

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007 ～ 2010
 課題番号：19209060
 研究課題名（和文） 抗菌性モノマーの多面的応用による次世代保存治療デザインの探求
 研究課題名（英文） The pursuit of conservative dental treatment design in a new era by diverse utilization of an antibacterial monomer
 研究代表者
 今里 聡（IMAZATO SATOSHI）
 大阪大学・大学院歯学研究科・教授
 研究者番号：80243244

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯科保存分野におけるさまざまな治療法への抗菌性モノマーMDPBの応用の可能性について検討した。その結果、MDPB含有接着システムによる直接覆髄処置が歯髄保存の点で有効であることが分かり、また、MDPBを配合した新規の抗菌性根管充填システムやマルチパーパス接着処理剤、封鎖用レジンのプロトタイプの開発に成功した。さらに、MDPBに対しては口腔細菌が耐性を獲得しにくいことが確認され、抗菌性付与の点で有益な成分であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this research project, the possibility of utilization of an antibacterial monomer MDPB for various treatment modalities in the field of conservative dentistry was examined. It was found that MDPB-containing dentin bonding system was effective to preserve pulp vitality in direct pulp capping therapy. The prototypes of antibacterial root canal filling system, multi-purpose conditioning agent for adhesion, and sealing resin were successfully achieved by incorporation of MDPB. In addition, no development of resistance against MDPB by oral bacteria was confirmed, suggesting the benefits of usage of MDPB as the antimicrobial.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2008年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
総計	37,000,000	11,100,000	48,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：抗菌性、歯科用修復材料、レジンモノマー、歯髄保存療法、根管治療、歯質接着、殺菌作用、耐性

1. 研究開始当初の背景

歯科治療の大半は、感染した組織に対する処置であり、過去100年以上の歴史の中で、外科的に感染病巣を除去することが基本とされてきた。しかし、歯科治療そのものを飛

躍的に進化させるためには、従来のような感染組織の外科的除去を主体とした治療体系から脱却し、感染のコントロールを念頭に置いた新たなアプローチが必要不可欠である。とくに、修復材料を用いた治療では、今日ま

で使用されてきた不活性な材料ではなく、細菌の抑制作用を備えたバイオリジカルな材料を駆使して、新たな治療デザインを確立していく必要がある。

こういった背景のもと、研究代表者らは、まず第四アンモニウムに重合性基を組み込んだ抗菌性モノマーMDPBの開発とそれを配合した接着システムについての研究を進め、2004年に窩洞殺菌作用を備えた接着システムの実用化に世界で初めて成功した。このように、MDPBの臨床応用は一部既に始まっているが、MDPBは、重合前だけでなく、重合後にも接触型の抗菌作用を発揮できるというユニークな特徴を備えている。すなわち、MDPBは、単なるう蝕の修復治療に留まらず、さまざまな歯科治療オプションにおいて有用となる可能性を秘めており、とくに保存治療領域において、抗菌効果の発現に基づく新しい概念の材料や治療法の確立をもたらすポテンシャルの高い化合物である。

2. 研究の目的

本研究では、抗菌性モノマーMDPBの、歯髄保存療法への応用、根管治療への応用、外科的歯内療法・歯の再植療法への応用、マルチパーパス接着処理剤への応用、MDPBに対する耐性菌出現の可能性の検討の5つのプロジェクトを推進することにより、保存治療分野におけるさまざまな治療法への抗菌性モノマーMDPB応用の可能性について検討し、抗菌的アプローチに基づいて生体を守る「次世代の保存治療デザイン」を探究することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯髄保存療法への応用

① 象牙質形成に及ぼす影響の *in vitro* での検討

象牙芽細胞様細胞である MDPC-23 細胞を用いて、MDPB が象牙芽細胞の増殖、分化ならびに石灰化に対して及ぼす影響を、現在頻用されている他のレジンモノマー (Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, MDP) と比較した。また、既に市販されている 5%MDPB 配合セルフエッチングプライマー (メガボンド FA プライマー) と MDPB 非配合のメガボンドプライマー、一液性のトライエスポンド間で、MDPC-23 細胞に対する毒性を比較し、MDPB 配合接着システムの象牙芽細胞への影響について検討した。

