

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	<a href="https://doi.org/10.18910/52337">https://doi.org/10.18910/52337</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# 学 位 論 文

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

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻

(口腔分子感染制御学講座 歯科保存学教室)

三木 彩希

## 目次

---

I.	緒言	3
II.	使用菌株	6
III.	実験 1. S-PRG フィラー溶出液の細菌増殖抑制効果の評価	6
	1) 目的	
	2) 実験方法	
	3) 実験結果	7
	4) 小括	
IV.	実験 2. S-PRG フィラーを含有するコンポジットレジン の細菌増殖抑制効果の評価	8
	1) 目的	
	2) 実験方法	
	① 実験用コンポジットレジンの調製	
	② 硬化試料の作製	
	③ 阻止斑形成試験	
	④ 硬化試料上での細菌増殖試験	
	⑤ 統計分析	
	3) 実験結果	10
	4) 小括	
V.	実験 3. 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	11
	1) 目的	
	2) 実験方法	
	① 硬化試料からのイオン溶出濃度の測定	
	② 各イオン溶液の作製	

③ 各イオン存在下での細菌増殖試験	
④ 統計分析	
3) 実験結果	13
4) 小括	14
VI. 実験 4. S-PRG フィラーを含有するコンポジットレジンの細菌代謝抑制効果の評価	15
1) 目的	
2) 実験方法	
① 硬化試料上での酸産生による pH 低下	
② イオン存在下での細菌代謝活性の測定	
③ イオン存在下での酸産生能の測定	
3) 実験結果	17
4) 小括	18
VII. 考察	19
VIII. 結論	30
IX. 謝辞	31
X. 参考文献	32
XI. 図表	40

## I. 緒言

---

長年にわたる研究開発により、コンポジットレジンの機械的強度や耐摩耗性、審美性は著しく向上した。また、歯質接着技術が飛躍的な発展を遂げたことにより、コンポジットレジンの臨床成績が大きく改善され、現在さらにその応用範囲が拡大している<sup>1, 2)</sup>。しかしながら、金属やセラミックスあるいはエナメル質と比較すると、コンポジットレジンの表面にはプラークが堆積しやすいという欠点があり<sup>3, 4)</sup>、プラークコントロールが困難な部位への使用を懸念する意見も根強い。こういったことを背景に、コンポジットレジんに抗菌性や抗プラーク性を付与する試みが以前より盛んに行われている。例えば、第四アンモニウム系抗菌性モノマーである 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB)の配合<sup>5-7)</sup>、ポリエチレンイミンナノ粒子の配合<sup>8)</sup>、クロルヘキシジンの配合<sup>9, 10)</sup>、フィラーへの銀イオンの添加<sup>11)</sup>などが代表例として挙げられ、これら以外にもさまざまな方法が研究されている。

ところで、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アイオノマー層が存在し、それをさらに SiO<sub>2</sub> 層が防護する三層構造の微粉末粒子で (図 1)、フッ化物イオン徐放性にすぐれる<sup>12, 13)</sup>ことから、さまざまな修復材料に配合され、すでに臨床で使用されている。本フィラーは、SiO<sub>2</sub> で被覆された酸反応性のフルオロボロアルミノシリケートガラス粒子にポリアクリル酸を噴霧して作製され、表層下に形成されたガラスアイオノマー層の存在により、フッ素イオン (F) の徐放能とリチャージ能を備えていることが知られている<sup>12, 14-17)</sup>。しかも、S-PRG フィラーのコアガラスは、従来からのガラスアイオノマーセメントに使用されるフルオロアルミノシリケートガラスとは組成が異なるため、Fに加えて、アルミニウム

イオン ( $\text{Al}^{3+}$ )、ホウ酸イオン ( $\text{BO}_3^{3-}$ )、ナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ )、ケイ酸イオン ( $\text{SiO}_3^{2-}$ )、ストロンチウムイオン ( $\text{Sr}^{2+}$ ) を高濃度で放出するという特徴を備えている<sup>13, 18)</sup>。S-PRG フィラーから放出されるこれら多種類のイオンにはさまざまな作用が期待できることから、これまでに、S-PRG フィラーを含有する修復材やシーラント、コート材等の種々の機能について検討が行われ、酸の緩衝<sup>19)</sup>、歯質の脱灰抑制<sup>20-23)</sup>、石灰化促進<sup>13, 24)</sup>等の作用が認められることが報告されている。

ところで、S-PRG フィラーから溶出する6種のイオンのうち、 $\text{BO}_3^{3-}$ は、防腐剤として使用されるホウ酸<sup>25, 26)</sup>のイオン化状態のひとつであり、*Staphylococcus aureus* や *Escherichia coli* の増殖を抑制することが知られている<sup>27)</sup>。また、Fは *Streptococcus mutans* に対して増殖抑制効果を示すことが報告されている<sup>28)</sup>。したがって、修復材に配合されたS-PRG フィラーからのイオンの溶出によって、口腔細菌に対する阻害作用が引き起こされる可能性も考えられる。実際、S-PRG フィラーを含有するレジンの表面では、*S. mutans* 等のう蝕関連細菌や人工プラークの付着が抑制されることが *in vitro* の実験において報告されており<sup>29- 31)</sup>、さらに *in situ* の実験でも、S-PRG フィラー含有コンポジットレジン表面ではプラークの成熟が阻害されることが確認されている<sup>32, 33)</sup>。ただし、S-PRG フィラー含有修復材の口腔細菌に対する直接的な作用についてはこれまで検討がなされていないため、前述のような付着抑制が細菌の増殖や活性の阻害に基づくものであるか否かについては不明である。

そこで本研究では、コンポジットレジンへのS-PRG フィラーの配合による抗菌効果の発現について詳細な検討を加えるべく、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、*S. mutans* の増殖と代謝に対する抑制効果を検索した。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。

## II. 使用菌株

---

ビーズ保存法にて-20°C で凍結保存している *S. mutans* NCTC10449 株を用いた。*S. mutans* が付着したビーズ 1 個を 0.5% yeast extract (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) を添加した brain-heart infusion (BHI) 液体培地 (Becton Dickinson) 10 mL に浸漬し、37°C 下で 24 時間嫌気培養して細菌を増殖させた。その後、100  $\mu$ L の菌液を 10 mL の新たな BHI 液体培地に添加し、37°C 下で 12 時間嫌気培養を行った。特段の記載がない限り、同様の方法でさらに 12 時間継代培養を行った細菌を各実験に供した。なお、被験菌液の濃度調整には、特段の記載がない限り、0.5% yeast extract 添加 BHI 液体培地を使用した。

## III. 実験 1. S-PRG フィラー溶出液の細菌増殖抑制効果の評価

---

### 1) 目的

実験 1 では、S-PRG フィラーを水中浸漬して得られた溶出液を用いて *S. mutans* の増殖に対する抑制効果を検討し、S-PRG フィラー単体の細菌増殖抑制能を評価した。

### 2) 実験方法

平均粒径 3  $\mu$ m の S-PRG フィラー (松風, 京都) 1000 g を蒸留水 1000 mL に浸漬し、ターブラーミキサー (T10B, シンマルエンタープライゼス, 大阪) にて攪



拌しながら 23°C 下で 24 時間保管した。遠心分離によりフィラーを分離した後、上澄みをろ過して S-PRG フィラー溶出液を回収した。

得られた溶出液を、0.5% yeast extract 添加 BHI 液体培地 (Becton Dickinson) を用いて 50、25、または 12.5% に希釈し、96 穴マイクロプレート (Becton Dickinson) のウェルに 50  $\mu\text{L}$  ずつ分注した。各ウェルに、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^4$  または  $2 \times 10^3$  colony-forming units (CFU)/mL に調整した *S. mutans* 菌液 50  $\mu\text{L}$  を加え、37°C 下で 24 時間嫌気培養を行った後、波長 550 nm における吸光度 (OD) をマイクロプレートリーダー (Model 680 MICROPLATE READER, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて測定し、増殖を評価した。フィラー溶出液のみを含み、菌を播種していない BHI 液体培地をコントロールとして、実験群の培養後の吸光度が、コントロールでの吸光度  $\pm 0.010$  である場合を「増殖なし」と判定した。試料数は 5 とした。

### 3) 実験結果

表 1 に、各希釈濃度の S-PRG フィラー溶出液存在下での *S. mutans* の増殖の有無を示す。12.5% および 6.25% 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においても増殖抑制は認められなかった。25% に希釈した溶出液では、 $1 \times 10^5$  CFU/mL の *S. mutans* の抑制は認められなかったものの、 $1 \times 10^4$  および  $1 \times 10^3$  CFU/mL の菌液においては抑制が認められた。

### 4) 小括

S-PRG フィラーからの溶出液は、12.5% 以下に希釈されると効果が認められなくなるものの、25% の希釈であれば、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^3$  CFU/mL の濃度の *S. mutans* の増殖を抑制した。

## IV. 実験 2. S-PRG フィラーを含有するコンポジットレジン<sup>o</sup>の細菌

### 増殖抑制効果の評価

---

#### 1) 目的

実験 2 では、S-PRG フィラーを種々の濃度で配合した実験用コンポジットレジン（以下 CR）を作製し、阻止斑形成試験および硬化試料上での増殖試験を行うことで、S-PRG フィラーからのイオン溶出による抗菌作用発現について検討した。

#### 2) 実験方法

##### ①実験用コンポジットレジンの調製

2,2-bis[4(2-hydroxy-3-methacryloyloxy-propyloxy)-phenyl] propane (Bis-GMA) と Triethylene glycol dimethacrylate (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（平均粒径 3  $\mu\text{m}$ , 松風）とシリカフィラー（平均粒径 1  $\mu\text{m}$ ）を配合して 5 種の CR を作製した（表 2、P0~P4）。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、25 : 75、50 : 50、75 : 25、または 100 : 0 とした。なお、S-PRG フィラー、シリカフィラーともシランカップリング処理を行っていないものを使用した。

##### ② 硬化試料の作製

直径 9 mm、深さ 2 mm のシリコンモールドに各 CR ペーストを填入し、セロファンストリップス（松風）を介在させてスライドガラスで圧接後、上方向か

ら 500 mW/cm<sup>2</sup> の光照射器 (Optilux 501 Kerr Corporation, Orange, CA, USA) にて 40 秒間の光照射を行ってディスク状硬化試料を作製した。

図 2 に S-PRG フィラーのみを含有する P4 の硬化試料表面の走査型電子顕微鏡像を示す。数  $\mu\text{m}$  から約 10  $\mu\text{m}$  のフィラーが緊密に配合されている様子が観察される。図 3 は、P3 と P4 の硬化試料を積み重ねてマイクロ CT で撮影した像である。S-PRG フィラーの含有量が多いほどエックス線不透過性が高くなるが、いずれの試料においても CR 全体にフィラーが均等に分布していることが確認できる。

なお、硬化試料はエチレンオキシドガスにて滅菌後、セロファンストリップス圧接面を各実験に供した。

### ③ 阻止斑形成試験

阻止斑形成試験は、Imazato ら<sup>34)</sup>の方法に準じた寒天平板拡散法により行った。1×10<sup>8</sup> CFU/mL に調整した *S. mutans* 菌液 300  $\mu\text{L}$  を 0.5% yeast extract (Becton Dickinson) を添加した BHI 寒天平板培地 (Becton Dickinson) 上に塗抹し、表面が軽く乾燥した後、各硬化 CR 試料を置いた。37°C 下で 48 時間嫌気培養後、試料周囲での阻止斑形成の有無を判定した。試料数は 3 とした。

### ④ 硬化試料上での細菌増殖試験

硬化 CR 試料上に 3×10<sup>3</sup> CFU/mL に調整した *S. mutans* 菌液 50  $\mu\text{L}$  を播種し、相対湿度 100%、37°C、嫌気条件下で培養した。18 時間培養後、試料を菌液ごと 9.95 mL の 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) 中に浸漬し、振とう後に 10 倍段階希釈を行った。希釈した菌液 100  $\mu\text{L}$  を BHI 寒天平板培地 (Becton

Dickinson) に播種し、37°C 下で 48 時間嫌気培養後、コロニー数を測定した。試料数は各 CR につき 3 とした。

#### ⑤統計分析

細菌増殖試験の結果は、One-way ANOVA 及び Tukey-Kramer test にて危険率 5% で有意差を判定した。

### 3) 実験結果

#### ①阻止斑形成試験

図 4 に阻止斑形成試験の結果を示す。P0～P4 のいずれにおいても、試料周囲に増殖阻止帯の形成はみられなかった。

#### ②硬化試料上での細菌増殖試験

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た (図 5)。P2 と P3、P3 と P4 間には有意差は認められないものの、S-PRG フィラー含有量が多いほど細菌数が減少する傾向が認められた。

### 4) 小括

P1～P4 のいずれも、寒天平板拡散法で阻止斑の形成がみられず、作製した S-PRG フィラー含有試作 CR からは試料周囲の *S. mutans* の増殖を抑制するほどの抗菌成分の溶出は認められなかった。しかし、硬化試料上で  $3 \times 10^3$  CFU/mL の *S. mutans* を培養すると、P1～P4 のいずれにおいても有意な増殖抑制が認められ、その効果は S-PRG フィラー含有量が多いほど大きくなる傾向が確認された。

## V. 実験 3. 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) 目的

実験 3 では、S-PRG フィラーを含有する CR から溶出するイオンの濃度を測定し、その結果に基づいて各イオンの *S. mutans* 増殖抑制効果を個別に評価することで、それぞれの溶出イオンの抗菌性発現への関与について検討した。

