様　式　C－19、F－19、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 26 年　 5 月　 7 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010～2013
課題番号：22592114
研究課題名（和文）クロルヘキシジン含有・歯科接着剤の抗菌性、接着耐久性の研究

研究課題名（英文）The effect of chlorhexidine to improve dentin bond durability

研究代表者
平石　典子（Hiraishi, Noriko）

東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・助教

研究者番号：20567747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,400,000円、（間接経費）　1,020,000円

研究成果の概要（和文）：Bis-GMA、HEMAを主組成とした親水性の異なる試作歯科接着剤を用い、機械的、性状的の違い評価し、象牙質に対する短期及び長期接着性試験を行った。またmethyl methacrylateベースの歯科接着セメントにて、クロルヘキシジン含有歯科材料を作製し、試作試料からのクロルヘキシジンの有効放出量をHPLC等にて測定し、Streptococcus mutans やEnterococcus faecalisに対する抗菌性を報告した。クロルヘキシジン含有の接着性歯科材料の、クロルヘキシジンの放出、付加に伴う物性の変化、殺菌効果、象牙質コラーゲンの劣化抑制効果を検討し、床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：I studied the effect of chlorhexidine incorporation into experimental dentin adhesives with different hydrophilicities on the chlorhexidine release and the microtensile bond strength to dentin after 24 h and 14 months after specimen preparation. The more chlorhexidine released the more hydrophilic resin co-monomers. Significant reduction in bond strength was observed in all adhesive groups, except for chlorhexidine-containing most hydrophobic adhesive. Also, MMA-based resin was used to measure chlorhexidine-release from resin cement by means of HPLC, and antibacterial effect against Streptococcus mutans and Enterococcus faecalis. The 3.0 and 4.0% chlorhexidine-incorporated cement exhibited chlorhexidine release for 5 weeks; however, more than 98% of chlorhexidine was retained in resin matrix. The 3.0 and 4.0% chlorhexidine-incorporated resin cement possessed prolonged chlorhexidine release and antibacterial properties for 2 weeks.

研究分野：保存修復学

科研費の分科・細目：基盤C　（一般）

キーワード：クロルヘキシジン　　歯科材料　象牙質　親水性　接着歯学

１．研究開始当初の背景
医薬用殺菌薬のクロルヘキシジンは、口腔粘膜への非侵襲的修復治療に一般に用いられる。このクロルヘキシジンは抗菌性に加え、歯質接着性の長期耐久性劣化を遅延する働きが報告されている。接着性劣化原因として象牙質基質から放出される MMP（Matrix Metalloproteinases）の存在が指摘されているが、クロルヘキシジンはジククロライド、ドキシサイクリンと並び、MMP 阻害剤として、歯科修復への使用が注目されている。象牙質削除後の歯面に３０秒間塗布したものは、象牙質コラーゲンの劣化が抑制されることが、in vivo, in vitro の研究において近年報告されている。そこで、長期効果的な薬剤の放出を考え、歯科接着材料そのものにクロルヘキシジンを付加する試みを行なった。クロルヘキシジン付加による、接着性、機械的物性、殺菌効果、MMP 阻害効果への影響を総括的に研究した報告は未だなされておらず、感染象牙質の残存細菌を減らす効果と共に、接着界面での象牙質コラーゲンの劣化を抑制させる効果を備えるクロルヘキシジンを付加した歯科材料の、臨床においての有効性を追求するものである。

２．研究の目的
クロルヘキシジン含有の接着性歯科材料の、クロルヘキシジンの放出、付加に伴う物性の変化、殺菌効果、象牙質コラーゲンの劣化抑制効果を検討し、短期、長期接着性への影響を包括的にとらえ、臨床応用の可能性を評価する。従来の市販されている歯科材料に加え、親水性の違いによる試験的接着性レジンを用いて、付加により本来のレジンの物性を劣化させない、またクロルヘキシジンの最大限の効果がみられる最適な付加量を確認することを目的とした。

３．研究の方法
①　ヒト象牙質への接着試験
親水性の異なる試作接着性材料さらにクロルヘキシジン含有セルフエッチングプライマーを用いて、ヒト象牙質接着資料を作成し、24 時間水中保存後の引っ張り接着強さの測定をマイクロテンサイル法により行い、破断面形態の観察を行う。さらに１年後水中保管した場合の、引っ張り接着強さの測定を行う。
②　試作資料からのクロルヘキシジン放出量測定（対象材料：試作歯質接着レジン、試作 PMMA セメント）
試作材料を硬化後、一定期間（4 週間から 12 週間）水中保存し、その保存水中に放出された、クロルヘキシジン量を UV 分光吸光光度計により測定する。また、より正確な測定方法として、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による検量を試みる。
③　試作資料の殺菌効果性の評価
う蝕原因菌の Streptococcus mutans と歯内疾患関連菌の Enterococcus faecalis に対する殺菌効果を検証する。硬化前の資料は Agar diffusion test にて、硬化後水中で保存した後の資料については、Direct contact test 法を用いる。後者は 96 ウェルマイクロタイタープレートを用いて、ウェル側面に試作材料を塗布後、硬化させ、一定期間３７度で保存したものに、直接、培養細菌を付着させ、細菌の増殖の過程を分析する方法である。Direct contact test 法は、レジン系など、硬化後に薬剤が放出しにくい材料の殺菌性を評価する場合、Agar diffusion test 法より勝るといわれている。

