

平成23年 5月20日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592454

研究課題名(和文)

齲蝕・歯周病予防効果を持つナノ粒子チタン酸Caを基材とする歯質コーティング

研究課題名(英文)

Development of a new tooth coating with anti-carious and anti-periodontitis properties by using nanoparticles of Calcium Titanate

研究代表者

岸本 悦央 (KISHIMOTO ETSUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20091316

研究成果の概要(和文)：

新規コーティング材チタン酸カルシウム-非晶質炭素複合物(CaTiO₃-C)ナノ粒子を用いた歯質コーティングによる、新たな齲蝕・歯周病予防法の開発を目的とした。培養実験により、改良型アルコキシド法により作製されたCaTiO₃-Cナノ粒子が細胞活性を向上させることが示された。また、CaTiO₃-Cナノ粒子に抗菌性を付与し齲蝕原因菌に対する抗菌試験を行った結果、良好な結果が得られた。以上のことから、本材料は齲蝕予防法への応用が期待できる新規生体材料であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

The objective of this study was the development of a new tooth coating method for prevention of caries and periodontitis by using calcium titanate nanoparticles. KUSA/A1 cells culture with CaTiO₃-C showed good results for cell proliferation and differentiation. Furthermore, we have been able to produce CaTiO₃-C with antibiotic properties that gave satisfying results against carious bacteria. We expected that this new coating material could be of a great utility in the future,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：口腔保健学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：チタン酸、ナノ粒子、生体材料、齲蝕、歯周病、抗菌

1. 研究開始当初の背景

齲蝕予防にはフッ素化合物や代用糖(キシリトール)が用いられている。歯周病予防と

してブラッシングや機械的除去が用いられている。これらは別々の目的で利用されるが、いずれも十分な効果はない。抗生物質の薬効

も長期的な効果がない。

両疾患を同時に予防できるコーティング材が必要である。薬効が長期的DDSで効果がみられるコーティング方法の開発が必要である。両疾患予防の原理は齶蝕予防DDSのために耐酸性物質のコーティング、石灰化能及び殺菌性の付与である。一方、歯周病予防法は細菌、真菌の殺菌性があり長期的DDSが必要となる。

これらの両効果を満足させる歯質コーティング材はない。

合成チタン酸カルシウム（ペロブスカイト）とは天然鉱物である CaTiO_3 （一般的にABO₃）と同じ結晶構造を持つ酸化物で理想型のペロブスカイトは格子の立方体の中心にA（陽イオン）、頂点にB（陽イオン）、辺の中心にO（陰イオン）が位置しているナノ粒子構造である。このナノ粒子は非晶質炭素（-C）を含有している。 $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ はテトラサイクリンやFeと結合する。

最近、山岸らはF含有HAとリン酸と H_2O_2 塗布により人工エナメル質形成法を開発したが（Nature 2005, 433 : 819）これには抗菌性、歯周病予防効果はない。過酸化水素水（ H_2O_2 ）は薬事法上問題がある。

以上のことから $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ （TC、F含有）ナノ粒子をボンディング材（高機能モノマー）と混合し、コーティング材として歯の表面に利用する着想に至った。

歯の漂白には一般に過酸化水素（ H_2O_2 ）が用いられているが、 H_2O_2 の利用は薬事法上問題があり、方法論の再考が必要である。 TiO_2 に H_2O_2 を利用する方法もあるが、 TiO_2 酸化物（ルチル）自身にも細胞毒性がある一方、 $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ はCaが溶出しても TiO_4 チタン酸として存在し、毒性はなく安定している。 TiO_2 自身は純白色であるが、 $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ はやや黄色を示すことから、天然歯色であり、色彩的にも CaTiO_3 が歯の審美性に有利である。

2. 研究の目的

齶蝕および歯周病両疾患予防の原理は耐酸性物質のコーティング、石灰化能及び殺菌性の付与である。本研究では、新規コーティング材 $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ ナノ粒子を用いた歯質コーティングによる、新たな齶蝕・歯周病予防法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ の基本的な性質について

①アルコキシド法及び改良型熱分解法によりチタン酸カルシウムを作製し、EDS及びXRD解析を行った。

② 非晶質炭素を含むチタン酸カルシウム-非晶質炭素複合物（ $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ ）について、その生体反応を確認するため、骨原性細胞（KUSA cell）を用いて培養実験を行った。培地に $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ 粉末を添加し、MTS assayによる細胞増殖、アルカリホスファターゼ活性測定による細胞分化及び石灰化について検討した。対照としてハイドロキシアパタイト（HA、650℃）と乾式法（1200℃）によるチタン酸カルシウム粉末を用いた。

(2) アルコキシド法の改良と細胞活性解析

加熱時間を30分、2時間、12時間の3条件で $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ を作製、ジェットミルおよびフィルターを用いナノ粒子とし、SEM、XRD、FT-IR解析を行った。また、骨原性細胞（KUSA cell）を用いて培養実験を行った。培地に上記条件で作製した粒子を添加し、MTS assayによる細胞増殖、アルカリホスファターゼ（ALP）活性測定による細胞分化について検討した。