#### 2) 実験方法

##### ①硬化試料からのイオン溶出濃度の測定

実験 2 で行った硬化試料上での細菌増殖試験に準拠する方法で、各 CR 硬化試料からの、6 種のイオンの溶出濃度を計測した。すなわち、P0~P4 の硬化試料上に蒸留水 50  $\mu$ L を置き、相対湿度 100%、37°C 下で 18 時間保管後、ピペットを用いて試料 5 個分の溶出液をまとめて 9.75 mL の蒸留水中に回収した。サンプル中に含まれる  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ については、ICP 発光分光分析装置 (ICPS-8000, 島津製作所, 京都) を用いて Al、B、Na、Si、Sr の濃度を測定し、Fについては、フッ素イオン電極 (Model 9609BN, Orion Research Inc., MA, USA) を用いて測定を行った。試料数は各 CR につき 4 とした。

##### ②各イオン溶液の作製

S-PRG フィラー含有 CR から溶出する各イオンの *S. mutans* に対する抑制作用を検討するため、それぞれのイオンの単独標準液を調製した。すなわち、蒸留水に  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  (いずれも和光純薬)

または NaF (シグマアルドリッチ, 東京) を添加して、100 ppm の  $\text{Al}^{3+}$  および 1000 ppm の  $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{F}^-$  の各イオン溶液を作製した (表 3) 。カウンターイオンとしては、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$  の陽イオンには  $\text{NO}_3^-$  を、 $\text{SiO}_3^{2-}$  と  $\text{F}^-$  に対しては  $\text{Na}^+$  を用いた。また、低 pH による細菌増殖への影響を排除するために、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液と  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  溶液については、それぞれ NaOH (和光純薬)、 $\text{HNO}_3$  (ナカライテスク, 京都) を用いて pH 調整を行い、すべての被験液の pH が 5.0 以上となるようにした (表 3) 。

### ③各イオン存在下での細菌増殖試験

作製したイオン溶液を PBS (pH 7.4) で希釈後、*S. mutans* の BHI 懸濁液に添加した。各イオンの最終濃度は、実験①で得られた P4 からの溶出濃度とし (表 4)、菌液の濃度は、実験 2 の CR 硬化試料上での増殖試験と同様の  $3 \times 10^3$  CFU/mL とした。37°C 下で 18 時間嫌気培養後、10 倍段階希釈した菌液 100  $\mu\text{L}$  を BHI 寒天平板培地に塗抹し、37°C 下で 48 時間嫌気培養を行ってコロニー数を測定した。

さらに、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$  については、前述の実験①で測定された P1 ~P4 からのすべての溶出濃度 (表 5) での増殖抑制効果を、同様の方法で重ねて実験した。コントロールにはどのイオンも含まない PBS を用い、試料数はすべての群につき 3 とした。

### ⑤統計分析

イオン溶出濃度測定と細菌増殖試験の結果は、One-way ANOVA 及び Tukey-Kramer test にて危険率 5% で有意差を判定した。

### 3) 実験結果

#### ①硬化試料からのイオン溶出濃度の測定

図 6 に、ICP 発光分光分析により測定した溶出サンプル中の B, Sr, Na, Si, Al の濃度と、フッ素イオン電極を用いて測定した F の濃度を示す。P1 では 6 種の成分のうちで Sr の溶出濃度が最も高く、B、Na がこれに次いだが、P2~P4 においては、B の溶出濃度が最も高く、次いで Sr、Na の順となった(図 6)。S-PRG フィラーを含まない P0 からは、微量の Na と Si の溶出が認められたが、B、Sr、Al、F は検出されなかった。

6 種のイオンの溶出挙動には二つのパターンがみられた。すなわち、B、Na、Si では、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り、とくに B については P1~P4 のすべての試料間で有意差が認められた。これに対して、Sr、Al、F につい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が、P2~P4 間には有意差が認められなかった。

#### ②各イオン存在下での細菌増殖試験

P4 からの溶出濃度の各イオン存在下で *S. mutans* を培養したところ、Na<sup>+</sup>と Sr<sup>2+</sup>ではイオン非添加のコントロールと有意差が認められなかったが、BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>、F、Al<sup>3+</sup>、SiO<sub>3</sub><sup>2-</sup>では有意に菌数が少なく、増殖抑制が認められた(図 7)。

図 8 は、上記の BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>、F、Al<sup>3+</sup>、SiO<sub>3</sub><sup>2-</sup>について、P1~P4 からの溶出濃度で増殖試験を行った結果である。4 種のイオンとも、濃度が高くなるほど生菌数が減少する傾向は認められたものの、Al<sup>3+</sup>と SiO<sub>3</sub><sup>2-</sup>は P4 からの溶出濃度においてのみコントロールと有意差がみられ、BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>と F については、それぞれ P2 または P1 からの溶出濃度以上の濃度で増殖抑制が認められた。また、BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>では、P3

と P4 からの溶出濃度での増殖抑制効果には有意差がなく、Fについては、P1 から P4 での溶出濃度すべてにおいて有意差が認められなかった（図 8）。

#### 4) 小括

6 種のイオンのうち、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、F、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ は、試作 CR からの溶出濃度において *S. mutans* に対する増殖抑制効果を示した。ただし、 $\text{Al}^{3+}$ と  $\text{SiO}_3^{2-}$ は P4 からの溶出濃度でのみ増殖抑制を認めたのに対し、 $\text{BO}_3^{3-}$ は P2～P4 からの溶出濃度（52.2～131.0 ppm）で、Fは P1～P4 からの溶出濃度（4.6～8.6 ppm）で増殖抑制作用を発揮した。



## VI. 実験 4. 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) 目的

実験 4 では、S-PRG フィラー含有 CR 上での *S. mutans* の糖代謝による酸産生を評価し、S-PRG フィラーから溶出するイオンの細菌代謝活性に対する抑制効果について検討を行った。

#### 2) 実験方法

##### ①硬化試料上での酸産生による pH 低下

Mayanagi らの方法<sup>35)</sup>に基づき、硬化試料表面上の *S. mutans* がグルコースを代謝して酸を産生することによって生じる pH の変動を測定した。*S. mutans* 菌液を OD<sub>660</sub> = 0.5 ( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL) になるまで培養し、2 mM potassium phosphate buffer (PPB; pH 7.0) にて 2 度洗浄後、PPB に懸濁した。菌体内の糖を分解させるために菌懸濁液を 37°C 下で 1 時間静置保管した後、遠心分離 (16000 × g, 7 分, 4°C) により菌体を沈殿させて、1 g 中に  $1.0 \times 10^{11}$  CFU の *S. mutans* を含む濃縮菌塊を作製した。

P0 および P4 の硬化試料表面に、試料端から中心に至る幅 1 mm、深さ 1 mm の溝を形成し、微小 pH 電極 (Ion-sensitive field-effect transistor pH electrode, 日本光電工業, 埼玉) を固定した。直径 4 mm の穴のあいた厚さ 1 mm の polymethyl methacrylate (PMMA) プレートを用いて、pH 電極の先端に穴が位置するように設置し、調整した *S. mutans* 菌塊を pH 電極に接触するように穴に填塞した (図 9)。填塞した菌塊の質量が 16 mg であったことから、使用した菌数は  $1.6 \times 10^9$  CFU と算

出された。菌塊に PPB 100  $\mu\text{L}$  を滴下して 37°C にて 60 分間静置した後、0.5% グルコース（ナカライテスク）500  $\mu\text{L}$  を滴下し、37°C 下での pH 値を 5 分ごとに 120 分後まで記録した。試料数はすべての群につき 3 とした。

## ②イオン存在下での細菌代謝活性の測定

実験 3 において明瞭な *S. mutans* の増殖抑制作用が認められた  $\text{BO}_3^{3-}$  と F について、増殖には影響を及ぼさない低濃度条件での *S. mutans* の代謝活性抑制の可能性を検討した。すなわち、実験 1 での結果をもとに、S-PRG フィラー溶出原液中濃度の 12.5~3.13% の  $\text{BO}_3^{3-}$  または F の存在下で、 $1 \times 10^5$  または  $1 \times 10^6$  CFU/mL の *S. mutans* を培養し、XTT アッセイにて代謝活性を測定した。具体的には、PPB を用いて、実験 3 で作製した  $\text{BO}_3^{3-}$  標準液を 542、271 または 135.5 ppm に、F 標準液を 27、13.5 または 6.8 ppm に希釈した。各希釈液 50  $\mu\text{L}$  に、 $2 \times 10^6$  または  $2 \times 10^5$  CFU/mL に調整した *S. mutans* 菌液 50  $\mu\text{L}$  を加え、37°C 下で 16 時間嫌気培養後、XTT 試薬 (AppliChem, Darmstadt, Germany) 50  $\mu\text{L}$  を添加し、さらに 37°C 下で 2 時間培養した後、マイクロプレートリーダー (Model 680 MICROPLATE READER) を用いて波長 450 nm での吸光度を測定した。なお、すべての実験において、同様の条件で 18 時間培養後に OD<sub>550</sub> の値を測定し、増殖抑制の有無を確認した。どちらのイオンも含まない PPB をコントロールとし、試料数は各条件につき 5 とした。

## ③イオン存在下での酸産生能の測定

Kawashima らの方法<sup>36)</sup>に基づいて、増殖には影響を及ぼさない低濃度の  $\text{BO}_3^{3-}$  または F (S-PRG フィラー溶出原液中濃度の 12.5% 相当) の存在下で、*S. mutans* の酸産生速度を測定した。*S. mutans* 菌液を OD<sub>660</sub> = 0.5 ( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL) に

なるまで培養し、PPBにて2度洗浄後、 $1.5 \times 10^8$  CFU/mLのPPB懸濁液を調整した。実験3で作製した $\text{BO}_3^{3-}$ またはF標準液を、それぞれ813 ppm、40.5 ppmとなるようにPPBで希釈した後、各希釈溶液1 mLに菌液2 mLを加え、37°C下で4分間静置した。その後、0.5%グルコース100  $\mu\text{L}$ を滴下し、pHスタット(AUTO pH stat, model AUT-211S, 東亜電機工業, 東京)を用いて50 mMの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た。得られた酸産生量曲線の傾きから、グルコース滴下10分後および30分後の酸産生速度を算出した。どちらのイオンも含まないPPBをコントロールとし、試料数は各条件につき3とした。

#### ④統計分析

結果は、One-way ANOVA 及び Tukey-Kramer test にて危険率5%で有意差を判定した。

### 3) 実験結果

#### ①硬化試料上での酸産生によるpH低下

P0表面では、グルコース添加15分後からpHの低下が始まり、120分経過後には、約4.2まで低下した。これに対して、P4表面では、グルコース添加35分後からpH低下が始まり、120分経過後でもpHは約4.8にとどまった。また、グルコース添加40分から120分後までを通して、P4でのpH値はP0よりも有意に高かった(図10)。

## ②イオン存在下での細菌代謝活性の測定

$\text{BO}_3^{3-}$ 、Fとも、培養後の菌液の吸光度はコントロールと有意差がなく、正常な増殖が生じたことが確認された(図 11a, c)。一方、XTT アッセイでは、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、Fともに、すべての被験濃度においてコントロールと比較して有意に吸光度が低くなり、代謝活性の低下が認められた(図 11b, d)。

## ④イオン存在下での酸産生能の測定

図 12 に、グルコース添加 10 および 30 分後の酸産生速度を示す。271 ppm の  $\text{BO}_3^{3-}$  の存在により、*S. mutans* による酸産生速度が有意に低下した。また、Fの存在下においても、グルコース添加から 10 分後で有意な低下が認められた。

## 4) 小括

S-PRG フィラー含有 CR 硬化試料表面では、*S. mutans* のグルコース代謝による酸産生に基づく pH 低下が抑制された。また、 $\text{BO}_3^{3-}$  と F は、*S. mutans* の増殖には影響を及ぼさない濃度であっても、その代謝活性を抑制する効果を示すことが確認された。

## VII. 考察

---

S-PRG フィラーは、フルオロボロアルミノシリケートからなるコアガラスの表面にガラスアイオノマー層が存在し、それを SiO<sub>2</sub> 層が防護する構造をしている。ガラスアイオノマー層そのものの物性はコアガラスほど高くはないが、SiO<sub>2</sub> 層の被覆により、ガラスアイオノマー層からイオンが溶出しても安定な状態を維持できる。また、多種類のイオンを高濃度に放出するものの、細胞に対する毒性は低く、生体親和性にすぐれることも確認されている<sup>37)</sup>。このような特徴から、現在、S-PRG フィラーは、市販のコンポジットレジン<sup>29)</sup> や歯面コート材<sup>22)</sup>、シーラント材<sup>38)</sup>、接着システム<sup>39)</sup>等に配合されており、またそれ以外にも、根管充填用シーラー<sup>40)</sup>、象牙質知覚過敏治療材<sup>41,42)</sup>、歯磨剤<sup>43)</sup>等さまざまな材料への応用の試みが行われている。

本研究では、S-PRG フィラーのコンポジットレジンへの配合による抗菌効果発現の可能性を詳細に解析することを目的に、S-PRG フィラーを種々の濃度で配合したコンポジットレジンを調製し、*S. mutans* の増殖と代謝に対する抑制効果を検索した。さらに、S-PRG フィラーから溶出する 6 種のイオンそれぞれの *S. mutans* に対する抑制作用を検討した。

### 実験 1. S-PRG フィラー溶出液の細菌増殖抑制効果の評価

まず、S-PRG フィラーから溶出するイオンの抗菌力を評価するために、S-PRG フィラーを水中浸漬して得られた溶出液を用いて細菌増殖試験を行ったところ、希釈率が大きい場合は増殖抑制効果は認められなかったが、25%希釈液の場合には、 $1 \times 10^4$  CFU/mL 以下の *S. mutans* の増殖が抑制された。すなわち、S-PRG フィラーから溶出するイオンは、ある一定以上の濃度であれば、*S. mutans* の数が比

