



Title	ナノカーボン材料「graphene oxide」による耐水透明コーティングと歯面の抗菌化
Author(s)	宮治, 裕史
Citation	北海道歯学雑誌, 44, 6-9
Issue Date	2023-09-15
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/90477">http://hdl.handle.net/2115/90477</a>
Type	article
File Information	44_02.pdf



[Instructions for use](#)

## 最新の歯学

# ナノカーボン材料「graphene oxide」による 耐水透明コーティングと歯面の抗菌化

## Water-resistant transparent coating with nanocarbon material "graphene oxide" and antibacterial modification of the tooth surface

北海道大学 大学院歯学研究院 臨床教育部

宮 治 裕 史

### はじめに

根面う蝕や歯周病などの口腔感染性疾患は、歯を失う大きな原因となっており、高齢者の健康寿命の延伸、QOLの向上のためにも対策が必要である。高齢者は一般的に身体機能や認知機能の低下により歯ブラシによる毎日の口腔ケアの維持が困難な場合が多いことから、口腔ケアの補助を目的とした洗口剤の使用が望まれる。しかし、多くの洗口剤に含まれる塩化セチルピリジニウム (CPC) 等のカチオン性界面活性剤 (CSAA) や抗菌性有機化合物は、歯面に強固に付着できないため水で容易に洗い流されることから、洗口しても長期間に渡る抗菌効果は期待できない<sup>1,2)</sup>。したがって、湿潤環境でも長期的に抗菌効果を維持できる新しい抗菌コーティング法が求められている。近年著者はナノカーボン材料である「graphene oxide (GO, 酸化グラフェン)」を用いた新しい抗菌コーティング法を開発し、水洗してもCSAAをコーティング面に保持し抗菌効果が持続することを実証した。

### 酸化グラフェン超薄膜の抗菌性のメカニズム

GOは、厚さ約1 nm、幅数 $\mu\text{m}$ の炭素の単層ナノシートで、黒鉛 (グラファイト) を強力な酸化剤と超音波処理して層間剥離することで得ることができる<sup>3)</sup>。酸化処理の結果、GOの表面にはエポキシ基、ヒドロキシル基、カルボン酸基など、さまざまな酸素含有官能基が導入されており、その結果様々な分子と強く相互作用することができる。またGOは大きなアスペクト比 (幅と厚さの比) を有することから、高い表面間相互作用 (ファンデルワールス力、イオン相互作用など) により、様々な基材に良好に接着することができる。

GOとCSAAによる抗菌コーティングの施術方法とメカニズムを図1および2に模式的に示す<sup>4)</sup>。まず基板にGO分散液を塗布し、その後水洗して余剰なGOを基材から除去

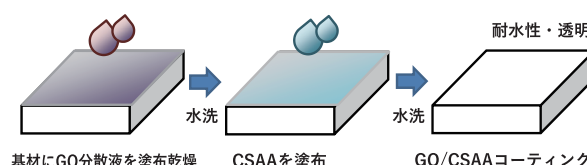


図1 GO/CSAA耐水透明コーティングの施術方法.

するが、基材に最も近いGOは強い吸着力により脱落せずに基材表面に保持される。図3の電子顕微鏡像はガラス基材上に付着した単層GOシートの様子である。これらは肉眼的には透明であり、基材の色味を損なうことはない。GOとの相互作用が強い基材の場合、GO塗布のみで基材に容易に付着するが、ポリエチレンテレフタレートなど疎水性の強い基材の場合は、先に高濃度のGO分散液を塗布後、十分に乾燥して水分を飛ばすことでGOが基材に密着し、同様に透明にコーティングすることが可能である。

次にGOコーティング面にCSAAを付着させる。これにはCSAA溶液を塗布するだけで容易にCSAAとGOの複合体が形成される。基材に付着したGOには酸素官能基が豊富に残留しており、アニオン-カチオン相互作用によってCSAAと強く結合してGO/CSAA複合体を形成し、その後水洗工程を経ても除去されることはない。図4はGOとCSAAの強固な結合力を示したものである。GO分散液にCSAAの一種である塩化ベンザルコニウム (BAC) を添加すると図のように瞬時に凝集することから、GOがBACと結合したことを意味している。その後GO/BACの凝集塊を強く水洗したが、数回水洗しても再分散することなく、BACがGOから外れないことが示唆された。さらにGOの六印環は、 $\pi$ - $\pi$ スタッキングやCH/ $\pi$ 相互作用などの他の結合効果を発揮することが明らかとなっており、CSAAの付着性はこれらの複合によるものと考えられる<sup>5-8)</sup>。

