

抗菌性修復材

鳥居 光男

鹿児島大学歯学部歯科保存学講座 (1)

1. はじめに

う蝕の発生頻度は徐々に減少してきている。しかし、二次う蝕の発生は未だになくならず、ある調査では来院主訴の第一位は二次う蝕や二次う蝕に起因する疾患であり、口腔内診査では来院患者の約60%に二次う蝕が認められたとある¹⁾。二次う蝕の原因は修復物と歯質の間隙に生じる微少漏洩（マイクロリーケージ）への口腔細菌の侵入による。現在では、レジンセメントやコンポジットレジンなどの歯質接着性材料の接着性並びに樹脂含浸層の形成による歯質の保護により二次う蝕の発生を防止しようと努めている。これらの材料の性能は近年非常に向上しており、将来的には二次う蝕の発生も減少すると期待されるが、これらの材料の接着性もその耐久性は今のところ完全ではない。そこで、いずれは生じるであろうマイクロリーケージに備えてあらかじめ抗菌剤を配置しておくことは、二次う蝕の発生を抑制する点からは意義あることと思われる。

さらに、修復物上と健全な歯面上における細菌の定着量を比較した研究によると、咬合面を除く他の面では健全歯面より修復物のうえの方が細菌の量が多く²⁾、とくにコンポジットレジンの上には多くの細菌が付着している^{3,4)}。また、コンポジットレジンではそこから溶出してくる未重合モノマーが細菌の増殖を促すうえ、ミュータンスレンサ球菌のグルコシルトランスフェラーゼの活性を増強する事が分かっており⁵⁾、それがコンポジットレジン修復物の上にプラークがよく付着する原因の一つと考えられる。修復物上にプラークが付着することは、修復物自体に劣化をおこす原因になるばかりでなく、二次う蝕の原因にもなる。これらを防止するためにも、修復物が抗菌性・抗プラーク性を持つことが望ましい。

さらに、う蝕が歯面に定着した細菌の産生する酸による脱灰で始まる事から、歯面を抗菌性のコーティング材でカバーし、細菌の定着と酸の歯質への拡散を防

止するという考えも、う蝕の病因論からして妥当な考え方と思われる。

2. 修復物への抗菌性付与の考え方

修復材に抗菌性を与えることにより表面へのプラークの付着を阻止するという考えは以前からあり、いろいろの試みが報告されている⁶⁻¹¹⁾。特に、コンポジットレジンに関しては、クロールヘキシジンを用いた研究が多く報告されており、*in vitro*では著明な効果を現している。しかし、これらはすべて材料の中に抗菌剤を単に添加しただけのものであり、修復物から溶出してくる抗菌剤によって抗菌効果が発揮される。従って、最初は強い抗菌作用を示すが、時間とともにその効果は減少し、溶出が完了すると効果はなくなる。また、薬剤が溶出した跡はvoidとなるため、修復物の物性が低下する。その上、溶出した抗菌剤はプラーク細菌叢のみならず他の口腔細菌叢、ひいては他の消化管の細菌叢にも影響することが懸念される、というような欠点が種々存在する。これらの欠点を克服し修復物に抗菌性を付与する場合、抗菌剤が溶出しない状態で抗菌作用を表すいわゆる非溶出型（接触型）の抗菌性を実現することが望ましい。あるいは溶出型を用いる場合でも、必要なときにだけ抗菌剤を溶出しかつ抗菌力を可逆的に回復することにより永続的に効果を保つようなドラッグデリバリーシステムを開発する必要がある。

3. 固定化酵素利用による抗プラーク性付与の試み

抗菌性とは少し異なるが、レジン表面に酵素を固定化する事による抗プラーク性付与の試みを紹介する。

う蝕原性細菌の中で最も強力なミュータンスレンサ球菌に属する細菌は、グルコシルトランスフェラーゼを産生し、この酵素の働きによりスクロースを基質としてグルコースのポリマーであり非水溶性で粘着性の

