

# 論 文 要 旨

バイオアクティブガラス、キトサン、酸化亜鉛 3 種混合ナノ粒子材料による  
エナメル質の再石灰化に関する研究

令和 2 年度  
北海道医療大学大学院歯学研究科

長崎 綾汰

## 【緒論】

現在のブラケット装置を用いた矯正治療では、ボンディングの前処理であるエッチング処理による歯質の脱灰や、装置装着に伴った自浄性の低下によってカリエスのリスクが高まることが問題点として知られており、エナメル質の脱灰抑制や再石灰化促進作用を有した機能性材料の開発が望まれている。

生体活性セラミックスの医療分野における開発研究は盛んであり、バイオアクティブガラスは体内に存在する種々のイオンを溶出することによって、再石灰化の促進、酸緩衝作用を示すことから、歯科用インプラントや歯磨剤など多くの用途に応用されている。また天然高分子であるキトサンは生分解性や生体適合性に優れており、齲蝕予防効果を有する歯科用生体材料として応用が期待されている。さらに近年、このような機能性材料はナノテクノロジーの進歩によって、ナノ粒子化によるサイズ依存的な効果の増強や機能性の付与が検討されている。なかでも酸化亜鉛をはじめとしたセラミックスナノ粒子による抗菌特性は非常に有用とされており、生活様式の変化や薬剤の多量投与による耐性菌の出現が危惧されている今日において、新規の抗菌性材料として関心を集めている。

本研究では、バイオアクティブガラス、キトサン、酸化亜鉛混合ナノ粒子におけるエナメル質の再石灰化効果および齲蝕原性細菌に対する抗菌効果を調べることを目的とした。

## 【材料と方法】

### 1. バイオアクティブガラス粒子

マイクロサイズ（以下  $\mu\text{B}$ ）、ナノサイズ（以下  $\text{nB}$ ）からなる2種のバイオアクティブガラスを作製した。

二酸化ケイ素、酸化カルシウム、一酸化二ナトリウム、五酸化二リンからなる混合物を高温電気炉を用いて  $1550^\circ\text{C}$  に加熱し、熔融させた。熔融体を急冷して凝固させた後、ナノジェットマイザーによって粒径を  $10\ \mu\text{m}$  以下まで粉碎し  $\mu\text{BG}$  を得た。

脱イオン水、エタノール混合液にオルトケイ酸テトラエチル、硝酸ナトリウム、硝酸カルシウムを分散させ、クエン酸で  $\text{pH}$  を  $1\sim 2$  に調整した。溶液が透明になるまで攪拌を行い、その後第二リン酸アンモニウムを加えた脱イオン水中に滴下し、24時間攪拌した。この手順の間、アンモニア水で  $\text{pH}$  を  $10\sim 11$  に維持した。遠心分離後、上清を捨て、沈殿物を凍結乾燥させ、 $700^\circ\text{C}$  で煅焼し、 $\text{nBG}$  を得た。

### 2. キトサンナノ粒子

酢酸水溶液中にキトサンを溶解し、水酸化ナトリウム溶液を用い、pHを4.6~4.8まで上昇させた。キトサン溶液にトリポリリン酸を添加し、遠心分離後、沈殿物を凍結乾燥させ、キトサンナノ粒子（以下C）を得た。

### 3. 酸化亜鉛ナノ粒子

Sigma-Aldrichより購入した酸化亜鉛ナノ粒子（721077）（以下Z）を使用した。純水中に分散されており、平均粒径は $\leq 40$  nmであった。

### 4. 材料の特性評価

本実験にて作製した粒子に対し、走査型電子顕微鏡（以下SEM）、透過型電子顕微鏡（以下TEM）を用いて形態観察を行った。より詳細な構造解析として、ガス吸着測定法による比表面積の測定、ゼータ電位測定による表面電化特性の評価を行った。

nBに対してはX線回折装置（以下XRD）により結晶構造の確認を行い、さらに酢酸水溶液（pH4.5）に各濃度からなるnB（0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 mg/mL）を浸漬した際の経時的なpHを測定することで酸緩衝能を評価した。