較的少ない場合にその増殖を抑制できることが分かった。田村ら<sup>44)</sup>は、S-PRG フィラーを *Streptococcus sanguinis* または *Streptococcus oralis* の懸濁液に浸漬して培養し、継時的な増殖状態を吸光度測定により評価している。その結果、50 µg/mL の S-PRG フィラーの添加で、*S. sanguinis* では8時間後以降、*S. oralis* では12時間後以降の吸光度がS-PRG フィラー非添加のコントロールと比べて低く、増殖抑制が認められたと報告している。ただし、吸光度の低下はコントロールの5分の1程度に留まっており、強い抑制は確認されていない。今回の結果とこれらの報告を合わせて考えると、S-PRG フィラー溶出液には抗菌性があり、oral streptococci の増殖を抑制することが可能であるが、一般の抗菌剤のような強い作用とまでは言えないと判断できる。

## 実験 2. S-PRG フィラーを含有するコンポジットレジン<sup>6)</sup>の細菌増殖抑制

### 効果の評価

実験 2 では、モノマー組成とフィラー配合率を同一にした5種類のCRを調整し、S-PRG フィラーを含有するCRが *S. mutans* に対する増殖抑制効果を発揮するか否かを検証した。S-PRG フィラーと組み合わせるフィラーには、抗菌性を有さないシリカフィラーを用い、その配合比を変化させることによって、S-PRG フィラーの最終配合濃度を、0、13.9、27.9、41.8、55.9 (vol)%と段階的に変化させた (P0~P4)。

まず、硬化試料を用いて阻止斑形成試験を行ったところ、P1~P4のいずれにおいても、P0と同様に増殖阻止帯の形成を認めなかった。寒天平板を用いた阻止斑形成試験は、もともと、抗生剤等の水溶性抗菌成分に対する特定の細菌の感受性を評価するものであるが、歯科用修復材料の抗菌性評価にも頻用されている<sup>6)</sup>。CR硬化体の場合は、寒天培地の水分がCR表面から内部に浸透し、そ

れによって溶け出した抗菌成分が拡散して増殖阻止帯の形成に至る。本実験においては、従来から多用されている高い濃度の菌液を寒天平板培地に均等に塗抹する方法<sup>34)</sup>を採用したが、クロルヘキシジンのような強い抗菌力を有する成分を含む場合は、CR 硬化体であっても明確な阻止斑が観察される<sup>7)</sup>。しかし、最も多くの S-PRG フィラーを含有する P4 においても、阻止帯の形成は認められなかった。実験 1 で確認されたように、明瞭な増殖抑制効果を発揮するには高濃度の S-PRG フィラー溶出成分が必要であり、S-PRG フィラー含有 CR では、試料周囲に存在する多量の *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ことが分かった。

そこで、CR 硬化試料表面に先の実験よりも低濃度の  $3 \times 10^3$  CFU/mL の *S. mutans* を播種して培養したところ、P1~P4 のすべてにおいて増殖抑制効果が認められた。この試料上培養法では、溶出成分が確実に細菌と接触するため、溶出濃度との関係性も含めて抗菌効果を厳密に評価できる。P3 と P4 間には有意差は認められなかったものの、S-PRG フィラー含有量が多くなるに従って増殖抑制効果が高くなる傾向が認められたことから、S-PRG フィラーからの成分溶出によって細菌の増殖抑制が生じたものと考えられ、S-PRG フィラー含有 CR がその表面近傍において細菌に対して抑制作用を発現することが明らかとなった。

Saku ら<sup>29)</sup> は、S-PRG フィラーを含有する市販 CR 片を  $1 \times 10^9$  CFU/mL の *S. mutans* 菌液に浸漬して 2 時間培養したところ、表面へのプラーク付着が S-PRG フィラーを含まない他の市販 CR に比べて有意に少なかったと報告している。また、Hotta ら<sup>30)</sup> も、S-PRG フィラーを 40 (wt)% 含有する CR を試作し、唾液処理を行った後に  $1 \times 10^9$  CFU/mL の *S. mutans* 菌液に浸漬して 2 時間培養したところ、CR 表面への *S. mutans* の付着が減少したことを報告している。本実験で使用した P1~P4 の S-PRG フィラー含有量は、22.3~78.7 (wt)% である (表 2)。Saku

ら<sup>29)</sup> が用いた市販 CR 中の S-PRG フィラー含有量は 30 (wt)% 程度であり、また Hotta ら<sup>30)</sup> の実験で使用された CR 中の S-PRG フィラー量も今回の試作 CR の含有濃度の範囲にある。ただし、阻止斑形成試験と試料上培養試験の結果から明らかになったように、S-PRG フィラー含有 CR 表面で *S. mutans* の増殖抑制が生じるのはあくまでも菌液の濃度が低い場合であり、高濃度の菌液を使用した過去の実験で認められた S-PRG フィラー含有 CR によるプラーク付着抑制作用に、S-PRG フィラーからの溶出成分が発揮する増殖抑制作用がどの程度関わっているかは定かではない。

### 実験 3. 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

実験 1 において、S-PRG フィラーからの溶出成分が *S. mutans* の増殖を抑制することが示され、さらに実験 2 において、S-PRG フィラーを含有する CR 表面で細菌増殖抑制効果が発揮されることが明らかとなった。S-PRG フィラーからは、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、F、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$  が溶出することが知られている<sup>13,18)</sup>。しかしながら、これらのどのイオンが抗菌性発現に関与しているかは現在まで明らかにされていない。そこで、実験 3 では、硬化試料表面から溶出する各イオンの濃度を実験 2 の細菌増殖試験に近似した方法で測定し、さらに、その結果に基づいて各イオンの増殖抑制効果の評価することで、どのイオンが抗菌性発現に関与しているかの解明を試みた。

CR 硬化試料上での細菌培養試験で播種した菌液量と同じ 50  $\mu\text{L}$  の蒸留水を硬化体表面においてイオン溶出濃度を測定したところ、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Na}^+$ 、と  $\text{Sr}^{2+}$  が高い濃度を示した。なかでも  $\text{BO}_3^{3-}$  は 6 種のうちで最も溶出濃度が高く、55.9 (vol)% の S-PRG フィラーを含有する P4 からの溶出濃度は 131 ppm となった。S-PRG フィラー単体からは、やはり  $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Sr}^{2+}$  が他のイオンより高濃度で溶出す



ることが報告されており<sup>13, 18)</sup>、S-PRG フィラーを含有する CR からのイオン溶出の傾向も全く同様であることが確認された。一方、CR 中の S-PRG フィラー含有量と溶出濃度との関係には、二つのパターンが認められた。すなわち、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ については、CR 中の S-PRG フィラー量が多いほど溶出濃度が高くなる傾向にあったが、 $\text{F}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ では用量応答はみられず、27.9 (vol)%以上の S-PRG フィラーを含有する CR (P2~P4) では溶出濃度に差がみられなかった。6 種のイオンのうち、 $\text{BO}_3^{3-}$ と  $\text{SiO}_3^{2-}$ は主に S-PRG フィラーのガラス骨格を形成する成分であり、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{F}$ はガラス骨格の修飾に、 $\text{Al}^{3+}$ は骨格形成と修飾の両方に使用されている。しかし、それぞれのイオンの溶出特性と S-PRG フィラーの構造との関連性はとくに認められない。したがって、コアガラスがポリアクリル酸と反応して形成されたガラスアイオノマー層中での 6 種のイオンの量や存在状態が異なり、溶出濃度や溶出挙動の違いが生じたものと思われる。

次に、細菌増殖抑制効果に関与するイオンを特定するために、6 種のイオンそれぞれの標準溶液を作製し、測定された溶出濃度に基づいて *S. mutans* に対する増殖抑制効果を評価した。*S. mutans* は酸耐性を持つことが知られているが、pH 5.0 以下の酸性環境では増殖への影響が生じることから<sup>45, 46)</sup>、すべてのイオン溶液の pH を 5.0 以上に設定することで酸による結果への影響を排除した。はじめに、試作 CR のうちで S-PRG フィラーを最大量で含む P4 からの溶出濃度での各イオンの細菌増殖抑制効果を検討した結果、6 種のイオンのうち  $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{F}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ において有意な増殖抑制が認められた。中でも  $\text{BO}_3^{3-}$ が最も高い増殖抑制効果を示し、 $\text{F}$ がこれにつづき、 $\text{Al}^{3+}$ と  $\text{SiO}_3^{2-}$ では弱いながらも効果が認められた。

ホウ酸は *S. aureus* や *E. coli* に対して抗菌効果を発揮する<sup>27, 47)</sup> ことや、*Candida albicans* や *Botrytis cinerea* に対して抗真菌性を示すことが報告されており<sup>48)</sup>、

カンジダ膺炎の治療薬<sup>49)</sup> や点眼剤<sup>25)</sup> として臨床で使用されている成分である。現在も、ホウ酸を含む新規抗菌薬の開発<sup>50)</sup> が進められているほか、歯科領域においても、ホウ酸を用いた歯周病治療の試み<sup>51,52)</sup> 等さまざまな研究が行われている。ホウ酸は元来強い抗菌成分ではなく、*S. aureus* に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は 3.80 mg/mL である<sup>27)</sup>。口腔細菌に対する抗菌力に関する報告はなされていないが、本研究で使用した *S. mutans* NCTC10449 に対するホウ酸の MIC を  $1 \times 10^6$  CFU/mL の菌液を用いる通常の方法<sup>5)</sup> で測定したところ、5.56 mg/mL (5560 ppm) であった (データ示さず)。P4 表面からの  $\text{BO}_3^{3-}$  の溶出濃度は 131 ppm であり、MIC 値には達していないものの、硬化試料上での増殖試験に使用した菌液濃度は  $3 \times 10^3$  CFU/mL と低いため、*S. mutans* の増殖に対して抑制的に働いたものと考えられる。

フッ素は、う蝕予防のための成分として歯磨剤や洗口剤に配合されている<sup>53)</sup> ほか、二次う蝕抑制への寄与を期待してさまざまな修復材料にも添加されている<sup>54-56)</sup>。そのう蝕予防機序は、フルオロアパタイト形成による歯質の耐酸性向上<sup>57,58)</sup> が主であるが、フッ素には口腔細菌に対する抗菌作用があることも報告されている<sup>28,59)</sup>。*S. mutans* に対しては、歯磨剤や洗口剤に頻用されている NaF に関する研究が行われ、MIC が 1000 ppmF であったとされている<sup>28)</sup>。P4 からの F の溶出濃度はわずかに 8.5 ppm であり、MIC 値をはるかに下回っているが、試料上での培養試験の結果からすると、*S. mutans* に対しては  $\text{BO}_3^{3-}$  よりも強い抗菌力を持っていると考えられる。一方、弱い増殖抑制効果が認められた  $\text{Al}^{3+}$  と  $\text{SiO}_3^{2-}$  に関しては、抗菌性があるとする報告は過去にほとんど見当たらない。Al については、*S. aureus* や *E. coli* に対してわずかに抗菌効果を発揮するという結果が報告されている<sup>60, 61)</sup> のみであり、 $\text{SiO}_3^{2-}$  についても、*E. coli* の活性に多少

の影響を及ぼす<sup>62)</sup>といった報告があるにすぎない。今回の結果からも、 $\text{Al}^{3+}$ と $\text{SiO}_3^{2-}$ の細菌に対する抑制作用はごく軽度であると考えてよいであろう。

つづいて、増殖抑制効果が認められた $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{F}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ の4種のうち、どのイオンが効果発現の主因となっているかを明確にするため、P1～P4表面からの溶出濃度に基づいて異なる濃度の $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{F}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ 溶液を調整し、増殖抑制効果を比較した。その結果、すべてのイオン種において、濃度が高いほど抑制効果が強くなる傾向は認められたものの、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ は、P4からの溶出濃度においてのみ有意な効果を発揮するに過ぎなかった。これに対し、 $\text{BO}_3^{3-}$ と $\text{F}$ は、それぞれP2とP1からの溶出濃度以上の濃度において有意な細菌増殖抑制を示した。これらのことから考えると、S-PRG フィラーの配合によって認められたCR硬化試料表面における*S. mutans*の増殖抑制作用には、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{F}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ の4種の溶出イオンが関わっており、なかでも $\text{BO}_3^{3-}$ と $\text{F}$ が強く関与すると判断できる。

#### 実験4. S-PRG フィラーを含有するコンポジットレジン<sup>63)</sup>の細菌代謝抑制効果の評価

抗菌性を示す成分は、低濃度であっても細菌に対して何らかの抑制作用を発揮する場合が多い。例えば、強い抗菌力を有する抗生剤や第四アンモニウム系抗菌成分は、sub-MICの濃度でもある程度の細菌増殖抑制作用を発揮することが報告されており<sup>63-65)</sup>、また、Nakajoら<sup>66)</sup>は、ガラスイオノマーセメントから溶出する低濃度のフッ素によって*S. mutans*および*S. sanguinis*の代謝が抑制されると報告している。そこで、実験4では、実験3でS-PRG フィラーを含有するCRの増殖抑制効果発現の主要因であると分かった $\text{BO}_3^{3-}$ と $\text{F}$ を対象に、*S. mutans*の代謝活性に対する抑制作用を検討した。