ナノカーボン材料「graphene oxide」による  
耐水透明コーティングと歯面の抗菌化

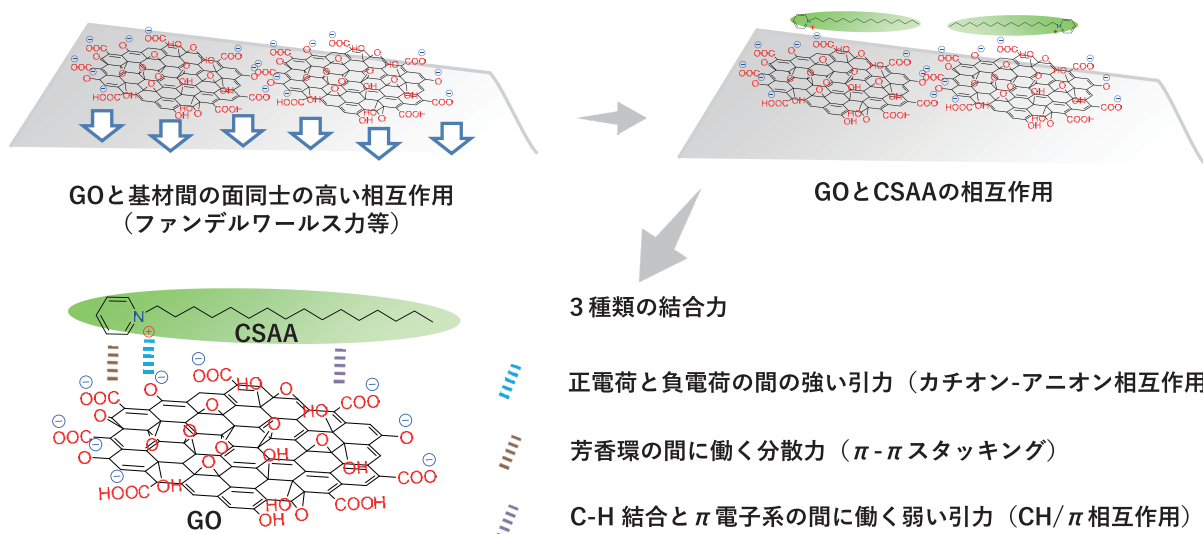


図2 GO/CSAAコーティングのメカニズム<sup>4)</sup>.

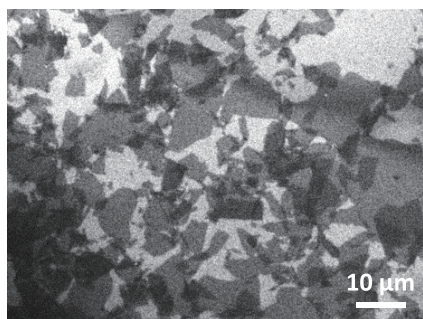


図3 GOコーティングの電子顕微鏡像 (ガラス基材)<sup>4)</sup>.

GO/CSAAコーティングの持続的抗菌性

GO/CSAAコーティングの抗菌性を調査するために、培養用wellの底面をGOコーティング後、BACを滴下し十分に水洗した。その後初期付着菌の*Actinomyces naeslundii* (ATCC 27039) を播種して24時間後に、相対濁度を用いた抗菌性評価を行った<sup>4)</sup>。なお対象として未処理、GOコーティングのみ、BACのみ (BAC滴下後水洗のみ) のウェルを用意した。その結果、*A. naeslundii*の濁度は、未処理のウェルとGOコーティングしたwellでは同様であり、GOコーティング単独では抗菌性がないことがわかった。GO/BACコーティングではBACのみに比較して、有意に低い濁度を示し、GOに結合したBACが水洗しても流出せず、抗菌性を発揮したことが示唆された (図5)。

次にGO/BACの長期的耐水性を調査した<sup>4)</sup>。同様に作製したGO/BACコーティングwellを5Lの水中に1, 3, 7日間保管後、水中より取り出し、*A. naeslundii*を播種培養して24時間後の相対濁度を調べた。その結果、すべての日数で有意に濁度の低下を示したことから、1週間程度はGOにBACが保持されることが明らかとなった。しかし、さら

