

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 8月28日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792257

研究課題名（和文） 抗菌性改質剤含有義歯床用レジンの開発

研究課題名（英文） Development of resin for antibacterial modifier component denture bases

 研究代表者 清水 統太（SHIMIZU TOTA）
 神奈川歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：90329201

研究成果の概要（和文）：高齢者に増加している口腔カンジダ症を予防するために、様々な材料表面へ抗菌性を付与するために開発された抗菌性改質剤を用いて、義歯への応用を目的とし検討を行った。その結果、改質剤に細胞毒性は認められず、生体に無害であることを確認した。さらに、抗菌効果を検討したところ、カビ菌（*C. albicans*）に対する抗菌活性が認められたため、義歯への有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have investigated to denture used modifier having antibacterial, to prevention of increased a mycotic stomatitis. The result showed to have no cytotoxicity of that modifier, to determine. Antibacterial activity was recognized against the *C. albicans*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学・有床義歯補綴学

キーワード：カンジダ症 抗菌性改質剤 義歯床

1. 研究開始当初の背景

年々、残存歯数は増加しているものの、超高齢社会となった日本は義歯を必要とする患者は後を絶たず、肺炎による死亡原因も近年大きな変化はなく上位に位置している。

2. 研究の目的

有床義歯を装用する患者は口腔内の自浄性や清掃性が劣るうえ有床義歯自体が細菌の温床になること、また健常者と比較して真菌類の占める割合が高くなることが多数報告されている。さらに有床義歯装着者は高齢者が数多く占めるため、全身的代謝、免疫機能の低下を来している場合が多く、日和見感染による菌交代現象から重篤な症状を呈することは少なくない。それら疾病を予防するためにも重要になるのが義歯の洗浄や清掃

性の向上である。そこで有床義歯自体に抗菌性を持たせ、誤嚥性肺炎をはじめとする疾病の予防を目的として、研究支援者の一人である東京理科大学工学部工業化学科の好野等が開発した抗菌性改質剤を PMMA レジンに添加することで抗菌性を有する義歯床の開発を行い、急速な高齢化が進んでいる我が国の国民の口腔内衛生状態の改善に寄与する。

3. 研究の方法

(I) 細胞毒性試験

抗菌剤として第4級アンモニウム塩の構造を有するシランカップリング剤である 10-I、および 18-I を用いた。

表面の汚染物質を除去したガラス板を改質剤中に浸漬して表面改質を行った。

実験には 1 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液

と 1 mol/L の塩酸に各一昼夜浸漬して表面の汚染物質を除去した市販ガラス板 (15×15×3 mm, 旭ガラス) を 20 mmol/L に調製した十分量の各改質剤中に 1 時間浸漬して表面改質を行い, 物理的に吸着した余剰な 10-I を除去するために EtOH で洗浄して自然乾燥後, エチレンオキサイドガスにより滅菌した. 陰性対照材料は高密度ポリエチレンフィルム ((財) 食品薬品安全センター秦野研究所), 陽性対照材料 A は 0.1% Zinc diethyldithiocarbamate (以下 ZDEC) 含有ポリウレタンフィルム ((財) 食品薬品安全センター秦野研究所), 陽性対照材料 B は 0.25% Zinc dibutyldithiocarbamate (以下 ZDBC) 含有ポリウレタンフィルム ((財) 食品薬品安全センター秦野研究所), 陽性対照物質は ZDBC (和光純薬工業株式会社) を用いた.

実験にはチャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞 (以下 V79, (財) ヒューマンサイエンス振興財団) を用いた. 細胞の継代に用いる培養液は 10 vol% ウシ胎児血清 (SAFC Biosciences Inc., Lot No. 7E0350, USA), 0.06 mg/mL カナマイシンを含む Eagle's Minimum Essential Medium (以下 MEM, 日本製薬株式会社) を用いた. 試験実施時には, 5 vol% ウシ胎児血清含有 MEM (Sigma-Aldrich Corporation, USA) に, 非必須アミノ酸, 1 mmol/L ピルビン酸及び 0.05 mg/mL カナマイシンを添加した M05 培地²⁴⁾を用いた. 培養条件は 37°C, 5% CO₂ インキュベーター中で静置培養とした.

