

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893121

研究課題名(和文) 抗菌性モノマーを配合したマルチユースタイプの抗菌性歯面処理剤の開発

研究課題名(英文) Development of a cavity disinfectant containing the antibacterial monomer for multiple restorations

研究代表者

北川 蘭奈 (Kitagawa, Ranna)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70711068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗菌性モノマーMDPBを含有する窩洞殺菌材を試作し、その抗菌効果と、種々の接着材の歯質接着性に及ぼす影響をin vitroにて検討した。阻止斑形成試験および最小発育阻止濃度/最小殺菌濃度測定により、試作窩洞殺菌材が市販のクロルヘキシジン窩洞清掃剤よりも強い抗菌力を有することが明らかとなった。また、感染象牙質モデルを用いた実験の結果、試作窩洞殺菌材が象牙細管内に存在する細菌を効果的に死滅させることが分かった。さらに、市販窩洞清掃剤とは異なり、間接・直接修復用の各種接着材の歯質接着性に悪影響を及ぼさないことから、試作窩洞殺菌材が臨床において有用な材料である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the experimental cavity disinfectant containing MDPB was prepared, and its antibacterial activity and influences on bonding of various adhesives to tooth structure were evaluated in vitro. Agar diffusion tests and minimum inhibitory/bactericidal concentrations measurements demonstrated that the experimental cavity disinfectant has greater antibacterial activity than the commercially available chlorhexidine-containing cavity conditioner. In addition, the experimental cavity disinfectant was found to be effective to kill bacteria in dentinal tubules by bactericidal activity tests using an infected dentin model. Application of the experimental cavity disinfectant showed no negative influences on the bonding abilities of various adhesives for indirect/direct restorations, while the chlorhexidine-conditioner harmfully affected bonding of self-adhesive resin cements to dentin. These results indicate possible clinical usefulness of the experimental cavity disinfectant.

研究分野：歯学

キーワード：抗菌性 レジンモノマー 第四アンモニウム化合物 歯面処理剤 Streptococcus mutans

## 1. 研究開始当初の背景

窩洞内の残存細菌や形成後に歯質に感染した細菌が修復物下で増殖し、治療後に生じる知覚過敏や二次う蝕の原因となりうることから、窩洞清掃剤による歯面処理が行われることが多い。しかしながら、例えばクワロルヘキシジンによる歯面清掃処理は、その後に適用される接着材料の歯質接着性を低下させる場合があることが報告されている。

今里らによって開発された抗菌性モノマーである 12-methacryloyloxydodecyl pyridinium bromide (MDPB) は、第四アンモニウムにメタクリロイル基を導入したレジンモノマーで、未重合状態で種々の口腔細菌に対して強い殺菌作用を発現するとともに、重合することで抗菌活性部位がレジンポリマーに固定化されるという特徴を有している。したがって、この重合可能な殺菌成分である MDPB を用いれば、直接修復や間接修復、ポスト植立等の様々な修復治療に使用されるレジン系接着材の歯質接着性に悪影響を及ぼさず、確実な抗菌効果を発揮する歯面処理材の開発が可能であると着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、エタノール水溶液に MDPB を配合した新規の窩洞殺菌材を試作し、その (1) 抗菌効果を市販の窩洞清掃剤と比較する (2) 各種接着材の歯質接着性に及ぼす影響を評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MDPB の抗菌力評価

う触関連細菌である *Streptococcus mutans* NCTC10449, *Actinomyces naeslundii* ATCC19246, *Lactobacillus casei* ATCC4646, *Parvimonas micra* GIFU7745、および感染根管関連細菌である *Enterococcus faecalis* SS497, *Fusobacterium nucleatum* 1436, *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 に対する MDPB の最小発育阻止濃度 (MIC) / 最小殺菌濃度 (MBC) を micro dilution assay にて測定した。比較として、市販の窩洞清掃剤に含有されている chlorhexidine digluconate (CHX) と、洗口剤等に頻用される cetylpyridinium chloride (CPC) の MIC/MBC 値の測定を行った。

### (2) 試作窩洞殺菌材の抗菌効果の検討

80 (wt)%エタノールに MDPB を 5%配合した試作窩洞殺菌材 (以下 ACC) コントロールとしての 80 (wt)%エタノール (以下 Et) および 2% chlorhexidine digluconate を含有する市販窩洞清掃剤 Consepsis (Ultradent 社、以下 CPS) を被験材料とした。

