誘導する歯科材料の開発に期待できる。

研究成果の概要（英文）：To establish a new technology to exhibit both antibacterial effects and hard tissue regeneration properties, we fabricated novel glasses containing zinc or strontium/lithium. Their solubility, ion-release property, and effects on cell and bacteria were evaluated. The zinc-containing glass, which was designed to be quickly dissolved, could release high concentration of zinc for a short period of time and exhibit the bactericidal effect against bacteria in dentinal tubules. The strontium-containing glass, which was designed to be slowly dissolved, could release strontium for a long term and demonstrate the effect to promote osteogenic differentiation.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯科材料 バイオセラミックス 感染制御 硬組織誘導 ドラッグデリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオセラミックス系材料は、優れた生体親和性に加え、硬組織誘導能や歯質結合性を示すことから、覆髄材や逆根管充填材、穿孔封鎖材として使用されている。しかし、バイオセラミックスの課題の一つは、pH 上昇によってある程度の抗菌性を発揮するが、象牙細管内に侵入した細菌を駆除できるほどの高い抗菌性を備えていないことである。

このような背景から、Zn 等の抗菌成分を含有することでバイオセラミックスに抗菌効果を付与する試みがなされている。しかし、高濃度の抗菌成分の持続的な溶出は、細菌に対して効果的な殺菌作用を発揮する一方、硬組織形成を促す細胞に対してはネガティブな作用に繋がるため、抗菌効果と硬組織誘導能という相容れない作用を共に発現させる技術はいまだ見出されていない。そこで、研究代表者らは、溶解速度の調整が容易なリン酸塩系ガラスに着目し、亜鉛またはストロンチウム/リチウムを含有するリン酸塩系ガラス粒子を新規に作製して、各ガラスの溶解速度の違いを利用して、抗菌効果を発現する亜鉛と硬組織形成作用を有するストロンチウムまたはリチウムを段階的に溶出させる技術を確立することを考えた。

2. 研究の目的

本研究では、溶解成分であるリンをベースとした亜鉛含有ガラスとストロンチウム/リチウム含有ガラスを試作し、各ガラス粒子の溶解性や機能を解析することで、抗菌効果と硬組織形成作用を段階的に発現する技術を確立することを目的とした。具体的には、短時間で溶解する亜鉛含有ガラスと溶解が緩徐なストロンチウム/リチウム含有ガラスを試作し、各ガラスの溶解性やイオン徐放性、および細菌・細胞に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) ガラスの作製

表1に示す原料をもとに、亜鉛、ストロンチウム、あるいはリチウムを含むガラスを作製し、平均粒径が約 10 μm となるように粉碎した。なお、ストロンチウムおよびリチウムを共に含むガラスは作製できなかった。作製した各ガラス粒子を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDS) により各ガラスの組成を解析した。

表1. 各ガラス作製に使用した原料.

mol%	Zn含有ガラス	Sr含有ガラス	Li含有ガラス
P ₂ O ₅	42	45	42
ZnO	12	0	0
SrO	0	35	0
Li ₂ O	0	0	38
Na ₂ O	40	16	0
CaO	4	0	16
Al ₂ O ₃	2	4	4

(mol%)

(2) 溶解性およびイオン溶出性の評価

各ガラス粒子を蒸留水に浸漬し、1、3、7、15、30 日後に蒸留水を交換しながら重量変化を測定して溶解率を算出した。さらに、得られた溶出液中のイオン濃度を ICP 発光分光分析装置を用いて測定した。

(3) 細菌・細胞に与える影響の検討

亜鉛含有ガラスの抗菌性評価

作製した亜鉛含有ガラス粒子を *Staphylococcus aureus* ATCC29213、*Streptococcus oralis* NCTC11427、*Streptococcus mitis* NCTC12261、*Streptococcus mutans* NCTC10449、*Enterococcus faecalis* SS497、*Actinomyces naeslundii* ATCC19246、*Porphyromonas gingivalis* W83 の7種の各菌液に浸漬し、24 時間培養後に生菌数を測定した。

また、象牙質内での感染に対する亜鉛含有ガラスの即時殺菌効果を検討するため、感染象牙質モデルを用いた抗菌試験を実施した。ヒト抜去大白歯の歯根部から象牙質片を採取し、象牙質片にグループを形成した。次亜塩素酸ナトリウムおよび EDTA 中にて順次超音波処理を行い、象牙細管を開口させた後、オートクレーブ滅菌を行った。その後、*S. mutans* または *E. faecalis* の各菌液に象牙質片を浸漬して培養後、感染させた象牙質片のグループ内に亜鉛含有ガラスを填入し、蒸留水を添加してガラスを溶解させた。象牙質片を切断した断面に LIVE/DEAD 染色を施した後、象牙細管内の細菌の生死を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて観察した。