*S. mutans* の端的な代謝活動は、糖を利用した酸の産生である。そこで、まず、CR 上に播種した *S. mutans* にグルコースを滴下し、酸産生に基づく pH 変動を継続的に測定したところ、P4 表面では P0 と比べて pH の低下が抑制された。Ma ら<sup>22)</sup> も、本研究と同様の方法を用いて S-PRG フィラーを約 25% 含有するレジン系コート材上での pH を測定し、グルコース添加後も 5.0 以上の pH 値が維持されたことを報告している。S-PRG フィラーから溶出するイオンのうち  $\text{Sr}^{2+}$  や  $\text{Na}^+$  は酸の緩衝作用を有すると考えられており、これまでに、S-PRG フィラーを含有するシーラント材が顕著な酸の緩衝効果を示すことが明らかになっている<sup>19)</sup>。したがって、P4 上では、産生された酸がこれらの溶出イオンにより中和された可能性は大きい。しかし、その一方で、抗菌効果を示す  $\text{BO}_3^{3-}$  や F によって *S. mutans* の代謝が抑制され、酸産生量が減少した可能性も考えられる。そこで、つづいて、低濃度の  $\text{BO}_3^{3-}$  および F の存在下で *S. mutans* を培養し、XTT アッセイによる代謝活性の測定を行った。なお、代謝活性判定に際しては、*S. mutans* の増殖には影響を及ぼさない濃度レベルでの評価を行うために、菌数を  $1 \times 10^5$  および  $1 \times 10^6$  CFU/mL に設定し、実験 1 の S-PRG フィラー溶出液による増殖抑制試験の結果を参考に、 $\text{BO}_3^{3-}$  の被験濃度を 67.8~271 ppm に、F のそれを 3.4~13.5 ppm とした。その結果、いずれの濃度の  $\text{BO}_3^{3-}$  または F でも、増殖は全く抑制しないにも関わらず、*S. mutans* の代謝活性を抑制することが分かった。

ところで、NADH および NADPH の産生を測定する XTT アッセイでは、エムデン・マイヤーホフ経路やペントースリン酸経路、クエン酸回路など *S. mutans* の全ての代謝活動の活性を総合的に評価することになり、酸産生という特定の活動の指標とはなりえない。そこで、酸産生活性に対する  $\text{BO}_3^{3-}$  と F の抑制効果をより具体的に解析するために、これらのイオン存在下での *S. mutans* の酸産生速度を測定した。この方法は、これまでに、streptococci や actinomyces による酸

産生に対するフッ素やキシリトールの抑制効果の検討に用いられており<sup>36, 67)</sup>、細菌の糖代謝能を直接評価できる代表的なものである。その結果、271 ppm の  $\text{BO}_3^{3-}$  の存在下では、グルコース添加 10 および 30 分後の酸産生速度が有意に低下し、また、13.5 ppm の F の存在下でも 10 分後において有意な速度低下が認められた。前述のとおり、フッ素については、酸産生抑制を検討した報告があり<sup>66, 67)</sup>、本研究の結果は、とくに、充填用の従来型ガラスアイオノマーセメントから溶出する 8.7 ppm の F によって *S. mutans* の酸産生が低下することを示した Nakajo ら<sup>66)</sup> の結果とよく一致している。なお、酸産生速度測定において F の抑制効果が  $\text{BO}_3^{3-}$  ほど明瞭でなかったのは、培養初期における活性の評価を行うために、本実験では  $1 \times 10^8$  CFU/mL という XTT アッセイの場合よりも多くの *S. mutans* を用いたためと考えられる。Kawashima ら<sup>36)</sup> は、 $7 \times 10^8$  CFU/mL の *S. mutans* を用いた場合に 36 ppm の F によって酸産生速度が低下したとしており、菌数やフッ素濃度、pH 等の条件によって酸産生の抑制の強さが変化するものと推測されるが、いずれにせよ、低濃度の  $\text{BO}_3^{3-}$  または F によって *S. mutans* の酸産生を抑制できることは明らかである。

ここで、両イオンの代謝抑制メカニズムについて考察する。まずフッ素は、細菌の糖代謝に関わるエムデン・マイヤーホフ経路 (図 13) において、2 ホスホグリセリン酸をホスホエノールピルビン酸に転化する酵素であるエノラーゼを阻害することに加え、プロトンの細胞外への輸送を担う酵素である ATP アーゼを阻害することで耐酸性を低下させるとされている<sup>68, 69)</sup>。今回の実験において、低濃度の F の存在により XTT アッセイで活性の低下がみられ、また酸産生速度の低下が生じたのは、解糖系であるエムデン・マイヤーホフ経路の働きがある程度抑制され、乳酸やギ酸の産生が低下したためと考えられる。ただし、増殖には影響が及んでいないことから、グルコースがペントース・リン酸経路

で使用されるとともに、ATP 産生効率の高いクエン酸回路が酸産生の経路以上に優先されるメカニズムが働いたのではないかと推測される。一方のホウ酸については、Francesco ら<sup>70)</sup> は、エルゴステロールの合成阻害によって抗真菌性を示すと述べているが、細菌に対する抑制メカニズムに関しては検討がなされておらず、詳細は不明である。有効濃度こそ異なるものの、 $\text{BO}_3^{3-}$ と F が XTT アッセイおよび酸産生速度の測定実験において同様の抑制挙動を示したことから考えると、 $\text{BO}_3^{3-}$ もエムデン・マイヤーホフ経路のどこかのステップを抑制した可能性がある。前述したように、ホウ酸はすでに一般に多用されている成分であるため、その抗菌メカニズムの解明は S-PRG フィラーに限らず今後の重要な課題である。

XTT アッセイで代謝抑制効果が認められた被験  $\text{BO}_3^{3-}$ 濃度のうちの 135.5 ppm は、実験 3 で確認された P4 表面からの溶出濃度にほぼ相当する。また、P4 表面からの F の溶出濃度も、XTT アッセイでの被験濃度の範囲にある。このことから、P4 表面で *S. mutans* の酸産生による pH 低下が抑制されたことには、S-PRG フィラーからの溶出イオンによる酸の緩衝だけでなく、 $\text{BO}_3^{3-}$ および F によって *S. mutans* の糖代謝抑制が生じたことも一因となっているものと考えられる。イオンによる酸の中和は瞬時に起こる反応であり、またこの反応によってイオンが消費されるため、低濃度の  $\text{BO}_3^{3-}$ や F による *S. mutans* の代謝抑制は、とくに S-PRG フィラー含有 CR 表面での持続的な pH 低下抑制に寄与するものと期待される。

本研究によって、S-PRG フィラーを含有する CR の表面においては、主に  $\text{BO}_3^{3-}$ と F の溶出によって *S. mutans* の増殖と代謝活性抑制が生じることが明らかとなった。Yoneda ら<sup>71)</sup> は、20%に希釈した S-PRG フィラー溶出液の存在によって、

1×10<sup>8</sup> CFU/mL の *S. mutans* 菌液中で培養したポリスチレン上の細菌付着量が 20%減少したと報告している。また Suzuki ら<sup>72)</sup> も、唾液中の混合細菌によるポリスチレン上でのバイオフィーム形成を 20%濃度の S-PRG フィラー溶出液が抑制したことを示している。しかし、実験 1 の結果からすれば、これらの濃度の S-PRG フィラー溶出液では、高い濃度の細菌の増殖を完全に抑制するのは困難であると考えられる。実際の口腔内においた S-PRG フィラー含有 CR の表面には、唾液タンパク由来の独特の層状構造物が形成されることが報告されており<sup>73,74)</sup>、これは S-PRG フィラーから溶出するイオンと唾液タンパクとが反応した結果生じたものであると推測されている<sup>74)</sup>。こういった CR 表面におけるペリクル様構造の修飾が口腔細菌の付着やバイオフィームの成長抑制をもたらしている可能性もあり、S-PRG フィラー含有 CR のプラーク付着抑制効果については、溶出イオンの抗菌作用以外の面からも詳細に検討すべきであろう。

その一方で、Yoneda らは、S-PRG フィラーの溶出液が *Porphyromonas gingivalis* のプロテアーゼを阻害することや、*P. gingivalis* と *Fusobacterium nucleatum* との共凝集活性を抑制することを見出している<sup>71)</sup>。したがって、S-PRG フィラーからのイオン溶出は、歯肉縁上プラークだけでなく、歯肉縁下プラークの形成抑制にも有効である可能性がある。S-PRG フィラーからのイオン溶出挙動は環境 pH によって変化することも報告されており<sup>18)</sup>、S-PRG フィラーからのイオン溶出によってもたらされる抗菌効果の臨床的有効性については、更なる検討が必要である。

## VIII. 結論

---

本研究では、**S-PRG** フィラー含有 **CR** の *S. mutans* に対する抗菌性を、溶出するイオン種との関係も含めて詳細に解析した。その結果、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。



## IX. 謝辞

---

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、御指導と御高配を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔機能再建学講座の今里 聡教授に、深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり多大な御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 恵比須繁之教授（現大阪大学理事・副学長）、大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 林 美加子教授、東北大学大学院歯学研究科 口腔生物学講座口腔生化学分野 高橋信博教授ならびに真柳 弦博士に心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、本研究を行うに際し、多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座ならびに東北大学大学院歯学研究科 口腔生物学講座口腔生化学分野の皆様、厚くお礼申しあげます。

## X. 参考文献

---

- 1) Kugel G. Direct and indirect adhesive restorative materials: a review. *Am J Dent.* 2000; 13: 35-45.
- 2) Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dent Mater.* 2011; 27: 29-38.
- 3) Hahn R, Weiger R, Netuschil L, Bruch M. Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. *Dent Mater.* 1993; 9: 312-16.
- 4) Ausschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 48-53.
- 5) Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RR. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res.* 1994; 73: 1437-43.
- 6) Ebi N, Imazato S, Noiri Y, Ebisu S. Inhibitory effects of resin composite containing bactericide-immobilized filler on plaque accumulation. *Dent Mater.* 2001; 17: 485-91.
- 7) Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater.* 2003; 19: 449-57.
- 8) Beyth N, Houry-Haddad Y, Baraness-Hadar L, Yudovin-Farber I, Domb AJ, Weiss EI. Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles. *Biomaterials.* 2008; 29: 4157-63.
- 9) Leung D, Spratt DA, Pratten J, Gulabivala K, Mordan NJ, Young AM. Chlorhexidine-releasing methacrylate dental composite materials. *Biomaterials.* 2005; 26: 7145-53.
- 10) Mehdawi I, Neel EA, Valappil SP, Palmer G, Salih V, Pratten J, Spratt DA, Young AM. Development of remineralizing, antibacterial dental materials. *Acta Biomater.* 2009; 5: 2525-39.

- 11) Kawashita M, Tsuneyama S, Miyaji F, Kokubo T, Kozuka H, Yamamoto K. Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method. *Biomaterials*. 2000; 21: 393-8.
- 12) Han L, Edward CV, Li M, Niwano K, Neamat AB, Okamoto A, Honda N, Iwaku M. Effect of fluoride mouth rinse on fluoride releasing and recharging from aesthetic dental materials. *Dent Mater J*. 2002; 21: 285-95.
- 13) Ito S, Iijima M, Hashimoto M, Tsukamoto N, Mizoguchi I, Saito T. Effects of surface pre-reacted glass-ionomer fillers on mineral induction by phosphoprotein. *J Dent*. 2011; 39: 72-9.
- 14) Itota T, Carrick TE, Yoshiyama M, McCabe JF. Fluoride release and recharge in giomer, compomer and resin composite. *Dent Mater*. 2004; 20: 789-95.
- 15) Itota T, Al-Naimi OT, Carrick TE, Yoshiyama M, McCabe JF. Fluoride release from aged resin composites containing fluoridated glass filler. *Dent Mater*. 2005; 21: 1033-8.
- 16) Kamijo K, Mukai Y, Tominaga T, Iwaya I, Fujino F, Hirata Y, Teranaka T. Fluoride release and recharge characteristics of denture base resins containing surface pre-reacted glass-ionomer filler. *Dent Mater J*. 2009; 28: 227-33.
- 17) Shimazu K, Ogata K, Karibe H. Evaluation of the ion-releasing and recharging abilities of a resin-based fissure sealant containing S-PRG filler. *Dent Mater J*. 2011; 30: 923-7.
- 18) Fujimoto Y, Iwasa M, Murayama R, Miyazaki M, Nagafuji A, Nakatsuka T. Detection of ions released from S-PRG fillers and their modulation effect. *Dent Mater J*. 2010; 29: 392-7.
- 19) Kaga M, Kakuda S, Ida Y, Toshima H, Hashimoto M, Endo K, Sano H. Inhibition of enamel demineralization by buffering effect of S-PRG filler-containing dental sealant. *Dent Mater J*. 2014; 122: 78-3.
- 20) Tomiyama K, Mukai Y, Teranaka T. Acid resistance induced by a new orthodontic bonding system in vitro. *Dent Mater J*. 2008; 27: 590-7.

- 21) Mukai Y, Kamijo K, Fujino F, Hirata Y, Teranaka T, ten Cate JM. Effect of denture base-resin with prereacted glass-ionomer filler on dentin demineralization. *Eur J Oral Sci.* 2009; 117: 750-4.
- 22) Ma S, Imazato S, Chen JH, Mayanagi G, Takahashi N, Ishimoto T, Nakano T. Effects of a coating resin containing S-PRG filler to prevent demineralization of root surfaces. *Dent Mater J.* 2012; 31: 1-7.
- 23) Kawasaki K, Kambara M. Effects of ion-releasing tooth-coating material on demineralization of bovine tooth enamel. *Int J Dent.* 2014; 463149.
- 24) 宮内貴弘. バイオアクティブ修復材料によるう蝕象牙質の石灰化. *日歯保存誌.* 2009; 52: 469-82.
- 25) Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther.* 2001; 18: 205-15.
- 26) Kaur IP, Lal S, Rana C, Kakkar S, Singh H. Ocular preservatives: associated risks and newer options. *Cutan Ocul Toxicol.* 2009; 28: 93-103.
- 27) Yilmaz M. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turk Med Scis.* 2012; 142: 1423-9.
- 28) Maltz M, Emilson CG. Susceptibility of oral bacteria to various fluoride salts. *J Dent Res.* 1982; 61: 786-90.
- 29) Saku S, Kotake H, Scougall-Vilchis RJ, Ohashi S, Hotta M, Horiuchi S, Hamada K, Asaoka K, Tanaka E, Yamamoto K. Antibacterial activity of composite resin with glass-ionomer filler particles. *Dent Mater J.* 2010; 29: 193-8.
- 30) Hotta M, Morikawa T, Tamura D, Kusakabe S. Adherence of *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus mutans* to saliva-coated S-PRG resin blocks. *Dent Mater J.* 2014; 33: 216-67.