(3) $\text{CaTiO}_3\text{-C}$ ナノ粒子への抗菌性の付与とその効果について

抗菌剤としてテトラサイクリン（TC）及び塩化セチルピリジニウム（CPC）を用い、

CaTiO₃-C ナノ粒子との混合液を作製した。齶蝕原因菌である *S. mutans*、*S. sobrinus* を用い、抗菌試験を行った。

BHI 培地に *S. mutans* 及び *S. sobrinus* 培養菌を 10⁴ 個接種し、抗菌剤 CaTiO₃-C ナノ粒子混合液を添加した (終濃度 200 μg/mL)。37 °C で 9 時間培養後、濁度 (600nm) を測定し、コントロールと比較して増殖率を求めた。

4. 研究成果

(1) CaTiO₃-C ナノ粒子の基本的な性質について

EDS 及び XRD 解析の結果、Ti、Ca、O 以外に非晶質炭素 (-C) が含まれることを明らかにした。

骨原性細胞 (KUSA cell) を用いた培養実験の結果、アルコキシド法による CaTiO₃-C 粉末を添加したものが最も細胞増殖、石灰化及びアルカリホスファターゼ活性が高く、次いで改良型熱分解法による CaTiO₃-C 粉末を添加したものであり、HA 以上に細胞活性を向上させることを明らかにした。

このことから、アルコキシド法による CaTiO₃-C は歯科材料として利用できる可能性が示された。

(2) アルコキシド法の改良と細胞活性解析

SEM 解析の結果、粒径は 600~1000nm であった。XRD 解析では 30 分および 2 時間の条件で作製した粒子に Ca₃CO₃ のピークが確認されたが、12 時間加熱した粒子には Ca₃CO₃ はみられなかった。しかし、FT-IR 解析では 3 条件の粒子に CO₃ が確認された。

培養実験では MTS assay および ALP 活性ともに加熱時間による有意な差は認められず、高い値を示した。

本研究結果から、アルコキシド法による加熱時間は 30 分で十分であり、本法により作製された CaTiO₃-C ナノ粒子は細胞活性を向

上させることを明らかにし、歯科材料への応用の可能性が示唆された。

(3) CaTiO₃-C ナノ粒子への抗菌性の付与とその効果について

抗菌試験の結果、TC、CPC とともに齶蝕原因菌に対して抗菌活性を示すことが明らかとなった。

以上のことから、新規コーティング材 CaTiO₃-C ナノ粒子は齶蝕原因菌への抗菌活性を示す抗菌性の付与が可能であり、齶蝕予防法への応用が期待できる新規生体材料であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

①Rodriguez AP, Inoue M, Tanaka T, Miyake M, Sfer AM, Kishimoto E, Tsujigiwa H, Rivera RS, Nagatsuka H. Effect of CaTiO(3)-CaCO(3) prepared by alkoxide method on cell response. J Biomed Mater Res A. 査読有, 93(1), 2010, 297-303

②Inoue M, Rodriguez AP, Takagi T, Katase N, Kubota M, Nagai N, Nagatsuka H, Inoue M, Nagaoka N, Takagi S, Suzuki K. Effect of a new titanium coating material (CaTiO₃-aC) prepared by thermal decomposition method on osteoblastic cell response. J Biomater Appl. 査読有, 24(7), 2010, 657-72

③Okauchi-Yabuuchi M, Tamamura R, Nagaoka N, Takagi S, Kishimoto E, Takagi T, Rodriguez A, Inoue M, Nagatsuka H, Akao M, Nagai N. Chemical Analysis of a Novel Coating Material, CaTiO₃-aC. Journal of Hard Tissue Biology. 査読有, 17(3), 2008, 115-120

〔学会発表〕（計6件）

①辻極秀次、骨髄幹細胞の歯・骨組織構成細胞への分化能についての検討、第52回歯科基礎医学会学術大会・総会、平成22年9月22日、東京

②平田泰久、新規コーティング材 CaTiO₃-aC の細胞生物学的・組織学的検討、第19回硬組織再生生物学会・学術大会、平成22年9月4日、岡山

③井上美穂、新規生体材料チタン酸カルシウム-炭酸カルシウム (CaTiO₃-CaCO₃) の細胞学的検討、第51回歯科基礎医学会学術大会・総会、平成21年9月11日、新潟

④A. Rodrigues, Effect of carbon in CaTiO₃ materials on cell proliferation and differentiation for medical application. The 4th International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials, 平成20年9月10日、Philippines

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 悦央 (KISHIMOTO ETSUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20091316

(2) 研究分担者

永井 教之 (NAGAI NORIYUKI)

岡山大学・名誉教授

研究者番号：90085770

長塚 仁 (NAGATSUKA HITOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70237535

高木 慎 (TAKAGI SHIN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准

教授

研究者番号：40116471

辻極 秀次 (TSUJIGIWA HIDETSUGU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70335628

長岡 紀幸 (NAGAOKA NORIYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70304326