

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791447

研究課題名（和文）リン脂質ポリマー修飾によるバイオフィルム抑制効果

研究課題名（英文）Effect of the biofilm reduction by coating of a surface with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)

研究代表者

的野 良就（MATONO YOSHINARI）

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：30432917

研究成果の概要：リン脂質ポリマーを歯科補綴で使用される材料の表面、及び歯の表面に修飾することによって、プラーク等バイオフィルムの付着抑制効果を検討した。表面修飾法でより良い修飾法を検討し、結果を得た。また、金属試料（歯科用金属）に関しては安定してプラークの付着を抑制する効果が期待できる結果を得ることが出来たが、歯科用レジン（入れ歯等に用いられる材料）や歯質に対してはプラーク付着抑制効果が期待できる結果を得ることが出来なかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴理工系歯学・歯科理工学

キーワード：細菌 リン脂質ポリマー 口腔内ケア

1. 研究開始当初の背景

歯科臨床においてはプラークコントロールが重要な役割を担っており、プラークコントロールの成否は齲蝕、歯周病を含む多くの歯科疾患の原因に大きく関与している。

また、近年の超高齢化社会の到来に伴い、高齢者の高い生活の質（QOL）の獲得が急務となってきた。高齢者の中には自分で歯磨きを出来ない人が多く、また歯科補綴物が装着されているケースが多い。つまり、高齢者の口腔内の補綴物は汚染されている場合が多く、この汚染が原因となって肺炎等を引き起こすケースも少なくない。

プラークが付着しない歯科補綴物や、プラークが付着しにくくなる歯面修飾法が開発されれば歯科臨床に対する貢献は極めて大きいと考えられる。

人工臓器やカテーテルなどの表面処理法としてすでに臨床応用されている。細胞膜と類似の分子構造を有する合成リン脂質ポリマーは著明なタンパク質抑制効果を示す（Ishihara, et al. Modification of polysulfone with phospholipid polymer for improvement of blood compatibility. part 2. Protein adsorption and platelet adhesion. Biomaterials 20 1553-59）。生体リン脂質は細菌付着抑制にも有効である

ため、合成されたリン脂質ポリマーも、細菌付着防止（プラーク形成抑制）に有効ではないかと考えたことが本研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

近年の超高齢化社会の到来に伴い、高齢者の口腔内ケアは重要な課題となっている。高齢者は自分でうまくブラッシング出来ない人も多く、それをサポートする環境は進歩しているとはいえ、まだまだ人手も足りていないのが現状である。また、口腔内の細菌は、齲蝕、歯周病、誤嚥性肺炎等の様々な問題を引き起こす原因となっている。本研究では、歯冠修復物に使用されている金属、義歯用のレジン、さらには天然歯の表面にリン脂質をコーティングすることで、それぞれの表面に付着する細菌叢（バイオフィルム）を抑制することを目的としている。

3. 研究の方法

（1）リン脂質ポリマー修飾法の検討

リン脂質ポリマー修飾による細胞付着防止については、乾燥等による修飾条件が細胞付着防止能や持続性に大きな影響を及ぼすことが知られているため、プラーク付着抑制に関しても、修飾条件の検討を行う。試料にリン脂質ポリマーをディップコーティングし、エタノールバス中にて静置した後、乾燥させる。コーティング時間や回数を変動させて、試料表面をリン脂質ポリマーで修飾する。修飾した試料でミュータンス菌を培養し付着抑制効果を検討する。

（2）プラーク付着抑制能の定量化

材料および修飾法を変動因子として、プラーク付着抑制能を定量化する。なお付着抑制能が異なる場合を想定し、静的培養によるプラーク付着実験（プラーク抑制能が強い場合）および動的培養によるプラーク付着実験（プラーク抑制能が弱い場合）を行う。種々の条件でリン脂質ポリマー修飾、あるいは、未修飾の試料表面に *Streptococcus mutance* (UA159 株) を播種し、Brain Heart Infusion (BHI) 培地を用いて、CO₂ インキュベーター、あるいは、恒温振盪機(振盪数 150) 内で 1～2 日間培養する。それぞれの条件で培養後の試料表面について、目視観察、および、付着菌数の定量化を行い、リン脂質ポリマー修飾によるプラーク形成抑制効果を評価する。付着菌数の定量については、以下の付着菌数の定量法および付着菌の重量測定による定量法の 2 法についてその有用性を検討する。

Streptococcus mutance 菌の計数

試料表面に付着した *Streptococcus mutance* 菌を剥離し、BHI にリン酸緩衝生理

食塩水 (PBS) を添加した溶液に分散させる。この菌懸濁液を希釈し寒天培地で培養しコロニー数をカウントした。

Streptococcus mutance 菌重量の計測

試料表面に付着した *Streptococcus mutance* 菌を剥離し、遠心分離により付着菌を回収する。遠心上清を除去し、残存物を凍結乾燥した後、付着菌重量を計測する。

