

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09987

研究課題名（和文）抗菌性および脱灰予防効果を持つ歯科用フィラーの開発

研究課題名（英文）Development of dental fillers with both antibacterial and demineralization preventive properties

研究代表者

横田 洋二（Makita, Yoji）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・総括研究主幹

研究者番号：80357988

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：抗菌性と脱灰予防効果を併せ持つ新規な歯科材料用フィラーとして、フッ化セチルピリジニウム（CPF）担持層状リン酸ジルコニウム（CPF-ZrP）及びCPF担持層状リン酸チタン（CPF-TiP）を開発した。CPF-ZrPとCPF-TiPの層間はCPF担持前の約4倍に広がり、層間にセチルピリジニウムイオンとCPFの存在が示唆された。

CPF-ZrPを5%添加したボンディングレジンプレートは、生理食塩水に4週間浸漬してもミュータンスに対する抗菌性を示した。生理食塩水に6週間以上浸漬すると抗菌性が失活するが、CPF溶液に再度浸漬することによりCPFがリチャージされ、抗菌性が復活することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、歯科治療で使用実績のある抗菌成分の塩化セチルピリジニウムと脱灰予防成分のフッ素を、フッ化セチルピリジニウムの形態で層状無機化合物の層間に挿入し、これらの機能成分を層間から徐放させて抗菌効果と脱灰予防効果を同時に発現させるための新規な歯科用フィラーを開発した。機能成分の徐放によってフィラー内の機能成分量が少なくなり機能性が失活しても、機能成分のリチャージによって機能を復活できる。二次う蝕の予防には辺縁漏洩部への菌の侵入や増殖抑制と歯質の脱灰抑制が効果的であるが、これまでこのような方法・材料は開発されていなかった。

研究成果の概要（英文）：Cetylpyridinium fluoride (CPF)-loaded layered zirconium phosphate (CPF-ZrP) and CPF-loaded layered titanium phosphate (CPF-TiP) were developed as new dental fillers with both antibacterial and antidecalcification properties. The interlayer distances of CPF-ZrP and CPF-TiP were approximately 4 times wider than before CPF loading; EPMA analysis suggested the presence of cetylpyridinium ions and CPF in the interlayer. Bonding resin plates with 5% CPF-ZrP showed antibacterial activity against *S. mutans*, even after 4 weeks of immersion in saline. Antimicrobial activity was found to be inactivated after 6 weeks or more of immersion in saline, but CPF was recharged by immersion in CPF solution and antimicrobial activity was restored.

研究分野：材料工学

キーワード：イオン交換 無機イオン交換体 抗菌 脱灰抑制 接着

1. 研究開始当初の背景

歯科医療において、歯質接着材料の果たす役割は極めて高い。修復物の脱落や辺縁漏洩を防ぐため、各メーカーは歯質接着力の強い材料開発に注力し、現在では十分な初期歯質接着強さを備えている。しかし、口腔内は飲食に伴う温度や pH の大きな変化に加えて断続的な咬合負荷を受けるなど劣悪な環境下であり、長期的には接着材料界面において微小な剥離が生じ、多種多数の細菌が存在するプラークが形成しやすい。また、う蝕治療では必要最小限の切削による修復、いわゆるミニマムインターベーションの考えに基づいて処置されるが、視認性に劣る大白歯遠心などではう蝕部位の確認が難しい症例もあり、感染歯質が完全に除去されていない場合もあり得る。以上のように、口腔内においては二次う蝕、歯周病、誤嚥性肺炎に罹患するリスクが顕在しているということである。

