

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861800

研究課題名(和文)細菌付着抑制効果のある新規象牙質知覚過敏抑制材の開発

研究課題名(英文)Development of new desensitizer for hypersensitive dentin having effect to control bacteria adhesion.

研究代表者

高橋 圭(Takahashi, Kei)

岡山大学・大学院・助教

研究者番号：00550815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、象牙質知覚過敏抑制材で処理した象牙質に対する口腔内細菌の付着性に関する研究である。既存の代表的な象牙質知覚過敏抑制材には、象牙質表面に高分子被膜を形成するか、あるいは親水性モノマーが象牙質表層に浸透して樹脂含浸層のような被膜を形成すると思われる。そこで本研究では、既存の代表的な象牙質知覚過敏抑制材を用いてプラーク形成の発端である口腔内細菌の初期付着について比較検討を行った。その結果、本研究の範囲内においては象牙質表面に高分子被膜を形成するタイプのほうが、親水性モノマーが象牙質表層に浸透して樹脂含浸層のような被膜を形成するタイプに比べて口腔内細菌の初期付着が少ない傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：This study is about the adhesion of oral bacteria for the dentin which I treated in desensitizer for hypersensitive teeth. It is thought that I form a high polymer film on the dentin surface to existing representative desensitizer for hypersensitive dentin, or a hydrophilic monomer penetrates to the dentin surface and forms a film such as hybrid layer in the adhesion. Therefore it was in the beginning representative desensitizer for hypersensitive dentin. As a result, the initial adhesion of oral bacteria tended that there was few it in comparison with the type that a hydrophilic monomer penetrated to the dentin surface, and a type to form a high polymer film on the dentin surface when I put it within this study formed a film such as hybrid layer in the adhesion.

研究分野：歯科保存修復学分野

キーワード：象牙質知覚過敏抑制材

### 1. 研究開始当初の背景

一般に象牙質知覚過敏症を呈している歯はブラッシング時に不快な痛みを伴うことが多く、ブラッシングが不十分になればプラークが付着しう蝕の発生や近接する歯肉の炎症を惹起させることも考えられる。プラーク形成が細菌の付着から始まることを考えると象牙質知覚過敏抑制材には本症に対する効果はもとより、細菌の初期付着を抑制する効果をもつことが必要であると思われる。これまでの象牙質知覚過敏抑制材はしゅう酸カリウムの結晶析出やアパタイトの析出を促し、開口部の閉鎖が試みられてきた。しかし効果が不十分なため、重合性モノマーを含有したボンディング材や低粘度レジンによるコーティングが提唱された。この方法では、歯面に被膜が形成されるので知覚過敏は抑制されるが、薄層被膜を形成することはきわめて困難で、歯面への移行が不整となりやすいため、プラークの蓄積を惹起させる恐れがある。そこで近年、ポリマーエマルジョンあるいは比較的低分子量の親水性モノマーを主成分とする象牙質知覚過敏抑制材が開発された。しかし、これらの材料も象牙質表面に塗布することにより、物理化学的性状に変化をきたすことが指摘されている。また、最近では従来の象牙質知覚過敏抑制材にフッ化ナトリウムを配合することにより、耐酸性の向上が図られている。そこで本研究では、これらの薬剤で処理した象牙質表面における細菌付着性について評価することとした。

### 2. 研究の目的

本研究は、象牙質知覚過敏抑制材で処理した象牙質に対する口腔内細菌の付着性に関する研究である。最近の象牙質知覚過敏抑制材の多くは、薄層被膜を形成することにより象牙質開口部を封鎖し知覚過敏を抑制する材料が主流である。しかし、象牙質表面へのポリマーの沈着やモノマーが浸透して被膜が形成されることから、象牙質表面の物理化学的性状に変化をきたすことが考えられる。そこで本研究では、各種象牙質知覚過敏抑制材で処理した象牙質の表面性状を調査研究することにより、細菌付着抑制効果のある新規象牙質知覚過敏抑制材の開発を目的としている。具体的には、象牙質表面への口腔内細菌の初期付着については付着試験を行い、光学顕微鏡および CCD カメラを用いて付着菌数の測定を行い、単位面積当たりの付着菌数を算出する。続いて象牙質表面の物理化学的性状の変化については、象牙質表面の接触角を測定することにより物理化学的性状の変化を調査する。次年度からはその研究結果をもとに、口腔内細菌の初期付着を抑制できる試作象牙質知覚過敏抑制材の研究を行うとともに、抗菌性を併せ持つ新規象牙質知覚過敏抑制材の開発を最終目標としている。