（3）プラーク付着抑制効果が有効な材料の検討

試料として、金属材料（銀合金、金銀パラジウム合金、純チタン）レジン（加圧重合レジン）および、歯質（牛歯）を用いる。銀合金、金銀パラジウム合金、純チタンについては、1.5 cm×1.5 cm×1.0 mm のサイズの金属板を作製し、この金属板を耐水研磨紙にて #400、あるいは、#1500 まで研磨した試料と、さらに、粒径 0.3 μm のアルミナ粉末を用いて、鏡面研磨した試料を作製する。加圧重合レジンについては、1.5 cm×1.5 cm×1.0 mm のサイズのレジン床を作製し、臨床で用いられる義歯床と同様にパフホイールを用いて研磨した試料を作製する。牛歯は唇面と舌面に分割し、エナメル質表面を耐水研磨紙にて #400、#1500 まで研磨した試料と、さらに、粒径 0.3 μm のアルミナ粉末を用いて、鏡面研磨した試料を作製する。以上の試料に、リン脂質ポリマー修飾を行った後、プラーク培養を行い、リン脂質ポリマー修飾によるプラーク付着抑制が有効な材料を検討する。なお、対照は未修飾試料とする。

4. 研究成果

（1）リン脂質ポリマー修飾法の検討

今回の研究ではリン脂質ポリマーの表面修飾法としてディップコーティング法を選択した。ディップコーティングを 5 分行い、エタノールバス（エタノール雰囲気下）に 20 分おいて真空乾燥を行った。より良いコーティング方法を模索するために

ディップコーティング 5 分のみ

ディップコーティング 5 分→エタノールバス 20 分→真空乾燥半日

ディップコーティング 5 分→エタノールバス 20 分→ディップコーティング 5 分→エタノールバス 20 分→真空乾燥半日

ディップコーティング 5 分→エタノールバス 20 分→ディップコーティング 5 分→エタノールバス 20 分→ディップコーティング 5 分→エタノールバス 20 分→真空乾燥半日

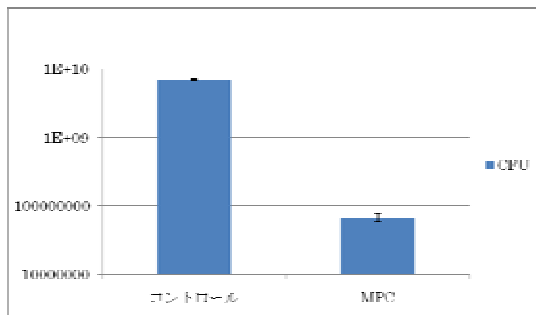
と 4 種類のコーティング方法を選択し、それぞれに関して純チタンの金属板に の方法、 の方法、 の方法でコーティングした試料そして、コントロールと 5 つの試料を準備した。それぞれの試料上で *Streptococcus mutance* (UA159 株) を培養し、2 日間培養後、試料表面を生理食塩液入りの洗

瓶で洗浄し、試料上に残存している菌数を計測した。
一番細菌が付着していたのはコントロールで、の方法でコーティングした試料はコントロールよりも細菌の付着数は少なかったが、の方法よりも細菌の付着数は有意に多かった。の方法はの方法よりも細菌の付着数は減少していたが、の方法よりは付着数が多かった。以上のことから、今回の研究で用いるコーティング方法はの方法を選択した。

(2) プラーク付着抑制能の定量化

Streptococcus mutance 菌の計数

純チタンの金属で出来た試料 (10mm × 10mm × 1mm) を鏡面研磨し、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) 液に5分間ディップコーティングし、エタノールバスで20分間乾燥、この作業を2回繰り返したあと、真空乾燥を半日行い、リン脂質ポリマーを表面修飾した。この試料と、コントロール(リン脂質ポリマー修飾を行ってない試料)を5枚ずつ12穴のウェルに入れ、培養液として0.1% sucrose 含有の BHI を1穴あたり2ml 入れ、*Streptococcus mutance* (UA159 株) を25μL 播種し2日間インキュベータで培養した。培養後試料を生理食塩液入りの洗瓶で洗い、付着している S. Mutans を BHI で攪拌して100μL 採取し、希釈した後寒天培地上に播種し24時間インキュベータで培養し、コロニーの数を計測した。



