

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462975

研究課題名(和文) 口腔バイオフィルム活性に対するイオン徐放性微粒子含有予防材料の効果

研究課題名(英文) Effects of dental materials containing multiple ions releasing filler against viabilities of oral biofilms

研究代表者

向井 義晴 (MUKAI, Yoshiharu)

神奈川県大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40247317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Surface Pre-Reacted Glass ionomer (S-PRG)フィラーはフッ化物、ストロンチウム、ホウ酸などのイオンを放出し、歯質の脱灰抑制のみならず、口腔細菌に対して抗菌活性を示すことが報告されている。我々は、多種細菌培養モデルであるポリマイクロバイアルバイオフィルムモデルを使用することにより、S-PRGフィラー溶出液含有培養液がNaF含有培養液よりも効果的な抗菌効果を示すことを報告した。また、形成されたバイオフィルムに対する本溶出液による60分間の処理効果を検討したところ、有意な抗菌効果を示すことを確認したことから、トレー法などによる本溶出液の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：It was reported that Surface Pre-Reacted Glass ionomer (S-PRG) filler released multiple ions such as fluoride, strontium and boron, and contributed to inhibit demineralization, as well as it may have antimicrobial effects on oral bacteria. In this study, we could demonstrated that culture medium containing S-PRG eluate showed predominant antibacterial effects on polymicrobial biofilm model which contained multiple species of oral bacteria in compared with culture medium with NaF. Further, sixty-minutes' application of the S-PRG eluate on formed polymicrobial biofilms showed also remarkable antibacterial effects. These results indicate that the S-PRG eluate will be useful for oral health by using delivery systems such as tray-technique.

研究分野：保存修復学

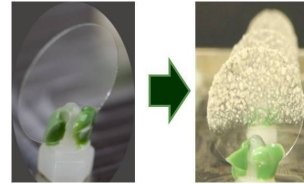
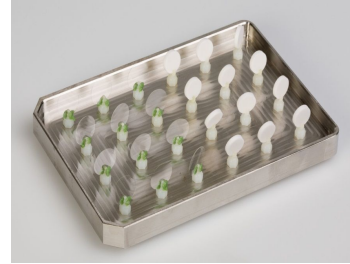
キーワード：バイオフィルム S-PRGフィラー 脱灰抑制 抗菌効果

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者は、一貫して歯質の脱灰を抑制し、再石灰化を誘導する材料の開発ならびに術式の考案を行ってきた。中でも、多種のイオンを徐放する性格を有する微粒子含有材料には優れた脱灰抑制効果や再石灰化誘導能があることを報告し、歯面コーティング材には材料に隣接した象牙質面の脱灰を効果的に抑制すること (Am J Dent; 2014; 27: 258-262), あるいは、本微粒子を含有する矯正用ブラケット接着材料には周囲エナメル質の脱灰抑制効果があることを報告した (Dent Mater J 2008; 27: 590-597)。さらには、本フィラーを義歯床用レジンに含有させることにより、物性を低下させることなく近接象牙質の脱灰を効果的に防げることも報告した (Eur J Oral Sci 2009; 117: 750-754)。しかしながら、これらの研究手法は乳酸、酢酸あるいはリン酸イオン、カルシウムイオンを含む脱灰液あるいは再石灰化液を使用した *in vitro* モデルであり、より口腔内に近い環境で研究を行っていくことが求められていた。すなわち、酸産生のあるデンタルプラークをシミュレートした実験モデルを構築していくことが、修復材あるいはう蝕予防材料の評価において近年重要視されている。

ヒト口腔内のデンタルプラークは多種多様の細菌によって構成され、個相の物質表面 (基質) に付着した細菌の集合体であるバイオフィームから成っている。これまでに、多くの研究者が 1~3 種、多くても 5 種類の細菌種を使ってバイオフィームの研究を行ってきたのに対し、最近、口腔内と同じ細菌種の多様性に富んだポリマイクロバイアルバイオフィームを用いた研究が、う蝕学の分野において注目され始めた (Lisa Wong et al, Archs Oral Biol 2007; 52: 280-289)。Exterkate らが開発したポリマイクロバイアルバイオフィームモデル上に形成されたバイオフィームはミュータンスレンサ球菌単一種により形成されたバイオフィームに比較して抗菌薬に対し強い耐性を示すことを報告した (Caries Res 2010; 44:372-379)。また、ten Cate は、2010 IADR シンポジウムにおいても、このバイオフィームモデルの有用性について紹介し、本モデルは、従来のバイオフィームモデルに比較して、より口腔内レベルに近似した固相への強固な付着を得ることが可能であるばかりでなく、多種多様な固相、抗菌薬を応用すること、抗菌薬の濃度を任意に調節することが可能な画期的なバイオフィームの培養モデルであることを強調した。研究分担者の富山らは、本モデルの基質として象牙質を使用し、象牙質上に形成されたバイオフィームは脱灰の緩衝作用により pH が高く保たれ、これが抗菌剤処理後に生じるバイオフィーム中の細菌の代謝に影響している可能性があること、また対照的にガラス上のバイオフィームはクロルヘ

