



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	歯科材料に混合したナノ多孔質シリカからの薬剤徐放能の検討
Author(s)	江良, 裕子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第14149号
Issue Date	2020-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14149
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83882
Type	doctoral thesis
File Information	Yuko_Era.pdf



博 士 論 文

歯科材料に混合したナノ多孔質シリカからの
薬剤徐放能の検討

令和 2 年 6 月 申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

江 良 裕 子

目次

第 1 章	はじめに	- 3 -
1.1	研究の背景	- 3 -
1.2	研究の目的	- 6 -
	参考文献	- 7 -
第 2 章	生体適合性の検証	- 10 -
2.1	序論	- 10 -
2.2	実験	- 11 -
2.2.1	ナノ/マイクロシリカ粒子	- 11 -
2.2.2	SEM および TEM 観察	- 11 -
2.2.3	細胞培養	- 11 -
2.2.4	細胞適合性試験	- 12 -
2.3	結果及び考察	- 12 -
2.3.1	ナノ/マイクロシリカ粒子	- 12 -
2.3.2	ナノ粒子曝露による細胞への影響	- 13 -
2.4	結語	- 13 -
	参考文献	- 15 -
第 3 章	薬剤徐放能の検討	- 23 -
3.1	序論	- 23 -
3.2	実験	- 24 -
3.2.1	試薬	- 24 -
3.2.2	試料片の作成	- 25 -
3.2.3	圧縮強度試験	- 25 -
3.2.4	操作性評価	- 25 -
3.2.5	薬剤徐放性試験	- 26 -
3.3	結果及び考察	- 26 -
3.3.1	圧縮強度試験	- 26 -
3.3.2	操作性評価	- 27 -
3.3.3	薬剤徐放試験	- 27 -
3.4	結語	- 29 -
	参考文献	- 30 -
第 4 章	総括	- 40 -
	謝辞	- 41 -
	利益相反	- 41 -

第 1 章 はじめに

1.1 研究の背景

フィッシャーシーラント(小窩裂溝う蝕予防填塞法)は、清掃困難な小窩裂溝に対し、う蝕に罹患する前に物理的に填塞することによってプラークの停滞を防ぎ、う蝕発生を予防する方法である。この方法は、1924 年に Hyatt が “Prophylactic Odontotomy” [1] を提唱したことから始まり、続いて 1929 年に Bodecker が “The eradication of enamel fissures.” [2] を発表した。これらの方法は健全歯質の削除、二次う蝕などの問題から普及しなかった。1960 年代になると高分子材料の開発が進み、1996 年に竹内 [3] が、1967 年に Buonocore [4] がエッチングによって歯質を酸処理し、合成樹脂を填塞する方法を発表した。このエッチングシステムにより、レジン系シーラント材を用いた小窩裂溝填塞法が急速に発展し、近年では、MMA-MF 共重合体(フッ素徐放性ポリマー)や、S-RPG フィラー(Surface reaction type Pre-Reacted Glass-ionomer filler) [5-6] と呼ばれる技術によりレジン材でありながらグラスアイオノマー相を有するシーラント材が開発され、フッ化物の他、ストロンチウムイオン、ホウ素イオン、アルミニウムイオン、ケイ素イオンを萌出し、フッ化物イオンのリチャージ機能、酸緩衝能、抗菌作用を発揮するバイオアクティブ機能を持ったレジン材が使用されるようになった。

1980 年代には、酸処理を行わないグラスアイオノマーセメントがシーラント材として使用されはじめ、単に封鎖するだけではなく、未成熟な歯質を強化する目的で、徐放性フッ素が添加されたグラスアイオノマーセメントが用いられるようになってきた [7]。

現在用いられているシーラント材は、前述のレジン系とガラスイオノマー系の2種類に大別される。前者は歯面に酸処理を行うため、歯面と填塞材の接着はガラスイオノマーセメントより強固であり、保持率も高い [8] が、酸処理のためラバーダム防湿が必須であるという欠点がある [9]。ガラスイオノマーセメントはレジン系シーラントと比べると機械的強度が脆く、脱離しやすいが生体親和性が高く、酸処理を必要としないため、クランプがかけられない萌出途上臼歯に応用することが可能である [10-13]。

シーラントを必要とする歯の多くは萌出間もない石灰化の不十分な萌出途中の乳臼歯、幼若永久歯であるため、クランプがかけられず簡易防湿下で処置することから、ガラスイオノマー系シーラントを選択する。簡易防湿下での処置は、歯面との十分な接着が得られず、シーラント材の破折や脱離を引き起こすリスクが向上する。そのため、破折したシーラント辺縁や、脱離後に歯面に残留したシーラント周囲にプラークが堆積し、う蝕を誘発することが懸念される。しかしながら萌出途中の乳臼歯や幼若永久歯は石灰化が不十分であり、裂溝形態は深く、複雑である。また、萌出途上歯では、歯冠の一部を被覆する歯肉弁が存在しているため歯垢を除去しにくく、自浄作用も及ぶにくいため最もう蝕になりやすい [14-15]。この時期にガラスイオノマー系シーラントで処置し、セメントから徐放されるフッ化物によるエナメル質の耐酸性の向上に期待し、完全萌出後、レジン系シーラントの填塞が可能になるまで使用したい。

Forss と Halme の研究によるとガラスイオノマー系セメント (Fuji III) を使用した完全保持率は 10.3%、う蝕抑制効果は 7% と報告されている [16]。

う蝕は感染症であり、*S. mutans* は、う蝕の発生に重要な役割を果たす。

S. mutans は母子伝播することが多く、感染を防ぐことは難しい [17]。

これらう蝕原性細菌は飲食物に含まれるスクロースを原料として乳酸を産生して歯質を脱灰する [18]。酸産生能は細菌の数に比例する [19-20]。

つまり口腔内の *S. mutans* などのう蝕原性細菌を減らすことはう蝕の発生を減らすことに繋がる。その方策として日頃の歯磨きが重要であるが、歯磨きで菌の数を減らしても、しばらくすると元通りに戻る [21]。マウスウォッシュなどの抗菌作用も効果は一時的である。市販のうがい薬に含まれる殺菌剤（塩化セチルピリジニウム：CPC）は *S. mutans* など口腔内細菌の殺菌には有効であるが、この薬剤を従来の歯科材料へと含有・塗布しても、口腔内環境へと容易に遊離・拡散してしまい、持続的な効果は得られない [22]。

これらを原因とするう蝕を予防するためには、口腔内で持続的に殺菌剤を徐放可能なシーラント材料が実現出来れば、更なるう蝕予防効果が期待出来ると考えた。持続的な抗菌性を付与した歯科材料として、これまで銀ゼオライトを用いて抗菌効果を付与する研究 [23-24] がおこなわれてきたが、銀により黒変し、審美性に問題を生じる、銀イオンが唾液などに存在するイオンと結びつき失活する、などの問題があり、実用化に至らなかった。また、殺菌剤を歯科材料にそのまま添加する研究 [25] や、ミネラル三酸化物集の生体化学物質を用いた研究 [26] も行われたが、徐放のコントロールが難しく、添加量が増えると物性が低下する。タンニン酸凝集体をテンプレートとして、細孔の直径が数 nm の多孔質材料であるメソポーラスな中空シリカマイクロ粒子を合成し、薬剤モデル化合物の保持量について検討も行われている [27]。

そこで本研究では、ナノ構造を持つ直径数百 nm のナノ多孔質シリカ(NPS)

を薬剤キャリアとして用い、薬剤モデル化合物の徐放挙動を検討した。NPS は表面にナノサイズの細孔が存在し、高い表面積を有する [28]。また、その表面は負電荷に帯電しており、その性状により陽イオンを吸着し、その後徐々に水中の H^+ や Na^+ と交換により吸着イオンを放出する陽イオン交換能を持つ事が知られている [29]。この陽イオン交換能を利用することで、電荷を持つ薬剤を NPS の細孔への導入が可能であり、導入された薬剤は徐放されることが報告されている [30]。

1.2 研究の目的

本研究の目的は、持続的な殺菌剤の徐放によりう蝕予防効果が期待出来る新規歯科用シーラント複合材料の開発である。口腔内で持続的に殺菌剤を徐放可能なシーラント材が実現出来れば、更なるう蝕予防効果が期待出来る。

そこで、持続的にう蝕原因菌を殺菌し得るシーラントが存在すれば、う蝕を予防出来ると考え、多孔質シリカ粒子を用い、薬剤徐放能を持つ新規の歯科用シーラント材の開発を試みた。

参考文献

- [1] Hyatt TP. Prophylactic odontotomy: an operative procedure for the prevention of decay. J Dent Res 1924; 6(4):389-426
- [2] Bodecher C.F. The eradication of enamel fissures. Dent Items Int.1929; 51:859-866
- [3] 竹内光春. 合成樹脂接着材による齲蝕予防填塞法について. 口腔衛生学会雑誌. 1996; 16: 155-128.
- [4] Cueto El, Buonocore MG. Sealing of pits and fissures with an adhesive resin its use in caries prevention. J Am Dent Assoc. 1967; 75: 121-128
- [5] 中塚稔, 出口幹, 根来紀. PRG(Pre-Reacted Glass-ionomer)技術の誕生とそれを応用した製品展開. 日本歯科産業会誌.1998; 21: 62
- [6] Shimazu K, Ogata K, Karibe H. Evaluation of the ion-releasing and recharging abilities of a resin-based fissure sealant containing S-PRG filler. Dent Mater J. 2011; 30: 923-927
- [7] Wilson AD, Groffman DM & Kuhn AT. The release of fluoride and other chemical species from a glass-ionomer cement. Biomaterials. 1985; 6: 431-433
- [8] 葭原明弘, 佐久間汐子, 宮崎秀夫: 第一大臼歯の初期表層脱灰歯面に填塞したガラスアイオノマー系シーラントとレジン系シーラントの有用性の比較. 口腔衛生会誌. 2000; 50: 777-782
- [9] 中村光一. フィッシャーシーラントの現状. 北海道歯誌. 2016; 37: 49-50
- [10] Wilson AD, Prosser HJ & Powis DM. Mechanism of adhesion of polyelectrolyte cements to hydroxyapatite. J Dent Res 1983; 74: 590-592
- [11] Xu X & Burgess JO. Compressive strength, fluoride release and recharge of Fluoride-releasing materials. Biomaterials. 2003; 24: 2451-2641
- [12] Hotz, P., McLean, J. W., Sced, I. and Wilson, A. D. The bonding of glass ionomer cements to metal and tooth substrates. Br. Dent. J.1977; 142: 41-47
- [13] Wilson A.D. Glass-ionomer cement origins, development and future. Clinicat Mater. 1991; 7 (4): 275-282
- [14] 下岡正八: 乳歯・幼若永久歯の特徴, 新小児歯科学, クインテッセンス, 東京,

