

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20402

研究課題名(和文) クロルヘキシジンを配合した抗菌性セルフアドヒーズセメントの開発

研究課題名(英文) Development of antibacterial self-adhesive resin cements containing chlorhexidine

研究代表者

北川 蘭奈 (Kitagawa, Ranna)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70711068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、市販のセルフアドヒーズセメントにクロルヘキシジン(CHX)を種々の濃度で配合し、抗菌性、歯質接着性および曲げ強さを評価した。その結果、デュアルキュア型のジーセムリンクエース(GC)にCHXを5(wt)%以上配合した場合、未重合状態で抗菌効果を発揮するとともに、硬化後もバイオフィーム形成を抑制できることが明らかとなった。さらに、5(wt)% CHX含有試作セメントが臨床使用に適した接着強さや曲げ強さを示すことが確認され、ジーセムリンクエースにCHXを5(wt)%配合することで、抗菌性を備えたセルフアドヒーズレジンセメントを実現できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, the experimental self-adhesive resin cements containing chlorhexidine diacetate (CHX) at various concentrations were prepared, and their antibacterial effects, bonding ability, and physical properties were evaluated. The experimental cements prepared by incorporation of CHX at 5 (wt)% or greater into a commercial dual-cure G-CEM LinkAce (GC Corp., Tokyo) exhibited antibacterial effects at uncured stage and inhibited biofilm formation on their surfaces after curing. In addition, the experimental cement containing 5 (wt)% CHX demonstrated dentin bonding ability and flexural strength acceptable for clinical use. Thus, incorporation of CHX at 5 (wt)% into G-CEM LinkAce was found to be a promising approach to provide the self-adhesive resin cements with antibacterial activities.

研究分野：歯学

キーワード：レジンセメント 抗菌性 クロルヘキシジン 溶出

1. 研究開始当初の背景

う蝕治療においては、いくつかの診断基準をもとに感染歯質の除去が行われるが、必ずしも確実な感染の除去が達成できるとは言えない。そのため、修復治療前にクロルヘキシジンなどの水溶性抗菌剤を含有する窩洞清掃剤を適用することも推奨されているが、これらの処理剤は、その後に適用するレジン系接着材の象牙質への接着強さを低下させる場合があることが知られており、理想的な処置とは言えない。また、多数の細菌が棲息する口腔内という環境では、治療後に再感染が生じ、修復部位の周囲にう蝕が再発することも多い。こういった点から、間接修復処置に用いられるセメントが抗菌性を備えていることは有益であると考えられる。

申請者は、セルフアドヒーシブセメントそのものに抗菌剤を配合することで、接着性能の低下を回避しつつ抗菌性を付与することが可能ではないかと着想した。また、セメント本体に抗菌剤を配合すれば、硬化後にもある一定期間抗菌剤の溶出を生じさせ、修復後のセメントライン周囲における抗菌性発現も期待できるものと発想した。

2. 研究の目的

本研究では、臨床使用に適した抗菌剤含有セルフアドヒーシブレジンセメントの開発を目指して、デュアルキュア型セルフアドヒーシブセメントにカチオン系抗菌剤であるクロルヘキシジン (Chlorhexidine diacetate; CHX) を種々の濃度で配合し、それらの抗菌性を詳細に検討するとともに、レジンセメントとしての各種基本特性の評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CHX 配合セルフアドヒーシブセメントの試作

基材となるセルフアドヒーシブセメントには、市販の粉液タイプのデュアルキュア型レジンセメントであるジーセム (GC, Tokyo) と、ペーストタイプのデュアルキュア型レジンセメントであるジーセムリンクエース (GC) を用いた。

ジーセムの粉材に CHX を 0.5, 1, 2, 5, 10, または 15 (wt)% となるように配合し、粉液比 2:1 で液と練和した。練和物をプラスチックモールドに填入後、プラスチックストリップスで圧接し、40 秒間光照射して硬化体を作製した。また、ジーセムリンクエースについては、最終濃度が 0.5, 1, 2, 5, 10, または 15 (wt)% となるように CHX を配合したペーストをモールドに填入し、40 秒間光照射して硬化体を作製した。

(2) CHX 溶出量の測定

直径 10 mm, 厚さ 2 mm のモールドを用いて作製した硬化セメント試料を 1 mL の滅菌蒸留水に浸漬し、24 時間ごとに溶出媒を交換し

ながら、溶出した CHX の濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて 14 日後まで経時的に測定した。HPLC 用カラムには逆相分配 C18 系を、移動相には第四アンモニウム検出のための 5 mM H_3PO_4 と 100 mM $NaClO_4$ を添加した 70% アセトニトリルを用いた。