グルカンを産生し、これを媒介として歯面に強力に付着する。この性質が、ミュータンスレンサ球菌のう蝕原性因子の一つとなっている¹²⁾。一方、逆にグルカンを分解する酵素も種々知られており、これを用いることにより、グルカン産生を抑え、あるいは生じてしまったプラークを分解することが実験的に証明されている¹³⁾。そこで、グルカン分解酵素（グルカナーゼ、デキストラナーゼ）をレジンの表面に固定化することにより、抗プラーク性を付与する可能性を検討した。

ところで、従来は工業的に酵素反応を利用する場合にも、一般的にはバッチ処理が行われた。そのため酵素は1回ずつの使い捨てである上、時間とともに酵素活性が落ちてくるという欠点があった。そこで酵素を非溶化することが考えられた¹⁴⁾。これにより、酵素は回収が容易になり何回も使用することができ、カラムなどに充填して連続的に酵素反応を続ける事ができる上、活性の低下も防ぐことができる。大きく分けて酵素の固定化には次の三つの方法がある。

- ①担体結合法…酵素を不溶性の担体に結合させる
- ②架橋法………酵素を2あるいは多官能性試薬で架橋して不溶化する
- ③包括法………酵素をゲルの微細な格子の中に包み込む（格子型）か、半透性のポリマーの被膜によって被覆する（マイクロカプセル型）

我々は、担体結合法を用いてレジン表面にデキストラナーゼを固定化することを試みた。この方法にも結合方式により共有結合法、イオン結合法、物理吸着法などがあり、またそれぞれにも種々の方法があるが、我々はレジんにカルボキシル基を加え、縮合試薬により酵素タンパクのアミノ基とレジンに加えたカルボキシル基とをペプチド結合することにより酵素を固定化することにした¹⁵⁾。一般的な Bis-GMA-TEGDMA 系のベースレジンに重合可能なカルボキシル基含有物としてメタクリル酸を加えたレジンで試料を作成し、pH6の緩衝液中で N-エチル-5-フェニルイソオキサゾリウム-3'-スルホナート（ウッドワード試薬K）と1時間反応させた後、デキストラナーゼを加えさらに24時間反応させることにより、レジン試料表面にデキストラナーゼを固定化することができた。この試料表面では *S. mutans* のグルコシルトランスフェラーゼによる不溶性グルカン合成は約70%抑制され、*S. mutans* の培養系に試料を懸垂して生じる人工プラークの付着も抑制された。高密度にデキストラナーゼを固定化したレジンの微粉末をフィラーのよう

な形でコンポジットレジンに加えることにより、抗プラーク性を与えることができるのではと考えている。

4. 非溶出型抗菌性付与の試み

保存修復の臨床で永久修復材として最も多く使用されているにも関わらず、プラークの蓄積が多いとされているコンポジットレジンに非溶出型の抗菌性を付与することを試みた。

現在よく用いられているコンポジットレジンのシステムは、酸を主体とする歯面処理材と、レジン成分の歯質への浸透を促進するプライマーあるいは両者かねたセルフエッチングプライマー、およびボンディング材とコンポジットレジン本体という3ないし4者構成になっている¹⁶⁾。一般にはレジン重合触媒系の重合促進剤として3級アミンを、またある製品では強い酸性を示す成分や、グルタルアルデヒドなど抗菌性を期待できる成分を含む。市販のコンポジットレジンシステムの抗菌性を調べた研究によると、確かに多くの製品で各構成部分に抗菌性が観察されるが、ほとんどの場合重合が完了するとともに抗菌性が消失する¹⁷⁻¹⁹⁾。また、材料の性質上、重合前に歯質と接触している時間はせいぜい数分以内であり、多くの抗菌性は期待できない。