105－110, 1996

- [15] 祖父江鎮雄, 鈴木俊行, 森脇豊. 幼若永久歯の小窩裂溝部アパタイトの結晶性について. 小児歯科学誌. 1974; 12 : 135－139
- [16] Forss H, Halme E: Retention of a glass ionomer cement and a resin-based fissure sealant and effect on carious outcome after 7 years. Community Dent Oral Epidemiol. 1998; 26(1):21-25
- [17] Caufield P.W., Cutter, G.R., Dasanayaki A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants : evidence for a discrete window of infectivity. J. Dent. Res. 1993; 72(1) : 37-45
- [18] 大嶋 隆: 齲蝕予防のための食品科学. 22-36, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1996.
- [19] Takahashi N., Nyvad B. The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. J. Dent. Res. 2011; 90(3):294-303
- [20] 高橋美如, 尾崎正雄, 今村まり子, 久保山博子, 京極絵美, 本川渉: 乳歯列期小児のカリエスリスク判定に関する研究 齲蝕活動性試験の比較及び応用方法の検討. 小児歯科学雑誌. 2001; 39(1) 13-19
- [21] Nolte W.A.: Oral Microbiology with basic microbiology and immunology, 4th ed. 1982
- [22] Cheng L., Zhang K., Zhang N., Melo M.A.S., Weir M.D., Zhou X.D., Bai Y.X, Reynolds M.A., Xu H.H.K.: Developing a New Generation of Antimicrobial and Bioactive Dental Resins. J. Dent. Res. 2017; 96 : 855-863
- [23] Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M: Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. Dental Mater. 2000; 16(6): 452-455
- [24] Cinar C, Ulusu T, Ozcelik B, Karamuftuoglu N, Yucel, H: Antibacterial Effect of Silver-Zeolite Containing Root-Canal Filling Material. J Biomed Mater Res. B Biomater. 2009; 90B(2): 592-595
- [25] Namba N, Yoshida Y, Nagaoka N, Takashima S, Matsuura-Yoshimoto K, Maeda, H, Van Meerbeek B, Suzuki K, Takashiba S: Antibacterial effect of bactericide immobilized in resin matrix. Dental Materials. 2009; 25(4): 424-430
- [26] Minamikawa H, Yamada M, Deyama Y, Suzuki K, Kaga M, Yawaka Y, Ogawa T: Effect of N-acetylcysteine on Rat Dental Pulp Cells Cultured on Mineral Trioxide Aggregate. J. Endodontics. 2011; 37(5):637-641

- [27] Yao X, Zheng X, Zhang J, Cai K: Oxidation-induced surface deposition of tannic acid: towards molecular gates on porous nanocarriers for acid-responsive drug delivery. *RSC Adv.* 2016; 6(80):76473-76481
- [28] Tagaya M, Ikoma T, Yoshioka T, Motozuka S, Xu Z, Minami F, and Tanaka J: Synthesis and luminescence properties of Eu(III)-doped nanoporous silica spheres. *J Colloid Interface Sci.* 2011; 363(2):456-464
- [29] Bando Y, Nakanishi K, Abe S, Yamagata S, Yoshida Y, Iida J: Electric charge dependence of controlled dye-release behavior in glass ionomer cement containing nano-porous silica particles. *J. Nanoscience and Nanotechnol.* 2018; 18(1): 75–79
- [30] Joshi G.V., Kevadiya B.D., Bajaj H.C: Controlled release formulation of ranitidine-containing montmorillonite and Eudragit (R) E-100. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 2010; 36(9): 1046-1053

第 2 章 生体適合性の検証

2.1 序論

近年の急速なナノテクノロジーの発展により、ナノ粒子はさまざまな分野へと応用展開が進められている[1-3]。たとえば、酸化チタン (TiO_2) ナノ粒子は、光学、エレクトロニクス、化学（触媒反応など）、生物/医用品、および化粧品などへの応用がなされている[4-7]。ナノ粒子の使用の増加により、これらの粒子への人間の曝露は、産業環境および日常環境でも増加している。以前の研究では、粒子サイズが非常に小さい場合、生体適合性材料でさえ炎症を引き起こすことが示唆されている[8-11]。

粒子サイズがナノレベルに達すると、マクロレベルで生体適合性があると見なされた場合でも、それらの一部は *in vitro* で毒性を示す。以前の研究では、Ti や TiO_2 などの生体適合性材料でさえ、サブミクロンからナノレベルの粒子サイズでは炎症を引き起こすことが示唆された[12]。実際、一部の研究者は、ナノサイズの粒子が人間と環境に有害な影響を与える可能性があるとして報告している[13-15]。例えば、異なるサイズの金ナノ粒子をマクロファージへと暴露した場合、粒子径が小さくなると細胞毒性と免疫学的応答が増加するという報告がある[16]。そのため、歯科用材料への応用展開を考えた場合、ナノ・マイクロサイズのシリカ粒子の細胞適合性を理解することは非常に重要である。

そこでナノ多孔質シリカからの薬剤徐放能の研究に先立ち、サイズの異なるナノ・マイクロサイズのシリカ粒子を骨芽細胞様細胞へと曝露し、その生体適合性の検討を行った。

2.2 実験

2.2.1 ナノ/マイクロシリカ粒子

ナノ多孔質シリカ粒子として、北海道大学大学院歯学研究院生体材料工学教室で化学合成した NPS 1 [17]、および市販のナノポーラスシリカ (NPS、Aldrich 社製、St. Louis) NPS 2-4 を用いた。NPS の種類と規格を表 2-1 に示す。また比較のため、 TiO_2 ナノ粒子 (高純度化学社製、東京)、 CuO ナノ粒子 (Aldrich 社製) も用いた。

2.2.2 SEM および TEM 観察

ナノマイクロ粒子の形態観察には走査型電子顕微鏡 (SEM、S-4800、日立社製)、および透過型電子顕微鏡 (TEM、JEM-1400、日本電子社製) を用いた。SEM 観察用試料の導電化前処理には Pt-Pd スパッタ装置 (E-1030、日立社製) を用い、加速電圧 5 kV で観察を行った。TEM 観察は、エタノールへと分散させたナノ粒子をコロジオン膜被覆グリッゴ上に滴下し、一晚静置させた試料を用い、加速電圧 200 kV で行った。

2.2.3 細胞培養

シリカ粒子の細胞適合性を評価するために、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた。液体培地として、10 % FBS、および抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン) を添加した MEM- α (Gibco 社製、Carlsbad) を用い、5 % CO_2 嫌気下、37°C で培養を行った。SEM 観察試料は、2 % グルタルアルデヒド水溶液による固定、酸化オスミウム水溶液による染色、アルコール系列 (50, 70, 80, 90, 95, 98 %, エタノール) を用いた脱水ののち、臨界点乾燥を行い、

Pt-Pd スパッタによる導電化前処理を行った。グルタルアルデヒドは、タンパクのアミノ基などと結合し、立体構造の一部を変形させることにより酵素活性を妨げ、自己分解や腐敗の進行を阻害する。また、架橋反応により組織構造のそれ以上の変形を阻止する事により形状が保存される。SEM 観察は、SEM (S-4800) を使用して、加速電圧 5 kV で行った。

2.2.4 細胞適合性試験

マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1) を 10 %FBS 含有 MEM - α (Gibco) を用いて培養した。これらの細胞を約 1×10^4 細胞 / mL の密度で 24 穴プレートに播種し、5 % CO₂ 嫌気下、37 °C で、48 時間培養した。その後、培地を吸引し、ナノ粒子を各種濃度で分散した新鮮な培地を加えた。24 時間の培養の後、細胞内アデノシン三リン酸レベルを測定する CellTiter-Glo アッセイキット (Promega、Madison、WI、USA) を使用して、細胞活性を決定した。CellTiter-Glo 試薬を培地に加え、2 分間振とうすることで細胞溶解を誘導し、その後、マイクロプレートリーダー (Spectra Max Paradigm、Molecular Devices、東京、日本) を用いて、発光強度を定量化した。

2.3 結果及び考察

2.3.1 ナノ/マイクロシリカ粒子

図 2-1 に、本実験で用いたナノ多孔質マイクロシリカ粒子 (NPS) の典型的な SEM 画像を示す。これらは球形の形状を持ち、直径は各々、NPS1 : 0.3 - 0.5 μm 、NPS2 : 0.5 - 0.8 μm 、NPS3 : 1 μm 、および NPS4 : 2 μm を示した。これらの粒子は、ナノサイズの構造体を持っている。図 2-2 は、NPS のナノ

構造を示す。このナノ構造により、NPS 粒子は非常に大きな表面積 ($> 500 \text{ m}^2/\text{g}$) を持つ[18]。

2.3.2 ナノ粒子曝露による細胞への影響

NPS の細胞適合性を評価するために、NPS 曝露下で MC3T3-E1 細胞を培養した。図 2-3 に示すように、NPS 曝露下 (10 ppm) での MC3T3-E1 は、非曝露下の対照群 (cont.) と同様に、広く伸展し、仮足を延ばして床面に接着している様子が観察された。一方、CuO 曝露下では、細胞表面が粗造になり、床面から剥離している様子が観測された。次いで、曝露濃度の影響を評価するために、さまざまな濃度の NPS を曝露下で MC3T3-E1 細胞を培養した。図 2-4 に示すように、濃度が増加しても、濃度が 30 ppm に達するまで MC3T3-E1 細胞の細胞活性は維持された。この挙動は、 TiO_2 ナノ粒子にさらされた場合とほぼ同じである。対照的に、細胞の生存率は、濃度に応じて CuO ナノ粒子にさらされると劇的に低下した。MC3T3-E1 細胞の場合、NPS 曝露下でもほぼ同じ傾向にある。生存率は、時間依存性の観点でも推定された。図 2-5 に示すように、NPS 暴露下の MC3T3-E1 は 3 日後でも高い生存率を示した。これらの結果は、NPS が優れた細胞適合性を持つことを示している。

