HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The evaluation of dentin-coating ability and photothermal antibacterial effect of graphene oxide [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	長尾, 敬志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13050号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70718
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Keishi_Nagao_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　長　尾　敬　志

学　位　論　文　題　名

The evaluation of dentin-coating ability and photothermal antibacterial effect of graphene oxide

（象牙質の酸化グラフェンコーティングと近赤外線光による光熱抗菌効果）

酸化グラフェン（GO）は厚さ 1nm 以下の炭素の単層シートで，一部に sp^3結合炭素原子を有し，表層にエポキシ基，カルボキシル基等の酸素官能基を有している．これらの酸素官能基により GO は親水性が高く，良好な分散性を示す．さらに，GO は生体に対して高い親和性を示すとともに，*Escherichia coli* などの細菌に対して抗菌性も発揮することが報告されている．一方，光熱療法は光吸収性物質に光を照射し，粒子の発熱により細菌やがん細胞にダメージを与える方法である．光吸収性のあるナノ粒子には金ナノ粒子やグラフェン，カーボンナノチューブ，カーボンナノホーンなどがあげられ，GO もまた光熱療法への応用が期待されている．

GO の光熱療法を歯科領域に応用する場合，GO で歯をコーティングすることが可能なのか, NIRS の照射によって口腔細菌に対する殺菌効果を有するのかを検証する必要があるが，現在までこれらの検討は行われていない．そこで，象牙質に安定した GO のコーティングが可能か，さらに GO コーティングした象牙質表面に NIRS を照射した場合の *Streptococcus mutans* に対する抗菌効果を評価した．

健全なヒト第 3 大臼歯を 50 本から，5×5×1mm の象牙質ブロックを作製し，蒸留水（DW）で洗浄後 3%EDTA にて 60 秒超音波洗浄した．なおヒト象牙質採取に関しては北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った（自 012-0046）．GO は

Hummers-Offeman 法によりグラファイトの酸化と化学的剥離によって作製し，DW で希釈して 1μg/mL および 10 μg/mL の GO 分散液を調整した．象牙質ブロックを各 GO 分散液に 30 秒間浸漬し，その後 DW に 5 分間浸漬して試料とした．一部の試料はさらに 20 秒間 DW 中で超音波洗浄を行った．各試料はエタノール系にて脱水，乾燥後，走査電子顕微鏡（SEM）でコーティング状態を評価した．コーティング状態は，象牙細管の封鎖性により以下の 4 スコアに分類した．スコア 1：ほぼ開口，スコア 2：50%以下，スコア 3：50%以上，スコア 4：ほぼ封鎖．各試料（n＝4）の任意の 3 カ所でスコアを計測し，その平均値を算出した．統計分析は Scheffe の検定を行った．

次に，同様に GO コーティングした象牙質ブロックの試料に NIRS を照射し，照射 5 秒後の表面温度をサーモグラフィにて測定した．照射距離は 1,2,3cm，照射時間は 0,10,20,30 秒とした．また，照射距離 1cm として 10 秒間の NIRS 照射を 30 秒間隔で 3 回繰り返し，温度上昇を計測するとともに、照射後のコーティング状態を SEM で観察した．

さらに，*S.mutans*（ATCC 35668）を 0.1%の抗生物質と 1%スクロースを加えた BHI 培地に 1.5×10^6 CFU/mL で懸濁し，1 μg/mL または 10 μg/mL の GO 分散液で GO コーティングした象牙質ブロックを浸漬，37℃で嫌気的に 5 時間培養して試料として，以下の方法で抗菌試験を行った. まず, 各試料に NIRS を 30 秒間照射し, さらに 5 時間培養して SEM で観察した．次に，NIRS30 秒照射後の試料を BHI 培地で 24 時間培養し，濁度計を用いて 590nm で各培地の濁度を測定した．また，NIRS30 秒照射後の試料を 12 時間培養し，培養液を BHI 寒天プレート上に播種，37℃で 48 時間培養して CFU を測定した．さらに 10 または 30 秒間の NIRS 照射を行い, 照射直後および 5 時間培養後の試料表面の *S.mutans* を Live/Dead 細菌生存キットで染色し観察を行った．NIRS 照射なしと 30 秒間照射した試料は，光学顕微鏡下で任意の 3 視野で死菌の割合を計測した（n＝3）.