### 3. 研究の方法

(1) 各種象牙質知覚過敏抑制材を用いて処理した象牙質表面への口腔内細菌の初期付着について

付着試験に使用する口腔内細菌は、う蝕原性菌である *Streptococcus mutans* と、歯面への初期付着が報告されている菌として *Streptococcus oralis* の 2 種類とする。これらの細菌を 0.5% Yeast Extract を添加した BHI 液体培地で 37℃、1 晩嫌気培養し、対数増殖期の細胞を 4000 g で 10 分間遠沈させ回収する。菌体は pH7.3 の 0.9% NaCl 含有 10mM トリス緩衝液で洗浄後、同溶液中に  $10^7$  cell/ml になるように再懸濁液 200cc をピーカーに注ぎ、試料体を付着させたスライドガラスを液に浸漬するようにピーカーの側面に固定する。懸濁液は、細菌が沈殿しないようにスターラーで緩やかに攪拌しながら 37℃ で 1 時間保持して菌を付着させる。終了後、試料体に付着した細菌をトリス緩衝液で軽く洗浄し、2.5% グルタルアルデヒド水溶液中に浸漬して 4℃ で 30 分間保持し固定を行う。細菌の染色は酵素抗体法を用いて行う。付着菌数の測定には光学顕微鏡および CCD カメラを用いて画像を記録し、1 試料あたり任意の 6 視野の付着菌数を計測して単位面積当たりの付着菌数を算出する。

なお、本研究では、ヒト抜去歯象牙質を 2000 番シリコンカーバイドペーパーで研磨した後、超音波処理した面を被験面とした。予備的に被験面を SEM 観察したところ、スマヤー層は残存しているが象牙質細管は部分的に開口していることを確認している。象牙質知覚過敏症を発症する露出根面は、スマヤー層の存在しない面であるため、実際の状態を再現しているとは言い難いが、試料の統一化を考え、本研究では被験面とすることとした。

(2) 各種象牙質知覚過敏抑制材を塗布することによる象牙質表面の物理化学的性状の変化について

各種象牙質知覚過敏抑制材を塗布することによる象牙質表面の物理化学的性状の変化を調べるために、塗布後の象牙質へ 100mM NaCl および 100%  $\gamma$ -ブロムナフタレンを滴下し、その接触角を測定した。また、供試菌の接触角も以下のように測定した。まず、30ml の 0.5% Yeast Extract を添加した BHI 培地で対数増殖期まで嫌気培養した細菌を遠心集菌し、10mM リン酸緩衝液で洗浄後、メンブレンフィルター上に回収して菌体フィルムを作製する。この菌体フィルムをデジケータで 1 時間乾燥させ、接触角の測定に使用する。5  $\mu$ l の 100mM NaCl および 100%  $\gamma$ -ブロムナフタレンを試料体および菌体フィルムに滴下し、CCD カメラを用いて画像を記録し、滴下直後に液滴と試料体および菌体フィルム間に形成される接触角を測定する。そしてこれらの測定した接触角の値を、Young の式および Fowkes の式に代入して表面自由エネルギーを算出する。

(3) 口腔内細菌の初期付着抑制効果ならびに抗菌性を有する新規象牙質知覚過敏抑制材の開発について

本研究は今回の3つの研究テーマのうち最も重要視している項目であり、前年度までの研究結果をもとに、各種象牙質知覚過敏抑制材の利点・欠点を探求し、口腔内細菌の初期付着抑制効果のある手法で尚且つ、長期耐久性を併せ持つ新規象牙質知覚過敏抑制材の研究開発に取り組む。具体的には、抗菌性モノマーを配合した新規象牙質知覚過敏抑制材の試作品を作製し、それを用いて付着試験ならびに象牙質表面の物理化学的性状の変化を調べるために接触角の測定を行い、また長期耐久性を調べるために歯ブラシ摩耗試験やサーマルサイクル試験による口腔内環境を想定した耐久性試験を行う。また、臨床の現場で頻繁に行われる処置を想定して、新規象牙質知覚過敏抑制材塗布後のレジン接着強さの影響についても微小引張試験ならびに接着界面のSEM観察を行い考察する。