各被験物質 10 個を無菌的に取り出し, この被験物質の表面積 6 cm² に対し M05 培地を 1 mL の割合で加え, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター中で 24 時間抽出した. この抽出液を試験原液とし, 0.5, 1.0, 3.2, 5.0, 6.3, 10.0, 12.5, 25.0, 50.0% および 100% になるよう M05 培地を用いて調整した計 10 種類の濃度の検体試験液を調製した.

対照物質の抽出は, 陰性対照材料および陽性対照材料をそれぞれ 121°C, 15 分間高压蒸気滅菌した後, これらの重量 1 g に対し M05 培地を 10 mL の割合で加えて被験物質と同様に抽出を行い, その抽出液を陰性対照材料試験液および陽性対照材料試験液とした. 陰性対照材料試験液は, M05 培地に 5 µl/mL となるようジメチルスルホキシドを添加したものを, そして陽性対照材料 A 試験液は, 0.2, 0.6 および 1.8%, 陽性対照材料 B 試験液は, 25.0, 50.0 および 100% になるよう M05 培地を用いて希釈し, 試験に用いた. また, ブランクコントロールとして, M05 培地のみについて検体と同様の抽出を行った空抽出試験液を使用した. 陽性対照物質は, ジメチルスルホキシドに溶解させた後, 0.5, 1.0 および 2.0 µg/mL になるよう M05 培地を用いて希釈し, 試験に用いた.

単層に増殖した V79 細胞をトリプシン処理により剥離し, M05 培地を用いて 100 個/mL/well の細胞浮遊液を調製した. この細胞浮遊液を組織培養用プラスチックプレートに 0.5 mL/well 播種し, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター中で 6 時間培養した. 培養後, 細胞がプレートの底面に接着していることを確認してから培地を除き, 各濃度の検体試験液, 陰性対照材料試験液及びブランクコントロールを 0.5 mL/well 加え, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター中で 6 日間培養した. また, 細胞培養した別のプレートに各濃度の陽性対照材料試験液, 陰性対照材料試験液, 陽性対照物質試験液およびブランクコントロールを 0.5 mL/well 加え, 同様に培養した. 培養終了後, 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し, 0.1% メチレンブルー溶液で染色して, 細胞数 50 個以上のコロニーを計測した.

(II) 最小発育阻止濃度 (MIC)

EtOH にて 20 mmol/L に調製した 10-I 溶液を作製し, BHI-yeast 寒天培地および血液寒天培地に加え, 培地に含有される 10-I の濃度が 100, 200, 400, 600 および 800 ppm (1.6 mmol/L) になるよう調製した. その後, 培地を高压蒸気滅菌しシャーレに注入して固化させた. 作製した寒天培地上に各供試菌懸濁液 10 µL を播種した. その後, 好気性菌は 37°C, 24 時間, 嫌気性菌は 37°C, CO₂: 10%, H₂: 10%, N₂: 80% の嫌気性条件下で 72 時間培養し, 発育が観察されなかった培地の最小化合物濃度を MIC 値とした.

(III) *C. albicans* に対する抗菌活性

先の *C. albicans* に対する MIC を基に, 10-I を EtOH にて 400 ppm の濃度に調製し実験に供した. 供試菌は神奈川歯科大学感染制御学講座微生物学分野保存菌株の *C. albicans* を用いた.

実験 I と同様に洗浄した市販ガラス板を 400 ppm に調製した十分量の改質剤中に 1 時間浸漬して表面改質後, 物理吸着した余剰な改質剤を EtOH にて洗い流して自然乾燥後, エチレンオキサイドガスにより滅菌した. 対照群は, 溶媒である EtOH を用いて 10-I と同様の処理を施し, 実験に供した.