そこで積極的にコンポジットレジンへの抗菌性の付与を試みたわけであるが、前に説明したように永久修復材としては、非溶出型の抗菌性が必要と考えた。昨今抗菌グッズと呼ばれるような抗菌性を付与した商品が多数販売されているが、多くは材料のプラスチックに抗菌剤を練り込んだものであるが、固定化抗菌剤も研究されており^{20,22)}、特に直接長時間皮膚に接触する繊維製品の分野で抗菌剤を固定化したものが開発され実用化されている^{23,24)}。コンポジットレジンは大まかに分けてベースレジンと無機質フィラーで構成されているが、我々はその内のレジン部分に非溶出の抗菌性を付与することを企画した^{25,26)}。この際、前項の酵素の不溶性担体への固定化と同様に共有結合、イオン結合、物理的吸着等の方法が利用できるわけであるが、結合の安定性を考えて共有結合法を採用した。直接充填用のレジンはずべてメタクリル基の二重結合を利用して重合硬化する。そこで、ベースレジン触媒系をそのまま利用できるように、抗菌剤にメタクリル基を導入し、ベースレジンと直接重合できるような抗菌性を持ったモノマーすなわち抗菌性モノマーを合成した。抗菌剤としては、高い抗菌性、口腔内での安全性、抗菌性の作用部位が細菌細胞壁であることに加えメタク

リル基の導入のしやすさなどから、4級アンモニウム塩である Dodecylpyridinium bromide を選んだ。まず、12-bromo-1-dodecanol にピリジンを加えて加熱することにより4級アンモニウム化し、抗菌剤である 12-hydroxydodecylpyridinium bromide (HDPB) を得た。さらに metahacryloyl chloride を加えて加熱することによりメタクリル化し、図1に

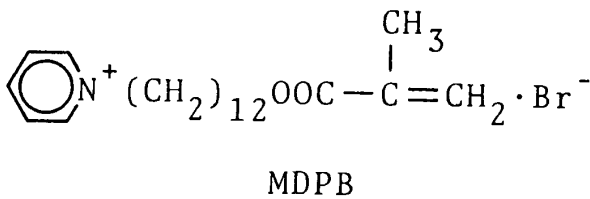


図1 12-methacryloyloxy-dodecylpyridinium bromide (MDPB) の構造式

示す12-methacryloyloxy-dodecylpyridinium bromide (MDPB) の合成に成功した²⁷⁾。MDPB は単味で供試したミュータンス連鎖球菌に11.7-23.5µg/ml の MIC (最小発育阻止濃度) を示した²⁵⁾。

フィルターとしてシラン処理した石英粉末を 83w/w %含む一般的な光重合型 Bis-GMA-TEGDMA 系コンポジットレジンに MDPB を0.1あるいは0.2w/w %添加した抗菌性コンポジットレジンを試作した(以下それぞれ0.1%試料および0.2% 試料と呼ぶ)。これらを光硬化させた試料から醋酸エチル抽出により測定した MDPB の重合率はそれぞれ 99.23, 98.22%で、どちらの濃度でも MDPB はほぼ完全に重合していた^{25,28)}。またこの程度の添加量では他のモノマーの重合にも影響せず、硬度なども非添加のコントロールと差のないことが確認されている。さらに蒸留水と n-ヘプタンへの浸漬では、両試料とも6か月間全く MDPB を溶出せず、エタノール浸漬の場合にも0.2%試料が5か月めで1.17, 6か月めで1.73µg/mlの溶出を示したのみで、0.1%試料からの溶出は認められず、MDPB はベースレジンを十分化学結合していると考えられ、実用上非溶出の状態が得られた²⁵⁾。

次に抗菌性の点であるが、MDPB 添加コンポジットレジンの上でミュータンス連鎖球菌を培養すると、MDPB 非添加の対照に比べ0.1%試料で50%前後、0.2%試料では99%以上の増殖抑制が認められた。この抗菌性を反映して、試料を *S. mutans* の培養の中に懸垂した時に表面に形成される人工プラークの量も、

0.1%試料で約30%, 0.2%試料で約45%抑制された。さらに、これらの抗菌性は長期水中保管しても保たれ、また唾液処理によっても10%程度の低下はおこるものの消失しない²⁵⁾。

このように、抗菌性モノマー MDPB をベースレジンに加えることにより、コンポジットレジンに長期間有効な非溶出型の抗菌性を付与することが出来た。現在、最初の二次う蝕の発生部位であるコンポジットレジンと歯質との界面に効果的に抗菌性を発揮させるために、プライマーやボンディング材への添加を検討しており、将来的にはレジンセメント等へも応用できると考えている。また、重合性などの点で MDPB の添加量の増加にも限度があるため、dodecylpyridinium bromide 以外の抗菌剤の使用や、メタクリル基と抗菌剤との間にスペーサーを挿入するなど、より強力な抗菌性モノマーの合成を試みている。