### 5. エナメル質再石灰化試験

実験に適用する材料として次の6種の試験懸濁液を調製した。1) 市販フッ化物・塩化セチルピリジニウム配合ジェル（Check-Up gel, ライオン, 以下F）、2) nB、3) nBC、4) nBZ、5) nBCZ、6)  $\mu$ B。

ヒト抜去歯からブロック状に切り出したエナメル質を、エポキシ樹脂に包埋後、鏡面研磨を行った。35%リン酸エッチングにより脱灰処理した後、再石灰化溶液（pH6.8）への7時間浸漬、試験懸濁液への1時間浸漬を交互に行う再石灰化試験を28日間実施した。再石灰化溶液には、 $\text{Ca}/\text{PO}_4 = 1.67$ に調整した人工唾液を用いた。コントロールとして再石灰化溶液への浸漬のみを行う試料も用意した。（以下Con）

### 6. エナメル質試料の硬さ、弾性係数の評価

各エナメル質試料に対して、脱灰前後および再石灰化試験1, 7, 28日後において、ナノインデンテーション試験により機械的特性（硬さ、弾性係数）を評価した。押し込み荷重は、10 mN（押し込み深さ約400 nm）と100 mN（押し込み深さ約1200 nm）の2条件を用いた。各群5つのサンプルを用意し、各サンプルに対して4視野5カ所の計測を行い、 $n=100$ とした。統計分析には一元配置分散分析を用い、その後の多重比較にはTukey検定を用いた（ $p < 0.05$ ）。

### 7. SEMによるエナメル質試料の観察

再石灰化試験前後のエナメル質試料について、金蒸着を行い、SEMを用いた表面性状

の観察を行った。

## 8. 抗菌試験

96穴ウェルプレートを用いた微量液体希釈法により、最小殺菌濃度（以下MBC）を測定した。試験材料は再石灰化試験と同様の6種からなり、それぞれから10%希釈液を調製し用いた。被検細菌は10種の菌（*S.mutans*, *S.sanguinis*, *S.salivarius*, *S.gordonii*, *S.aureus*, *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *F.nucleatum*, *P.intermedia*, *C.albicans*）を選択した。これらの菌液をBHI液体培地により濁度 $OD_{600nm}=1.0 \times 10^{-3}$ に調製し、各菌液100  $\mu$ Lをプレートに接種した。この培養液3  $\mu$ Lを新たなBHI寒天培地に再度接種し、菌の発育の有無によりMBCを評価した。

### 【結果と考察】

特性評価の結果、作製した nB, C は非晶質構造からなる類円形の粒子であり、ナノ粒子化に伴った非常に大きな比表面積、表面電荷による中等度の分散安定性を有することが確認された。さらに酸緩衝能試験では、酢酸水溶液に nB を浸漬後、pH は速やかに上昇し、5 mg/mL 以上の濃度ではおよそ 10 に達したことから、優れた酸緩衝能が示された。

再石灰化試験では、バイオアクティブガラスナノ粒子含有群（nB, nBC, nBZ, nBCZ）を適用したエナメル質表面のより速やかな機械的特性の回復が示された。SEM による表面性状の観察では、いずれの群においても脱灰エナメル質の粗造で多孔質な表面構造は再石灰化試験後に、石灰化物様の沈着物に覆われている様子が確認された。

齲蝕原性細菌である *S. mutans* を始めとしたグラム陽性菌や、歯周病原性細菌を含んだグラム陰性菌、真菌である *C. albicans* など、いずれの菌に対しても酸化亜鉛含有群（nBZ, nBCZ）の MBC が同定され、広範囲にわたる抗菌スペクトルを有していることが確認された。

### 【結論】

バイオアクティブガラスおよび酸化亜鉛混合ナノ粒子は酸緩衝および齲蝕原性細菌への抗菌効果による脱灰抑制作用、さらには再石灰化促進作用を有することが示された。