BHI-yeast 液体培地にて前培養した *C. albicans* を, 1.1×10⁴ CFU/mL, 1.1×10⁵ CFU/mL および 6.2×10⁷ CFU/mL に調製し, 各菌液 4 mL と表面改質したガラス板を各ウェルに 1 枚ずつ加え, 一定振盪下で 37°C, 24 時間好氣的に培養した. 培養後, 各ウェルの生菌数を計測し, 対照ウェルの菌数と実験ウェルの菌数の割合を比較して減少率を求め抗菌活性とした.

(IV) 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

実験 I と同様に, 清浄化したカバーガラス (φ 12 mm, Menzel, Braunschweig, Germany)

を 800 ppm に調製した十分量の 10-I 中に 1 時間浸漬して表面改質の後、物理吸着した余剰な改質剤を EtOH にて洗い流して自然乾燥後、オートクレーブにて滅菌した。対照群は溶媒である EtOH を使用し、実験群と同様に処理して用いた。

バイオフィルムの作製には、Exterkate らの報告したポリマイクロバイアルバイオフィルムを使用した。すなわち、1 被験者から採取した刺激唾液を、McBain medium²⁵⁾, pH 7.5 に終濃度 0.2% になるようにスクロースを添加した混合液で 50 倍希釈し、ポリスチレン製の 24 ウエルプレートに 1.5 mL ずつ分注し、37°C, CO₂: 10%, H₂: 10%, N₂: 80% の嫌気条件下で 10 時間培養し、バイオフィルムを作製した。培養終了後、cysteine peptone water (CPW) にて 3 回洗浄し、2 mL の PBS 中に各試料を移して 90 秒間超音波振動させ、試料から細菌を剥離、回収した。その後、各菌液を CPW にて階段希釈を行い、Tryptic Soy 血液寒天培地に 50 μL 播種し、37°C, CO₂: 10%, H₂: 10%, N₂: 80% の嫌気条件下で 3 日培養後、各培地の生菌数を計測した。

4. 研究成果

(I) 細胞毒性試験

陰性対照群のコロニー形成率は 91.6% であり、ブランクコントロールと有意な差は認められなかった。陽性対照材料 A および B の IC₅₀ はそれぞれ 0.8% と 66.1%、陽性対照材料は 1.3% であった。被試験物質である 10-I の IC₅₀ は >100% であった。しかし、18-I のコロニー形成率は 10.0% でコロニーの縮小、25.0% でコロニーの縮小および染色性の低下が認められ、IC₅₀ は 18.8% であった。

(II) 最小発育阻止濃度 (MIC)

各細菌における MIC は *viscosus*, *L. casei*, *E. nucleatum*, *P. gingivalis* および *P. intermedia* の 5 菌株の MIC は 200 ppm であった。また、*C. albicans*, *S. aureus* および *S. mutans* の MIC は 400 ppm であった。

(III) *C. albicans* に対する抗菌活性

各ウエルの生菌数を計測し、対照ウエルの菌数と実験ウエルの菌数の割合を比較して減少率を求めたところ、10-I 改質面の生菌数の減少率は、 1.1×10^4 CFU/mL では 92.5%、 1.1×10^5 CFU/mL では 67.1%、 6.2×10^7 CFU/mL では 56.5% であった。

(IV) 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

各ウエルの生菌数を計測し、対照ウエルの菌数と実験ウエルの菌数の割合を比較して減少率を求めた結果、10-I 群の生菌数は 3.4×10^4 CFU/disk であり、対照群の 16.8×10^4 CFU/disk に比較して約 80% が失活されており、強い抗菌活性を示した。

10-I 改質面の生菌数の減少率は、 1.1×10^4

CFU/mL では 92.5%、 1.1×10^5 CFU/mL では 67.1%、 6.2×10^7 CFU/mL では 56.5% であった。

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 1 件)