４．研究成果
①　ヒト象牙質への接着試験
親水性の異なるクロルヘキシジン含有試作エッチアンドリンスシステム接着性材料を用いて場合、クロルヘキシジン 2%含有により短期の接着強さは低下が見られなかった。見慣れなかった(図１)。

図 1　Values are mean ± S.D. (number of specimens). Different superscripts values indicate significant differences ($p<0.05$). Microtensile Bond Strength (MPa)

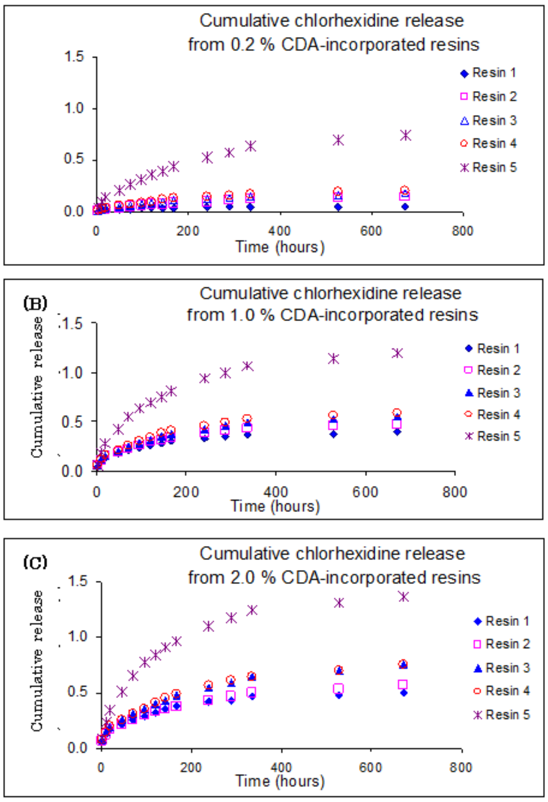
50 wt% ethanol-solvated resins	With 2% CHX	Without CHX
Resin 1 親水性+	20.3 ± 6.1 (41)[a]	19.0 ± 5.2 (40)[a]
Resin 2 親水性++	33.0 ± 6.2 (39)[b]	30.3 ± 5.9 (41)[b,d]
Resin 3 親水性+++	37.4 ± 4.8 (42)[c]	34.9 ± 7.1 (42)[b,c]

さらに１年後水中保管した場合の、引っ張り接着強さは、ほぼ全ての群で低下が見られたが、クロルヘキシジン含有の親水性の少ない Resin1 のみ低下が見られなかった。一方すべての群の中で、クロルヘキシジン含有の親水性のやや高い Resin3 が最も高い値を示した。
一方クロルヘキシジン含有セルフエッチングプライマーでは、０．５％の含有量なら、接着界面の物性、短期象牙質接着性に影響が出ないことが分かった。この場合、0.5%が最適含有量であり、これを超えた場合はレジンそのものの物性劣化が見られた。

②　試作資料からのクロルヘキシジン放出量測定

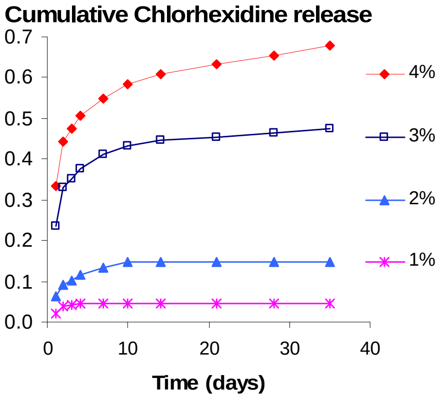
親水性の異なる試作接着性材料からの積算放出量は親水性の高い Resin5 が最も高く、親水性が低くなるとひくくなり、Resin1 が最も低い値だった(図 2).

図 2



3.0 % と 4.0 % 含有の PMMA セメントは 5 週間クロルヘキシジンの放出が見られたが、1.0 % と 2.0 %含有はそれぞれ 1 週間、2 週間のみに留まった(図 3)。