口腔疾患の予防にはブラッシング等の口腔ケアが有効であるが、高齢者や要介護者では困難な場合もあり、現実的には十分なケアが行われているとは言い難い。う蝕予防や脱灰予防(再石灰化促進)のために、殺菌剤やフッ素を配合した洗口剤や歯磨剤が市販されている。しかし、殺菌剤やフッ素は溶けやすく、その効果は一時的であり、継続的な使用が不可欠である。歯質接着材料の分野においても、殺菌剤やフッ素を添加した機能性材料の研究開発が盛んに行われているが、長期的な有効性が確認できないためほとんど実用化されていない。例えば、歯科用接着材(製品名:クリアフィルメガボンド FA)のプライマーには抗菌性モノマーMDPBが含まれているが、臨床研究での二次う蝕予防効果は実証されていない。以上の点を鑑み、研究代表者は歯科材料に抗菌性を付加するための無機フィラー(塩化セチルピリジニウム(CPC)担持モンモリロナイト)を開発した。臨床応用の第一弾として、暫間使用の義歯床下粘膜調整材に CPC 担持モンモリロナイト配合し、粘膜調整材表面において菌の増殖を 2 週間以上抑制することを非臨床試験にて確認し、口腔に薬剤(抗菌成分)が徐放する医療機器(製品名:ティッシュコンディショナーCPC)として国内で初めての承認に繋がった。介護施設で使用した臨床例を見ても、本品が口腔内の衛生状況を保つ上で有効であることは明らかである(Pharmaceutics 2023)。

一方、二次う蝕の予防においては、辺縁漏洩部への菌の侵入や増殖を防ぐことに加え、歯質の脱灰を抑制し、再石灰化を促進する必要がある。しかしながら、これらの機能を同時に発現する方法は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究は、持続的な抗菌性と脱灰予防効果を併せ持つ新規な歯科材料用フィラーを開発するとともに、新規フィラーおよびフィラー添加歯科接着材料の物性を評価し、実用化のための基礎的知見を集積することを目的とする。

3. 研究の方法

抗菌効果及び脱灰予防効果を発現させる機能成分には、CPC($C_{21}H_{38}ClN$)中の Cl を F に置換したフッ化セチルピリジニウム(CPF)を使用する。CPF は唾液中では塩化セチルピリジニウムイオン(CP^+)と F⁻に乖離し、それぞれ抗菌作用と脱灰抑制に寄与すると推察される。

本研究では、CPF を徐放させて持続的な機能を発現させるため、CPF を無機化合物に担持する。CPF の担体には、層状リン酸ジルコニウム($Zr(HP04)_2 \cdot nH_2O$ (α -ZrP))及び層状リン酸チタン($Ti(HP04)_2 \cdot nH_2O$ (α -TiP))を用いた(図1)。新規フィラーの物性は、エックス線回折パターン(XRD)による結晶構造解析、電子線プローブマイクロアナライザー(EPMA)による組成分析、熱重量減少(TG)測定、走査電子顕微鏡(SEM)による形態観察、及び新規フィラーからの CPF 溶出試験により評価した。

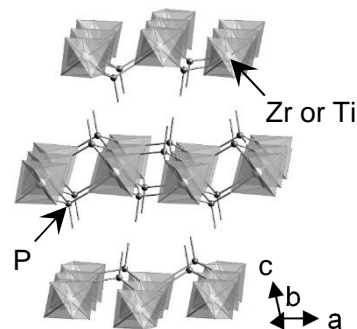


図1 層状リン酸塩の結晶構造

また、開発した新規フィラーを市販歯科接着材料に添加したレジンプレートを作製し、生理食塩水に長期間浸漬し、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に対する抗菌効果の持続性について評価した。レジンプレート内の新規フィラーからの CPF の溶出に伴っていずれ CPF 量がなくなり抗菌性が失活することが予想されるため、レジンプレート内の新規フィラーへの CPF リチャージを試み、抗菌性が復活するか検討した。

4. 研究成果

(1) CPF 担持フィラーの開発

CPF を担持した層状リン酸ジルコニウム(CPF-ZrP)及び層状リン酸チタン(CPF-TiP)は、CPF 溶液中に所定量の α -ZrP 及び α -TiP を添加し、25℃で24時間振とう後、乾燥、乳鉢粉碎して得た。CPF 担持量は合成時の固液比によって異なるため、 α -ZrP 及び α -TiP の中性での陽イオン交換量