#### 阻止斑形成試験

3 (1) で用いた 7 菌種に対する ACC、Et、および CPS の抗菌性を寒天平板拡散法により

評価した。

#### MIC/MBC 測定

*S. mutans* NCTC10449 に対する ACC、Et、および CPS の MIC/MBC を測定した。

#### 感染象牙質モデルを用いた即時殺菌効果の検討

ヒト抜去大白歯の歯冠象牙質から切り出した象牙質ブロックを  $1 \times 10^8$  CFU/mL の *S. mutans* NCTC10449 懸濁液中に浸漬し、37 で 12 時間嫌気培養を行って重度の感染象牙質モデルを作製した。また、 $1 \times 10^5$  CFU/mL の *S. mutans* 懸濁液中で 6 時間嫌気培養を行ったものを軽度の感染象牙質モデルとした。これらの感染モデルの表面を ACC、Et、または CPS で処理した後、ただちに 1 mm の深さまでラウンドバーで象牙質を切削回収して、残存生菌数の測定を行った。

また、ACC 処理後の感染象牙質モデルを Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits を用いて染色し、象牙細管内に侵入した細菌の生死を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて観察した。

### (3) 各種接着材の歯質接着性に対する影響の評価

#### レジンセメントに対する影響

牛歯のエナメル質または象牙質表面を ACC または CPS にて処理後、PANAVIA F2.0、あるいはクリアフィル SA セメントオートミックスをを用いてステンレス棒を接着させ、37 で 24 時間保管後にせん断接着試験を行った。

#### 支台築造用および充填用接着システムに対する影響

ヒト抜去大白歯の象牙質を ACC または CPS で処理後、クリアフィルボンド SE ONE を用いてコンポジットレジン築盛し、37 で 24 時間保管後に微小引張接着試験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) MDPB の抗菌力評価

7 種の口腔細菌に対する MDPB の MIC 値は 3.2~6.4  $\mu\text{g/mL}$  であり、MBC 値は 12.8~51.2  $\mu\text{g/mL}$  であった。これらの値は CPS および CPC のものよりも高いものの、被験菌すべてに対して MDPB が強い抗菌力を備えていることが明らかとなった。

### (2) 試作窩洞殺菌材の抗菌効果の検討

#### 阻止斑形成試験

ACC は、7 種の口腔細菌すべてに対して CPS と同等の大きさの阻止斑を形成した。Et では、ほぼすべての細菌に対して阻止斑の形成は認められなかった。

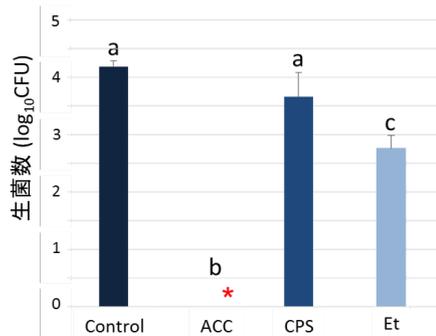
#### MIC/MBC 測定

ACC の MIC 値は CPS と同一で 0.012% (原液に対する%濃度) であったが、ACC の MBC 値は

0.098%であり、0.49%であった CPS より低かった。したがって、ACC が CPS と比較してより強い抗菌力を備えていることが分かった。Et は、測定可能な濃度において抗菌性を示さなかった。

### 感染象牙質モデルを用いた即時殺菌効果の検討

軽度の感染モデル



\* 細菌を認めず

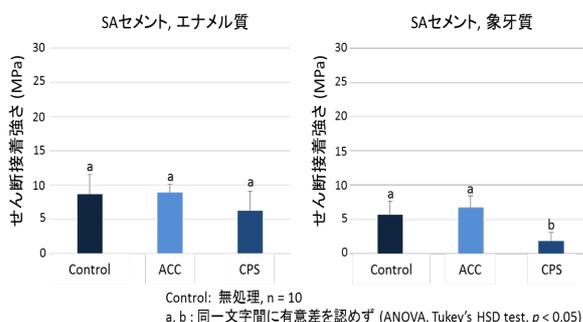
Control: 無処理, n = 3  
a, b, c : 同一文字間に有意差を認めず (ANOVA, Tukey's HSD test, p < 0.05)

CPS 処理後の残存生菌数は無処理の場合と有意差がなかったのに対し、ACC 処理によって生菌数の有意な減少が認められた。とくに、軽度の感染モデルでは、ACC 処理によりすべての細菌を死滅させることが可能で、ACC が強い即時的な殺菌作用を示すことが明らかとなった。

象牙細管内に侵入した細菌の生死を CLSM で確認したところ、ACC 処理によって細菌が死滅している様子が認められ、試作窩洞殺菌材が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。