5. 溶出型抗菌性利用の試み

コンポジットレジンに前述のような抗菌性モノマーの添加により、非溶出型の抗菌性を付与しようとした場合、重合性などの点で抗菌力に限度がある。また、抗菌効果のみを比較しても、その効果の効率や有効範囲などの点で、溶出型の方が勝っている場合も多い。従って、効果の永続性の点を解決できれば溶出型の抗菌性材料も使用可能な場合があると考えられる。またその際、一方的に溶出し続けるのではなく、必要ときにのみ溶出し抗菌性を発揮するようなドラッグデリバリーシステムにすることが望ましい。

そこで、レジンにイオン交換性基を導入し、イオン性抗菌剤を可逆的に保持させる事を考え、図2および表1に示すレジンに調製した。すなわち、TEGDMA をモノマーに選び、これに重合可能な陽イオン交換性基としてメタクリル酸を加え光重合化したベースレジんに陽イオン性の抗菌剤 Cetylpyridinium chloride (CPC) をイオン結合で保持させようとしたのであ

表1 試作抗菌性歯面塗布材の組成 (w/w %)

メタクリル酸	8.6
トリエチレングリコールジメタクリレート	85.5
塩化セチルピリジニウム	1.7
エタノール	1.7
メタクリル酸-2-ジメチルアミノエチル	1.5
カンファーキノン	1.0