② 臨床試験

実際の臨床で、5%MDPB 配合プライマーを組み込んだメガボンド FA または Ca(OH)₂ 製剤である Dycal を用いてランダム化割付で直接覆髄処置を行い、臨床成績

を3年まで比較した。また、抜去予定の歯の重度う蝕による露髄を対象に、メガボンド FA またはメガボンドで直接覆髄を行い、90日後に抜歯して歯髄の状態と dentin bridge の形成を病理組織学的に比較した。

(2) 根管治療への応用

5%MDPB を配合したプライマーとレジンスーラーからなるツーステップタイプの根管充填システムを試作し、以下の項目について評価した。

① 抗菌性

感染根管から高頻度に分離される *Enterococcus faecalis* 等の細菌に対する MDPB 単体および MDPB 配合試作根管充填用プライマーの殺菌作用を、浮遊系とバイオフィーム系の細菌、および抜去歯の根管部象牙質管に *E. faecalis* を侵入させた感染根管モデルを用いた実験系で評価した。

② 根管系封鎖性

試作根管充填システムの根管壁との適合性を、デジタルマイクロスコープおよび SEM での形態学的観察により評価した。

(3) 外科的歯内療法・歯の再植療法への応用

① 試作封鎖用レジンの封鎖能、材料特性と抗菌性の評価

他官能メタクリル系レジンベースに、1~15%の MDPB を配合した封鎖用レジンを試作し、MDPB 配合プライマーとの組合せでの封鎖能や歯根象牙質への接着性について検討した。また、試作レジンの強度と表面での抗菌性発現について検討した。

② 骨再生への影響の *in vitro* での評価とベースレジンの検討

骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞を用いて、骨芽細胞の増殖と分化に対する MDPB の影響を調べた。また、生体組織内で使用するという観点で、生体親和性の点からベースレジンそのものの最適な組成について検討を加える必要があるため、Bis-GMA/TEGDMA 系、4-META/MMA 系、HEMA 系のレジンを用い、各硬化体上での未分化間葉系細胞 C2C12 を培養した場合の増殖と分化能を MTT アッセイ、ALP 活性測定により検討した。さらに、有機溶剤の配合濃度を変えた種々の封鎖用レジンを試作し、実際の口腔内で歯面に適用して、操作性の点から最適な稠度について検討した。

(4) マルチパーパス接着処理剤への応用

MDPB を 1~5%配合した HEMA ベースの接着処理剤を試作し、以下の項目についての評価を行った。

① 接着性

市販のレジンセメントを併用して引張接着試験を行い、エナメル質、象牙質、AuPd

合金、コア用レジンに対する接着性の検討を行った。さらに、Nd:YAG レーザーで処理した象牙質にメガボンド FA を用いてコンポジットレジン充填を行い、引張接着試験を行って MDPB 配合プライマーのレーザー処理象牙質に対する接着性について検討した。

② 抗菌性

数種の嫌気性菌に対する試作処理剤の抗菌効果を評価した。

③ MMP 抑制作用

MDPB による Matrix Metalloprotenases (MMP) の抑制効果を評価し、MDPB 配合による接着耐久性向上の可能性について検討した。

(5) 耐性菌出現の可能性の検討

① 種々の濃度の MDPB の抗菌特性の解析

Sub-MIC レベルの低濃度から MBC の数倍までの種々の濃度の MDPB を用いて、短時間接触での殺菌作用、増殖抑制作用、代謝抑制作用について検討し、MDPB が有する抗菌特性の詳細な解析を行った。

② 耐性獲得の評価

MDPB、塩化セチルピリジニウム (CPC)、ならびにクロヘキシジンを用いて、低濃度の各成分への頻回暴露による *S. mutans* と *E. faecalis* における MIC 変化を測定することにより、口腔細菌による MDPB に対する耐性獲得の可能性について検討した。

