

令和元年5月30日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11620

研究課題名(和文)再石灰化促進作用を有する高機能性フィラーの開発と歯科材料への応用

研究課題名(英文) Development of highly functional filler with remineralization promoting action and its application to dental materials

研究代表者

小比賀 秀樹 (Obika, Hideki Obika)

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

研究者番号：90356741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：根面う蝕における辺縁漏洩や2次う蝕などを防止するための機能性歯科材料を開発するために、Ca、リン酸および抗菌成分をリリースする各種無機フィラーを添加したメタクリレート樹脂を製作し、人工体液中におけるアパタイト形成およびミュータンスに対する抗菌性を調べた。Caリリース用フィラー(バイオガラス)の添加量が高いほどアパタイト形成が促進された。アパタイトの形成は、リン酸リリース用フィラーのみの添加でも観察された。バイオガラスおよび抗菌成分リリース用フィラー(CPC担持モンモリロナイト)を添加したメタクリレート樹脂はミュータンスに対して明らかな抗菌性を示し、バイオフィームは形成されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根面う蝕は、う蝕になりやすい歯根が露出することが主な原因で発生する中～高齢者に特徴的な口腔疾患の1つである。本研究では、根面う蝕の修復治療に使用される歯科補綴材料に、う蝕原因菌の増殖を抑え、歯の再石灰化を促す効果を付加するために、抗菌成分(塩化セチルピリジニウム(CPC：C₂₁H₃₈NC₁、和光純薬(株)))と再石灰化促進成分(カルシウム、リン酸)を持続的に徐放する無機フィラーを開発し、歯科材料に応用する。CPC、カルシウムおよびリン酸を徐放する無機フィラーを用いることにより、唾液やCPC配合製品(歯磨剤や洗口剤)を用いた口腔ケアから、有効成分の再挿入(リチャージ)が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Methacrylate resin moldings compounding some kinds of inorganic fillers were prepared for imparting antimicrobial property against pathogens to resins by releasing cetylpyridinium chloride (CPC) and for promoting recalcification by releasing Ca and/or phosphate on marginal region of dental restoration.

The resin moldings containing 40 wt% of 2 kinds of fillers, bioglass and phosphate adsorbent were prepared at the different weight ratio of fillers. When the moldings were immersed in simulated body fluids for 24 hours, the apatite-like crystals formed on the surface area at the molding compounding only phosphate adsorbent and they formed on the large surface area at the molding compounding high content of bioglass.

A resin molding containing 30 wt% of bioglass and 10 wt% of CPC intercalated montmorillonite showed antimicrobial property against *Streptococcus mutans* clearly and no biofilm formation was observed on the surface of the molding after the antimicrobial property testing.

研究分野：醗酵工学

キーワード：根面う蝕 無機フィラー 再石灰化 抗菌性 無機イオン交換体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

根面う蝕は、中～高齢者に特徴的な口腔疾患の1つであり、加齢に伴って歯肉が下がり、う蝕になりやすい歯根が露出することが主な原因である。近年、う蝕治療を必要とする高齢者数が急増している。これは、高齢化社会に伴う歯周病患者の増加に加え、8020運動の推進による高齢者の残存歯数が増加したことが要因とされる。高齢者人口は今後も増加傾向にあり、根面う蝕治療を必要とする高齢者数の増加が予想されている。初期根面う蝕の場合には、積極的なう蝕部位の切削、修復材料の充填を行う治療よりは、フッ化物を用いた再石灰化により進行を抑制し、う蝕を管理することが多い。一方、根面う蝕が大きい場合は、充填修復治療が必要となる。通常、エナメル質のう蝕治療と同様にコンポジットレジンが用いられるが、う蝕が歯肉縁下におよび、防湿が困難なことも多く、その場合にはグラスアイオノマーセメントの使用が推奨されている。グラスアイオノマーセメント修復は、コンポジットレジン修復と比較して、歯質に対する接着強さは低いものの、2次う蝕、辺縁適合性の評価において、両者に有意差はないとされている。しかしながら、コンポジットレジンでもグラスアイオノマーセメントでも2次う蝕を防ぐことはできず、再石灰化を促進するなど根面う蝕に効果的な材料の開発が求められている。