### (3) 各種接着材の歯質接着性に対する影響の評価

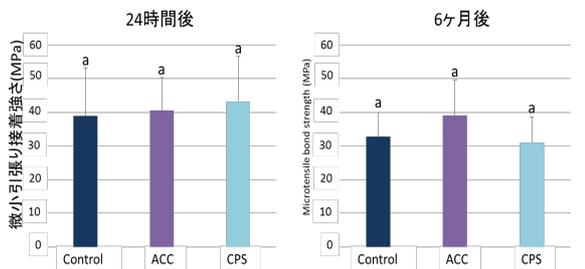
#### レジンセメントに対する影響



Control: 無処理, n = 10  
a, b : 同一文字間に有意差を認めず (ANOVA, Tukey's HSD test, p < 0.05)

PANAVIA F2.0 に対しては、エナメル質、象牙質とも、ACC、CPS のいずれの処理でも接着強さへの影響は認められなかった。一方、クリアフィル SA セメントに対しては、CPS 処理では象牙質接着強さが有意に低下したが、ACC 処理では無処理との間に有意差が認められなかった。

### 支台築造用および充填用接着システムに対する影響



Control: 無処理, n = 10  
a, b : 同一文字間に有意差を認めず (ANOVA, Tukey's HSD test, p < 0.05)

ACC および CPS で処理したものはともに、無処理のものとは比べて接着強さに有意差はなく、試作窩洞殺菌材による処理が悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。

以上より、試作 MDPB 含有窩洞殺菌材は、市販のクロルヘキシジン窩洞清掃剤よりも抗菌力が強く、感染象牙質モデルを用いた実験から、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分かった。また、クロルヘキシジン窩洞清掃剤とは異なり、間接・直接修復用の各種接着材の歯質接着性に悪影響を及ぼさないことが明らかとなり、試作窩洞殺菌材が臨床において有用な材料である可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kitagawa R, Kitagawa H, Izutani N, Hirose N, Hayashi M, Imazato S. Development of an antibacterial root canal filling system containing MDPB. *J Dent Res*. 査読有. 93(12):1277-82, 2014.

DOI: 10.1177/0022034514549808

〔学会発表〕(計 6 件)

廣瀬奈々子、北川蘭奈、北川晴朗、林美加子、今里 聡. MDPB 含有窩洞殺菌材の抗菌効果と歯質接着性への影響の評価. 日本歯科理工学会第 65 回春期学術大会、2015 年 4 月 11 日、仙台

Kitagawa R, Mehdawi IM, Yamaguchi S, Kitagawa H, Hirose N, Imazato S. Self-adhesive resin cement containing chlorhexidine. International Association for Dental Research 93rd General Session & Exhibition, 2015, March 13, Boston

Kitagawa H, Kitagawa R, Takeda K, Tsuboi R, Sasaki JI, Hayashi M. Imazato S. Endodontic sealers containing CPC-loaded polymer particle with long-lasting antimicrobial release. International Association for Dental Research 93rd General Session & Exhibition, 2015, March 13, Boston

Kitagawa H, Kitagawa R, Takeda K, Tsuboi R, Sasaki JI, Hayashi M. Imazato S. Endodontic sealers containing CPC-loaded polymer particle with long-lasting antimicrobial release. International Association for Dental Research 93rd General Session & Exhibition, 2015, March 13, Boston

Association for Dental Research 93rd  
General Session & Exhibition, 2015,  
March 13 Boston

巽 奈々子、北川蘭奈 北川晴朗、林  
美加子、今里 聡 .MDPB 配合抗菌性コン  
ディショナーの開発-各種口腔細菌に対  
する抗菌効果の評価 .日本歯科理工学会  
第 62 回秋期学術大会、2013 年 10 月 21  
日、新潟

Kitagawa R, Kitagawa H, Tatsumi N,  
Hayashi M, Imazato S. Assessment of  
antibacterial effects of newly  
developed MDPB-containing primer for  
root canal filling. Academy of Dental  
Materials Annual Meeting 2013, 2013.  
October 12 Vancouver

巽 奈々子、北川蘭奈、北川晴朗、林 美  
加子、今里 聡 .MDPB 配合抗菌性コン  
ディショナーの開発-各種口腔細菌に対  
する抗菌効果の評価 .日本歯科理工学会  
近畿・中四国地方会夏季セミナー、2013  
年 9 月 6 日、岡山

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

北川 蘭奈 (KITAGAWA Ranna)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号 : 70711068