

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17132

研究課題名(和文) 感染象牙質モデルを用いた各種窩洞清掃剤の殺菌効果の包括的検索

研究課題名(英文) Comprehensive evaluation of antibacterial activities of various cavity disinfectants using infected dentin model

研究代表者

廣瀬 奈々子 (HIROSE, NANAOKO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10780819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クロルヘキシジン水溶液、消毒用エタノール、および抗菌性モノマー 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB)の窩洞清掃剤としての有効性を検討するため、各窩洞清掃剤の象牙細管への浸透深さを評価するとともに、*Streptococcus mutans*による感染象牙質モデルを用いて、それらの抗菌効果を検証した。その結果、MDPB含有窩洞清掃剤は、他の2種の窩洞清掃剤よりも高い象牙質浸透性と抗菌力によって、象牙細管内に存在する*S. mutans*を効果的に死滅させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Minimal Interventionの理念に基づいたう蝕治療では最小限の切削介入が重視されるため、感染歯質の取り残しが生じるケースも少なくない。本研究により、試作MDPB含有窩洞清掃剤を使用することで、感染歯質の取り残しを始めとして、修復処置に際して起こりうるさまざまな細菌感染を確実に制御できることが明らかとなった。したがって、MDPB含有窩洞清掃剤が実用化されれば、う蝕歯の修復治療の成績向上がもたらされ、また、これまで抜髄の適応とされていた症例において歯髄を保存できる可能性が高まり、従来に比べて生体侵襲性の低い修復治療体系の確立に繋がるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, usefulness of the chlorhexidine aqueous solution (CPS), 80% ethanol (Et), and an experimental disinfectant containing MDPB (12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide) (ACC) as cavity disinfectant was assessed by investigating their penetration into dentin and antibacterial effects. The penetration depth of each solution was evaluated by CLSM observation with the addition of Rhodamine B, and the antibacterial effect was quantitatively and qualitatively assessed by using infected dentin model with *Streptococcus mutans*. ACC showed significantly deeper penetration than CPS, and demonstrated significantly greater bactericidal activity than CPS or Et, achieving complete killing of bacteria in dentin. These results indicate that the experimental MDPB-containing cavity disinfectant is considered be the most useful material for cavity disinfection.

研究分野：歯学

キーワード：窩洞清掃剤 第四アンモニウム化合物 抗菌性モノマー *Streptococcus mutans*

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

MI の理念に基づいたう蝕治療では最小限の切削介入が重視されるため、感染歯質の取り残しが生じるケースも少なくなく、修復処置の前に窩洞清掃剤による殺菌処理を行うことが推奨される。現在、窩洞の殺菌を目的として、クロルヘキシジン水溶液やエタノール水溶液等が使用されているが、こういった窩洞清掃剤が実際に象牙細管内に侵入した細菌に対して効果を発揮できるか否かは、抗菌成分の象牙細管への浸透性や組織液による希釈等、さまざまな因子による影響を受けると考えられる。しかしながら現在まで、これらの複雑な要因を考慮して窩洞清掃剤の効果を評価するアプローチは行われておらず、十分に科学的に臨床の有効性が立証されているとは言えないのが現状である。

そこで本研究では、う蝕の取り残しや窩洞形成後の再感染を模倣した感染象牙質モデルを確立し、各種の窩洞清掃剤の抗菌効果を評価することを発案した。すなわち、各種窩洞清掃剤の象牙質浸透性の評価、象牙細管内に感染した細菌に対する殺菌効果の定量的および Live/Dead 染色法による視覚的評価を行い、これら一連の包括的検討結果から、実際の臨床における有効性を検索することを着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、象牙質に細菌を感染させたモデルを用いた抗菌効果の評価を中心に、各種窩洞清掃剤の効果を包括的に検証し、その臨床的有用性を検索することを目指した。具体的には、各窩洞清掃剤について 象牙質浸透性の評価、最小発育阻止濃度・最小殺菌濃度の測定による抗菌力の比較、象牙細管内に感染した細菌に対する殺菌効果の実質的な評価を行い、臨床に近い条件での有効性の評価を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

