



Title	セルフケア予防材料へのS-PRGフィラー応用による Streptococcus mutansのう蝕原性抑制効果の検討
Author(s)	北村, 崇洋
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87966
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

セルフケア予防材料への S-PRG フィラー応用による
Streptococcus mutans のう蝕原性抑制効果の検討

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻
口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室

北 村 崇 洋

はじめに

う蝕は多くの先進国において減少傾向にあるものの、今なお世界で最も多い感染症の1つである (Peres ら, 2019)。う蝕の進行は、生活の質を低下させるだけでなく、治療を受けることで患者は大きな経済的負担を強いられることもある (Peres ら, 2019)。う蝕治療で使用する歯科材料は、物性や抗菌性の面で著しい発展を遂げているものの、健全歯に勝る歯科材料は今なお存在せず、予防的なアプローチが近年になって特に重要視されている (Lee ら, 2013)。う蝕の予防法としては、歯ブラシや歯磨き用ペーストなどを用いたセルフケアによって、う蝕原性細菌を含むバイオフィルムを歯面から除去することが最も有効な手段の1つである (Jepsen ら, 2017)。そのため、う蝕予防において、より効果的なセルフケア予防材料の新規開発が望まれている (Matayoshi ら, 2021)。

Streptococcus mutans はグラム陽性通性嫌気性のレンサ球菌であり、う蝕の主要な病原細菌の1つとして知られている (Hamada と Slade, 1980)。*S. mutans* はスクロース存在下において、グルカンと呼ばれる粘着性かつ不溶性の重合体を合成することにより、歯面に付着して強固なバイオフィルムを形成する (Ooshima ら, 2001)。バイオフィルム内の *S. mutans* は、スクロースを代謝して酸を産生することにより歯質の脱灰を生じて、う蝕を進行させると考えられている (Hamada と Slade, 1980; Hamada ら, 1984)。

Surface Pre-Reacted Glass-ionomer (S-PRG) フィラーは、多機能性ガラス (フルオロロロアルミノシリケートガラス) に多孔性無機シリカガラス層をコーティングして表面改質した多機能性ガラスフィラーを主原料とする (Ito ら, 2011)。この多機能性ガラスフィラーにポリアクリル酸水溶液を噴霧することにより、多機能性ガラスコアと表面改質層の間に安定したガラスアイオノマー相が形成され、3層構造からなるバイオアクティブ機能性ガラスである S-PRG フィラーが製造される (Ito ら, 2011)。S-PRG フィラーは高い物理的強度を有する上に、ガラスアイオノマー相からフッ化物イオン (F^-)、ナトリウムイオン (Na^+)、ホウ酸イオン (BO_3^{3-})、アルミニウムイオン (Al^{3+})、ケイ酸イオン (SiO_3^{2-}) およびストロンチウムイオン (Sr^{2+}) の6種類のイオンを徐放することを可能としている (Ito ら, 2011)。これらのイオンの働きにより、S-PRG フィラーは抗菌効果、酸緩衝能、エナメル質の脱灰抑制効果などのバイオアクティブ効果を示すことが確認されている (Nomura ら, 2018)。また、S-PRG フィラーは *S. mutans* の増殖能やスクロース依存性のバイオフィルム形成能を抑制し、*S. mutans* の糖代謝に関わるタンパクをコードする遺伝子の発現を抑制することが示されている (Nomura ら, 2018)。

S-PRG フィラーは、コンポジットレジン、セメント、フィッシャーシーラントおよび歯面コーティング剤などの様々な歯科材料に応用され、歯科臨床において実用化に至っている (Shimazu ら, 2012; Ma ら, 2012)。S-PRG フィラーから徐放されるイオン量は、S-PRG フィラーの粒子径および含有量や歯科材料に含まれる他の成分によって異なる

ものの、いずれの材料においてもマルチイオンの徐放やバイオアクティブ効果が確認されており、これらの歯科材料を使用した際の *S. mutans* に対する抑制効果も示されている (Yoneda ら, 2015)。その一方で、セルフケア予防材料に S-PRG フィラーを応用した研究はほとんど行われていない。

本研究では、S-PRG フィラーを応用したセルフケア予防材料が、*S. mutans* のう蝕原性に与える影響を検討することにした。そこで、歯ブラシの刷毛部であるモノフィラメントに S-PRG フィラーを応用し、モノフィラメント周囲における *S. mutans* に対する抑制効果の分析を行うこととした。また、S-PRG フィラーを歯磨きペーストにも応用して、*S. mutans* の増殖能とスクロース存在下でのバイオフィルム形成能に着目したう蝕原性に対する抑制効果の分析を行うこととした。

材料および方法

1. 菌株と培地

S. mutans MT8148 株（血清型：c）（Ooshima ら, 1983）を使用し、Brain Heart Infusion（BHI; Difco Laboratories Detroit, MO, USA）液体培地および Mitis-salivarius（MS）寒天培地（Difco Laboratories）にバシトラシン（100 unit/mL; Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, USA）および 15%スクロースを添加した MSB 寒天培地上を用いて培養した。供試菌は BHI 液体培地では 37°C で 18 時間、MSB 寒天培地では窒素 95%、炭酸 5% の条件下で 37°C で 48 時間嫌氣的に培養した。

2. S-PRG フィラー含有モノフィラメント

1) S-PRG フィラー含有モノフィラメントの作製

S-PRG フィラー含有モノフィラメントは、ナイロン 6 もしくはポリエステルに S-PRG フィラーを含有させることにより作製され、株式会社松風（京都）より提供された。まず、原材料であるナイロン 6 もしくはポリエステルに S-PRG フィラーを含有させた樹脂ペレットを、直径 200 μm のモノフィラメントの形状に紡糸した。モノフィラメントに含有可能な最大量の S-PRG フィラーは、ナイロン製モノフィラメントで 20 wt%、ポリエステル製モノフィラメントで 1.4 wt% であった。S-PRG フィラー未配合のモノフィラメントは、対照群として分析に使用した。ナイロン製モノフィラメントは、S-PRG フィラーを加えることにより無色から白色へと変化し（図 1）、ポリエステル製モノフィラメントは S-PRG フィラーの有無にかかわらず白色であった。走査型電子顕微鏡所見から、S-PRG フィラー含有の各モノフィラメントの内部には、直径数十 nm から数 μm の S-PRG フィラー粒子が均一に含有されており、ナイロン製モノフィラメントではポリエステル製モノフィラメントよりも多くの S-PRG フィラーが認められた（図 2）。

2) S-PRG フィラー含有モノフィラメントからのイオン量の測定

S-PRG フィラー含有モノフィラメントから徐放されたイオン量は、 BO_3^{3-} 、 Al^{3+} 、 SiO_3^{2-} 、 Sr^{2+} 、 Na^+ については誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICPS-8100, 島津製作所, 京都）を用いて測定し、F についてはイオン選択性電極メーター（Model 9609BNWP, Orion Research Inc., Beverly, MA, USA）を用いて測定した。モノフィラメント 360 本を 10 cm の長さに切断して蒸留水 15 ml に浸漬後、ローターで 18 時間攪拌することにより、S-PRG フィラー含有ナイロン製モノフィラメントからは S-PRG フィラーに由来する 6 種すべてのイオンが 1 ppm 以上検出され（図 3）、 BO_3^{3-} が最も高い濃度を示した。それに対して、S-PRG フィラー含有ポリエステル製モノフィラメントから徐放される各イオン濃度は、ナイロン製のものよりも低かった（図 4）。また、S-PRG フィラー含有モノフィラメントからは、S-PRG フィラーに由来するイオンが 168 時間まで継続的に徐放され、

ナイロン製モノフィラメントではポリエステル製モノフィラメントと比較して高いイオン濃度が認められた (図 5、6)。

3. S-PRG フィラー含有モノフィラメントを用いたう蝕原性抑制効果の分析

1) モノフィラメントに対する *S. mutans* の付着能の分析

1%スクロース (和光純薬, 大阪) 含有 BHI 液体培地 1 ml を用いて 1.0×10^7 CFU/ml となるように調整した *S. mutans* 菌液中に、3 cm に切断したモノフィラメントを 1 本浸漬し、37°C で 18 時間培養した。その後、*S. mutans* が付着したモノフィラメントを BHI 液体培地から滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) 中に移し、超音波処理によりモノフィラメントに付着した *S. mutans* をすべて剥離した。この菌液を PBS で段階希釈したものを MSB 寒天培地上に播種して培養後にコロニー数を計測し、モノフィラメントに付着した *S. mutans* 菌数を測定した。

共焦点レーザー顕微鏡によるモノフィラメントに付着した *S. mutans* の観察は、Nomura ら (2018) の方法を用いて行った。*S. mutans* を付着させたモノフィラメントを 10 mM Hexidium Iodide (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 溶液に浸漬し、遮光下にて室温で 15 分間染色した。染色後、モノフィラメントをハンクス平衡塩溶液 (Lonza, Walkersville, MD, USA) で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定後にスライドガラスにマウントした。作製したサンプルを用いて、LSM-510 顕微鏡 (Carl ZEISS Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany) で 543nm の波長の反射レーザー光を照射し、DMI6000B 蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems GmbH) の 63×油浸対物レンズを用いて観察した。

2) モノフィラメントに対する *S. mutans* の剥離能の分析

3. 1) に記載の方法でモノフィラメントに *S. mutans* を付着させた後、PBS 中に移して 3 秒間ボルテックスすることでモノフィラメントから *S. mutans* を剥離させた。次に、菌液からモノフィラメントを取り出して別のエッペンチューブに移し、PBS を加えて超音波処理を行うことによりモノフィラメントに付着したすべての細菌を剥離した。剥離した菌液は、PBS で段階希釈後に MSB 寒天培地上に播種し培養後にコロニー数を計測した。ボルテックスによる剥離後にモノフィラメント上に残存した *S. mutans* の割合 (%) は、(ボルテックス後に残存した *S. mutans* 菌数) / [(ボルテックスにより剥離された *S. mutans* 菌数) + (ボルテックス後に残存した *S. mutans* 菌数)] の百分率により算出した。

3) モノフィラメント静置時の *S. mutans* の経時的菌数変化の分析

3. 1) に記載の方法でモノフィラメントに *S. mutans* を付着させた後、モノフィラメントを空のエッペンチューブ内に移し、15、30、60、120、240 分間まで経時的に空気中で常温下にて静置した。静置後、モノフィラメントを PBS 中に移し、モノフィラメントに付着したすべての *S. mutans* を超音波処理により剥離して、菌液を段階希釈したも

のを MSB 寒天培地上に播種し培養後にコロニー数を計測し、モノフィラメント上に残存した生菌数を測定した。

4. S-PRG フィラー含有ジェルペースト (PRG ジェルペースト)

本研究で用いた PRG ジェルペースト (松風, 京都) は、5 wt% の S-PRG フィラーを含む歯面清掃用ジェルペーストであり、保湿剤としてのグリセリンおよびソルビトール溶液、研磨剤としての無水ケイ酸、結合材料としてのカルボキシメチルセルロースおよび発泡剤としてのラウリル硫酸ナトリウムが配合されている。本研究では、PRG ジェルペーストに加え、対照群として PRG ジェルペーストから S-PRG フィラーのみを除いたジェルペースト (S-PRG フィラー非含有ジェルペースト) を作製して分析に使用した。

5. PRG ジェルペーストを用いたう蝕原性抑制効果の分析

1) *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析

BHI 液体培地で 1.0×10^7 CFU/mL に調整した *S. mutans* 菌液中に、PRG ジェルペーストを 0%、0.001%、0.01%、0.1%、1% および 10% の濃度になるように添加した。これらの溶液を 37°C で短時間 (10、20、30、60 分)、中時間 (3、6、12、24 時間)、長時間 (1、2、3、4 週間) 培養後、菌液を段階希釈したものを MSB 寒天培地上に播種し培養後にコロニー数を計測した。

ギムザ染色による *S. mutans* の増殖能の観察は、Nakano ら (2004) の方法を用いて行った。BHI 液体培地で 1.0×10^7 CFU/mL に調整した *S. mutans* 菌液中に各濃度の PRG ジェルペーストを添加して 30 分、12 時間および 1 週間培養後に、*S. mutans* 菌液を 10 μ L ずつスライドガラスに播種後にメタノールで 2 分間固定し、ギムザ溶液で 30 分間染色した。その後、スライドガラスを流水で 3 分間洗浄し、実体顕微鏡を用いて観察した。

共焦点レーザー顕微鏡による *S. mutans* の増殖能の観察は、Nomura ら (2018) の方法を用いて行った。BHI 液体培地で 1.0×10^7 CFU/mL に調整した *S. mutans* 菌液中に各濃度の PRG ジェルペーストを添加して 30 分、12 時間および 1 週間培養後に、*S. mutans* 菌液を 10 μ L ずつスライドガラスに播種後に 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、10 mM Hexidium Iodide で遮光下にて室温で 15 分間染色した。染色後、スライドガラスを PBS で 3 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 543nm の波長のレーザー光を照射して *S. mutans* の状態を観察した。

2) スクロース存在下における *S. mutans* に対する抑制効果の分析

S. mutans 菌液を 1% スクロース含有 BHI 液体培地で 1.0×10^7 CFU/mL に調整し、PRG ジェルペーストを 0%、0.001%、0.01%、0.1%、1% および 10% の濃度になるように添加して、37°C で 24 時間培養した。その後、菌液を段階希釈したものを MSB 寒天培地に播種し培養後にコロニー数を計測した。また、0% および 0.1% の PRG ジェルペーストを添加した *S. mutans* 菌液については、PBS で 2% に調整したグルタルアルデヒドで固定後に

H-7650 透過型電子顕微鏡（日立、東京）を用いた観察を行った。

3) *S. mutans* のバイオフィーム形成能に対する抑制効果の分析

(1) プレートを用いた分析

バイオフィーム形成量の測定は、Nomura ら（2018）の方法を用いて行った。まず、*S. mutans* を 1%スクロース含有 BHI 液体培地を用いて 1.0×10^7 CFU/mL になるよう調整し、PRG ジェルペーストを 0%、0.001%、0.01%、0.1%、1%および 10%の濃度になるよう添加した。これらの菌液を 200 μ L ずつ 96 穴プレートに分注し、37°C で 18 時間培養した。その後、プレートを PBS で 3 回洗浄することにより浮遊した細菌を除去し、形成されたバイオフィームを 25%ホルムアルデヒドにより 10 分間固定後、各ウェルに 0.05%クリスタルバイオレット水溶液（Sigma-Aldrich）を 200 μ L ずつ分注して 5 分間室温で染色した。染色後のプレートを PBS で洗浄し、バイオフィームを 95%エタノールを用いて溶解させた後に、マイクロプレートリーダー（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を用いて各ウェルの OD₅₉₅ 値を測定した。また、*S. mutans* によるバイオフィームをチャンバースライド上で形成させ、5. 1) の方法によって共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(2) ウシエナメル質を用いた分析

分析に使用したウシエナメル質は、自動精密切断機を使用して抜去したウシ前歯から 6 mm 四方、厚さ 1 mm の寸法にスライスしたものを準備した。スライスされたウシエナメル質を 0.05 g の PRG ジェルペーストを塗布したラバーカップを用いて 1 分間歯面処理した後に、PBS を用いて洗浄することにより余剰の PRG ジェルペーストを除去した。次に、1%スクロース含有 BHI 液体培地で 1.0×10^7 CFU/ml に調整した *S. mutans* 菌液にウシエナメル質を浸漬し、37°C で 18 時間 *S. mutans* を培養した。培養後、ウシエナメル質を PBS で 3 回洗浄し、1 mL の PBS を添加して超音波処理とピペッティングにより付着した *S. mutans* を全て剥離した。剥離した菌液を段階希釈したものを MSB 寒天培地上に播種し培養後、コロニー数を計測した。また、ウシエナメル質表面に形成された *S. mutans* のバイオフィームを観察するために、*S. mutans* のバイオフィームを形成させたウシエナメル質を 10%ホルムアルデヒドにより固定した後、0.3%アガロース（和光純薬）含有 3%魚コラーゲン（和光純薬）に埋入したものを EDTA で脱灰し、パラフィンに包埋後グラム染色を行った。さらに、ウシエナメル質表面に形成させた *S. mutans* によるバイオフィームを、5. 1) の方法によって共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

