

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者	清水 翔二郎
論 文 審 査 委 員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 二階堂 徹 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 玉置 幸道 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 石神 元
論 文 題 目	テオブロミンおよび S-PRG フィラー含有歯面コーティング材の 細菌付着性と抗菌性の評価
論文内容の要旨	<p>【目 的】</p> <p>う蝕は歯質表面に付着した細菌が産生する酸の脱灰によって生じるため、細菌の初期付着とそれに次ぐ脱灰を阻止できれば、う蝕の発生を抑制することが可能となる。S-PRG フィラー含有歯面コーティング材の塗布は、歯を保護し、カリエスリスクを低下させるために Minimal Intervention Dentistry に合致する方法である。テオブロミンはカカオの一成分であり、歯質の再石灰化と強化を促進し、さらにテオブロミンを S-PRG フィラー含有歯面コーティング材に添加することで、脱灰歯質の再石灰化効果が報告されている。そこで本研究では、テオブロミンと S-PRG 含有歯面コーティング材を試作し、その細菌付着性と抗菌性について検討した。</p> <p>【材料および方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 試作コーティング材の組成：試作コーティング材は、ベース（4 種類）と PRG バリアコートアクティブ（松風、京都）とを等量混和して調整した。ベースには、各々添加材料としてシリカ (SC)、S-PRG (PR)、シリカ+5.0 wt%テオブロミン (SC/TB)、または S-PRG+5.0 wt%テオブロミン (PR/TB) を用いた。 試料の作製：試作コーティング材を金属製型枠に填入し、スライドガラスで圧接後、20 秒間光硬化させた。さらに#2000 の耐水研磨紙で研磨し、超音波洗浄した。 試料表面の SEM 観察：試作コーティング材を 3 群；研磨群、純水浸漬群、人工唾液浸漬群に分けた。試料はオスミウム処理後、走査電子顕微鏡 (SEM, S-4500, 日立, 茨城) を用いて観察した。 細菌付着性試験：TSBY 寒天培地を用いて <i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175 を培養後、[methyl-³H]thymidine (ARC) にてラベルした。その後、遠心 (12,000 g) で 15 分間、4 °C で集菌し、PBS にて洗浄後、1×10^8 CFU/ml の菌液を調整した。試料は研磨群、純水群または人工唾液群とし、各試料 (4×4×1 mm) を浸漬し、37 °C 2 時間振盪後、PBS で 3 回洗浄した。その後、全自動試料燃焼装置 (ASC-113B, 日立, 東京) を用いて試料に付着した菌体を完全燃焼させ、³H₂O として回収し、液体シンチレーションカウンター (AccuFLEX LSC-8000, 日立, 東京) で放射能を測定した。 抗菌性試験：テオブロミン (富士フィルム和光純薬, 大阪) と EGCG (長良サイエンス, 岐阜) を最終濃度 0, 0.2, 2, 4 mM の TSBY 寒天 (Cont.) に調整した。PBS にて 1×10^3 CFU/ml に調製した <i>S. mutans</i> 培養液 (100 μl) を各寒天培地上に塗布後、37 °C 24 時間嫌気培養して Colony

Forming Unit (CFU) を測定した。

6. テオブロミン溶出量の測定：試料 (10×10×1 mm) を 2 個ずつ純水に浸漬後、37 °C で 2 時間静置後、溶出液から試験体を取り出し、溶出液を 5 倍希釈した。高速液体クロマトグラフィーにて送液装置 (alliance e2695 Separations Module, Waters), 検出器 (2998 Photodiode Array Detector, Waters), カラム (4.6×75 mm, 粒子サイズ 2.5 μm, XBridge C18, Waters) で測定した。

7. イオン徐放量の測定：テオブロミン溶出量と同様に溶出液を作製した。F を除く各種イオン徐放量 (Na, B, Al, Si, Sr) は、ICP 発光分析法 (ICPS-8000, SHIMADZU Co.) にて測定し、各元素濃度から換算した。F はフッ素電極法 (Fluoride ion electrode: Model 9609BN, pH/ion meter: Model Orion 2115010 Dual Star, Orion Research) にて測定した。

8. 統計処理：細菌付着性試験のデータ解析は、二元配置分散分析 (ANOVA) の後、Bonferroni 法を用いて行った。一方、抗菌性試験の結果の解析は、一元配置分散分析後、Tukey 検定を行った。イオン徐放量の測定結果は、Bonferroni 補正をした Wilcoxon の順位和検定、テオブロミン徐放量の結果の解析には Student's *t*-検定を用いた。いずれも有意水準 5 % にて統計処理を行った。

【結 果】

1. SEM 観察：研磨群と純水群の試料表面においては、いずれの試料表面にフィラーの脱落と気泡が認められた。一方、人工唾液群では試料表面がすべて被覆されて滑沢な面が観察された。

2. 細菌付着性試験：研磨群、純水群、人工唾液群のいずれにおいても、テオブロミン添加の有無による細菌付着量に差は認められなかった。一方、S-PRG 配合コーティング材においては、シリカ配合コーティング材と比べて細菌付着量の有意な減少が認められた。

3. 抗菌性試験：抗菌性は濃度依存性であり、0.2 mM においてテオブロミン、EGCG とともに CFU の有意な減少が認められた。一方、2 mM, 4 mM においてはテオブロミン、EGCG とともに CFU の有意な減少が認められ、4 mM においてはテオブロミンの抗菌性は EGCG に比べて低かった。

4. テオブロミン溶出量：テオブロミンを配合する 2 種の歯面コーティング材からのテオブロミン溶出量は、2 種の配合フィラーの有無によるテオブロミン溶出量に有意差は認められなかった。

5. イオン徐放量：SC および SC/TB の B, Sr, F については検出限界以下と判断した。PR および PR/TB による各イオン徐放量に有意な差は認められなかった。

【考 察】

細菌付着性試験の結果、テオブロミンに細菌付着抑制効果は認められず、一方 S-PRG には効果があることがわかった。一方、抗菌性試験においては、テオブロミンは水に難溶性であるため、2 mM 添加試料においては EGCG よりも高い抗菌性を示したが、4 mM ではその効果に変化はなかった。試作コーティング材からのテオブロミンの溶出が確認されたが、S-PRG からの各イオンの徐放に影響しないことがわかった。本研究結果から、テオブロミンは再石灰化や歯質強化のみならず、抗菌性を有し、共存する S-PRG の効果を阻害しないことから、新規う蝕抑制材料の開発への応用が期待される素材であることが示唆された。

【結 論】

テオブロミンおよび S-PRG フィラー含有コーティング材を試作し、細菌付着性と抗菌性について検討し、以下の結論を得た。

1. テオブロミンの添加によるコーティング材の細菌付着性に影響は認められなかった。
2. テオブロミンは 2 mM 以上で抗菌性が認められた。
3. 試作コーティング材からテオブロミンおよび S-PRG フィラー由来のイオンの溶出が確認されたが、テオブロミン添加は各種イオンの溶出に影響を及ぼさないことがわかった。
4. テオブロミンは、う蝕抑制機能を備えた新規材料の開発に応用可能であることが示唆された。