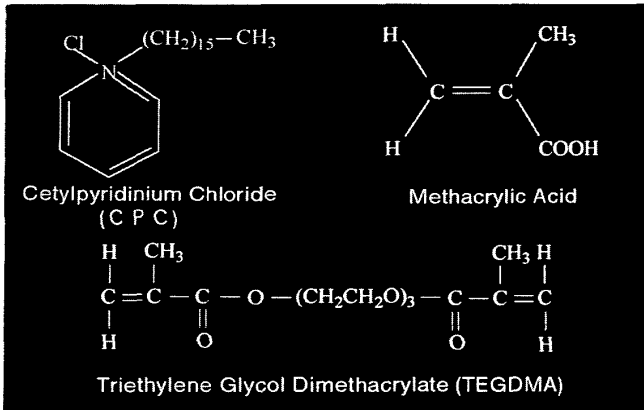


図2 試作抗菌性歯面塗布材の主要構成成分

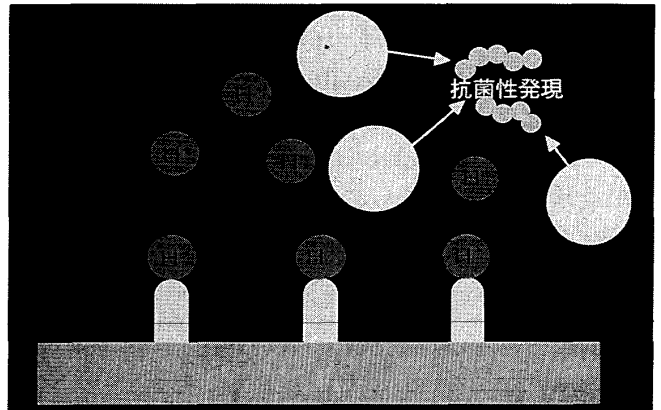


図4-2 細菌が酸産生すると、抗菌剤が酸と交換され溶出し抗菌作用を発揮する。

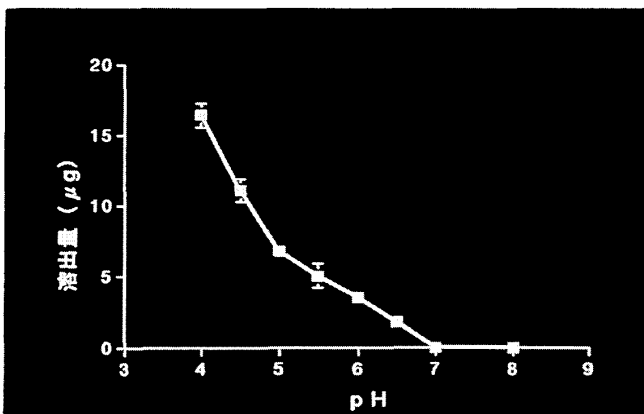


図3 試作抗菌性歯面塗布材からの CPC の溶出におよぼす pH の影響

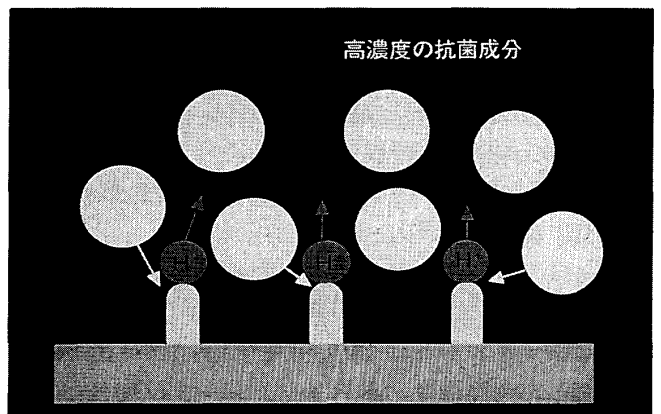


図4-3 抗菌剤の溶出が進み抗菌力が減少しても、高濃度の抗菌剤で処理すると酸と交換される。

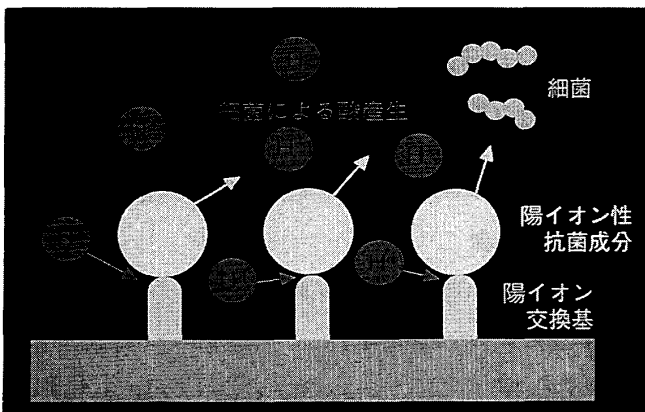


図4-1 陽イオン性抗菌剤がベースレジンに重合した陽イオン交換基にイオン結合で保持されている。

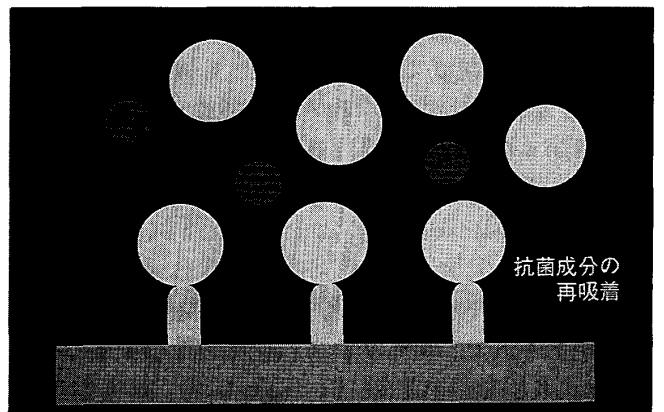


図4-4 抗菌活性が回復する。

る²⁹⁾。

このレジンに光硬化させて作製した試料を種々の pH の緩衝液に浸漬し、溶出してくる CPC を HPLC で定量したところ、図 3 に示すように中性ないしアルカリ性領域では CPC の溶出は認められず、酸性度の上昇に従って CPC の溶出は増加した。また、中性領域でも食塩の添加によってイオン強度を増加させるに従って CPC の溶出が認められ、CPC がイオン交換機序で保持されていることが明らかとなった。さらに CPC を含まないコントロールレジンを 1% CPC 溶液に浸漬した試料を、pH4 の緩衝液に浸漬したところ CPC の溶出が見られ、CPC を再吸着する事が明らかになった。つまり、このレジンには図 4 に示すようにメタクリル酸の部分で CPC をイオン交換機序により保持しており、周囲の環境が酸性に傾く（例えば、表面に付着した細菌が酸産生を始める）と CPC を溶出して抗菌効果を発揮する。そして CPC の溶出が進んでも、高濃度の CPC を作用させることにより CPC を再吸着して抗菌性を可逆的に回復するのである²⁹⁾。

