

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293409

研究課題名(和文) 長期的な抗菌剤徐放を可能とするハイドロゲルの開発と各種レジン系材料への応用

研究課題名(英文) Development of hydrogels with the ability to release antimicrobials for long term and their application to various resin-based materials

研究代表者

今里 聡 (Imazato, Satoshi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80243244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HEMA と架橋性モノマーTMPTからなる非生体吸収性ハイドロゲル粒子を試作し、これに塩化セチルピリジニウム(CPC)を担持させることで、長期的な抗菌剤徐放を可能とするリザーバーの開発に成功した。さらに、作製したCPC担持ハイドロゲル粒子をMMA系レジンやHEMA系根管充填シーラーに適用することにより、臨床使用に適した物性を維持しつつ、CPC徐放に基づく持続的な抗菌性を各材料に付与できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, non-biodegradable hydrogels composed of HEMA and a cross-linking monomer TMPT, to be used as a reservoir of antimicrobials, were fabricated. These novel hydrogels were found to be able to work as a carrier of cetylpyridinium chloride (CPC), enabling long-term release of CPC in a wet environment. By incorporation of CPC-loaded polyHEMA/TMPT hydrogel particles, it is possible to provide MMA-based resins or HEMA-based endodontic sealers with long-lasting antibacterial effects, keeping their physical properties in clinically acceptable level. Thus, we successfully developed a sustained antimicrobial-release system useful for achievement of reconstructive materials which exhibit long-lasting antibacterial effects.

研究分野：歯科生体材料学

キーワード：歯学 歯科材料 レジン 抗菌性 ドラッグデリバリー 抗菌剤

### 1. 研究開始当初の背景

歯科用レジン系材料の各種基本特性が臨床的に十分なレベルに達したことを背景に、近年、新たな機能のひとつとして抗菌性を付与する試みが盛んに行われるようになってきた。しかしながら、簡便な手法として古くから研究が進められてきた、水溶性の抗菌成分を直接添加し、その溶出によって抗菌効果を発揮させるアプローチでは、抗菌効果の発現が初期の短期間に留まるうえ、抗菌剤の溶出によって材料物性が著しく低下するという問題がある。一方、研究代表者らは、これまでに、2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) を主成分とする非生体吸収性のハイドロゲルを開発し、このゲルがタンパクの担体として使用可能であり、とくに Fibroblast growth factor-2 の徐放用担体として適していることを見出した。そこで、この技術をベースに、抗菌剤の担持・徐放に最適な非生体吸収性ハイドロゲルを開発すれば、材料物性に影響を及ぼすことなく、長期的な抗菌剤徐放能を備えたレジン系材料の実現が可能となるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、HEMA と架橋性モノマー trimethylolpropane trimethacrylate (TMPT) からなる非生体吸収性ハイドロゲルを試作し、歯科領域で使用される再建材料への適用を主眼とする抗菌剤徐放用リザーバーとしての有用性を *in vitro* において検索することを目的とした。具体的には、第四アンモニウム系抗菌剤である塩化セチルピリジニウム (CPC) の徐放とリチャージに最適な polyHEMA/TMPT ハイドロゲルを完成させ、これを配合した歯科用レジンの CPC 徐放挙動や抗菌効果、各種材料特性について検討を行い、持続的な抗菌性を発現できる新規技術の実現を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ハイドロゲルの作製とキャラクタリゼーション

HEMA と三官能架橋性モノマー TMPT を 10/90, 30/70, 50/50, 70/30, 90/10 の重量比で混合し、熱重合後に粉碎して、粒径約 500  $\mu\text{m}$  の 5 種のハイドロゲル粒子の作製を試みた。そして、各粒子の吸水率、疎水度、表面電荷を測定し、特性を比較した。

#### (2) ハイドロゲル粒子への CPC の担持と溶出性の評価

浸漬法または重合前添加法の二種の方法で CPC を各ハイドロゲル粒子に担持させ、高速液体クロマトグラフィを用いて CPC の溶出挙動を調べた。

また、水以外の三種の溶出媒 (Triton X-100, NaCl, 尿素水溶液) への CPC 溶出性を評価し、ハイドロゲルと CPC の結合メカニズムを解析した。

#### (3) 各種口腔細菌に対する CPC の抗菌力評価

CPC の必要十分な溶出濃度を知る目的で、*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* の 4 菌種に対する CPC の最小発育阻止濃度を測定した。