2.4 結語

実験では、骨芽細胞様細胞へとサイズの異なるマイクロ/ナノサイズのシリカ粒子を曝露し、その生体適合性、細胞為害性について検討した。今回検討したサブミクロンからマイクロサイズの 4 種類の球状のナノ多孔質シリカ粒子は、いずれのサイズでも優れた細胞適合性を示し、サイズによる適合性の

違いは見られなかった。一方、CuO ナノ粒子は低濃度域から細胞への為害性が見られた。先行研究[19]では、マイクロサイズの CuO 粒子曝露下と比較すると、CuO ナノ粒子はより低濃度から細胞への為害性を示した。これらの結果から、細胞への為害性には化学種の違いに起因するものが支配的であり、サイズ効果は二次的な効果である事が示唆された。

参考文献

- [1] G. Hodes. When Small Is Different: Some Recent Advances in Concepts and Applications of Nanoscale Phenomena *Adv. Mater.* 2007; 19: 639-655
- [2] Burda C, Chen X, Narayanan R, M. A. El-Sayed. Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Rev.* 2005; 105: 1025-1102
- [3] Toshima N, Yonezawa T. Bimetallic nanoparticles-novel materials for chemical and physical applications. *New J. Chem.* 1998; 22: 1179-1201
- [4] Chen D, Qiao X, Qiu X, Chen J. Synthesis and electrical properties of uniform silver nanoparticles for electronic applications. *J. Mater. Sci.* 2009; 44: 1076-1081.
- [5] Mitsudome T, Arita S, Mori H, Mizugaki T, Jitsukawa K, Kaneda K. Supported Silver-Nanoparticle-Catalyzed Highly Efficient Aqueous Oxidation of Phenylsilanes to Silanols. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008; 47: 7938-7940
- [6] Usui H, Sasaki T, Koshizaki N. Optical Transmittance of Indium Tin Oxide Nanoparticles Prepared by Laser-Induced Fragmentation in Water. *J. Phys. Chem. B.* 2006; 110: 12890-12895
- [7] Kim K.Y, Park S.B. Preparation and property control of nano-sized indium tin oxide particle. *Mater. Chem. Phys.* 2004; 86: 210-211
- [8] Yen H, Hsu S and Tsai C. Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small.* 2009; 5: 1553-1561
- [9] Karlsson H, Gustafsson J, Cronholm P. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. *Moller L: Toxicol. Lett.* 2009; 188: 112-118
- [10] Ifkovits J.L. and Burdick J.A. Photopolymerizable and Degradable Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng.* 2007; 13: 2369-2385
- [11] Brunner T, Wick P, Manser P, Spohn P., Grass R, Limbach L, Bruinink A and Stark W. In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40: 4374-4381
- [12] Watari F, Abe S, Koyama C, Yokoyama A, Akasaka T, Uo M, Matsuoka M, Totsuka Y, Esaki M, Morita M and Yonezawa T. Behavior of in vitro, in vivo

- and internal motion of micro/nano particles of titanium, titanium oxides and others. *J. Ceram. Soc. Jpn.* 2009; 116: 1-5
- [13] Colvin V.L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21: 1166-1170
- [14] Veranth J, Kaser E, Veranth M, Koch M and Yost G. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle Fibre Toxicol.* 2007; 4: 1-18
- [15] Lewinski N, Colvin V, and Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small.* 2008; 4: 26-49
- [16] Venkatachalam N, Yamano T, Hemmer E, Hyodo H, Kishimoto H and Soga K. Er³⁺-Doped Y₂O₃ Nanophosphors for Near-Infrared Fluorescence Bioimaging Applications. *J. Am. Ceram. Soc.* 2013; 96: 2759-2765
- [17] Bando Y, Nakanishi K, Abe S, Yamagata S, Yoshida Y, Iida J: Electric charge dependence of controlled dye-release behavior in glass ionomer cement containing nano-porous silica particles. *J. Nanoscience and Nanotechnol.* 18(1): 75-79.2018.
- [18] Tagaya M, Ikoma T, Yoshioka T, Xu Z, Tanaka J. Immobilization of folic acid on Eu³⁺-doped nanoporous silica spheres. *Chem. Commun.* 2011; 47:8430-8432
- [19] Abe S, Iwadera N, Narushima T, Uchida Y, Uo M, Akasaka T, Yawaka Y, Watari F, Yonezawa T.: "Comparison of biodistribution and biocompatibility of gelatin-coated copper nanoparticles and naked copper oxide nanoparticles" *J. Surface Science Nanotechnology*, 10, p33-38 (2012)

表 2-1. NPS の種類と規格

	particle size (μm)	pore size (nm)
NPS1 : 化学合成 (北海道大学)	0.3 - 0.5	4
NPS2 : Aldrich社	0.5	4
NPS3 : Aldrich社	1	4
NPS4 : Aldrich社	3	4

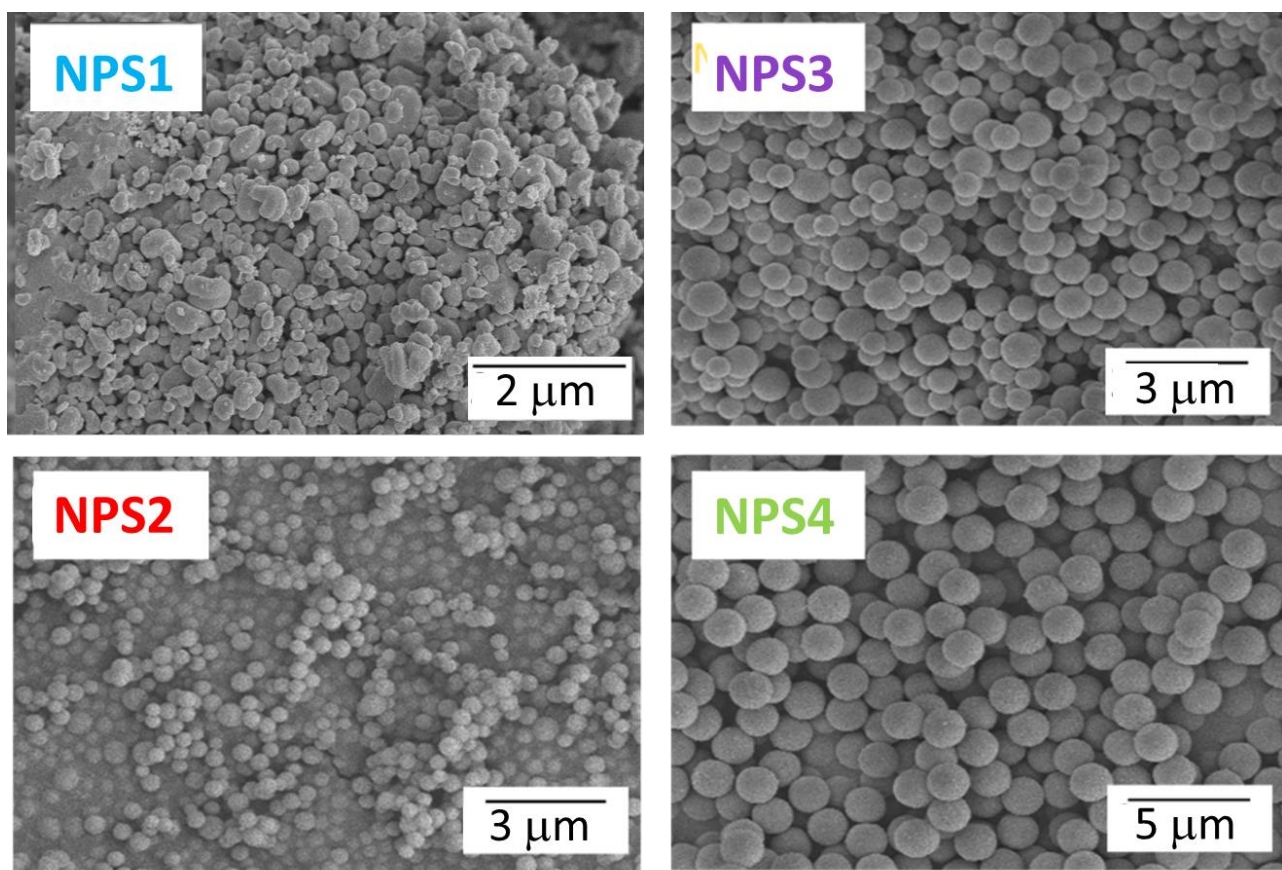


図 2-1 ナノ多孔質シリカの SEM 像

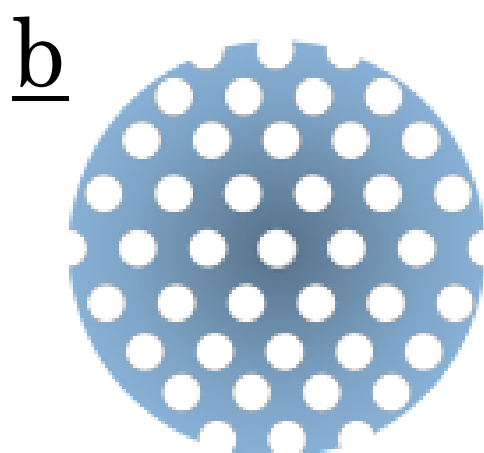
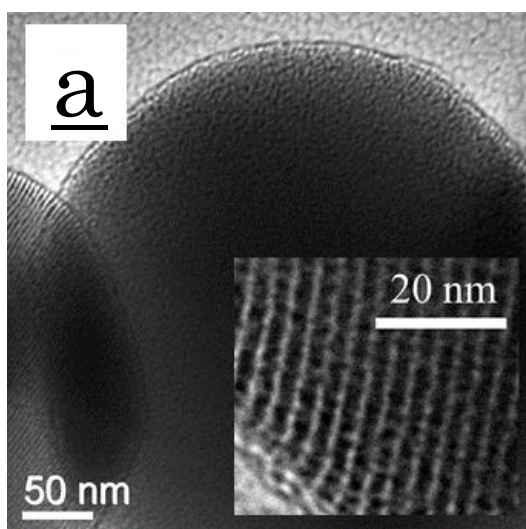