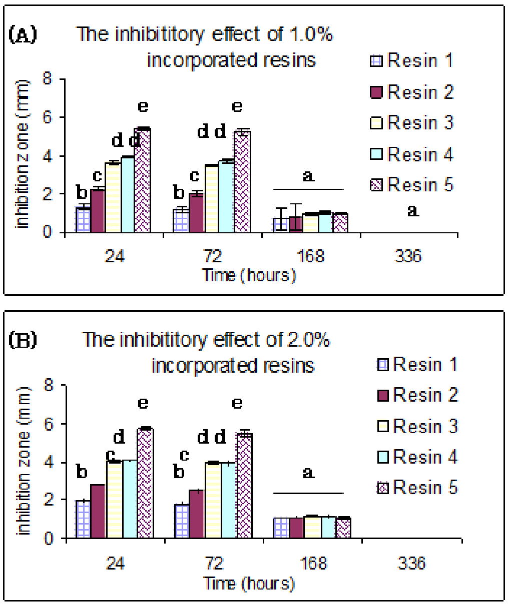
図 3



③ 試作資料の殺菌効果性の評価

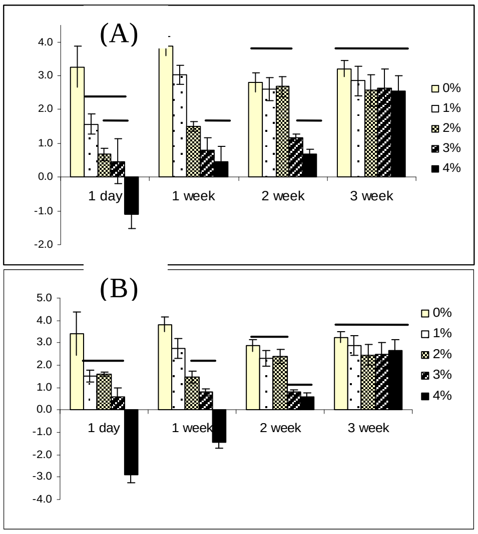
親水性の異なる試作接着性材料の抗菌性は親水性の高いものが徐効性が高かった (図 4)。

図 4
(A) 1.0%含有 (B) 2.0%含有



PMMA レジンセメント(Super-Bond C & B)では、有意な抗菌性は、3.0 % と 4.0 % 含有では 2 週間見られたが、低い含有度では長期抗菌性はなかった。長期抗菌性を PMMA レジンセメントに付加するためには、含有量は 3%または 4 %必要であることが分かった(図 5)。

図 5 Direct contact test にて Antibacterial effects of chlorhexidine-incorporated Super-Bond C & B against (A) Streptococcus mutant and (B) Enterococcus faecalis.



5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. Effect of natural cross-linkers incorporation in a self-etching primer on dentine bond strength. Islam S, <u>Hiraishi N</u>,

Nassar M, Yiu C, Otsuki M, Tagami J.

J Dent. 2012;40(12):1052-92.
doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.015
2. Effect of chlorhexidine incorporation into dental adhesive resin on durability of resin-dentin bond. Yiu CK, Hiraishi N, Tay FR, King NM. J Adhes Dent. 2012;14(4):355-62.
doi: 10.3290/j.jad.a25674.
3. Chlorhexidine release and antibacterial properties of chlorhexidine-incorporated polymethyl methacrylate-based resin cement. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010;94(1):134-40
doi: 10.1002/jbm.b.31633.

〔学会発表〕（計　6 件）
1.平石典子、田上順次.クロルヘキシジン含有歯科メチルメタクリレートセメントの長期性抗菌作用 第 133 回　日本歯科保存学会 (2010 年 10/28〜29)　岐阜
2.Islam Md. Sofiqul, Hiraishi Noriko, Otsuki Masayoki, Tagami Junji. Effect of Hesperidin Incorporation into the Primer of a Self-etching Adhesive on Micro Tensile Bond Strength to Dentin.(Oral & poster presentations) The 4th International Congress on Adhesive Dentistry (April 15th-17th, 2011) Millennium Seoul Hilton hotel, Seoul, Korea
3.Islam Sofiqul, Hiraishi Noriko, Otsuki Hasayuki, Tagami Junji Effect of Grape Seeds on Stabilization of Collagen and Remineralization of the Root Dentin Lesion. (Oral presentation) The 134th meeting of Japanese society of conservative dentistry (June 9th -10th, 2011) Tokyo Disney resort Tokyo Bay Club Resort Hotel, Chiba, Japan.
4.Islam Sofiqul, Hiraishi Noriko, Otsuki Masayoki, Tagami Junji. Effect of Incorporation of Hesperidin in a Self-etching Primer on Dentin Bond Strength. (Oral presentation) The 135th meeting of Japanese society of conservative dentistry (October 20th -21st, 2011) Osaka international house foundation, Osaka, Japan.
5.Islam Sofiqul, Hiraishi Noriko, Otsuki Masayoki, Tagami Junji. Effect of Cross-linker on Resin-dentin Bond Strength of Self-etch Adhesive. (Oral presentation) The 26th International Association of Dental Research South East Asia Division (November 3rd -4th, 2012), Hong Kong, China.
6.Nassar Mohannad, Hiraishi Noriko, Islam Md.Sofiqul, Yukihiko Tamurad, Masayuki Otsukia, Shohei Kasugaie, Keiichi Ohyad, Junji Tagamia, Tay Flanklin. Glutathione Detoxification of 2-hydroxyethylmethacrylate and Its Effect on Bond Strength. (Oral presentation) IADR/AADR/CADR General Session. (March 20th – 23th, 2013). Washington Convention Center, Seattle, Washington. USA
〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
平石典子　(HIRAISHI Noriko)
東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科う蝕制御学分野
特任助教
研究者番号：20567747

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：