

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893140

研究課題名(和文) オンデマンドの抗菌性発現機能を備えた根管充填材の開発

研究課題名(英文) Development of a root canal filling material with on-demand antibacterial activity

研究代表者

北川 晴朗 (Kitagawa, Haruaki)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50736246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000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からなるポリマーに、抗菌剤であるCPCを担持させたハイドロゲル粒子を作製し、これをHEMA系の根管充填用シーラーに配合して、CPC溶出性と抗菌効果、物性および根管封鎖性を評価した。その結果、CPCを担持させた粒子をシーラーに配合することにより、オンデマンドでのCPC徐放が可能となり、また感染根管モデルを用いた抗菌実験から、象牙細管内に存在する細菌を効果的に死滅させることが分かった。さらに、配合する粒子の粒径を調整することで、臨床使用可能な物性および根管封鎖性を備えたシーラーを実現できることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, novel polyHEMA/TMPT particles loaded with cetylpyridinium chloride (CPC) were fabricated and incorporated into a HEMA-based endodontic sealer. Release profiles of CPC, antibacterial activities, physical properties, and sealing abilities of experimental sealers containing CPC-loaded hydrogel particles were evaluated in vitro. The experimental sealers containing CPC-loaded hydrogel particles demonstrated on-demand release of CPC. By the antibacterial activity tests using an infected dentin model, sealers containing CPC-loaded hydrogel particles were found to be effective to kill bacteria in dentinal tubules. In addition, it was confirmed that acceptable physical properties and sealing abilities could be obtained by adjusting the diameter of particles incorporated.

研究分野：歯学

キーワード：抗菌性 薬剤徐放 ポリマー 根管充填用材料 オンデマンド

1. 研究開始当初の背景

感染根管治療において、十分な機械的拡大と化学的清掃を行っても、根管内の細菌を完全に排除することは不可能であるため、根管充填用材料が抗菌性を備えていることは有益である。また、根尖病変の再発は、新たな細菌の漏洩や根尖孔からの組織液の侵入による根管に残存細菌の増殖に起因するため、根管充填後にこれらの問題が発生した際に抗菌剤の放出を生じさせる技術は根管治療の予後を高めるうえで極めて有効な手段であると考えられる。そこで、カチオン系抗菌剤である塩化セチルピリジニウム (CPC) を担持させたハイドロゲル粒子を新規に創製し、これをレジン系の根管充填材に添加することで、CPC の長期徐放のみならず、根管充填後に組織液等の漏洩が生じた際に、CPC 徐放を起こさせるリザーバーを内包した根管充填材が実現できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、オンデマンドでの抗菌剤徐放特性を備えた抗菌性根管充填用材料を開発することを目指して、2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) と架橋性モノマー Trimethylolpropane trimethacrylate (TMPT) からなるポリマーに、抗菌剤である CPC を担持させたハイドロゲル粒子を作製し、これを HEMA 系の根管充填用シーラーに配合して、抗菌剤溶出性と抗菌効果、物性および根管封鎖性を *in vitro* にて評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CPC 担持ハイドロゲル粒子の作製と CPC 徐放性の評価

HEMA と架橋性モノマー TMPT を重量比で 50/50 の割合で混合し、これに CPC 粉末を 0.5、5、10、または 25 wt% となるように添加し、加熱重合した後粉碎して、平均粒径が 500 μm の CPC 担持ハイドロゲル粒子 (以下、0.5%-、5%-、10%-、または 25%-CPC ゲル粒子) を作製した。作製した 0.5%-、5%-、または 10%-CPC ゲル粒子を滅菌蒸留水に浸漬し、溶出した CPC の濃度を高速液体クロマトグラフィにて測定した。

(2) CPC ゲル粒子配合シーラーの作製と CPC 徐放性の評価

CPC ゲル粒子を配合するシーラーには、HEMA 系の根管充填シーラーであるメタシール Soft (サンメディカル) を使用した。実験 (1) にて作製した各 CPC ゲル粒子を平均粒径が 30、50、100、あるいは 500 μm となるように粉碎・調整した。各 CPC ゲル粒子を、重量比で 20 または 50% となるようにパウダーに混合後、リキッドと練和した混和泥を、直径 9 mm、深さ 2 mm のモールドに填入し、光照射を行って硬化ディスクを作製した。作製した各硬化