4) ジェルペースト中の S-PRG フィラーに着目した *S. mutans* のう蝕原性抑制効果の分析

0.1%、1%、10%の濃度で添加した S-PRG 非含有ジェルペーストまたは PRG ジェルペーストを含む BHI 液体培地もしくは 1%スクロース含有 BHI 液体培地を準備した。これ

らの液体培地に *S. mutans* を 1.0×10^7 CFU/mL となるよう添加し、5. 1) および 5. 3) の方法によって増殖能およびバイオフィルム形成能の分析を行った。

6. 統計分析

統計学的分析には GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いた。2 群間における統計学的有意差の検定には、Student の *t* 検定を行い、多群間の比較には ANOVA の後 post-hoc 解析として Bonferroni 法を用いた。全ての分析において有意水準 5% 以下の場合を有意差ありとした。

結果

1. S-PRG フィラー含有モノフィラメントを用いたう蝕原性抑制効果の分析

1) モノフィラメントに対する *S. mutans* の付着能の分析

ナイロン製およびポリエステル製モノフィラメントにおいて、S-PRG フィラー含有モノフィラメントに付着した *S. mutans* 菌数は、S-PRG フィラー非含有モノフィラメントに付着した *S. mutans* 菌数と比較して有意に低下した ($P < 0.01$) (図 7、8)。実体顕微鏡画像および共焦点レーザー顕微鏡画像から、ナイロン製およびポリエステル製モノフィラメントの両方で、S-PRG フィラー含有モノフィラメントでは S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して、付着した *S. mutans* の明らかな減少が認められた (図 9、10)。

2) モノフィラメントに対する *S. mutans* の剥離能の分析

ナイロン製およびポリエステル製モノフィラメントにおいて、ボルテックスによる *S. mutans* の剥離後に S-PRG フィラー含有モノフィラメントに残存した *S. mutans* の割合は、S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して有意に低下した ($P < 0.001$) (図 11、12)。実体顕微鏡画像および共焦点レーザー顕微鏡画像から、ナイロン製およびポリエステル製モノフィラメントの両方で、S-PRG フィラー含有モノフィラメントでは S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して、残存する *S. mutans* の明らかな減少が認められた (図 13、14)。

3) モノフィラメント静置時の経時的菌数変化の分析

いずれの測定時間においても、S-PRG フィラー含有ナイロン製モノフィラメントでは S-PRG フィラー非含有ナイロン製モノフィラメントと比較して、*S. mutans* 菌数は有意に減少した ($P < 0.001$) (図 15)。特に、実験開始 240 分後には、S-PRG フィラー非含有ナイロン製モノフィラメントでは 1.2×10^5 CFU の *S. mutans* が認められたのに対して、S-PRG フィラー含有ナイロン製モノフィラメントでは *S. mutans* は認められなくなった。また、ポリエステル製モノフィラメントにおいても、S-PRG フィラー含有モノフィラメントでは S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して、*S. mutans* 菌数は各時間で有意に減少し ($P < 0.001$) (図 16)、実験開始 240 分後には S-PRG フィラー含有モノフィラメントでは *S. mutans* は認められなくなった。

2. PRG ジェルペーストを用いたう蝕原性抑制効果の分析

1) *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析

PRG ジェルペーストを 0.001% から 0.1% の濃度で添加した際には、添加 60 分後まで *S. mutans* の増殖能は抑制されなかった (図 17)。一方、1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時では非添加群と比較して、添加 10 分後以降の各時間において *S. mutans* 菌数は減

少した。さらに、10%濃度の PRG ジェルペースト添加時には、*S. mutans* は 10 分間で死滅した。その後、0.001%および 0.01%濃度の PRG ジェルペースト添加時には、24 時間後まで *S. mutans* の増殖能は抑制されなかったのに対して、0.1%濃度の PRG ジェルペースト添加時には非添加群と比較して 6 時間後以降の *S. mutans* の増殖能が抑制された (図 18)。また、1%濃度の PRG ジェルペースト添加時には、6 時間後にすべての *S. mutans* が死滅した。さらに、0.1%濃度の PRG ジェルペースト添加時には、1 週間後から 4 週間後にかけて *S. mutans* 菌数は経時的に減少した (図 19)。実体顕微鏡画像および共焦点レーザー顕微鏡画像による観察の結果から、0.1%濃度の PRG ジェルペースト添加時には 12 時間後および 1 週間後において *S. mutans* の増殖能の低下が認められた (図 20、21)。また、1%濃度の PRG ジェルペースト添加時には 12 時間後に *S. mutans* が認められなくなり、10%濃度の PRG ジェルペースト添加時には 30 分後に *S. mutans* が認められなくなった。

2) スクロース存在下における *S. mutans* に対する抑制効果の分析

スクロース存在下における *S. mutans* の増殖能は、0.1%、1%および 10%濃度の PRG ジェルペースト添加群において非添加群と比較して有意に低下した ($P < 0.001$) (図 22)。また、透過型電子顕微鏡画像から、PRG ジェルペースト非添加時には多数の *S. mutans* が観察され、細菌周囲には多量のグルカンが確認された (図 23)。一方で、0.1%濃度の PRG ジェルペースト添加時にはジェル成分の隙間においてのみ、細胞質構造に変化を認める *S. mutans* が存在し、細菌の周囲にはグルカンの形成をほとんど認めなかった。

3) *S. mutans* のバイオフィーム形成能に対する抑制効果の分析

(1) プレートを用いた分析

0.1%、1%および 10%濃度の PRG ジェルペースト添加時には、*S. mutans* のバイオフィーム形成能は PRG ジェルペースト非添加時と比較して有意に抑制された ($P < 0.001$) (図 24)。共焦点レーザー顕微鏡画像から、0.1%および 1%濃度の PRG ジェルペースト添加時にはわずかに *S. mutans* の存在を認めたが、10%濃度の PRG ジェルペースト添加時には *S. mutans* は全く認められなくなった (図 25)。

(2) ウシエナメル質を用いた分析

PRG ジェルペーストを用いたウシエナメル質への歯面処理を行った場合には、PRG ジェルペーストを用いなかった場合と比較して、ウシエナメル質表面に付着した *S. mutans* 菌数は有意に減少し ($P < 0.001$) (図 26)、バイオフィーム形成能も有意に低下した ($P < 0.001$) (図 27)。実体顕微鏡画像および共焦点レーザー顕微鏡画像から、PRG ジェルペースト不使用時のウシエナメル質表面には均一に厚いバイオフィームが確認されたが、PRG ジェルペースト使用時にはバイオフィームは少量しか観察されなかった (図 28、29)。

4) ジェルペースト中の S-PRG フィラーに着目したう蝕原性抑制効果の分析

(1) *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析

S. mutans の増殖能は、ペースト非添加時と比較して 0.1%濃度の S-PRG フィラー非含有ジェルペースト添加時において高い抑制効果を示し、0.1%濃度の PRG ジェルペースト添加時にはさらに高い抑制効果を示した (図 30)。また、1%濃度の S-PRG フィラー非含有ジェルペースト添加時には 24 時間後に *S. mutans* が死滅したのに対し、1%濃度の PRG ジェルペースト添加時には 6 時間で *S. mutans* は死滅した (図 31)。10%濃度のジェルペースト添加時には、S-PRG フィラーの有無にかかわらず、3 時間後に *S. mutans* は死滅した (図 32)。

(2) *S. mutans* のバイオフィーム形成能に対する抑制効果の分析

各ペーストを 0.1%の濃度で添加した場合において、PRG ジェルペースト添加時には S-PRG フィラー非含有ジェルペースト添加時と比較して、*S. mutans* のバイオフィーム形成能は有意に低下した ($P < 0.001$) (図 33)。また、ウシエナメル質表面におけるバイオフィーム形成能は、いずれのジェルペーストで歯面処理を行った場合においても、ペースト不使用時と比較して有意に低下した ($P < 0.001$) (図 34)。特に、PRG ジェルペースト使用時には S-PRG フィラー非含有ジェルペースト使用時と比較して、バイオフィーム形成能が有意に低下した ($P < 0.001$)。

考察

S. mutans はう蝕の主要な原因細菌であり、う蝕予防の観点から *S. mutans* に対して抗菌成分を含む歯磨きペーストや含嗽薬といったセルフケア予防材料が開発されている (Prabakar ら, 2018; Guven ら, 2019)。しかし、歯ブラシの植毛部であるモノフィラメントにおいては、抗菌効果を付与した製品の開発はほとんど進んでいない (do Nascimento ら, 2015)。また、う蝕予防を目的とした歯磨きペーストとして、バイオアクティブ機能性ガラスである S-PRG フィラーを含有した製品が開発されエナメル質の再石灰化能が確認されているが (Amaechi ら, 2017)、う蝕原因細菌に対する効果の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、S-PRG フィラー含有歯ブラシ用モノフィラメントおよび S-PRG フィラー含有歯磨きペーストを用いて、*S. mutans* に対する抑制効果を検討することとした。

これまでに、抗菌性を有する歯ブラシとして、モノフィラメントに銀イオンを徐放する効果を付与したものが開発されている (Al-Ahmad ら, 2010; do Nascimento ら, 2015)。しかし、これらの歯ブラシでは、モノフィラメントの表面に銀イオンがコーティングされているのみであり、銀イオンによる持続的な抗菌効果が期待できないことが明らかになっている (Al-Ahmad ら, 2010; do Nascimento ら, 2015)。それに対して、S-PRG フィラー含有モノフィラメントには、直径数 nm から数 μm の S-PRG フィラー粒子がモノフィラメント内部にまで緊密に含有されているため、6 種類のイオンの長期的な徐放による歯ブラシの持続的な抗菌効果が期待できると考えられる。本研究では、S-PRG フィラー含有モノフィラメントからのイオンの徐放を 168 時間まで確認できた。このモノフィラメントで作製した歯ブラシの実用化に当たっては、モノフィラメントからのイオンの徐放に関するより長期的な分析が今後必要と考えられる。

歯ブラシを用いて口腔清掃を行った後、多くの細菌がモノフィラメントに付着していることが明らかになっている (Al-Ahmad ら, 2010)。*S. mutans* は硬組織への強い付着能およびバイオフィーム形成能を有することから (Kawabata ら, 1999)、モノフィラメントにも強固に付着してバイオフィームを形成する可能性が考えられた。そこで、従来プラスチック製のプレート上で行われていたバイオフィームアッセイを改変して、モノフィラメント上に *S. mutans* のバイオフィームを形成させることにした。また、*S. mutans* を付着させたモノフィラメントをボルテックスして *S. mutans* の剥離能を検討した。さらに、ブラッシング後の歯ブラシに残存する *S. mutans* を想定して、*S. mutans* を付着させたモノフィラメントを空気中に静置した際に残存する菌数の経時的変化を測定した。これらのすべての分析において、S-PRG フィラーを含有させることにより、モノフィラメント周囲の *S. mutans* は有意に減少した。このような *S. mutans* に対する抑制効果は、S-PRG フィラーを 20 wt%含有するナイロン製モノフィラメントだけでなく、S-PRG フ

ィラーを 1.4 wt%しか含まないポリエステル製モノフィラメントでも認められたことから、モノフィラメントに 1 wt%程度の S-PRG フィラーを含有することで、モノフィラメント周囲の *S. mutans* の付着能を抑制できることが示唆された。

本研究において、歯ブラシ刷毛部への *S. mutans* の付着抑制を目的とした S-PRG フィラー含有モノフィラメントの分析に対して、歯面に存在する *S. mutans* の抑制を目的とした歯磨きペーストの有効性についても検討を行った。まず、S-PRG フィラー含有歯磨きペーストである PRG ジェルペーストを 10%の濃度となるように *S. mutans* 菌液に添加したところ、すべての *S. mutans* が 10 分以内に死滅した。このことから、PRG ジェルペーストを原液で歯磨きペーストとして使用すれば、口腔内の *S. mutans* は直ちに減少させることができると考えられた。また、0.1%以上の濃度で PRG ジェルペーストが存在することにより、*S. mutans* の増殖が抑制されるだけでなく不溶性グルカンの合成が阻害され、バイオフィームはほとんど形成されなかった。このことから、ブラッシング後に口腔内に残存した低濃度の PRG ジェルペーストが *S. mutans* のう蝕原性の抑制に有効である可能性が示唆された。

ウシのエナメル質は脱灰および再石灰化の評価など、ヒトのう蝕に近い病態を再現する実験系で広く使用されている (Tschoppe ら, 2011; Almohefer ら, 2018; Hamba ら, 2020)。本研究では、従来のプラスチックプレートまたはチャンバースライドを用いたバイオフィームアッセイに加えて (Yoo ら, 2018; Nomura ら, 2021)、臨床により近い状況を再現できるウシエナメル質を用いたバイオフィームアッセイを構築した。分析の結果、ウシエナメル質の表面を PRG ジェルペーストで処理することで、*S. mutans* のバイオフィーム形成が著しく抑制された。今後はヒトを対象とした臨床試験によって、PRG ジェルペーストの効果を検証したいと考えている。

本研究では、PRG ジェルペースト中の S-PRG フィラーの効果を示すために、S-PRG フィラーを除いたジェルペーストを準備した。この S-PRG フィラー非含有ジェルペーストでは、PRG ジェルペーストと比較して *S. mutans* に対する抑制効果が減少したことから、歯磨きペースト中の S-PRG フィラーの有効性が確認された。しかし、S-PRG フィラー非含有ジェルペーストにも *S. mutans* に対する抑制効果が残存していた。これは、発泡剤として歯磨きペーストに広く使用されているラウリル硫酸ナトリウムの抗菌性によるものと考えられる。ラウリル硫酸ナトリウムは歯磨きペーストにとって有用な成分であるが、人体への影響からその含有濃度には限度が存在する。また、歯磨きペーストに抗菌剤として広く用いられている塩化セチルピリジニウムやトリクロサンに関しては毒性の報告が存在する (Johnson ら, 2016; Kim ら, 2021)。これに対して、PRG ジェルペーストには 5 wt%の S-PRG フィラーが含有されており、臨床応用されているセメント、コンポジットレジンなどの歯科材料にはより高濃度の S-PRG フィラーが含有されているものが存在するが、これまでに人体への為害性は報告されていない。将来的に

は、人体に有害となる可能性のある抗菌物質を含有せず S-PRG フィラーだけを含有する歯磨きペーストを開発したいと考えている。

本研究結果から、ナイロン製およびポリエステル製モノフィラメント内に含有された S-PRG フィラーは複数のイオンを徐放することで、モノフィラメントに対する *S. mutans* の付着を抑制し、付着した *S. mutans* は容易に剥離された。また、S-PRG フィラー含有モノフィラメント上に残存した *S. mutans* は、常温下で静置することにより死滅した。さらに、高濃度の PRG ジェルペーストは短期間で *S. mutans* を死滅させ、低濃度の PRG ジェルペーストは *S. mutans* 菌数と不溶性グルカンの量を減少させ流とともにバイオフィーム形成能を抑制した。以上のことから、S-PRG フィラーを含有するセルフケア予防材料は、*S. mutans* のう蝕原性に対する抑制効果により、口腔環境の改善に効果的である可能性が示された。