4. 研究成果

(1) 歯髄保存療法への応用

① 象牙質形成に及ぼす影響の *in vitro* での検討

MTT アッセイ、ALP の発現と活性測定、DSPP, Nestin, OCN 等の分化マーカーのリアルタイム PCR 解析、生成 Ca 量測定、生成硬組織の X 線回折等により評価した結果、MDPC-23 細胞の増殖と石灰化に対する MDPB の抑制作用は HEMA よりも大きいもの、Bis-GMA, MDP よりも小さいことが分かった。また、MTT アッセイにより MDPC-23 細胞に対する LD₅₀ 値を求めて比較したところ、メガボンド FA プライマーと、MDPB 非配合のメガボンドプライマーやトリエスボンドとの間に差は認められなかった。これらのことから、MDPB が象牙質形成にはとくに悪影響を及ぼさないことが示唆された。

② 臨床試験

メガボンド FA と Dycal の間で 3 年までの臨床成績には差が認められなかった。また、重度う蝕で露髄した面にメガボンドを適用した場合は、歯髄に炎症が残り、硬組織誘導が起こらなかったのに対し、メガボ

ンド FA では、歯髄の炎症が抑えられ、dentin bridge 形成が高頻度に生じることが分かった。

これらの *in vitro* および臨床試験の結果より、MDPB の歯髄面への直接的な適用が象牙質誘導に悪影響を及ぼさず、また、ある程度感染していると考えられる歯髄を保存するうえで有効であることが示された。

(2) 根管治療への応用

① 抗菌性の評価

浮遊系では、MDPB および試作抗菌性根管充填用プライマーは、*E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens* を 60 秒以内の短時間で殺菌することができ、また、バイオフィーム状態のこれらの細菌に対しても、短時間で明瞭な殺菌効果を発揮することが分かった。さらに、感染根管モデルを用いた実験で、試作プライマーが根管内に存在する細菌に対して殺菌作用を発揮することが確認された。

② 根管系封鎖性の評価

試作根管充填システムは根管象牙質に対して良好な接合性を示し、緊密な封鎖状態の達成が確認された。

これらの結果より、新規の試作 MDPB 配合根管充填システムは、抗菌性と封鎖性という要件を満たしており、臨床的に有用である可能性が示された。

(3) 外科的歯内療法・歯の再植療法への応用

① 試作封鎖用レジンの封鎖能、材料特性と抗菌性の評価

酸を用いた脱灰試験により評価した封鎖能、および微小引張接着試験により評価した象牙質接着性の点では、すべての濃度の MDPB 配合レジンが良好な成績を示した。しかし、硬さや耐摩耗性の点では、5%以上の MDPB の添加により低下が認められ、5%未満の濃度が望ましいことが分かった。逆に、5%以上の MDPB が配合されたレジン表面では、抗菌性の発現が認められ、プラークの成熟が抑制された。

② 骨再生への影響の *in vitro* での評価とベースレジンの検討

MTT アッセイおよび ALP 活性測定の結果から、MDPB の骨芽細胞の増殖と分化に対する抑制作用は Bis-GMA よりも小さいことが分かった。また、HEMA 系レジンと比べて、Bis-GMA/TEGDMA 系および 4-META/MMA 系レジン上では C2C12 細胞はすぐれた増殖と分化能を示した。これらの材料からの溶出モノマーの解析結果から、未重合モノマー量が少ないレジンでは細胞へのダメージが小さいことが明らかとなった。また、封鎖材としては、流し込み

に有利な稠度の低いレジンが実際の臨床使用に適していることが分かった。

これらの結果より、本研究において試作した封鎖用レジンには、すぐれた封鎖能や接着性が認められたものの、物性と抗菌性を両立させる点でMDPBの配合濃度についてさらなる検討が必要であることが分かった。また、歯周組織等に接触させる基材としては、メタクリレート系の中でも重合性にすぐれたレジンが適していること、臨床で使用するうえでは材料のフローにも重きを置く必要があることが分かり、実用化を考えた場合、これらすべての条件を満たすようにベースレジンそのものから再調整する必要のあることが分かった。

(4) マルチパーパス接着処理剤への応用

① 接着性の評価

いずれの被着体に対しても、5%までのMDPB配合であれば、接着性に悪影響は認められず、現在臨床で使用されているレジンセメントと同程度の高い接着性を示すことが分かった。またメガボンドFAプライマーは、Nd:YAGレーザーで処理した象牙質に対しても高い接着性を示し、MDPBがレーザー処理象牙質への接着に対しても悪影響を示さないことが確認された。