図 2-2 ナノ多孔質シリカの TEM 像(a) および概念図(b)

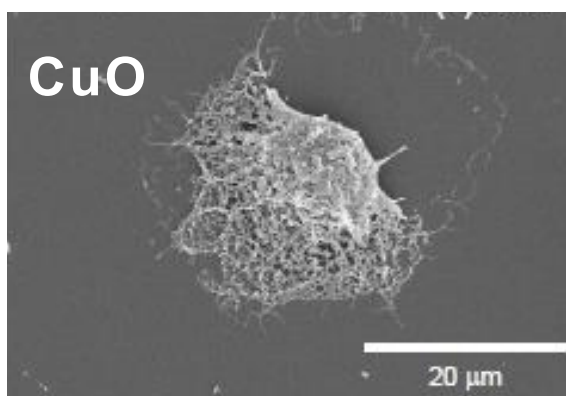
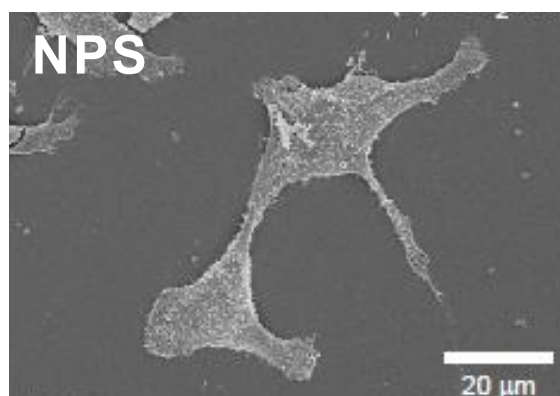
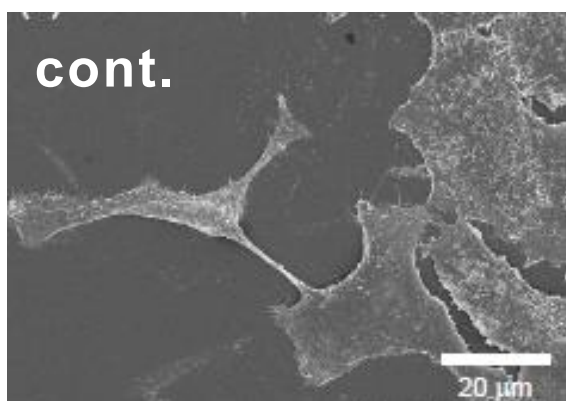


図 2-3 ナノ粒子曝露下での MC3T3-E1 の SEM 像

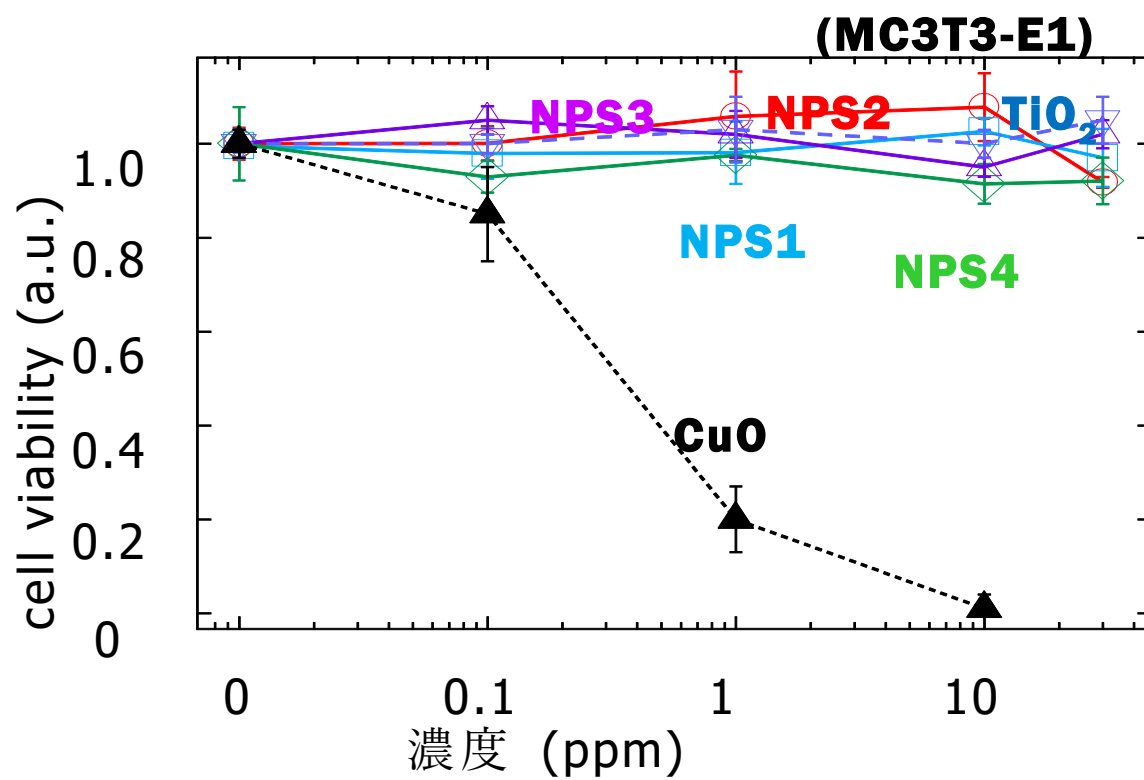


図 2-4 ナノ粒子曝露下での細胞活性の濃度依存性

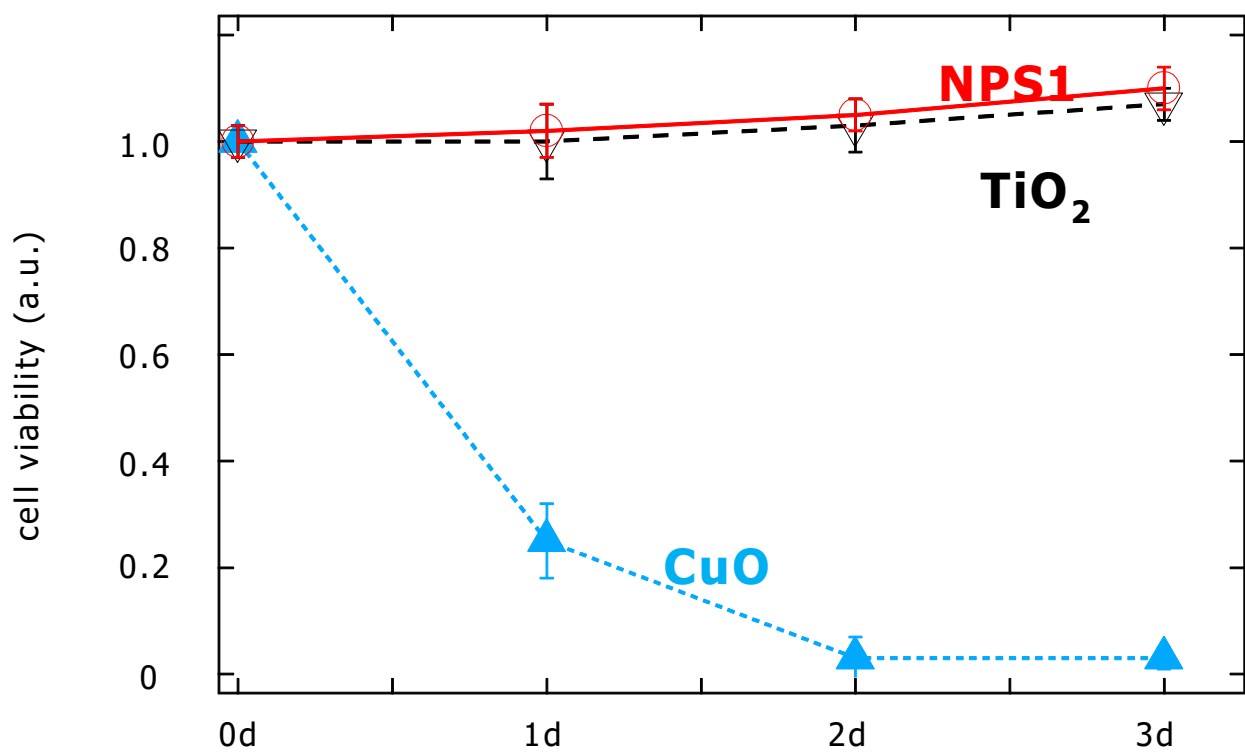


図 2-5 ナノ粒子曝露下での細胞活性の経時変化

第 3 章 薬剤徐放能の検討

3.1 序論

シーラントは、歯ブラシが到達しにくい清掃困難な小窩裂溝を物理的に填塞することによりう蝕を予防する方法であり、臨床において広く用いられている。シーラント処置の前に PMTC 等でプラークを除去するが、機械的な除去だけに頼るのでは限界がある。さらに簡易防湿で行うため、無菌状態でシーラント処置を行うことは不可能である。そこで、持続的にう蝕原因菌を殺菌し得るシーラントが存在すれば、う蝕を予防出来ると考え、ナノポーラスシリカを用い、薬剤徐放能を持つ新規の歯科用シーラント材の開発を試みた。シーラント材はレジン系とグラスアイオノマー系に大別されるが、本実験では、最もう蝕になりやすい萌出途上臼歯に簡易防湿下で 사용할 ことが出来る、グラスアイオノマー系シーラントを選択した。グラスアイオノマー系シーラントには化学重合型と光重合型があるが、化学重合型を選択した。この理由は NPC をグラスアイオノマーセメントの粉部に混入させて試作しようとしたこと、また、光重合器を使用しないため、歯科治療の設備が整備されていない発展途上国においても処置できると考えたからである。