今後は、セルフケア予防材料に応用した S-PRG フィラーが *S. mutans* のう蝕原性を抑制する詳細なメカニズムの解析や、他のセルフケア予防材料への応用展開を視野に入れながら、さらなる検討を行っていきたいと考えている。

結論

S-PRG フィラーを応用したセルフケア予防材料における *Streptococcus mutans* のう蝕病原性に対する抑制効果を検討したところ、以下の結果が得られた。

1. S-PRG フィラー含有のナイロン製およびポリエステル製モノフィラメントは、持続的にイオンを徐放することにより *S. mutans* の付着能を抑制するだけでなく、付着した *S. mutans* の剥離能を促進し、モノフィラメント上に残存した *S. mutans* の生存率を低下させた。
2. PRG ジェルペーストはスクロースの有無にかかわらず、*S. mutans* の増殖を抑制した。また、*S. mutans* によるスクロース依存性の不溶性グルカンの合成およびバイオフィルム形成能を抑制した。

以上のことから、S-PRG フィラーを応用したセルフケア予防材料は、*S. mutans* によって誘発されるう蝕の予防に有効な手段となり得ることが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇意なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室 仲野 和彦 教授に心から謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、終始様々な御指導と御校閲をいただきました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室 野村 良太 准教授に厚く御礼申し上げます。

最後になりましたが、終始研究に対し御理解と御協力をいただいた、大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

- Al-Ahmad, A., M. W. Al-Ahmad, D. Deimling, C. Jaser, K. Pelz, A. Wittmer and P. R. Krüger.** 2010. An antimicrobial effect from silver-coated toothbrush heads. *Am. J. Dent.* 23, 251–254.
- Almohefer, S. A., J. A. Levon, R. L. Gregory, G. J. Eckert and F. Lippert.** 2018. Caries lesion remineralization with fluoride toothpastes and chlorhexidine-effects of application timing and toothpaste surfactant. *J. Appl. Oral. Sci.* 26, e20170499.
- Amaechi, B. T., M. C. Key, S. Balu, L. O. Okoye and P. T. Gakunga.** 2017. Evaluation of the caries preventive effect of toothpaste containing surface prereacted glass-ionomer filler. *J. Investig. Clin. Dent.* 8, e12249.
- do Nascimento, C., D. F. Paulo, M. S. Pita, V. Pedrazzi and R. F. de Albuquerque Junior.** 2015. Microbial diversity of the supra and subgingival biofilm of healthy individuals after brushing with chlorhexidine or silver-coated toothbrush bristles. *Can. J. Microbiol.* 61, 112–123.
- Guven, Y., N. Ustun, E. B. Tuna and O. Aktoren.** 2019. Antimicrobial effect of newly formulated toothpastes and a mouth rinse on specific microorganisms: an *in vitro* study. *Eur. J. Dent.* 13, 172–177.
- Hamada, S. and H. D. Slade.** 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44, 331–384.
- Hamada, S., T. Koga and T. Ooshima.** 1984. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.* 63, 407–411.
- Hamba, H., K. Nakamura, T. Nikaido, J. Tagami and T. Muramatsu.** 2020. Remineralization of enamel subsurface lesions using toothpaste containing tricalcium phosphate and fluoride: an *in vitro* μ CT analysis. *BMC Oral Health* 20, 292.

- Ito, S., M. Iijima, M. Hashimoto, N. Tsukamoto, I. Mizoguchi and T. Saito.** 2011. Effects of surface pre-reacted glass-ionomer fillers on mineral induction by phosphoprotein. *J. Dent.* 39, 72–79.
- Jepsen S., J. Blanco, W. Buchalla, J. C. Carvalho, T. Dietrich, C. Dörfer, K. A. Eaton, E. Figuero, J. E. Frencken, F. Graziani, S. M. Higham, T. Kocher, M. Maltz, A. Ortiz-Vigon, J. Schmoekel, A. Sculean, L. M. Tenuta, M. H. van der Veen and V. Machiulskiene.** 2017. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 44,18: S85–S93.
- Johnson, P. I., E. Koustas, H. M. Vesterinen, P. Sutton, D. S. Atchley, A. N. Kim, M. Campbell, J. M. Donald, S. Sen, L. Bero, L. Zeise and T. J. Woodruff.** 2016. Application of the Navigation Guide systematic review methodology to the evidence for developmental and reproductive toxicity of triclosan. *Environ. Int.* 92–93, 716–728.
- Kawabata, S. and S. Hamada.** 1999. Studying biofilm formation of mutans streptococci. *Methods Enzymol.* 310,513–523.
- Kim, H., J. Yoo, Y. M. Lim, E. J. Kim, B. I. Yoon, P. Kim, S. D. Yu, I. C. Eom and I. Shim.** 2021. Comprehensive pulmonary toxicity assessment of cetylpyridinium chloride using A549 cells and Sprague-Dawley rats. *J. Appl. Toxicol.* 41, 470–482.
- Lee, Y.** 2013. Diagnosis and Prevention Strategies for Dental Caries. *J. Lifestyle Med.* 3, 107–109.
- Ma, S., S. Imazato, Ji. Chen, G. Mayanagi, N. Takahashi, T. Ishimoto and T. Nakano.** 2012. Effects of a coating resin containing S-PRG filler to prevent demineralization of root surfaces. *Dent. Mater. J.* 31, 909–915.
- Matayoshi, S., R. Nomura, T. Kitamura, R. Okawa and K. Nakano.** 2021. Inhibitory effect of toothbrush monofilament containing surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler on *Streptococcus mutans*. *Sci. Rep.* 11, 211.

- Nakano, K., R. Nomura, I. Nakagawa, S. Hamada and T. Ooshima.** 2004. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, *k*, in the human oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 42, 198–202.
- Nomura, R., Y. Morita, S. Matayoshi and K. Nakano.** 2018. Inhibitory effect of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate against adhesion and colonization by *Streptococcus mutans*. *Sci. Rep.* 8, 5056.
- Nomura, R., J. Ohata, M. Otsugu, R. Okawa, S. Naka, M. Matsumoto-Nakano and K. Nakano.** 2021. Inhibitory effects of flavedo, albedo, fruits, and leaves of *Citrus unshiu* extracts on *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 124, 105056.
- Ooshima, T., A. Izumitani, S. Sobue and S. Hamada.** 1983. Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 36, 219–223.
- Ooshima, T., M. Matsumura, T. Hoshino, S. Kawabata, S. Sobue and T. Fujiwara.** 2001. Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* 80, 1672–1677.
- Peres, M. A., L. M. D. Macpherson, R. J. Weyant, B. Daly, R. Venturelli, M. R. Mathur, S. Listl, R. K. Celeste, C. C. Guarnizo-Herreño, C. Kearns, H. Benzian, P. Allison and R. G. Watt.** 2019. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet* 394, 249–260.
- Prabakar, J., J. John, I. M. Arumugham, R. P. Kumar and D. S. Sakthi.** 2018. Comparing the effectiveness of probiotic, green tea, and chlorhexidine and fluoride containing dentifrices on oral microbial flora: a double-blind, randomized clinical trial. *Contemp. Clin. Dent.* 9, 560–569.
- Shimazu, K., K. Ogata and H. Karibe.** 2012. Caries-preventive effect of fissure sealant containing surface reaction-type pre-reacted glass ionomer filler and bonded by self-etching primer. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 36, 343–347.
- Tschoppe, P. and A. M. Kielbassa.** 2011. Remineralization of bovine enamel subsurface lesions: effects of different calcium-phosphate saturations in buffered aqueous solutions. *Quintessence Int.* 42, 501–514.

- Yoneda, M., N. Suzuki and T. Hirofuji.** 2015. Antibacterial effect of surface pre-reacted glass ionomer filler and eluate-mini review. *Pharm. Anal. Acta.* 6, 1000349.
- Yoo, H. J. and S. K. Jwa.** 2018. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. *Arch. Oral Biol.* 88, 42–46.

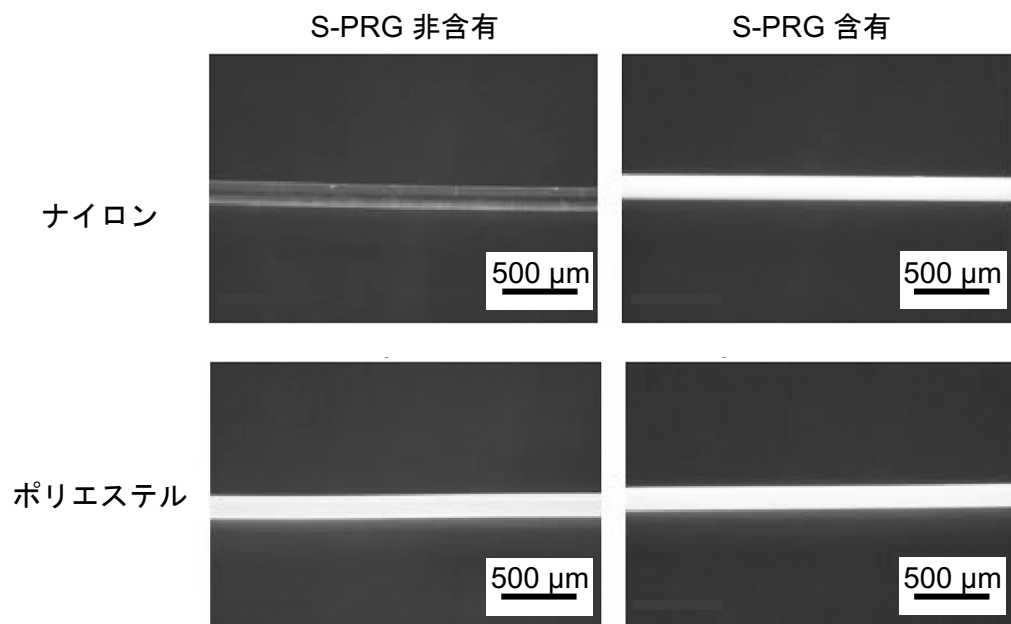


図1 モノフィラメントの実体顕微鏡画像

ナイロン製モノフィラメントは S-PRG フィラーを含有することで無色から白色に変化した。
ポリエステル製モノフィラメントは S-PRG フィラーの有無にかかわらず白色であった。

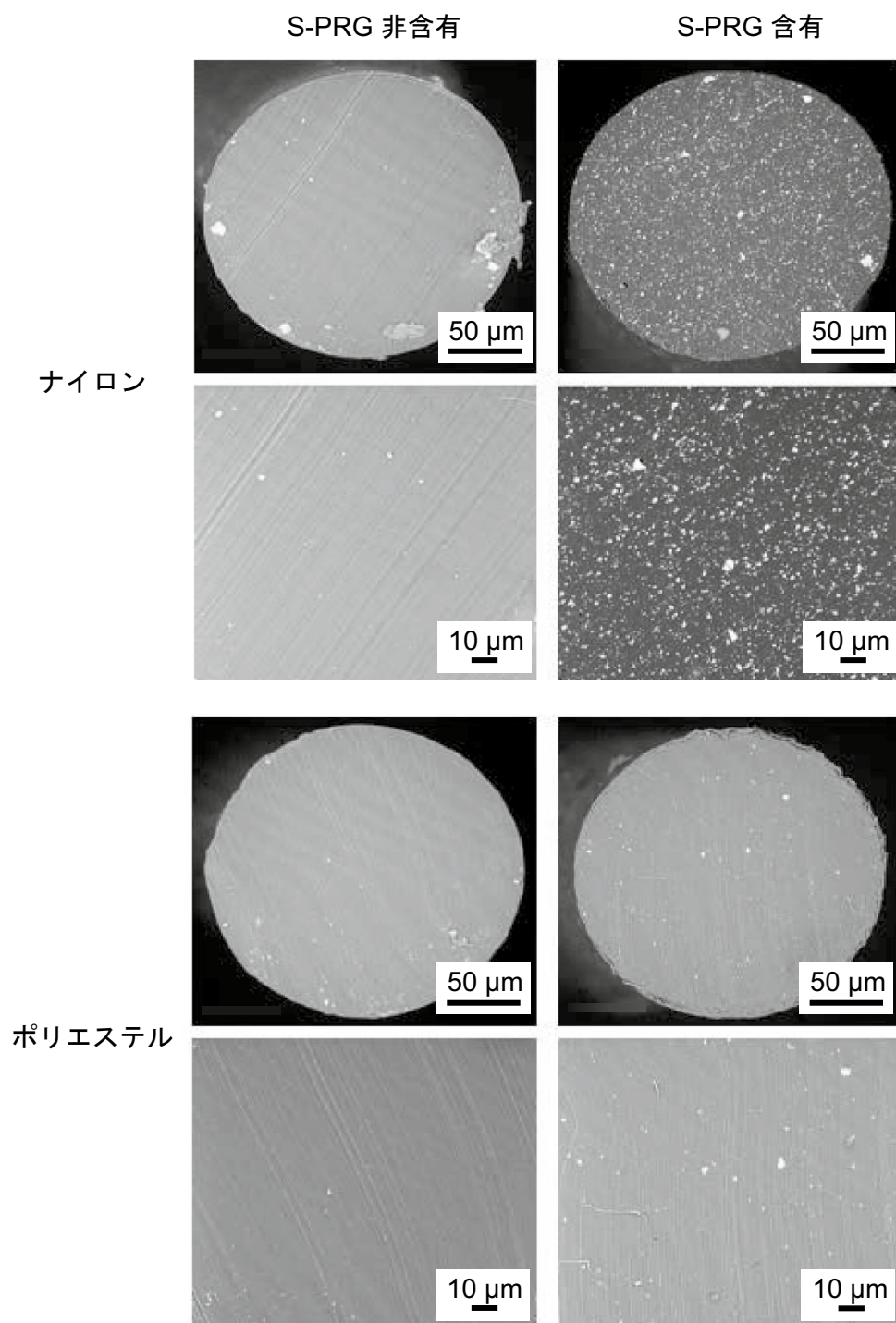


図2 モノフィラメントの走査型電子顕微鏡画像

S-PRG フィラー含有の各モノフィラメントの内部には S-PRG フィラー粒子が均一に含有されており、ナイロン製モノフィラメントではポリエステル製モノフィラメントよりも多くの S-PRG フィラー粒子が認められた。

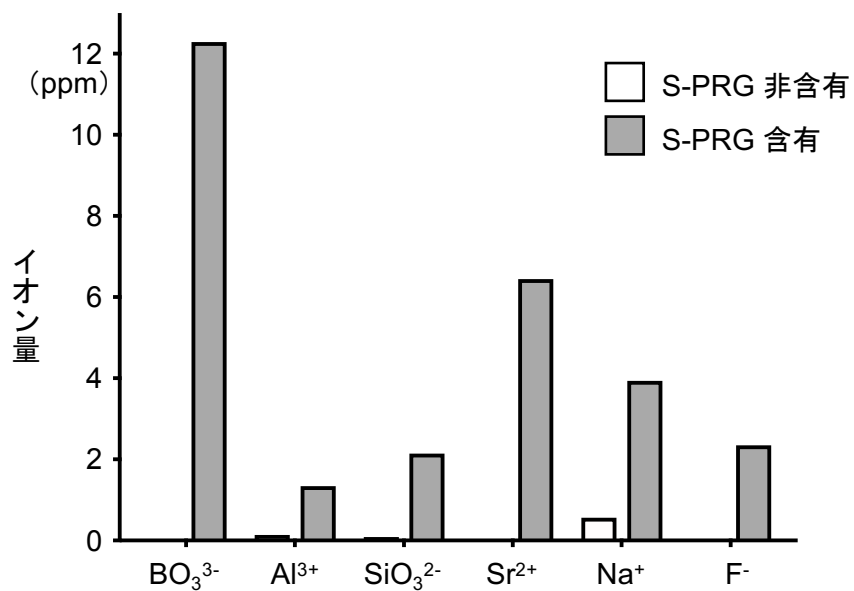


図3 18時間混合後ナイロン製モノフィラメントから滅菌蒸留水に徐放されたイオン量
S-PRG フィラー含有ナイロン製モノフィラメントからは、S-PRG フィラーに由来する 6 種すべてのイオンが 1ppm 以上検出され、 BO_3^{3-} が最も高い濃度を示した。

