

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K17128

研究課題名（和文）電子線照射法によるレジン系材料への抗菌成分固定化技術の開発

研究課題名（英文）Immobilizing bactericides on resin-based materials via electron-beam irradiation

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、濃度の異なるMDPBコート液をレジン試料表面に塗布して、加速電圧10MeVの電子線を照射することで、MDPBを固定化させたレジン試料上での口腔細菌に対する抗菌効果、および口腔バイオフィーム形成抑制作用を検討した。その結果、50%濃度のMDPBを含むコート液を塗布して電子線を照射することで、固定化されたMDPBによる殺菌効果により、レジン試料表面での口腔バイオフィーム形成が抑制されることが分かった。さらに、レジン試料を長期保管後も、固定化MDPBの抗菌および抗バイオフィーム効果が維持されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、高分子材料の表面改質のために既に実用化されている電子線照射法を応用することで、抗菌性モノマーMDPBが歯科用レジン表面に高濃度に固定化され、レジン表面において持続的な抗菌作用を発現する技術の開発に成功した。本研究により確立した新規技術を応用することで、歯科材料に抗菌性発現機能を持たせることができれば、常に細菌感染のリスクを伴う口腔内という過酷な環境において、二次的な疾患の発生予防に役立つ次世代型歯科材料の実現につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, experimental coating solutions containing different concentrations of MDPB were fabricated. By applying each solution to a resin surface and exposure to 10 MeV of electron-beam irradiation, MDPB-immobilized resins were prepared. The antibacterial effect of MDPB-immobilized resins and their inhibitory effect on oral biofilm formation were evaluated. The MDPB-immobilized resin coated with 50% MDPB and exposed to electron-beam irradiation exhibited bactericidal and anti-biofilm effects. Further, its antibacterial and anti-biofilm effects were not attenuated after ageing.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯学 抗菌成分 電子線照射 レジン系材料 固定化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科用レジンに抗菌性を付与するアプローチとして、抗菌成分をレジジンに配合し、その溶出によってレジン表面への細菌の付着を抑制する試みが古くから行われてきた。しかし、それらの手法では、抗菌効果の発現がごく初期に限られ、また抗菌成分の溶出によって物性が低下するという問題点がある。これに対して、研究代表者らは、抗菌性モノマーMDPB を各種レジン系材料に応用し、抗菌成分を固定化するアプローチにより、抗菌性根管充填材等を開発する研究に取り組んできた。MDPB は、その重合によって抗菌成分である第四アンモニウムがレジジンに固定化され、抗菌成分の溶出に依存しない接触型の抗菌効果を発揮するため、MDPB を配合したレジン系材料は、硬化後も持続的な抗菌効果を示すことが可能である。しかしながら、MDPB の固定化による抗菌効果については、基材となるレジジンの重合前に MDPB を配合して硬化させる方法では、抗菌成分である第四アンモニウムを材料表面に集中的に局在させることが困難で、材料表面において効率的に MDPB の抗菌効果を発揮させることが不可能であった。

そこで、歯科用レジン表面に MDPB を集中的に固定化させる方法を模索し、高分子繊維やプラスチックチューブなどの表面改質のために既に実用化されている電子線照射法に着目した。本法は、高い加速電圧による電子線を材料表面に照射することで、基板ポリマー分子内でラジカルが発生し、表面に存在するモノマーのグラフト重合を可能とする技術である。したがって、レジン表面に MDPB コート液を塗布して電子線を照射すれば、抗菌活性分子の高濃度での固定化を達成でき、各種レジン系修復物表面に抗菌コートを施すことが可能となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、濃度の異なる MDPB コート液をレジン試料表面に塗布して加速電圧 10MeV の電子線を照射し、MDPB を固定化させたレジン試料上での口腔細菌に対する抗菌効果、および口腔バイオフィーム形成抑制効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) MDPB コート液の調整、および電子線照射

30%エタノール溶液に MDPB を 0、5、10、20、50、80%の濃度で溶解させた MDPB コート液を調製した後、各コート液を直径 10 mm、厚さ 2 mm のポリメチルメタクリレート (PMMA) ディスク上面に塗布した。

加速電圧 10 MeV の電子線を試料上面に照射した後、エタノール水溶液に浸漬して試料に付着した MDPB ホモポリマーを除去した。

(2) MDPB 結合状態の評価

電子線照射後のレジン表面での MDPB の存在を確認するため、エックス線光電子分光装置による照射側面の MDPB 由来の N1s/Br3d を検出した。

次に、水中浸漬後のレジン表面での MDPB 結合状態を評価するため、電子線照射後のコーティングレジン試料を蒸留水に浸漬し、溶液中に溶出した未重合 MDPB 濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

