



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Antibacterial coating of human dentin surface with surface pre-reacted glassionomer (S-PRG) nanofillers [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	眞弓, 佳代子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13487号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74077
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kayoko_Mayumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 眞弓佳代子

学 位 論 文 題 名

Antibacterial coating of human dentin surface with surface pre-reacted
glassionomer (S-PRG) nanofillers

(surface pre-reacted glassionomer (S-PRG) ナノフィラーによるヒト象牙質表面の
抗菌コーティング)

う蝕や歯周炎などの原因となる歯面のバイオフィーム形成を抑制するには、抗菌性材料を歯面に付着させることが有効と考えられる。Surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラーは、イオンを徐放するガラスアイオノマー(GI)の多層構造を有し、 F^- , Na^+ , BO_3^{3-} , Al^{3+} , SiO_3^{2-} , Sr^{2+} の6種類のイオンを放出することが知られており、とくに F^- と BO_3^{3-} には抗菌効果があると報告されている。このS-PRG フィラーをナノ粒子化することで、凝集能が向上して歯の表面に付着し、抗菌性を付与できる可能性があると考えられる。そこで本研究では、ナノおよびマイクロサイズのS-PRG フィラーを作製し、粒子サイズによる象牙質への付着性および抗菌性の違いについて検討した。

フルオロボロアルミノシリケートガラスから作製したガラスフリットを粉砕後、ポリアクリル酸で表面処理してS-PRG フィラーを作製した。このフィラーを蒸留水と混合してstock分散液とし、さらにフィラーの沈降スピードの差を用いてnano-S-PRG フィラー分散液と、micro-S-PRG フィラー分散液の2種類に分級して、合計3種類の分散液を作製した。まず、これらの分散液の粒度測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、エネルギー分散型X線 (EDX) 分析、イオン溶出量の測定を行った。また、nano または micro-S-PRG フィラー分散液に *Streptococcus mutans* を播種、嫌気培養して濁度測定およびコロニーカウントを行った。

次に、ヒト抜去歯より象牙質ブロックを作製しEDTA処理後、1 wt%の各分散液に3分間浸漬、乾燥して、SEM画像で象牙細管の封鎖性を1~3のスコアで評価するとともに、EDX分析を行った。象牙質表面へのS-PRG フィラーの付着強度をみるために、超音波洗浄器 (VS-100Ⅲ, AS ONE) を用いて45 kHz で1秒および10秒間超音波洗浄を行い、SEMで象牙質表面に残存したフィラー数を計測、EDX分析を行った。また、象牙質ブロックを5 %アルブミンまたは5 %リゾチームに10秒間浸漬、乾燥し、nano-またはmicro-S-PRG フィラー分散液に3分間浸漬、PBSで洗浄後、SEMで200 nm以上の粒子数を計測した。また、nano-S-PRG フィラー処理象牙質からのイオン放出量を測定した。

さらに nano-S-PRG フィラー処理象牙質に *Streptococcus mutans* および *Actinomyces naeslundii* を播種、嫌気培養後、象牙質面から付着細菌を剥離してコロニーカウントを行った。また、nano-S-PRG 処理象牙質上で *S. mutans* を培養後、SEM観察するとともに、LIVE / DEAD 染色して赤と緑の面積を計測した。さらに、マイクロプレートに nano-または micro-S-PRG フィラー分散液でコーティングし、NIH3T3 細胞を培養して WST-8 assay および LDH-

assay を行った。

各分散液の粒度測定の結果、平均粒径は nano-S-PRG が 0.44 μm , micro-S-PRG が 1.2 μm , stock が 5 μm であった。SEM では nano-S-PRG は粒径 300~800 nm, micro-S-PRG は 500~1500 nm の粒子が観察された。いずれのサイズのフィラーも EDX 分析で Al, Si, Sr, Na, F の元素が同定され, Na, B, Al, Si, Sr, F イオンの放出量は各フィラーのサイズ間で差はなかった。nano または micro-S-PRG 分散液に *S. mutans* 菌を播種, 培養後の濁度は, nano-S-PRG がコントロールおよび micro-S-PRG に比較して有意に低い値となり, CFU は nano および micro-S-PRG がコントロールより有意に低い値となった。

S-PRG 分散液に浸漬していない象牙質は, SEM で象牙細管が開口していたのに対し, nano-S-PRG フィラー分散液に浸漬した象牙質は微粒子で覆われ, 象牙細管への粒子の侵入も観察された。micro-S-PRG および stock では, 象牙質を覆う粒子はまばらで, 象牙細管内への侵入はわずかであった。象牙細管内への侵入性をスコア化した結果, nano-S-PRG が他に比較して有意に高い値を示した。EDX 分析では, nano-S-PRG, micro-S-PRG, stock で S-PRG フィラーに関連する元素が顕著な強度を示した。超音波洗浄機で 10 秒間洗浄後に SEM 観察した結果では, nano-S-PRG では 300~500 nm のフィラーが多く残存していたが, micro-S-PRG, stock ではフィラーの大部分が脱落し, 残存フィラー数は nano-S-PRG が micro-S-PRG, stock に比較して有意に多かった。また nano-S-PRG 処理象牙質からは B, F, Si, Sr イオンの放出が確認された。このことから, 象牙質上に存在しているフィラーは S-PRG フィラーであると考えられ, nano-S-PRG フィラーは象牙質面への付着強度が高いことが示唆された。

アルブミンおよびリゾチームでコーティングした象牙質を nano-または micro-S-PRG フィラー分散液に浸漬, SEM で評価した結果, リゾチームコーティングされた象牙質面では, アルブミンと比較すると付着フィラー数が有意に減少した。これは S-PRG フィラーがアルブミンの負の電荷に親和性を示したためではないかと考えられた。nano-S-PRG フィラー処理象牙質上で *S. mutans* を培養して SEM 観察した結果では, コロニー形成はコントロールである S-PRG 未処理象牙質上に比べて顕著に減少した。また, nano-S-PRG フィラー処理象牙質上で *S. mutans*, *A. naeslundii* を培養しコロニーカウントした結果, コントロールより有意に少ない CFU となった。LIVE / DEAD 染色においても, nano-S-PRG 処理象牙質上では死菌が多数観察され, 死菌の面積はコントロールに比べ有意に高かった。このことより nano-S-PRG フィラーで処理することによって, 象牙質表面に殺菌性を付与することが可能と考えられた。

一方, nano-S-PRG でコーティングしたプレート面では, micro-S-PRG コーティングおよびコーティングしていないコントロールに比べて, NIH3T3 細胞の増殖が有意に抑制された。一方, LDH 活性は nano および micro-S-PRG がコントロールと比較して有意に低かった。すなわち, S-PRG フィラーは細胞増殖を抑制するが細胞毒性は低いと考えられた。

以上の結果より, micro-S-PRG 比べ nano-S-PRG の方が安定した象牙質面のコーティングが可能であり, S-PRG フィラーは口腔内細菌の増殖を阻害し, 線維芽細胞の細胞傷害性が低いことが示唆された。