The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	レジンモノマーと口腔細菌の増殖との関連性に関する研究
Author(s)	高橋, 雄介
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/43667
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

レジンモノマーと口腔細菌の増殖との関連性に関する研究

大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子感染制御学講座（歯学保存学教室）
（指導教官：恵比須　繁之 教授）
高橋　雄介

本研究の要旨の一部は、第 112 回日本歯科保存学会（大阪、平成 12 年 4 月 21 日）において発表した。

緒言

近年、コンポジットレジンは、前歯部のみならず臼歯部の修復にも適用されるようになり、日常の臨床において極めて高頻度に用いられている。コンポジットレジンの硬化は、ベースとなる二官能性モノマーの重合によるものであるが、臨床で行われているような数十秒の光照射ではもちろんのこと、加熱等の後重合処理を行っても 100%の重合率は得られないため、その硬化体から未重合のモノマーが溶出することが知られている [1~10]。コンポジットレジンからのモノマー溶出が引き起こす問題としては、機械的強度の低下 [11~14] や歯髄への毒性 [15~20] が従来からとりあげられてきたが、これら以外に、最近、溶出したモノマーによってある特定の口腔細菌の増殖が促進される可能性が指摘されている [21, 22]。すなわち、Hansel ら [21]は、エチレングリコール系モノマーが *Streptococcus sobrinus* や *Lactobacillus acidophilus* の増殖を促進することを報告し、レジン系修復材から溶出するモノマーによって歯質-修復物界面で細菌の増殖が促進され、歯髄への為害作用が惹起される可能性を示唆している。また河合 [22]は、コンポジットレジンから溶出したトリエチレングリコールジメタクリレートが *Streptococcus sobrinus* の増殖と不溶性グルカンの合成を促進することから、コンポジットレジン表面における易プラーク付着性にモノマーの溶出が関与すると報告している。

しかしながら、これらの報告はいずれも、細菌の増殖現象をごく限られた面からとらえた結果にもとづくものであるため、コンポジットレジンモノマーがいかなるメカニズムで細菌の増殖を促進するかは明らかにされておらず、本作用の詳細については不明な点が多い。そこで本研究では、二種の口腔レンサ球菌を対象として、コンポジットレジン用各種モノマー存在下での培養系で、吸光度、生菌数ならびに菌体 ATP 量を測定するとともに、形態的および化学的解析を併用することにより、菌増殖促進作用を有するとされているコンポジットレジンモノマーが口腔細菌の増殖に具体的にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

材料と方法

1．供試菌株

歯科保存学教室保管の *Streptococcus sobrinus* B13 および、*Streptococcus sanguis* ST3R の二菌株を用いた。これらの二菌株は、エチレングリコール系モノマー添加条件下で二十数種の菌株を培養した予備実験において、過去の報告と同様に吸光度の相対的上昇現象が観察されたものである。グリセリン 50%含有の Brain Heart Infusion（BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）液体培地中に -20℃で保存された各菌を、BHI 液体培地で 18 時間培養し、グラム染色にて形態的に菌の確認を行った後、さらに二代継代培養して、実験に供した。

2．使用コンポジットレジンモノマー

コンポジットレジンに使用されているモノマー五種類を用いた（表 1, 図 1)。各モノマーを 100% ジメチルスルホキシド（DMSO, 和光純薬工業, 東京）に溶解した後、BHI 液体培地に加えて、ほぼ最大溶解濃度のモノマー添加培地を得た（表 2)。なお、モノマー添加培地中の DMSO の最終濃度は 2.0% であり、コントロールにはモノマーを含まない 2.0% DMSO 含有 BHI 液体培地を用いた。

3．各種モノマー添加条件下での吸光度測定

各モノマーを添加した BHI 液体培地 100mL に、*S. sobrinus* B13 あるいは *S. sanguis* ST3R を 1 x 10^6 CFU/mL となるように接種し、37℃にて培養した。培養開始後、24 時間まで 2 時間ごとに菌液を 1mL 採取し、分光光度計（UV-1600, 島津製作所, 京都）を用いて λ=550nm における吸光度を測定した。さらに培養を 48 時間まで継続して行い、同じように吸光度を測定した。試料数はそれぞれ 3 とし、Mann-Whitney's U test（有意水準 5%）にて統計学的有意差の検定を行った。

4．エチレングリコール系モノマー添加条件下での生菌数および菌体 ATP 量の測定

前記 3 項の実験で吸光度の相対的上昇が認められた三種のエチレングリコール系モノマーについて、同様の培養系で生菌数と菌体 ATP 量の測定を行った。すなわち、TEGDMA、DEGDMA、EGDMA を 1.0mg/mL の濃度で添加した BHI 液体培地 100mL に、*S. sobrinus* B13 あるいは *S. sanguis* ST3R を 1 x 10^6 CFU/mL となるように接種し、37℃にて培養した。2 時間ごとに吸光度測定を行うと同時に、100μL の菌液を採取して 900μL の BHI 液体培地に加え、超音波発生装置（UR-20P, トミー精工, 東京）にて 5 秒間の分散処理を行った。その後、BHI 液

体培地を用いて 10 倍段階希釈し、100μL を BHI 寒天平板培地上に播種して 48 時間嫌気培養を行い、形成されたコロニー数（CFU）を計測した。

また、2 時間ごとに 100μL の菌液を採取し、蒸留水で 10 倍希釈した後、ATP 消去剤キット（AF-3X2, 東亜電波工業, 東京）を用いて以下の手順で菌体 ATP 量を測定した。まず ATP 消去試薬 100μL を注入して撹拌した後、10 分間放置して菌体外の遊離 ATP を除去した。その後、微生物用抽出試薬 100μL を加えて 20 秒間撹拌し、さらに発光試薬 100μL を注入して、10 秒間の発光量を ATP アナライザー（AF-100, 東亜電波工業, 東京）にて測定した。生菌数については、TEGDMA と DEGDMA では 24 時間まで、EGDMA では 48 時間まで測定し、ATP 量については 24 時間まで測定を行った。試料数はそれぞれ 3 とした。

さらに、TEGDMA を 1.0、0.5、0.1、0.01mg/mL の各濃度で 100mL の BHI 液体培地中に添加した条件において、*S. sobrinus* B13 あるいは *S. sanguis* ST3R を 1 x 10^6 CFU/mL となるように接種し、同様の方法で吸光度と生菌数を 24 時間まで経時的に測定した。試料数はそれぞれ 3 とした。

統計学的有意差の検定はすべて、有意水準 5%にて Mann-Whitney's U test にて行った。

5．走査型電子顕微鏡による形態学的分析

表2に示した濃度で各モノマーを添加したBHI液体培地500mLに、*S. sobrinus* B13あるいは*S. sanguis* ST3Rを1 x 10^6 CFU/mLとなるように接種し、37℃にて培養を行った。2時間ごとに10mLの菌液を採取して、3000rpm、10分間の遠沈処理を行い、沈殿物を0.1Mカコジル酸緩衝液（pH 7.4）にて3回洗浄した。その後、0.1M Half-Karnovsky溶液（2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタールアルデヒド含有、pH 7.4）に1時間浸漬して固定し、再度0.1Mカコジル酸緩衝液にて3回洗浄した。つづいて、50%、70%、80%、90%、96%エタノール中に10分間ずつ浸漬した後、100%エタノール中に30分間浸漬して脱水を行った。さらに、等量の100%エタノールとt-ブチルアルコールに10分間、t-ブチルアルコールに40分間浸漬後、凍結乾燥装置（JFD-310, 日本電子, 東京）による1時間の凍結乾燥を行い、コーティング装置（PLASMA MULTI COATER PMC-5000, 盟和商事, 大阪）を用いて白金蒸着を施して、走査型電子顕微鏡（SEM, JSM-5310LV, 日本電子, 東京）にて観察した。なお、モノマー非添加の培地に各菌を接種して培養したものをコントロールとし、形態を比較した。

6．赤外分光法および熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析法による分析

TEGDMAを1.0mg/mLの濃度で添加したBHI液体培地100mLに、*S. sobrinus* B13

あるいは *S. sanguis* ST3R を 1 x 10^6 CFU/mL となるように接種し、37℃にて 24 時間培養した。培養液を 3000rpm で 10 分間遠沈処理し、沈殿物を 0.1M カコジル酸緩衝液にて 3 回洗浄した後、菌体のみを染め出すために沈殿物を 0.025% サフラニン（Merck, Darmstadt, Germany）にて 10 分間染色し、再び 0.1M カコジル酸緩衝液にて 3 回洗浄した。つづいて、500rpm、5 分間の遠沈処理による二層分離をくり返してサフラニン非染色の菌体以外の粉末成分を回収し、24 時間室温にて乾燥した後、フーリエ変換赤外分光法（FT-IR）および熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析法（熱分解 GC-MS）にて成分の同定を行った。FT-IR では、試料 2mg を約 200mg の臭化カリウムと混和して乳鉢にてすりつぶした後、成型器でプレスしてディスク状サンプルを調製し、フーリエ変換赤外分光装置（FTIR-8200PC, 島津製作所, 京都）を用いてスペクトルを採取した。また、熱分解 GC-MS では、0.1mg の試料を用いて、表 3 に示す条件でパイログラムの採取と主ピークの質量分析を行った。なお、FT-IR、熱分解 GC-MS とも、TEGDMA ポリマー粉末を同様の条件で分析し、得られたスペクトルを比較した。TEGDMA の重合は、0.3%のベンジルジメチルケタール（和光純薬工業、東京）を光重合触媒として添加し、180 秒間光照射した後、120℃で加熱して行った。得られた硬化物をガラス製乳鉢で破砕して粉状にしたものを TEGDMA ポリマー粉末サンプルとした。

7．抗菌剤に対する感受性試験

TEGDMA 存在下で培養された *S. sobrinus* B13 および *S. sanguis* ST3R の抗菌剤に対する感受性の変化を調べるために、表 4 に示す四種の殺菌剤を用いて、microdilution assay[23] にて最小発育阻止濃度（MIC）と最小殺菌濃度（MBC）を測定し、TEGDMA 非添加で培養された菌の場合と比較した。

各殺菌剤を滅菌蒸留水に溶解して 1mg/mL の水溶液とした後、96 ウェルマイクロプレートを用いて BHI 液体培地で 2 倍段階希釈し、500～0.24 μg/mL の殺菌剤溶液 50 μL を調製した。各ウェルに、1.0mg/mL の TEGDMA 存在下で 18 時間培養後 BHI 液体培地を用いて 2×10^6 CFU/mL に調製した菌液 50 μL を加え、37℃で 24 時間培養を行った後、肉眼的に増殖を認めない殺菌剤の最小濃度を MIC と判定した。さらに、増殖が認められなかったウェルの菌液を BHI 寒天平板培地に 100 μL 播種し、48 時間嫌気培養後、コロニー形成を認めない殺菌剤の最小濃度を MBC とした。TEGDMA 非添加で 18 時間培養した菌についても同様の方法で MIC と MBC を測定し、TEGDMA 添加条件での結果と比較した。測定はいずれも 3 回行った。