(3) 抗菌性の評価

実験(1)と同様に作製した各コーティングレジン試料を蒸留水に 3 日間浸漬して乾燥させた後、試料上に *Streptococcus mutans* NCTC10449 の菌液を播種し、24 時間培養後、コロニーカウント法により生菌数を測定した。

さらに、50%MDPB コート液を用いて作製したコーティングレジン試料を 7 日あるいは 28 日間水中保管した後、各試料上で *S. mutans* を 24 時間培養し、生菌数を測定した。

(4) バイオフィーム形成抑制効果の検討

50%MDPB コート液を用いて作製したコーティングレジン試料上に *S. mutans* の菌懸濁液、あるいはヒト唾液由来の細菌懸濁液を滴下しながら 24 時間培養後、試料上に形成されたバイオフィームに LIVE/DEAD 染色を施した後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行い、得られた三次元画像からバイオフィームの厚みおよび生菌率を定量した。

さらに、MDPB コーティングレジン試料を 28 日間水中保管した後、再度 *S. mutans* あるいはヒト唾液由来の細菌懸濁液を滴下しながら 24 時間培養後、バイオフィーム形成抑制効果を評価した。

4. 研究成果

(1) MDPB 結合状態の評価

エックス線光電子分光装置を用いて MDPB 由来の N1s/Br3d の検出を行ったところ、コート液中の MDPB の濃度が高くなるにしたがって、検出された N1s 値が高くなることが分かった。次に、電子線照射後のコーティングレジン試料を蒸留水に浸漬し、溶液中に溶出した未重合 MDPB 濃度

を、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したところ、水中浸漬後 2 日間は溶液中に未重合の MDPB モノマーが検出されたものの、3 日目以降はその溶出が認められなかった。すなわち、電子線照射後のレジン表面に残存した未重合の MDPB を除去するには、エタノール洗浄後 3 日間の水洗を行う必要があることが分かった。

(2) 抗菌性の評価

各コーティングレジン試料上で 24 時間培養後、*S. mutans* の生菌数を測定したところ、50%濃度の MDPB コート液を用いてコーティングしたレジン試料では、非コーティング試料やその他の濃度のコート液を用いて作製したコーティングレジン試料に比べて、生菌率が有意に低かった。

さらに、50%MDPB コート液を用いて作製したコーティングレジン試料を 7 日あるいは 28 日間水中保管した後に、各試料上で 24 時間培養した *S. mutans* の生菌数を測定したところ、7 日および 28 日間水中保管した試料と水中浸漬前の試料の間で有意差は認められなかった。したがって、50%MDPB コート液を用いて作製したコーティングレジン試料は長期保管後も *S. mutans* に対する抗菌効果を維持できることが分かった。

(3) バイオフィーム形成抑制効果の検討

50%MDPB コート液を用いて作製したコーティングレジン試料上に *S. mutans* の菌懸濁液を滴下しながら 24 時間培養後、試料上に形成されたバイオフィームの性状を評価したところ、MDPB コーティングレジン試料上では、コントロールである MDPB 非コーティングレジン試料に比べて、バイオフィームの厚みおよび生菌率が有意に低下することが分かった（図 1）。

さらに、MDPB コーティングレジン試料を 28 日間水中保管した後、再度 *S. mutans* によるバイオフィーム形成抑制効果を評価したところ、水中浸漬前後の試料間でバイオフィームの厚みおよび生菌率に有意差が認められなかった。

また、MDPB コーティングレジン試料上に唾液由来の細菌懸濁液を滴下しながら 24 時間培養後、試料上に形成されたバイオフィームの性状を評価したところ、MDPB コーティングレジン試料上では、バイオフィームの厚みおよび生菌率が有意に低下し、28 日間水中保管後も MDPB の固定化によるバイオフィーム抑制効果が維持されることが確認された（図 2）。

以上のように、本研究により、50%濃度の MDPB を含むコート液を塗布し、電子線を照射することで高濃度に固定化された MDPB による殺菌効果により、レジン試料表面での口腔バイオフィーム