本研究では、根面う蝕の修復治療に使用されるグラスアイオノマーセメントに、う蝕原因菌の増殖を抑え、歯の再石灰化を促す効果を付加するために、抗菌成分（塩化セチルピリジニウム（CPC： $C_{21}H_{38}NCl$ 、和光純薬（株）））と再石灰化促進成分（カルシウム、リン酸）を持続的に徐放する無機フィラーを開発し、歯科材料に応用する。

CPC、カルシウムおよびリン酸を徐放する無機フィラーには、これらの有効成分を選択的に捕捉する3種類の無機イオン交換体を使用する。無機イオン交換体の可逆的な吸脱着反応により、唾液やCPC配合製品（歯磨剤や洗口剤）を用いた口腔ケアから、有効成分の再挿入（リチャージ）が期待できる。また、口腔環境の変化（口腔内のpH変化）に応じてこれらの有効成分が徐放するため、半永久的な二次う蝕抑制と再石灰化促進効果が期待できる。さらに、初期硬化後のグラスアイオノマーセメントは、唾液中のカルシウムを取り込み、強固になることが知られている。開発するカルシウム担持無機イオン交換体は、充填後にカルシウムを徐放し始めるため、初期硬化性能の向上が見込め、硬化体の高強度化が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、根面う蝕における辺縁漏洩や2次う蝕などの問題を解決するために、う蝕原因菌の増殖を抑え、歯の再石灰化を促す効果を付加するための3種類の無機フィラーを開発する。

抗菌効果発現（CPCリリース）用無機フィラー

再石灰化促進（リン酸リリース）用無機フィラー

再石灰化促進（カルシウムリリース）用無機フィラー

これらの無機フィラーからの機能成分（CPC、リン酸、カルシウム）の溶出性を調べるとともに、無機フィラー添加歯科材料の機能性（再石灰化促進効果および抗菌性）を評価した。

3. 研究の方法

(1) 各種無機フィラーの合成および機能成分の溶出性評価

抗菌効果発現用無機フィラーは、イオン交換反応および疎水の相互作用を利用して層状無機化合物の層間に抗菌成分を挿入して合成した。層状無機化合物には、クニミネ工業（株）製のNa型モンモリロナイト（製品名：クニピアF）を用い、抗菌成分としては、和光純薬（株）製の塩化セチルピリジニウム（CPC）を用いた。

再石灰化促進用無機フィラーには、リン酸とカルシウムをそれぞれリリースするための無機フィラーを用いた。リン酸リリース用無機フィラーは、Zrで修飾したマグネシウム鉄層状複水酸化物（ $MgFeZr-LDH$ ）を文献（R. Chitrakar et al., *J. Colloid Int. Sci.*, **349**, 314 (2010)）に記載の方法に従って合成し、リン酸溶液に浸漬しリン酸を吸着させた。カルシウムリリース用無機フィラーは、カルシウム溶出性の無機フィラーとして歯科材料としても一般に用いられる市販のバイオグラス（G018-144）、ウオラストナイト（KAP_150）、セピロライト（P-200W）の3種類を用いた。

各種無機フィラーからのCPC、リンおよびカルシウムの溶出性は、蒸留水またはNaClとNaOHの混合溶液中に各種無機フィラーを添加し、溶出した各成分濃度の経時変化を調べ評価した。溶液中のCPC、PおよびCa濃度は、それぞれ紫外可視分光光度計(UV)、Hachモリブデンブルー吸光度法およびICP-OESにより測定した。

(2) 再石灰化促進用無機フィラーを添加した歯科材料における再石灰化促進効果

再石灰化促進効果は、人工体液中に無機フィラーを添加した歯科材料成形体を人工体液中に浸漬し、サンプル表面に形成したアパタイトを走査電子顕微鏡(SEM)で観察して評価した。本研究は、グラスアイオノマーセメントに機能性を付与するための無機フィラーを開発することが目的であるが、グラスアイオノマーセメントに含まれるフルオロアルミノシリケートガラスの影響を受けず試作の無機フィラーのみ検討するため無機フィラーを樹脂に添加し硬化させたもので評価することとした。そこで本研究では、均一分散が容易メタクリレート樹脂(UDMA: Urethan dimetacrylate、HEMA: Hydroxyethyl metacrylate)に無機フィラーを添加した後、光