- 31) Hahnel S, Wastl DS, Schneider-Feyrer S, Giessibl FJ, Brambilla E, Cazzaniga G, Ionescu A. *Streptococcus mutans* biofilm formation and release of fluoride from experimental resin-based composites depending on surface treatment and S-PRG filler particle fraction. *J Adhes Dent*. 2014; 16: 313-21.
- 32) 田本晃生, 作 誠太郎, 山本宏治. 改良型 S-PRG フィラー配合低粘度コンポジットレジン of 抗プラーク性と窩壁適合性に関する研究. *日歯保存誌*. 2006; 49: 658-68.
- 33) 吉田幸司, 作 誠太郎, 大橋静江, 山本宏治. 新規フッ化物徐放性接着システムの抗プラーク性. *日歯保存誌*. 2008; 51: 493-501.
- 34) Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater*. 2006; 22: 527-32.
- 35) Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Nakajo K, Domon-Tawaraya H, Takahashi N. Evaluation of pH at the bacteria-dental cement interface. *J Dent Res*. 2011; 90: 1446-50.
- 36) Kawashima J, Nakajo K, Washio J, Mayanagi G, Shimauchi H, Takahashi N. Fluoride-sensitivity of growth and acid production of oral *Actinomyces*: comparison with oral *Streptococcus*. *Microbiol Immunol*. 2013; 57: 797-804.
- 37) 伊藤範明, 森川貴史, 小竹宏明, 堀田正人. S-PRG フィラーの HeLa 細胞に対する細胞毒性. *日歯保存誌*. 2011; 54: 26-32.
- 38) 長谷川晴彦, 飯塚純子, 椎谷 亨, 富山 潔, 倉持江里香, 寺中敏夫, 向井義晴. エナメル質裂溝に填塞した S-PRG フィラー含有シーラント材の脱灰抑制効果. *日歯保存誌*. 2013; 56: 370-6.
- 39) 村田雄基, 小竹宏明, 亀水秀男, 堀田正人. S-PRG フィラー含有ボンディング材の機械的性質と接着強さ. *日歯保存誌*. 2012; 55: 86-96.
- 40) 韓 臨麟, 竹中彰治, 興地隆史. 試作 S-PRG フィラー含有根管充填用シーラーに関する研究. *日歯保存誌*. 2007; 50: 713-20.
- 41) 坪田康德, 向井義晴, 花岡孝治. S-PRG 微粉末の象牙質知覚過敏治療剤としての応用. *日歯保存誌*. 2006; 49: 563-73.

- 42) 澤 悦夫, 向井義晴, 富山 潔, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 寺中敏夫. S-PRG 微粉末とポリアクリル酸を応用した新規象牙質知覚過敏治療法の開発. 日歯保存誌. 2013; 56: 17-24.
- 43) Iijima M, Ito S, Nakagaki S, Kohda N, Muguruma T, Saito T, Mizoguchi I. Effects of immersion in solution of an experimental toothpaste containing S-PRG filler on like-remineralizing ability of etched enamel. *Dent Mater J*. 2014; 33: 430-6.
- 44) 田村大輔, 作 誠太郎, 山本宏治, 堀田正人. S-PRG フィラー含有コンポジットレジエンに吸着する唾液タンパク. 日歯保存誌. 2010; 53: 191-206.
- 45) Horiuchi M, Washio J, Mayanagi H, Takahashi N. Transient acid-impairment of growth ability of oral Streptococcus, Actinomyces, and Lactobacillus: a possible ecological determinant in dental plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24: 319-24.
- 46) Nakajo K, Takahashi N, Beighton D. Resistance to acidic environments of caries-associated bacteria: *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium longum*. *Caries Res*. 2010; 44: 431-7.
- 47) Meers PD, Chow CK. Bacteriostatic and bactericidal actions of boric acid against bacteria and fungi commonly found in urine. *J Clin Pathol*. 1990; 43: 484-7.
- 48) Qin G, Zong Y, Chen Q, Hua D, Tian S. Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. *Int J Food Microbiol*. 2010; 138: 145-50.
- 49) Iavazzo C, Gkegkes ID, Zarkada IM, Falagas ME. Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: the clinical evidence. *J Womens Health* . 2011; 20: 1245-55.
- 50) Luan Q, Desta T, Chehab L, Sanders VJ, Plattner J, Graves DT. Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial. *J Dent Res*. 2008; 87: 148-52.
- 51) Baker SJ, Ding CZ, Akama T, Zhang YK, Hernandez V, Xia Y. Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Future Med Chem*. 2009; 1: 1275-88.

- 52) Sağlam M, Arslan U, Buket Bozkurt Ş, Hakki SS. Boric acid irrigation as an adjunct to mechanical periodontal therapy in patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2013; 84: 1297-308.
- 53) Clark MB, Slayton RL. Fluoride use in caries prevention in the primary care setting. *Pediatrics*. 2014; 136: 626-33.
- 54) Lee SY, Dong DR, Huang HM, Shih YH. Fluoride ion diffusion from a glass-ionomer cement. *J Oral Rehabil*. 2000; 27: 576-86.
- 55) Heijnsbroek M, Paraskevas S, Van der Weijden GA. Fluoride interventions for root caries: a review. *Oral Health Prev Dent*. 2007; 5: 145-52.
- 56) Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials-fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater*. 2007; 23: 343-62.
- 57) Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1999; 27: 31-40.
- 58) Rošin-Grget K, Peroš K, Sutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Med Acad*. 2013; 42: 179-88.
- 59) Qian W, Zhang J, Xiao X. Research on inhibition of sodium fluoride on five subgingival bacteria in vitro. *West China journal of stomatology*. 1998; 16: 105-7.
- 60) 佐藤嘉洋. 金属材料の抗菌性. 高温学会誌. 2009; 35: 121-5.
- 61) 生貝 初, 兼松秀行, 黒田大介. 金属材料による細菌の増殖抑制. 軽金属. 2011; 61: 160-6.
- 62) Dong Z, Yang H, Wu D, Ni J, Kim H, Tong M. Influence of silicate on the transport of bacteria in quartz sand and iron mineral-coated sand. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014; 123: 995-1002.

- 63) Cars O, Odenholt-Tornqvist I. The post-antibiotic sub-MIC effect in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother.* 1993; 31: 159-66.
- 64) Odenholt I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents.* 2001; 17: 1-8.
- 65) Izutani N, Imazato S, Nakajo K, Takahashi N, Takahashi Y, Ebisu S, Russell RR. Effects of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) on bacterial viability and metabolism. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119:175-81.
- 66) Nakajo K, Imazato S, Takahashi S, Kiba W, Ebisu S, Takahashi N. Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. *Dent Mater.* 2009; 25: 703-8.
- 67) Kakuta H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N. Xylitol inhibition of acid production and growth of mutans Streptococci in the presence of various dietary sugars under strictly anaerobic conditions. *Caries Res.* 2003; 37: 404-9.
- 68) Loveren , Hoogenkamp MA, Deng DM, ten Cate JM. Effects of different kinds of fluorides on enolase and ATPase activity of a fluoride-sensitive and fluoride-resistant *Streptococcus mutans* strain. *Caries Res.* 2008; 42: 429-34.
- 69) Takahashi N, Washio J. Metabolomic effects of xylitol and fluoride on plaque biofilm in vivo. *J Dent Res.* 2011; 90: 1463-8.
- 70) De Seta, Schmidt M, Vu B, Essmann M, Larsen B. Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida vaginitis*. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 325-36.
- 71) Yoneda M, Suzuki N, Masuo Y, Fujimoto A, Iha K, Yamada K, Iwamoto T, Hirofuji T. Effect of S-PRG eluate on biofilm formation and enzyme activity of oral bacteria. *Int J Dent.* 2012; 814913.
- 72) Suzuki N, Yoneda M, Haruna K, Masuo Y, Nishihara T, Nakanishi K, Yamada K, Fujimoto A, Hirofuji T. Effects of S-PRG eluate on oral biofilm and oral malodor. *Arch Oral Biol.* 2014; 59: 407-13.



- 73) 本多忠之, 作 誠太郎, 山本宏治. S-PRG フィラー配合レジン界面に形成されるフィルム様構造物. 日歯保存誌. 2004; 47: 391-402.
- 74) 廣瀬雅之, 作 誠太郎, 山本宏治. S-PRG レジン表面に形成されるフィルム様構造物の分析. 日歯保存誌. 2006; 49: 309-19.

## XI. 図表

表 1 S-PRG フィラー溶出液存在下で 24 時間培養後の細菌増殖の有無

溶出液の希釈度 菌液濃度 (CFU/mL)	25%	12.5%	6.25%	0%
$1 \times 10^5$	+	+	+	+
$1 \times 10^4$	-	+	+	+
$1 \times 10^3$	-	+	+	+

＋：増殖を認める

－：増殖を認めない

表2 実験用CRの組成

	S-PRGフィラー/シリカフィラー (vol)%	フィラー配合率		CR中でのS-PRGフィラー含有量	
		(vol)%	(wt)%	(vol)%	(wt)%
P0	0/100	55.9	75.1	0	0
P1	25/75	55.9	76.1	13.9	22.3
P2	50/50	55.9	77.1	27.9	42.7
P3	75/25	55.9	77.9	41.8	61.4
P4	100/0	55.9	78.7	55.9	78.7

表 3 各イオン標準液の組成と pH

	$\text{BO}_3^{3-}$	$\text{F}^-$	$\text{Na}^+$	$\text{Al}^{3+}$	$\text{SiO}_3^{2-}$	$\text{Sr}^{2+}$
組成	$\text{H}_3\text{BO}_3$	$\text{NaF}$	$\text{NaNO}_3$	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$
pH	6.13	7.32	5.57	NaOH 添加により 5.14	$\text{HNO}_3$ 添加により 6.07	5.50
濃度 (ppm)	1000	1000	1000	100	1000	1000

表 4 P4 からの溶出濃度に基づく各イオンの被験濃度 (ppm)

$\text{BO}_3^{3-}$	F <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	$\text{SiO}_3^{2-}$	Si <sup>2+</sup>
131.0	8.5	37.5	6.8	9.7	52.5

表 5 各 CR からの溶出濃度に基づく  $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$  の被験濃度 (ppm)

	P1	P2	P3	P4
$\text{BO}_3^{3-}$	26.1	52.2	88.3	131.0
$\text{F}^-$	4.6	7.9	8.6	8.6
$\text{Al}^{3+}$	4.9	6.0	6.0	6.8
$\text{SiO}_3^{2-}$	5.7	7.8	8.4	9.7

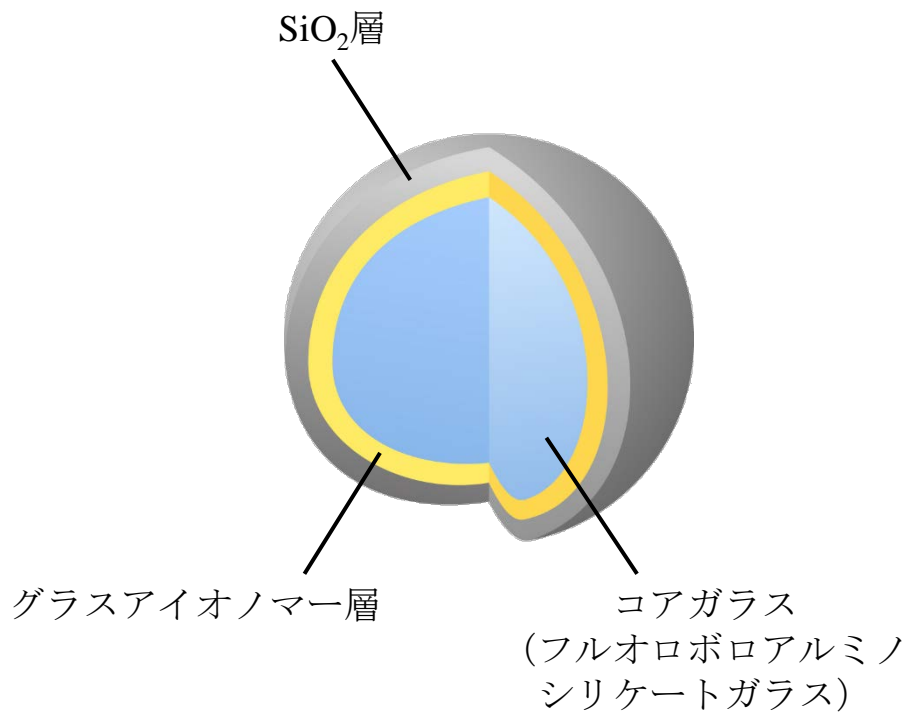
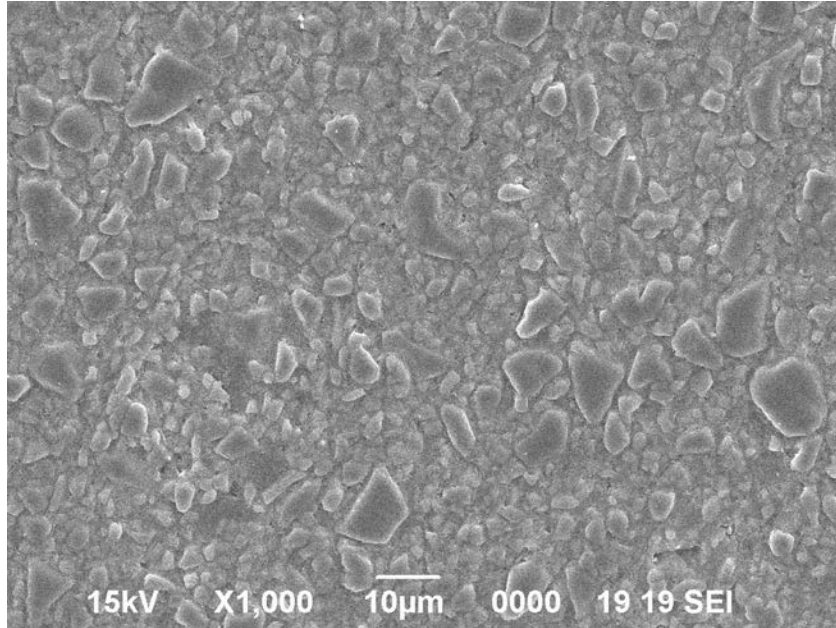


