

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 蝕治療で使用される歯科材料は、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(フルオロボ 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 層の間に安定したグ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、グ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(BO₃³⁻)、アルミニウムイオン(Al³⁺)、ケイ酸イオン (SiO₃²⁻) およびストロンチウムイオン(Sr²⁺)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

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

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)。

1

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℃で 18 時間、MSB 寒天培地では窒素 95%、炭酸 5%の条件下で 37℃で 48 時間嫌気的に培養した。

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、BO₃³⁻、Al³⁺、SiO₃²⁻、 Sr²⁺、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 時間撹拌することにより、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)、BO₃³⁻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 有する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 × 10⁷ 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℃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 1.0×10⁷ 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 μL 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 1.0×10⁷ 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℃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 のバイオフィル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

バイオフィルム形成量の測定は、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 1.0×10⁷ 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 µL ずつ 96 穴プレートに分注し、37℃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ルムを 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 µL 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、バイオフィルムを 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 ル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 1.0×10⁷ CFU/ml に調整した *S. mutans* 菌 液にウシエナメル質を浸漬し、37℃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* のバイオフィルムを観察するために、*S. mutans* のバイオフィルムを形成さ 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 よるバイオフィルムを、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。

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1.2×10⁵ 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 フィラー含有モノ

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 ースト添加時において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(図 23)。一方で、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。

3) S. mutansのバイオフィル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 添加時ではわずかに S. mutans の存在を認めたが、10%濃度の PRG ジェルペースト添加 時では 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)、バイオフィル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ルムが確認 されたが、PRG ジェルペースト使用時にはバイオフィル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 ト添加時で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 は死滅した(図 31)。 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 時間後に S. mutans は死滅した(図 32)。

(2) S. mutansのバイオフィル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 (P<0.001)(図 33)。また、ウシエナメル質表面におけるバイ オフィルム形成能は、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 ィルム形成能が有意に低下した (P<0.001)。 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 一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 およびバイオフィル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ル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ルムアッセイを改変して、モノフ ィラメント上に S. mutans のバイオフィル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、バイオフィル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 ィル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ル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* のバイオフィル 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 ィル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。

- 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 科ロ腔科学専攻ロ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ロ腔科学専攻ロ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 歯学研究科ロ腔科学専攻ロ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 new lyformulated 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* µCT 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. Schmoeckel, 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 prereacted 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、BO₃³⁻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時的変化 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継時的変化 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。



ポリエステル

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。



ポリエステル

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。



 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。



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。



100 µm 100 µm 100 µm

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、共焦点レーザー顕微鏡画像)(赤色:バイオフィルム) 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。

PRG ジェルペースト濃度



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)(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)(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 のバイオフィルム形成能は有意 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、実体顕微鏡画像) (矢頭:バイオフィルム) 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ルムが確認 されたが、 PRG ジェルペースト使用時にはバイオフィル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、共焦点レーザー顕微鏡画像)(赤色:バイオフィルム)

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ルムが確認されたが、PRG ジェルペースト使用時にはバイオフィル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ではさらに 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。