ストロンチウム含有ガラスの細胞に対する作用

作製したストロンチウム含有ガラス粒子を -MEM 培地に 24 時間浸漬し、採取したイオン溶出液の存在下で骨芽細胞様細胞を 24 時間培養後、MTT アッセイにより細胞毒性を評価した。また、ストロンチウム含有ガラス粒子の存在下で MC3T3-E1 を 7 日間まで培養し、細胞増殖試験を行った。

さらに、ストロンチウム含有ガラスの骨分化に及ぼす影響を検討するため、ストロンチウム含有ガラス粒子の存在下で間葉系幹細胞を 14 日間培養し、リアルタイム PCR 法により骨分化マーカーの発現量を評価した。

4. 研究成果

(1) ガラスの作製

作製したガラスのうち、亜鉛含有リン酸塩系ガラスとストロンチウム含有リン酸塩系ガラスの SEM 観察および EDS マッピングの結果を図 1 に示す。

亜鉛含有ガラスの作製には、2 (mol)% の Al_2O_3 を使用したのに対して、ストロンチウム含有ガラスおよびリチウム含有ガラスの作製には、亜鉛含有ガラスよりも高い 4 (mol)% の Al_2O_3 を使用した。すなわち、ガラス内のアルミニウム含有率を調整することで、亜鉛含有ガラスは水に溶けやすく、ストロンチウム含有ガラスおよびリチウム含有ガラスは水に溶けにくい設計とした。

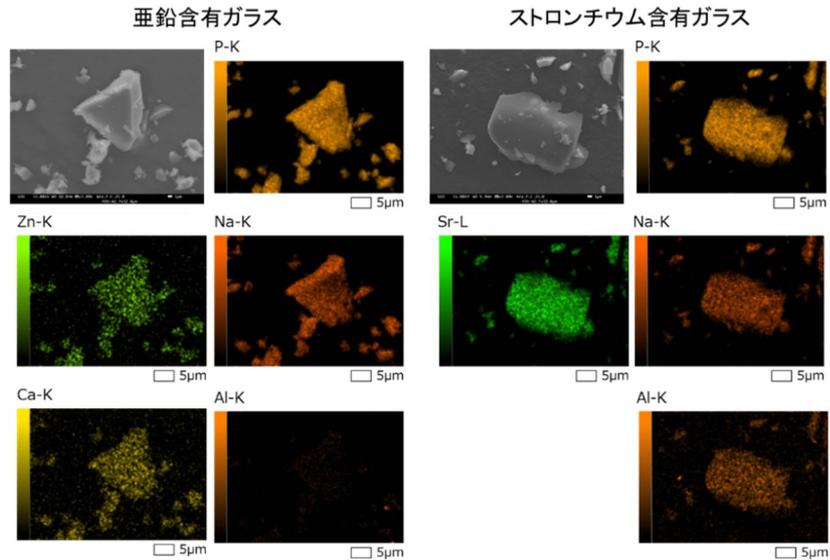


図 1. 亜鉛含有およびストロンチウム含有ガラスの SEM および EDS マッピング像。

(2) 溶解性およびイオン溶出性の評価

亜鉛含有ガラスは、2 時間蒸留水に浸漬後、99%溶解し、24 時間経過後に 99.9%溶解した。また、24 時間経過後の溶出液内の亜鉛イオン濃度は 562.5 ppm であった。

一方、リチウム含有ガラスは 7 日間浸漬後に 99.9%以上溶解したのに対して、ストロンチウム含有ガラスは 30 日間経過後も 62%のガラスが残存し、それに伴いストロンチウムの溶出が 30 日間持続することが確認された。したがって、緩徐な溶解により硬組織形成作用を有する成分を徐放するガラスとして、リチウム含有ガラスよりもストロンチウム含有ガラスが適していることが分かった。

(3) 細菌・細胞に与える影響の検討

亜鉛含有ガラスの抗菌性評価

亜鉛含有ガラス粒子存在下で培養した後の生菌数は、ガラス非存在下のコントロールと比べて、*S. aureus*、*S. oralis*、*S. mitis*、*S. mutans*、*E. faecalis*、*A. naeslundii*、*P. gingivalis* の 7 種いずれの細菌においても有意に減少した (図 2)。

また、感染象牙質モデルを用いた抗菌試験の結果から、亜鉛含有ガラス粒子を感染象牙質に適用することで、象牙細管内の *S. mutans* および *E. faecalis* いずれの細菌に対しても殺菌効果を発揮することが明らかとなった。