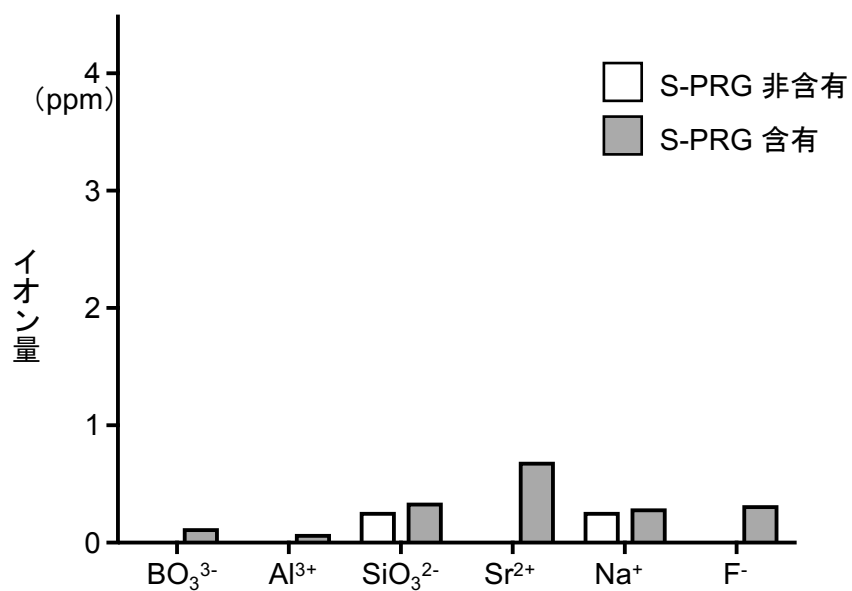


図4 18時間混合後ポリエステル製モノフィラメントから滅菌蒸留水に徐放されたイオン量
S-PRG フィラー含有ポリエステル製モノフィラメントからは、S-PRG フィラーに由来する6種すべてのイオンが検出されたが、これらはいずれも S-PRG フィラー含有ナイロン製モノフィラメントにおけるよりも少量であった。

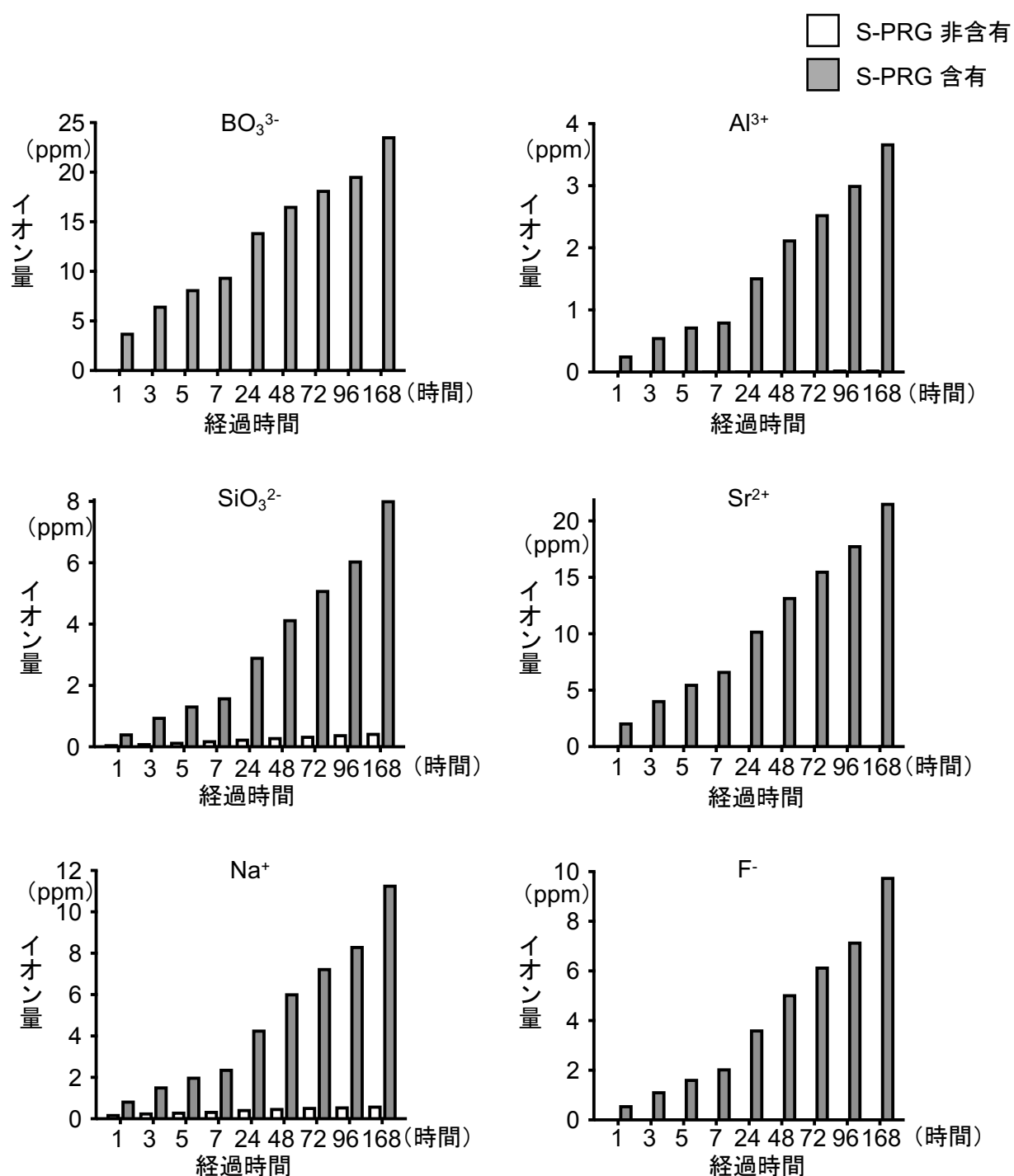


図5 ナイロン製モノフィラメントから滅菌蒸留水に徐放されたイオン量の継続的变化

S-PRG フィラー含有ナイロン製モノフィラメントでは、滅菌蒸留水に 168 時間浸漬した後も S-PRG に由来するすべてのイオンが継続的に検出された。

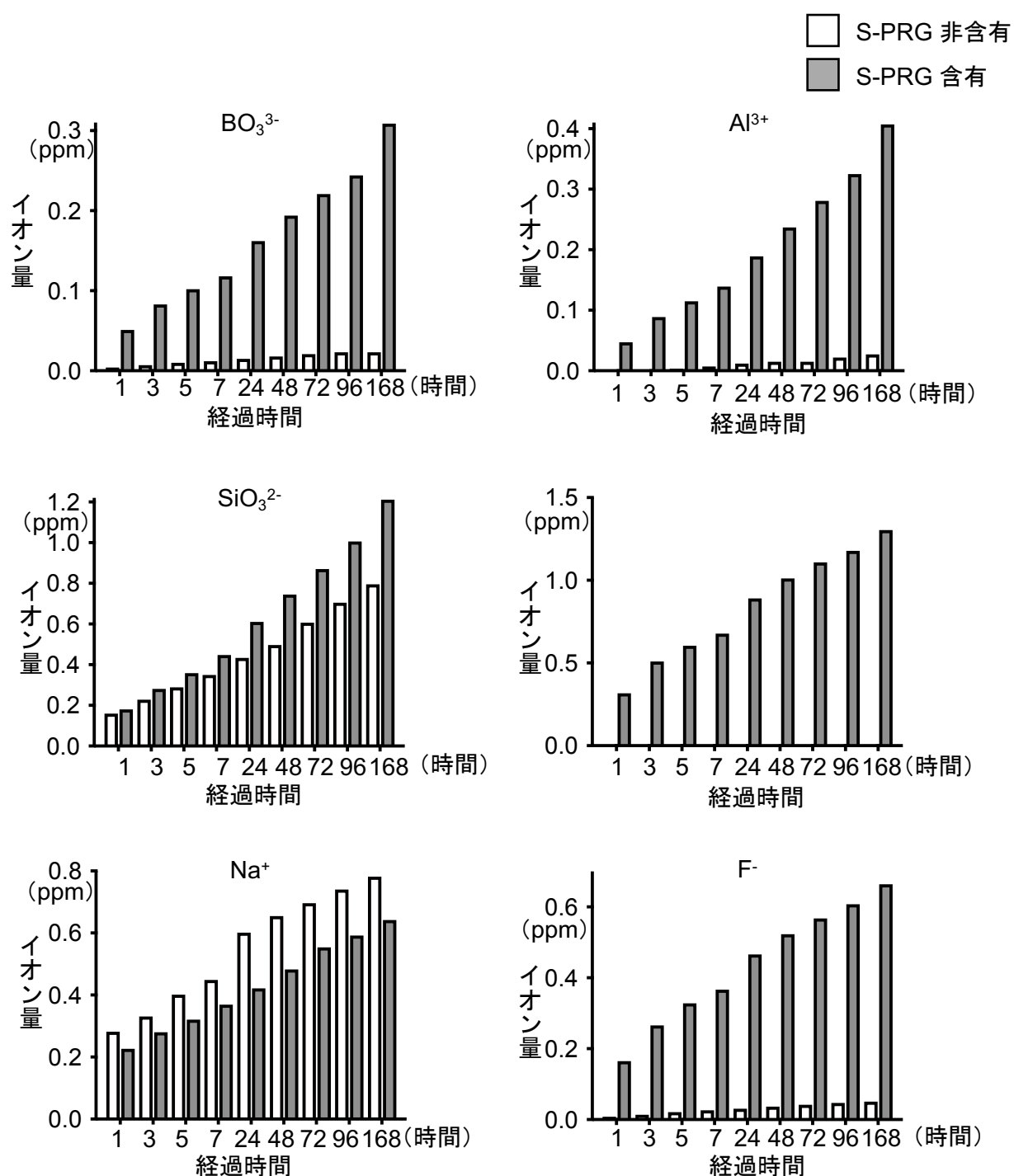


図6 ポリエステル製モノフィラメントから滅菌蒸留水に徐放されたイオン量の経時的変化

S-PRG フィラー含有ポリエステル製モノフィラメントでは、滅菌蒸留水に 168 時間浸漬した後も S-PRG に由来するすべてのイオンが継続的に検出されたが、各イオン量はナイロン製モノフィラメントから徐放されるイオンよりも少量であった。

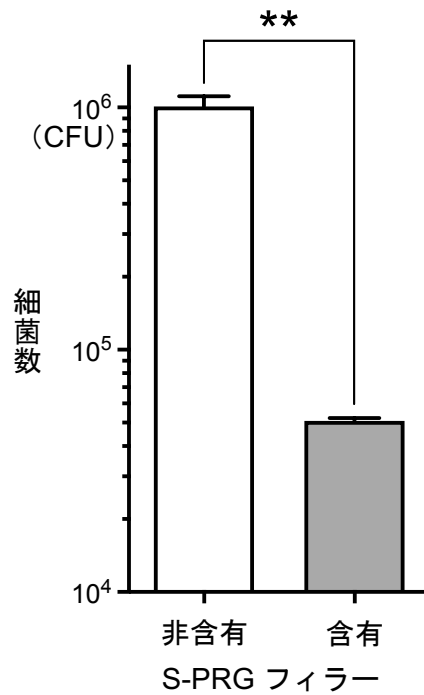


図7 ナイロン製モノフィラメントに対する *S. mutans* の付着能の分析

(Student の *t* 検定; ** $P < 0.01$)

ナイロン製モノフィラメントにおいて、S-PRG フィラー含有モノフィラメントに付着した *S. mutans* 菌数はS-PRG フィラー非含有モノフィラメントに付着した菌数と比較して有意に低下した。

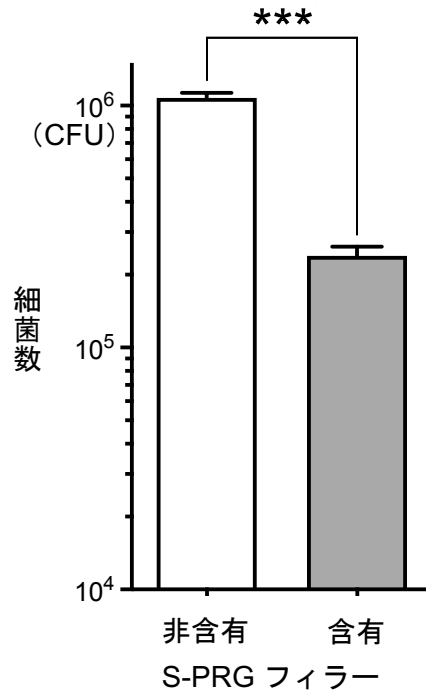


図8 ポリエステル製モノフィラメントに対する *S. mutans* の付着能の分析
(Student の *t* 検定; *** $P < 0.001$)

ポリエステル製モノフィラメントにおいて、S-PRG フィラー含有モノフィラメントに付着した *S. mutans* 菌数はS-PRG フィラー非含有モノフィラメントに付着した菌数と比較して有意に低下した。

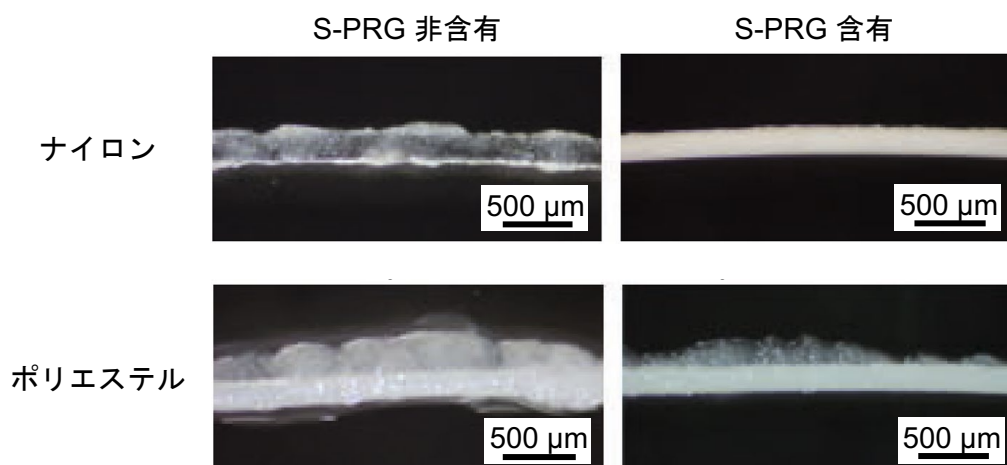


図9 *S. mutans* の付着実験後のモノフィラメントの実体顕微鏡画像

ナイロン製およびポリエステル製モノフィラメントの両方で、S-PRG フィラー含有モノフィラメントでは S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して、付着した *S. mutans* の明らかな低下が認められた。