う蝕予防のためにう蝕原性細菌を排除しようという試みは、ペニシリンが実用化されて間もない時期からなされ、バンコマイシンやカナマインシンなどの化学療法薬のプラーク抑制効果や、実際的な応用の可能性を示唆した研究がいくつか発表されている[1]。しかし、これらの化学療法薬を長期に渡り使用すると、その薬剤に感受性のある常在細菌が消え、*C. albicans* が異常増殖する菌交代現象が起こり、口腔カンジダ症等を発症することがある。ま

た、化学療法の進歩により、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）やバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）のように、多くの既存の抗菌薬が効かない耐性菌が出現し、問題となっている。このような薬剤耐性菌の出現は、感染症治療における抗菌薬の安易かつ不規則・不十分な使用が主な原因とされている。黄色ブドウ球菌や腸球菌は本来、病原性のない常在菌であり、MRSA や VRE の感染者の多くは入院中の抵抗力の低下した患者である。このように疾病や投薬などに伴う宿主の免疫力の低下により、病原性の乏しい微生物が感染することを日和見感染という。高齢者や手術直後の患者、免疫抑制薬を服用している患者、糖尿病、HIV 感染者などは特に抗菌薬の適正使用の徹底が重要である[2]。

そこで本研究では、現在口腔内で用いられている安全性の高い「塩化セチルピリジニウム（CPC）」を選択した。この CPC は、陽イオン型界面活性剤で細菌のタンパクや脂質と結合することで殺菌作用を示す[3]。

この CPC を長時間担持・放出するため、徐放可能な薬剤キャリアとして、直径数 nm の細孔を持つ、ナノポーラスシリカ[4]に着目した。ガラスアイオノマーセメントをマトリックスとして、この NPS を混合し、徐放キャリアとしての挙動を検討した。

3.2 実験

3.2.1 試薬

薬剤徐放性を持つ歯科用シーラントの母材として、前述の通り、ガラスアイオノマー系シーラント材（Fuji III、ジーシー社製、東京）を用いた。Fuji III はシーラント材として創られ、流れが良く、従来の製品と比較すると保持

率も向上した[5]。薬剤徐放能を持つナノシリカ粒子として、ナノポーラスシリカ（NPS、Aldrich 社製、St. Louis）を用いた。薬剤徐放挙動の検討のため、薬剤モデル化合物、ローダミン B、メチルバイオレット B、フルオロセイン、エリスロシン（各々、RhB、MVB、Flu、EC、Aldrich 社）を用いた。薬剤徐放試験には、塩化セチルピリジウム（CPC, Aldrich 社）を使用した。各々の化学構造式を図 3-1(a)～(f)に示す。

3.2.2 試料片の作成

Fuji III の粉部に NPS を 0, 3, 5 wt% 混合した粉末を用い、規定の粉液比（粉 1.2g：液 1.0g）で練和し、各試験毎に使用するモールドへと填入し、室温で 5 分静置し、硬化させた。

3.2.3 圧縮強度試験

3.2.2 の要領で練和したシーラント材を、テフロン製割型モールド（ $\phi 10 \times 1 \text{ mm}$ ）へと填入し、圧縮強度試験用試料を各群 3 個ずつ、作成した。硬化後に万能強度試験機（インストロン社製、3366 型）を用い、先行研究に従い[6]クロスヘッドスピード 1 mm/min. で圧縮試験を行った。付属の解析ソフトを用い、試験結果から圧縮強度、および弾性係数を算出した。

3.2.4 操作性評価

歯科医師 3 名、歯科衛生士 6 名、学生 1 名 計 10 名を対象に操作性の評価を行った。

方法は、GIC の粉部に 0wt%、3wt%、5wt% の割合で NPS を配合したものを

セメント A, セメント B, セメント C とし、練和から填塞操作まで一連の操作を顎模型上にて実際に填塞した。その後、「粉と液の親和性」「練和操作」「填塞操作」について質問紙調査を実施した。質問内容は表 3-1 に示す。

解析には Friedman の順位付けによる変数の双方向分析による多重比較を行った。統計処理は、統計解析ソフト SPSS ver25 (IBM 社製) を用い、有意水準は 5% とした。

3.2.5 薬剤徐放性試験

3.2.2 の要領で練和したシーラント材を、シリコン製モールド ($\Phi 10 \times 1 \text{ mm}$) へと填入し、薬剤徐放挙動試験用試料を作成した。硬化後に 1 wt% 薬剤モデル化合物水溶液 (5 mL) へと浸漬した。24 時間後に試料を取り出し、新たな蒸留水 (5 mL) へと浸漬した。24 時間浸漬後に試料を取り出し、新たな蒸留水へと浸漬した。この作業を、2 週間繰り返した。得られた上澄液中へと放出された薬剤モデル化合物の濃度は、紫外可視吸光光度計 (V-650、日本分光) を用いて計測した。これらの実験操作の概要を図 3-2 に示す。

3.3 結果及び考察

3.3.1 圧縮強度試験

図 3-3 に、試料片の圧縮試験結果を示す。セメント片は、 $130.1 \pm 2.5 \text{ MPa}$ の圧縮強さを示した。一方、NPS を含有した試験片 (3, 5 wt%) は、各々圧縮強度 124.9 ± 27.5 , $151.1 \pm 48.0 \text{ MPa}$ を示し、NPS 含有による圧縮強度には、有意な差は見られなかった。弾性係数についても、NPS 含有による有意差は認められなかった (各々、0 wt%: $4.2 \pm 0.1 \text{ GPa}$, 3 wt%: $3.9 \pm 0.4 \text{ GPa}$,

5 wt%: 4.4 ± 0.4 MPa) (図 3-4)。

NPS の含有による試料片の機械的強度への影響は見られなかった。ガラスアイオノマーセメントは Si, Al, O, 及び F を主成分とするフルオロアミノシリケートガラスが用いられている。NPS はガラスフィラーに類似の化合物 (SiO_2) であり、かつそのサイズはサブミクロンサイズのフィラーと類似している。そのため、今回の添加濃度 (5 wt%) では、機械的強度への影響が見られなかったと考えられる。

3.3.2 操作性評価

操作性についての被験者の各評価を表 3-2、図 3-5(a)～(c)に示す。粉と液との親和性については、3 wt% 混合試料と 5 wt% 混合試料との評価の間に有意差が見られたが、0 wt% 混合試料との間には評価に有意差は見られなかった。5 wt% 混合試料については、「抵抗を感じる」というコメントも得られた。練和操作性については、0 wt% 混合試料では「ダメになる感じがした」というコメントが、一方、5 wt% 混合試料では「広げやすく、纏めやすい」というコメントがあったが、各試料間の評価に有意差は見られなかった。充填操作性については、3 wt% 混合試料では「少し硬い感じがした」、「軟らかくて流れる」というコメントが、5 wt% 混合試料では「(填塞してから) 硬化するまでの時間が長い」というコメントがあったが、こちらも各試料間の評価に有意差は見られなかった。

3.3.3 薬剤徐放試験

図 3-6 に、用いた薬剤モデル化合物 MVB, EC 水溶液の吸収スペクトルを示

す。MVB は、580 nm、EC は、525 nm に各々、吸収ピークを持つ。試料浸漬により溶出した薬剤モデル化合物の上澄液への溶出量を確認するため、各日の上澄み液の吸収スペクトルを測定し、その変化を経時的にプロットした(図 3-7)。色素溶液から取り出した直後の第 1 日目の上澄液には、試料に非特異的に吸着した色素分子の溶出も含まれるため、得られた吸光度を 2 日目の吸光度を用いて規格化した。

図 3-8 には CPC 水溶液の吸収スペクトルを示す。CPC は、260 nm に吸収ピークを持つ。また、CPC の徐放の経時的な挙動をプロットした結果を図 3-9 に示す。NPS を含有した試料からは 2 週間にわたる色素の徐放が確認された。一方、NPS を含有しない試料の場合、徐放量は 1 週間程度で検出限界以下に到達した。

セメント試料からの薬剤モデルの徐放挙動を観察したところ、MVB 溶液へと浸漬した NPS 含有試料片からは、2 週間にわたる薬剤モデルの徐放が認められた。NPS を含有しないセメント試料片を用いた場合には、数日間の徐放で上澄液へと徐放された薬剤モデルは検出限界以下に到達した。一方、EC の場合、NPS を含有していても、上澄液へと徐放された薬剤モデルの量は、数日の内に検出限界以下に到達した。このことは、NPS の存在が、MVB の吸着・徐放に寄与していることが示唆される。本実験で用いた MVB と EC とは、各々異なる電荷を持つ事が知られており、徐放挙動の違いは薬剤モデル化合物の電荷の違いによるものと考えられる。シリカの表面は負電荷に帯電している事が知られており [7-8]、本実験で用いた NPS はナノメートルサイズの細孔を持つナノ構造のため、非常に大きな表面積を有している [9]。それゆえ、正電荷を持つ MVB がこの NPS 表面へと静電的に吸着し、水中で徐々に解離・放

出されるため[10]、長期間にわたる徐放挙動を示したと考えられる。正電荷を持つ殺菌剤 CPC においても、MVB と同様の徐放挙動が観察されたのも、この機構によるものと考えられる。

3.4 結語

ナノサイズの細孔を持つシリカナノ粒子 NPS を歯科用シーラント材へと含有させ、NPS の薬剤徐放能を検討した。本実験で検討した含有濃度(5 wt%)では、シーラント材の機械的強度や操作性への影響は見られなかった。NPS 含有シーラント試料は、正電荷を持つ化合物を特異的に吸着・徐放する事が示され、蒸留水中への徐放は2週間にわたり観察された。この挙動は、典型的な殺菌剤として知られる CPC においても観察された。これらの結果は、NPS の含有による薬剤徐放性を持つ新規な歯科用シーラント材の開発への展開が期待される。