試料を滅菌蒸留水に浸漬し、CPC の溶出挙動を評価した。さらに、オンデマンドでの CPC 徐放性を検討するため、14 日間 CPC を初期溶出させた硬化試料を、37 $^{\circ}\text{C}$ で 14 日間空气中にて保管し、再度滅菌蒸留水に浸漬して溶出 CPC 濃度の測定を行った。

(3) 抗菌性の評価

感染根管モデルの作製

ウシ抜去単根管歯の歯冠を除去した後、セメントエナメル境から根尖方向へ 4 mm の位置で歯根を切断し、外径が 6 mm になるように試料を調整した後、根管を直径 3.1 mm に拡大した。その後、*Enterococcus faecalis* SS497 懸濁液中に試料を浸漬し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間嫌気培養を行って、感染根管モデルを作製した。

残存生菌数の測定

E. faecalis を感染させた根管モデルを 24 穴マイクロプレートウェルの底部に固定し、寒天培地を試料の上部まで周囲に注入した。その後、練和した CPC ゲル粒子配合シーラーを根管内に填入し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 14 日間嫌気培養した。ラウンドバーを用いて根管充填材を除去し、根管象牙質を切削回収した。回収した象牙質粉を液体培地に懸濁、希釈した後、寒天平板培地に塗抹し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 48 時間嫌気培養後、生菌数の測定を行った。

(4) 物性の評価

歯科用根管充填シーラーの ISO 規格 (ISO 6876:2001) に準じて、25%-CPC ゲル粒子配合シーラーの被膜厚さと崩壊率を測定した。被膜厚さは、重ねた 2 枚のガラス板の厚さを測定した後、練和した試料の一部をガラス板の中央に採取し、練和開始 10 分後に 2 枚のガラス板とシーラーの厚さを測定し、算出した。崩壊率は、共栓瓶中で硬化試料を蒸留水に 24 時間浸漬後、蒸留水を蒸発させ、共栓瓶中の残渣の重量を測定し、算出した。

(5) 根管封鎖性の評価

ヒト抜去単根管歯の根管を拡大・形成し、次亜塩素酸ナトリウムと EDTA にて洗浄後、25%-CPC ゲル粒子配合シーラーとガッタパーチャポイントを用いて根管充填を行った。24 時間あるいは 14 日間湿潤下にて保管後、Fluid filtration 法による漏洩試験を行った。

4. 研究成果

(1) CPC 担持ハイドロゲル粒子からの CPC 徐放性

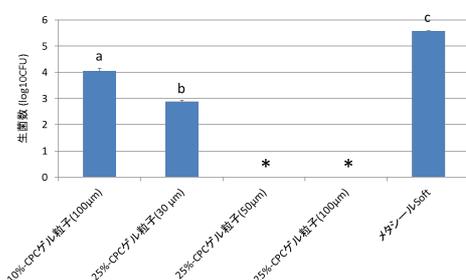
0.5%-CPC ゲル粒子では、CPC の溶出が 20 日間まで認められ、5%-および 10%-CPC ゲル粒子では、120 日間におよぶ CPC の溶出が認められた。

(2) CPC ゲル粒子配合シーラーからの CPC 徐放性

0.5%-および5%-CPC ゲル粒子配合シーラーでは、粒子の配合量にかかわらず CPC の溶出は 4 日間までしか認められなかった。一方、10%-および 25%-CPC ゲル粒子を 50%配合したものは、14 日間におよび持続的な CPC の溶出が認められた。

