

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592857

研究課題名(和文) 抗菌剤を使用しない抗菌歯科材料の開発とその臨床への応用

研究課題名(英文) Development and application of the antibacterial dental materials using salivary proteins

研究代表者

永留 初實 (nagadome, hatsumi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30284516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢社会を迎えた現代では、義歯床やそれに付与するティッシュコンディショナーを介して、細菌感染が起こり、全身疾患へ陥ることは稀ではない。そこで近年、多数の抗菌材を含む歯科材料開発の試みが行われている。しかし、これらの材料は生体に対してアレルギーなど、生体為害性を及ぼす可能性がある。そこで、通常で唾液に含まれる抗菌性蛋白質の局所濃度を上昇させる様な歯科材料を開発する、つまり抗菌剤を含まない抗菌歯科材料の開発を目的として研究を行った。

特に本研究では、高齢者の義歯に使用頻度の高いティッシュコンディショナーにこの方法を応用し、極めて生体親和性の高い抗菌ティッシュコンディショナーの開発を行った。

研究成果の概要(英文)：In the super-aged society, it is often the case that results in systemic disease by the bacteria with the tissue conditioner and denture. Many antimicrobial dental materials including antimicrobial agents have been developed in recent years. However, there is a possibility that they are harmful to the human body such as allergic. So, we want to develop a dental materials, such as increasing the local concentration of the antibacterial protein contained in the human saliva. In other words, this research was conducted for the purpose of development of antibacterial dental materials that do not contain any antimicrobial agents.

In the present study, we apply this method to tissue conditioner frequently used in denture and develop the tissue conditioner with high biocompatibility antibacterial.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：唾液 抗菌性蛋白質 抗菌歯科材料 ラクトフェリン

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会であるわが国において、80歳の1人平均現在歯数の推定値は9.8本であり、義歯装着者が多数を占める。義歯の口腔内へ与える影響は大きく、その維持管理はもっとも重要な課題のひとつとなる。

また近年、要介護患者の多くが免疫力の低下した易感染性であり、義歯の不十分な管理で、口腔カンジダ菌などによる義歯性口内炎を引き起こす。これらは誤嚥性肺炎、細菌性心内膜炎の引き金にもなり、症状が重篤になる可能性がある。

一方、義歯用ティッシュコンディショナーは不適合義歯や咬合不調などによる義歯床下粘膜の歪み、変形(圧痕)、発赤、褥瘡性潰瘍など、非生理的状态になった組織を生理的状态に回復することを目的とした材料である。しかし、ティッシュコンディショナーは表面性状が軟質であり、ブラシなどによる機械的清掃が難しく、著しく汚れを除きにくい。微生物によるコロニー形成を受けやすくなる。そこで、多くの抗菌剤をティッシュコンディショナーに添加する試みがなされているが、生体に対してのアレルギーのような有害性を抗菌剤はもたらす可能性がある。

口腔内における唾液と歯肉溝滲出液には抗菌酵素として、リゾチーム、ペルオキシダーゼ、ラクトフェリン等が含まれている。特に、ラクトフェリンは鉄結合性糖蛋白質で、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、カンジダ属、他の腸内細菌といった広い微生物に対して静菌効果を及ぼす。

2. 研究の目的

我々は材料自体には抗菌性を持たせず、陽イオン交換樹脂や抗体を材料に添加することで口腔内の抗菌性蛋白質であるラクトフェリンを材料に結合・集中させることにより、

抗菌効果を高め、なおかつ生体に対して有害性が少ないという全く新しい概念の義歯材料の開発を試みた。この抗菌材料が開発され、義歯自体に抗菌性を持たせることができれば、義歯性口内炎、誤嚥性肺炎の害を減少させることができると考えられる。また、義歯清掃の簡略化、介助者の手助けにもなる。

本研究では陽イオン交換樹脂をティッシュコンディショナーへ添加し、ヒトラクトフェリンの結合量測定、ラクトフェリンを結合したティッシュコンディショナーの *C. albicans* に対する抗真菌性、細胞毒性、機械的性質、色調安定性について検討した。