参考文献

- [1] 浜田茂幸, 古賀敏比古: う蝕の細菌学と生化学. 化学と生物, Vol 19. No.11 695-705.1981
- [2] 梶隆一: 糖尿病 と日和見感染症 との関連性について的基础的研究. 日本口腔科学会雑誌. 1988; 37(2):409-424
- [3] Sutch, J.C.D., Pinney R.J., Wilson M. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilm to oral antiseptics. Pharmaceutical Science. 1995; 1: 395-398
- [4] Yao X, Zheng X, Zhang J, Cai K. Oxidation-induced surface deposition of tannic acid: towards molecular gates on porous nanocarriers for acid-responsive drug delivery. RSC Adv 2016; 6(80): 76473-76481
- [5] Inoue S, Komatsu H, Hirohashi S, Kobayashi Y, Ikeda T, Yoshimura M, and Shimokobe H. Retention Rates of Improved Glass-ionomer Sealant. J Dent Res(IADR Abstracts). 1995; 74:433(262)
- [6] Nakamura K, Abe S, Minamikawa H, and Yawaka Y. Calcium Charge and Release of Conventional Glass-Ionomer Cement Containing Nanoporous Silica. Materials. 2018; 11: 1295(1-8)
- [7] Iler RK. The Chemistry of Silica. 73-78.Wiley, New York. 1979
- [8] Bando Y, Nakanishi K, Abe S, Yamagata S, Yoshida Y, Iida J: Electric charge dependence of controlled dye-release behavior in glass ionomer cement containing nano-porous silica particles. J. Nanoscience and Nanotechnol. 2018; 18(1): 75-79
- [9] Tagaya M, Ikoma T, Yoshioka T, Motozuka S, Xu Z, Minami F, and Tanaka J. Synthesis and luminescence properties of Eu(III)-doped nanoporous silica spheres. J Colloid Interface Sci. 2011; 363(2): 456-464
- [10] Horie K, Máximo Barón, Fox RB, He J, Hess M, Kahovec J, Kitayama T, Kubisa P, Maréchal E, Mormann W, Stepto RFT, Tabak D, Vohlídal J, Wilks ES and Work WJ. Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric materials. pure Appl Chem. 2004; 76(4): 889-906

表 3-1 質問紙調査

調査事項	セメント A	セメント B	セメント C
粉と液の親和性	良い・普通・悪い	良い・普通・悪い	良い・普通・悪い
練和操作	良い・普通・悪い	良い・普通・悪い	良い・普通・悪い
填塞操作	良い・普通・悪い	良い・普通・悪い	良い・普通・悪い

良い＝3点、普通＝2点、悪い＝1点として統計処理した。

表 3-2 質問紙調査結果（コメント）

	cont.	NPS3%含有GIC	NPS5%含有GIC
粉と液との親和性	ダメになる感じがした。		粉がキュツとなり抵抗を感じる。
練和操作			広げやすく、纏めやすい。
填塞操作		少し硬い感じがする。 柔らかくて流れる。	填塞してから硬化するまでの時間が長い。

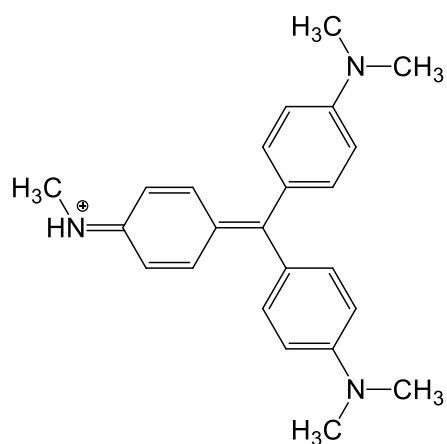


図 3-1 (a) メチルバイオレット B (MVB)

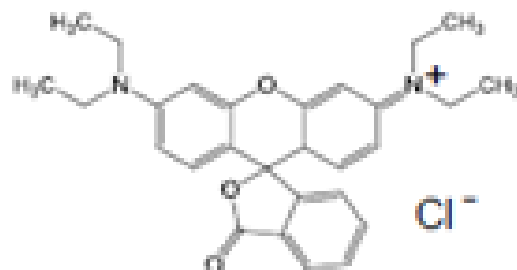


図 3-1 (b) ローダミン B (RhB)

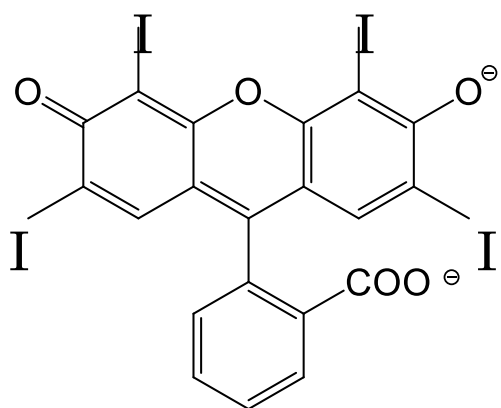


図 3-1 (c) エリスロシン (ES)

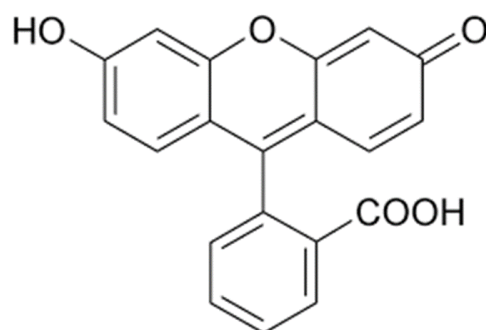


図 3-1 (d) フルオレセイン (FL)

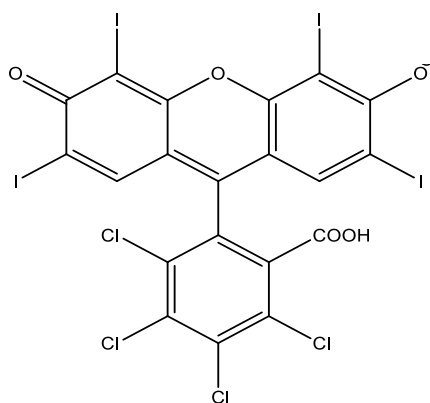


図 3-1 (e) ローズベンガル (RB)

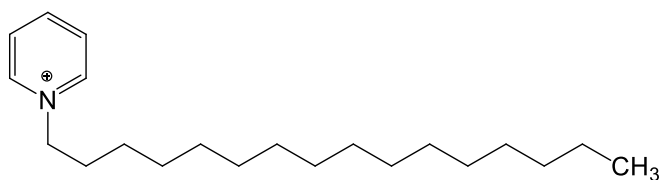


図 3-1 (f) 塩化セチルピリジニウム (CPC)