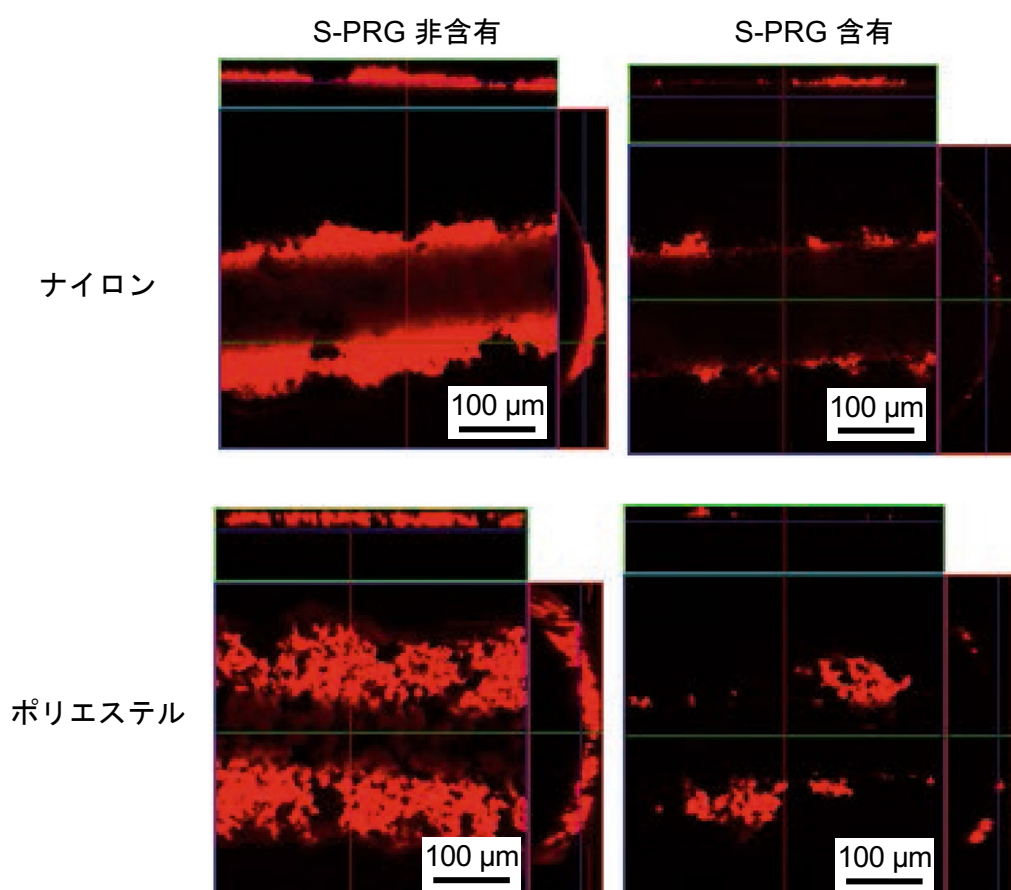


図10 *S. mutans* の付着実験後のモノフィラメントの共焦点レーザー顕微鏡画像

(赤色 : *S. mutans*)

ナイロン製およびポリエステル製モノフィラメントの両方で、S-PRG フィラー含有モノフィラメントでは S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して、付着した *S. mutans* の明らかな低下が認められた。

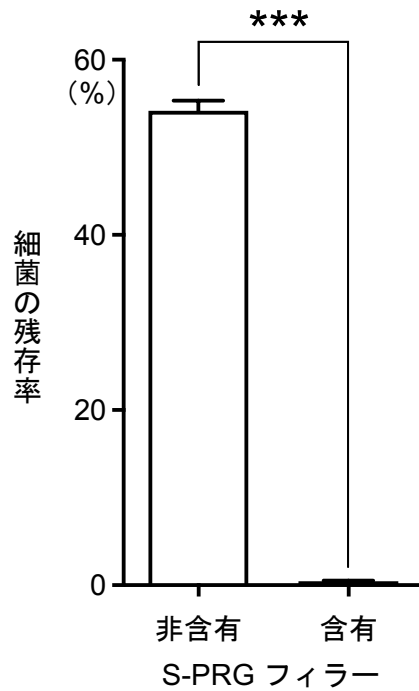


図11 ナイロン製モノフィラメントに対する *S. mutans* の剥離能の分析
(Student の *t* 検定; *** $P < 0.001$)

S-PRG フィラー含有ナイロン製モノフィラメントにおいて、ボルテックスによる *S. mutans* の剥離後に S-PRG フィラー含有モノフィラメントに残存した *S. mutans* 菌数は、S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して有意に低下した。

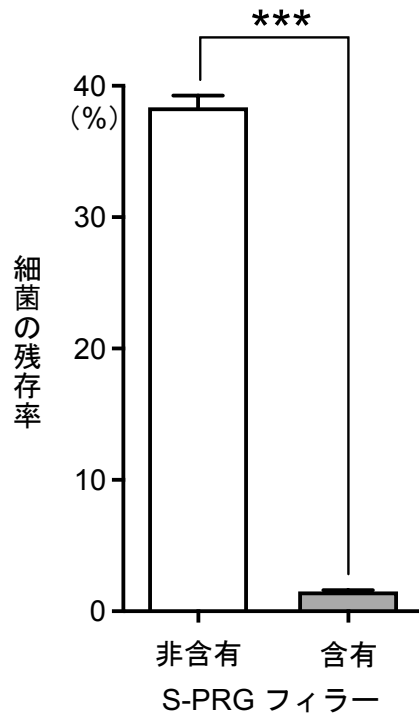


図12 ポリエステル製モノフィラメントに対する *S. mutans* の剥離能の分析

(Student の *t* 検定; *** $P < 0.001$)

S-PRG フィラー含有ポリエステル製モノフィラメントにおいて、ボルテックスによる *S. mutans* の剥離後に S-PRG フィラー含有モノフィラメントに残存した *S. mutans* 菌数は、S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して有意に低下した。

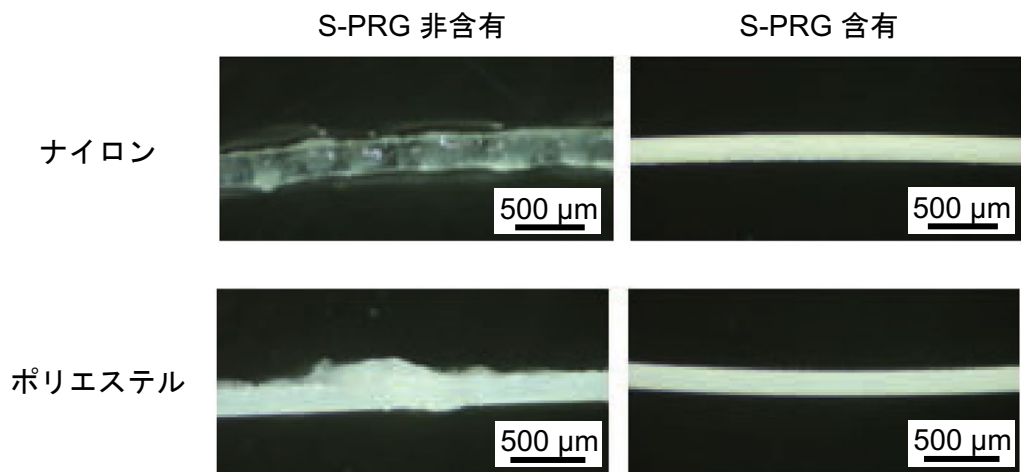


図13 *S. mutans* の剥離実験後のモノフィラメントの実体顕微鏡画像

ナイロン製およびポリエステル製モノフィラメントの両方で S-PRG フィラー含有モノフィラメントでは S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して残存する *S. mutans* の明らかな低下が認められた。

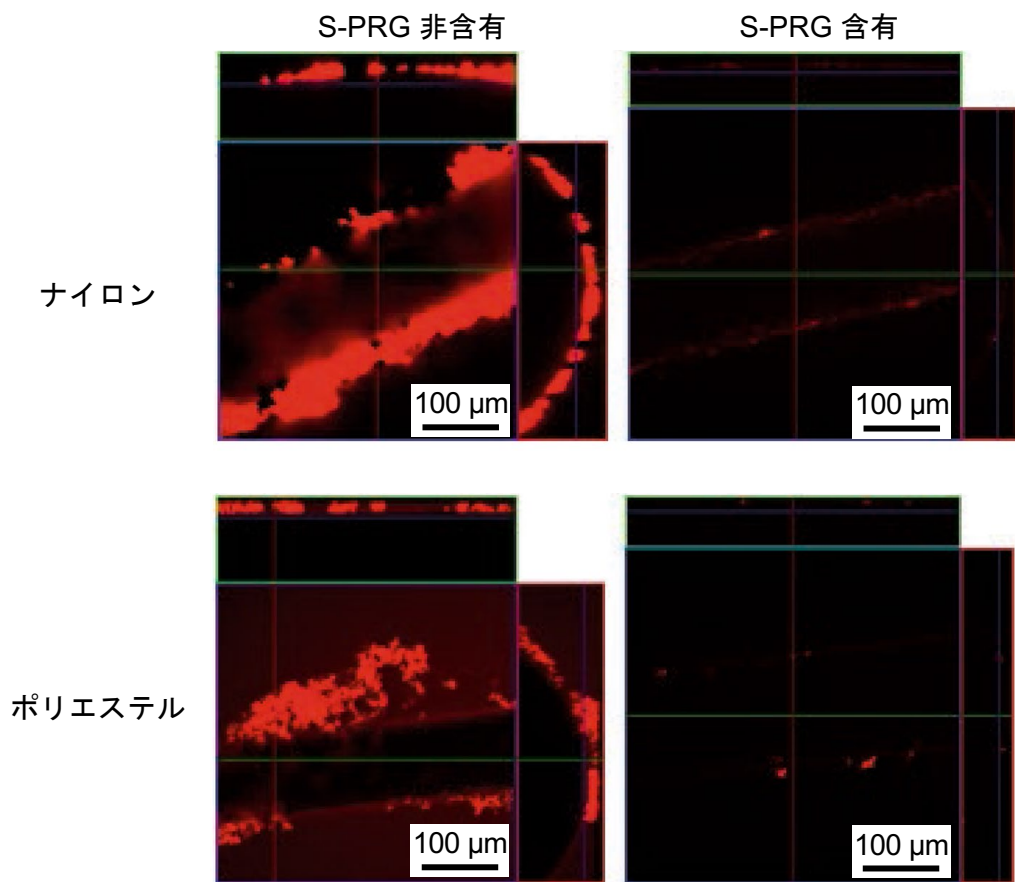


図14 *S. mutans*の剥離実験後のモノフィラメントの共焦点レーザー顕微鏡画像
(赤色：*S. mutans*)

ナイロン製およびポリエステル製モノフィラメントの両方で S-PRG フィラー含有モノフィラメントでは S-PRG フィラー非含有モノフィラメントと比較して残存する *S. mutans* の明らかな低下が認められた。

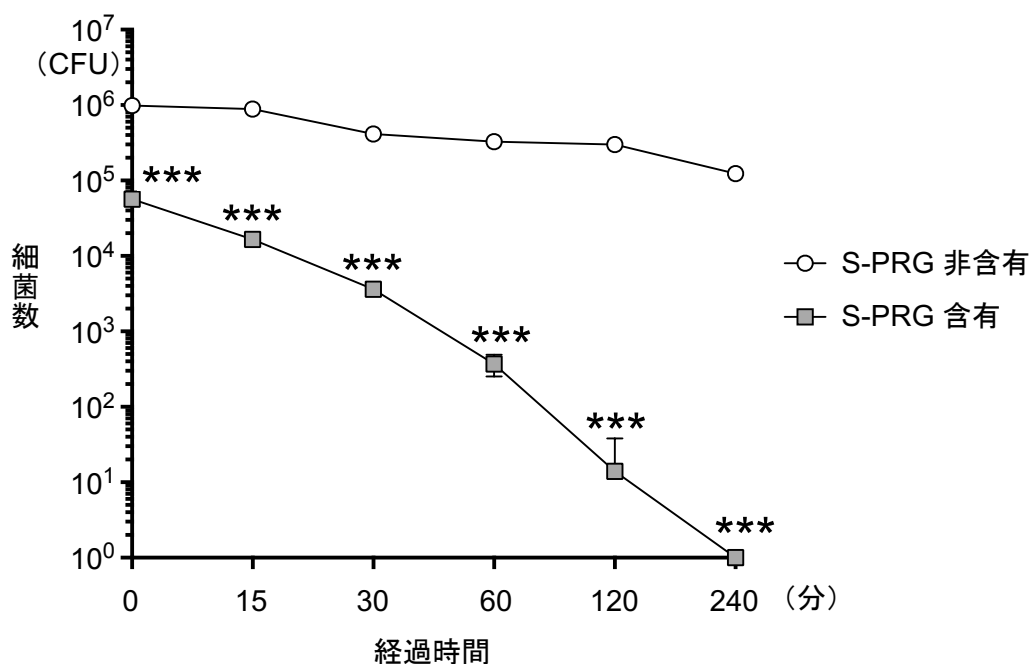


図15 ナイロン製モノフィラメント静置時の経時的菌数変化の分析

(Student の t 検定; *** $P < 0.001$)

S-PRG フィラー含有ナイロン製モノフィラメントでは、S-PRG フィラー非含有ナイロン製モノフィラメントと比較して *S. mutans* 菌数は各時間で有意に減少し、実験開始 240 分後には *S. mutans* は認められなくなった。

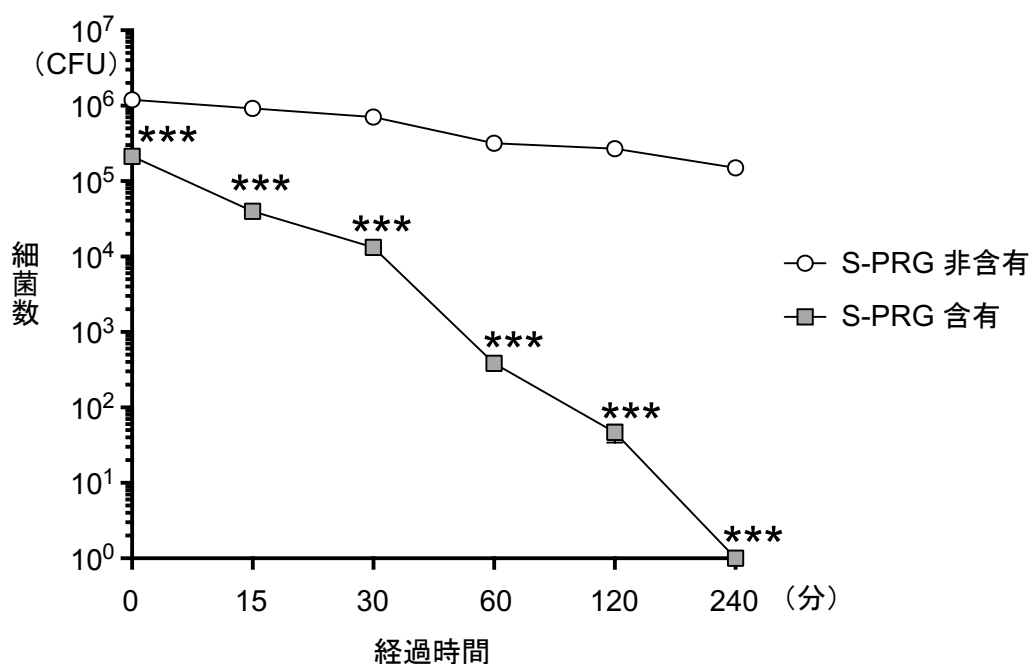


図16 ポリエステル製モノフィラメント静置時の経時的菌数変化の分析
(Student の t 検定; *** $P < 0.001$)

S-PRG フィラー含有ポリエステル製モノフィラメントでは、S-PRG フィラー非含有ポリエステル製モノフィラメントと比較して *S. mutans* 菌数は各時間において有意に減少し、実験開始 240 分後には *S. mutans* は認められなくなった。