3. 研究の方法

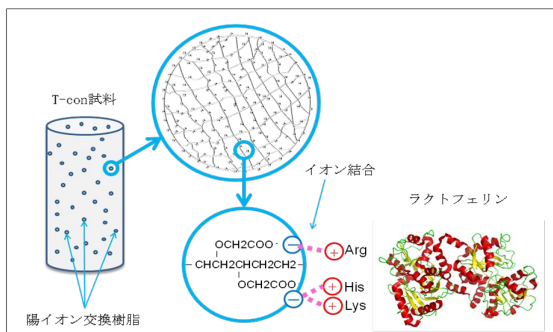
1) ヒトラクトフェリン (hLF) の *C. albicans* に対する抗菌試験

細菌濁液 1 mL が菌濃度 1.0×10^5 CFU/mL・hLF 濃度 100、400、800 $\mu\text{g/mL}$ になるように調整し、24 時間、25 好気条件下で振盪しその抗菌効果を検討した。菌数の測定は PPB を用いて 250 倍に希釈後、各希釈液の 0.2 mL を SDA に播種し、37 °C にて 48 時間好気培養を行い、生菌数を測定した。

2) 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに対するヒトラクトフェリン結合量の測定

陽イオン交換樹脂を 4、8 wt% 含む T-con(直径 3 mm、高さ 6 mm の穴を開けたテフロン板に填入)を 25 °C で硬化させた。通常の粉液比で作製した樹脂を添加しないものをコントロール試料として実験試料と同様に作製した。24 時間経過後、テフロン板から取り外しクリーンベンチ内で UV 下にて蒸留水に 24 時間浸漬した。試料を hLF 溶液 (800 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL 中に 10 バルクずつ、25 °C にて 24 時間浸漬し hLF を結合させた。浸漬後、各 hLF 溶液

の濃度を BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE 社製) を使用して計測した。試料への hLF 結合量は初期 hLF 溶液濃度 (800 µg/mL) との比較により算出した。



T-con 試料中の樹脂と hLF との結合

3) 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに結合したヒトラクトフェリンの *C. albicans* に対する抗菌試験

各調整菌液 1 mL 中に hLF 結合試料を浸漬し、24 時間、25 °C 好気条件下で振盪しその抗菌効果を検討した。菌数の測定は PPB を用いて 250 倍に希釈後、各希釈液の 0.2 mL を SDA に播種し、37 °C にて 48 時間好気培養を行い生菌数を測定した。コントロール試料として樹脂を 4、8 wt% 含む T-con を作製し、hLF 溶液の代わりに PPB 中に浸漬したものを使用した。

4) 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーの機械的強度試験

実験試料として、樹脂を 4、8 wt% 含む直径 10 mm、高さ 20 mm の T-con を、ステンレスの型に填入しスライドガラスを介して適度な圧で圧接することで作製した。通常の粉液比で作製した樹脂を添加しないものをコントロール試料として実験試料と同様に作製した。練和後 24 時間、25 °C で保存した後にレオメーター (サン科学社製) を用いて、試験片の圧縮弾性率を算出した。

5) 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコン

ディショナーの細胞毒性試験

供試細胞として Balb/c 3T3 mouse fibroblast 細胞を用い、実験試料として樹脂を 4、8 wt% 含む直径 3 mm、厚さ 6 mm の T-con を作製した。通常の粉液比で作製した樹脂を添加しないものをコントロール試料として実験試料と同様に作製した。

細胞毒性は細胞増殖度の算定 (濁度法) と細胞形態の観察で行った。細胞を 3、7 日間培養し、各ウェルに WST-8 溶液 (5 mg/mL) を 10 µL 添加し、5% CO₂・95% Air、湿度 100%、37 °C のインキュベーターで 2 時間、37 °C で呈色反応を行った。ウェルそれぞれの上清を 96 穴マルチプレートに移し替え、オートプレートリーダー ImmunoMini microplate reader (Inter Med 社製) を使い OD₄₅₀ を測定した。コントロールまたは実験群と DMEM のみで培養した細胞数との相対値を百分率で表した。