(それぞれ 3.3、3.5 mmol/g(カタログ値)) に対して、溶液中の CPF モル量が 1、3、6、10 倍になるように調整して行った。

CPF-ZrP 及び CPF-TiP の XRD パターン測定の結果 (図 2) 層間隔に相当する底面ピークはいずれも低角度側に大きくシフトしており、層間に CPF が挿入され層間隔が大きく拡張されていることが示唆される。例えば、CPF 担持前の α -ZrP の層間隔は 0.75 nm (11.9°) であるのに対して、合成時の CPF 濃度が陽イオン交換容量の 3 倍 (CPF-ZrP (x3)) では 3.0 nm (3.0°) となり、層間隔は 4 倍に拡張した。

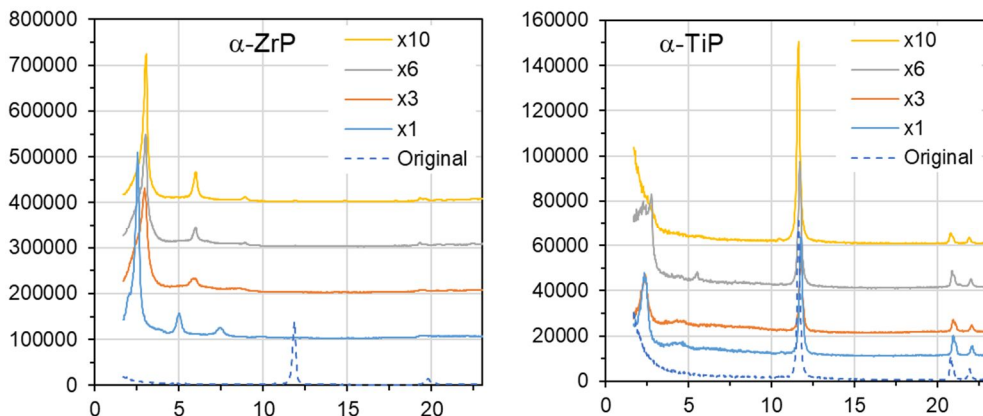


図 2 XRD パターン

CPF-ZrP 及び CPF-TiP の熱重量減少測定では、250 付近で急激な重量減少が見られ、1000 までの熱重量減率は CPF 担持前の α -ZrP 及び α -TiP に比べて高かった (図 3)。 α -ZrP の重量減少率が 10 % であるのに対して、CPF-ZrP (x6) は 60 % となった。単体の CPC では 250 ですべて熱分解することから、250 付近以降の重量減少は、ほとんどが CPF の分解によるものと考えられる。また、1000 までの熱重量減少率は CPF-TiP よりも CPF-ZrP の方が大きいことから、CPF-ZrP の方がより CPF 担持量が多いと考えられる。

EPMA 分析の結果、CPF-ZrP (x3) の N 及び F 濃度は、それぞれ 9.4、4.6 wt% であった。 α -ZrP は陽イオン交換体であるため、まず塩化セチルピリジニウムイオン (CP^+) が H^+ とのイオン交換により層間に挿入され、 CP^+ 挿入に伴って形成された疎水的空間に CPF が吸着すると考えられる。この吸着メカニズムを踏まえて CPF-ZrP (x3) の層間に挿入された CP^+ と CPF の量を計算すると、 CP^+ が 64 モル%、CPF が 36 モル%となった。

走査電子顕微鏡 (SEM) 観察 (図 4) において、 α -ZrP 及び α -TiP はいずれも約 0.5 μm の板状結晶であった。CPF 挿入後の α -ZrP では、合成時の CPF 濃度が陽イオン交換容量の 3 倍以上の条件において層状のシートが折り重なった形態が見られることから、剥離再配列反応を伴って CP^+ と CPF が層間に担持されたと考えられる。一方、 α -TiP では CPF 挿入後に形態変化がほとんど見られないことから、通常の CP^+ のイオン交換に引き続いて CPF が吸着したと考えられる。