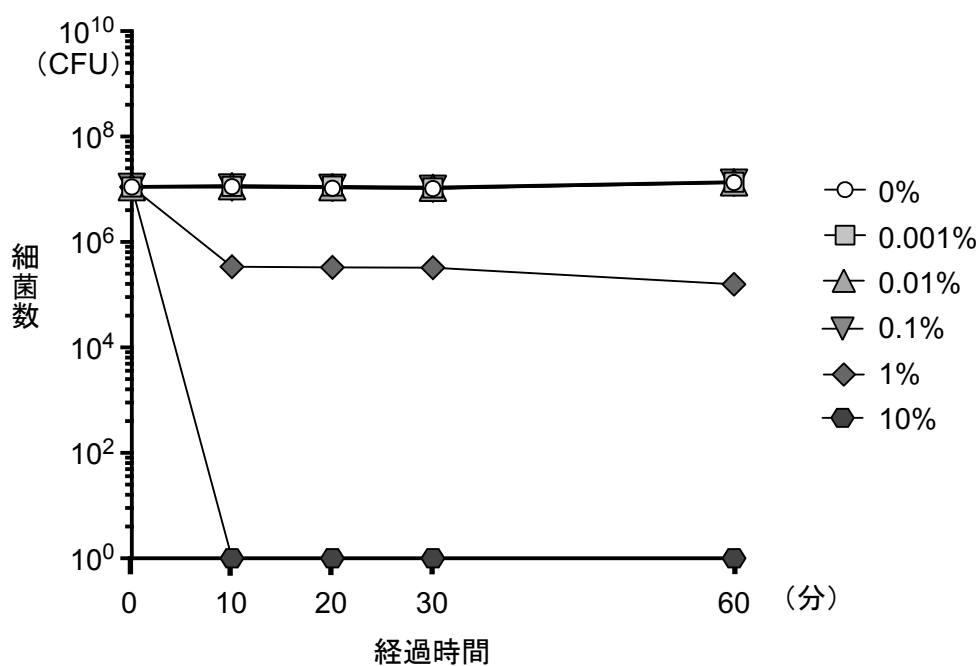


図17 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析

1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時では非添加群と比較して、添加 10 分後以降の各時間において *S. mutans* 菌数は減少した。また、10% 濃度の PRG ジェルペースト添加時には、添加 10 分後に全ての *S. mutans* が死滅した。

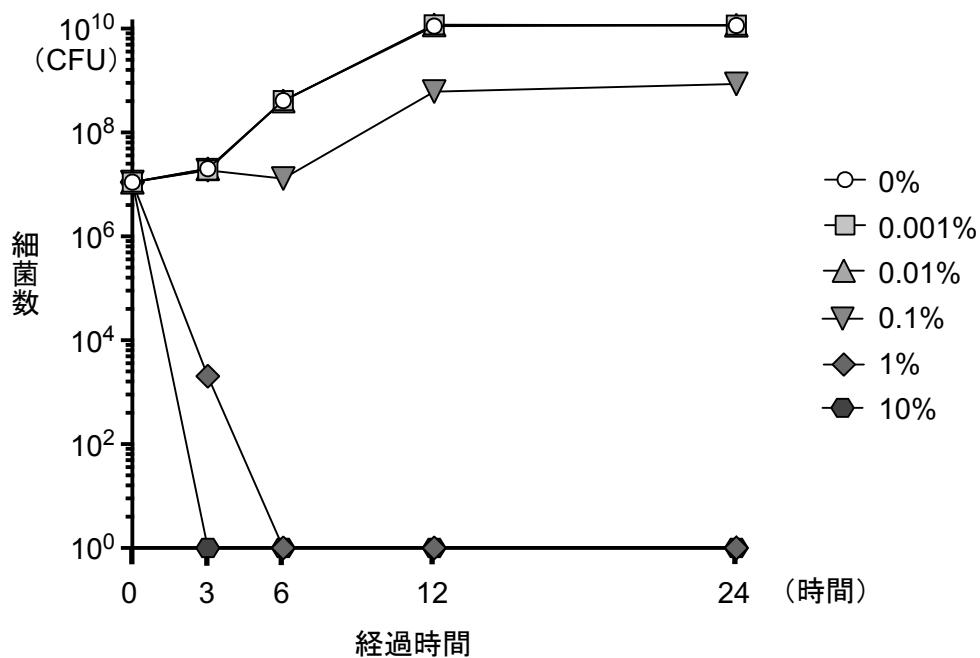


図18 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析

0.1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時では非添加群と比較して、添加 6 時間後以降の各時間において *S. mutans* の増殖能が低下した。また、1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時には、添加 6 時間後に全ての *S. mutans* が死滅した。

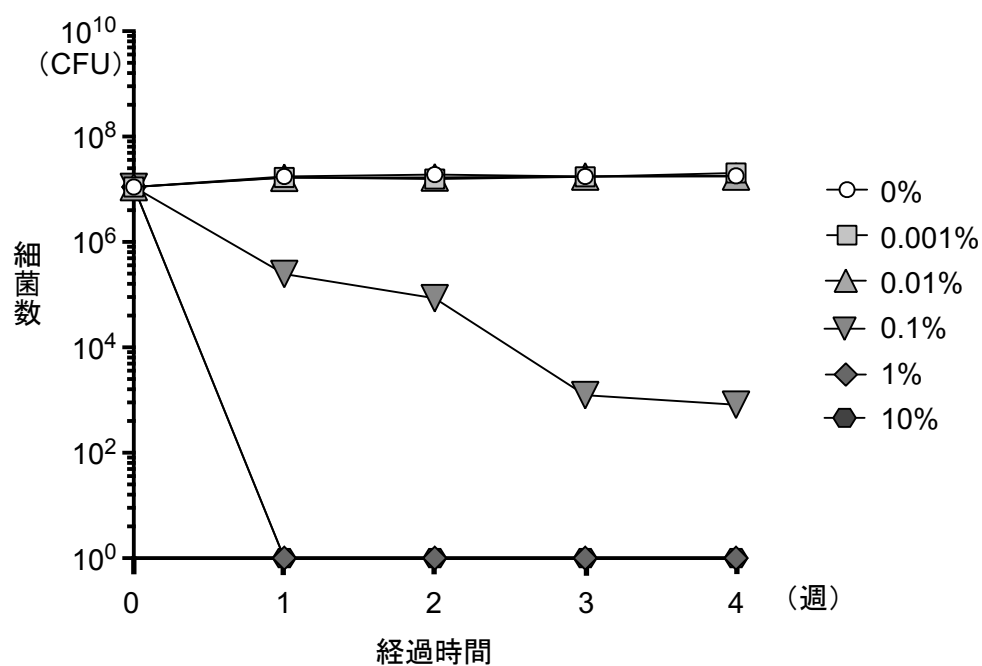


図19 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析
PRG ジェルペーストを 0.1% の濃度で添加時では非添加群と比較して、添加 1 週間後以降の各時間において *S. mutans* 菌数は減少した。

PRG ジェル
ペースト濃度

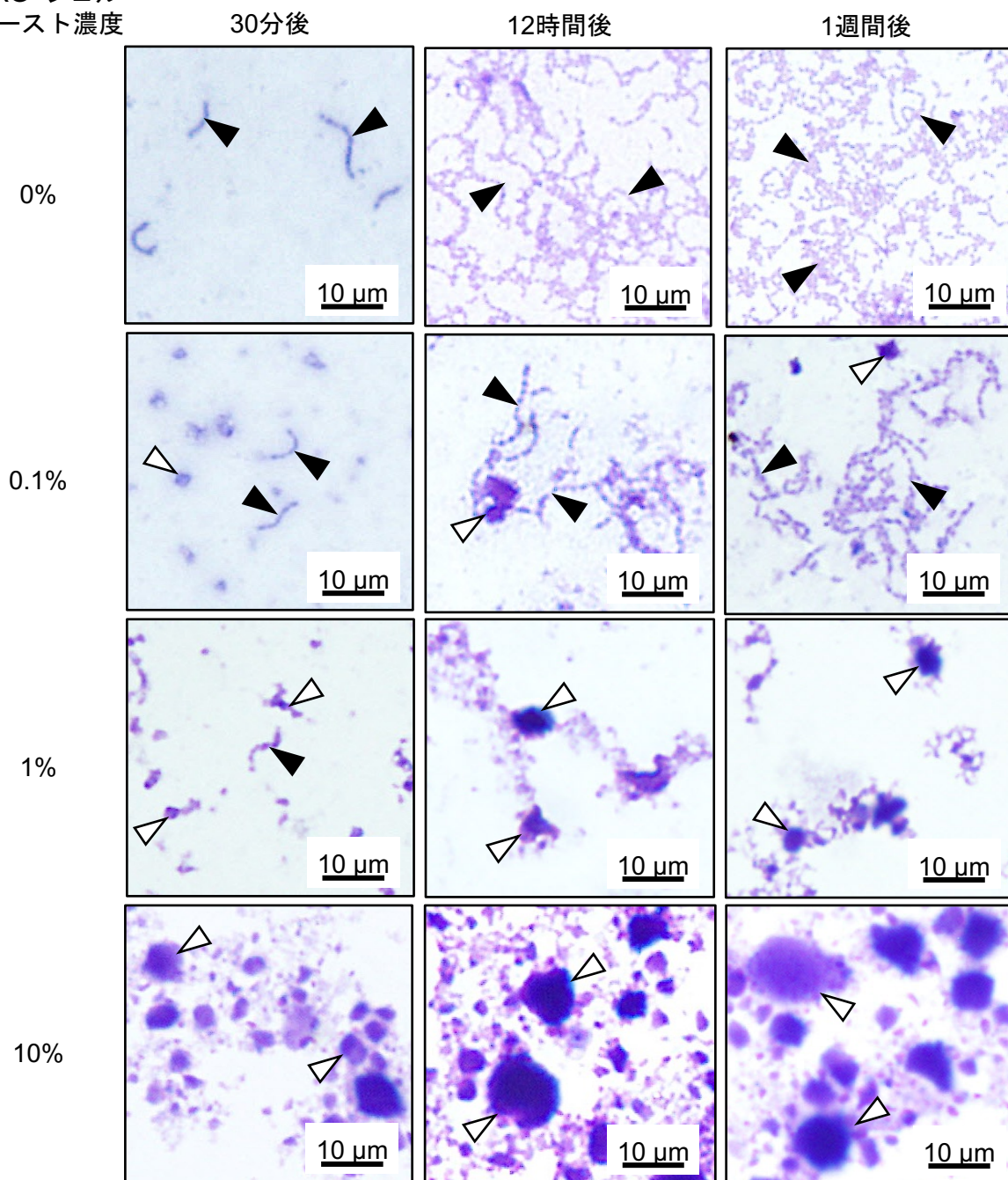


図20 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析
(実体顕微鏡画像) (白矢頭：ジェルペースト、黒矢頭：*S. mutans*)

0.1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時には、12 時間後および 1 週間後において、*S. mutans* の増殖能の低下が認められた。また、1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時には 12 時間後、10% 濃度の PRG ジェルペースト添加時には 30 分後に *S. mutans* が認められなくなった。

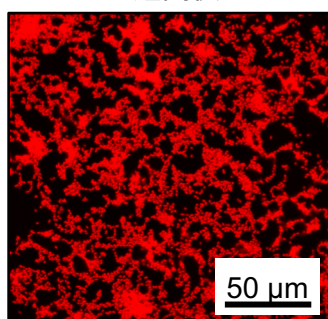
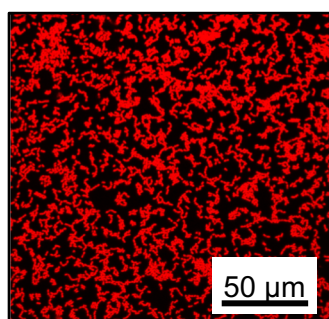
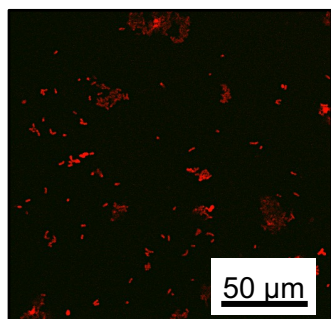
PRG ジェル
ペースト濃度

30分後

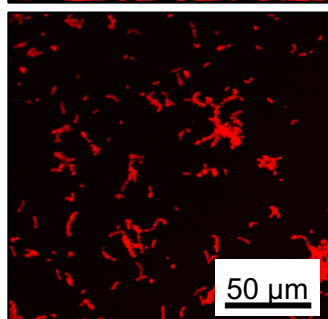
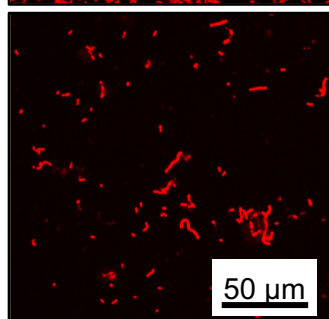
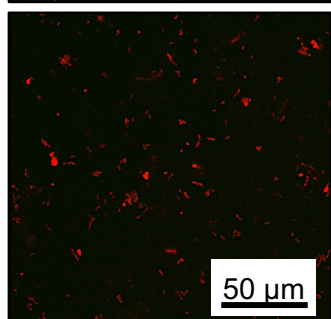
12時間後

1週間後

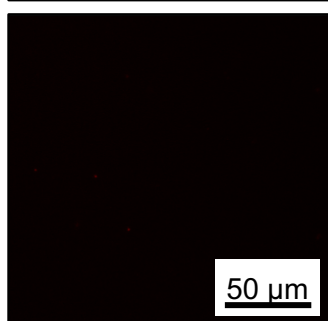
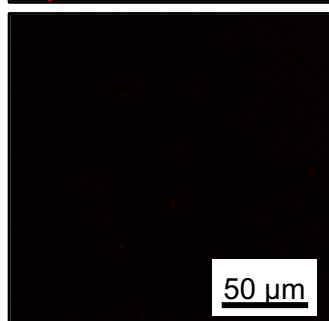
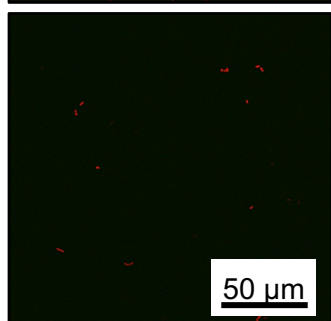
0%



0.1%



1%



10%

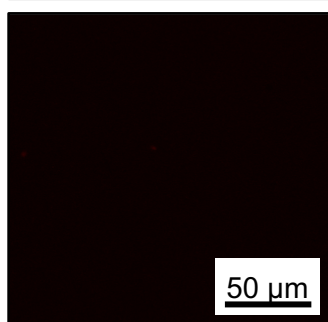
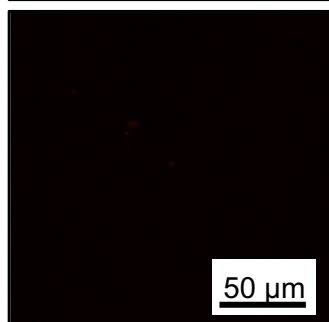
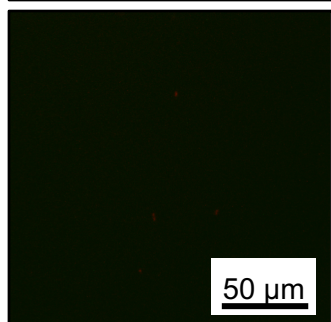


図21 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析
(共焦点レーザー顕微鏡画像) (赤色: *S. mutans*)

0.1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時には、12 時間後および 1 週間後において、*S. mutans* の増殖能の低下が認められた。また、1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時には 12 時間後、10% 濃度の PRG ジェルペースト添加時には 30 分後に *S. mutans* が認められなくなった。