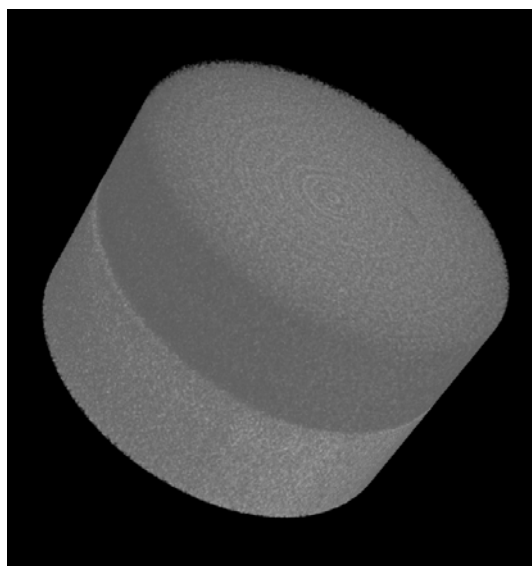
図1 S-PRGフィラーの構造



**図2 S-PRGフィラー含有CR (P4) 表面の走査型電子顕微鏡像**

アルミナ粒子 (5 µm) を用いて流水下で硬化試料を研磨した後、走査型電子顕微鏡 (JSM-6390LV, JEOL, 日本電子) にて観察した。



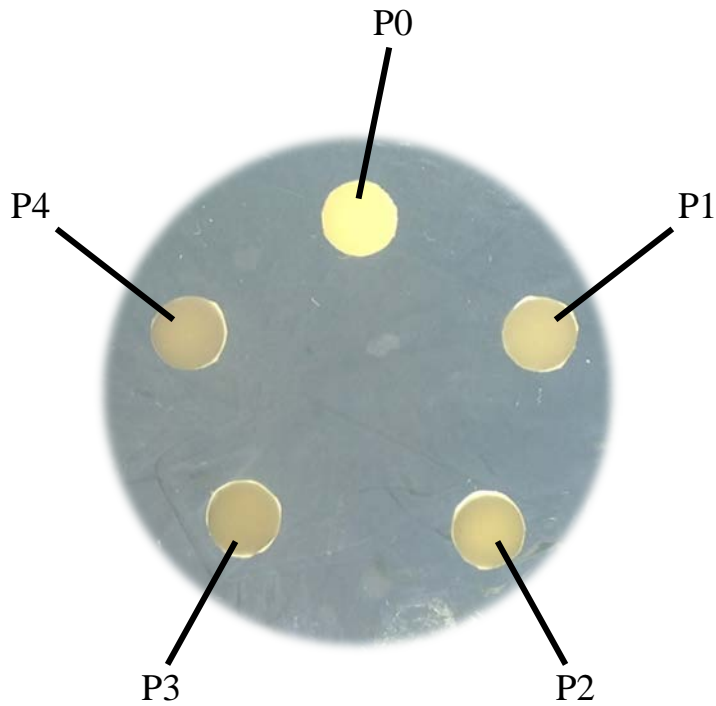


**図3 S-PRGフィルター含有CRのマイクロCT像**

上：P3，下：P4

撮影条件：SMX-100CT-SV3, 島津

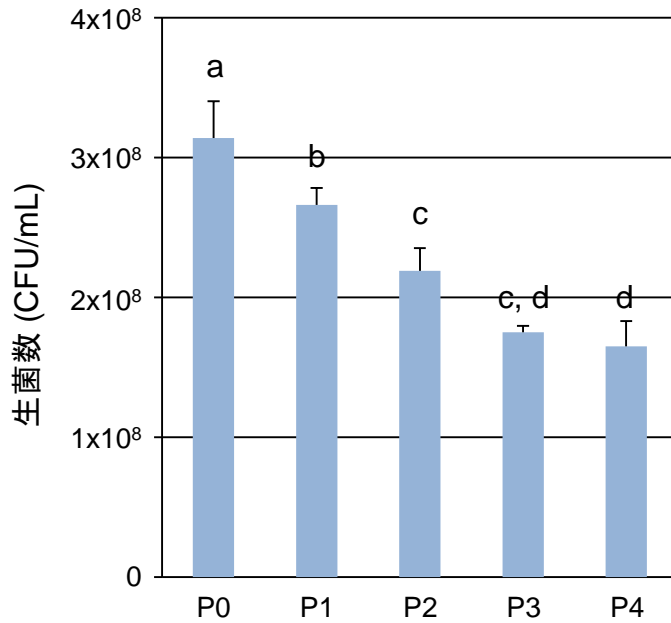
管電圧90 kV, 管電流29  $\mu$ A



#### 図4 P0～P4による阻止斑形成試験の結果

$1 \times 10^8$  CFU/mLに調整した*S. mutans*菌液300  $\mu$ LをBHI寒天平板培地上に塗抹し、各硬化CR試料を置いて37°C下で48時間嫌気培養後、阻止斑形成の有無を判定した。

いずれの試料周囲にも増殖阻止帯の形成は認められない。



**図5 硬化試料上で18時間培養後の生菌数**

硬化CR試料上に $3 \times 10^3$  CFU/mLに調整した*S. mutans*菌液50  $\mu$ Lを播種し、相対湿度100%、37°C下で嫌気培養した。18時間後、菌液を回収、希釈してBHI寒天平板培地に塗抹し、37°C下で48時間嫌気培養後、コロニー数を測定した。

縦線は標準偏差を示す (n = 3)。

a, b, c, d: 異なる文字間で有意差を認める (ANOVA, Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

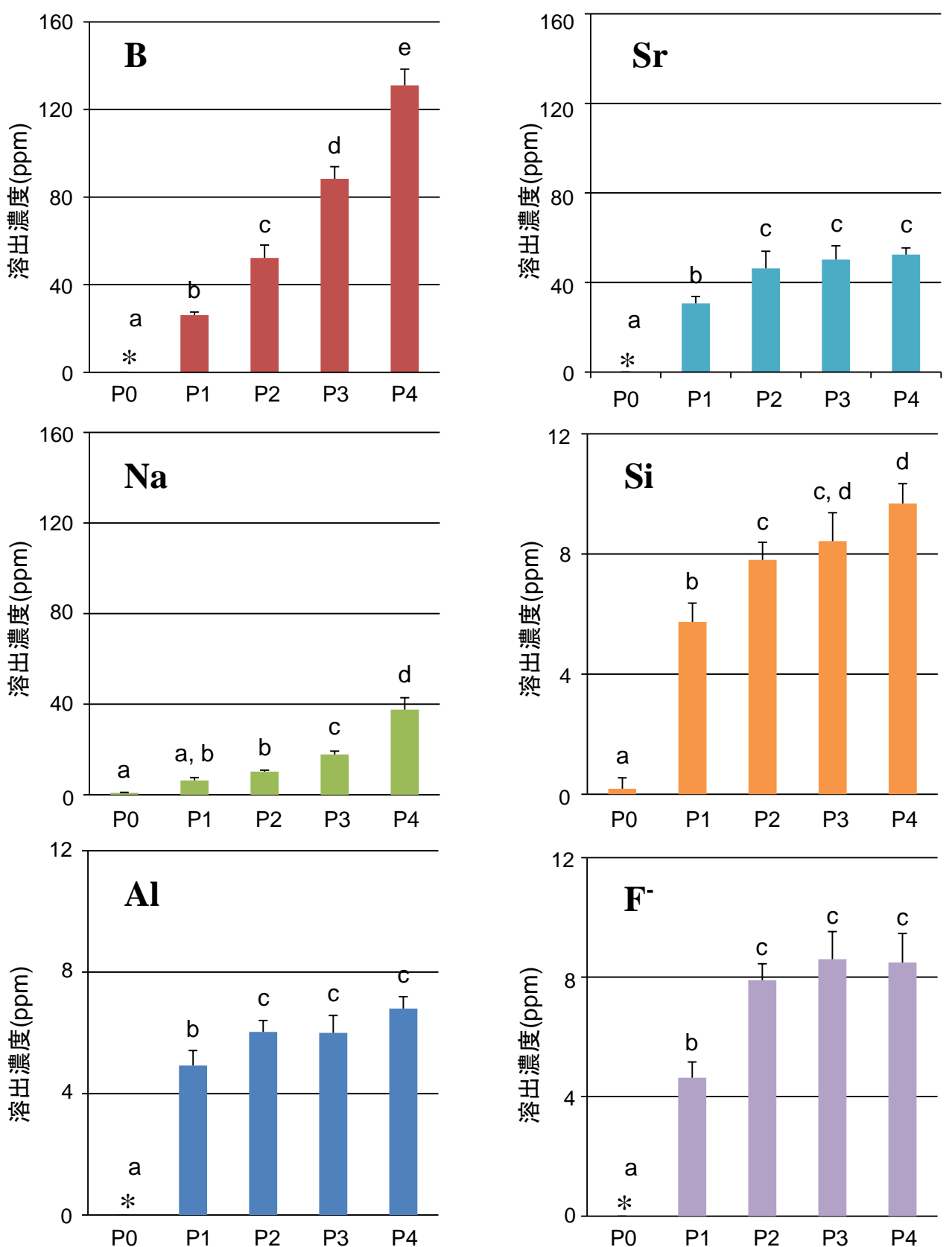


図6 各CRからの各イオン溶出濃度

硬化試料上に蒸留水50  $\mu$ Lを置き、相対湿度100%、37°C下で18時間保管後、試料5個分の溶出液を9.75 mLの蒸留水中に回収し、各イオンの溶出濃度を計測した。  $\text{BO}_3^{3-}$ 、  $\text{Sr}^{2+}$ 、  $\text{Na}^+$ 、  $\text{SiO}_3^{2-}$ 、  $\text{Al}^{3+}$ については、ICP発光分光分析によりB、Sr、Na、Si、Alの濃度測定を行い、 $\text{F}^-$ についてはフッ素イオン電極を用いて濃度を測定した。

\*検出限界以下。縦線は標準偏差を示す (n = 3)。

a, b, c, d, e: 異なる文字間で有意差を認める (ANOVA, Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

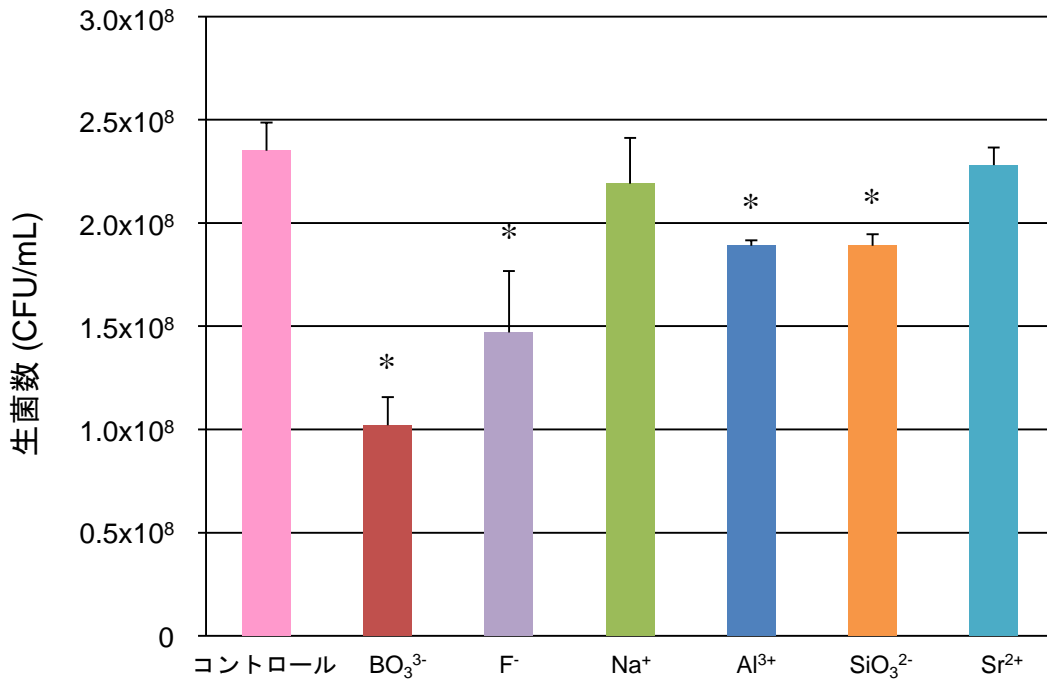


図7 P4からの溶出濃度の各イオン存在下で18時間培養後の生菌数

P4からの溶出濃度が最終濃度となるようにPBSで希釈したイオン溶液を、BHI培地細菌懸濁液に添加、最終濃度 $3 \times 10^3$  CFU/mLの*S. mutans*を37°C下で嫌気培養した。18時間後、希釈した菌液をBHI寒天平板培地に塗抹し、37°C下で48時間嫌気培養を行ってコロニー数を測定した。