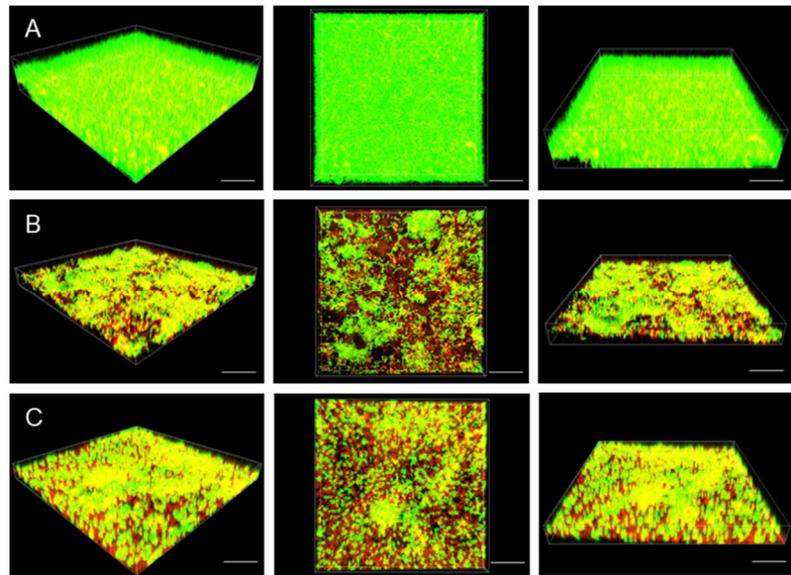


図 1 .*S. mutans* を 24 時間滴下後のレジン試料上でのバイオフィーム形成 .

A: MDPB 非コーティングレジン試料 .

B: 50%MDPB コート液を用いて作製したコーティングレジン試料 .

C: 28 日間水中保管後の MDPB コーティングレジン試料 .

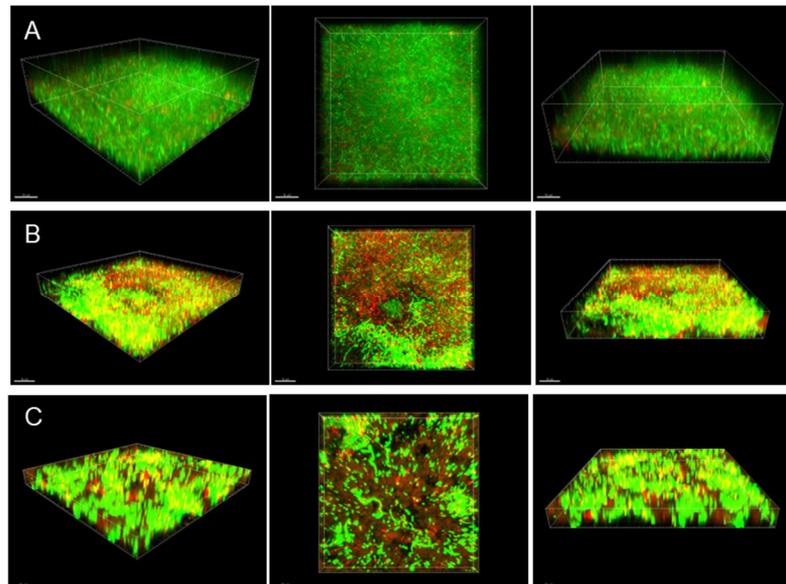


図 2. 唾液由来の細菌懸濁液を 24 時間滴下後のレジン試料上でのバイオフィーム形成 .

A: MDPB 非コーティングレジン試料

B: 50%MDPB コート液を用いて作製したコーティングレジン試料

C: 28 日間水中保管後の MDPB コーティングレジン試料

ム形成が抑制されることが分かった。さらに、レジジン試料を長期保管後も、固定化 MDPB の抗菌および抗バイオフィルム効果が維持されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Thongthai P, Kitagawa H, Kitagawa R, Hirose N, Noree S, Iwasaki Y, Imazato S	4. 巻 108
2. 論文標題 Development of novel surface coating composed of MDPB and MPC with dual functionality of antibacterial activity and protein repellency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 3241 ~ 3249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34661	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 -
1. 著者名 Morita M, Kitagawa H, Nakayama K, Kitagawa R, Yamaguchi S, Imazato S	4. 巻 -
2. 論文標題 Antibacterial activities and mineral induction abilities of proprietary MTA cements	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Thongthai P, Kitagawa H, Iwasaki Y, Noree S, Kitagawa R, Imazato S	4. 巻 100
2. 論文標題 Immobilizing Bactericides on Dental Resins via Electron Beam Irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1055 ~ 1062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345211026569	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 -
1. 著者名 Deng F, Sakai H, Kitagawa H, Kohno T, Thongthai P, Liu YH, Kitagawa R, Abe G, Sasaki JI, Imazato S	4. 巻 27
2. 論文標題 Fabrication of pH-responsive Zn-releasing glass particles for smart antibacterial restoratives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7202 ~ 7202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27217202	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kitagawa R, Kitagawa H, Hirose N, Tsuboi R, Kohno T, Hayashi M, Imazato S
2. 発表標題 Antibacterial effects and bonding abilities of chlorhexidine-containing self-adhesive resin cement
3. 学会等名 4th Meeting of the IADR/APR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川蘭奈, 北川晴朗, 林 美加子, 今里 聡
2. 発表標題 試作メタクリル酸エステル系根管充填シーラーの根管象牙質に対する接着性および封鎖性
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会 (第152回)
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
---------------------------	-----------------------	----

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