硬化させた樹脂サンプルを用いて評価した。なお、人工体液は、文献(Cho et al., *J. Am. Ceram. Soc.*, **78**, 1769-1774 (1995))の方法で調整したものを使用した。

まず、3種類のカルシウムリリース用無機フィラーのうち、再石灰化促進効果が最も高いフィラーを選定し、次に、リン酸リリース用無機フィラーとカルシウムリリース用無機フィラーの添加量を変えて樹脂サンプルを作製し、人工体液中でのアパタイト形成能をSEM観察により評価した。

(3) 抗菌効果発現用無機フィラーを添加した歯科材料における抗菌性

抗菌試験は、*Streptococcus mutans* 菌液に樹脂成形体を添加し、37℃で48時間後の培地の濁度変化により抗菌活性を評価した。また、抗菌試験後の成形体表面をSEM観察し、*Streptococcus mutans* の付着性を評価した。

4. 研究成果

(1) 各種無機フィラーの合成および機能成分の溶出性評価

CPCリリース用無機フィラー

60℃に加熱した蒸留水中でNa型モンモリロナイト(Na-Mont)を添加・攪拌し、Na-Mont懸濁液を調整した。また、懸濁液中のNa-Montの陽イオン交換容量(115 meq/100 g)の5倍のモル量の塩化セチルピリジウム(CPC)を含む水溶液を調整した。CPC担持モンモリロナイト(CPC-Mont)は、Na型モンモリロナイト懸濁液をCPC水溶液にゆっくりと添加し、24時間攪拌し、遠心分離で固液分離・水洗・乾燥して得た。得られたCPC-Montを粉砕し、これをCPCリリース用無機フィラーとした。

Na-MontおよびCPC-MontのXRD測定を行った結果、底面間隔は1.26 nmから4.16 nmに増加した。モンモリロナイトのアルミノシリケート層の厚みが0.97 nmであることを考慮すると、これは、層と層の間の距離は、0.29 nmから3.19 nmに広がったことを示している(図1)。

Na-MontおよびCPC-Montの熱分析を行い、1000℃までの重量減少率を測定した結果、CPC-Montは60%であった。Na-Montの重量減少率と陽イオン交換容量を考慮してCPC-Mont組成を計算すると、アルミノシリケート層が41 wt%、セチルピリジニウムイオン(CP+)が15 wt%、CPCが44 wt%となった。

CPC-MontのCPC溶出性は、蒸留水中を用いて評価した。ガラスカラム内に蒸留水(5 mL)およびCPC-Mont(23 mg)を添加・振とうし、2日ごとに溶液を全量回収・交換し、回収溶液中のCPC濃度を紫外可視分光光度計(UV)で測定した(図2)。その結果、CPC溶出量は経過日数につれて減少した。10日間のCPC-Mont 1 mgあたりのCPC溶出量は0.36 mgとなり、CP+およびCPCを合わせた含有率(59 wt%)の約60%が10日間で溶出した。

リン酸リリース用無機フィラー

MgFeZr-LDHは、1 mol/LのMgCl₂とFeCl₃、0.5 mol/LのZrOCl₂の水溶液を、Mg/(Fe+Zr)のモル比3(Fe/Zr=1)の割合で蒸留水中に滴下し、共沈反応により合成した。その際、反応槽のpHは1 mol/LのNaOHを用いて10に維持した。このMgFeZr-LDH粉末(2.0 g)をP濃度850 mg-P/LのNaH₂PO₄溶液(200 mL)に24時間マグネティックスターラーで攪拌し、リン酸を吸着させ、メンブランフィルターでろ過した。この操作を3回繰り返した。溶液中のリンの濃度変化から求めた吸着量は396 mg-PO₄/gとなり、これをリン酸リリース用無機フィラーとした。(以下MgFeZr-LDH(P)と略す)

MgFeZr-LDH(P)のリン酸溶出性においては、蒸留水および0.1 M NaCl+0.05 M NaOH溶液を用いて評価した。培養チューブ内に、MgFeZr-LDH(P)(0.2 g)および溶液(40 mL)を添加し、25℃で振とうし、1日おきに培養チューブを振って懸濁状態にし、