被験濃度；BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>: 131.0 ppm, F<sup>-</sup>: 8.5 ppm, Na<sup>+</sup>: 37.5 ppm, Al<sup>3+</sup>: 6.8 ppm, SiO<sub>3</sub><sup>2-</sup>: 9.7 ppm, Sr<sup>2+</sup>: 52.5 ppm

縦線は標準偏差を示す (n = 3)。

\*: コントロールとの間に有意差を認める (ANOVA, Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

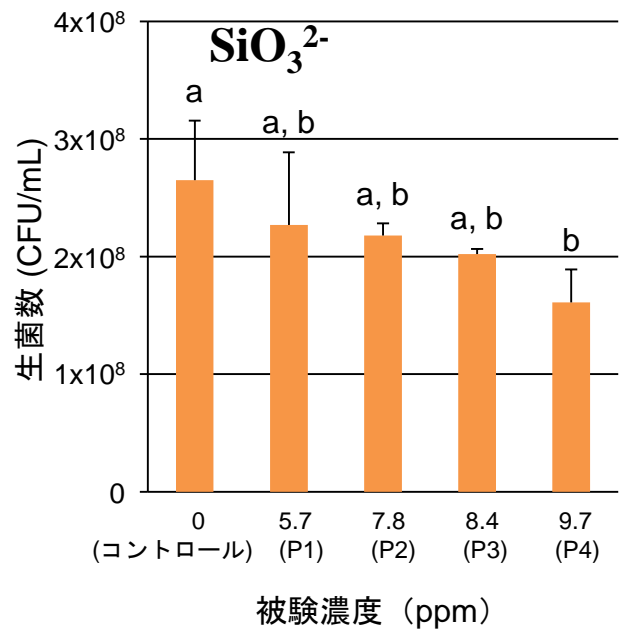
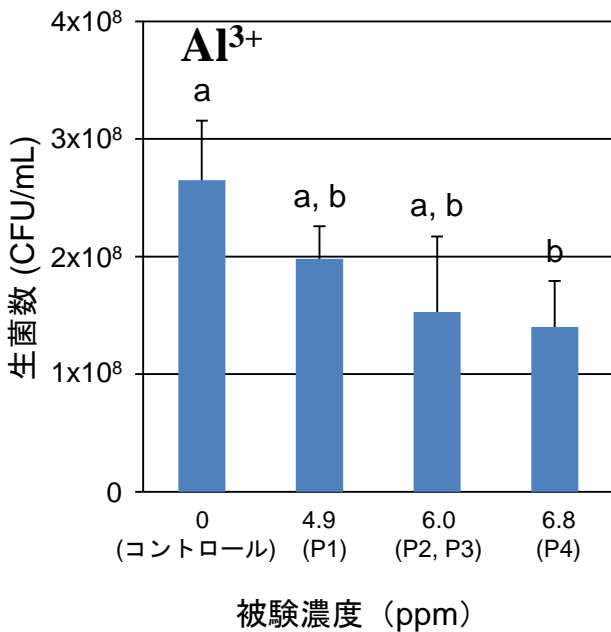
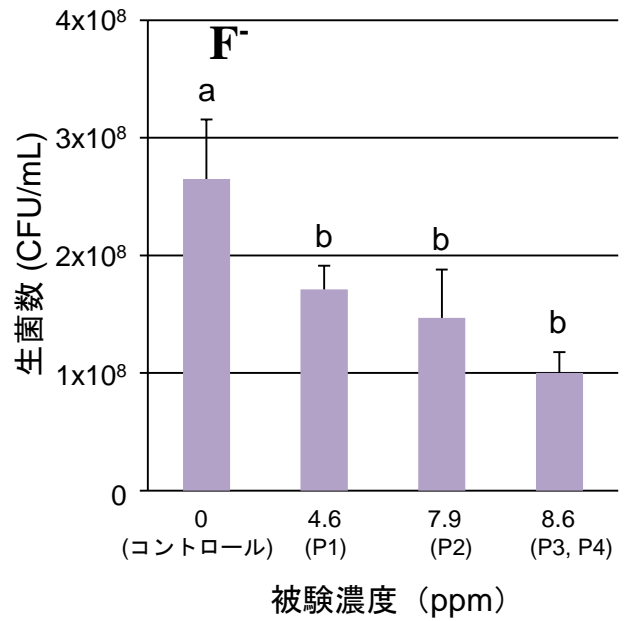
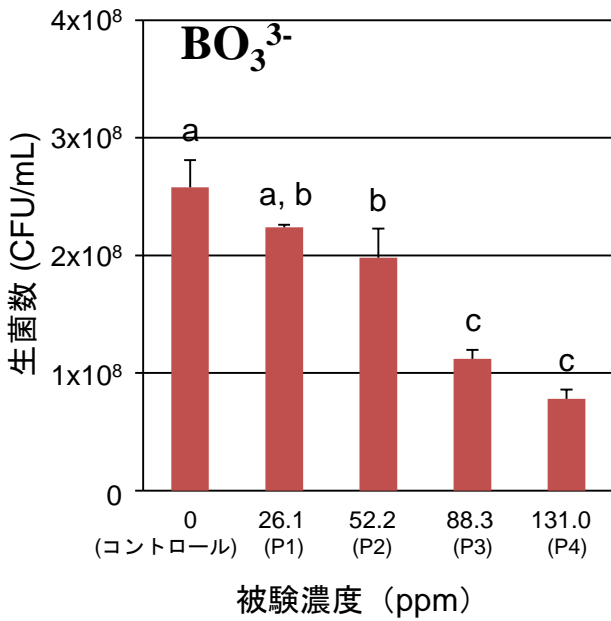


図8  $\text{BO}_3^{3-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_3^{2-}$ 存在下で18時間培養後の生菌数

P1~P4からの溶出濃度が最終濃度となるようにPBSで希釈した $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ のイオン溶液を、BHI培地細菌懸濁液に添加し、最終濃度 $3 \times 10^3$  CFU/mLの*S. mutans*を37°C下で嫌気培養した。18時間後、希釈した菌液をBHI寒天平板培地に塗抹し、37°C下で48時間嫌気培養を行ってコロニー数を測定した。

縦線は標準偏差を示す (n = 3)。

a, b, c, d, e: 異なる文字間で有意差を認める (ANOVA, Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

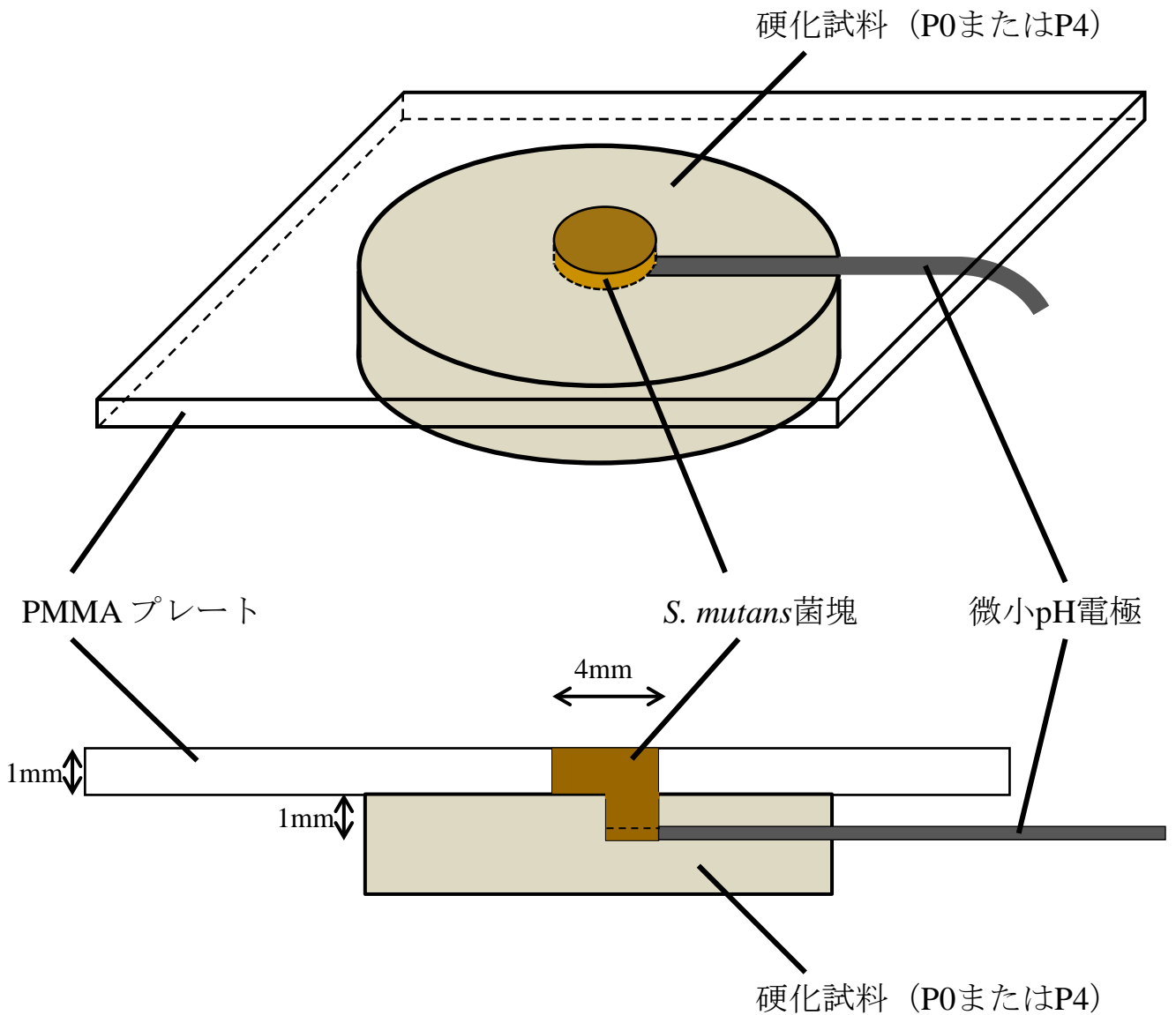


図9 硬化試料上の*S. mutans*のグルコース代謝によるpH変動測定試験

硬化CR試料表面に、試料端から中心に至る幅1 mm、深さ1 mmの溝を形成し、微小pH電極 (Ion-sensitive field-effect transistor pH electrode, 日本光電工業) を固定した。直径4 mmの穴のあいた厚さ1 mmのPMMAプレートを、pH電極の先端に穴が位置するように設置し、 $1.6 \times 10^9$  CFUの*S. mutans*を含む菌塊をpH電極に接触するように填塞した。菌塊に0.5%グルコースを滴下し、37°C下でのpH値の変動を記録した。

