

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19041

研究課題名（和文）難治性のバイオフィーム感染症に対する多機能性EDTA系根管洗浄剤の開発

研究課題名（英文）Development of multifunctional EDTA-based root canal irrigant for refractory biofilm infections

研究代表者

藤巻 龍治（Fujimaki, Ryuji）

神奈川県立歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90769332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：強アルカリ性領域に調整した高機能性EDTA溶液の、細菌に対する抗菌作用、バイオフィーム除去作用測定による有機質溶解作用、および象牙質スミヤ層除去効果と象牙質脱灰能による無機質溶解作用の基礎的研究評価の研究報告し抗菌作用、バイオフィーム除去作用および、優れたスミヤ層除去作用を示し、さらに化学的に安定した優れた根管洗浄であることが示され、有機質および無機質溶解作用を有し、化学的安定性に優れた単独使用可能な根管洗浄剤であることが示された

研究成果の学術的意義や社会的意義

中性領域でのEDTA溶液単独では抗菌作用、有機質溶解作用を持ち合わせておらず、加えてNaClO溶液とEDTA溶液の併用時にEDTAが有するキレート作用の阻害効果が報告されており有機質と無機質の両方が除去可能な一本化した根管洗浄液が存在していなかった。しかしながらpHを強アルカリ性領域に調整することでEDTA溶液は細菌細胞壁を破壊し、細菌増殖を抑制し抗菌作用を有すること、ハイドロキシアパタイトに結合した有機質成分を溶解することが確認されたことで、EDTAを強アルカリ性領域に調整した、新規多機能性根管洗浄液の開発は臨床応用への可能性が非常に高い研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Fundamentals of the antibacterial effect of a highly functional EDTA solution adjusted to a strongly alkaline region, the organic matter dissolving effect by measuring the biofilm removal effect, and the inorganic dissolving effect due to the dentin smear layer removal effect and dentin demineralization ability. A research report of a research evaluation showed that it has antibacterial activity, biofilm removal effect, and excellent smear layer removal effect, and is also a chemically stable and excellent root canal cleaning agent, and has an organic and inorganic dissolving effect. It was shown to be a root canal cleansing agent with excellent chemical stability that can be used alone.

研究分野：歯内療法

キーワード：EDTA アルカリ性 根管洗浄剤 抗菌効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯内療法で良好な予後を得るためには、根管洗浄液を用いた化学的清掃が必要不可欠である。化学的清掃法としては、有機質に有効な次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) 溶液と無機質に有効なエチレンジアミンテトラ 4 酢酸 (EDTA) 溶液を併用した根管洗浄法が推奨されている。しかしながら、これら 2 種類の溶液併用法は、操作の煩雑性、薬液の飛散による軟組織障害、有効塩素濃度低下に伴う薬剤劣化や不快な塩素臭、長時間使用による健全な根管象牙質の過脱灰や歯根破折リスクの向上などが懸念されている。さらに難治性根尖性歯周炎の治療に対し執拗な抵抗を示すことが報告されている *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) は根管象牙質への侵入と根尖孔外へのバイオフィーム形成による強い薬剤抵抗性を示すことにより、根管治療が困難になることが多数報告されている。現在、単体で殺菌作用、有機質除去作用および無機質溶解作用を有する根管洗浄剤は存在しない。そこで、単体で有機質および無機質に有効な多機能性根管洗浄剤を検討した。

2. 研究の目的

感染根管治療においてファイル等を使用した根管形成では、根管内の感染源の約 50% が残存することが示されている。根管内感染源除去には、根管洗浄剤による化学的な根管感染源除去が、必須である。根管洗浄剤には、有機質除去作用と無機質溶解作用を有する根管洗浄剤を必要としている。

本研究は、アルカリ性領域に調整した多機能性 EDTA 溶液を使用することで、有機質溶解作用と無機質溶解の両機能を有する多機能性の「根管治療用洗浄剤」の開発を目的とした。



3. 研究の方法

(1) ヒト抜去歯根管モデルを用いた難治性バイオフィーム分解効果を有する新規多機能性 EDTA の根管清掃効果を行ない、根管象牙質における象牙細管の解析を行なう。また、根管洗浄に使うための安全性を評価することを目的として、難治性のバイオフィーム感染症に対する多機能性 EDTA 系根管洗浄剤のヒト歯肉線維芽細胞への影響を解析する

ナノインデンテーション法(超微小押し込み硬さ試験)による脱灰象牙質の評価

ヒト単根抜去歯の歯冠切除後、垂直方向に切断し、断面が上面となるようにオストロン(ジーシー)に包埋する。耐水研磨紙 #2,000 を用いて健康象牙質を露出させ、表面が平面となるまで研磨を行ない、象牙質表面にスミヤー層を実験的に形成する。サンプルの半面をメンディングテープで覆い、残り半分に対し試作 EDTA 溶液 (pH12.3 0.09mol/l EDTA, 日本歯科薬品) を 1 分、2 分、5 分、10 分、60 分と計時的に作用させ、各時間の根管象牙質表面硬さを超微小押し込み硬さ試験機 (ENT-1100a エリオニクス) にて、押し込み硬さ (HIT)、マルテンス硬さ (HM) および押し込み弾性率 (EIT) の測定を行う。なお、統計学的解析は Unpaired t-test ($P < 0.01$) を用いて評価する。

根管象牙質表面の電顕的評価

実験 1 の終了後、サンプルの試験片に白金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡 (SS-550, 島津製作所) にて任意の点 (3 か所) を 5,000 倍で撮影し、脱灰状態の判定を行い、その後象牙質表面をレジンで覆い垂直に切断する。切断面に白金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡および電子線マイクロアナライザー (EPMA-8705TH, 島津製作所) にて観察し、脱灰の程度についても検討する。