結果

1．各種モノマー添加条件下での吸光度測定

図 2-a および b に、各種モノマーを添加した条件での *S. sobrinus* B13 菌液ならびに *S. sanguis* ST3R 菌液の経時的な吸光度変化を示す。

S. sobrinus B13 では、Bis-GMA あるいは UDMA を添加した場合は、培養開始直後から 48 時間まで、吸光度の値にコントロールとの間で有意差は認められなかった（$p>0.05$）。一方、TEGDMA あるいは DEGDMA を添加した条件では、培養開始後 10 時間まではコントロールとの間に有意差は認められなかったが、12 時間以降ではコントロールに比して有意な吸光度の増加が認められた（$p<0.05$）。また、EGDMA を添加した場合、吸光度は培養開始後 8 時間を経過してもほとんど上昇せず、その後 24 時間までコントロールの値を有意に下回ったものの、48 時間後にはコントロールよりも有意に高い値となった（$p<0.05$）。

S. sanguis ST3R においても、Bis-GMA あるいは UDMA を添加した条件では、培養開始直後から 48 時間まで吸光度の値にコントロールとの間で有意差は認められなかった（$p>0.05$）。TEGDMA を添加した場合は、培養開始後 14 時間以降において、コントロールと比較して吸光度の値が有意に増加した（$p<0.05$）。また、DEGDMA を添加した場合も、培養開始後 18 時間以降でコントロールより

も有意な吸光度の増加が認められた（$p<0.05$）。EGDMA を添加した場合は、培養開始後 10 時間を経過しても吸光度はわずかに上昇したのみで、その後 24 時間まではコントロールの値を有意に下回ったが、48 時間後にはコントロールよりも有意に高い値を示した（$p<0.05$）。

図3に、各レジンモノマーを添加した条件で48時間培養した後の*S. sobrinus* B13菌液の状態を示す。Bis-GMA や UDMA を添加した菌液はコントロールと同様の懸濁状態であり、沈殿物の量が同等であるが、エチレングリコール系モノマーを添加した菌液においてはコントロールよりも明らかに多量の沈殿物が認められた。

2．エチレングリコール系モノマー添加条件下での生菌数および菌体 ATP 量の測定

エチレングリコール系モノマーを 1.0mg/mL の濃度で添加した条件での、生菌数（CFU 数）の経時的変化を図 4-a および c に、菌体 ATP 量の経時的変化を図 4-b および d に示す。

S. sobrinus B13 の場合には、吸光度については前述の結果とまったく同様であったが、TEGDMA を添加した条件でも、CFU 数には培養開始直後から 24 時間までコントロールとの間で有意差は認められなかった（$p>0.05$、図 4-a）。DEGDMA を添加した場合の CFU 数も、培養中に一部コントロールを下回ることもあった

が、ほとんどの培養時間においてコントロールと有意差が認められなかった（図 4-a)。また EGDMA を添加した場合は、培養開始直後から 24 時間まではコントロールに比べ CFU 数は有意に低かったが（$p<0.05$)、48 時間後にはコントロールと有意差が認められなくなった（$p>0.05$)。

S. sobrinus B13 の菌体 ATP 量については、TEGDMA を添加した条件において、培養開始 12 時間後のみコントロールより低い値を示したものの、それ以外の培養時間では有意差は全く認められなかった（$p>0.05$、図 4-b)。また DEGDMA を添加した場合も、24 時間の培養期間を通じてコントロールを上回ることはなかった。EGDMA を添加した場合、培養開始直後から 24 時間までつねにコントロールを有意に下回った（$p<0.05$)。

S. sanguis ST3R についても吸光度は先の実験と全く同じ結果であったが、TEGDMA あるいは DEGDMA を添加した条件での CFU 数は、培養期間を通じてコントロールを下回るか、または有意差が認められなかった（図 4-c)。EGDMA を添加した場合の CFU 数は、培養開始後 4 時間から 24 時間まではコントロールに比べ有意に低かったが（$p<0.05$)、48 時間後にはコントロールと有意差を認めなくなった（$p>0.05$)。

S. sanguis ST3R の菌体 ATP 量についても、*S. sobrinus* B13 の場合と同様に、TEGDMA あるいは DEGDMA を添加した条件においては、コントロールと有意

差が無いか、またはコントロールよりも低い値となった（図 4-d)。また EGDMA を添加した場合は、培養開始後 4 時間から 24 時間までコントロールに比べ有意に低い値を示した（$p<0.05$)。

添加する TEGDMA の濃度を変化させて吸光度を測定した結果を図 5-a および c に、また培養開始 12、18、24 時間後の CFU 数を図 5-b および d に示す。0.5 あるいは 1.0mg/mL の濃度で TEGDMA を添加した条件では、*S. sobrinus* B13 では培養開始後 10 時間以降において、*S. sanguis* ST3R では 12 時間以降で、コントロールに比べ吸光度の値が有意に増加した（$p<0.05$)。これに対し、0.1mg/mL 以下の濃度では、両菌とも、培養開始直後から 24 時間まで、コントロールとの間に有意差は認められなかった（$p>0.05$)。一方、CFU 数に関しては、*S. sobrinus* B13 および *S. sanguis* ST3R とも、いずれの濃度の TEGDMA の添加においても、コントロールとの間に有意差は認められなかった（$p>0.05$)。

3．SEM による形態学的分析

図 6-a および c にモノマー非添加で 18 時間培養した後の *S. sobrinus* B13 と *S. sanguis* ST3R の SEM 像を、図 6-b および d に TEGDMA を 1.0mg/mL の濃度で添加した条件で 18 時間培養した後の *S. sobrinus* B13 と *S. sanguis* ST3R の SEM 像を示す。TEGDMA 存在下で培養した場合、*S. sobrinus* B13 では培養開始後 12 時

間以降で、*S. sanguis* ST3R では 14 時間以降において、疎な構造物が菌体を取り囲むように存在しているのが観察された。この構造物は吸光度の上昇に伴って量が増加し、菌体周囲から外側に拡大して、18 時間培養後には全体として層雲状を呈していた（図 6-b、d)。DEGDMA あるいは EGDMA を添加した条件でも、両菌において TEGDMA を添加した場合と同様の構造物が吸光度の相対的上昇に伴って観察された。これに対し、Bis-GMA あるいは UDMA を添加した条件では、いずれの培養時間においても、コントロールと同様の通常のレンサ球菌像が観察された。

4．赤外分光法および熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析法による分析

FT-IR ならびに熱分解 GC-MS にて菌体周囲構造物の組成を解析した結果を図 7-a、b および c に示す。

FT-IR による分析では、*S. sobrinus* B13 と *S. sanguis* ST3R の菌体周囲構造物より得られたスペクトルは類似しており、ともに 1740、1640、1460、1380、1350、1260、1140cm^{-1} の位置にピークが認められた。また、これらのピークの出現パターンは、TEGDMA ポリマー粉末より得られたパターンと完全に一致していた（図 7-a)。

熱分解 GC により得られた菌体周囲構造物のパイログラムでは、両菌ともに保

持時間が約 20 分の位置にピークが得られた。このパターンも TEGDMA ポリマー粉末のものと同一であり（図 7-b)、さらに 20 分のピークを質量分析して得られたマススペクトログラフ（図 7-c）も、両菌の菌体周囲構造物と TEGDMA ポリマー粉末とで一致していた。

5．抗菌剤に対する感受性試験

表 5 および 6 に、TEGDMA を添加した条件で培養した *S. sobrinus* B13 もしくは *S. sanguis* ST3R に対する各種殺菌剤の MIC と MBC をそれぞれ示す。いずれの試験においても、3 回の測定結果は完全に一致していた。トリクロサンとベンゼトニウムクロライドでは、TEGDMA を添加して培養した菌に対しては、MIC で 1 ステップ、MBC で 2 ステップの上昇が認められた。また、クロルヘキシジンジアセテートでは、*S. sobrinus* B13 に対して、MIC が 1 ステップ、MBC が 2 ステップ上昇し、*S. sanguis* ST3R に対しては、MIC および MBC とも 1 ステップ上昇した。ヘキサデシルピリジニウムクロライドについては、両菌に対して、MIC で 2 ステップ、MBC で 1 ステップの上昇が認められた。

考察

モノマー分子中の C=C の割合を指標とする FT-IR による測定では、コンポジットレジンの重合率は 50～70%であると報告されている [24~30]。したがって、硬化体中には 30～50%の未反応 C=C が残留していることになる。硬化したコンポジットレジンから溶出するのは、未重合モノマーの中でも一分子中の二個の C=C がともに未反応であったものに限定される [31] が、水溶媒への溶出量を測定した結果によると、全モノマーのうちの 10～30%程度が溶出すると報告されている [3, 32]。溶出試験において検出されるモノマーの種類としては、主要構成成分である Bis-GMA や UDMA ならびに TEGDMA についての報告が多く [1, 5, 9, 32~35]、とくにエチレングリコール系の低粘性モノマーである TEGDMA は、Bis-GMA や UDMA よりも明らかに高い濃度で溶出する [5, 9, 32~35]。これは、親水性のエチレングリコール基を有する TEGDMA の水への溶解度が、Bis-GMA や UDMA よりも大きいためである [36, 37]。

Hansel ら [21] は、こういったコンポジットレジンからの未重合モノマーの溶出が、歯質-コンポジットレジン界面やコンポジットレジン表面に存在する細菌に及ぼす影響を調べる目的で、モノマー添加条件での菌の増殖挙動について検討した。すなわち、モノマーを加えた培地で *S. sobrinus* や *L. acidophilus* を培養して

経時的な吸光度測定を行い、エチレングリコール系モノマーの存在下では定常期において吸光度が増大することを報告した。そして、各菌液の吸光度と菌数の相関関係をモノマー非添加条件で予備的に調べた結果から、エチレングリコール系モノマーが存在すると 15～30%の菌数増加が認められると結論づけている [21]。しかし、Hansel らが菌の増殖の指標として測定したのはあくまでも菌液の濁度のみであり、細菌の増殖が促進されたかどうかを直接的には調べていない。また河合 [22] も、TEGDMA の存在による吸光度の増加を *S. sobrinus* を用いた実験から明らかにしているが、やはりこの現象の詳細を厳密に解析するには至っていない。

そこで本研究では、モノマーの存在が特定の口腔細菌の増殖を促進するというこれらの報告の正当性を検証する目的で、*S. sobrinus* B13 と *S. sanguis* ST3R を用いて、経時的な吸光度測定だけでなく、生菌数と菌体 ATP 量の測定を同時に行って増殖促進の有無を判定した。その結果、吸光度については、コンポジットレジンに多用されるモノマーのうち Bis-GMA ならびに UDMA を培地に添加した場合は 48 時間の培養期間を通じてモノマー非添加の場合と差が認められなかったが、TEGDMA や DEGDMA を添加した場合は定常期における有意な増加が認められた。また、EGDMA を添加した場合は、培養開始後 24 時間まではモノマー非添加の場合を有意に下回ったものの、48 時間後においては吸光度は有意に増加した（図 2)。これらの結果は、Hansel ら [21] や河合 [22] が報告しているもの

とほぼ同じであり、菌液の濁度という点では、エチレングリコール系モノマーを添加することによって菌の増殖が促進されたように見受けられた。しかしながら、塗抹寒天平板法により生菌数（CFU 数）を測定したところ、TEGDMA あるいは DEGDMA を添加した場合でも、吸光度の相対的増加が認められた定常期においてもモノマー非添加の場合を上回ることは全くなかった（図 4-a、c)。また、生菌数の値と比例関係にあることが知られている菌体 ATP 量[38] についても、モノマー非添加と同じか、下回る結果となり、吸光度の増加とは一致しなかった（図 4-b、d)。これらの結果は、過去の研究における吸光度の結果にもとづく結論とは異なり、TEGDMA あるいは DEGDMA を添加して培養しても *S. sobrinus* B13 ならびに *S. sanguis* ST3R の菌数は増加していないことを示している。また、24 時間を超える培養時間においては菌数を正確に反映しないという理由から ATP 量の測定は行わなかったが、EGDMA についても、吸光度の相対的増加を示した 48 時間後の CFU 数はコントロールと有意差がなく、やはり菌の増殖促進は起こっていないと判断された。

河合[22] は、1.0～3.0mg/mL の TEGDMA の存在下で *S. sobrinus* を培養し、経時的な吸光度測定以外に、塗抹寒天平板法による 12 時間培養時の CFU 数の測定と、24 時間培養時の乾燥菌体重量および 24 時間の培養により菌体に取り込まれた［^{3}H］-チミジン量の測定を行っている。その結果、1.0 および 2.0mg/mL の

TEGDMA を添加した場合は、乾燥菌体重量および［^{3}H］-チミジン取り込み量とも非添加の場合よりも有意に高く、しかも両者が TEGDMA の濃度依存的に増加することを見出し、*S. sobrinus* の増殖が促進されたと述べている。その一方、吸光度の相対的上昇が認められた 12 時間の時点での CFU 数については、本研究での結果同様に、モノマー非添加の場合を上回らなかったと報告し、この点については、菌体が凝集したり菌の連鎖が延長して一コロニーあたりの菌数が増加したために、見かけ上の CFU 数が小さくなったのではないかと考察している。しかしながら、あらかじめ超音波処理を行って充分に菌を分散させた後に CFU 数測定を行った本研究においては、菌数に変化がないことが確認された（図 4-a、c）。また、今回測定した ATP 量は個々の菌体 ATP 量の総和であるため、連鎖が延長しているのであればその変動が生じるはずであるが、CFU 数同様に ATP 量にも増加は認められなかった（図 4-b、d）。さらに、河合 [22] が行った［^{3}H］-チミジンの取り込み量測定実験においては、3.0mg/mL の TEGDMA を添加した場合には逆に抑制される結果となっており、乾燥菌体重量の結果と明らかに矛盾していることから、［^{3}H］-チミジン取り込み量が菌数を正確に表しているとは考えにくい。これらのことから総合的に判断すると、エチレングリコール系モノマーを添加しても、菌数の増加は起こっていないと結論づけるのが最も理にかなっていると考えられる。

そこで、吸光度上昇の原因を解明するために、モノマー存在下で培養した菌の状態を、SEM 観察により形態学的に検討した。その結果、吸光度測定においてコントロールと差が認められなかった Bis-GMA あるいは UDMA を添加した場合は、培養期間を通じて常にモノマー非添加の場合と同様の通常のレンサ球菌像が観察されたのに対し、エチレングリコール系モノマーを添加した条件では、相対的な吸光度の上昇が始まる頃から菌体周囲に疎な構造物が形成されることが分かった（図 6-b、d)。しかも、この構造物は、吸光度の増加に伴ってその量が増加し、明らかに高い吸光度を示す時点では菌体周囲のみならず外側に広がった層雲状の像として観察され、もとの菌体の形態はほとんど確認できないほどになっていた。この観察結果から、エチレングリコール系モノマーを添加した場合における吸光度の相対的な増加現象は、通常の培養時には認められない構造物が菌体周囲に形成されることによるものであると考えられた。すなわち、粒子数（菌数）には変化はないが、構造物の存在により粒子径が大きくなって濁度の上昇が生じたわけで、図 3 に示した 48 時間培養後の写真はこの状態を明瞭に反映している。また、河合 [22] が報告した TEGDMA 添加培養時に認められた乾燥菌体重量の増加は、この構造物の存在によるものと考えられた。

つづいて、SEM により観察された構造物が何に起因するものかを明らかにするため、TEGDMA 存在下での培養で形成された菌体周囲構造物を菌体から分離

し、FT-IR と熱分解 GC-MS による分析を行ったところ、*S. sobrinus* B13 および *S. sanguis* ST3R いずれについても、この構造物の組成は TEGDMA ポリマー粉末と同一であるという結果が得られた（図 7）。菌体との分離のための処理の際に、サフラニン以外にアルシアンブルーやルテニウムレッドによる染色 [39~41] も行ってみたが、この構造物はいずれの試薬にも染色されず、糖成分ではないものと考えられる。さらに、アセトンやテトラヒドロフランなどの有機溶媒に浸漬しても全く影響を受けなかったことから判断すると、単にモノマーが凝集して付着したものではなく、重合体として菌周囲に存在しているものと考えられた。したがって、エチレングリコール系モノマー添加条件下での相対的吸光度上昇は、菌の増殖が促進されたことによるものではなく、培地に添加したモノマーが菌体周囲で重合してポリマーとなり、濁度を上昇させたことによるものであると推測される。

通常、レジンモノマー中の C=C はフリーラジカルによって開環して付加重合する [31, 42, 43] が、不対電子が存在すれば、フリーラジカルは水中も含めたさまざまな環境下で生成される [43]。そのため、今回使用したモノマーには重合禁止剤としてハイドロキノンが約 0.01%混入されていて、自然発生する少量のフリーラジカルを相殺することにより、長期間の保管中にも自家重合しないようになっている。したがって、培地に添加したモノマーが菌の培養中に重合したのは、ハイドロキノンの許容量を超える量のラジカルが生成されたか、あるいはハイドロキ

ノンが不活性化されたためと考えられる。予備的な実験として、*S. sobrinus* B13 や *S. sanguis* ST3R を PBS に懸濁して 48 時間放置し、コロニーを形成しない状態となったものを用いても、構造物の形成による吸光度の増加は認められなかった。また、菌を加えていない BHI 液体培地にエチレングリコール系モノマーを添加して、37℃で保管して 48 時間以上経過させた後も、重合体の形成は生じなかった。したがって、菌の増殖あるいはそれに伴う代謝がラジカルの生成かハイドロキノンの不活性化を引き起こすものと考えられるが、本研究からは添加モノマーの重合開始因子までは解明できず、この点は今後の重要な検討課題である。

ところで、分子量や化学構造は異なるものの、Bis-GMA や UDMA も二つのメタクリレートを分子の両端に持ち（図 1)、重合メカニズムにはエチレングリコール系モノマーと違いがない [31]。にもかかわらず、吸光度の相対的な増加は、すべての報告において、TEGDMA をはじめとするエチレングリコール系モノマーでのみ生じるとされている。本研究でも、確かにエチレングリコール系モノマーを添加した条件においてのみこの現象が観察されたが、TEGDMA を対象として、1.0～0.01mg/mL の間で添加濃度を変化させると、0.1mg/mL 以下の濃度の場合には吸光度の増加は起こらなかった（図 5-a、c)。一方、Bis-GMA や UDMA は水への溶解性が低く [36, 37]、元来 0.1mg/mL を超える濃度で培地に溶解させることは不可能である。本研究と同様、Hansel[21] らや河合 [22] の実験において使用さ

れた Bis-GMA や UDMA の濃度も、0.1mg/mL 以下である。これらのことから考えると、本現象がエチレングリコール系モノマーに特異的であるというよりはむしろ、Bis-GMA や UDMA の溶解度が低いために重合を生じるのに必要なだけの量が培地中に存在せず、菌体周囲にポリマーが形成されないと考えるのが妥当であろう。

吸光度の相対的上昇が過去に報告されているのは、*S. sobrinus* と *L. acidophilus* の二菌種のみ [21, 22] であり、本研究に先立って、予備的に二十数種の菌に関してエチレングリコール系モノマー添加条件下で経時的吸光度測定を行った場合も、吸光度の増加は *S. sobrinus* と *S. sanguis* のみという非常に限られた菌でしか生じなかった（未発表データ）。したがって、この現象の発現には強い菌種特異性があるものと思われる。しかし、例えば *S. sobrinus* と類縁の *Streptococcus mutans* ではこの現象は観察されないため、菌体周囲におけるモノマーの重合がなぜ特定の菌においてのみ観察されるのかについては、現時点では不明である。菌種ごとの非常に細かいレベルでの代謝の違いなどを考慮に入れた検討が必要であろう。

さて、ミュータンスレンサ球菌のグループに属する *S. sobrinus* は、う蝕原性菌の一つとして知られ、歯肉縁上プラークや小窩裂溝、平滑面および根面齲蝕から分離される [44, 45]。また、*S. sanguis* は、現在では口腔感染症との直接的な関連性はあまりないと考えられているものの、歯肉縁上プラーク中に多数存在し、う蝕

病巣からの検出頻度も高い[44, 45]。こういった菌の周囲においてレジンのポリマーが形成されることの影響の一つとして、各種抗菌剤に対する感受性の変化に着目し、TEGDMA 添加条件で培養した菌に対する MIC と MBC の測定を行った。その結果、菌体周囲に TEGDMA ポリマーを有する *S. sobrinus* B13 ならびに *S. sanguis* ST3R に対しては、トリクロサン、クロルヘキシジンジアセテート、ベンゼトニウムクロライド、ヘキサデシルピリジニウムクロライドの四種の殺菌剤すべてにおいて、通常の菌と比べて MIC と MBC の上昇が認められた。これらの殺菌剤は、菌の細胞壁を透過して細胞膜に障害を与え、細胞質成分の不可逆的漏出を引き起こしたり、酵素蛋白を凝固変性することにより殺菌効果を発揮するような薬剤である[46~50]。MIC、MBC の上昇に見られる感受性の低下は、周囲における TEGDMA ポリマーの存在が菌体に対する防護作用を発揮し、抗菌剤の浸透を妨害した結果と考えられた。疎水度の高いトリクロサンや、逆に親水度の高いクロルヘキシジンや第四アンモニウム化合物のいずれでも、MIC と MBC の上昇が認められたことからすると、菌体周囲に形成されたレジンポリマーは多くの抗菌剤に対してバリアーとして働くことが推測される。

コンポジットレジンからの TEGDMA の溶出濃度については、様々な報告がある[6, 8, 9, 32~35]。たとえば Pelka ら[33]は、直径 11mm、厚さ 1.5mm の市販コンポジットレジン硬化ディスクを 2mL の培地に 24 時間浸漬すると、1085.2nmol/mL

(0.31mg/mL)の TEGDMA が溶出したと報告している。この結果をはじめとする過去の報告の多く[8, 9, 32~35]では、試料の容積よりも多量の溶出媒が使用されているが、歯質-修復物界面などの微小環境においては、モノマー濃度がより高くなる可能性がある。実際、直径 9.0mm、厚さ 0.5mm の皿状硬化体の底面を 350μL の滅菌蒸留水に接触させた今里ら[6]の実験では、24 時間で 0.43mg/mL の TEGDMA が溶出したことが報告されている。また、窩洞深部に相当する重合率の低い部分からはより多くのモノマーが溶出する[32]という報告も存在する。 培地への添加濃度を変化させて吸光度測定を行った結果（図 5-a、c）から明らかとなったように、菌体周囲での重合体形成に必要な TEGDMA の濃度が 0.1～0.5mg/mL の間にあるとすれば、本現象は、臨床においても起こりうるものと思われる。したがって、比較的多量のモノマーの溶出と菌の増殖が生じるだけの栄養条件が充たされる環境においては、菌体周囲にレジンのポリマーが形成されて抗菌剤に対する感受性が低下している可能性があり、通常より高濃度の抗菌剤が作用発現には必要となると考えられる。

本研究の結果から、コンポジットレジンからの溶出モノマーが菌の増殖を促進するという過去の報告が否定され、実際には菌体周囲にエチレングリコール系モノマーの重合体が形成されているということが明らかになった。また、この現象がもたらす影響として、本研究では、外来因子に対するバリアーとしての働きが

見出されたが、それ以外にも、異なる菌との共凝集を起こしやすくしたり、プラークが形成、成熟していく過程において菌や菌体外基質が付着する足場となることなども考えられる。また、コンポジットレジンモノマーがグルコシルトランスフェラーゼを活性化する可能性も示唆されており[22, 51]、溶出モノマーが口腔細菌に及ぼす影響をより広い視点から検討することが、今後必要であると考えられる。

結論

エチレングリコール系モノマー存在下で *S. sobrinus* B13 もしくは *S. sanguis* ST3R を培養すると、過去の報告と同様に、定常期における吸光度の相対的上昇が認められた。しかし、生菌数と菌体 ATP 量の測定、SEM による形態学的観察、ならびに FT-IR と熱分解 GC-MS による化学的分析を併用して検討した結果、この現象は細菌の増殖促進により生じるものではなく、モノマーの重合体が菌体周囲に形成されることによるものであるということが明らかとなった。

また、菌体周囲にモノマー重合体が形成されることにより抗菌剤に対する感受性が低下することから、このモノマー重合体の存在が細菌にとっては外来因子に対するバリアーとして機能する可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）恵比須繁之教授に謹んで感謝の意を表します。また本研究の遂行に際し、終始変わらぬ御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）今里　聡助教授に深く感謝いたします。

最後に本研究に対して御理解、ご協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）の諸先生に心から感謝いたします。

文献

1) 藤沢盛一郎, 増原英一 (1979)：高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による歯科用レジン充填材料の溶出物の分析. 歯理工誌, 20, 121-131, 昭和 54.

2) Inoue, K. and Hayashi, I. (1980)：Residual monomer (Bis-GMA) of composite resins. *J. Oral Rehabil.,* 9, 493-497.

3) 平林　茂, 平澤　忠, 奈須郁代, 中西　敏 (1984)：可視光線重合型コンポジットレジンの組成およびそれら硬化体からの残留モノマーの溶出について. 歯材器, 3, 655-664, 昭和 59.

4) 菊池　寛, 辻　楠雄, 新谷英晴, 中村晃忠 (1987)：コンポジットレジン中のメタクリレートモノマーに関する研究（第一報）. 硬化レジンからのモノマーの各種溶媒への溶出について. 歯材器, 6, 621-626, 昭和 62.

5) Ferracane, J.L. and Condon, J.R. (1990)：Rate of elution of leachable components from composite. *Dent. Mater.,* 6, 282-287.

6) 今里　聡, 横田若生, 樽味　寿, 鳥居光男, 土谷裕彦 (1991)：コンポジットレジン修復物からのモノマー溶出性 －特にボンディング層の透過性について－. 歯材器, 10, 601-605, 平成 3.

7) Ferracane, J.L. (1994)：Elution of leachable components from composites. *J. Oral*

Rehabil., 21, 441-452.

8) 樽味　寿, 今里　聡, 横田若生, 平栗英樹, 小林恭子, 小田晃三, 鳥居光男, 土谷裕彦 (1994) : Bis-GMA 系コンポジットレジンにおける TEGDMA 配合量がモノマー溶出濃度と細胞毒性に及ぼす影響. 日歯保存誌, 37, 1435-1442, 平成 6.

9) Spahl, W., Budzikiewicz, H. and Geurtsen, W. (1998) : Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Dent.,* 26, 137-145.

10) Bagis, Y.H. and Rueggeberg, F.A. (2000) : The effect of post-cure heating on residual, unreacted monomer in a commercial resin composite. *Dent. Mater.,* 16, 244-247.

11) Wu, W. and McKinney, J.E. (1982) : Influence of chemicals on wear of dental composites. *J. Dent. Res.,* 61, 1180-1183.

12) Asmussen, E. (1983) : Softening of BISGMA-based polymers by ethanol and by organic acids of plaque. *Scand. J. Dent. Res.,* 92, 257-261.

13) McKinney, J.E. and Wu, W. (1985) : Chemical softening and wear of dental composites. *J. Dent. Res.,* 64, 1326-1331.

14) Lee, S.Y., Huang, H.M., Lin, C.Y. and Shih, Y.H. (1998) : Leached components from dental composites in oral simulating fluids and the resultant composite strengths. *J. Oral Rehabil.,* 25, 575-588.

15) Langeland, L.K., Guttuso, J., Jeromo, D.R. and Langeland, K. (1966) : Histologic and clinical comparison of Addent with silicate cements and cold-curing materials. *J. Am. Dent. Assoc.,* 72, 373-385.

16) Stanley, H.R., Swerdlow, H. and Buonocore, M.G. (1967) : Pulp reactions to anterior restorative materials. *J. Am. Dent. Assoc.,* 75, 132-141.

17) Rao, S.R. (1971) : Pulp response in the rhesus monkey to "composite" dental restorative materials in unlined cavities. *Oral Surg.,* 31, 676-688.

18) Stanley, H.R., Going, R.E. and Chauncey, H.H. (1975) : Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite resin restoration. *J. Am. Dent. Assoc.,* 91, 817-825.

19) Ericksen, H.M. and Leidal, T.I. (1979) : Monkey pulpal response to composite resin restorations in cavities treated with various cleansing agents. *Scand. J. Dent. Res.,* 87, 309-317.

20) Leidal, T.I. and Ericksen, H.M. (1984) : Human pulpal response to composite resin restorations. *Endod. Dent. Traumatol.,* 1, 66-68.

21) Hansel, C., Leyhausen, G., Mai U.E.H. and Geurtsen, W. (1998) : Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms *in vitro. J. Dent. Res.,* 77, 60-67.

22) 河合啓次 (1988)：複合レジン構成成分が *Streptococcus mutans* の不溶性グルカン合成および増殖に及ぼす影響. 日歯保存誌, 31, 332-351, 昭和 63.

23) Little, W.A., Thomson, L.A. and Bowen, W.H. (1979) : Antibiotic susceptibility of *Streptococcus mutans*: Comparison of serotype profiles. *Antimicrob. Chemother.,* 15, 440-443.

24) Chung, K. and Greener, E.H. (1988) : Degree of conversion of seven visible light-cured posterior composites. *J. Oral Rehabil.,* 15, 555-560.

25) Rueggeberg, F.A., Hashinger, D.T. and Fairhurst, C.W. (1990) : Calibration of FTIR conversion analysis of contemporary dental resin composites. *Dent. Mater.*, 6, 241-249.

26) Imazato, S., Tarumi, H., Kobayashi, K., Hiraguri, H., Oda, K. and Tsuchitani, Y. (1995) : Relationship between the degree of conversion and internal discoloration of light-activated composite. *Dent. Mater. J.,* 14, 23-30.

27) Park, S.H. and Lee, C.S. (1996) : The difference in degree of conversion between light-cured and additional heat-cured composites. *Oper. Dent.,* 21, 213-217.

28) Tarumi, H., Imazato, S., Ehara, A., Kato, S., Ebi, N. and Ebisu, S. (1999) : Post-irradiation polymerization of composites containing bis-GMA and TEGDMA. *Dent. Mater.,* 15, 238-242.

29) Peutzfeldt , A. and Asmussen, E. (2000) : The effect of postcuring on quantity of remaining double bonds, mechanical properties, and *in vitro* wear of two resin composite.

J. Dent., 28, 447-452.

30) Imazato, S., McCabe, J.F., Tarumi, H., Ehara, A. and Ebisu, S. (2001) : Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. *Dent. Mater.,* 17, 178-183.

31) 門磨義則 (1985)：接着剤の化学；やさしい接着剤のはなし（門磨義則編）. 1版, 書林, 東京, 27-54, 昭和 60.

32) 川口　稔, 福島忠男, 宮崎光治, 井上勇介 (1998)：Bis-GMA 系光重合型コンポジットレジンからの残留モノマーの溶出について. 歯材器, 17, 279-283, 平成10.

33) Pelka, M., Distler, A. and Peutschelt, A. (1999) : Elution parameters and HPLC-detection of single components from resin composite. *Clin. Oral Invest.,* 3, 194-200.

34) 横田若生, 今里　聡, 鳥居光男, 土谷裕彦 (1991)：光重合型コンポジットレジンからのベースモノマーの溶出濃度と細胞毒性に関する研究 －特に照射時間の影響について－. 日歯保存誌, 34, 459-467, 平成 3.

35) Tanaka, K., Taira, M., Shintani, H., Wakasa, K. and Yamaki, M. (1991) : Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *J. Oral Rehabil.,* 18, 353-362.

36) Bowen, R.L. (1981) : Adhesive bonding of various materials to hard tooth tissues: XXIII. Isotonic monomer formulations. *J. Dent. Res.,* 60, 901-907.

37) Kawai, K., Torii, M. and Tsuchitani, Y. (1988) : Measurement of water solubility of resin components by means of high performance liquid chromatography. *J. Osaka Univ. Dent. Sch.*, 28, 153-160.

38) 羽毛田 靖 (1997) : ATP 法による細菌数測定装置の基礎と応用. 防菌防黴, 25, 457-466, 平成 9.

39) Shea, S.M. (1971) : Lanthanum staining of the surface coat of cells. Its enhancement by the use of fixatives containing Alcian blue or cetyl pyridinium chloride. *J. Cell Biol.*, 51, 611-620.

40) Brooker, B.E. and Fuller, R. (1975) : Adhesion of lactobacilli to the chicken crop epitherium. *J. Ultrastruct. Res.*, 52, 21-31.

41) Shepard, N. and Mitchell, N. (1976) : The localization of proteoglycan by light and electron microscopy using Safranin O. A study of epiphyseal cartilage. *J. Ultrastruct. Res.*, 54, 451-460.

42) McCabe, J.F. (1990) : Synthetic polymers ; Applied Dental Materials. (McCabe, J.F., editor). ed. 7, Blackwell Scientific Publications, London, 78-86.

43) 井本　稔 (1976) : 有機反応序説　フリーラジカル（井本　稔編）. 1 版, 化学同人, 京都, 1-12, 昭和 51.

44) 奥田克爾 (1993) : デンタルプラーク細菌の世界. その病原性とミクロの戦い

（奥田克爾編）. 1 版, 医歯薬出版, 東京, 73-99, 平成 5.

45) 浜田茂幸, 川端重忠 (2000) : 口腔内の主な微生物 ; 口腔微生物学・免疫学（浜田茂幸編）. 1 版, 医歯薬出版, 東京, 214-216, 平成 12.

46) Regos, J. and Hitz, H.R. (1974) : Investigation on the mode of action of triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.,* 226, 390-401.

47) Gardner, J.F., Phil, D., Gray, K.G., Pharm, B. and Com, B. (1983) : Chlorhexidine ; Disinfection, Sterilization and Preservation (Block, S.S., editor). ed 3, Lea & Febiger, Philadelphia, 251-270.

48) Scheie, A.A. (1989) : Modes of action of currently known chemical anti-plaque agents other than chlorhexidine. *J. Dent. Res.,* 68, 1609-1616.

49) 池沢宏郎 (1993) : 滅菌と消毒 ; 考える薬学微生物学（池沢宏郎編）. 2 版, 廣川書店, 東京, 53-57, 平成 5.

50) 加藤隆一 (2000) : 化学療法 ; NEW 薬理学（田中千賀子, 加藤隆一編）. 3 版, 南江堂, 東京, 522-556, 平成 12.

51) Kawai, K. and Tsuchitani, Y. (2000) : Effects of resin composite components on glucosyltransferase of cariogenic bacterium. *J. Biomed. Mater. Res.,* 51, 123-127.

表 1　本研究で使用したコンポジットレジン用モノマー

モノマー	略称	製造者	Batch No.
2, 2-Bis[4-(3-methacryloxy-2-Hydroxypropoxy)-phenyl]-propane	Bis-GMA	三菱レイヨン	G70704
Urethane dimethacrylate	UDMA	三菱レイヨン	0090847
Triethylene glycol dimethacrylate	TEGDMA	和光純薬工業	CKM5273
Diethylene glycol dimethacrylate	DEGDMA	東京化成工業	GHO1
Ethylene glycol dimethacrylate	EGDMA	和光純薬工業	SEJ4068

表 2　BHI 液体培地中の各モノマーの濃度

	濃度（mg/mL）
Bis-GMA	0.05
UDMA	0.01
TEGDMA	1.0
DEGDMA	1.0
EGDMA	1.0

表3　熱分解 GC-MS 測定装置ならびに測定条件

	測定装置	測定条件
熱分解装置	Curie Point Pyrolyser JHP-2 （日本分析工業，東京）	590℃、5秒間
GC 装置	MS-GCG06 （日本電子，東京） カラム：DB-1 30m x 0.25m x 1.0μm	キャリアー流量： He 40mL/min カラム温度： 100～300℃、8℃/min
MS 装置	JMS-HX100/JMA-DA5000 （日本電子，東京）	イオン化方式：EI/MS マスレンジ：m/z 10～600

表４　MIC、MBC 測定に用いた殺菌剤

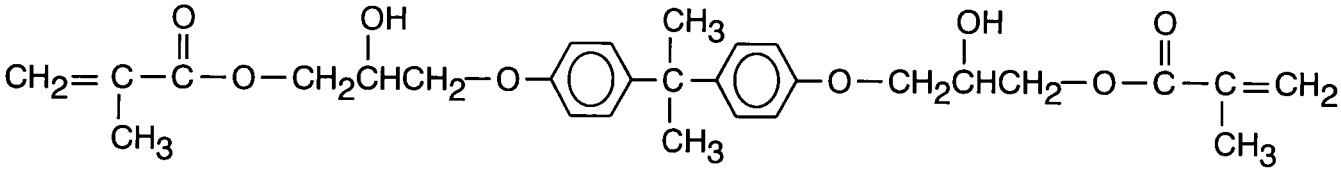
抗菌剤	製造者
トリクロサン	ノバルティス ファーマ，東京
クロルヘキシジンジアセテート	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
ベンゼトニウムクロライド	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
ヘキサデシルピリジニウムクロライド	ナカライテスク，京都

表 5　*S. sobrinus* B13 に対する各種殺菌剤の MIC、MBC（μg/mL）

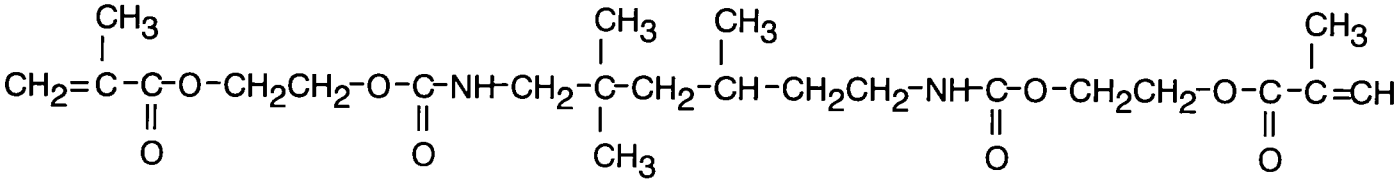
	MIC		MBC	
	モノマー	TEGDMA	モノマー	TEGDMA
	非添加	添加	非添加	添加
トリクロサン	3.9	7.8	7.8	31.3
クロルヘキシジンジアセテート	0.12	0.24	0.24	0.96
ベンゼトニウムクロライド	1.95	3.9	15.6	62.5
ヘキサデシルピリジニウムクロライド	0.49	1.95	1.95	3.9

表 6　*S. sanguis* ST3R に対する各種殺菌剤の MIC、MBC（μg/mL）

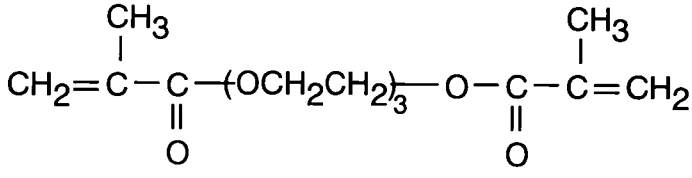
	MIC		MBC	
	モノマー	TEGDMA	モノマー	TEGDMA
	非添加	添加	非添加	添加
トリクロサン	3.9	7.8	7.8	31.3
クロルヘキシジンジアセテート	0.12	0.24	0.48	1.95
ベンゼトニウムクロライド	1.95	3.9	15.6	31.3
ヘキサデシルピリジニウムクロライド	0.49	1.95	1.95	3.9



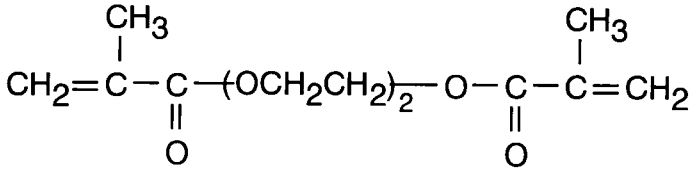
Bis-GMA



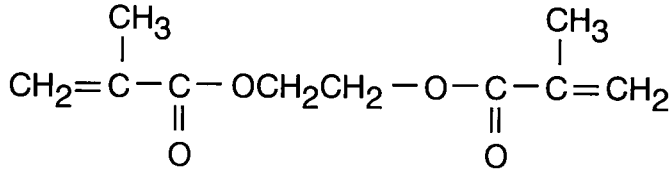
UDMA



TEGDMA



DEGDMA



EGDMA

図1　本研究で使用したコンポジットレジン用モノマーの構造式

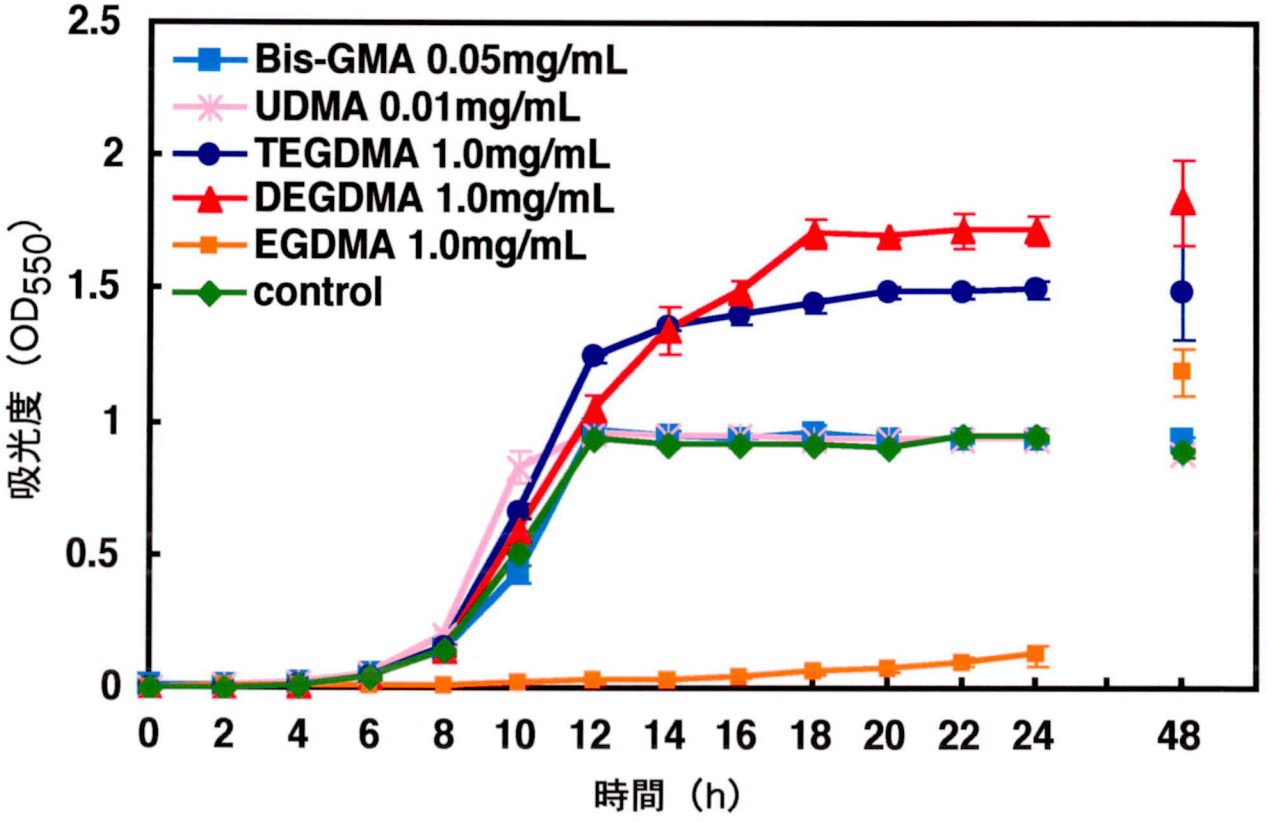


図2-a　各種モノマー添加条件における*S. sobrinus* B13の経時的吸光度変化
モノマーのみを培地に添加し、菌を接種しない条件では、吸光度は48時間まで常に0であった。

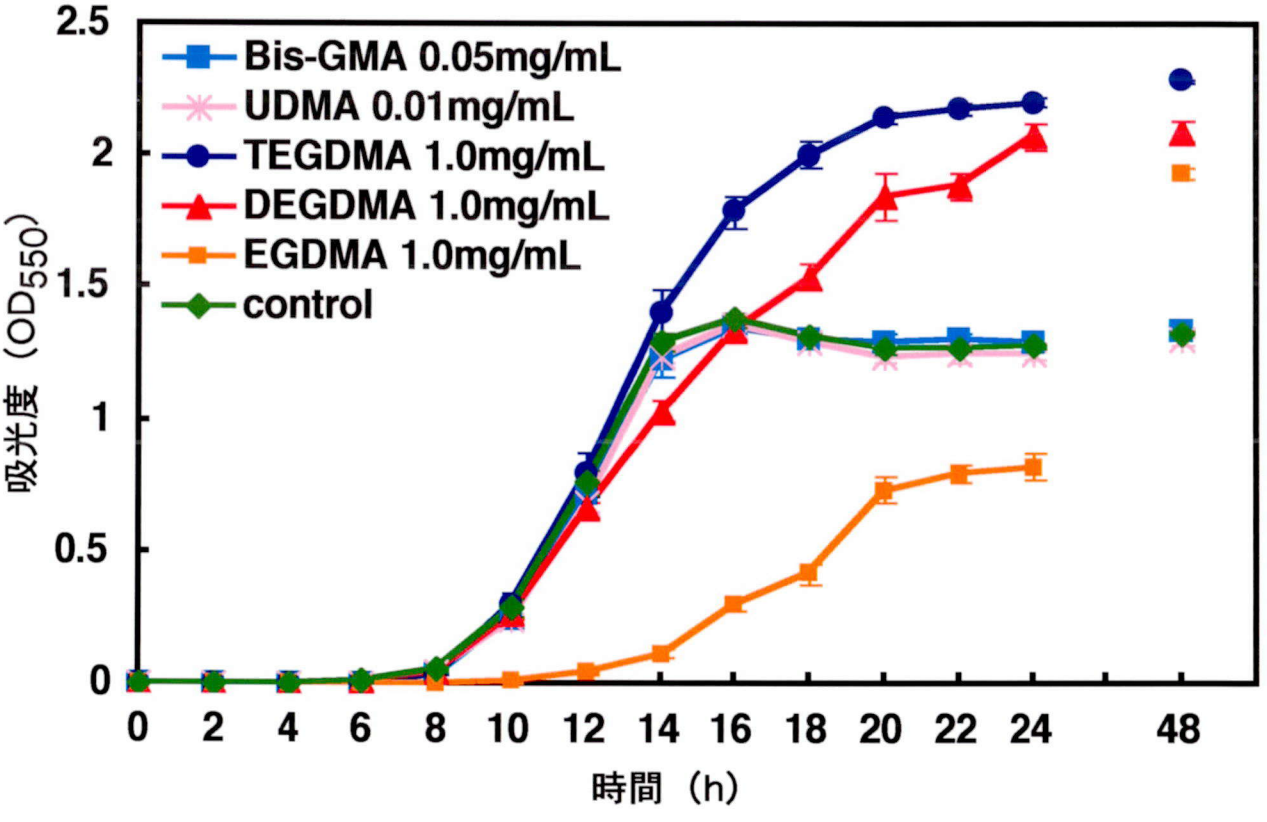


図2-b　各種モノマー添加条件における*S. sanguis* ST3Rの経時的吸光度変化
モノマーのみを培地に添加し、菌を接種しない条件では、吸光度は48時間まで常に0であった。

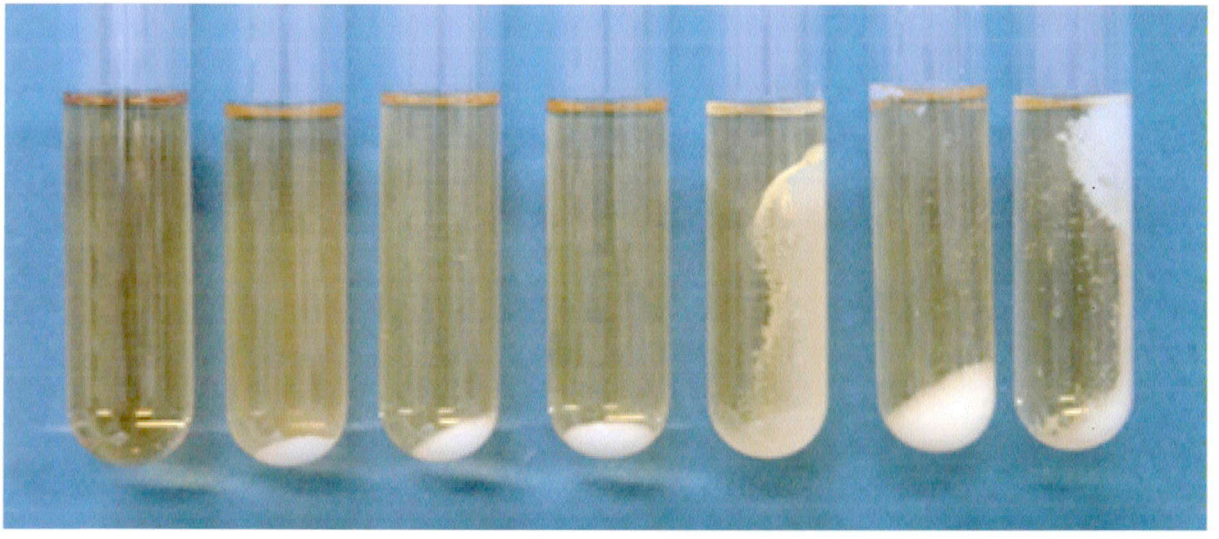


図3　各種モノマーを添加して48時間培養した後の*S. sobrinus* B13菌液
左から順に、BHI液体培地、コントロール、Bis-GMA、UDMA、EGDMA、DEGDMA、TEGDMA
添加条件での結果を示す。

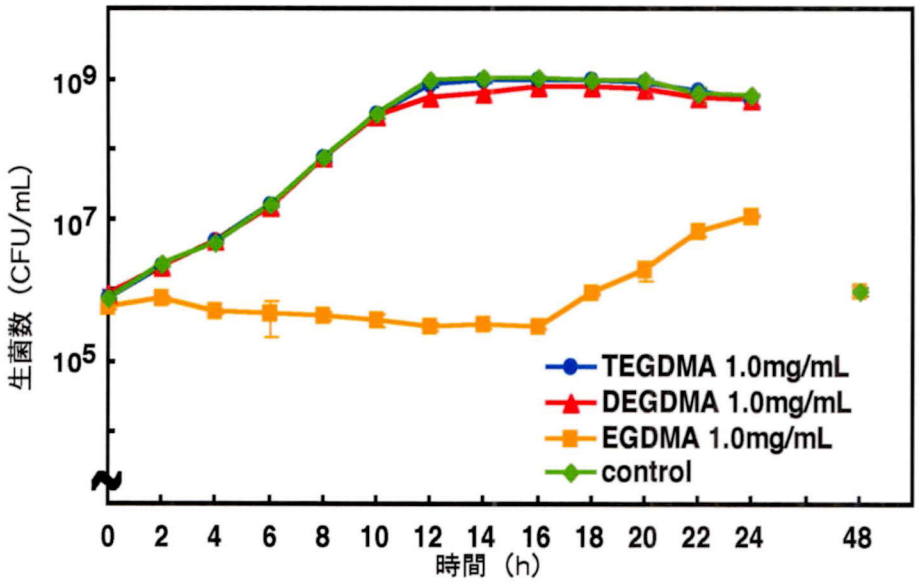


図4-a エチレングリコール系モノマー添加条件における
S. sobrinus B13の経時的CFU数変化

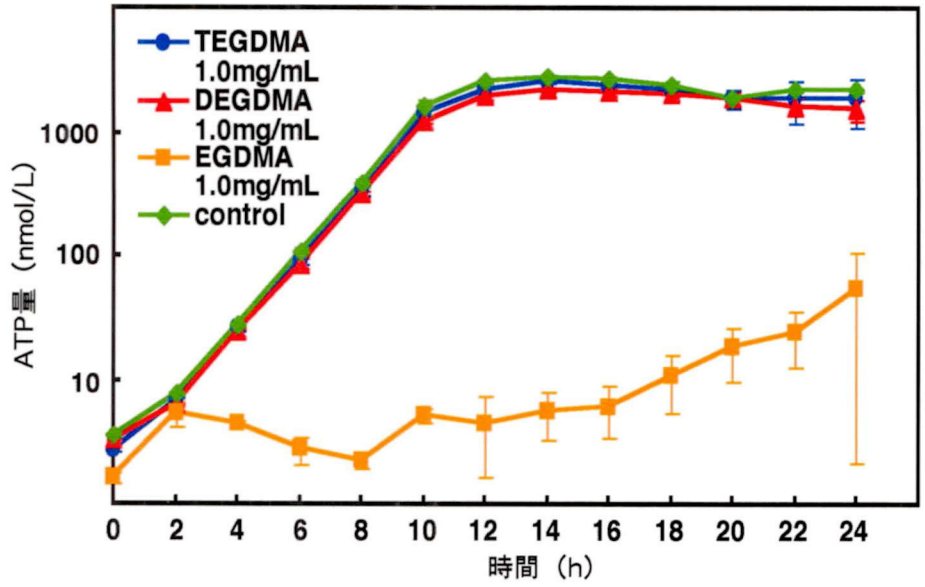


図4-b エチレングリコール系モノマー添加条件における
S. sobrinus B13の経時的ATP量変化

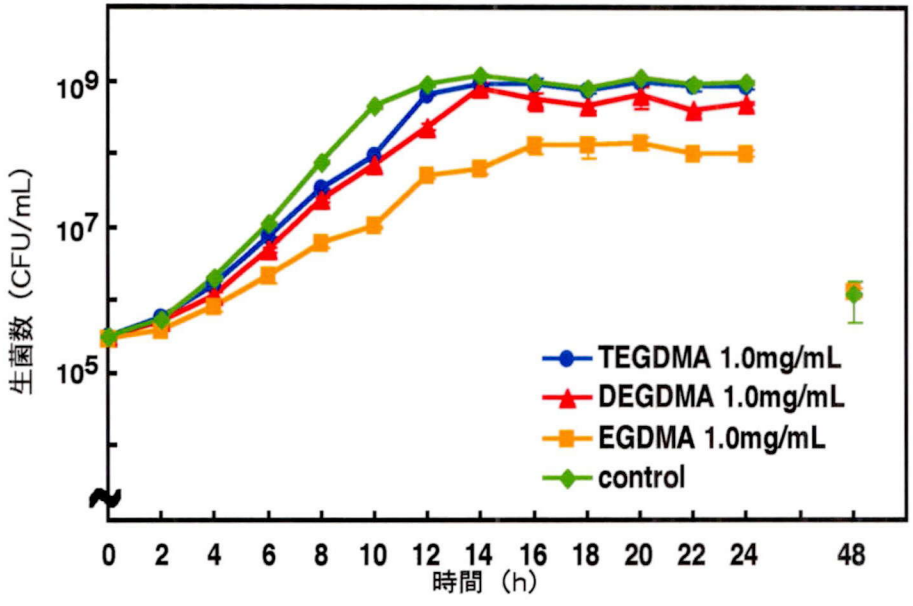


図4-c エチレングリコール系モノマー添加条件における
S. sanguis ST3Rの経時的CFU数変化

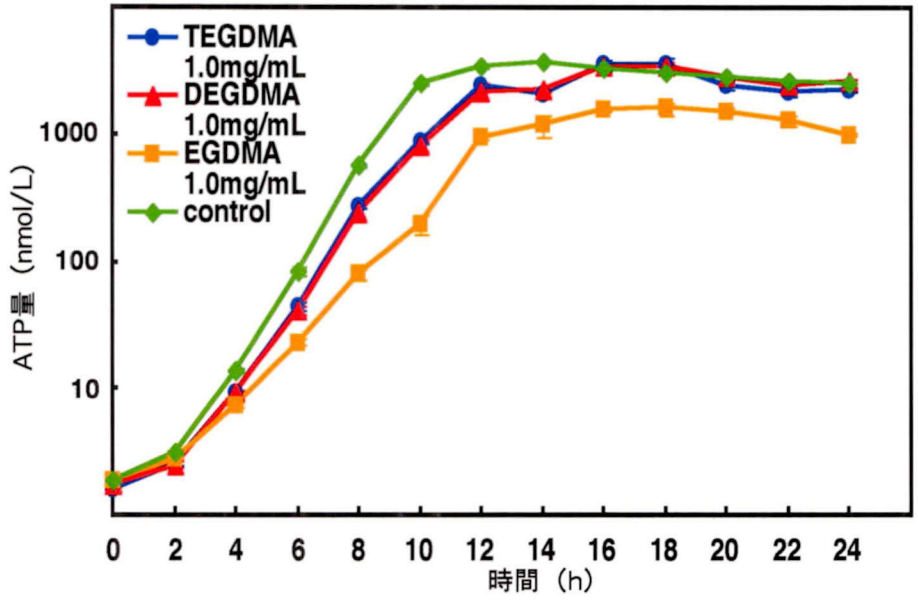


図4-d エチレングリコール系モノマー添加条件における
S. sanguis ST3Rの経時的ATP量変化

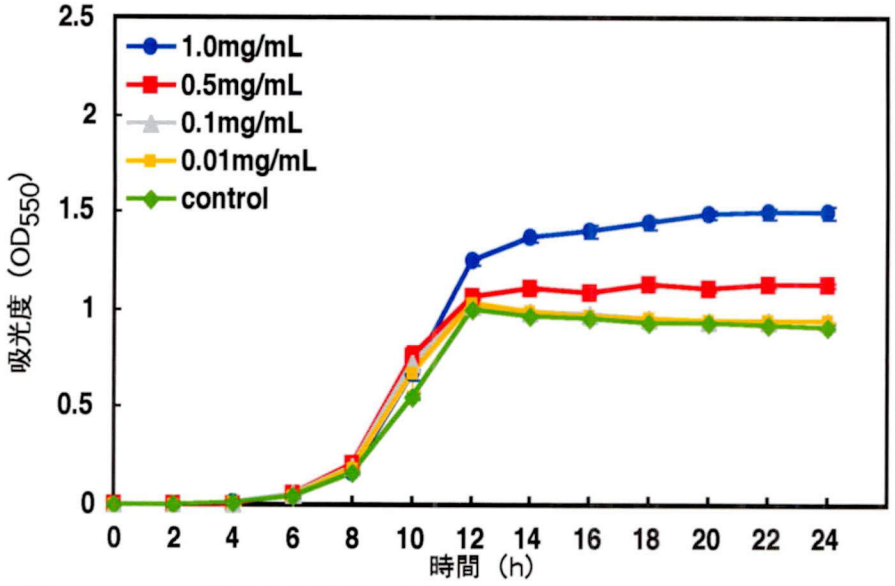


図5-a TEGDMA濃度を段階的に変化させた場合の
S. sobrinus B13の経時的吸光度変化

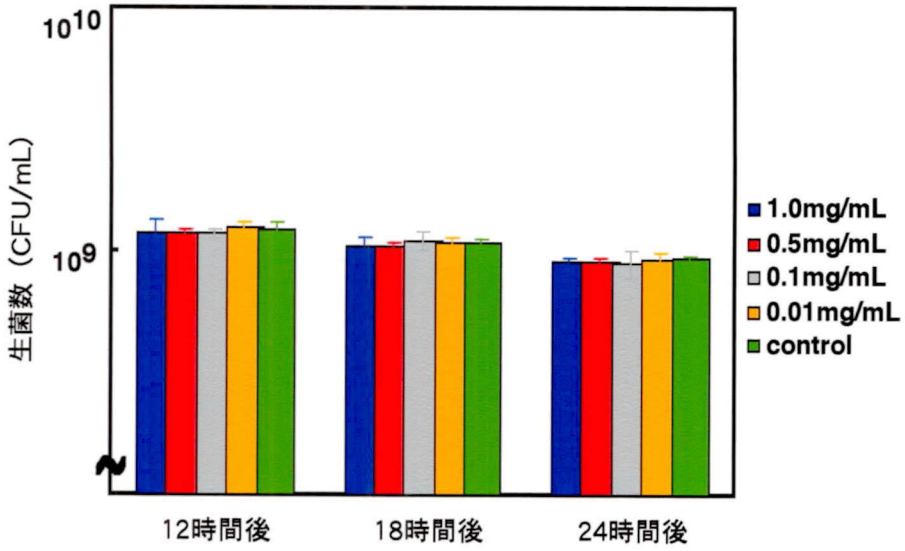


図5-b TEGDMA濃度を変化させた場合の
12、18、24時間培養後の*S. sobrinus* B13のCFU数

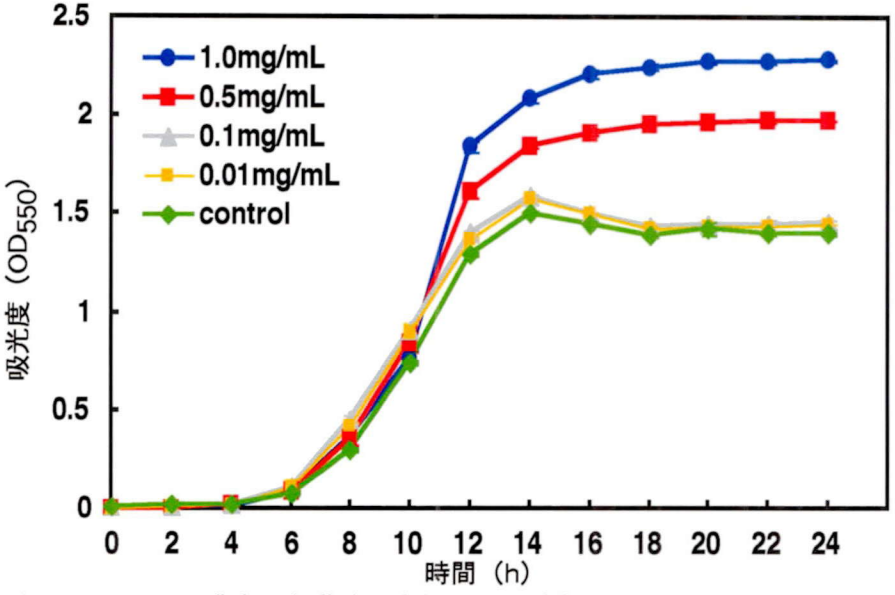


図5-c TEGDMA濃度を段階的に変化させた場合の
S. sanguis ST3Rの経時的吸光度変化

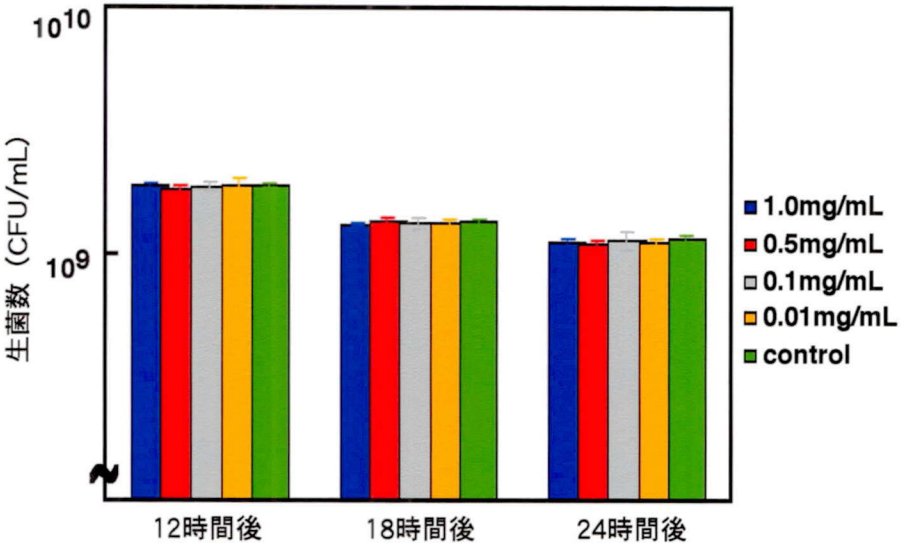


図5-d TEGDMA濃度を変化させた場合の
12、18、24時間培養後の*S. sanguis* ST3RのCFU数

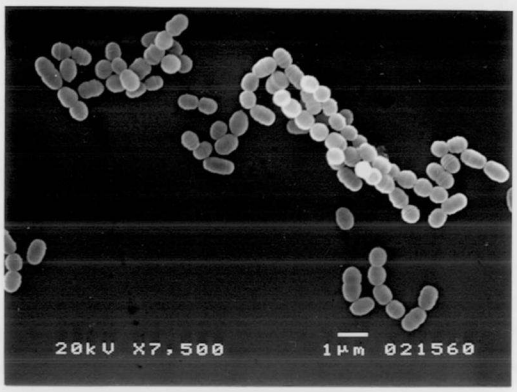


図6-a　モノマー非添加で18時間培養後の*S. sobrinus* B13のSEM像（x7500）

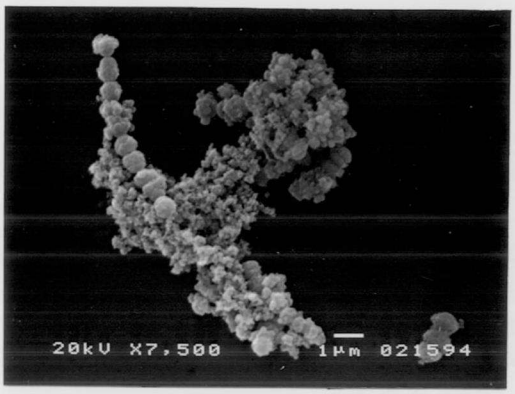


図6-b　TEGDMA 1.0mg/mL 添加で18時間培養後の*S. sobrinus* B13のSEM像（x7500）

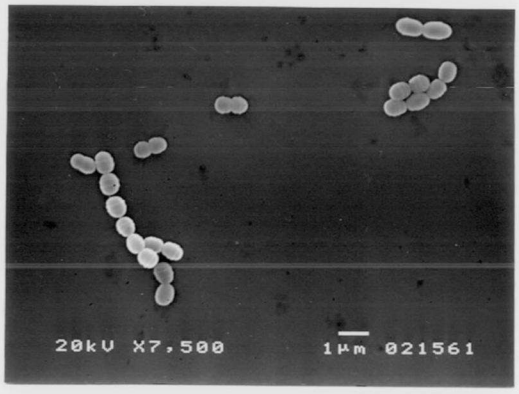


図6-c　モノマー非添加で18時間培養後の*S. sanguis* ST3RのSEM像（x7500）

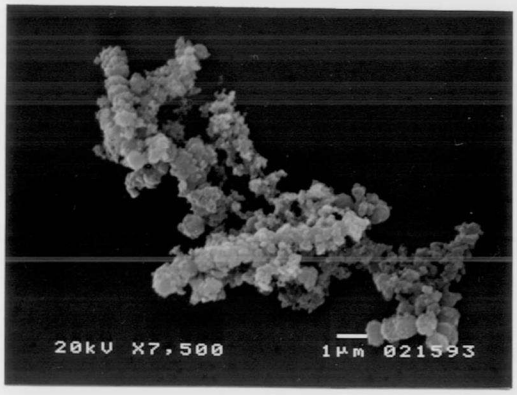


図6-d　TEGDMA 1.0mg/mL 添加で18時間培養後の*S. sanguis* ST3RのSEM像（x7500）

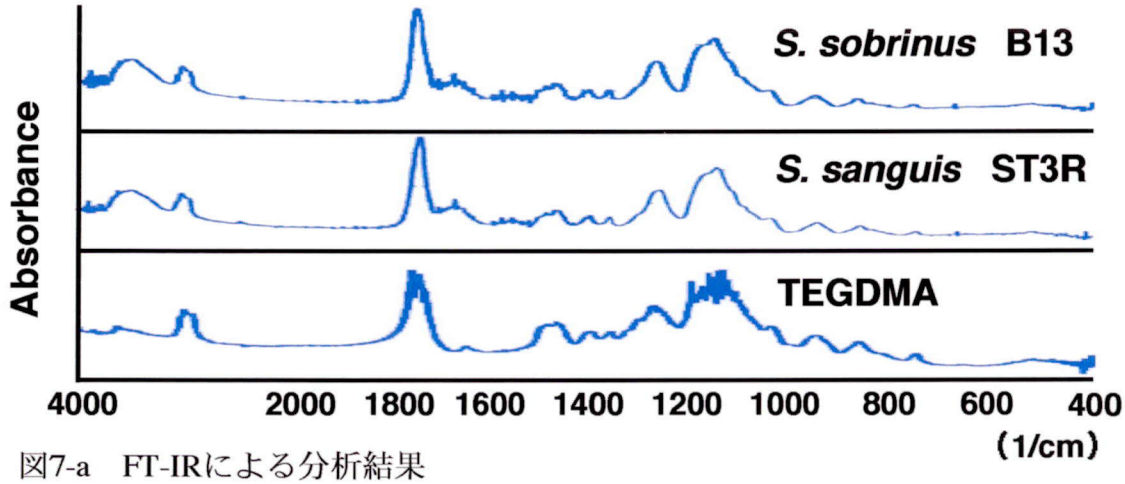


図7-a　FT-IRによる分析結果

上段から順に、*S. sobrinus* B13、*S. sanguis* ST3R の菌体周囲構造物およびTEGDMAポリマー粉末より得られたスペクトルを示す。

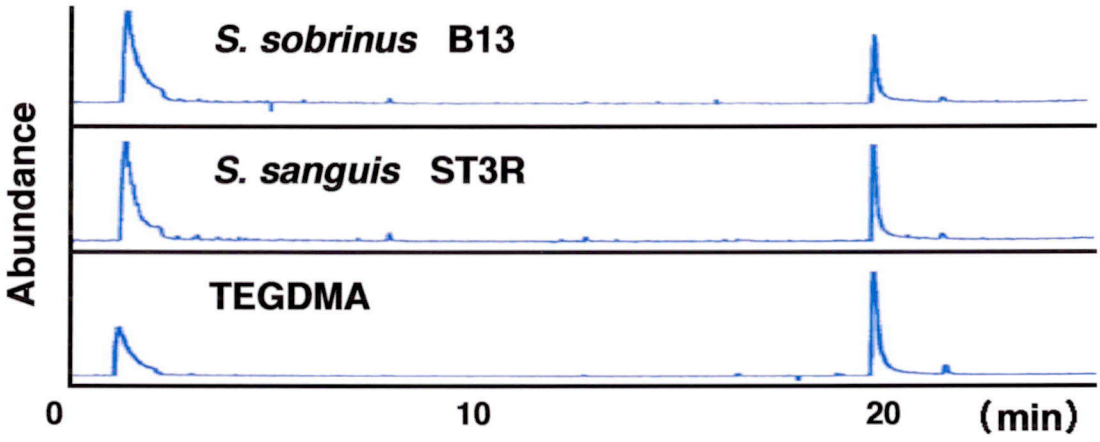


図7-b　熱分解GCによる分析結果

上段から順に、*S. sobrinus* B13、*S. sanguis* ST3R の菌体周囲構造物およびTEGDMAポリマー粉末より得られたパイログラムを示す。

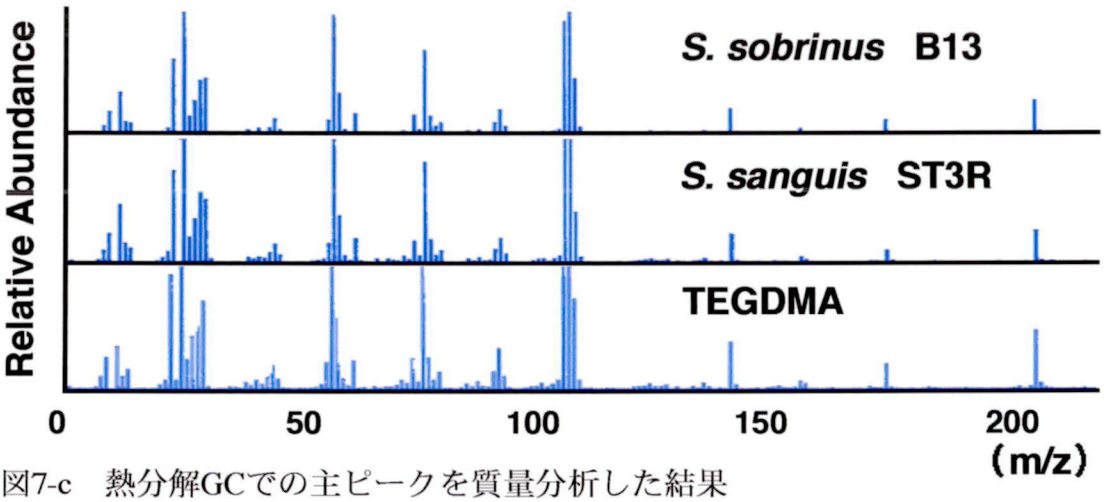


図7-c　熱分解GCでの主ピークを質量分析した結果

熱分解GCで得られた主ピーク（保持時間20分）を質量分析して得られたマススペクトルを、上段から、*S. sobrinus* B13、*S. sanguis* ST3R の菌体周囲構造物およびTEGDMAポリマー粉末の順で示す。