キシジン処理に対して感受性が高く、バイオフィームの成分を観察した結果、象牙質よりも酸抵抗性、酸産生とともに高い細菌種が形成するバイオフィームに移行している可能性を示唆した (日本歯科保存学会 2010 年度秋季大会 抄録番号 B-1)。また、本モデルにより、象牙質表層下脱灰病巣が作製できることも報告した (PER-IADR 2012, Abstract 616)。これらの報告からも、本モデルは、実際の口腔内におけるバイオフィーム形成過程を再現しており、う蝕のメカニズム解析およびその予防法・治療法を検討するための最も効果的な手法と思われる。



2. 研究の目的

本研究は、唾液中の多種の細菌から構成されるポリマイクロバイアルバイオフィームモデルを用いて、多種イオン徐放性微粒子を含有する歯磨剤、および微粒子からのイオン溶出液からなる洗口剤について、その抗菌効果ならびにう蝕抑制効果を確認することを目的とする。

(1) イオン徐放性微粒子含有歯磨剤、および溶出イオン含有洗口剤のバイオフィーム活性および構成細菌叢に与える影響

異なった基質上に形成したポリマイクロバイアルバイオフィームに対するイオン徐放性歯磨剤および洗口剤の影響は、バイオフィームの pH、バイオフィームの乳酸産生量およびバイオフィーム中の総生菌数をクロルヘキシジンを経標準として測定することにより検討する。また、歯質を主体として種々な基質上に形成したポリマイクロバイアルバイオフィームに対し、イオン徐放性歯磨剤および洗口剤を作用させた前後の細菌活性および細菌叢構成を、共焦点レーザー顕微鏡、live/dead bacterial viability kit および Polymerase Chain Reaction Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) を用いて解析する。

(2) イオン徐放性微粒子含有歯磨剤および溶出イオン含有洗口剤がバイオフィーム下の象牙質脱灰病巣の形成に与える影響

AAA モデルを用いて象牙質円盤上に作製したポリマイクロバイアルバイオフィームにイオン徐放性歯磨剤および洗口剤を作用さ

せ、バイオフィーム下象牙質からのカルシウム溶出量、および表層下脱灰病巣の形成を Transverse Microradiography(TMR)を用いて検討する。

研究分担者の富山は、2009年1月より2010年8月まで Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA)に長期派遣研究員として在籍し、安定した代謝活性を示す長期培養ポリマイクロバイアルバイオフィームモデルの作製に成功した。本モデルの開発元は ACTA であることから、本邦において本モデルを用いた研究が行えるのは我々の研究室のみでありそのオリジナリティーは極めて高い。これまでも唾液を使用した多種細菌から成るバイオフィームは報告されているが、表層下脱灰病巣作製ができるほど活性の高いバイオフィームは報告されていない。また、イオン徐放性微粒子から溶出されるイオンの中でも、フッ化物イオンには脱灰抑制、再石灰化誘導効果が、またホウ素イオンには抗菌効果があることが報告されているが、本バイオフィームモデルはこれら両方の効果が確認可能なモデルである。今回使用する歯磨剤および洗口剤に高い抗菌性と脱灰抑制作用が確認されれば、極めて効果的な予防材料になるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) ポリマイクロバイアルバイオフィームに対する S-PRG フィラー溶出液含有培養液の抗菌効果

フッ化物、ストロンチウムおよびホウ酸など多種のイオンを含有する surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラー溶出液のバイオフィームに対する抗菌効果を唾液より作製したポリマイクロバイアルバイオフィームモデルを用いて検討した。標準培養液に buffered McBain 2005 培養液 (Cont 群)を用いた。S-PRG フィラー溶出液を用いて作製した buffered McBain 2005 培養液を S 群、S-PRG フィラー溶出液と同濃度のフッ化物を含む F 群を作製、それぞれ標準培養液で 2 倍および 10 倍希釈した 0.5S 群、0.1S 群、および 0.5F 群、0.1F 群の 6 群を試験培養液とした。ポリマイクロバイアルバイオフィームは、健康な被験者 1 名の 50 倍希釈刺激唾液を混入した標準培養液中にカバーグラスを懸架 37 で 10 時間嫌気培養後、新鮮培養液に交換し 24 時間まで培養を継続し作製した。24 時間後からは、抗菌効果検討のため標準培養液と各種試験培養液を用い、34 時間後新鮮培養液に交換、48 時間まで培養を継続した。24、34 および 48 時間後の培養液の pH および 48 時間後の生菌数を測定し、実験群間の比較は One-way ANOVA および Games-Howell 検定により有意水準 5%で行なった。

