

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10052

研究課題名(和文) 義歯床深層にカンジダ菌を定着させない抗菌性義歯床用材料の開発

研究課題名(英文) Development of antimicrobial denture base material to prevent a colony of *Candida albicans* in the deep layer

研究代表者

阿部 泰彦 (Abe, Yasuhiko)

広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授

研究者番号：00253097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、義歯床用裏装材の表層劣化と基材との接着界面剥離に伴うカンジダ菌の深層への侵入・定着を想定し、抗菌剤「塩化セチルピリジニウム(CPC)担持モンモリロナイト(Mont)」を配合した義歯床用軟質裏装材を試作した。試作品のJIS規格物性、抗菌性能、CPC徐放およびリチャージ特性について検証し、低徐放性3重量% CPC-Mont配合試作品が抗菌性義歯床用軟質裏装材の有用な候補であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

義歯床粘膜面(表層)や床内部(深層)に定着したカンジダ菌は完全に消失せず、口腔カンジダ症は再燃する。特に、義歯床用軟質裏装材の長期使用では、カンジダ菌の深層定着がよく認められる。抗菌性義歯床用軟質裏装材は、これらの問題を解決する適切な臨床的対処方法と成り得る。したがって、本研究の成果は、学術的意義のみならず、高齢義歯装着患者の口腔衛生管理を可能とし誤嚥性肺炎予防の一助となり社会的意義も有する。

研究成果の概要(英文)：The surface layer deteriorated of denture lining materials and separation of adhesive interface with base material cause penetration and colonization in the deep layer of *Candida albicans*. The purpose of this study was to evaluate the JIS T 6520:2019 standard, antimicrobial ability, and controlled release and recharge ability of cetylpyridinium chloride (CPC) of antimicrobial denture soft lining materials containing 0 and 1, 3 wt% CPC-montmorillonite (Mont) of high or low release types, respectively (Hc1%, Hc3%, Lc1%, Lc3%). For water absorption on the JIS standard, the nonstandard results (Hc3% > Hc1% > Lc3% > Lc1% > 40 micro-g/mm³) depended on the water absorption ability of Mont. Lc3% sample exhibited enough antimicrobial activity against *C. albicans* such as *S. aureus* and *S. mutans*. The controlled release of CPC equaled the antimicrobial ability. However, the recharge ability was not proved. Lc3% sample is a potential candidate as antimicrobial denture soft lining material.

研究分野：補綴系歯学関連

キーワード：義歯床用軟質裏装材 カンジダ菌 抗菌性 塩化セチルピリジニウム(CPC) モンモリロナイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔カンジダ症は、カンジダ菌(真菌)による口腔感染症で、主に、抵抗力の減弱した高齢者や免疫不全、ステロイド治療、および抗生剤の不適切な長期使用に該当する患者に発症する。一般に、適切な抗真菌薬の使用で症状は軽快・治癒する。しかしながら、カンジダ性義歯性口内炎では、再燃を繰り返すことが知られており、この原因は義歯がカンジダ菌の温床になっているからである(山崎ら、2011)。カンジダ菌は、義歯床粘膜面に容易に定着するため、通常、義歯用ブラシによる機械的清掃と義歯洗浄剤による化学的洗浄により、カンジダ菌の定着は予防される。しかしながら、このような義歯の衛生管理を行ったとしても、義歯床粘膜面(表層)や床内部(深層)に定着したカンジダ菌は完全に消失せず、口腔カンジダ症は再燃する。義歯床深層にカンジダ菌が定着する原因として、義歯の使用期間が長く、未重合部位、マイクロクラック、気泡等の存在が報告されている(Kobaら、2013)。特に、口腔内で直接裏装した常温重合型床裏装材の部位では、義歯の使用期間が短くても、深層にカンジダ菌の定着が多く認められる。そこで、中村ら(2001)は、義歯床内部(表層から約1mm深層でカンジダ菌を同定)におけるカンジダ菌を消失させる有効な方法を検証する必要性を唱えた。すなわち、最も有効な方法は、義歯床自体に抗菌性を付与することである。抗菌性義歯の設計コンセプトは、義歯床表層を機械的清掃と化学的清掃により衛生的に管理し、同時に、深層にカンジダ菌を侵入させない抗菌性能を付与することである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、当初、カンジダ菌が義歯床深層まで定着する実験モデルを構築し、このモデルを用いて抗菌性義歯床用材料の検証を行うことで、抗菌性義歯の実用化を目指すものであった。しかしながら、「紫外線」と「サーマルサイクル」の併用で義歯床用材料の劣化促進を試みたものの、深層へのカンジダ菌の侵入・定着は困難であることが判明した。そこで、臨床で観察される義歯床用裏装材の表層劣化と基材との接着界面剥離に伴うカンジダ菌の深層への侵入・定着を想定し、義歯床用軟質裏装材へ抗菌性能を付与し、抗菌性義歯床用軟質裏装材の実用化を目指す。