細胞生存率 (%) = コントロールまたは実験群における細胞数 / DMEM のみで培養した細胞数 × 100

また、細胞形態の観察には倒立位相差顕微鏡 (CKX41, オリンパス社製) を用いた。

6) 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーの色調安定性試験

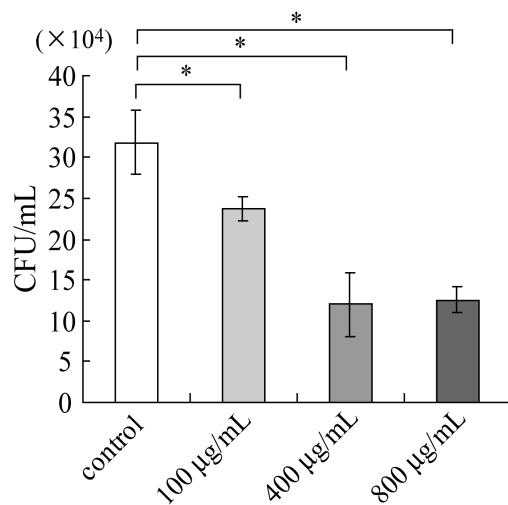
実験試料として、樹脂を 4、8 wt% 含む直径 10 mm、厚さ 2 mm の T-con を、テフロン板に填入しスライドガラスを介して適度な圧で圧接することで作製した。通常の粉液比で作製した樹脂を添加しないものをコントロール試料として実験試料と同様に作製した。24 時間後の各試料を KODAK Gray Scale の「10」上で測色を行った。測色には Crystaleye スペクトルフォトメーター CE100-DC/JP (OLYMPUS 社製) を用いて、L*、b*、a* 表色系の値を求めた。

4. 研究成果

1) ヒトラクトフェリンの *C. albicans* に対する抗菌性

hLF 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での生菌数は 2.4×10^5 CFU/mL、hLF 濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での生菌数は 1.2×10^5 CFU/mL、hLF 濃度 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での生菌数は 1.3×10^5 CFU/mL であった。

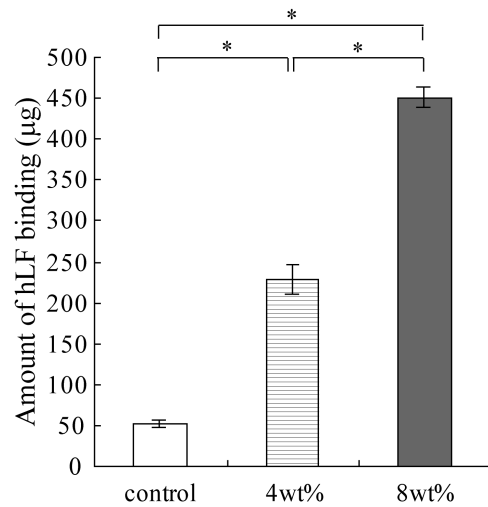
hLF 濃度 100、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、初期濃度 1.0×10^5 CFU/mL の *C. albicans* 菌液に対して、24 時間培養後で抗菌性を示した。培養 24 時間後において hLF は 100 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で *C. albicans* に対して量依存的に抗菌性を示すことがわかった。