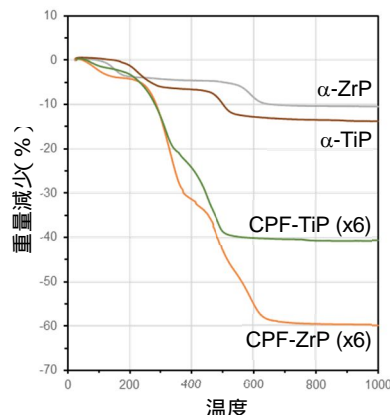


図 3 熱重量測定

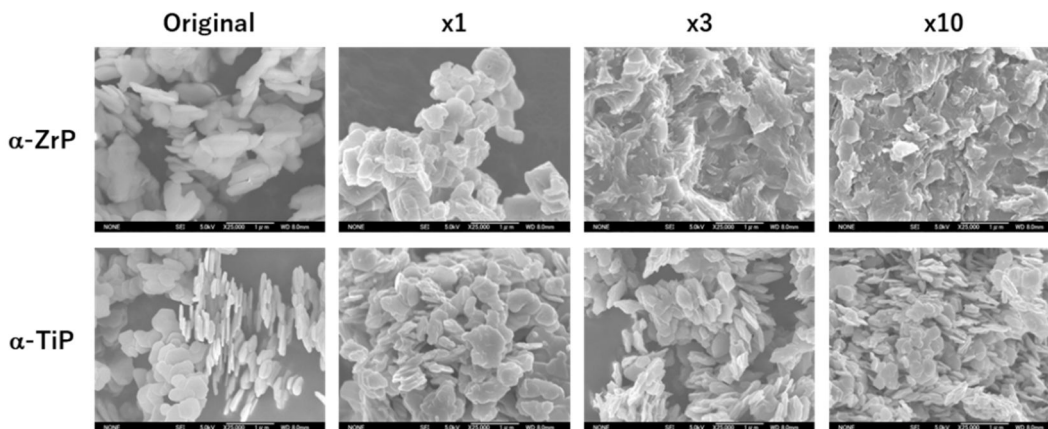


図 4 SEM 写真

(2) CPF-ZrP からの CPF 溶出挙動

フィルター付きガラスカラムに CPF-ZrP を 25 mg、蒸留水 5 mL を入れ、インキュベータ内で 37 °C、130 rpm で 24 時間振とう後、蒸留水を入れ替える作業を 4 日間繰り返した。回収した溶液中のセチルピリジニウムイオン (CP⁺) 濃度を分光光度計で測定し、CPF の溶出挙動を調べた (図 5)。その結果、日数経過に伴い CPF の溶出量が減少した。CPF-ZrP (x3) では、3.4 wt% の CP⁺ が 4 日間で溶出した。また、合成時の CPF 濃度の高いほど、CPF-ZrP 1mg あたりの CP⁺ 濃度が高い傾向を示した。