3. 研究の方法

(1) 試料作製

アクリル系義歯床用軟質裏装材に抗菌剤「塩化セチルピリジニウム(CPC)担持モンモリロナイト(Mont)(**図1**)」の高徐放性タイプ(CPC初期徐放量(mg/g):80~120)と低徐放性タイプ(CPC初期徐放量(mg/g):10~16)の2種類(粒度分布(μm):D50 5;D90 10)を、粉末に対して各1および3重量%配合した4種類の試料(Hc1%、Hc3%、Lc1%、Lc3%)を試作し、また、抗菌剤を配合しない試料をコントロール(Ctrl)とした。

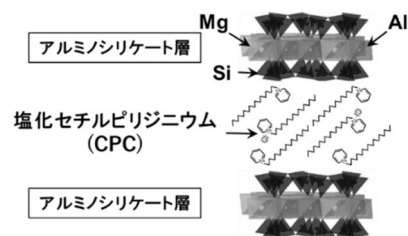


図1 無機系抗菌剤の構造

(2) 義歯床用長期弾性裏装材 JIS T 6520:2019 規格試験(改変)

24時間後および30日後のデュロメータA硬さ

試料形態は、直径40mm、厚さ5mmとし、37℃蒸留水に浸漬した。24時間後、蒸留水から取り出し、試料辺縁から5mm以上離し、表面に均等に分散させた5荷重点を3分以内に測定した。30日後も同様に、前回の荷重点から2mm以上離して測定した。試料2個の平均値が規格値(タイプ 柔らかい:24時間後、25を超え55以下;30日後、65以下)に適合するか検証した。

接着強さ

試料を接着させるPMMA義歯床用プレートは、25mm四方、厚さ3mmとし、両面はP500耐水ペーパーで研磨した。義歯床プレートに内径10mm、高さ2mmのリングを設置し、試料を填入後、もう1つの義歯床プレートで圧接し、クランプで締め付けた。室温(23±2℃)で1時間硬化させ、37℃蒸留水に24時間浸漬し、引張試験に供した。試料2個について規格値(アクリル系0.6MPa以上)に適合するか検証した。

吸水量・溶解量

試料形態は、直径50mm、厚さ1mm、体積(V)1962.5mm³とした。試料を37℃デシケータに24時間静置後、23℃デシケータに60分間静置し、取り出し質量を測定した。シリカゲルを交換し、前述の操作を、恒量(m₁)に達するまで、すなわち質量減少が0.2mg以下になるまで繰り返した。次に、試料を37℃蒸留水に7日間(168±2時間)浸漬した後取り出し、タオルで水気を拭き、空気中で15秒間振り動かし、取り出しから60秒後の質量(m₂)を測定した。その後、恒量(m₁)と同様の操作を行い、恒量(m₃)を測定した。

試料2個について、吸水量 W_{sp} ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) = $(m_2 - m_3)/V$ 、溶解量 W_{s1} ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) = $(m_1 - m_3)/V$ を求め、

規格値（アクリル系給水量 40 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ 以下；溶解量 15 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ 以下）に適合するか検証した。

(3) 抗菌試験

Lc1%、Lc3%およびCtrlの3試料各3個について、抗菌試験（ディスク拡散法、比濁法）を実施した。試料形態は、直径6 mm、厚さ1 mmとした。被検菌は、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (NBRC 12732)、ミュータンス菌 *Streptococcus mutans* (NBRC 13955)、カンジダ菌 *Candida Albicans* (NBRC 1594)の3菌とした。

ディスク拡散法では、 $1 \times 10^7/\text{ml}$ の *S. mutans* および *S. aureus* の BHI 溶液、 $3 \times 10^7/\text{ml}$ の *C. albicans* の YM 溶液を寒天培地に塗布し、その上に試料を静置、24 時間後の増殖を観察した。

比濁法では、試料を 24well plate に静置し、 $3 \times 10^{-8}/\text{ml}$ の *S. mutans* および *S. aureus* の BHI 溶液、 $3 \times 10^{-8}/\text{ml}$ の *C. albicans* の YM 溶液をそれぞれ 1ml 添加し、24 時間後の濁度を測定した。

