

氏名	高 務 朋 将
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1724 号
学位授与の日付	平成10年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	修復材料へのレンサ球菌の初期付着に関する研究
論文審査委員	教授 鈴木一臣 教授 渡邊達夫 教授 福井一博

学位論文内容の要旨

【緒言】 液体-固体界面で形成される生物性被膜は、一般に“バイオフィーム”と呼ばれ表面劣化など固体材料の性質に影響を及ぼすため、様々な産業領域でその形成機序が研究されている。歯科領域でも齶蝕予防のため、歯表面での歯垢(バイオフィーム)の形成機序について多くの研究がなされてきた。しかし、修復材料上で形成されるバイオフィームについては材料の劣化や二次齶蝕に関連すると考えられているが、未だ詳細な研究は行われていない。そこで本研究では、バイオフィーム形成の初期段階である修復材料表面への口腔細菌の初期付着の様相を明らかにするために、修復材料表面に初期付着する細菌叢の分析を行い、付着細菌叢の中で最も優勢であったレンサ球菌の付着特性を界面化学的に解析した。

【材料および方法】

1. 修復材料

高分子系材料としてコンポジットレジン(クリアフィルAP-X, クラレ), 金属系材料としてアマルガム(スフェリカル-D, 松風)を用い, 比較のためヒトエナメル質を使用した。

2. 修復材料表面に初期付着する口腔細菌叢の分析

修復材料試料(直径3.8mm, 厚さ2.0mm)を可撤性装置に固定し, 3名の被験者(男性; 28歳, 36歳, 41歳)の左側上顎小臼歯部頬側に1時間装着し, 付着した細菌を通常の培養法によって分離・同定した。また, レンサ球菌分離株については16SリボソームDNA領域のPCRに法よる増幅, 分離を行い, 制限酵素処理断片の解析(RFLP解析)を行って菌種を同定した。

3. 修復材料表面への口腔レンサ球菌の付着試験

1被験者(36歳)のレジン及びアマルガムディスクから分離したレンサ球菌分離株8株と標準菌株5株(*S. mitis* NCTC12261, *S. oralis* ATCC9811, *S. sanguis* ATCC10556, *S. mutans* MT3940, *S. sobrinus* OMZ176)の菌懸濁液(10^7 /ml)中にSiCペーパー#2000で研磨した各材料を1時間浸漬し, 表面に付着した細菌を蛍光染色して計数した。また, 同一被験者からの濾過滅菌全唾液で材料を20分間処理したものに

いても同様に試験した。

4. 修復材料と細菌の界面化学的解析

修復材料と付着試験に用いた菌体の表面自由エネルギーを、100 mM NaCl及び α -ブロモナフタレンを用いた液滴法による接触角の測定値から計算した。すなわち、Young及びFowkesの式を用い、材料と菌体の表面自由エネルギー γ_s 、 γ_B 及びそのLondon分散力による寄与分 γ_s^d 、 γ_B^d と極性による寄与分 γ_s^p 、 γ_B^p を算出した。さらに、これらの表面自由エネルギー値から、付着に伴うエネルギー変化量 (ΔG_{adh}) を計算した。なお、菌体はメンブレンフィルター上にフィルム化して接触角を測定した

【結果と考察】

1. 修復材料表面に形成される初期付着細菌叢

3名の被験者では、レンサ球菌と通性嫌気性グラム陽性桿菌が主な初期付着細菌として検出された。また、レジン表面からはレンサ球菌の分離率が高く（3被験者の細菌叢で平均72.0%）、アマルガムからはレンサ球菌（平均39.3%）以外にグラム陽性桿菌が高い比率で分離された（平均50.4%）。一方、エナメル質では両材料の中間型の細菌叢を示した。分離されたレンサ球菌（198株）を種レベルでみると、大半は*S. mitis*であった（61.1%）。

2. *in vitro*での口腔レンサ球菌の修復材料表面への付着性

付着菌数はエナメル質よりもレジン、アマルガムに多く（約1.2倍）、唾液処理によりいずれの材料においても減少したが、この傾向はさらに強くなった（約1.8倍）。

3. 細菌付着の界面化学的解析

材料の表面自由エネルギーは、研磨表面ではアマルガム、レジン、エナメル質の順に大きくなり、唾液処理により、アマルガム、レジンでは増大し、エナメル質はほとんど変化せず、3者の試料はほぼ同様な値を示すようになった。細菌の表面自由エネルギーについては、 γ_B^d 値が菌株間で大きく変化しなかったのに対して γ_B^p 値が菌株間で様々で、表層構造に由来する極性の違いが細菌の表面自由エネルギーに現れたと考えられた。材料への細菌付着量は、材料の表面自由エネルギーが小さいほど増加する傾向がみられた。また、 ΔG_{adh} がマイナスの方向に移行するほど付着量が増加する傾向が観察された。

【結論】

本研究より、以下のことが明らかにされた。

コンポジットレジン、アマルガム表面への口腔内での初期付着細菌叢は、エナメル質と同様にレンサ球菌と通性嫌気性グラム陽性桿菌で構成されていた。またレンサ球菌の大半は、16SrDNAのPCR-RFLP解析により*S. mitis*とわかった。一方、*in vitro*の付着実験では、表面自由エネルギーが低く疎水性の修復材料は、表面自由エネルギーが高く親水性のエナメル質よりレンサ球菌の付着菌数が多く、唾液処理により材料は親水性となり、それに伴い付着菌数は減少した。また、修復材料へのレンサ球菌付着現象は、細菌、材料、溶媒の表面自由エネルギーから算出される界面自由エネルギー変化量によって概ね説明が可能であり、物理化学現象として捉え得ることが示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は、口腔内における修復物表面のバイオフィルム形成の初期段階である材料表面への口腔細菌の初期付着の機序を明らかにする事を目的としている。*in vivo* において修復物に付着する初期細菌叢の分析を行い、付着細菌叢の中で優勢菌種であるレンサ球菌の付着現象を菌体表面と修復材料表面の自由エネルギーの観点から解明している。

1. 口腔内に装着した修復材料に付着する主細菌は、16SrDNAのPCR-RFLP解析により、*Streptococcus mitis* であると同定した。
2. 新鮮分離菌株*S.mitis* の修復材料への付着は、菌体と修復材料の表面自由エネルギーおよび界面自由エネルギーの変化量に支配されていることを示した。

in vivo における修復材料表面上のバイオフィルム形成には多様な因子が複雑に関与することが考えられるが、この研究はバイオフィルム形成の初期段階である修復材料への菌付着において、界面における自由エネルギーの重要性を示唆している有意義な業績であり、本申請論文は博士（歯学）の学位論文として価値あるものと認める。