② 抗菌性の評価

寒天平板法および短時間接触殺菌試験にて、試作処理剤が、*E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. nigrescens*に対して強い殺菌作用を有していることが確認された。

③ MMP抑制作用の評価

MDPBには、高いMMP抑制作用が認められた。とくに、5%の濃度のMDPBで、MMP-9や象牙質結合型のMMPが強く抑制されることが分かった。

これらの結果より、試作処理剤が、抗菌効果とさまざまな被着体に対する高い接着性を示すことが確認され、抗菌性を備えたマルチパーパス接着処理剤として有用であると考えられた。また、MMP抑制作用が認められる点で、接着材へのMDPBの配合が接着界面の耐久性向上に寄与する可能性が示唆された。

(5) 耐性菌出現の可能性の検討

① 種々の濃度のMDPBの抗菌特性の解析

MBCの数倍以上の濃度のMDPBは、浮遊系あるいはバイオフィーム系の*S. mutans*に対して、20~60秒以内に強い殺菌作用を示すことが分かった。一方、sub-MIC濃度のMDPBでも、*S. mutans*の増殖や糖代謝活性が抑制され、最終産物である乳酸の産生が抑えられることが分かった。

② 耐性獲得の評価

*E. faecalis*において、クロルヘキシジ

ンへの頻回暴露でMICの上昇が生じ、耐性獲得が認められた。さらに、耐性を獲得した*E. faecalis*が高い糖代謝能を維持していることも確認された。これに対して、第四アンモニウム系の抗菌成分であるMDPBとCPCでは、いずれの細菌でもMICの上昇は生じず、耐性獲得が認められなかった。

以上のことから、第四アンモニウムの誘導体であるMDPBは、一定以上の濃度であれば非常に短時間で細菌を死滅させる能力を有しており、また耐性の出現の可能性の点でクロルヘキシジンよりすぐれていることが示された。

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23件)

1. Izutani N, Imazato S, Nakajo K, Takahashi N, Takahashi Y, Ebisu S, Russell RRB. Effects of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) on bacterial viability and metabolism. *Eur J Oral Sci* 119: 175-181, 2011. 査読有
2. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, Breschi L, Nishitani Y, Tay FR, Pashley DH. The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *J Dent Res* 90: 535-540, 2011. 査読有
3. Nishida M, Imazato S, Takahashi Y, Ebisu S, Ishimoto T, Nakano T, Yasuda Y, Saito T. The influence of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide on the proliferation, differentiation and mineralization of odontoblast-like cells. *Biomaterials* 31: 1518-1532, 2010. 査読有
4. Izutani N, Imazato S, Noiri Y, Ebisu S. Antibacterial effects of MDPB against anaerobes associated with endodontic infections. *Int Endod J* 43: 637-645, 2010. 査読有
5. Imazato S, Horikawa D, Takeda K, Kiba W, Izutani N, Yoshikawa R, Hayashi M, Ebisu S, Nakano T. Proliferation and differentiation potential of pluripotent mesenchymal precursor C2C12 cells on resin-based restorative materials. *Dent Mater J* 29: 341-346, 2010. 査読有
6. Kiba W, Imazato S, Takahashi Y, Yoshioka S, Ebisu S, Nakano T. Efficacy of