(4) CPC 徐放量測定

Lc1%、Lc3%の2試料各1個について、CPC 徐放量の測定を行った。試料形態は、直径50 mm、厚さ1 mmとした。試料をペトリディッシュの底部に貼付、25 mL 蒸留水を注入、37 で1時間振とう後ポリプロピレンチューブに溶液を回収した。以後、37 で24時間振とう後溶液を回収する工程を28日間繰り返した。回収溶液は、分光光度計 UV-3100(PC)S (Shimadzu、京都)を用いて波長259 nmで吸光度を測定し、検量線よりCPC 徐放量 (mg/cm^2) を定量した。

(5) CPC リチャージの検証

CPC 徐放試験28日後の試料を用いて、25 mL 5% CPC 溶液を注入、37 で6時間振とうし、CPC リチャージ試料とした。以後、25 mL 蒸留水を注入、37 で24時間振とう後溶液を回収する工程を3日間繰り返した。

4. 研究成果

(1) 義歯床用長期弾性裏装材 JIS T 6520:2019 規格試験（一部改変）結果（表1）

抗菌剤を配合した試料の給水量は、JIS 規格外であった。これは、抗菌剤の Mont の吸水性能に起因し、配合量が増加すると給水量も増加していた。その他のパラメータについては、JIS 規格内であった。

表1 義歯床用長期弾性裏装材 JIS T 6520:2019 規格試験（一部改変）結果

試料	デュロメータ A 硬さ		接着強さ	給水量	溶解量
	24 時間後	30 日後			
JIS	25 <, 55	65	0.6 MPa	40 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$	15 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$
Ctrl01	33.2	29.8	1.09	21.2	1.14
Ctrl02	33.4	28.4	0.98	19.2	1.31
Hc1%01	32.8	31.2	1.33	63.7	2.29
Hc1%02	33.6	30.6	1.12	62.9	1.83
Hc3%01	33.6	31.2	1.15	83.6	2.96
Hc3%02	34.2	31.4	1.27	90.0	2.34
Lc1%01	32.4	28.4	1.09	46.5	1.67
Lc1%02	33.0	29.2	1.33	49.5	1.96
Lc3%01	32.6	28.4	1.15	61.0	2.80
Lc3%02	33.4	27.6	1.29	60.5	3.00

(2) 抗菌試験結果

Lc1%、Lc3%およびCtrlの3試料についてディスク拡散法の結果を表2に、比濁法の結果を図2に示した。以上より、黄色ブドウ球菌およびミュータンス菌に対してはLc1%で抗菌性を示したが、カンジダ菌に対してはLc3%で前述2菌と同等の抗菌性を示した。

表2 抗菌試験（ディスク拡散法）の結果（mm）

被検菌	Ctrl	Lc1%	Lc3%
黄色ブドウ球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	6	8	10
ミュータンス菌 <i>Streptococcus mutans</i>	6	8	10
カンジダ菌 <i>Candida Albicans</i>	6	7	8