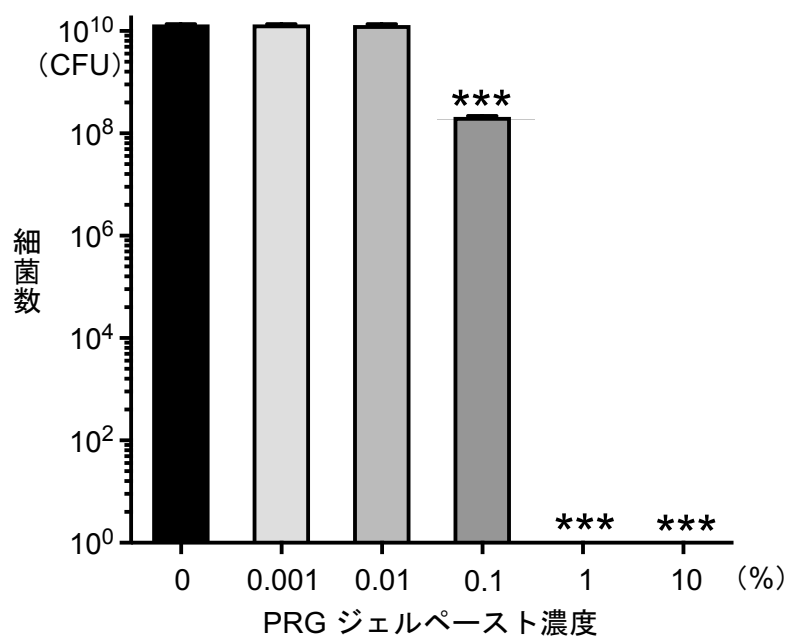


図22 スクロース存在下における PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析 (ANOVA の後 Bonferroni 法; *** $P < 0.001$)

スクロース存在下における *S. mutans* の増殖能は、0.1%、1% および 10% 濃度の PRG ジェルペースト添加群において非添加群と比較して有意に低下した。

PRG ジェルペースト濃度

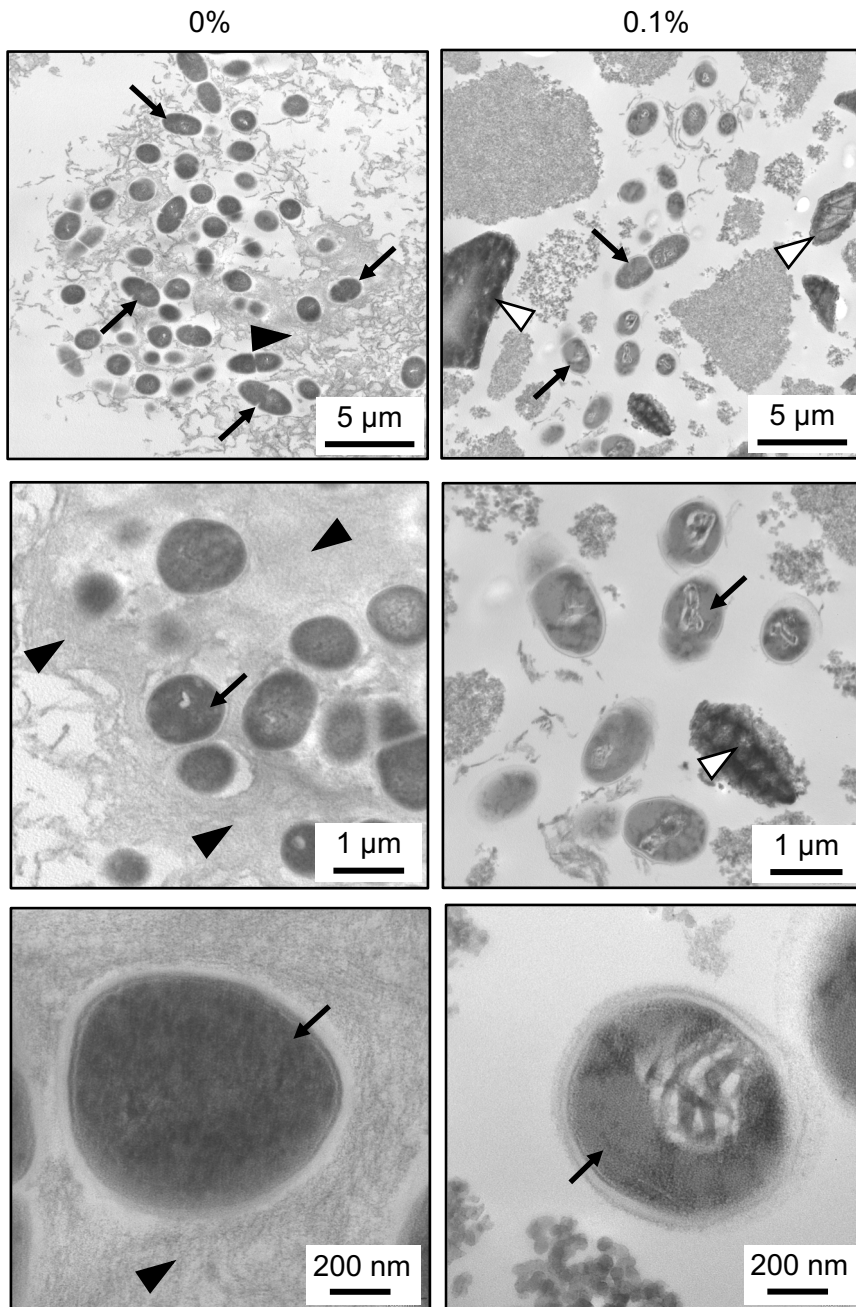


図23 スクロース存在下における PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析（透過型電子顕微鏡画像）（矢印： *S. mutans*、黒矢頭：不溶性グルカン、白矢頭：S-PRG フィラー）

PRG ジェルペースト非添加時では多数の *S. mutans* が観察され、細菌周囲には多量のグルカンが確認された。一方、0.1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時ではジェル成分の隙間においてのみ細胞質構造に変化を認める *S. mutans* が存在し、細菌の周囲にはグルカンの形成をほとんど認めなかった。

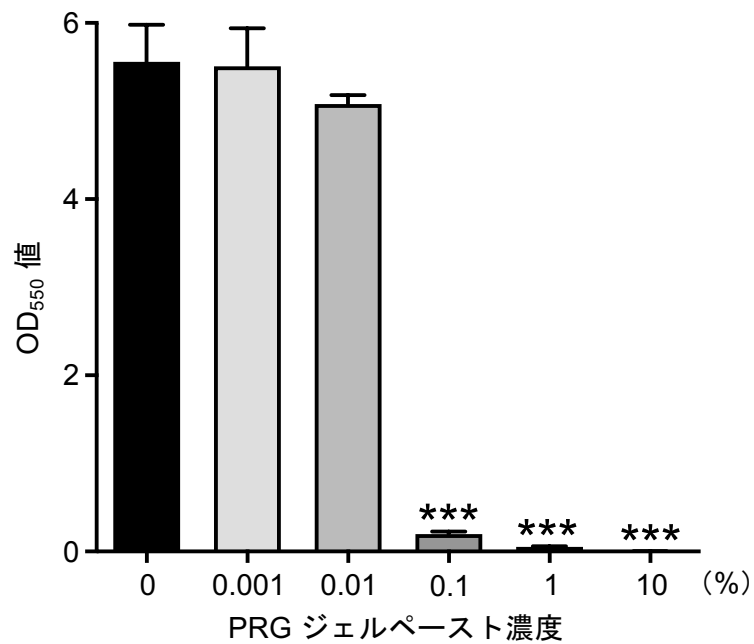
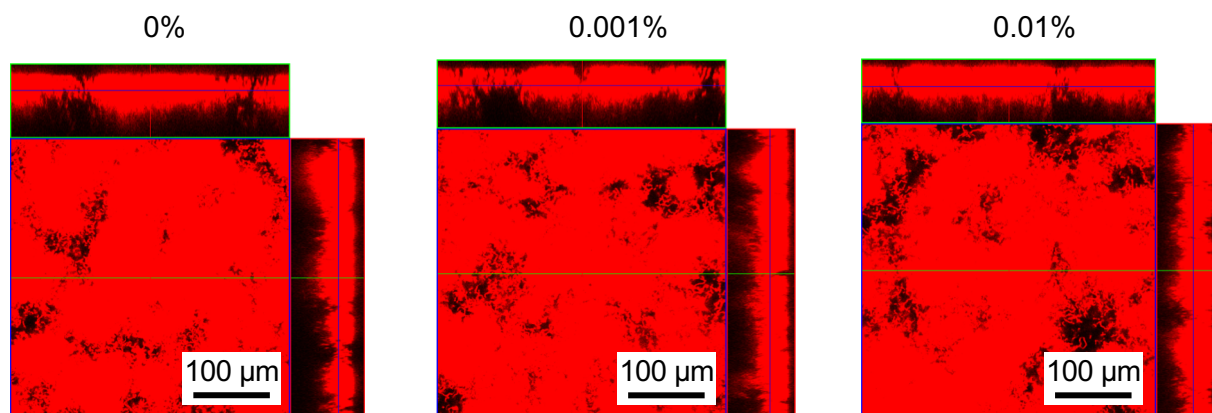


図24 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* のバイオフィルム形成能に対する抑制効果の分析（プレートを用いた分析）（ANOVA の後 Bonferroni 法; *** $P < 0.001$ ）
0.1%、1% および 10% 濃度の PRG ジェルペースト添加時において、*S. mutans* のバイオフィルム形成能は PRG ジェルペースト非添加時と比較して有意に低下した。

PRG ジェルペースト濃度



PRG ジェルペースト濃度

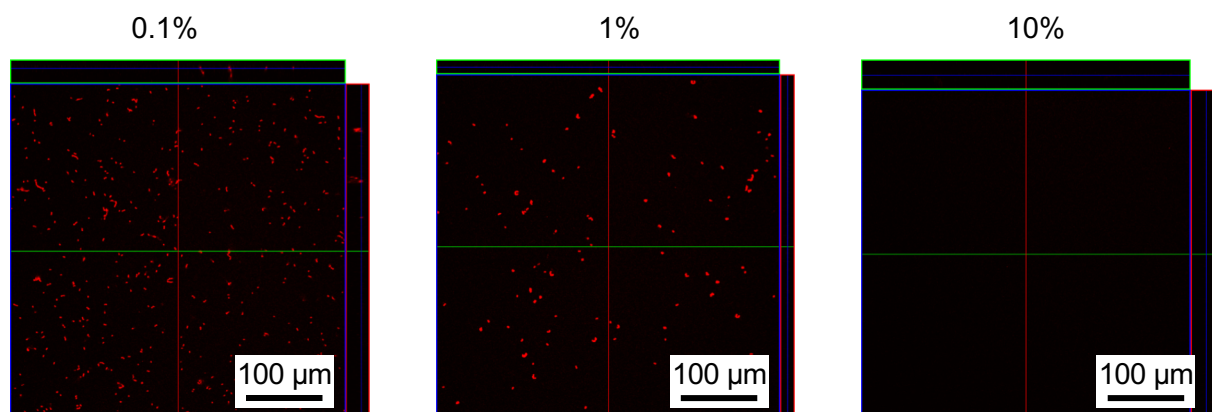


図25 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* のバイオフィーム形成能に対する抑制効果の分析（プレートを用いた分析、共焦点レーザー顕微鏡画像）（赤色：バイオフィーム）
0.1% および 1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時において *S. mutans* はほとんど認められなくなり、10% 濃度の PRG ジェルペースト添加時では *S. mutans* は全く認められなくなった。

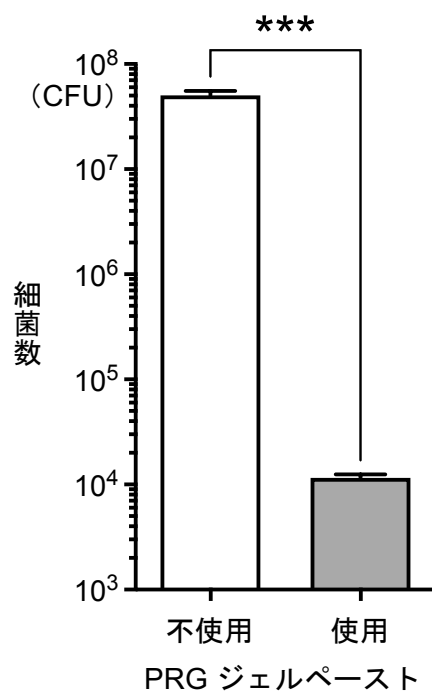


図26 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* のバイオフィーム形成能に対する抑制効果の分析（ウシエナメル質を用いた分析）（Student の t 検定; *** $P < 0.001$ ）

PRG ジェルペーストを用いて歯面処理を行った場合では、PRG ジェルペーストを用いなかった場合と比較して、ウシエナメル質に付着した *S. mutans* 菌数は有意に減少した。

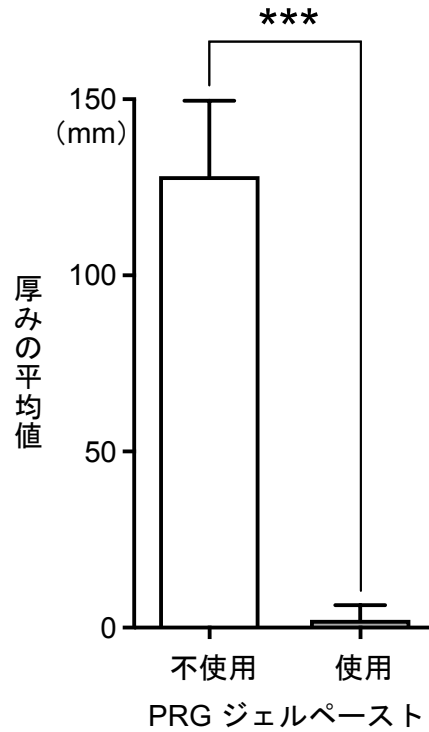


図27 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* のバイオフィーム形成能に対する抑制効果の分析（ウシエナメル質を用いた分析）（Student の *t* 検定; *** $P < 0.001$ ）

PRG ジェルペーストを用いて歯面処理を行った場合では、PRG ジェルペーストを用いなかった場合と比較して、ウシエナメル質に付着した *S. mutans* のバイオフィーム形成能は有意に低下した。

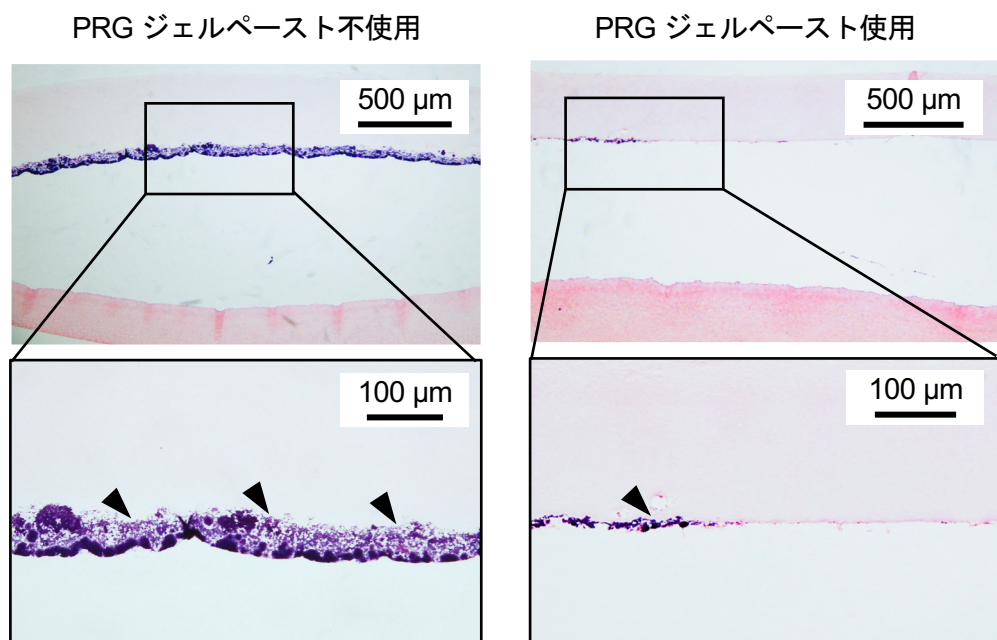
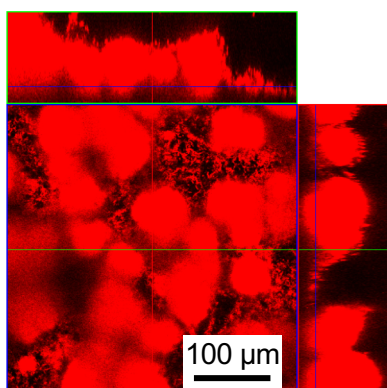