#### (4) CPC 担持ハイドロゲル粒子の抗菌性評価

寒天平板拡散法により、前述の 4 種の細菌に対する CPC 担持ハイドロゲル粒子の抗菌性を検討した。

#### (5) 試作ハイドロゲル粒子の CPC リチャージ特性の評価

実験(2)で得られた結果から、溶出の持続性の点で有利であると判明したハイドロゲル粒子を用いて、一旦 CPC 溶出濃度が必要レベル以下に低下した後に CPC 溶液に浸漬することで溶出濃度の回復が可能かどうかを検討した。また、リチャージの時間やタイミング、使用する CPC 濃度を変化させ、条件の違いによるリチャージ後の CPC 溶出挙動の変化を詳細に検討した。

#### (6) 細胞親和性評価

試作ハイドロゲル粒子の存在下で骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 を培養し、粒子への細胞の付着や細胞増殖の状態を、SEM 観察、Live/Dead 染色ならびに MTT アッセイにより評価した。

#### (7) 各種レジン系材料へのハイドロゲル粒子の配合

CPC 担持ハイドロゲル粒子を市販の MMA 系デンチャーレジンまたは HEMA 系レジンシーラーに 10~50 (wt)% 濃度で配合し、以下の評価を行った。

##### CPC 溶出性

各材料からの CPC 溶出性を、リチャージの可能性も含めて評価した。

##### 抗菌性

各材料の臨床使用環境において対象となる菌を用いて、抗菌効果を評価した。

##### 材料特性

各材料が具備すべき基本的材料特性を検討した。すなわち、MMA 系レジンでは 24 時間水中保管後の曲げ強さを、HEMA 系シーラーでは稠度、被膜厚さ、操作時間、X 線造影性、および根管封鎖性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) ハイドロゲルの作製とキャラクタリゼーション

5 種の HEMA/TMPT の混合割合のいずれにおいても、ハイドロゲル粒子の作製が可能であった。ハイドロゲル粒子の吸水率と疎水度は、ともに HEMA の割合が多い程増加する傾向を示した。ゼータ電位測定の結果、いずれのハイドロゲル粒子も負の表面電荷を有し、HEMA50%/TMPT50%以上でその値が大きくなった。

#### (2) ハイドロゲル粒子への CPC の担持と溶出性の評価

浸漬法により試作ハイドロゲル粒子に CPC を担持させた場合、HEMA50%/TMPT50%粒子で

は 48 時間までの CPC の溶出が認められ、溶出期間の点では 5 種のなかで最も有利であると考えられた。また、溶出媒として界面活性剤である Triton X-100 を用いると、担持させた CPC がすべて溶出することから、HEMA/TMPT ハイドロゲルへの CPC の担持には主に疎水性相互作用が関与していることが分かった。

一方で、HEMA50%/TMPT50%モノマーの重合前に、0.5、5 または 10(wt)%の CPC 粉末を予め添加する方法で担持させると、明らかな CPC 溶出の長期化が得られ、0.5%添加試料では 20 日間まで、5 および 10%添加試料では 120 日間におよぶ溶出が認められた。

(3) 各種口腔細菌に対する CPC の抗菌力評価  
*S. mutans*, *L. casei*, *E. faecalis*, *C. albicans* の 4 菌種に対する CPC の MIC 値は、それぞれ、0.8 µg/mL, 1.6 µg/mL, 1.6 µg/mL, 1.6 µg/mL であり、CPC が細菌抑制効果を発揮するための必要最小溶出濃度は 1.6 µg/mL であると考えられた。

(4) CPC 担持ハイドロゲル粒子の抗菌性評価  
重合前添加法による 0.5、5、および 10% CPC 担持ハイドロゲル粒子は、4 菌種すべてに対して抑制作用を示し、とくに 10% CPC 添加で最大の抑制が認められた。

(5) 試作ハイドロゲル粒子の CPC リチャージ特性の評価

HEMA50%/TMPT50%の組成のハイドロゲル粒子を用いて CPC のリチャージ能を評価したところ、500 µg/mL の濃度の CPC 溶液への 5 分間の再浸漬では CPC 溶出濃度の十分な回復は得られなかったが、5 mg/mL の CPC 水溶液を用いると、5 分間のリチャージでも有効濃度 (1.6 µg/mL) 以上の CPC の溶出が維持できることが分かった。

一方、0.5%の CPC 粉末を予め添加する方法で担持させた CPC 担持ハイドロゲル粒子においては、500 µg/mL の CPC 水溶液による 5 分間のリチャージでも、有効濃度を超える持続的な CPC 溶出が維持できることが確認された。