- polyphasic calcium phosphates as a direct pulp capping material. *J Dent* 38: 828-837, 2010. 査読有
7. Imazato S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. *Dent Mater J* 28: 11-19, 2009. 査読有
 8. Imazato S, Horikawa D, Nishida M, Ebisu S. Effects of monomers eluted from dental resin restoratives on osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res Part B: Applied Biomaterials* 88B: 378-386, 2009. 査読有
 9. Wu H, Hayashi M, Okamura K, Koytchev EV, Imazato S, Tanaka S, Tanaka Y, Sano H, Ebisu S. Effects of light penetration and smear layer removal on adhesion of post-cores to root canal dentin by self-etching adhesives. *Dent Mater* 25: 1484-1492, 2009. 査読有
 10. Imazato S, Ohmori K, Russell RRB, McCabe JF, Momoi Y, Maeda N. Determination of bactericidal activity of antibacterial monomer MDPB by a viability staining method. *Dent Mater J* 27: 145-148, 2008. 査読有
 11. Kaneshiro AV, Imazato S, Ebisu S, Tanaka S, Tanaka Y, Sano H. Effects of a self-etching resin coating system to prevent demineralization of root surfaces. *Dent Mater* 24: 1420-1427, 2008. 査読有
 12. Hayashi M, Okamura K, Wu H, Takahashi Y, Koytchev EV, Imazato S, Ebisu S. The root canal bonding of chemical-cured total-etch resin cement. *J Endod* 34: 583-586, 2008. 査読有

[学会発表] (計48件)

1. Izutani N, Kitagawa H, Imazato S, Yoshikawa R, Ebisu S: Evolution of resistance to chlorhexidine in *Enterococcus faecalis*. 89th IADR, Mar 19, 2011, San Diego, USA.
2. 泉谷尚美, 北川晴朗, 今里 聡, 吉川蘭奈, 恵比須繁之: クロルヘキシジンに対する *Enterococcus faecalis* の耐性獲得, 第133回日本歯科保存学会, 2010年10月28日, 岐阜市.
3. Kaneshiro AV, Imazato S, Kiba W, Ebisu S: Effects of coating-resins and adhesives against demineralization on root surfaces. 88th IADR, July 16, 2010, Barcelona, Spain.
4. 吉川蘭奈, 今里 聡, 泉谷尚美, 恵比須繁之: 抗菌性を備えたレジン系根管充填シーラーの開発～根管充填用 MDPB 配合プライマーの抗菌性評価～, 第132回日本歯科保存学会, 2010年6月5日, 熊本市.
5. 泉谷尚美, 今里 聡, 中條和子, 高橋信博, 高橋雄介, 恵比須繁之: 種々の濃度での抗菌性モノマーMDPBの殺菌・静菌特性の解析, 第131回日本歯科保存学会, 2009年10月29日, 仙台市.
6. Izutani N, Imazato S, Takahashi Y, Ebisu S, Russell RRB: Antibacterial effects of MDPB against anaerobes associated with endodontic infections. 87th IADR, Apr 4, 2009, Miami, USA.
7. Nishida M, Imazato S, Ebisu S, Yasuda Y, Saito T, Ishimoto T, Nakano T. Influences of MDPB on differentiation and mineralization of odontoblast-like cells. 87th IADR, Apr 3, 2009, Miami, USA.
8. Özer F, Alptekin T, Cobanoglu N, Unlu N, Imazato S: The effect of MDPB on dentin bridging of exposed pulps. 86th IADR, July 4, 2008, Toronto, Canada.
9. Eneren E, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Gurgan S: Coating effects of antibacterial resins containing MDPB on root surface. 86th IADR, July 3, 2008, Toronto, Canada.
10. Izutani N, Imazato S, Takahashi Y, Ebisu S, Russell RRB: Effects of short-period exposure to antibacterial monomer MDPB on viability of *Streptococcus mutans*. International Dental Materials Congress 2007, Nov 24, 2007, Bangkok, Thailand.
11. Imazato S: Bio-active restorative materials with antibacterial effects - Innovative materials in the new era. International Dental Materials Congress 2007, Nov 22, 2007, Bangkok, Thailand.
12. 西田万里子, 今里 聡, 高橋雄介, 安田善之, 斎藤隆史, 恵比須繁之: 抗菌性モノマーMDPBが象牙芽細胞様細胞の増殖, 分化ならびに石灰化に及ぼす影響. 第127回日本歯科保存学会, 2007年11月8日, 岡山市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今里 聡 (IMAZATO SATOSHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 80243244

(2)研究分担者

野杵 由一郎 (NOIRI YUICHIRO)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：50218286

林 美加子 (HAYASHI MIKAKO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：40271027

中野 貴由 (NAKANO TAKAYOSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：30243182

高橋 雄介 (TAKAHASHI YUSUKE)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60397693

(H19～H20年度までとH22年度に分担者として参画)