被験材料として、以下の 3 種の窩洞清掃剤を使用した。市販の窩洞清掃剤として、2% クロルヘキシジン含有の窩洞清掃剤である Consepsis (Ultradent、以下 CPS) および消毒用エタノール (Wako、以下 Et) を使用した。また、抗菌性モノマーを含有した窩洞清掃剤として、第四アンモニウムに重合性基を導入したレジンモノマーである MDPB (12-methacryloyl oxydodecylpyridinium bromide) を 80% エタノールに 5% の濃度で溶解したものを (以下 ACC) を作製し、使用した。

#### 1) 各窩洞清掃剤の象牙質浸透性の評価

ヒト抜去大白歯の歯冠側から 2 mm の厚さの象牙質片を切り出して 4 x 5 mm、厚さ 2 mm のブロックを作製した。作製したブロックの表面に、0.1% の濃度で Rhodamine B を添加した各窩洞清掃剤を 30 秒間作用させた後、歯軸方向に平行に切断し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によって観察することで、各窩洞清掃剤の象牙細管への浸透深さを評価した。

#### 2) 各窩洞清掃剤の抗菌力の比較

う蝕関連細菌として *Streptococcus mutans* NCTC 10449 を用いて、これらの細菌に対する各窩洞清掃剤の最小発育阻止濃度・最小殺菌濃度 (MIC・MBC) を micro dilution assay にて測定し、抗菌力を比較した。

#### 3) 感染象牙質モデルを用いた殺菌効果の評価

##### 3-1) 感染象牙質モデルの作製

ヒト抜去大白歯の歯冠側から 2 mm の厚さの象牙質片を切り出して 4 x 5 mm、厚さ 2 mm のブロックを作製し、作製した象牙質ブロックをリン酸水溶液と次亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸漬して超音波処理し、象牙細管内に細菌が侵入できるように象牙細管を開口させた。その後、オートクレーブ滅菌を行い、歯冠側以外の面にネイルバーニッシュを塗布した。つづいて、 $1 \times 10^5$  CFU/mL の *S. mutans* 菌液中で 6 時間培養して感染させた後、試料表面に付着した細菌を除去し、感染象牙質モデルを作製した。

##### 3-2) 菌数カウント法による殺菌効果の評価

上記の方法で作製した感染象牙質モデルの表面に、各窩洞清掃剤 10  $\mu$ L を 30 秒間作用させ、弱圧でエアブロー後、表面から 1 mm の厚さまで感染象牙質をラウンドバーで切削回収した。回収した感染象牙質を、5 mL の BHI 液体培地中に混濁、希釈し、寒天平板培地に塗抹して 37°C で 48 時間培養後、生菌数の測定を行った。

##### 3-3) Live/Dead 染色法による殺菌効果の評価

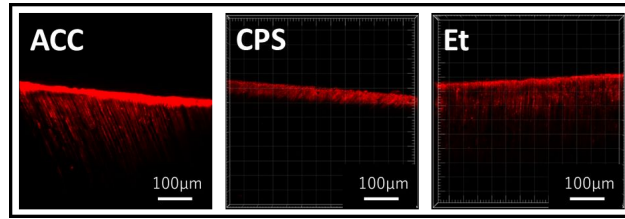
上記の方法で作製した感染象牙質モデルの表面に、各窩洞清掃剤 10  $\mu$ L を 30 秒間作用させ、弱圧でエアブロー後、試料を歯軸方向に平行に切断した。Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit を用いて細菌を染色し、象牙細管内の細菌の生死を CLSM にて評価した。

菌数カウント法による残存細菌数の定量的な評価と CLSM で直接観察した象牙細管内の細菌の死滅状態の視覚的な評価を総合的に判断し、各窩洞清掃剤の殺菌可能な細菌の侵入深さを判定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 各窩洞清掃剤の象牙質浸透性の評価