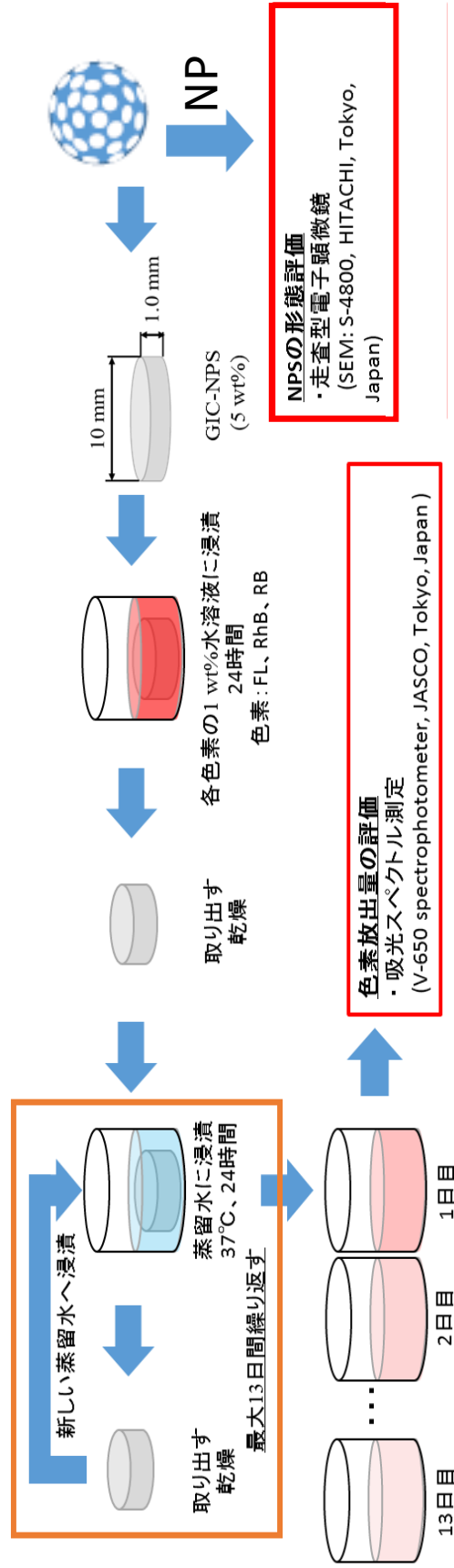


図 3-2 薬剤溶出試験の概要

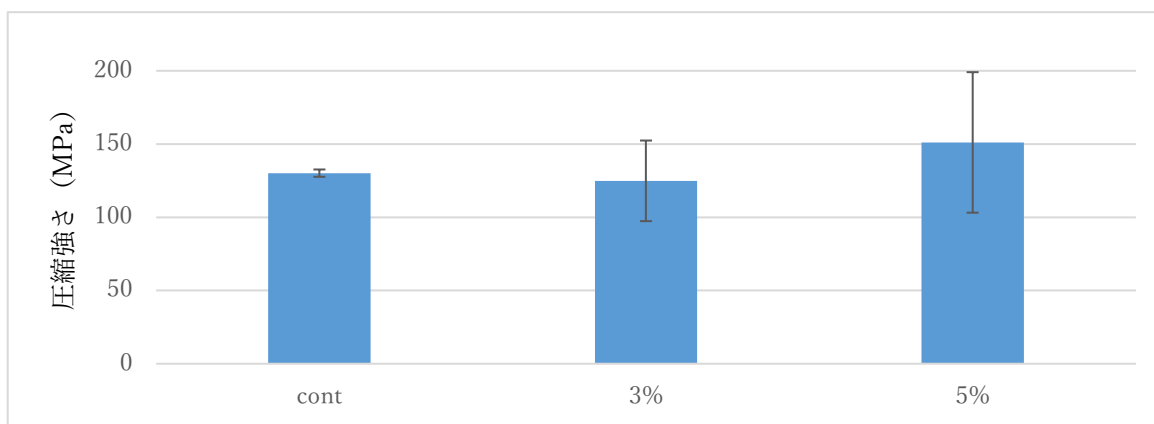


図 3-3 圧縮強度

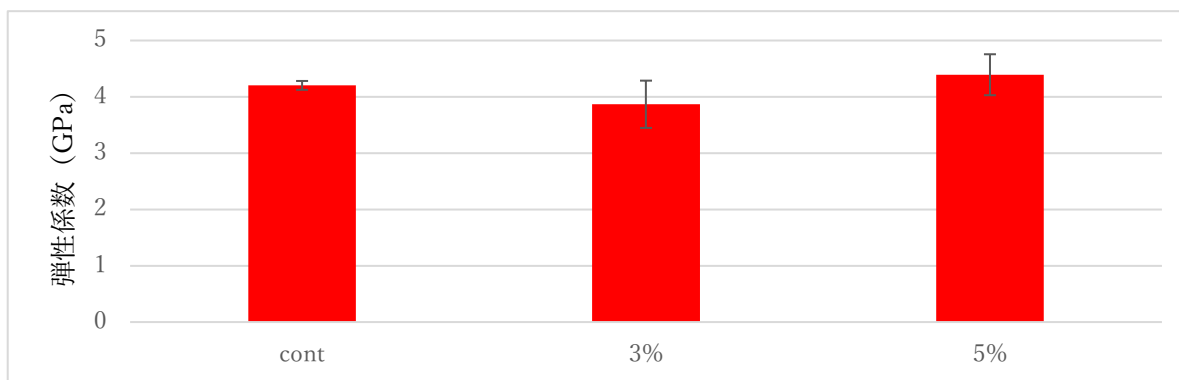


図 3-4 弾性係数

*Friedman 検定 $p < 0.05$

n=10

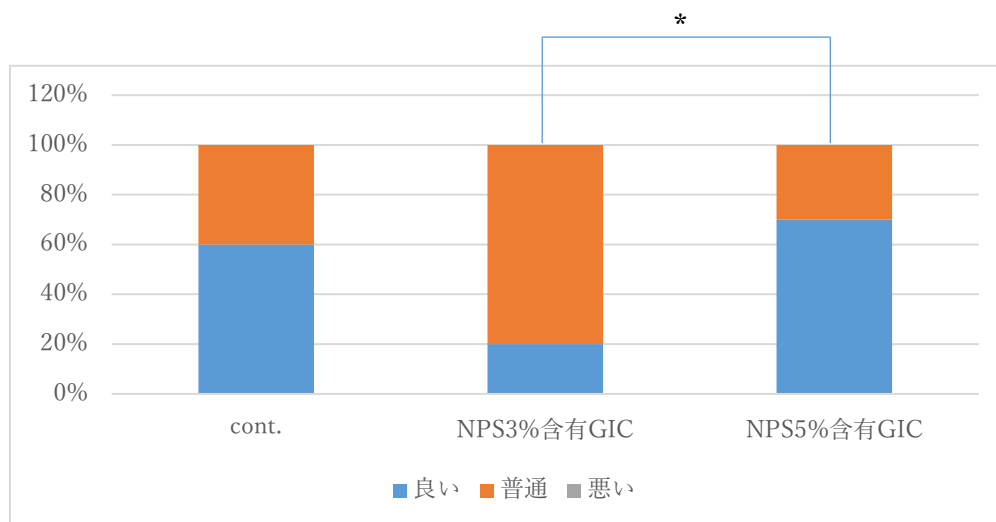


図 3-5(a) 粉と液の親和性

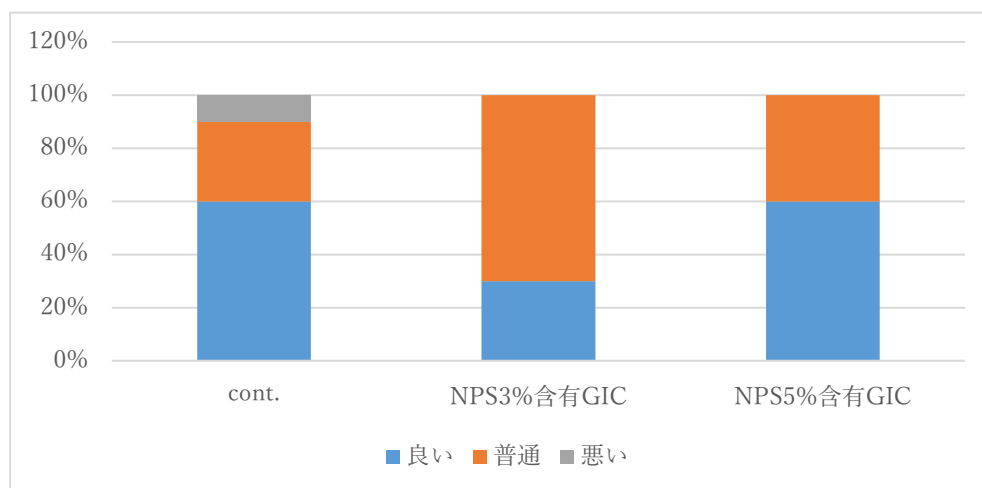


図 3-5 (b) 練和操作

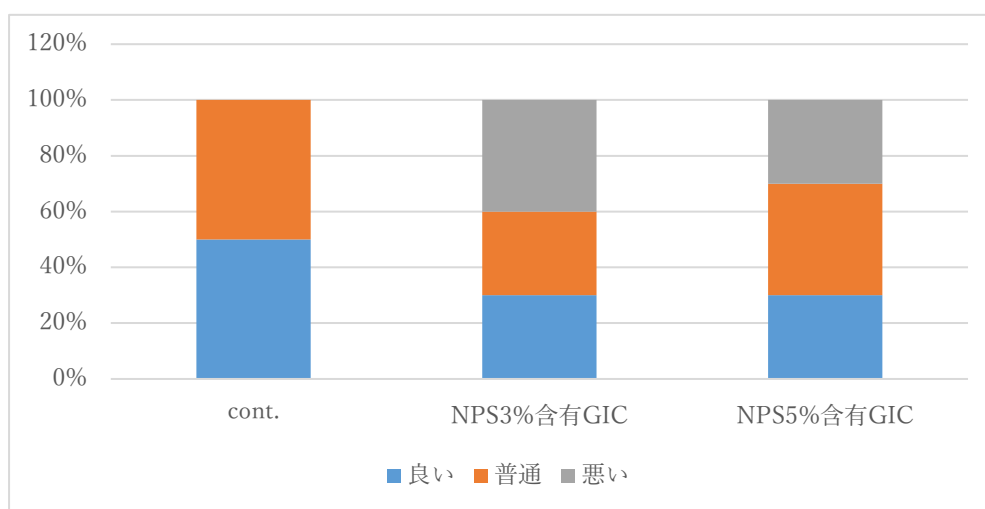


図 3-5 (c) 填塞操作

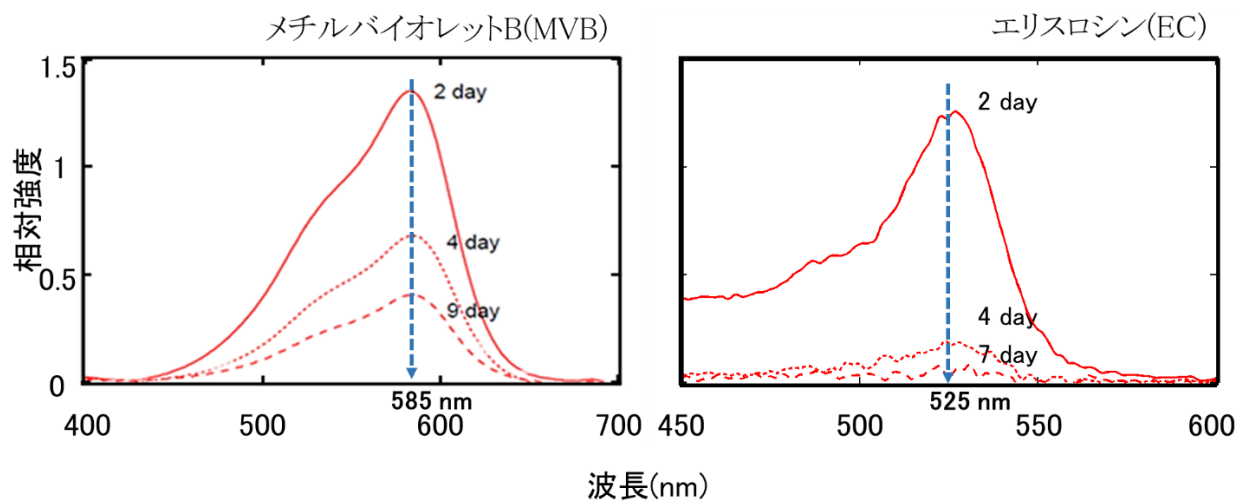


図 3-6 薬剤モデル化合物の吸収スペクトル

NPS による MVB の担持・徐放が確認された。

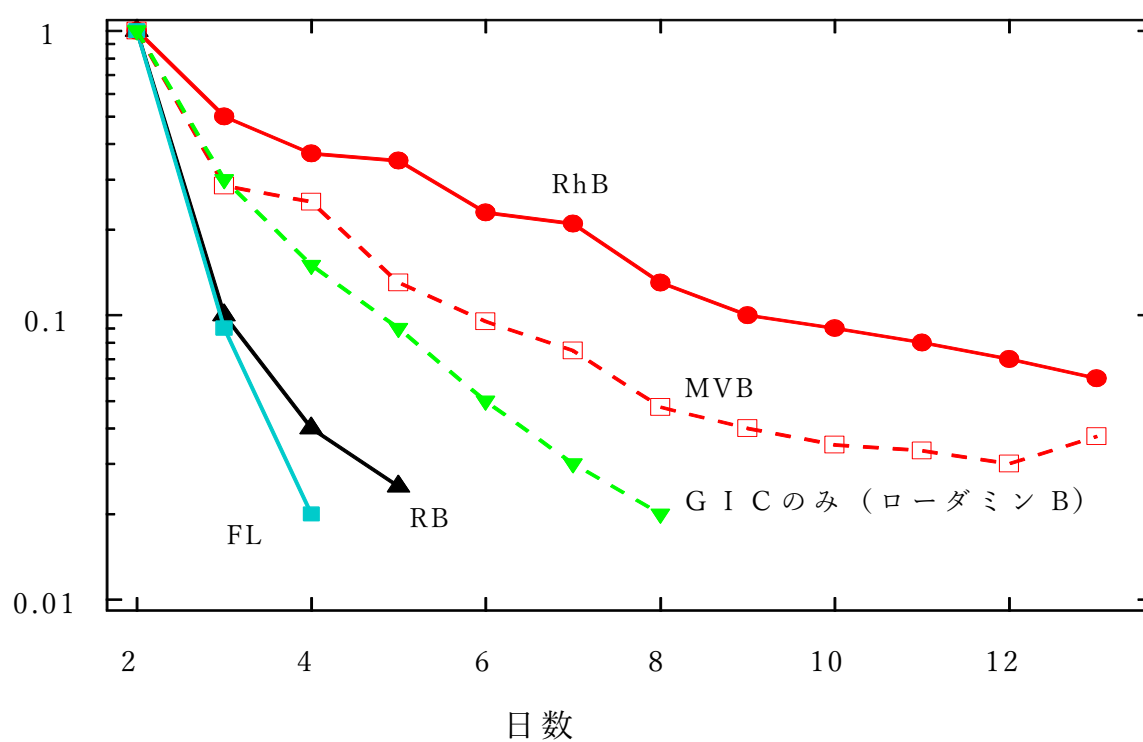


図 3-7 モデル薬剤徐放の経時変化：● ローダミン B、□メチルバイオレット、
▲ローズベンガル、■フルオレセイン、▼GIC のみ（ローダミン B）

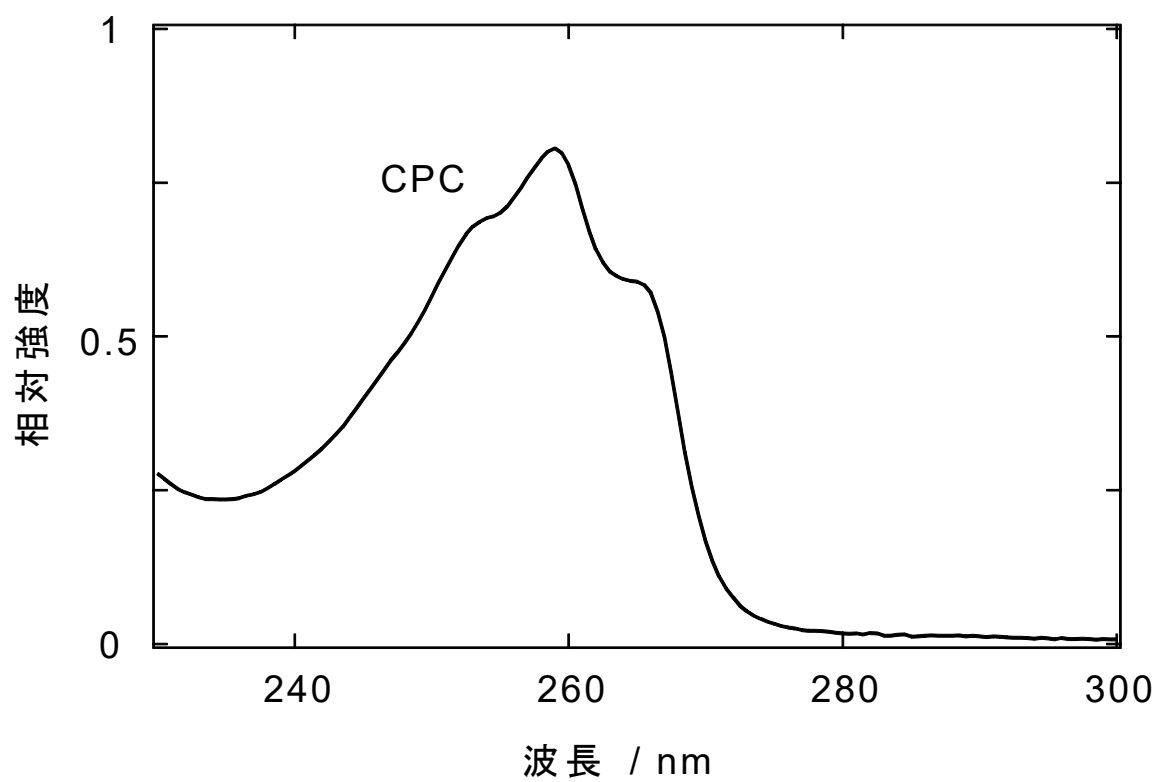


図 3-8 殺菌剤 CPC の吸収スペクトル

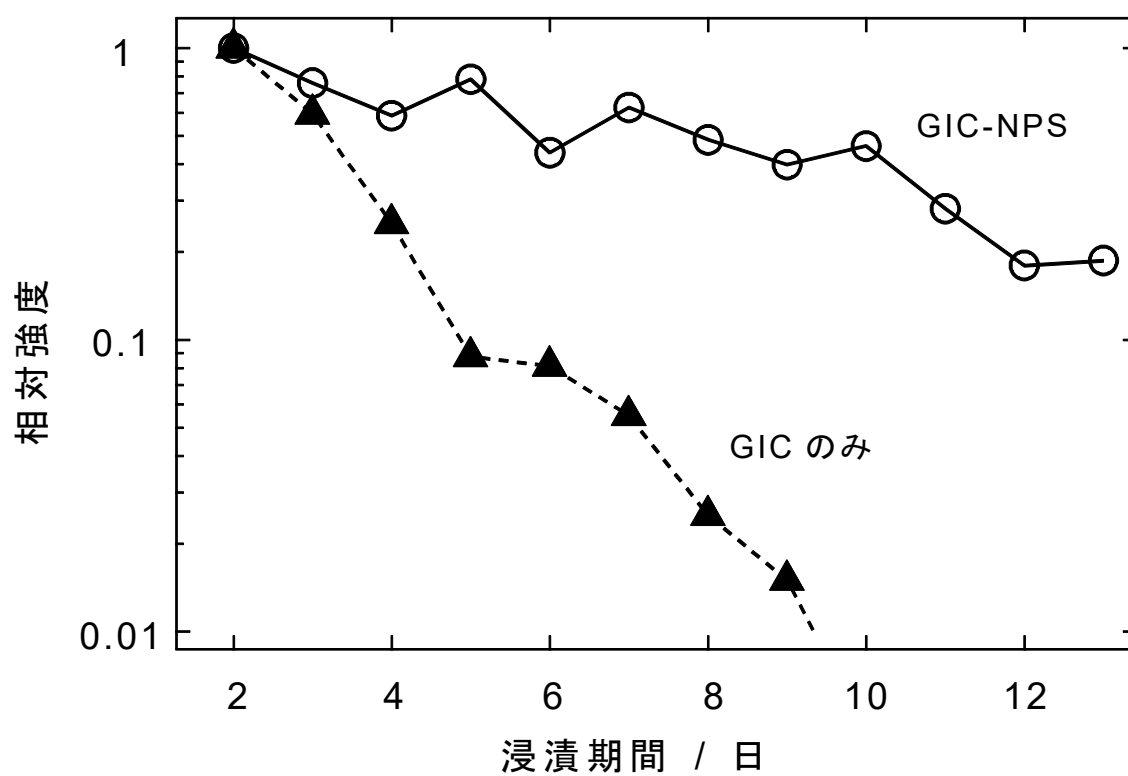


図 3-9 CPC 溶出挙動の経時的プロット ○：GIC-NPS、▲：GIC のみ

第 4 章 総括

本研究の目的は、持続的な殺菌剤の徐放によりう蝕予防効果が期待出来る新規歯科用シーラント複合材料の開発である。口腔内で持続的に殺菌剤を徐放可能なシーラント材が実現出来れば、更なるう蝕予防効果が期待出来る。そこで、ナノサイズの細孔を持つことにより、静電相互作用によりイオンの吸着・放出が期待される多孔質シリカ粒子をドラッグキャリアとして用いることにより、薬剤徐放能を持つ新規の歯科用シーラント材の開発を試みた。