抗菌性の点でも、本レジンの表面で *S. mutans* MT 8148 株の培養を試みても全く菌の増殖はおこらず、そのうえ接種した菌も回収されなかった。つまり、接種した菌がわずかに増殖を始め、それにともなって酸産生をした段階で溶出した CPC により殺菌されたと考えられる。また本レジンで作製した試料を *S. mutans* の培養系に懸垂して、人工プラークの付着を見たところ、付着はほとんど観察されなかった³⁰⁾。

現在、本レジンのプラーク付着抑制効果を、ビーグル犬を用いた *in vivo* の系で確認する実験を進行中である。本レジンには、歯面塗布材のような使用形態での利用を考えている。特に、根面う蝕はまだ治療法が確立していないが、高齢化の進行に伴って露出根面でのう蝕の発生が多発しており、このような場合に予防的にこの抗菌性レジンを使用できるのではと考えている。

6. おわりに

歯科材料に抗菌性を付与するという考え方と、その実現に向けての我々の試みを紹介してきたが、上述のように我々は、溶出型と非溶出型の両面から研究を展開している。永久修復材や、ボンディング材などのように本来再修復を考えず長期間に亘って機能すべき部位にはやはり非溶出型の抗菌性を付与する事が必要である。しかし、歯面塗布材等のように再処置が非常に簡単に行えるものについては、永続性が多少劣り、物性の低下が生じるとしても抗菌効果の高い溶出型を

利用し、劣化に対しては再処置で対応していくのが現実的であると考えられる。

参考文献

- 1) 豊島義博, 安田 登, 野村義明: 一般歯科臨床における脱落の調査 (二次齲蝕併発の各種要因について). 接着歯学, 13, 134-142, 1995
- 2) Lindquist, B. & Emilson, C. G.: Distribution and Prevalence of Mutans Streptococci in the Human Dentition. J. Dent. Res., 69, 1160-1166, 1990
- 3) Svanberg, M., Mjor, I. A. & Orstavik, D.: Mutans Streptococci in Plaque from Margins of Amalgam, Composite, and Glass-ionomer Restorations. J. Dent. Res., 69, 861-864, 1990.
- 4) Skjorland, K. K.: Plaque accumulation on different dental filling materials. Scand. J. Dent. Res., 81 538-542, 1973
- 5) 河合啓治: 複合レジン構成成分が *Streptococcus mutans* の不溶性グルカン合成および増殖に及ぼす影響. 日歯保誌, 31, 322-351, 1973
- 6) 竹村金造, 阪本有三, Staninec, M., 小林新吾, 末広和彦, 土谷裕彦: 一種の Bis-GMA 系複合レジンの抗菌性とクロールヘキシジン配合による抗菌効果. 日歯保誌, 26, 540-547, 1983
- 7) 小林新吾, 土谷裕彦: 抗プラーク性付与を目的とした修復用レジンに関する研究(1)抗菌剤を組込んだレジンの抗菌性. 日歯保誌, 24, 1074-1075, 1981
- 8) Ribeiro, J. & Ericson, D.: In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. Scand. J. Dent. Res., 99, 533-540, 1991
- 9) Jedrychowski, J. R., Caputo, A. A. & Kepper, S: Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. J. Oral Rehabil., 10, 373-381, 1983
- 10) 熱田 充: 抗プラーク付着性補綴物に関する研究. 昭和61年度科研報告書 (60480424), 1987.
- 11) Bapna, M. S., Murphy, R. & Mukherjee, S.: Inhibition of bacterial colonization by antimicrobial agents incorporated into dental resins. J. Oral Rehabil., 15, 405-411, 1988
- 12) Newbrun, E. 著, 浜田茂幸, 長谷川 清, 井上