(2) 感染根管から多く検出される *Porphyromonas gingivalis* と *Porphyromonas endodontalis*, 難治性根尖性歯周炎より検出される *Enterococcus faecalis* と真菌である *Candida albicans* に対する難治性バイオフィーム分解効果を有する新規多機能性 EDTA の殺菌効果およびバイオフィーム形成阻害効果を評価し、口腔内細菌に対する有効性を明らかにする。

根管洗浄液の殺菌効果

感染根管から多く検出される *Porphyromonas gingivalis* や *Porphyromonas endodontalis* や、難治性根尖性歯周炎より検出される *Enterococcus faecalis* と *Candida albicans* をブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地で 18 時間培養したものをを用いる。各供試菌液を BHI 寒天培地上に無菌的に塗抹後、直径 6 mm の滅菌ろ紙に被験試料を各 10 μ L ずつ滴下させた後、*P. gingivalis* と *P. endodontalis* および *E. faecalis* は 37 $^{\circ}$ C, 5 日間嫌気培養を、*C. albicans* は 37 $^{\circ}$ C, 2 日間好気培養を行ない、培養後ろ紙周囲に形成された発育阻止円の直径を測定し評価する。

根管洗浄液の細菌増殖抑制効果

2 倍濃度の BHI 液体培地と各供試試料を混合させたものに、*P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *E. faecalis* および *C. albicans* を加えて、37 $^{\circ}$ C, 18 時間嫌気培養を行ない、経時的に試料を採取後、波長 600 nm で濁度測定する。

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

(3) 根管象牙質を用いた根管充填時と支台築造時における残留根管洗浄液の影響を明らかにする。 根管象牙質表面における引張接着試験

実験にはウシ下顎前歯を用いる。冷凍保存ウシ歯を解凍後、歯頸部で歯冠部と歯根部を低速精密切断機 (ISOMENT, BUEHLER) で切断分割し、流水洗浄後の歯根部を用いる。調整したウシ下顎前歯歯根の歯髄を抜去後、歯軸方向に歯根を2分割し、根管内象牙質が上面となるように常温重合レジンに包埋し、耐水研磨紙 #600 を用いて表面が平面となるまで研磨を行い、象牙質表面に実験的にスマヤー層を付与し接着試験用試料とする。

接着試験用試料は溶液別に、試作 EDTA 溶液 (EDTA 群)、スメアクリーン (SC 群)、未処置 (コントロール群) の3群に分類し、各溶液をマイクロブラシにて象牙質面に塗布し2分間処理した後、水洗、乾燥を行った後、各試料に接着面積を規定するため直径3mmの穴の開いた厚さ約60 μ mのメンディングテープ (3M) を貼付する。接着用レジンセメントにはパナピア V5 (クラレノリタケ) を用いて、業者指示通りにトゥースプライマーにて被着象牙質面を20秒間処理後、エアーにて乾燥させ、セメントを直径5mmのステンレス製接着子に盛り、手指にて被着面に圧接し、その後1kgの荷重を垂直に5分間負荷する。負荷中に余剰セメントの除去及び左右2方向から可視光線照射器にて各30秒間光照射し硬化させた後、直ちに37 $^{\circ}$ C 100%湿度環境中に24時間保管する。保管後、卓上型万能試験機 EZ Test (EZ-S500N 島津製作所) を用いてクロスヘッドスピード1.0mm/minにて引張接着試験をおこなう

4. 研究成果

強アルカリ性領域に調整した高機能性 EDTA 溶液の、細菌に対する抗菌作用、バイオフィーム除去作用測定による有機質溶解作用、および象牙質スマヤー層除去効果と象牙質脱灰能による無機質溶解作用の基礎的研究評価の研究報告を2編の原著論文にて行った。

pH 調整による EDTA 溶液の根管象牙質に及ぼす影響. 日歯保存誌. 63(5) : 425-431. 2020

Bactericidal effect of a novel alkaline EDTA root canal cleaning solution. Eur J Dent. 15(3): 546-550 2021.

アルカリ性 EDTA 溶液は、抗菌作用、バイオフィーム除去作用および、優れたスマヤー層除去作用を示し、さらに化学的に安定した優れた根管洗浄であることが示され、有機質および無機質溶解作用を有し、化学的安定性に優れた単独使用可能な根管洗浄剤であることが示された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Sato Takenori, Fujimaki Ryuji, Suzuki Jiro, Hamada Nobushiro, Tani-Ishii Nobuyuki, Handa Keisuke | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Bactericidal Effect of a Novel Alkaline EDTA Root Canal Cleaning Solution | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Dentistry | 6. 最初と最後の頁 546~550 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0041-1723067 | 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 藤巻龍治, 鈴木二郎, 石井信之 | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 pH調整によるEDTA溶液の根管象牙質に及ぼす影響 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌 | 6. 最初と最後の頁 425~431 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤巻龍治, 鈴木二郎, 浜田信城, 石井信之 |
| 2. 発表標題 アルカリ性EDTA溶液を用いたE. faecalis に対する抗菌効果の臨床的解析 |
| 3. 学会等名 日本歯科保存学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 藤巻 龍治 |
| 2. 発表標題 多機能型根管洗浄溶液による象牙質接着能に対する評価 |
| 3. 学会等名 日本歯科保存学会春季学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤巻 龍治 |
| 2. 発表標題 EDTA系化学的洗浄材による根管象牙質に対する接着能の評価 |
| 3. 学会等名 日本歯科保存学会春季学術大会 |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤巻 龍治 |
| 2. 発表標題 試作EDTA溶液の根管象牙質に対するレジン接着性への影響 |
| 3. 学会等名 日本歯内療法学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------|---------|
| | |