第 2 章で示したように本実験で用いたナノ多孔質シリカ粒子 (NPS) は、現在生体・医療用材料として用いられている TiO_2 ナノ粒子と同様に優れた生体適合性を持つ事が示された。

第 3 章では、この NPS を歯科用セメントへと混合しても、機械的物性の低下は見られず、NPS 添加による操作性への影響も見られなかった。モデル薬剤化合物の徐放試験からは、NPS 添加により正電荷を持つモデル薬剤に対して特異的に吸着・徐放能が示された。上記モデル薬剤の徐放は、2 週間程度に渡り観察された。本研究で目的としている正電荷を持つ殺菌剤・塩化セチルピリジニウムについても、NPS 添加により 2 週間程度に渡る徐放が観察された。

以上、本研究により、優れた生体適合性を持つナノ多孔質シリカ粒子をドラッグキャリアとして歯科用セメントへと添加する事により、殺菌剤 CPC を徐放する事が出来る新規歯科用グラスアイオノマー系シーラント材の開発が期待される事が示された。

謝辞

本研究の一部は、埼玉県立大学奨励研究費（新任者 18038）の助成を受けたものである。

この研究を遂行するにあたり、終始適切な助言を賜り、丁寧に指導して下さいました北海道大学大学院歯学研究院吉田靖弘教授・阿部薫明博士（現長崎大学大学院医歯薬学総合研究科准教授）に深く感謝いたします。試料の電子顕微鏡観察には、北海道大学大学院歯学研究院研究支援部の協力を、試薬の提供には同歯学研究院中西康博士のご協力を戴いた。ここに感謝の意を表します。本研究の趣旨を理解し快く協力して頂きアンケートに回答して下さいました福住デンタルオフィスの皆様、埼玉県立大学教員、学生の皆様には感謝の念にたえません。本当にありがとうございました。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。