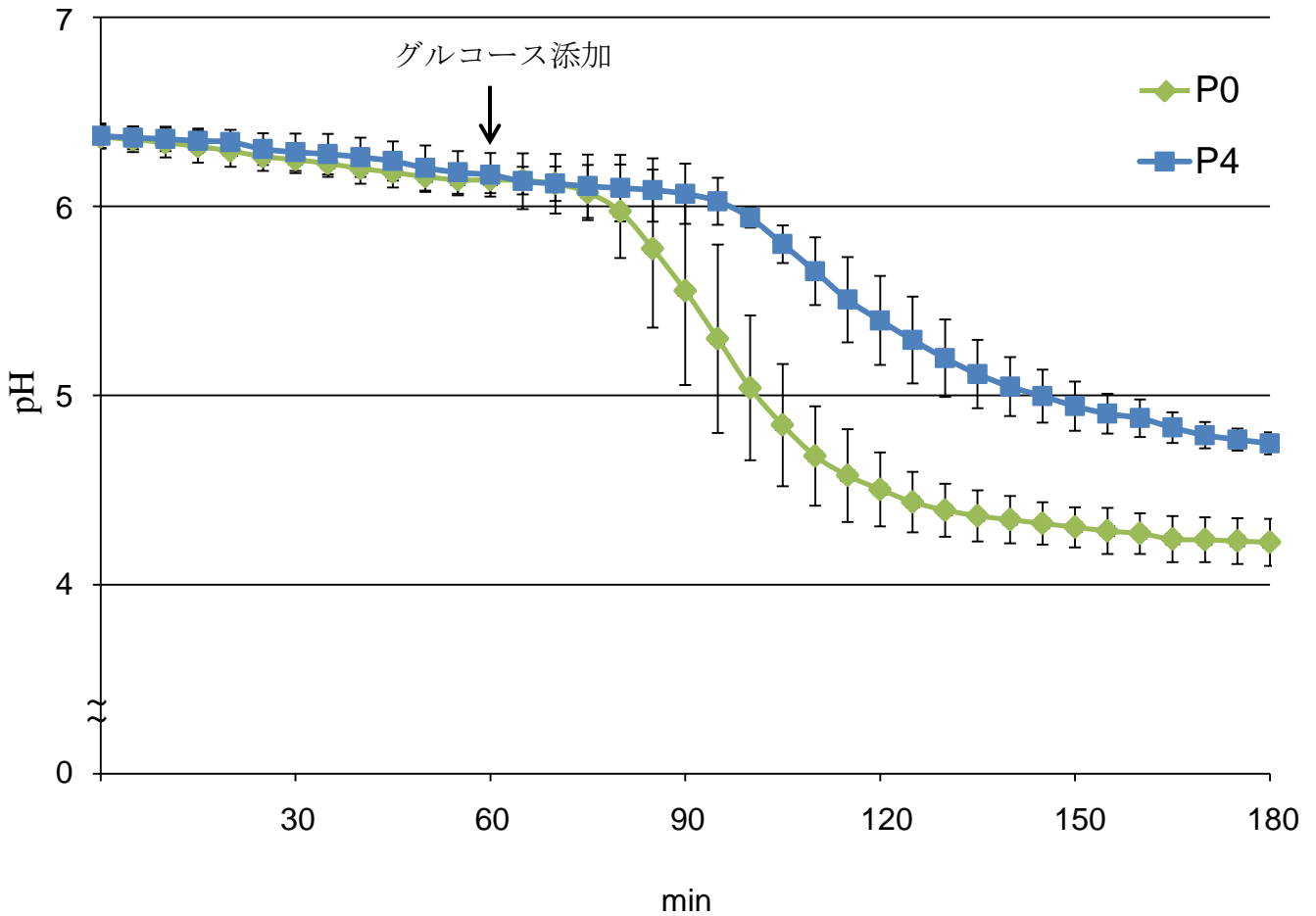
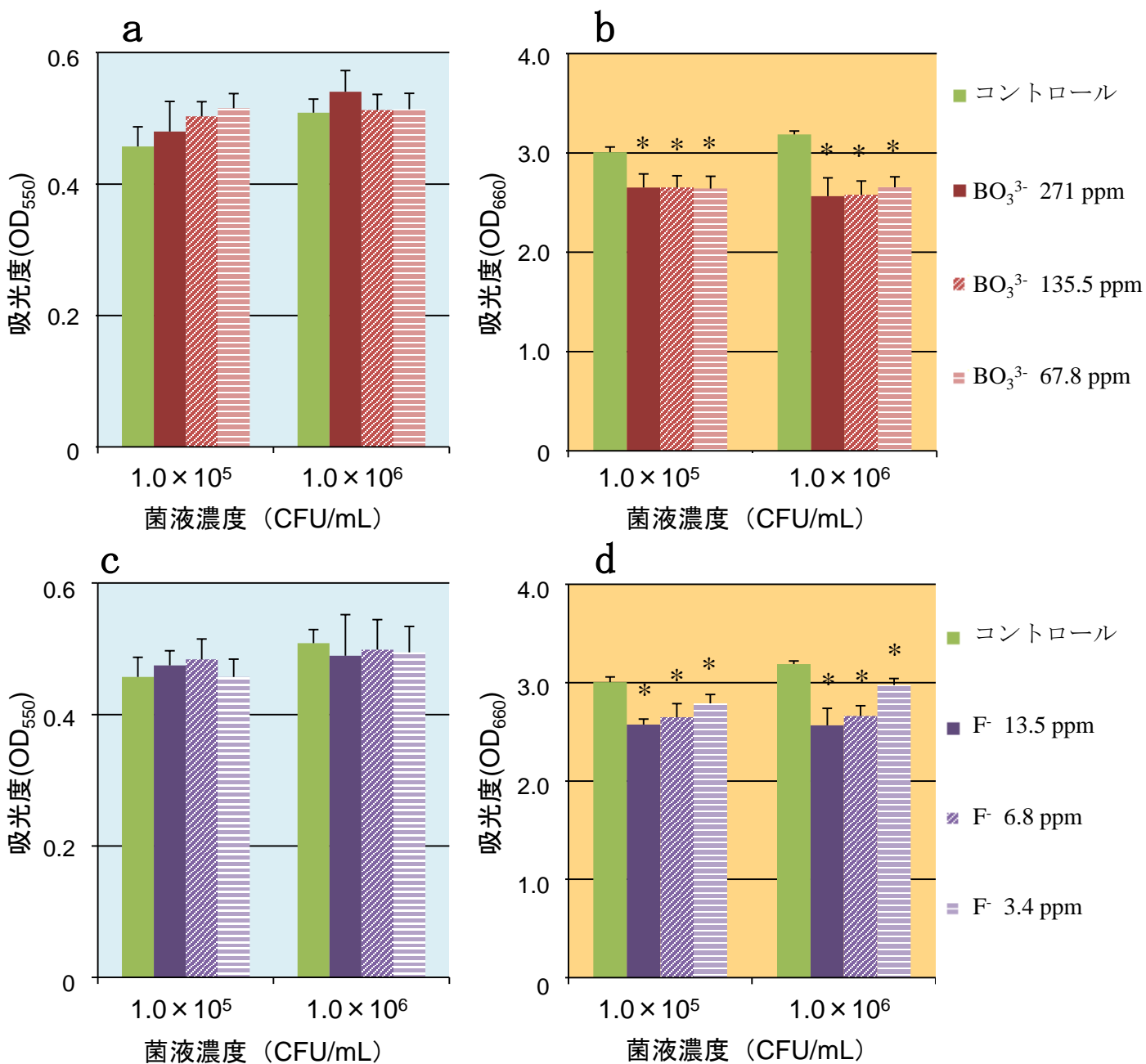


図10 硬化CR試料表面でのpH変動

P0またはP4上で、 $1.6 \times 10^9$  CFUの*S. mutans*を含む菌塊にPPB 100  $\mu$ Lを滴下して37°Cにて60分間静置した後、0.5%グルコース500  $\mu$ Lを滴下し、37°C下でのpH値を5分ごとに120分後まで記録した。

縦線は標準偏差を示す (n = 3)。





**図11 BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>, F<sup>-</sup>存在下で培養後の菌液の吸光度およびXTTアッセイの結果**

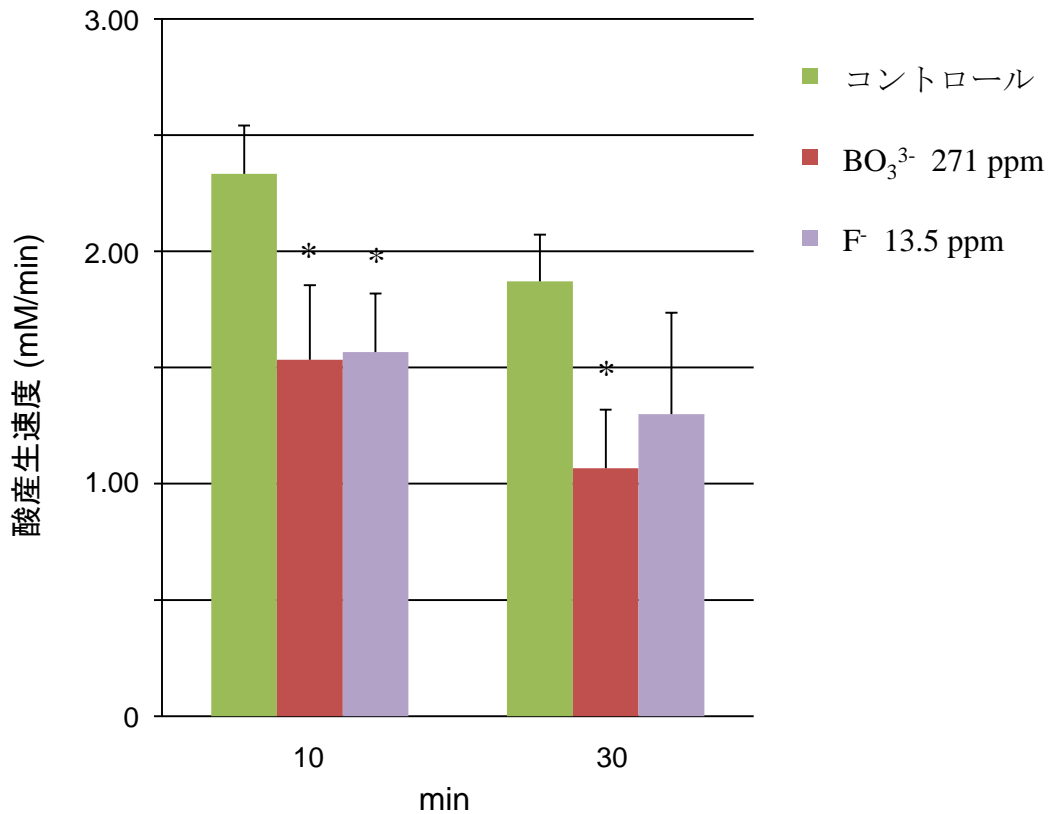
BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>標準液を542、271または135.5 ppmに、F<sup>-</sup>標準液を27、13.5または6.8 ppmに希釈した溶液50 μLに、2 × 10<sup>6</sup>または2 × 10<sup>5</sup> CFU/mLに調整した*S. mutans*菌液50 μLを加え、37°C下で16時間嫌気培養後、XTT試薬50 μLを添加し、さらに37°C下で2時間培養した後、波長450 nmでの吸光度を測定した。また、同様の条件で18時間培養後にOD<sub>550</sub>の値を測定し、増殖抑制の有無を確認した。

**a:** BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>存在下で培養後の吸光度, **b:** BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>存在下でのXTTアッセイの結果

**c:** F<sup>-</sup>存在下での培養後の吸光度, **d:** F<sup>-</sup>存在下でのXTTアッセイの結果

縦線は標準偏差を示す (n = 3)。

\*: コントロールとの間に有意差を認める (ANOVA, Tukey-Kramer test, p < 0.05)。



### 図12 BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>, F<sup>-</sup>存在下での酸産生速度

813 ppmのBO<sub>3</sub><sup>3-</sup>イオン液、または40.5 ppmのF<sup>-</sup>液1 mLに1.5 × 10<sup>8</sup> CFU/mLの*S. mutans*菌液2 mLを加え、37°C下で4分間静置した。その後、0.5%グルコース100 μLを滴下し、pHスタットを用いて50 mMの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た。得られた酸産生量曲線の傾きから、グルコース滴下10分後および30分後の酸産生速度を算出した。

縦線は標準偏差を示す (n = 3)。

\*:コントロールとの間に有意差を認める (ANOVA, Tukey-Kramer test,  $p < 0.05$ )。

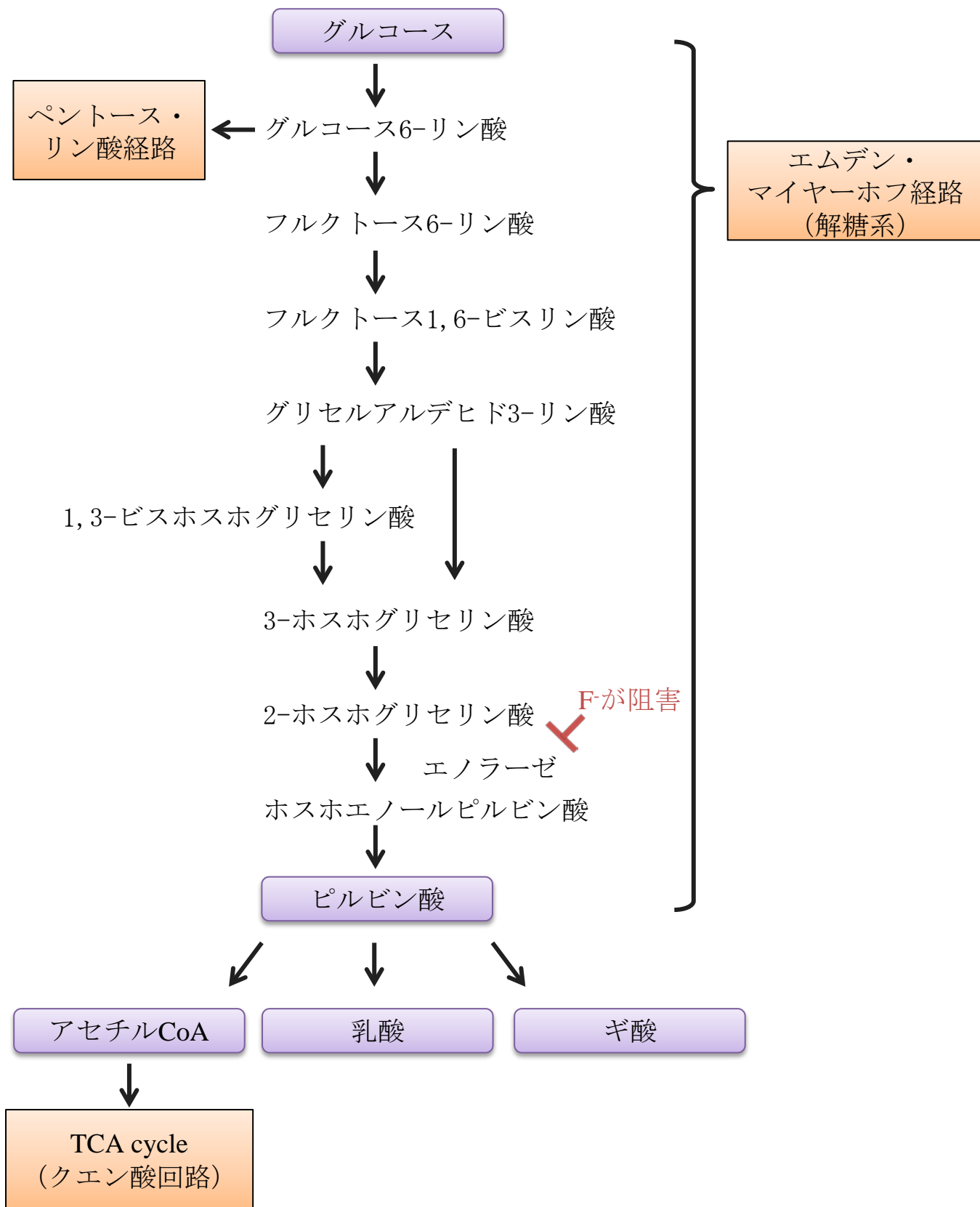


図13 *S. mutans*におけるグルコース代謝経路  
(Takahashi N. *et al.* 2011より一部改変)