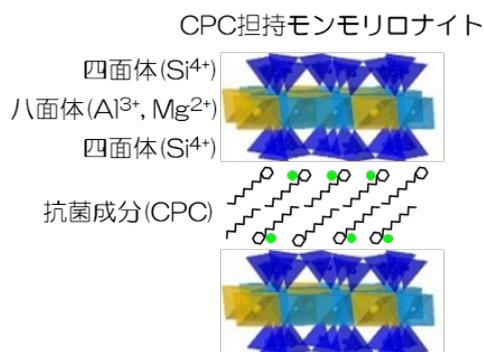


図1 CPCリリース用無機フィラー

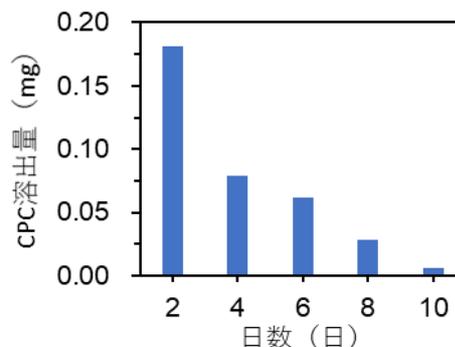


図2 蒸留水中におけるCPC-Mont 1 mgあたりのCPC溶出量

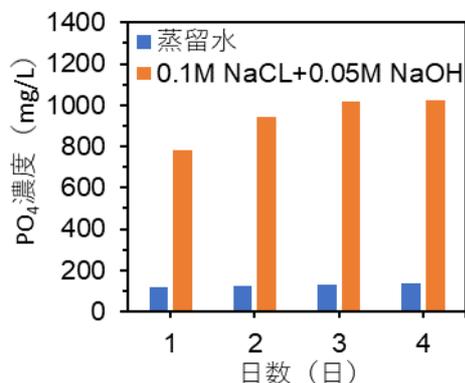


図3 リン酸イオン濃度の経時変化

3000 g の遠心操作を行った後、上清を 2 mL をサンプリングし、注射器用フィルター(0.45 μ m)でろ過した。ろ液中のリン酸イオン濃度の経時間変化を図 3 に示す。0.1 M NaCl+0.05 M NaOH 溶液中のリン酸イオン濃度は、1 日目でも蒸留水中の濃度と比較して 6 倍以上高かった。MgFeZr-LDH は陰イオン交換体であることから、リン酸イオンの溶出は主に OH⁻ との交換によるものと考えられる。0.1 M NaCl+0.05 M NaOH 溶液では 3 日目ではほぼ平衡に到達した。4 日目のリン酸濃度は 1025 mg-P₀₄/L となり、使用した MgFeZr-LDH(P)中のリン酸の 52 %に相当する。

カルシウムリリース用無機フィラー

カルシウム溶出性の無機フィラーとして歯科材料としても一般に用いられる市販のバイオガラス、ウオラストナイト、セピロライトのカルシウム溶出性は、蒸留水を用いて評価した。それぞれの粉末サンプルを固液比 100 として蒸留水中に分散させ、25℃ で 24 時間振とうした後、粉末をろ過した上清に含まれるカルシウム濃度を ICP-OES にて測定した(表 1)。その結果、バイオガラスでは上清の pH が高い値(11.3)を示したが、Ca イオン濃度は 30.6 mg/L となり、ウオラストナイト(9.1 mg/L)およびセピロライト(3.7 mg/L)に比べて高かった。

表 1 上清中の Ca イオン濃度

無機フィラー	Ca 濃度 (mg/L)	pH
バイオガラス	30.6	11.3
ウオラストナイト	9.1	7.7
セピロライト	3.7	7.9

(2) アパタイト形成に好適な無機フィラーの検討

リン酸リリース用無機フィラー(MgFeZr-LDH(P))、カルシウムリリース用無機フィラーおよび液材(UDMA、HEMA)を混練し、その混練物をシリコン樹脂モールドに流し込み、光照射によりメタクリレート樹脂を成形した。この際、好適なカルシウムリリース用無機フィラーを選定するために、カルシウムリリース用無機フィラーの種類を変えて樹脂サンプルを作製した。