三宅 香、大橋 桂、二瓶智太郎、清水統太、山口真一郎、近藤行成、好野則夫、寺中敏夫、抗菌性シランカップリング剤の細胞毒性、日本歯科保存学雑誌、査読有、54 巻 (6) 2011、393-398

[学会発表] (計 10 件)

①二瓶智太郎、K-H Kunzelmann、倉田茂昭、山口真一郎、大橋 桂、三宅 香、清水統太、芹田枝里、原 健一郎、近藤行成、好野則夫、寺中敏夫、フッ化炭素鎖を含む表面処理剤の歯科への応用 (XX) - 混合シランの物理化学的特性 -、日本歯科保存学会、2011. 10. 21. 大阪

②三宅 香、熊田秀文、二瓶智太郎、大橋 桂、清水統太、山口真一郎、近藤行成、好野則夫、浜田信城、寺中敏夫、抗菌性シランカップリング剤の抗菌効果、神奈川歯科大学学会、2011. 12. 3. 神奈川

③Miyake K, Ohashi K, Nihei T, Kurata S, Shimizu T, Kondo Y, Yoshino N, and Teranaka T

Cytotoxicities of tooth surface modifiers having antibacterial potency.

IADR 2011. 9. 3. Budapest

④三宅 香、熊田秀文、二瓶智太郎、大橋 桂、清水統太、原 めぐみ、近藤行成、好野則夫、浜田信城、寺中敏夫、抗菌性表面改質剤の歯科への応用 (II) - 抗菌性シランカップリング剤の抗菌効果 -、2012 年度春季学会 (第 136 回) 日本歯科保存学会、2012. 6. 29. 沖縄

⑤大橋 桂、二瓶智太郎、三宅 香、清水統太、芹田枝里、原 健一郎、寺中文子、大橋 崇明、小泉忠彦、近藤行成、好野則夫、寺中敏夫、フッ素系シランと芳香族系シランの細胞毒性について、2012 年度春季学会 (第 136 回) 日本歯科保存学会、2012. 6. 29. 沖縄

⑥三宅 香、二瓶智太郎、富山 潔、長谷川晴彦、向井義晴、大橋 桂、清水統太、熊田秀文、近藤行成、好野則夫、浜田信城、寺中敏夫、マイクロコスモバイオフィルムに対する抗菌性シランカップリング剤の抗菌効果、2012 年度秋季学会 (第 137 回) 日本歯科保存学会、2012. 11. 23. 広島

⑦三宅 香、二瓶智太郎、富山 潔、長谷川晴彦、向井義晴、大橋 桂、清水統太、熊田秀文、近藤行成、好野則夫、浜田信城、寺中敏夫、ポリマクロバイアルバイオフィルムに対

する抗菌性シランカップリング剤の抗菌効果、神奈川歯科大学学会第47回総会、2012.

12. 1. 横須賀

⑧寺中文字子、大橋 桂、芹田枝里、清水統太、二瓶智太郎、寺中敏夫、各種修復材料の表面粗さと表面自由エネルギーについて(第2報)、神奈川歯科大学学会第47回総会、2012. 12.

1. 横須賀

⑨二瓶智太郎、岡田周策、清水統太、鈴木敏行、寺中敏夫、疎水性シランカップリング剤処理層の運動性と微細構造について、日本補綴歯科学会西関東支部会総会・学術大会、2013. 1. 20. 横浜

⑩二瓶智太郎、三宅 香、寺中文字子、大橋 桂、清水統太、向井義晴、寺中敏夫、大規模災害後における口腔ケアに対する歯面塗布剤と義歯塗布剤の開発とマニュアルの作成、第1回災害医療歯科学研究報告会、2013. 3. 31. 横須賀

[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

清水統太 (SHIMIZU TOTA)

神奈川歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 90329201

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: