

Title	S-PRGフィラー含有コンポジットレジンの Streptococcus mutansに対する抗菌性の検索
Author(s)	三木, 彩希
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52337
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (三木 彩希)

論文題名 S-PRGフィラー含有コンポジットレジンの*Streptococcus mutans*に対する抗菌性の検索

【研究目的】

Surface pre-reacted glass ionomerフィラー (S-PRGフィラー) は、コアガラスの表面に予め反応させたガラスイオノマー層が存在する微粉末粒子で、 BO_3^{3-} , F^- , Na^+ , Al^{3+} , SiO_3^{2-} , Sr^{2+} といった多種のイオンを高濃度で放出するという特徴を備えている。そのため、S-PRGフィラーを含有する修復材やコート材には、酸の緩衝や歯質の脱灰抑制、石灰化促進等の作用が認められることが報告されている。一方、S-PRGフィラーから溶出する6種のイオンのうち、 BO_3^{3-} や F^- は細菌の増殖に抑制的に働くことが知られており、S-PRGフィラーを含有する修復材が口腔細菌に対して抗菌性を発現する可能性も考えられるが、これまで、その直接的な口腔細菌阻害作用を検討した報告は見当たらない。

そこで本研究では、一定組成のマトリックスレジンにS-PRGフィラーを異なる濃度で配合したコンポジットレジンを調製し、*Streptococcus mutans*の増殖と代謝に対する抑制効果を詳細に検索した。加えて、S-PRGフィラーから溶出する6種のイオンの標準溶液を用いて、それぞれのイオンの*S. mutans*に対する抑制作用を調べ、S-PRGフィラーから溶出するイオン種と抗菌性発現の関連性についての解析を行った。

【材料および方法】

I. S-PRGフィラー溶出液の細菌増殖抑制効果の評価

S-PRGフィラーを蒸留水に24時間浸漬し、遠心分離後にろ過して溶出液を得た。BHI液体培地で50, 25, 12.5%に希釈した溶出液50 μL に、 2×10^5 , 2×10^4 または 2×10^3 CFU/mLの*S. mutans* NCTC10449菌液50 μL を加え、37°C下で24時間嫌気培養後、吸光度測定により増殖を判定した。

II. S-PRGフィラーを含有するコンポジットレジン細菌増殖抑制効果の評価

Bis-GMAとTEGDMAを重量比70 : 30で混合した二元系モノマーに、S-PRGフィラーとシリカフィラーを配合して5種のコンポジットレジン (CR) を調製した。フィラー配合率はいずれも55.9 (vol)%とし、各CRにおけるS-PRGフィラー対シリカフィラー配合比を、0:100 (P0), 25:75 (P1), 50:50 (P2), 75:25 (P3), または100:0 (P4)とした。*S. mutans*菌液を塗抹したBHI寒天平板培地上に、直径9 mm, 厚さ2 mmのCR硬化試料を置き、37°C下で48時間嫌気培養後に阻止斑の形成を判定した。また、硬化試料上に 3×10^3 CFU/mLに調整した*S. mutans* 菌液50 μL を滴下し、18時間培養後に細菌数を測定した。

III. S-PRGフィラーから溶出する各イオンの細菌増殖抑制効果の評価

1. 硬化試料からのイオン溶出濃度の測定

硬化試料上に蒸留水50 μL を置き、37°C下で18 時間静置保管後、ICP発光分光分析法によりAl, B, Na, Si, Srの溶出濃度測定を行った。また、フッ素イオン電極を用いて溶出したF濃度を測定した。

2. 各イオン存在下での細菌増殖試験

H_3BO_3 , NaF, NaNO_3 , Na_2SiO_3 , $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ または $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ を蒸留水に添加し、1000 ppmの BO_3^{3-} , F^- , Na^+ , SiO_3^{2-} , Sr^{2+} 標準溶液および100 ppmの Al^{3+} 標準溶液を作製した。各標準液を用いて、P4表面からの溶出濃度の各イオンを含むBHI液体培地を調製し、同培地中で 3×10^3 CFU/mLの *S. mutans*を18時間嫌気培養後に菌数測定を行った。さらに、 BO_3^{3-} , F^- , Al^{3+} , SiO_3^{2-} については、P1~P4の溶出実験結果に基づいて異なる濃度の溶液を調整し、前述と同様にして*S. mutans*の増殖試験を行った。

IV. S-PRGフィラーを含有するコンポジットレジン中の細菌代謝抑制効果の評価

1. 硬化試料上での酸産生によるpH低下

1×10^8 CFU/mLの*S. mutans*菌液を37°C下で1時間静置して菌体内の糖を分解させた後、遠心分離により濃縮菌塊を作製した。P0およびP4硬化体表面に微小pH電極を固定した後、穴のあいたPMMAプレートをその上に設置し、pH電極に接触するように*S. mutans*菌塊を穴に填塞した。菌塊にPPB 100 μ Lを滴下して37°Cにて1時間静置後、0.5%グルコース500 μ Lを滴下し、37°C下でのpH値を5分ごとに2時間まで記録した。

2. イオン存在下での細菌代謝活性の測定

BO_3^{3-} またはF標準液をS-PRGフィラーからの溶出濃度の25~6.25%となるように希釈した溶液50 μ Lに、 2×10^6 または 2×10^5 CFU/mLに調整した*S. mutans*菌液50 μ Lを加え、嫌気培養を行った。18時間培養後、吸光度測定により増殖を判定すると同時に、XTTアッセイにて細菌の活性を評価した。

3. イオン存在下での酸産生能の測定

約 1.5×10^8 CFU/mLの*S. mutans*菌液に813 ppmの BO_3^{3-} または40.5 ppmのFを加え、0.5%グルコース100 μ Lを滴下した。pHスタットを用いた水酸化カリウムの滴定によって、*S. mutans*の糖代謝による経時的な酸産生量を記録し、得られた曲線の傾きから、グルコース滴下10および30分後の酸産生速度を算出した。

【結果および考察】

I. S-PRGフィラー溶出液の細菌増殖抑制効果の評価

12.5%以下に希釈したS-PRGフィラー溶出液では、いずれの濃度の菌液でも増殖の抑制はみられなかったが、25%希釈液では、 1×10^4 および 1×10^3 CFU/mLの菌液において増殖抑制が認められた。

II. S-PRGフィラーを含有するコンポジットレジン中の細菌増殖抑制効果の評価

阻止斑形成試験では、P0~P4のいずれにおいても増殖阻止帯の形成はみられなかった。しかし、P1~P4硬化体上で*S. mutans*を培養した場合には、P0と比較して有意に生菌数が減少し、S-PRGフィラー含有量が多いほど増殖抑制効果が大きくなる傾向が認められた。これらの結果より、S-PRGフィラー含有CRからは周囲の多量の*S. mutans*の増殖を抑制するほどの抗菌成分の溶出は生じないが、13.9 (vol)%以上のS-PRGフィラーを含有するCRでは、その表面において*S. mutans*に対する増殖抑制効果が発現することが分かった。

III. S-PRGフィラーから溶出する各イオンの細菌増殖抑制効果の評価

P1では、6種の成分のうちでSrが最も高濃度で溶出し、B、Naがこれに次いだが、P2~P4ではBの溶出濃度が最も高く、次いでSr、Naの順となった。また、B、Na、Siについては、S-PRGフィラー含有量が多いCRほど溶出濃度が高くなる傾向にあったが、Sr、Al、Fに関しては用量応答はみられず、P2~P4においてP1より有意に高い濃度の溶出を認めた。

イオン標準液を用いた検討の結果、 BO_3^{3-} 、F、 Al^{3+} 、 SiO_3^{2-} の存在下では菌数が有意に少なくなり、増殖抑制が認められた。ただし、 BO_3^{3-} とFについては、それぞれP2またはP1からの溶出濃度で有意な抑制が生じたが、 Al^{3+} と SiO_3^{2-} についてはP4からの溶出濃度でのみ抑制効果が得られた。これらのことから、S-PRGフィラー含有CRで認められた抗菌性には主に BO_3^{3-} とFの溶出が関与するものと考えられた。

IV. S-PRGフィラーを含有するコンポジットレジン中の細菌代謝抑制効果の評価

P4硬化体表面では、P0と比較してpH低下の抑制がみられた。低濃度の BO_3^{3-} およびF存在下では、正常な増殖が生じた一方で、XTTアッセイで代謝活性の低下がみられ、また酸産生速度の減少が認められた。これらのことから、増殖には影響を及ぼさない濃度レベルの BO_3^{3-} またはFであっても*S. mutans*の代謝を抑制する効果を有しており、S-PRGフィラーから溶出した BO_3^{3-} やFによって*S. mutans*の糖代謝が阻害されたこともP4表面でのpH低下抑制の一因となっているものと考えられた。

【結論】

13.9 (vol)%以上のS-PRGフィラーを含有するCR表面では*S. mutans*に対する増殖抑制効果が認められ、その効果が主にS-PRGフィラーから溶出したホウ酸イオンおよびフッ素イオンに依存するものであることが分かった。また、これら2種のイオンの溶出は、増殖を抑制しないレベルの低濃度であっても、*S. mutans*の代謝活性を抑制し、酸産生を抑え得ることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (三 木 彩 希)			
		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	今里 聡
	副 査	教授	竹重 文雄
	副 査	准教授	中田 匡宣
	副 査	講師	野村 良太
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、Surface pre-reacted glass ionomer フィラー (S-PRG フィラー) を含有するコンポジットレジン中の <i>Streptococcus mutans</i> に対する抗菌性を、S-PRG フィラーから溶出する 6 種のイオンとの関連性を含めて詳細に検索したものである。</p> <p>その結果、S-PRG フィラーを含有するコンポジットレジン表面では、ホウ酸イオンおよびフッ素イオンの溶出によって <i>S. mutans</i> の増殖が抑制され、さらに、これら 2 種のイオンは、低濃度であっても <i>S. mutans</i> の代謝活性を抑制し、酸産生を抑える効果を発現することが明らかとなった。</p> <p>以上の研究成果は、抗菌性を備えた次世代型の修復材料を開発するうえで重要な知見を提供するものであり、本研究は博士 (歯学) の学位授与に値するものと認める。</p>			