(3) CHX の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

う蝕関連細菌として *Streptococcus mutans* NCTC10449 を、感染根管関連細菌として *Enterococcus faecalis* SS497 を使用し、これらの細菌に対する CHX の MIC を micro dilution assay にて測定した。

(4) 試作セメントの抗菌効果の検討

阻止斑形成試験

実験(3)で用いた 2 菌種の各菌液を塗抹した寒天平板培地上に、直径 10 mm, 厚さ 2 mm の硬化セメント各試料を置き、37 °C で 24 時間嫌気培養後に阻止斑の大きさを算出して、試作セメントに対する各細菌の感受性を評価した。また、硬化セメントを 14 日間滅菌蒸留水に浸漬した試料についても同様に、阻止斑形成試験を行った。

セメント硬化体上での細菌増殖試験

硬化セメント試料上に 1×10^3 CFU/mL に調整した *S. mutans* 菌液 50 μ L を播種し、24 時間嫌気培養後に BHI 培地中に回収した。寒天平板培地に回収菌液を塗抹し、コロニーカウント法により生菌数を測定した。

バイオフィーム形成試験

BHI 培地を用いて 1×10^8 CFU/mL に調整した *S. mutans* または *E. faecalis* 菌液 1.5 mL 中に硬化体を浸漬し、6 時間嫌気培養した。続いて、細菌を含まない BHI 培地中に試料を移して 18 時間嫌気培養を行い、さらに新鮮な BHI 培地に移しかえて 24 時間嫌気培養した後、LIDE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit を用いて染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡にて試料上に形成されたバイオフィームを観察した。また、より臨床に近い状態を再現するために、ヒトの唾液を採取して調整した混合細菌系でも同様の実験を行った。

(5) 接着強さへの影響の評価

牛歯の象牙質表面に試作セメントを用いてステンレス棒を接着させ、37 °C で 24 時間保管後にせん断接着試験を行った。

(6) 曲げ強さの測定

ISO 4049:2000 に準じて作製した、一辺 2 mm, 高さ 25mm の棒状試料を 37 °C 蒸留水に 24 時間または 28 日間浸漬した後、万能曲げ試験機を用いてクロスヘッドスピード 1 mm/min, 支点間距離 20 mm で曲げ試験を行った。

4. 研究成果

(1) CHX 溶出量の測定

ジーセムでは、CHX を 5%以上配合した試料において 14 日間の持続的な溶出が認められた。ジーセムリンクエースについては、すべての CHX 配合セメントで 14 日間の持続的な溶出が確認された。また、いずれのセメントにおいても、CHX 溶出量は CHX の配合濃度の増加とともに増加した。

(2) 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

CHX の *S. mutans*, *E. faecalis* に対する MIC 値は、両菌ともに 3.2 µg/mL であった。実験(1)の溶出試験の結果から、15%CHX 配合ジーセム、および 5, 10, 15%CHX 配合ジーセムリンクエースでは、14 日間の測定期間を通して MIC 値以上の溶出濃度を維持できることが確認された。

(3) 試作セメントの抗菌効果の検討

阻止斑形成試験

未重合のセメントおよび硬化直後のセメントを用いた場合、ジーセムでは、CHX 配合濃度が 5%以上の試料において *S. mutans* および *E. faecalis* に対して抑制作用が認められた。また、ジーセムリンクエースに関しては、1%以上 CHX を配合した試料において両菌に対する抑制作用が認められた。さらに、5, 10, 15%CHX 配合ジーセムリンクエースについては、14 日間滅菌蒸留水浸漬後も、抗菌効果を示すことが確認された。

これらの結果から、試作したセメントのうち、5%以上の濃度で CHX を配合したジーセムリンクエースが、未重合状態、硬化直後、および 14 日間水中保管後のいずれの期間においても抗菌効果を示すことが分かった。

セメント硬化体上での細菌増殖試験

5%CHX 配合ジーセムリンクエースの硬化試料上で *S. mutans* 菌液を 24 時間嫌気培養したところ、細菌は完全に死滅し、5%CHX 配合ジーセムリンクエースが硬化後に強い殺菌作用を示すことが確認された。