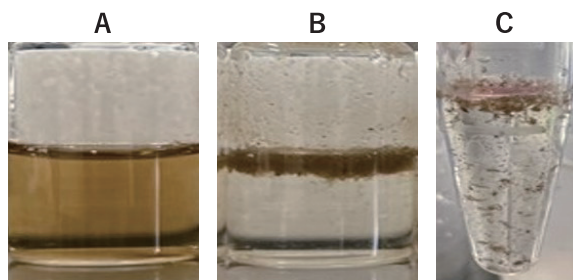


図4 GOとCSAAの相互作用<sup>4)</sup>。A) GO分散液, B) GO/CSAA, C) 水洗直後のGO/CSAA。

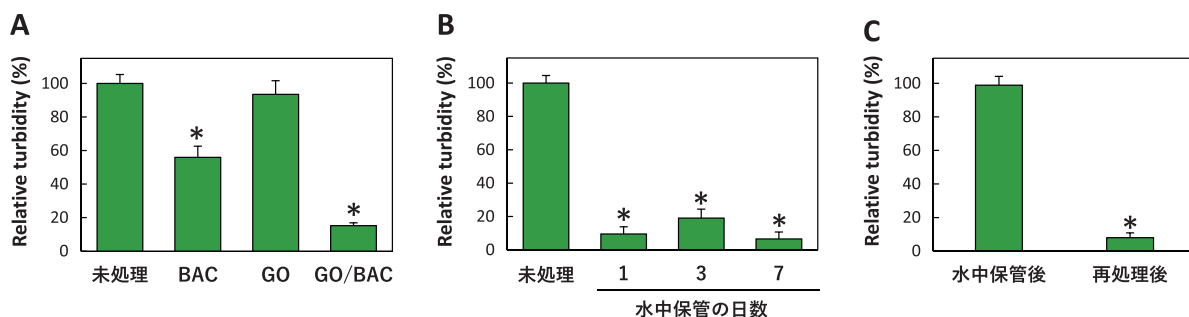


図5 抗菌試験<sup>4)</sup>。A) 各処理wellの24時間培養後の濁度。\* $P < 0.01$  (未処理およびGOとの比較)。B) 水中保管したGO/BAC wellの24時間培養後の濁度。\* $P < 0.01$  (未処理との比較)。C) BAC再処理による24時間培養後の濁度変化。\* $P < 0.01$  (水中保管後との比較)。Tukey HSD test。

に長期間(28日間)水中保管した場合は、GO/BACコーティングは抗菌性を失っていた。先行研究で示されるように<sup>9)</sup>、過剰量の水に含まれる多量のイオン ( $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $HCO_3^-$ イオンなど) の存在下で、イオン交換によってGOからのBACの脱離が起こったものと考えられた。しかしこの抗菌性を失ったGO/BACコーティングwellに再度BACを滴下処理することを試みたところ、抗菌性が完全に回復するという興味深い結果が得られた。つまり水中保管中にCSAAが放出されるが、GOの表面の官能基は残存しており、過剰量のCSAAを再度適用した際には上述のイオン等よりも結合力の強いCSAAと再結合をするというものである。GOの酸素官能基を除去するには高熱や強力な還元剤、紫外光などが必要であり、口腔内という温かな環境ではGOの酸素官能基は容易には除去されず、CSAAの繰り返し洗口でGOコーティング膜にCSAAがリチャージできる可能性がある。

#### 歯のGO/CSAAコーティング

歯の基材は主にハイドロキシアパタイトで構成されているため、カチオン性のカルシウムイオンが豊富であり、歯はGOと優れた親和性を持つことが推測される。そこでインフォームドコンセント(自主臨床研究承認17-222)を得た患者より提供された歯基材にGO/CSAAコーティングすることを試みた<sup>4)</sup>。成形した象牙質ブロックをGO分散液に10秒浸漬してすぐに強圧エアにて乾燥した。続いてCPC溶液に10秒浸漬し、すぐに十分に水洗した。対照群として未処理、CPC処理のみを行った象牙質ブロックを作製した。その後、う蝕原因菌の*Streptococcus mutans* (ATCC 35668) をブロックに播種して*in vitro*評価した。

その結果、CPC処理のみの歯基材では未処理のものと同様に*S. mutans*の増殖を認め、CPCは水洗で洗い流されたものと考えられた。一方、GO浸漬後にCPCに浸漬した歯基材では、*S. mutans*の増殖を強く抑制した(図6)。したがって、歯の表面にGOコーティングが瞬時(数秒)で形成され、CPCがGOに複合化し、洗浄しても流されずにCPCが歯面に残留して抗菌効果を発揮したと考えられた。またコーティングされた歯の変色は見られなかった。今後は安全性を確認し、歯科臨床応用できるかを検討予定である。

#### おわりに

近年の新型コロナウイルス感染症の影響により、国民の清潔志向は高まっている。本稿で解説したGO/CSAAによる耐水透明コーティングは、歯科治療応用だけではなく、院内感染の元凶となる病衣や病室カーテンなどの繊維類の抗菌化も可能であり<sup>10)</sup>、さらに接触感染の原因となるドアノブなどのプラスチックや金属基材等の抗菌化も容易であ