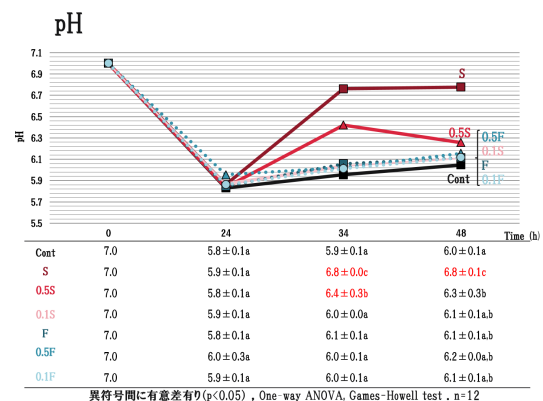
(2) S-PRG フィラー溶出液処理がポリマイクロバイアルバイオフィームに与える影響

バイオフィーム形成用基質には 12 mm のガ

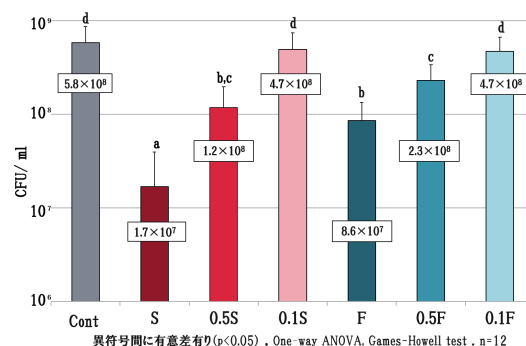
ラス試片を用いた。一被験者から採取した刺激唾液を用い、液体培地の buffered McBain 2005 (0.2%スクロース, 50 mM PIPES 含有, pH 7.0) に混入して嫌気培養 (CO₂: 10%, H₂: 10%, N₂: 80%, 37)し、初期のバイオフィームを形成した。実験群は、(1) 非処理群 (cont), (2) S-PRG フィラー溶出液群 (PRG), (3) 0.2 wt% グルコン酸クロルヘキシジン群 (Corsodyl, GlaxoSmithKline) (CHX) の 3 群とした (n=6)。培養液の交換は 10 時間、14 時間のサイクルで行った。培養 24 時間でバイオフィームの付着したカバーグラスを各処理剤に 60 分間浸漬し、CPW(casein peptone water)で洗浄後、超音波処理下で菌を剥離した。その後、剥離した菌を CPW で段階希釈後、血液寒天培地に塗抹、4 日間、嫌気培養を行い、生菌数を算定した。

4. 研究成果

(1) 培養液の pH は、34 時間培養後で S 群が pH6.8、0.5S 群が pH6.4 であり、48 時間培養後においても S 群は pH6.8 であり、S 群は他の実験群に対して有意に高い値を示した。48 時間後の生菌数は、Cont 群 (5.8 × 10⁸ CFU/ml) に比較して S 群 (1.7 × 10⁷ CFU/ml)、0.5S 群 (1.2 × 10⁸ CFU/ml)、F 群 (8.6 × 10⁷ CFU/ml) および 0.5F 群 (2.3 × 10⁸ CFU/ml) は、有意に低い値を示し、また、S 群は F 群に比較して有意に低い値であった。以上の結果から、S-PRG 溶出液に含有される多種のイオンはバイオフィームの成熟を抑制し、生菌数を減じる可能性が示唆された。



生菌数



(2) ガラス上に形成したポリマイクロバイアルバイオフィルムに S-PRG フィラー溶出液による長時間(60分間)の処理を行った結果,PRG 群及び CHX 群ともに cont 群と比較し有意に抑制された(Steel-Dwass test, $p < 0.05$). この結果は, S-PRG フィラーから溶出されたホウ酸イオンの抗菌効果である可能性があり, トレー法などによる 60 分間の S-PRG フィラー溶出液処理の有用性が示唆された.

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 2 件)

Shiiba T, Tomiyama K, Iizuka J, Hasegawa H, Kuramochi E, Fujino F, Ohashi K, Nihei T, Teranaka T, Mukai Y: Effects of the resin-based temporary filling materials against dentin demineralization. Dental Materials Journal, 35, 70-75, 2016, 査読有.