また最終年度は、前年度までの研究結果をもとに、必要な追加実験を順次行い、新規象牙質知覚過敏抑制材の試作品を完成させることが最終目標である。その新規象牙質知覚過敏抑制材の特徴として、口腔内細菌の初期付着が少なく、抗菌性を有して尚且つ、長期耐久性があり、レジン接着強さに影響を与えにくい材料の開発を目指している。

#### 4. 研究成果

本研究では試作の象牙質知覚過敏抑制材を用いて象牙質表面の物理化学的性状の変化と細菌付着性についての研究を行い、最終的には抗菌性を併せ持った新規象牙質知覚過敏抑制材の開発を目的としている。

既存の代表的な象牙質知覚過敏抑制材は、(1) 象牙質表面に高分子被膜を形成するか、あるいは(2) 親水性モノマーが象牙質表層に浸透して接着における樹脂含浸層のような被膜を形成すると考えられる。既存の象牙質知覚過敏抑制材のうち、MSコートONE(サンメディカル)とMSコートF(サンメディカル)が(1) 象牙質表面に高分子被膜を形成し、シールドフォースプラス(トクヤマデンタル)とGガード(ジーシー)とハイブリッドコート(サンメディカル)が(2) 親水性モノマーが象牙質表層に浸透して接着における樹脂含浸層のような被膜を形成するタイプに分類される。もちろんいずれも前もって酸処理などは行わずそのまま象牙質表面に塗布することがメーカー指示されているため、接着修復の際のような強固な樹脂含浸層は形成されているとは考え難い。しかし、これらの薬剤を塗布した象牙質はいずれも表面に被膜が形成され、表面の物理化学的性状は大きく変化すると考えられ、このことは、プラーク形成の発端である口腔内細菌の初期付着にも何らかの影響を与えることが考えられる。したがって、知覚過敏症状は

抑制できても、細菌付着性が増大し、プラークの蓄積をきたして歯肉の炎症を惹起するようであるなら、これらは優れた材料であるとは言いがたい。しかしながら、近年臨床の現場で使用頻度の高い既存の象牙質知覚過敏抑制材で処理した象牙質表面への細菌付着性を比較検討した報告は見当たらない。

そこで本研究では、各々のポリマーあるいはモノマーを主成分とした象牙質知覚過敏抑制材で処理した象牙質表面の物理化学的性状の変化と細菌付着性を *in vitro* において比較検討するとともに試作象牙質知覚過敏抑制材に抗菌性モノマーを配合することにより、抗菌性を有する新規象牙質知覚過敏抑制材の開発に取り組んだ。

#### 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)

大原直子、田中久美子、垣内伸子、星加知宏、高橋圭、神農泰生、伊澤俊次、山路港公造、西谷佳浩、吉山昌宏  
垂直歯根破折歯を口腔外接着再植法にて保存した症例  
岡山歯学会誌 33 巻 1 号 P7-11 (2014 年)  
査読有

田中久美子、徳善英紀、大原直子、星加知宏、高橋圭、神農泰生、伊澤俊次、山路港公造、西谷佳浩、吉山昌宏  
Tooth Wear に対してコンボジットレジンによる審美修復を行った症例  
岡山歯学会誌 33 巻 1 号 P1-5 (2014 年)  
査読有

##### [学会発表](計4件)

星加知宏、西谷佳浩、高橋圭、吉山昌宏  
新規ワンステップボンディング材における象牙質微小引張接着強さについて  
第141回日本歯科保存学会  
2014年10月30日~2014年10月31日  
山形テルサ(山形)

高橋圭、西谷佳浩、星加知宏、吉山昌宏  
新規光硬化型動揺歯固定材料の耐着色の評価  
第24回日本歯科審美学会  
2014年7月20日~2014年7月21日  
日本歯科大学(東京)

高橋圭、星加知宏、西谷佳浩、吉山昌宏  
新規光硬化型動揺歯固定材料の接着強と接着耐久性の評価  
第140回日本歯科保存学会  
2014年6月19日~2014年6月20日  
滋賀県立芸術劇場(滋賀)

横山章人、塩出信太郎、山路公造、伊澤

俊次、田中久美子、大原直子、高橋圭、  
西谷佳浩、吉山昌宏  
多用途型歯面処理材の象牙質接着強さ  
第139回日本歯科保存学会  
2013年10月17日～2013年10月18日  
秋田県総合生活文化会館（秋田）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 圭 (TAKAHASHI KEI)

岡山大学 岡山大学病院 助教

研究者番号：00550815