(6) 細胞親和性評価

試作ハイドロゲル粒子上に MC3T3-E1 細胞を播種し、3 日間培養後に細胞の付着状態を SEM にて観察したところ、粒子表面への良好な付着が認められた。また、Live/Dead 染色では、粒子に接触した細胞がすべて生存していることが確認された。さらに、カルチャーインサートを用いて試作ハイドロゲルを培養液中に浸漬して 48 時間培養を行い、MTT アッセイにより細胞増殖を評価したところ、試作ハイドロゲルからの溶出成分による細胞増殖の抑制は認められず、高い細胞親和性を示すことが分かった。

(7) 各種レジン系材料へのハイドロゲル粒子の配合

i) MMA 系デンチャーレジンへの配合

CPC 担持ハイドロゲル粒子を 20%以上配合した試料では、500 µg/mL の CPC 水溶液を用いて 3 日ごとにリチャージすることで、有

効濃度を超える持続的な CPC 溶出が維持できることが分かった。また、*C. albicans* を用いて評価を行ったところ、CPC のリチャージを行うことで付着抑制効果が維持されることが確認された。

一方、CPC 担持ハイドロゲル粒子配合による物性への影響を、曲げ強さを対象に評価したところ、10 および 30%で粒子を配合したいずれの試料においても、24 時間水中保管後の曲げ強さには粒子非配合のものとは有意差がないことが分かった。

ii) HEMA 系シーラーへの配合

CPC 担持ハイドロゲル粒子を 50%配合した硬化試料の CPC 溶出性を評価したところ、28 日間を超える持続的な CPC の溶出が認められた。また、*E. faecalis* に対する長期的な抗菌性を評価するため、一定期間水中浸漬した硬化シーラーを用いて阻止斑形成試験を行ったところ、14 日間浸漬後と 28 日間浸漬後の阻止斑の大きさに有意差は認められず、長期間経過後もシーラーの抗菌性が維持されることが分かった。

さらに、稠度、被膜厚さ、操作時間、X 線造影性、および根管封鎖性のいずれについても、CPC 担持ハイドロゲル粒子を配合した場合と非配合の場合で差は認められず、試作シーラーが臨床使用可能な物性を備えていることが確認された。

以上のように、本研究により、長期的な抗菌剤徐放を可能とするハイドロゲルの開発に成功した。さらに、作製したハイドロゲル粒子を MMA 系レジンや HEMA 系根管充填シーラーに適用することにより、臨床使用に適した物性を維持しつつ、CPC 徐放に基づく持続的な抗菌性を各材料に付与できることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Imazato S, Kitagawa H, Tsuboi R, Kitagawa R, Thongthai P, Sasaki JI. Non-biodegradable polymer particles for drug delivery: a new technology for “bio-active” restorative materials. *Dent Mater J* 査読有, in press.

Kitagawa H, Takeda K, Tsuboi R, Hayashi M, Sasaki JI, Imazato S. Influence of polymerization properties of 4-META/MMA-based resin on the activity of fibroblast growth factor-2. *Dent Mater J* 査読有, in press.

Kitagawa H, Izutani N, Kitagawa R, Maezono H, Yamaguchi M, Imazato S. Evolution of resistance to cationic biocides in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. *J Dent* 査読有, 47(1): 18-22, 2016. doi:

10.1016/j.jdent.2016.02.008.

今里 聡. 理想的な逆根管充填材とは? .  
日口外誌 査読有, 61(7): 360-362,  
2015.

Takeda K, Kitagawa H, Tsuboi R, Kiba W, Sasaki JI, Hayashi M, Imazato S. Effectiveness of non-biodegradable poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based hydrogel particles as a fibroblast growth factor-2 releasing carrier. *Dent Mater* 査読有, 31(11): 1406-1414, 2015. doi: 10.1016/j.dental.2015.09.007.

Kitagawa R, Kitagawa H, Izutani N, Hirose N, Hayashi M, Imazato S. Development of an antibacterial root canal filling system containing MDPB. *J Dent Res* 査読有, 93(12): 1277-1282, 2014. doi: 10.1177/0022034514549808. Kitagawa H, Takeda K, Kitagawa R, Izutani N, Miki S, Hirose N, Hayashi M, Imazato S. Development of sustained antimicrobial-release systems using poly-HEMA/TMPT hydrogels. *Acta Biomater* 査読有, 10(10), 4285-4295, 2014. doi:10.1016/j.actbio.2014.06.016.

[学会発表](計18件)

Imazato S. Non-biodegradable polymer particles for drug delivery: A new technology for 'Bio-active' restorative materials. International Dental Materials Congress 2016, November 5, 2016, Bali (Indonesia). Tsuboi R, Kitagawa H, Takeda K, Sasaki JI, Takeshige F, Imazato S. Release of FGF-2 from 4-META/MMA-based adhesive resins containing non-biodegradable FGF-2-loaded-polymer particles. International Dental Materials Congress 2016, November 5, 2016, Bali (Indonesia).