GO 分散液に浸漬した試料表面の SEM 観察では，フィルム状の構造物が象牙質表面を被覆していた．象牙細管の封鎖性を評価したスコアは，1 μg/mL GO 分散液に浸漬した試料の

スコアが 3.02±0.03，10 μg/mL では 3.78±0.18 であった．この結果から，GO 分散液に象牙質を浸漬することで, 象牙質上に GO のフィルムが形成され象牙細管を封鎖すること，浸漬する GO 分散液の濃度依存的に象牙細管の封鎖性が向上することが示された. GO 分散液に浸漬後の試料を 5 分間超音波洗浄すると，象牙細管封鎖性のスコアは 1 μg/mL で 1.76±0,17，10 μg/mL で 2.10±0.36 となり，スコアの減少を認めた．しかし，完全に開口した象牙細管は少なく象牙質をコーティングした GO フィルムは容易に剥離しないと考えられた.

GO コーティングをした試料に NIRS を照射し歯根表面の温度を測定した結果, 照射距離 1cm，照射時間 30 秒では，GO 分散液に浸漬しなかった試料の表面温度が 39.9℃への上昇であったのに対し，10 μg/mL GO 分散液に浸漬した試料では 58.5℃まで上昇した．試料の表面温度は照射時間と浸漬した GO 分散液の濃度に依存して増加し，照射距離が大きくなると低下した．これより，象牙質面をコーティングした GO フィルムは NIRS を吸収し，発熱すると考えられた．10 秒間の NIRS 照射を 30 秒間隔で 3 回繰り返した結果では，3 回とも約 50 度に温度が上昇し，さらにその試料を SEM 観察すると，象牙細管の封鎖性は 1 回の NIRS 照射の場合と同様であった．この結果から，NIRS を反復照射しても温度上昇やコーティング状態には影響しないと思われた.

S.mutans 懸濁液中で培養した試料を SEM 観察した結果，GO コーティングしなかった試料や NIRS 照射しなかった試料では，多数の細菌が観察されたが，GO コーティングした試料にはわずかしかみられなかった．濁度測定では，GO コーティングしなかった試料の光学密度は 0.223±0.010，1 μg/mL の分散液に浸漬した試料で 0.220±0.008，10 μg/mL では 0.185±0.008 となり，10 μg/mL では GO コーティングしなかった試料に比べて有意な低下が認められた．さらに NIRS 照射を行った場合，1 μg/mL，10 μg/mL の試料ではそれぞれ 0.108±0.023，0.023±0.022 となり，いずれも GO コーティングしなかった試料に比べて有意に低下した．CFU は，NIRS 照射を行わない場合，GO コーティングしなかった

試料では5.5×10^7 CFU/mL, 10 μg/mL の GO 分散液に浸漬した試料では4.6×10^6 CFU/mL であった．NIRS 照射を行った場合は，GO コーティングしなかった試料では 4.1×10^7 CFU/mL，10 μg/mL の GO 分散液に浸漬した試料では4.0×10^5 CFU/mL となり，GO コーティングした試料では NIR 照射の有無にかかわらず濁度が有意に低下した．5 時間培養後の Live/Dead 染色像における死菌の割合を計測した結果，NIRS を照射しない場合，1 μg/mL の GO 分散液に浸漬した試料では平均 22.6%, 10 μg/mL では 28.4%であったのに対して， NIRS 照射を 30 秒間行った場合では 1 μg/mL で 78.9%，10 μg/mL で 98.3%となった．これらの結果から，象牙質ブロックを GO 分散液に浸漬してコーティングを行うだけで抗菌性が得られ, さらに NIRS の照射を行うことで抗菌効果が向上することが示された.

以上より，象牙質ブロックを GO 分散液に浸漬することによって象牙質表面に GO フィルムを形成することができ，さらに NIRS 照射を行うことで表面温度が上昇するとともに，*S. mutans* に対する抗菌効果を発揮することが明らかになった.