さらに、14 日間 CPC を溶出させた 10%-および 25%-CPC ゲル粒子配合シーラーを、乾燥状態で 14 日間保管後、再度滅菌蒸留水に浸漬して CPC 溶出性を評価したところ、ひきつづき 14 日間 CPC の溶出が持続することが確認できた。また、25%-CPC ゲル粒子配合では、10%-CPC ゲル粒子の配合と比べて CPC 溶出濃度が常に有意に高く、粒径の大きな粒子を配合した方が、より高濃度の CPC 溶出を維持できることが分かった。

(3) 抗菌性



*: 生菌数を示す
a, b, c, d: 異なる文字間に有意差があることを示す (p<0.05, ANOVA, Tukey's HSD test, n=5)

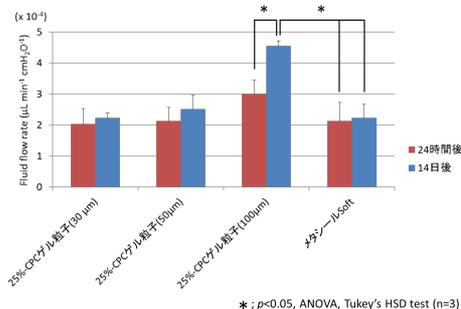
溶出試験の結果から、粒径が 100 μm の 10%-CPC ゲル粒子、または粒径が 30、50、あるいは 100 μm の 25%-CPC ゲル粒子を配合したシーラーが、CPC 溶出の持続性の点で有利であったことから、これらの粒子を配合したシーラーを対象に感染根管モデルを用いた抗菌試験を行った。

いずれの CPC ゲル粒子配合シーラーにおいてもメタシール Soft と比べて残存生菌数が有意に減少したが、粒径が 50 μm および 100 μm の 25%-CPC ゲル粒子の配合では、残存生菌を 100%死滅させ得ることが確認できた。

(4) 物性

平均粒径が 50 μm 以下の 25%-CPC ゲル粒子を配合したシーラーは、ISO 規格で定められている被膜厚さ、および崩壊率の基準値を満たしていることが分かった。

(5) 根管封鎖性



*: p<0.05, ANOVA, Tukey's HSD test (n=3)

粒径が 100 μm の場合、14 日間保管後の漏洩性が、24 時間後や CPC ゲル粒子非配合のメタシール Soft と比べて有意に高くなり、根管封鎖性が低下していることが分かった。これに対して、粒径が 50 μm 以下の場合、14 日間保管後でも封鎖性の低下は認められず、メタシール Soft を用いて根管充填を行った場合と同等の根管封鎖性を示すことが確認された。

(6) まとめ

以上より、CPC を担持させたハイドロゲル粒子を HEMA 系根管充填シーラーに配合することにより、オンデマンドでの CPC 徐放が可能となり、また感染根管モデルを用いた抗菌実験から、試作シーラーが象牙細管内に存在する細菌を効果的に死滅させることが分かった。さらに、配合する粒子の粒径を調整することで、臨床使用可能な物性および根管封鎖性を備えたシーラーを実現できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kitagawa H, Takeda K, Kitagawa R, Izutani N, Miki S, Hirose N, Hayashi M, Imazato S. Development of sustained antimicrobial-release systems using poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/trimethylolpropane trimethacrylate hydrogels. *Acta Biomater.* 査読有. 10(10): 4285-4295, 2014.

DOI: 10.1016/j.actbio.2014.06.016.

Takeda K, Kitagawa H, Tsuboi R, Kiba W, Sasaki J, 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 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: 18-22, 2016.

DOI: 10.1016/j.jdent.2016.02.008.

〔学会発表〕(計 5 件)

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. 第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2014 年 10 月 30 日、山形市.

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.

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. International Association for Dental Research 93rd General Session & Exhibition, March 13, 2015, Boston, USA.

Kitagawa R, Kitagawa H, Hirose N, Yamaguchi S, Mehdawi M, Hayashi M, Imazato S. Antibacterial effects of self-adhesive resin cements containing chlorhexidine. The Academy of Dental Materials 2015 Annual Meeting, October 8, 2015, Hawaii, USA.

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 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北川 晴朗 (KITAGAWA Haruaki)

大阪大学・歯学研究科 (研究院)・助教

研究者番号 : 50736246