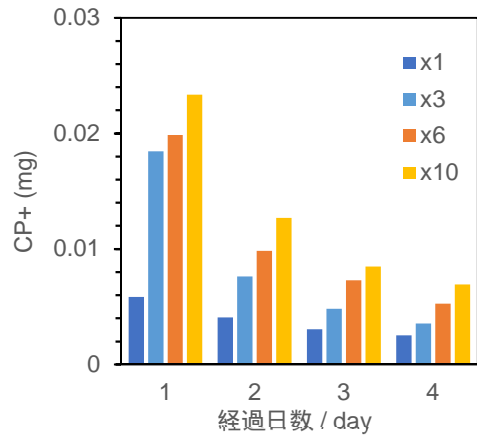


図 5 CPF-ZrP 1mg あたりの CP⁺ 溶出

(3) フィラー添加歯科接着材料 (CPF-ZrP 含有ボンディングレジンプレート) の作製及び抗菌性評価

CPF-ZrP (x3) を 5 wt% 含有するボンディングレジンプレート (直径 10 mm、厚さ 2 mm) を作製し (写真 1)、250 mL の生理食塩水 (0.9 % NaCl) に浸漬処理した。CPF-ZrP 含有レジンプレートの作製には 1 液性市販歯質接着材 (トライエスボンド ND クイック) を用い、浸漬処理では生理食塩水を 2 週間ごとに交換した。CPF-ZrP 含有レジンプレートの生理食塩水への浸漬時間が、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に対する抗菌性に及ぼす影響を調べた (表 1)。レジンプレートの抗菌試験は BHI 寒天培地を用いたディスク拡散法により行い、阻止円直径により抗菌性を評価した。その結果、生理食塩水への浸漬時間が 4 週間までは明らかな抗菌性を示したが、浸漬時間が 6 週間以上では抗菌性は認められなかった。



写真 1 CPF-ZrP (x3) 含有レジンプレート

表 1 CPF-ZrP (x3) の *S. mutans* に対する抗菌試験

浸漬時間	0 週	2 週	4 週	6 週	8 週	10 週
阻止円直径 (mm)	13	14	11	10	10	10

プレート直径は 10 mm。阻止円直径 10 mm は抗菌性がないことを示す。

(4) 抗菌性が失活した CPF-ZrP 含有ボンディングレジンプレートへの CPF リチャージ

表 1 の結果を踏まえて、生理食塩水中での 12 週間浸漬処理で抗菌性を失活させた CPF-ZrP 含有ボンディングレジンプレート (直径 10 mm、厚さ 2 mm) を作製し、このレジンプレートを 0.45 mol/L CPF 溶液に 9 時間浸漬して CPF リチャージを試みた。再度、生理食塩水に 2 週間浸漬処理し、(3) と同じ方法で *S. mutans* に対する抗菌性を評価した (表 2)。生理食塩水は 1 週間ごとに交換した。その結果、少なくとも 2 週間は抗菌性を維持していることがわかった。CPF が容易に溶解することを考慮すると、CPF 溶液を用いたリチャージ処理により、CPF は ZrP の層間に再挿入されていると考えられる。

表 2 CPF をリチャージした CPF-ZrP (x3) の *S. mutans* に対する抗菌試験

浸漬時間	0 週	1 週	2 週
阻止円直径 (mm)	13	14	11

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshihara K, Nagaoka N, Makita Y, Yoshida Y, Van Meerbeek B.	4. 巻 13
2. 論文標題 Long-Term Antibacterial Efficacy of Cetylpyridinium Chloride-Montmorillonite Containing PMMA Resin Cement.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1495-1507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano13091495.	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

1. 著者名 Yamamoto Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Van Meerbeek B, Yoshida Y	4. 巻 38
2. 論文標題 Novel composite cement containing the anti-microbial compound CPC-Montmorillonite.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 33-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2021.10.009	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 該当する

1. 著者名 Kumiko Yoshihara, Noriyuki Nagaoka, Aya Umeno, Akinari Sonoda, Hideki Obika, Yasuhiro Yoshida, Bart Van Meerbeek and Yoji Makita	4. 巻 14
2. 論文標題 Antibacterial Effect of Amino Acid-Silver Complex Loaded Montmorillonite Incorporated in Dental Acrylic Resin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1442-1451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma14061442	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎田 洋二
2. 発表標題 抗菌性歯科材料の開発
3. 学会等名 先端工学研究発表会2020
4. 発表年 2020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	吉原 久美子 (Yoshihara Kumiko) (90631581)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	長岡 紀幸 (Nagaoka Noriyuki) (70304326)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	杉浦 悠紀 (Sugiura Yuki) (70755040)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	吉田 靖弘 (Yoshida Yasuhiro) (90281162)	北海道大学・歯学研究院・教授 (10101)	

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