図28 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* のバイオフィーム形成能に対する抑制効果の分析（ウシエナメル質を用いた分析、実体顕微鏡画像）（矢頭：バイオフィーム）
PRG ジェルペースト不使用時のウシエナメル質表面には均一に厚いバイオフィームが確認されたが、PRG ジェルペースト使用時にはバイオフィームは少量しか観察されなかった。

PRG ジェルペースト不使用



PRG ジェルペースト使用

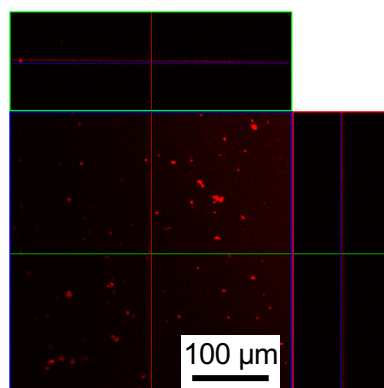


図29 PRG ジェルペースト添加時における *S. mutans* のバイオフィーム形成能に対する抑制効果の分析（ウシエナメル質を用いた分析、共焦点レーザー顕微鏡画像）（赤色：バイオフィーム）

PRG ジェルペースト不使用時のウシエナメル質表面には均一に厚いバイオフィームが確認されたが、PRG ジェルペースト使用時にはバイオフィームは少量しか観察されなかった。

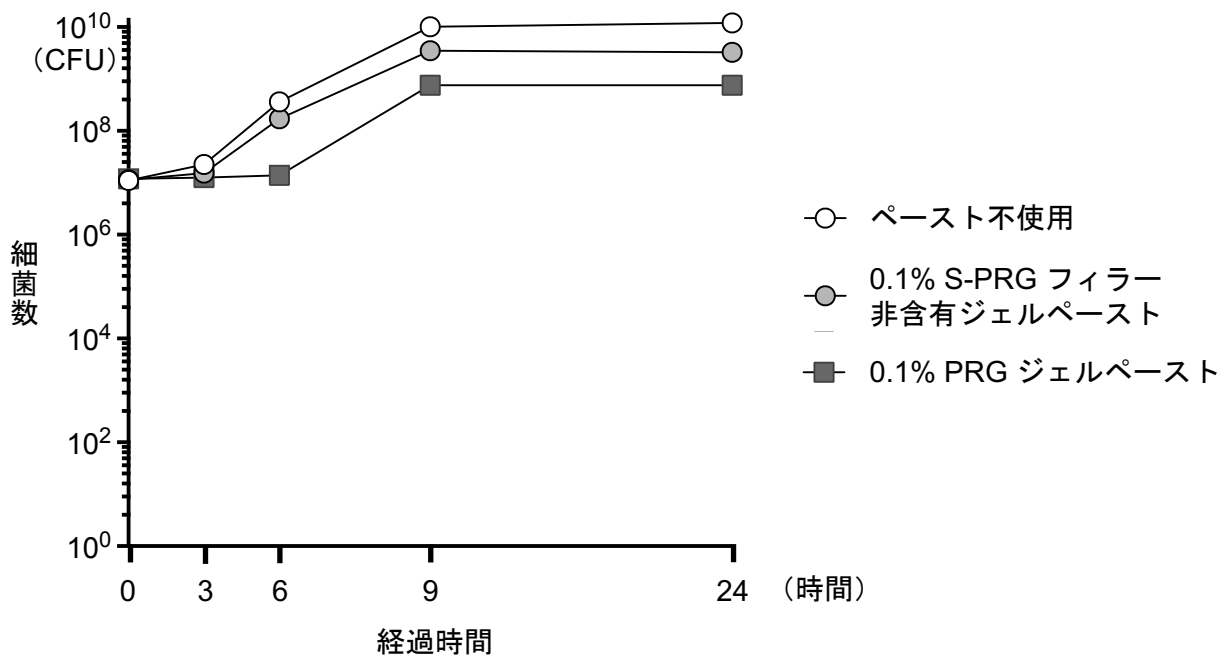


図30 0.1% 濃度のジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析
0.1% 濃度の S-PRG フィラー非含有ジェルペーストではペースト非添加時と比較して、*S. mutans* の増殖能が抑制された。また、0.1% 濃度の PRG ジェルペースト添加時にはさらに *S. mutans* の増殖能に対する高い抑制効果を示した。

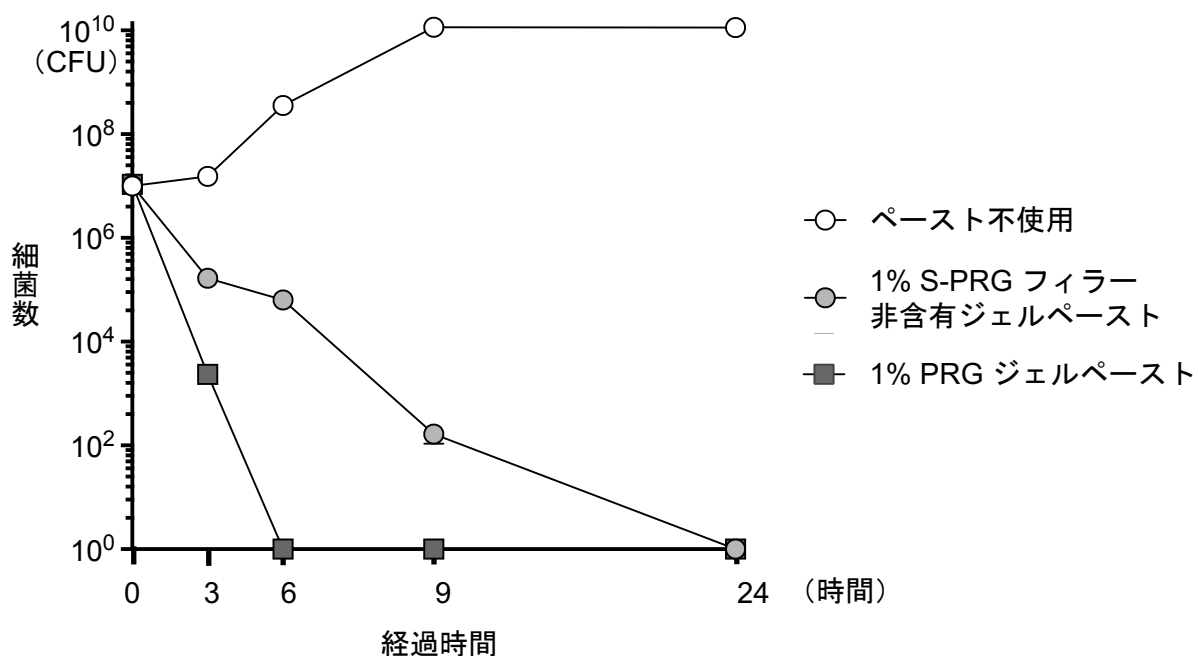


図31 1% 濃度のジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析
1% 濃度の S-PRG フィラー非含有ジェルペースト添加時では 24 時間後に *S. mutans* が死滅したのに対し、1% 濃度の PRGジェルペースト添加時では 6 時間で *S. mutans* が死滅した。

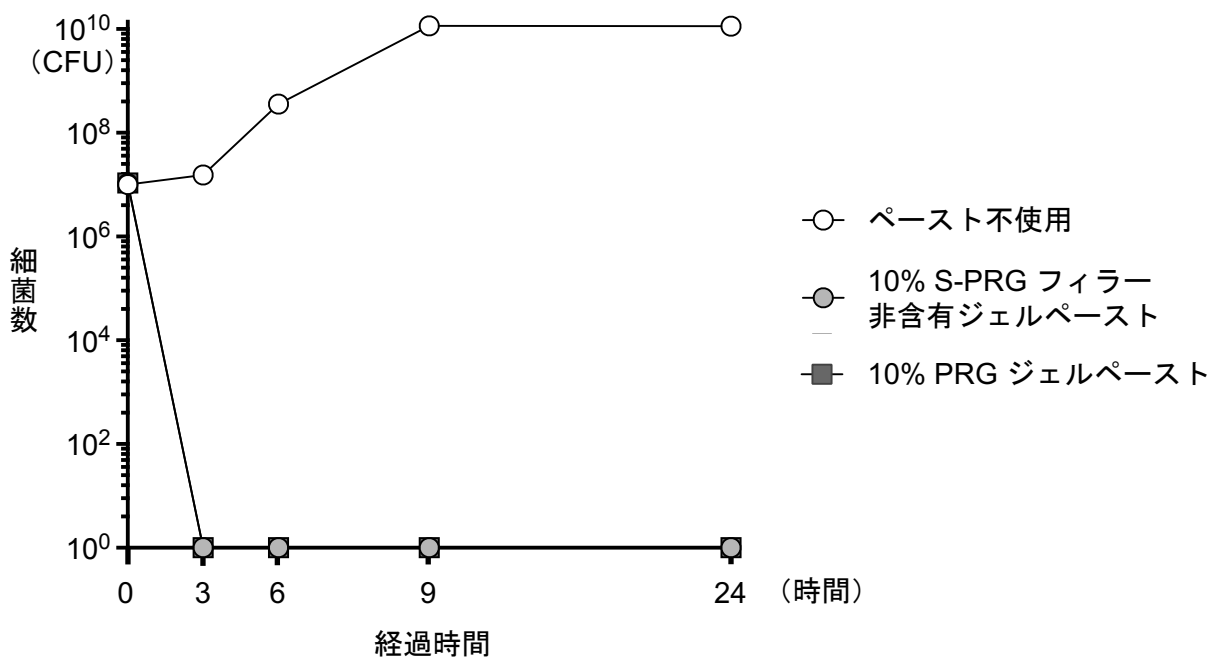


図32 10% 濃度のジェルペースト添加時における *S. mutans* の増殖能に対する抑制効果の分析
 10% 濃度の ジェルペースト添加時においては、S-PRG フィラーの有無にかかわらず 3 時間で *S. mutans* は死滅した。

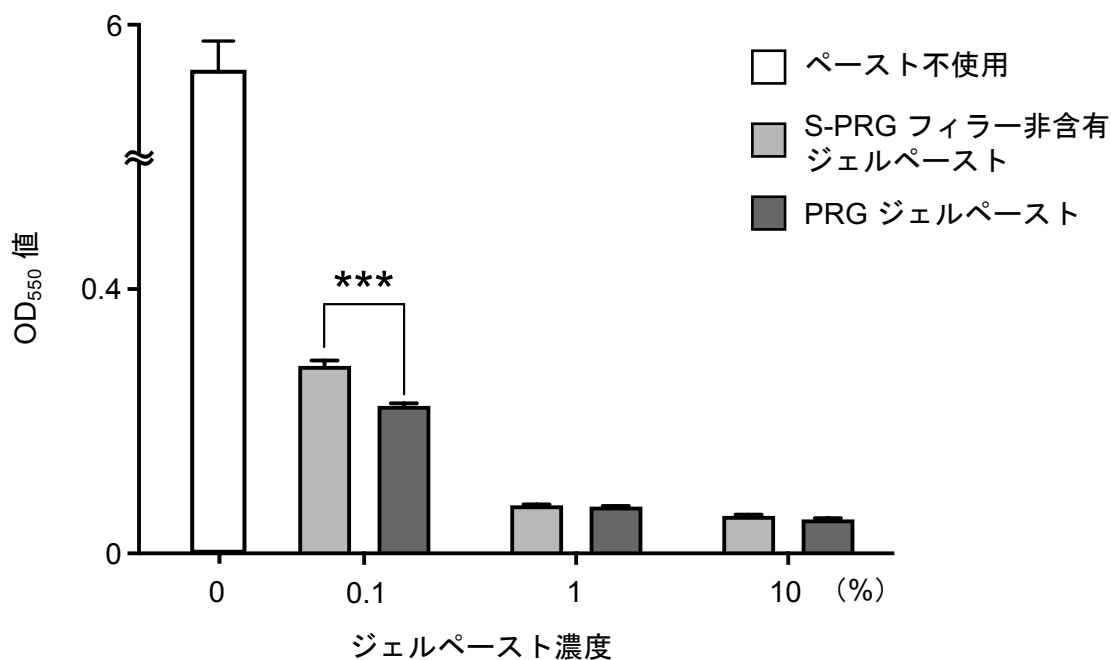


図33 ジェルペースト添加時における *S. mutans* のバイオフィルム形成能に対する抑制効果の分析（プレートを用いた分析）（Student の t 検定; *** $P < 0.001$ ）

各ペーストを 0.1% の濃度で添加した場合において、PRGジェルペースト添加時では、S-PRG フィラー非含有ジェルペースト添加時と比較して、*S. mutans* のバイオフィルム形成能は有意に低下した。

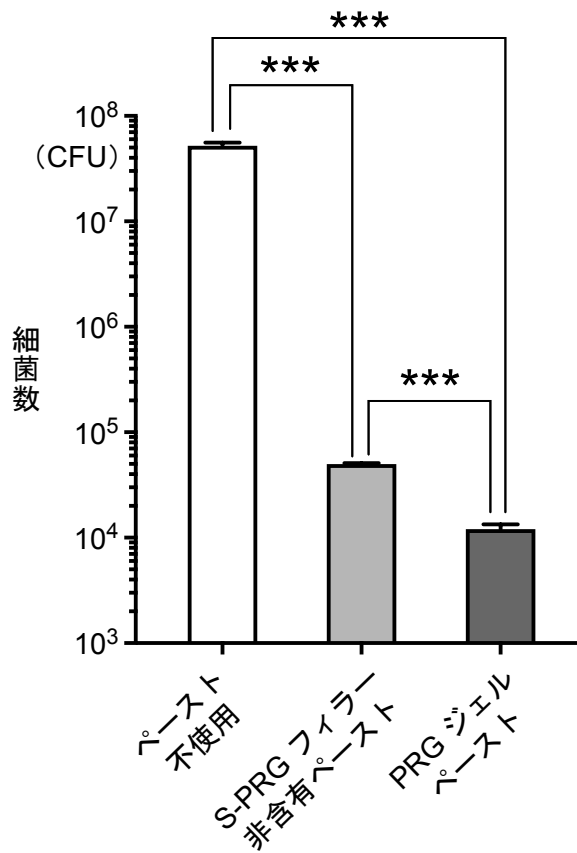


図34 ジェルペースト添加時における *S. mutans* のバイオフィルム形成能に対する抑制効果の分析（ウシエナメル質を用いた分析）（ANOVA の後 Bonferroni 法; *** $P < 0.001$ ）

ジェルペーストで歯面処理を行った場合、S-PRG フィラーの有無にかかわらず *S. mutans* のバイオフィルム形成能は有意に低下した。特に、PRG ジェルペースト使用時では S-PRG フィラー非含有ジェルペースト使用時と比較して、バイオフィルム形成能は有意に低下した。