- 昌一, 水野 純, 大嶋 隆, 鳥居光男, 梅本俊夫
共訳: 齶蝕の化学 (Cariology); 医歯薬出版,
東京, 1980
- 13) 古賀敏比古: Streptococcus mutans のグルカン
合成の抑制—おもにグルカナーゼについて; 浜田
茂幸 編, う蝕と歯周病—研究の進歩— 第2巻,
日本歯科評論社, 東京, 69-108, 1982
- 14) 千畑一郎 編: 固定化酵素; 講談社サイエンティ
フィク, 1975
- 15) 安永哲也, 浦野昌明, 鳥居光男, 土谷裕彦:
Dextranase 固定化による抗プラーク性レジンの
開発に関する研究. 日歯保誌, 35, 春季特別号,
13, 1992
- 16) 勝山 茂, 奈良陽一郎: 各種コンポジットレジ
ン接着システムの特徴と臨床応用上の注意点. クイ
ンテッセンス, 13, 147-164, 1994
- 17) 竹村金造, 阪本有三, 井上秀彦, 土谷裕彦: 複合
レジ
ンとボンディング剤の抗菌性. 日歯保誌,
27, 905-913, 1984
- 18) Felton, D., Bergenholtz, G. & Cox, C. F.: In-
hibition of bacterial growth under composite
restorations following GLUMA
pretreatment. J. Dent. Res., 68, 491-495, 1989
- 19) 今里 聡, 鳥居光男, 土谷裕彦: 市販光重合型ボ
ンディング材の抗菌性. 日歯保誌, 34, 157-163,
1991
- 20) 芝崎 勲: 固定化殺菌剤, 防菌防黴. 12, 561-
572, 1984
- 21) 中川善博, 俵谷孝彦, 芝崎 勲: 固定化第4級ア
ンモニウム塩の殺菌作用特性; 防菌防黴. 7, 7-
14, 1979
- 22) Isquith, A. J., Abbott, E. A. & Walters, P.
A.: Surface-Bonded Antimicrobial Activity of
an Organosilicon Quaternary Ammonium
Chloride. App. Microb., 24, 859-963, 1972
- 23) 遠藤善裕, 谷 徹, 石井 豊, 沼 謙司, 岡藤太
郎, 花沢一芳, 吉岡豊一, 松田孝一, 青木裕彦,
国吉葉子, 小玉正智: 第3アミン固定化繊維の抗
菌活性; 第16回医用高分子シンポジウム講演要旨
集, 51, 1987
- 24) 早川博允, 石坂 昇: 繊維抗菌防臭加工「東洋紡
バイオシル」について; 染色工業, 32, 266-275,
1984
- 25) 今里 聡: 薬剤非溶出型抗菌性コンポジットレ
ジ
ンの開発に関する研究. 日歯保誌, 35, 1109-1129
, 1992
- 26) Imazato, S., Torii M., Tsuchitani, Y.,
McCabe J. F. & Russell, R. R. B.: Incorpora-
tion of bacterial inhibitor into resin compos-
ite. J. Dent. Res., 73, 1437-1473, 1994
- 27) 鳥居光男: 非溶出性抗菌性コンポジットレ
ジ
ンの開発に関する研究; 平成3年度科学研究費補助金
(一般研究B) 研究成果報告書 (02454436), 1992
- 28) Imazato, S. & McCabe, J. F.: Influence of in-
corporation of antibacterial monomer on cur-
ing behavior of a dental composite. J. Dent.
Res., 73, 1641-1645, 1994
- 29) 江原 篤, 鳥居光男, 恵比須繁之: イオン交換機
序による抗菌成分の吸脱着に基づく抗菌性歯面塗
布材の開発. 日歯保誌, 39, 98, 1996
- 30) 江原 篤, 鳥居光男, 恵比須繁之: イオン交換機
序を利用した抗菌性歯面塗布材の開発—抗菌性の
評価について—. 日歯保誌, 40, 16, 1997