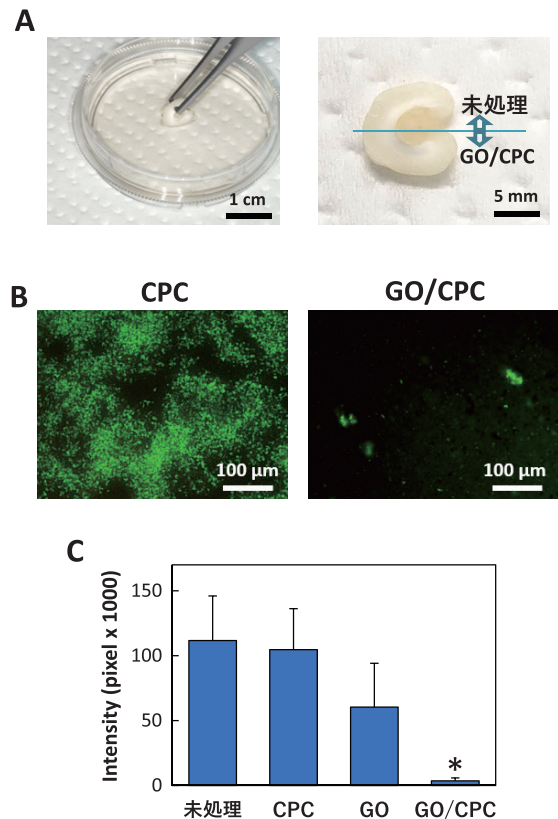


図6 歯の抗菌コーティング<sup>4)</sup>。A) 象牙質ブロック下半分のみGO分散液に浸漬(左)。GO/CPCコーティングによる色味の変化無し(右)。B) 各処理象牙質ブロックの蛍光染色像。緑：*S. mutans*。C) 蛍光強度の比較。\* $P < 0.05$  (未処理およびCPCとの比較)。Tukey HSD test。

ることから、公衆衛生の向上に広く寄与できると思われる。

#### 参考文献

- 1) Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M : The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. J Periodontol 67 : 572-576, 1996.
- 2) Versteeg PA, Rosema NA, Hoenderdos NL, Slot DE, Van der Weijden GA : The plaque inhibitory effect of a CPC mouthrinse in a 3-day plaque accumulation model: A cross-over study. Int J Dent Hyg 8 : 269-275, 2010.
- 3) Andre Mkhoyan K, Contryman AW, Silcox J, Stewart DA, Eda G, Mattevi C, Miller S, Chhowalla M : Atomic and electronic structure of graphene-oxide. Nano Lett 9 : 1058-1063, 2009.
- 4) Miyaji H, Kanemoto Y, Hamamoto A, Shitomi K, Nishida E, Kato A, Sugaya T, Tanaka S, Aikawa N, Kawasaki H, Gohda S, Ono H : Sustained antibacterial coating with graphene oxide ultrathin film combined

- with cationic surface-active agents in a wet environment. *Sci Rep* 12 : 16721, 2022.
- 5) Gao X, Li F, Li Y, Li S, Chen Y, Lee JM : A surfactant-free strategy for synthesizing reduced graphene oxide supported palladium nanoparticles with enhanced electrocatalytic performance towards formic acid oxidation. *J Power Sources* 280 : 491-498, 2015.
  - 6) Georgakilas V, Tiwari JN, Kemp KC, Perman JA, Bourlinos AB, Kim KS, Zboril R : Noncovalent functionalization of graphene and graphene oxide for energy materials, biosensing, catalytic, and biomedical applications. *Chem Rev* 116 : 5464-5519, 2016.
  - 7) Ye X. , Qin X, Yan X, Guo J, Huang L, Chen D, Wu T, Shi Q, Tan S, Cai X :  $\pi$ - $\pi$  conjugations improve the long-term antibacterial properties of graphene oxide/quaternary ammonium salt nanocomposites. *Chem Eng J* 304 : 873-881, 2016.
  - 8) Pang W, Xue J, Pang H : A high energy density azobenzene/graphene oxide hybrid with weak nonbonding interactions for solar thermal storage. *Sci Rep* 9 : 5224, 2019.
  - 9) Fujii R, Okubo K, Takashiba S, Bianco A, Nishina Y : Tailoring the interaction between graphene oxide and antibacterial pyridinium salts by terminal functional groups. *Carbon* 160 : 204-210, 2020.
  - 10) Kanemoto Y, Miyaji H, Nishida E, Hamamoto A, Sugaya T, Gohda S, Ono H : Water-resistant antibacterial properties of a graphene oxide / cetylpyridinium chloride complex formed on medical gauze fibers. *J Oral Biosci* 65 : 202-205, 2023.