倉持江里香, 富山 潔, 熊田秀文, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 渡邊清子, 浜田信城, 寺中敏夫, 向井義晴: SPR-G 溶出液のポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する抗菌効果. 日本歯科保存学会誌, 57, 414-420, 2014, 査読有.

[学会発表](計 12 件)

石澤将人, 富山 潔, 長谷川晴彦, 浜田信城, 向井義晴: S-PRG フィラー溶出液がポリマイクロバイアルバイオフィルムの群衆構造に与える影響 - リアルタイム定量 PCR 法による解析 -. 日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会(第 144 回), 宇都宮 2016.6.10.

Shiiba T, Kataoka A, Fujino F, Tomiyama K, Iizuka J, Hasegawa H, Kuramochi E, Ohashi K, Nihei T, Mukai Y: Anti-Demineralization Effect of Novel S-PRG Filler Containing Varnishes on Dentin. Academy of Dental Materials 2015 Annual Meeting, Maui, USA, 2015.10.8.

片岡あい子, 椎谷 亨, 藤野富久江, 富山 潔, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 大橋 桂, 二瓶智太郎, 向井義晴: 新規 S-PRG フィラー配合バーニッシュの象牙質脱灰抑制能(第 2 報) - 徐放されるフッ化物イオン濃度測定 -. 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会(第 142 回), 北九州, 2015.6.26.

片岡あい子, 椎谷 亨, 藤野富久江, 富山 潔, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 大橋 桂, 二瓶智太郎, 向井義晴: 新規 S-PRG フィラー配合バーニッシュの象牙質脱灰抑制能 - 再石灰化溶液浸漬後の脱灰抑制能 -.

日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会(第 143 回), 東京, 2015.11.13.

椎谷 亨, 片岡あい子, 藤野富久江, 富山 潔, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 大橋 桂, 二瓶智太郎, 向井義晴: S-PRG フィラー配合バーニッシュの象牙質脱灰抑制能. 神奈川歯科大学学会第 50 回総会, 横須賀, 2015.12.5.

片岡あい子, 椎谷 亨, 藤野富久江, 富山 潔, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 向井義晴: S-PRG フィラー配合バーニッシュの象牙質脱灰抑制能 - 再石灰化溶液浸漬後の脱灰抑制能 -. 神奈川歯科大学学会第 50 回総会, 横須賀, 2015.12.5.

石澤将人, 富山 潔, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 浜田信城, 向井義晴: S-PRG フィラー溶出液がポリマイクロバイアルバイオフィルムに与える影響. 神奈川歯科大学学会第 50 回総会, 横須賀, 2015.12.5.

Kuramochi E, Tomiyama K, Kumada H, Shiiba T, Iizuka J, Hasegawa H, Watanabe K, Hamada N, Teranaka T, Mukai Y: Antibacterial Effect of an S-PRG Eluate on Polymicrobial Biofilms. The 8th Annual Congress of the Pan European Region of the International Association for Dental Research (PER/IADR), Dubrovnik, Croatia, 2014.9.12.

倉持江里香, 富山 潔, 熊田秀文, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 渡邊清子, 浜田信城, 寺中敏夫, 向井義晴: ポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する S-PRG フィラー溶出液の殺菌効果. 日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会(第 140 回), 大津, 2014.6.20.

倉持江里香, 富山 潔, 熊田秀文, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 渡邊清子, 浜田信城, 寺中敏夫, 向井義晴: ポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する多種イオン溶液の抗菌効果. 神奈川歯科大学学会第 49 回総会, 横須賀, 2014.11.29.

倉持江里香, 向井義晴, 富山 潔, 熊田秀文, 椎谷 亨, 飯塚純子, 三宅 香, 長谷川晴彦, 渡邊清子, 浜田信城, 寺中敏夫: S-PRG フィラー配合歯磨剤のポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する抗菌活性. 日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会(第 138 回), 福岡, 2013.6.27.

倉持江里香, 向井義晴, 富山 潔, 熊田秀文, 椎谷 亨, 飯塚純子, 三宅 香, 長谷川晴彦, 渡邊清子, 浜田信城, 寺中敏夫: S-PRG フィラー配合歯磨剤のポリマイクロバイアル

ルバイオフィルムに対する抗菌活性：神奈川
歯科大学学会第 48 回総会，横須賀，
2013.11.30.

〔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

向井 義晴 (MUKAI, Yoshiharu)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・准教
授
研究者番号：40247317

(2) 研究分担者

浜田 信城 (HAMADA, Nobushiro)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20247315

富山 潔 (TOMIYAMA, Kiyoshi)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：90237131