UDMA : HEMA : MgFeZr-LDH(P) : バイオガラス = 47 : 33 : 10 : 10

UDMA : HEMA : MgFeZr-LDH(P) : ウオラストナイト = 47 : 33 : 10 : 10

UDMA : HEMA : MgFeZr-LDH(P) : セピロライト = 47 : 33 : 10 : 10

樹脂サンプルを人工体液中で 1 週間反応させ、反応後のサンプル表面を SEM 観察し、アパタイト生成の有無を調べた。その結果、バイオガラスを添加したサンプルの表面にはひげ状のアパタイト様物質が観察された(図 4)。一方、ウオラストナイトおよびセピロライトでは観察されなかった。このことから、今回使用した 3 種類のカルシウムリリース用無機フィラーの中で、バイオガラスが最も再石灰化促進効果を示すことがわかった。バイオガラスのアパタイト形成能が高いことは、表 1 に示されるように、ウオラストナイトおよびセピロライトよりもバイオガラスのカルシウム溶出性が高いためと推測される。

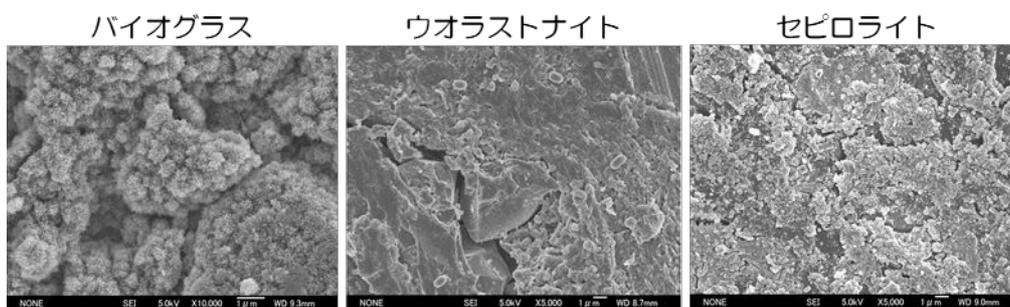


図 4 アパタイト形成におけるカルシウムリリース用無機フィラーの影響

次に、MgFeZr-LDH(P)とバイオガラスそれぞれの好適な添加率を明らかにするために、各無機フィラーの添加量を変えて樹脂サンプルを作製し、37℃ の人工体液中に 1 週間浸した後、アパタイト形成の有無を調べた。樹脂サンプル成型時の原料の混合比は、表 2 に示した。その結果、添加した無機フィラーに関係なくアパタイト様物質が観察された(図 5)。しかしながら、P/Ca=0.00 および P/Ca=0.26 では、樹脂サンプル表面の全面にアパタイト様物質が観察されたが、P/Ca=0.51、P/Ca=0.72、P/Ca=0.99 の順にアパタイト様物質が形成された面積が小さくなった。この結果より、バイオガラスの添加量が多いほど、アパタイト様物質が形成されやすいことが示唆された。

表 2 樹脂サンプル原料の混合比

サンプル名	UDMA (wt%)	HEMA (wt%)	バイオガラス (wt%)	MgFeZr-LDH(P) (wt%)
P/Ca=0.00	35	25	40	0
P/Ca=0.26	35	25	29.6	10.4
P/Ca=0.51	35	25	19.6	20.4
P/Ca=0.72	35	25	11.2	28.8
P/Ca=0.99	35	25	0.4	39.6