各 hLF 濃度の 24 時間後の抗菌性

2) 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに対するヒトラクトフェリン結合量

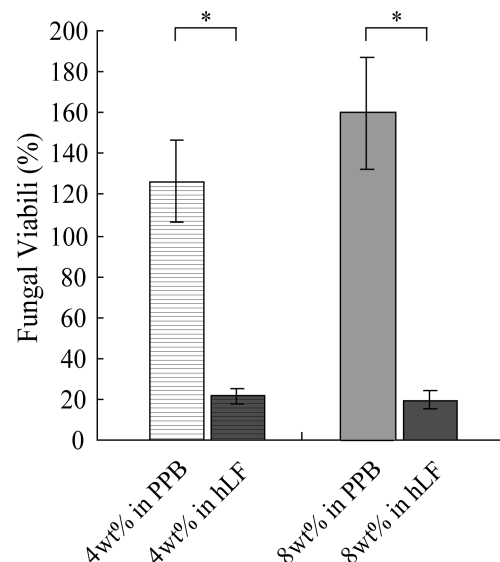
24 時間後に結合した hLF はコントロール試料で 52.3 μg 、4wt% 試料で 228.0 μg 、8 wt% 試料で 450.5 μg であった。結合 hLF 量は試料間で有意差があった ($P < 0.05$)。コントロール試料に結合した hLF は T-con の小孔に吸着したのではないかと考えられる。4、8 wt% 試料はコントロール試料と比較してそれぞれ約 4、9 倍の hLF を結合した。hLF は樹脂の添加量に依存して結合すると考えられる。



樹脂含有 T-con の hLF 結合量

3) 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに結合したヒトラクトフェリンの *C. albicans* に対する抗菌性

4、8 wt% 試料はコントロール試料に対して有意に抗菌性を示した ($P < 0.05$)。実験試料 4 wt%、8 wt% 間には有意差はない。4 wt% でも十分な抗真菌作用を示した。これらの結果から樹脂を含有した T-con は hLF を結合し、*C. albicans* に対して抗菌性を有することが示唆された。すなわち、樹脂の修復物への臨床応用によって、義歯性口内炎などの予防に寄与できると考えられる。

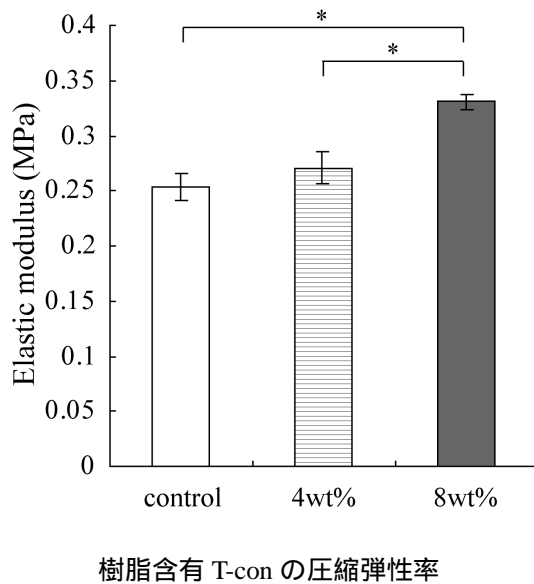


樹脂含有 T-con の抗菌性

4) 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーの機械的強度

4 wt%試料の値はコントロールに比較してわずかに高かったが、有意差はなかった。一方、8 wt%試料はコントロールと4 wt%試料それぞれに対して有意に高い値を示した。これは、樹脂含有量を大きくすることによりT-conの構造に変化が起こり、エチルアルコールの溶出が早まったと考えられる。

無歯顎患者の口腔粘膜の弾性率は0.66-4.36 Mpaであり、その平均は2.73 MPaであり、4、8 wt%試料の圧縮弾性率の値はそれぞれ0.27、0.33 MPaであり、無歯顎患者の口腔粘膜の弾性率値よりも低値であった。このことより実験試料は口腔内においても使用できる可能性が示唆された。



5) 細胞毒性

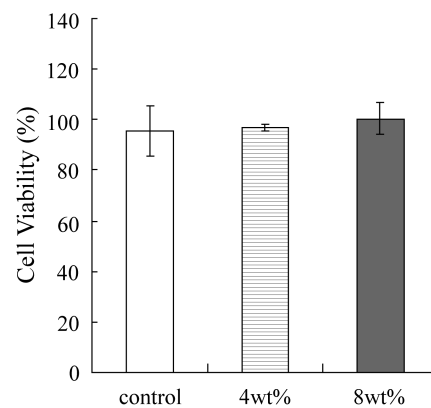
細胞毒性試験として a Balb/3T3 fibroblast cell を使用し、MTT assay を行った。3、7日の培養後、4、8 wt%試料とも高い細胞生存率を示した。