ACC、CPS および Et の象牙細管内への浸透深さはそれぞれ、 $201.6 \pm 18.2 \mu\text{m}$ 、 $39.0 \pm 4.7 \mu\text{m}$ 、 $203.1 \pm 17.4 \mu\text{m}$  であり、ACC および Et では CPS に比べて有意に高い象牙質細管内への浸透性を示すことが分かった。



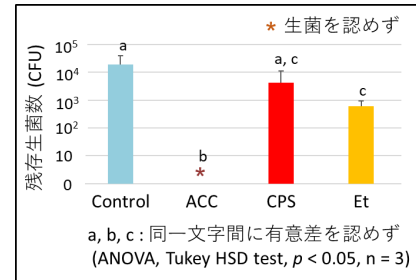
##### 2) 各窩洞清掃剤の抗菌力の比較

MIC 値は ACC、CPS とともに原液の 0.012%、MBC 値は、ACC で 0.098%、CPS では 0.049% であり、ACC と CPS は同等の抗菌力を備えていることが確認された。また、Et は最高被験濃度の 25% 希釈液でも抗菌性を示さなかった。

##### 3) 感染象牙質モデルを用いた殺菌効果の評価

###### 3-1) 菌数カウント法による殺菌効果の評価

CPS 処理後の残存生菌数は、無処理の Control 群と比べて有意差がなかったのに対し、ACC 処理および Et 処理によって生菌数の有意な減少が認められた。特に ACC 処理後には生細菌が回収されず、ACC は強い即時的な殺菌作用を示した。



###### 3-2) Live/Dead 染色法による殺菌効果の評価

象牙細管内に侵入した細菌の生死を CLSM で観察したところ、ACC 処理によって細菌が死滅している様子が認められ、象牙質に浸透して効果を発揮していることが確認された。また、CPS および Et では、処理を行った後でも生細菌が多く存在することが確認された。

以上の結果より、抗菌性モノマーMDPB含有窩洞清掃剤は象牙細管内への浸透性が高く、2% クロルヘキシジン含有窩洞清掃剤や消毒用エタノールに比べて、象牙質表面や象牙細管内に存在する細菌をより効果的に死滅させることが明らかとなり、臨床において最も有用な材料であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Muratovska I, Kitagawa H, Hirose N, Kitagawa R, Imazato S. Antibacterial activity and dentin bonding ability of combined use of Clearfil SE Protect and sodium hypochlorite. Dent Mater J. 37(3):460-464, 2018, DOI: 10.4012/dmj.2017-294. (査読有)

Hashimoto M, Hirose N, Kitagawa H, Yamaguchi S, Imazato S. Improving the durability of resin-dentin bonds with an antibacterial monomer MDPB. 37(4):620-627, 2018, DOI: 10.4012/dmj.2017-209. (査読有)

[学会発表](計 5件)

Hirose N, Kitagawa H, Maezono H, Hayashi M, Haapasalo M, Imazato S. Dentin Permeability and Bactericidal Effects of MDPB-containing Cavity Disinfectant, 2018 IADR/PER General Session, 2018/7/27, London, England.

Hirose N, Kitagawa R, Kitagawa H, Mine A, Hashimoto M, Hayashi M, Imazato S. Influence of MDPB-containing disinfectant on bonding of self-etch adhesives. Brazil-Japan Joint Research Workshop on ADHESIVE DENTISTRY, 2017/11/1, Sao Paulo, Brazil.

Thongthai P, Kitagawa H, Kitagawa R, Hirose N, Iwasaki Y, Imazato S. Anti-biofilm Effects of Dual-functional Coating Composed of MDPB and MPC, 2018 IADR/PER General Session, 2018 IADR/PER General Session, 2018/7/28, London, England.

Thongthai P, Kitagawa H, Kitagawa R, Hirose N, Iwasaki Y, Imazato S. Antibacterial and Protein-repellent Surface Coating Composed of MDPB and MPC. 第 65 回国際歯科研究学会日本部会学術大会, 2017/11/19, 東京都.

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。