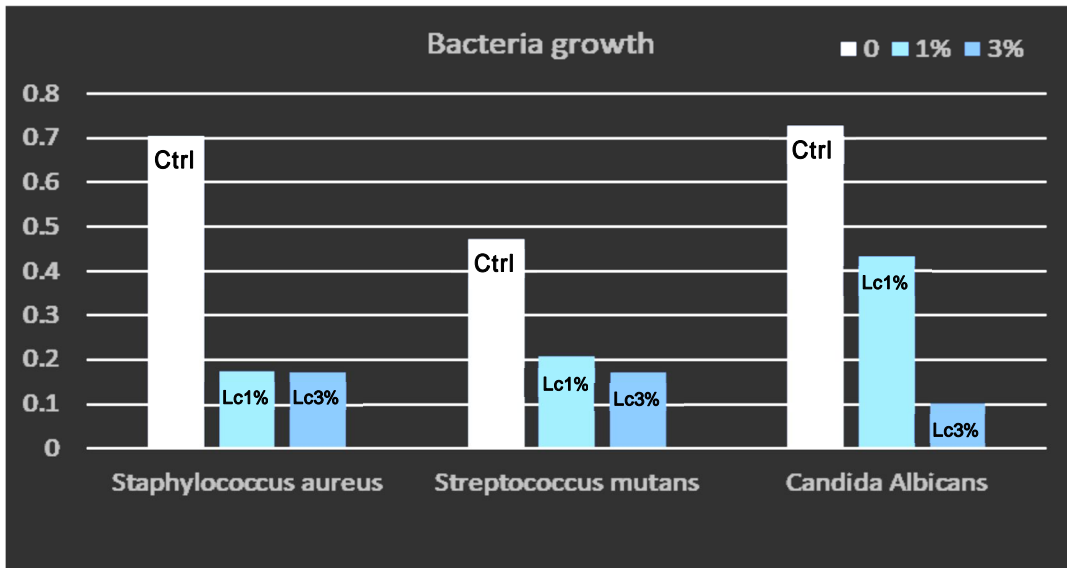


図2 抗菌試験（比濁法）の結果

(3) CPC 徐放量および CPC リチャージの検証結果（図3）

Lc1%、Lc3%の1時間後のCPC徐放量は0.0037 mg/cm²、0.0062 mg/cm²で、以後、徐放量は漸減し、28日後では0.0015 mg/cm²、0.0013 mg/cm²と同程度となった。参考データとして、粒度 (< 149 μm [100 mesh]) は異なるが、抗菌剤 CPC-Mont 低徐放性タイプを配合した抗菌性粘膜調整材「ティッシュコンディショナーCPC」のCPC徐放量も示した。「ティッシュコンディショナーCPC」のCPC徐放量は、1時間後で0.0176 mg/cm²、28日後で0.0024 mg/cm²である。すなわち、Lc1%、Lc3%のCPC徐放動態は、「ティッシュコンディショナーCPC」のゲル化状態と比較して、粘弾性を有するものの重合体であるため、徐放量の低位推移を示したと考える。

Lc1%、Lc3%のCPCリチャージ後の試料において、1日後のCPC徐放量が極めて多いことは、軟質裏装材の表面性状に起因するCPCの吸着し易さが原因と考える。そのため、2日、3日後も表面吸着のCPCが検出され、CPC-Mont本来のリチャージ性能を証明することは難しいと言える。すなわち、5%CPC溶液に浸漬しても、CPCは軟質裏装材の表面に吸着し、CPC-Mont層間へのリチャージが阻害されていると考える。

以上より、Lc3%試作品が抗菌性義歯床用軟質裏装材の有用な候補であることが示唆された。

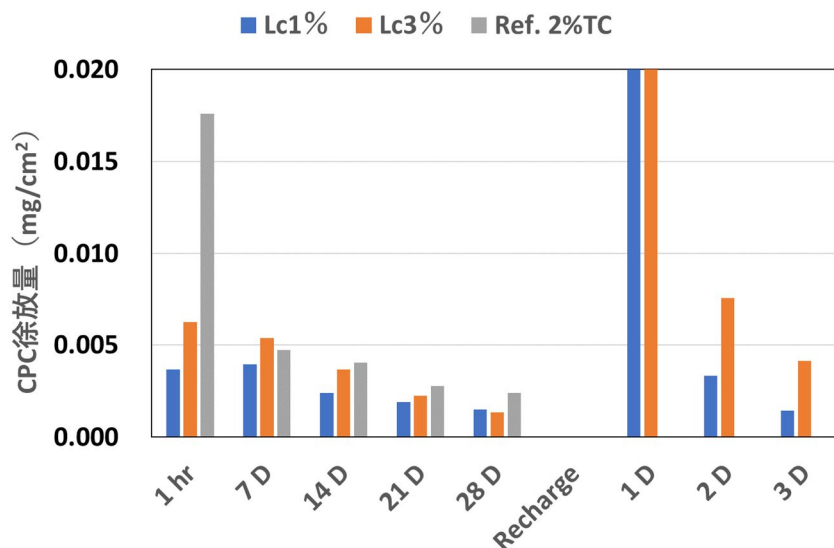


図3 CPC 徐放量および CPC リチャージの検証結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 ASAHARA Erika, ABE Yasuhiko, NAKAMORI Kiichi, OKAZAKI Yohei, MAKITA Yoji, HASEBE Akira, TSUGA Kazuhiro, YOKOYAMA Atsuro	4. 巻 41
2. 論文標題 Controlled release, antimicrobial activity, and oral mucosa irritation of cetylpyridinium chloride-montmorillonite incorporated in a tissue conditioner	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 142 ~ 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-155	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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部泰彦
2. 発表標題 第5回大型医療研究推進フォーラム 未来の歯科医療を見据えた革新的な研究開発に向けてーパート2「抗菌性粘膜調整材の開発における Strategic Choice Approach」
3. 学会等名 日本歯科医学会連合（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田靖弘, 吉原久美子, 長本香菜子, 中西 康, 赤坂 司, 阿部泰彦, 横山敦郎
2. 発表標題 歯科用コンビネーションプロダクトの実用化に向けた取り組み
3. 学会等名 令和3年度日本歯科理工学会北海道・東北地方会夏期セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉田靖弘, 横山敦郎, 阿部泰彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 第一歯科出版	5. 総ページ数 11
3. 書名 季刊 歯科医療	

〔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
研究分担者	岡崎 洋平 (Okazaki Yohei) (00706898)	広島大学・病院(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	吉原 久美子 (Yoshihara Kumiko) (90631581)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

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