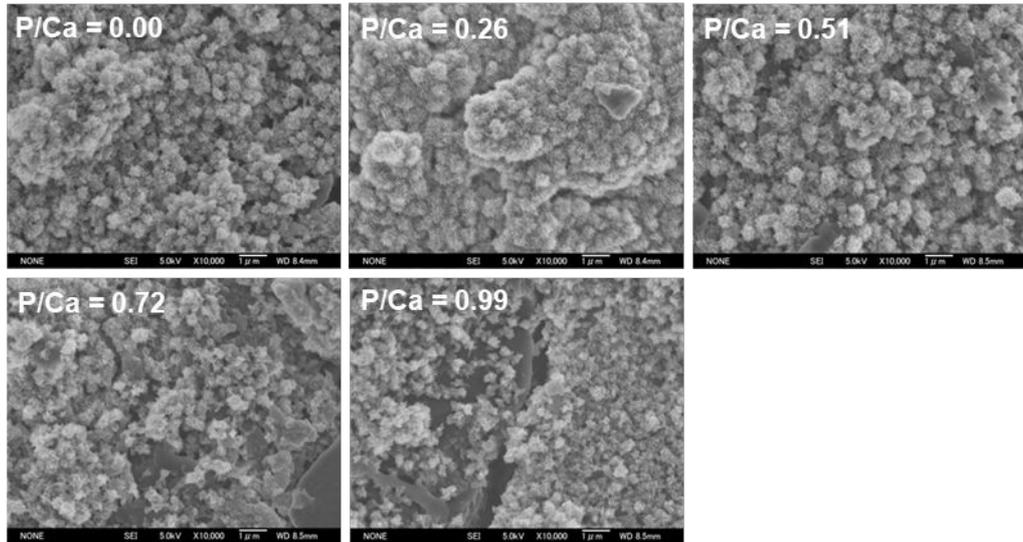


図5 アパタイト形成におけるMgFeZr-LDH(P)とバイオガラスの混合比の影響

(3) *Streptococcus mutans* に対する抗菌活性

バイオガラス、CPC-Mont および液材 (UDMA、HEMA) を混練し、その混練物をシリコン樹脂モールドに流し込み、光照射によりメタクリレート樹脂を成形した。また、抗菌効果の比較のために、CPC-Mont 未添加の成形体も作製した。樹脂サンプルの原料のUDMA、HEMA、Bioglass および CPC-Mont は以下の重量比で混合した。

UDMA : HEMA : バイオガラス : CPC-Mont = 35 : 25 : 30 : 0

UDMA : HEMA : バイオガラス : CPC-Mont = 35 : 25 : 30 : 10

抗菌試験における菌液の濃度変化を図6に示す。CPC-Mont 未添加 (バイオガラスのみ添加) の樹脂成形体では、Control とほぼ同じ濁度を示し、ほとんど抗菌性を示さなかった。一方、CPC-Mont 添加 (バイオガラスおよび CPC-Mont 添加) 成形体では、菌の増殖が抑制された。48時間後の樹脂成形体表面の SEM 像 (図7) を見ると、CPC-Mont 未添加の樹脂成形体の表面は *mutans* 密集しバイオフィームが形成しているのに対して、CPC-Mont 添加樹脂成形体の表面には全く附着しておらず、菌液の濁度測定における抗菌試験の結果と一致した。また、いずれの成形体においてもアパタイトは観察されなかったが、抗菌試験に使用した液体培地に含まれるリン酸とカルシウム濃度が人工体液に含まれるものの濃度以下であったためと考えられる。

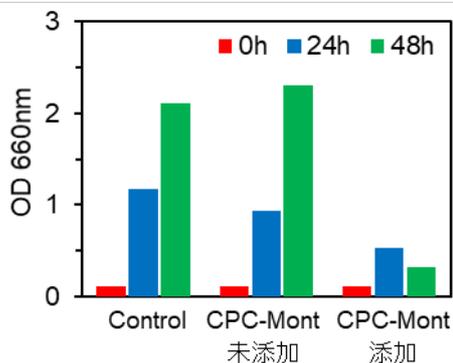


図6 樹脂成形体の抗菌活性

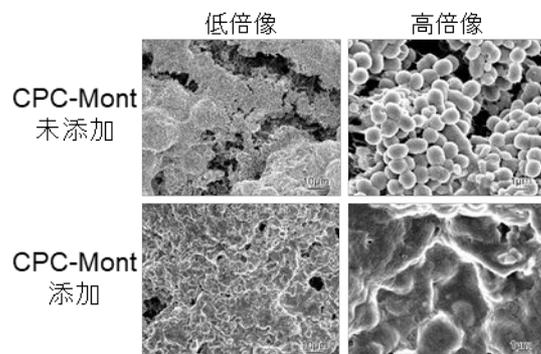


図7 樹脂成形体のSEM観察

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計0件)
〔学会発表〕(計0件)
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：槇田洋二

ローマ字氏名：Makita Yoji

所属研究機関名：産業技術総合研究所

部局名：健康工学研究部門

職名：研究グループ長

研究者番号(8桁)：80357988

研究分担者氏名：長岡紀幸

ローマ字氏名：Nagaoka Noriyuki

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯(薬)学総合研究所

職名：助教

研究者番号(8桁)：70304326

研究分担者氏名：吉原久美子

ローマ字氏名：Yoshihara Kumiko

所属研究機関名：岡山大学病院

部局名：

職名：助教

研究者番号(8桁)：90631581

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。