Kitagawa H, Kitagawa R, Tsuboi R, Takeda K, Sasaki JI, Imazato S. Development of an antibacterial endodontic sealer containing CPC-loaded polymer particles. 94th General Session & Exhibition of the IADR, June 24, 2016, Seoul (Republic of Korea).

北川晴朗、北川蘭奈、壺井莉理子、竹田かほる、佐々木淳一、今里 聡. CPC 担持ポリマー粒子の応用による長期的抗菌効果を備えた根管充填シーラーの開発. 第 67 回日本歯科理工学会学術講演会、2016 年 4 月 16 日、福岡市 .

今里 聡. 歯科領域における機能性材料の臨床応用の現状. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 10

日, 京都市 .

Imazato S. Non-biodegradable polymer particles for drug delivery to achieve bio-functional reconstructive materials. 第 63 回国際歯科研究学会日本部会学術大会, 2015 年 10 月 31 日, 福岡市 .

Imazato S. Potential Clinical Benefits of Antibacterial Restoratives. The Academy of Dental Materials 2015 Annual Meeting, October 9, 2015, Hawaii (USA).

壺井莉理子, 竹田かほる, 佐々木淳一, 竹重文雄, 今里 聡. 非生体分解性 FGF-2 徐放ポリマー粒子の開発 凍結乾燥処理が FGF-2 の徐放性と作用に及ぼす影響 . 第 66 回日本歯科理工学会学術講演会, 2015 年 10 月 3 日, 東京都 .

Imazato S. Caries prevention and management by bio-active restorative materials. 25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry in 2015, July 4, 2015, Glasgow (UK).

Imazato S. Future of dental restorative materials: From "bio-mimetic" to "bio-protective and bio-promoting". The 2nd Annual Meeting of Thai Society of Dental Biomaterials, Apr 29, 2015, Bangkok (Thailand).

Kitagawa H, Kitagawa R, Takeda K, Tsuboi R, Sasaki JI, Hayashi M, Imazato S. Endodontic sealers containing CPC-loaded polymer particle with long-lasting antimicrobial release. 93rd General Session & Exhibition of the IADR, March 13, 2015, Boston (USA).

Ma S, Chen JH, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Takeda K, Izutani N, Kitagawa H. Mechanism of detoxification of the cationic antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) by N-acetyl cysteine. The 6th International Congress on Adhesive Dentistry, January 31, 2015, Bangkok (Thailand).

Imazato S. Bio-active bonding: key technologies for advanced adhesive restorations. The 6th International Congress on Adhesive Dentistry, January 31, 2015, Bangkok (Thailand).

Imazato S. Therapeutic resins with " bio-protective/bio-promoting " functions for restorative treatments in new era. 第 62 回国際歯科研究学会日本部会学術大会, 2014 年 12 月 5 日, 大阪市 .

今里 聡. 修復治療のパラダイムシフト

と次世代型材料 . 第 7 回日本総合歯科学  
会学術大会 2014 年 11 月 29 日 吹田市 .  
北川晴朗 , 北川蘭奈 , 竹田かほる , 林 美  
加子 , 今里 聡 . CPC 担持ポリマー粒子  
の応用による長期的な抗菌効果を備え  
た根管充填シーラーの開発 . 日本歯科保  
存学会 2014 年度秋季学術大会 ( 第 141  
回 ) , 2014 年 10 月 30 日 , 山形市 .

Imazato S. Therapeutic resins for  
dental adhesives. 92nd General  
Session & Exhibition of the IADR, June  
27, 2014, Cape Town (South Africa).

Imazato S. Future of restorative  
materials: From bio-mimetic” to  
“bio-protective and bio-promoting” .  
4th Research Week - International  
Symposium of Oral Medicine, May 25,  
2014, Taipei (Taiwan).

[ その他 ]

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~techno/research.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

今里 聡 ( IMAZATO SATOSHI )  
大阪大学・歯学研究科・教授  
研究者番号 : 8 0 2 4 3 2 4 4

### (2) 研究分担者

佐々木淳一 ( SASAKI JUNICHI )  
大阪大学・歯学研究科・助教  
研究者番号 : 5 0 5 3 0 4 9 0

### (3) 研究分担者

高橋雄介 ( TAKAHASHI YUSUKE )  
大阪大学・歯学部附属病院・講師  
研究者番号 : 6 0 3 9 7 6 9 3

### (4) 研究分担者

岩崎泰彦 ( IWASAKI YASUHIKO )  
関西大学・化学生命工学部・教授  
研究者番号 : 9 0 2 8 0 9 9 0