病態応答型ガラスの細胞に対する作用

ストロンチウム含有ガラスは、骨芽細胞様細胞に対して細胞毒性を示さなかったものの、ストロンチウム含有ガラスと共に 7 日間骨芽細胞様細胞を培養しても、細胞増殖を促進する作用は認められなかった。

一方、Sr 含有ガラスの存在下で間葉系幹細胞を 14 日間培養すると、骨分化マーカーの発現量が増加することが分かった。

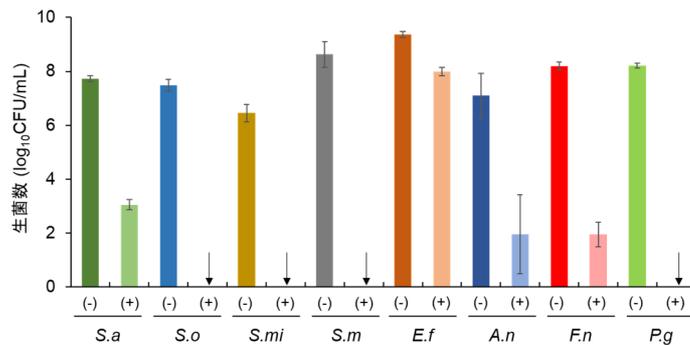


図 2. 亜鉛含有ガラス粒子存在下および非存在下で 24 時間培養後の各細菌の生菌数。

S.a: *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *S.o*: *Streptococcus oralis* NCTC11427, *S.mi*: *Streptococcus mitis* NCTC12261, *S.m*: *Streptococcus mutans* NCTC10449, *E.f*: *Enterococcus faecalis* SS497, *A.n*: *Actinomyces naeslundii* ATCC19246, *P.g*: *Porphyromonas gingivalis* W83. (-): ガラス非存在下. (+): ガラス存在下. 矢印: 細菌数が 0 であることを示す。

以上のように、本研究により、亜鉛含有ガラスは短期間で溶解して高濃度の亜鉛イオンを溶出し、象牙細管内に侵入した細菌に対して殺菌効果を発揮するのに対して、ストロンチウム含有ガラスは緩徐な溶解によりストロンチウムイオンを長期間徐放し、骨分化を促進する作用を發揮することが明らかとなった。本研究により確立した、抗菌効果と硬組織誘導能を段階的に発現する技術を応用することで、歯質での細菌感染を制御しつつ、良好な硬組織の治癒を誘導する歯科材料の開発に期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Liu YH, Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S	4. 巻 39
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 547-553
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 -
1. 著者名 Liu YH, Kohno T, Tsuboi R, Thongthai P, Deng F, Sakai H, Kitagawa H, Imazato S	4. 巻 40
2. 論文標題 Antibacterial effects and physical properties of a glass ionomer cement containing BioUnion filler with acidity-induced ability to release zinc ion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 1418 ~ 1427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-052	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 -
1. 著者名 Kitagawa H, Kitagawa R, Tsuboi R, Hirose N, Thongthai P, Sakai H, Ueda M, Ono S, Sasaki JI, Ooya T, Imazato S	4. 巻 37
2. 論文標題 Development of endodontic sealers containing antimicrobial-loaded polymer particles with long-term antibacterial effects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 1248 ~ 1259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2021.04.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Deng F, Sakai H, Kitagawa H, Kohno T, Thongthai P, Liu YH, Kitagawa R, Abe G, Sasaki JI, Imazato S	4. 巻 27
2. 論文標題 Fabrication of pH-responsive Zn-releasing glass particles for smart antibacterial restoratives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7202 ~ 7202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27217202	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kohno T, Liu YH, Deng F, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S.
2. 発表標題 Evaluation of anti-biofilm effects of bio-active GIC using a bioreactor.
3. 学会等名 第68回国際歯科研究学会日本部会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Liu YH, Kohno T, Tsuboi R, Thongthai P, Deng F, Sakai H, Kitagawa H, Imazato S
2. 発表標題 Antibacterial effects of BioUnion filler-incorporated GIC with acidity-induced zinc-releasing ability
3. 学会等名 99th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Deng F, Sakai H, Kitagawa H, Kohno T, Tsuboi R, Thongthai P, Liu YH, Imazato S
2. 発表標題 Fabrication of pH-responsive Zn-releasing glass particles for smart antibacterial restoratives
3. 学会等名 2022 International Association for Dental Research General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sakai H, Deng F, Sasaki JI, Kitagawa H, Kohno T, Abe G, Xiao L, Imazato S
2. 発表標題 Characterization of a strontium-releasing phosphate-based bioactive glass for bone regeneration
3. 学会等名 International Dental Materials Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	佐々木 淳一 (Sasaki Jun-Ichi) (50530490)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師 (14401)	

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
---------	---------