樹脂含有 T-con の 40%溶出液に対する3日間培養の細胞毒性はコントロール試料で

113.2±20.4%、4wt%試料で95.6±8.8%、8wt%試料で115.9±11.2%であった。それぞれの間には有意差はなかった ($P>0.05$)。樹脂含有 T-con の 80%溶出液に対する3日間培養の細胞毒性はコントロール試料で104.1±12.6%、4wt%試料で103.5±4.4%、8wt%試料で120.2±16.0%であった。それぞれの間には有意差はなかった ($P>0.05$)。樹脂含有 T-con の 40%溶出液に対する7日間培養の細胞毒性はコントロール試料で100.7±6.6%、4wt%試料で89.4±0.6%、8wt%試料で101.1±1.3%であった。それぞれの間には有意差はなかった ($P>0.05$)。樹脂含有 T-con の 80%溶出液に対する7日間培養の細胞毒性はコントロール試料で95.6±10.2%、4wt%試料で97.1±1.3%、8wt%試料で100.4±6.2%であった。それぞれの間には有意差はなかった ($P>0.05$)。

また Balb/c 3T3 mouse fibroblast cell の細胞像はコントロール試料と実験試料(4、8 wt%)で同様の細胞増殖度を示した。

これらの結果から樹脂含有 T-con は毒性を有しないということが示唆された。



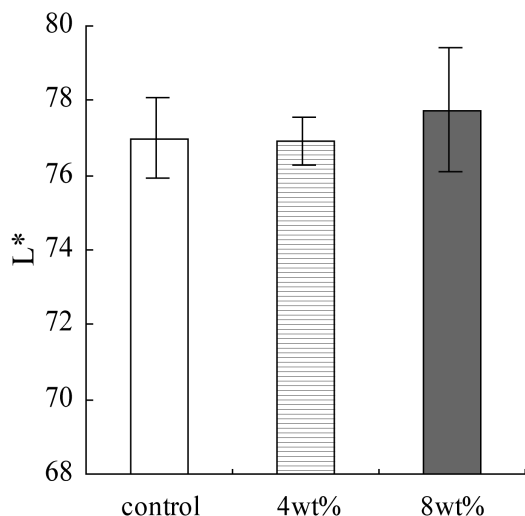
80%溶出液に対する細胞毒性(培養7日間)

6) 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーの色調安定性

T-con の 24 時間後の色調を L*表色系により示した。作製 24 時間後における L*値はコントロール試料で77.0±1.1、4 wt%試料で

76.9±0.7、8 wt%試料で 77.6±1.6 であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P>0.05$)。作製 24 時間後における a^* 値はコントロール試料で -1.75±0.11、4 wt%試料で -1.55±0.12、8 wt%試料で -1.45±0.20 であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P>0.05$)。作製 24 時間後における b^* 値はコントロール試料で -0.91±0.14、4 wt%試料で -1.15±0.11、8 wt%試料で -1.12±0.23 であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P>0.05$)。

これらの結果より樹脂を含有した T-con には色調変化が認められず、元の色調に影響を与えないことがわかった。



樹脂含有 T-con の L* 表色系の色調

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)

方法論で特許を取得する予定として、学会発表や論文での発表の一切を控えた

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永留 初實 (NAGADOME, Hatsumi)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30284516

(2) 研究分担者

牧平 清超 (MAKIHIRA, Seicho)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：80304450

(3) 研究分担者

諸井 亮司 (MOROI, Ryoji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70325471

(3) 研究分担者

寺田 善博 (TERADA, Yoshihiro)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：30038898