バイオフィーム形成試験

S. mutans および *E. faecalis* の両菌とも、CHX 非配合のジーセムリンクエース上では、ほとんどが生菌からなるバイオフィームの形成が観察されたが、5%CHX を配合した硬化セメント上では死菌がわずかに付着している状態であった。また、唾液サンプル由来の混合細菌液を用いた場合においても、5%CHX 配合セメント上に付着菌は認められず、ヒト唾液由来の多菌種から構成されるバイオフィーム形成も抑制することが分かった。

(4) 接着強さへの影響の評価

5%CHX 配合ジーセムリンクエースは、CHX 非配合セメントと比較して、象牙質接着強さに有意差は認められず、5%の CHX を配合してもジーセムリンクエースの歯質接着性に悪

影響を及ぼさないことが分かった。

(5) 曲げ強さの測定

ジーセムリンクエースに CHX を 1%以上配合すると、CHX 非配合のコントロールと比較して 24 時間浸漬後の曲げ強さが有意に低下することが確認された。また、CHX の配合濃度が増加するにしたがって、曲げ強さが低下する傾向が認められた。しかしながら、15%CHX 配合ジーセムリンクエースの 24 時間浸漬後の曲げ強さは 50 MPa 以上、5%CHX 配合では 80 MPa 以上であり、いずれも臨床的に問題のない曲げ強さを示すことが分かった。さらに、5%CHX 配合ジーセムリンクエースでは、28 日間浸漬後も曲げ強さの低下は認められず、長期水中保管後も物性が維持されることが確認された。

以上より、デュアルキュア型セルフアドヒーズセメントであるジーセムリンクエースに CHX を 5 (wt)%以上配合することで、未重合状態で抗菌効果を発揮するとともに、硬化後もバイオフィーム形成を抑制できることが明らかとなった。さらに、5 (wt)% CHX 含有試作セメントは臨床使用に適した接着強さや曲げ強さを示すことが確認され、ジーセムリンクエースに CHX を 5 (wt)%配合することで抗菌性を備えたセルフアドヒーズレジンセメントを実現できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hirose N, Kitagawa R, Kitagawa H, Maezono H, Mine A, Hayashi M, Haapasalo M, Imazato S. Development of a Cavity Disinfectant Containing Antibacterial Monomer MDPB. J Dent Res. 査読有. 95(13): 1487-1493, 2016. DOI: 10.1177/0022034516663465

Miki S, Kitagawa H, Kitagawa R, Kiba W, Hayashi M, Imazato S. Antibacterial activity of resin composites containing surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler. Dent Mater. 査読有. 32: 1095-1102, 2016. DOI: 10.1016/j.dental.2016.06.018

Kitagawa H, Izutani N, Kitagawa R, Maezono H, Yamaguchi M, Imazato S. Evolution of resistance to cationic biocides in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. J Dent. 査読有. 47: 18-22, 2016. DOI: 10.1016/j.jdent.2016.02.008

〔学会発表〕(計 5 件)

北川蘭奈, 北川晴朗, 廣瀬奈々子, 三木彩希, 和氣菜々子, 山口 哲, 林 美加子, 今里 聡. クロルヘキシジンを配合した

セルフアドヒーシブレジンセメントの開発
硬化後の抗菌性と長期水中保管後の
物性の評価 . 第 145 回日本歯科保存学
会秋季学術大会, 2016 年 10 月 28 日, 松
本市

Kitagawa H, Kitagawa R, Tsuboi R,
Takeda K, Sasaki JI, Imazato S.
Development of an Antibacterial
Endodontic Sealer Containing
CPC-loaded Polymer Particles.
International Association for Dental
Research 94th General Session &
Exhibition, 2016. 6. 24, Seoul

北川晴朗, 北川蘭奈, 壺井莉理子, 竹田か
ほる, 佐々木淳一, 今里 聡 .CPC 担持ポリ
マー粒子の応用による長期的抗菌効果を備
えた根管充填シーラーの開発 . 日本歯科理
工学会第 67 回春期学術大会, 2016 年 4 月
16 日, 福岡市

Kitagawa R, Kitagawa H, Hirose N,
Yamaguchi S, Mehdawi IM, Hayashi M,
Imazato S: Antibacterial effects of
self-adhesive resin cements containing
chlorhexidine. Academy of Dental
Materials Annual Meeting 2015, 10, 15,
Maui, USA

廣瀬奈々子, 北川蘭奈, 北川晴朗, 林 美
加子, 今里 聡 . MDPB 含有窩洞殺菌材の抗
菌効果と歯質接着性への影響の評価 . 日本
歯科理工学会第 65 回春期学術大会, 2015
年 4 月 11 日, 仙台市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北川 蘭奈 (Kitagawa Ranna)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号 : 70711068