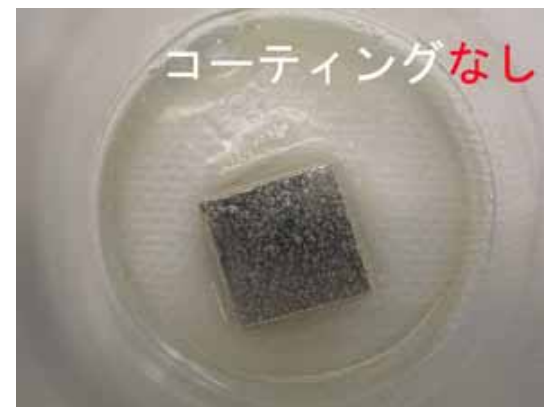
リン脂質ポリマーをコーティングした試料としてない試料では明確な有意差を得ることが出来た。

上記の結果は試料上に出来たミュータンスの膜が洗瓶で洗ったときに、コーティングしてある方の試料から一塊の膜となって剥がれ落ちていたので洗瓶で洗わなくていいように(より実験手技によるエラーをなくすために)動的(唾液の流動性を考慮した)実験を行った。静的実験と同様の手順で試料を作製し、培養をインキュベーター内ではなく、恒温振盪槽で一定の振盪数で培養した。2日間培養した後の肉眼所見を下に示す。リン脂質ポリマーをコーティングした試料は表面

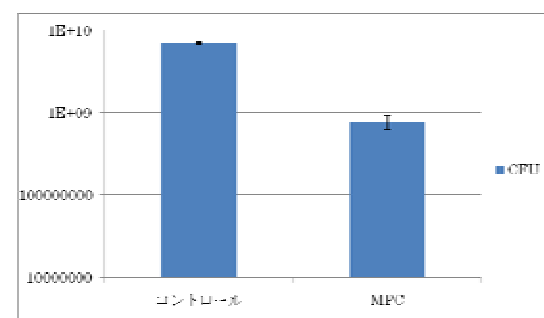
は鏡面状態を保っており、プラークの沈着は殆ど認められなかった。これに対して、コーティングしてない方の試料の表面はプラーク



クがまんべんなく沈着しておりその差は見た目で明らかな物となった。



試料上にプラークはほとんど残存しておらず、表面は鏡面状態を維持していた。コーティングした試料と比較して、著明なプラークの残存が試料上に観察された。



残存していた細菌数は上記の通りで、静的実験ほどの差を得ることは出来なかったが、有意に付着量が減少していることがわかった。

Streptococcus mutance 菌重量の計測

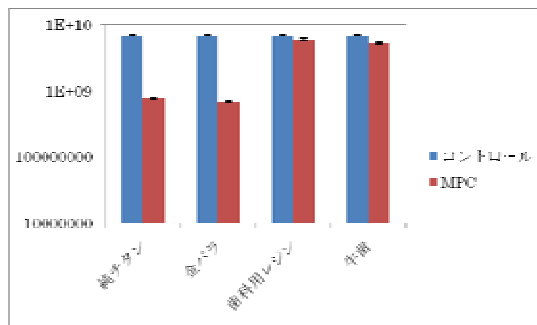
試料表面に付着した *Streptococcus mutance* 菌を剥離し、遠心分離により付着菌を回収する。遠心上清を除去し、残存物を凍結乾燥した後、

付着菌重量を計測したが、付着菌の量が少なすぎるため、安定した結果を得ることは出来なかった。

(3) プラーク付着抑制効果が有効な材料の検討

これまでの実験で試料は全て純チタンで出来ている金属試料を用いていたが、その他に歯科で使われる材料、金銀パラジウム合金 (CASTWELL M.C. 12%GOLD GC) 歯科用レジン、牛歯を用いて、同様の研磨手順を経て試料を作製した。

なお、培養方法は実験(2) プラーク付着抑制能の定量化の *Streptococcus mutans* 菌の計数における動的培養法を用いた。



金属試料においては(2)の実験結果と同様の結果が得られたが、歯科用レジンと牛歯ではコーティングした試料としてない試料とで有意な差を得ることが出来なかった。同様の研磨方法を用いたのだが、試料の構造上コーティングがうまくできていなかったと考えられる。今後の検討課題である。

(4) 口腔内での評価

実際に口腔内での実験を行うために、上顎の印象を採得し、模型を作製、模型上で口蓋を覆うタイプの床を歯科用レジンで作製し、リン脂質ポリマーを修飾した物をしてない物をそれぞれ3日間口腔内で実際に使用した。なお、歯磨きは1日2回、床を外してから行う物とした。

結果的に、プラークは床縁のわずかな部分にしか付着しておらず、コーティングした床としてない床との間に有意な差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的野 良就 (MATONO YOSHINARI)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号: 30432917