

表 題 MPC ポリマーを用いた歯科用修復物の *in situ* 防汚処理
In situ antibiofouling modification of dental composite resin
using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers

論文の区分 博士課程

著 者 名 小山 潤

担当指導教員氏名 森 良之 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
消化器疾患学 分野
歯科口腔外科学

2019年1月10日申請の学位論文

目次

1	はじめに	2
2	実験材料	6
3	実験方法	7
3-1	重合性基を有した 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーの合成	
3-2	コンポジットレジン(CR)表面の重合性基の残存評価	
3-3	MPC ポリマーを用いた CR の表面処理	
3-4	CR 表面解析	
3-5	歯ブラシ摺動試験	
3-6	タンパク質吸着試験	
3-7	細菌付着試験	
3-8	バイオフィルム形成試験	
4	結果と考察	19
4-1	CR の表面処理に用いることを目的に合成した MPC ポリマーの性質	
4-2	MPC ポリマーで表面処理を行った CR の表面解析	
4-3	MPC ポリマーで表面処理を行った CR 表面の防汚性, 物理的耐久性の評価	
5	結論	42
6	謝辞	43
7	参考文献	44

1 はじめに

齲蝕は歯周病と共によく知られた口腔内疾患である。一般的には歯質の齲蝕による欠損部は樹脂製の充填物や金属製の充填物、被覆冠に置き換えられる。エナメル質、象牙質に対する優れた接着性、また、修復による審美性が高いことから、齲蝕治療では歯科用修復物としてコンポジットレジン(CR)が広く使用されている¹⁻³⁾。硬化前のCRは柔軟なペースト状で、主には疎水性モノマーおよび架橋剤、シリカ粒子のようなフィラーで構成されている。また、CRには光重合開始剤が含まれているため光照射によって重合反応が起こり、ペースト状のCRは硬化する。しかしながら、CR表面にはデンタルプラークがよく堆積する^{1,2,4,5)}。歯質や歯科用修復物の表面に唾液に含まれるタンパク質などが吸着することでペリクルが形成され、その上でバイオフィルムの形成が始まる^{6,7)}。唾液タンパク質である高プロリンタンパク質やムチンのリガンドが齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans* (*S.mutans*)などの菌のペリクルへの付着を促す^{6,7)}。*S.mutans* はペリクルに付着して、細菌の集合体は一定の栄養代謝によって増加し⁸⁾、その他の口腔内細菌の集合体やバイオフィルムも形成される。歯質や歯科用修復物の表面に付着した口腔内細菌は口腔内で糖代謝によって酸を産生する⁷⁾。この酸が、歯質とCRの間隙に侵入して歯質が脱灰することで二次齲蝕を起こすことが問題となっている(図1)。充填されたCRの周囲の歯質が二次齲蝕に罹患すると、治療の際のさらなる窩洞形成により歯質の欠損が大きくなり、齲蝕が歯髄にまで及んでいる場合は麻酔抜髄に至り、その後は根尖性歯周炎や歯根破折によって抜歯にまで至る可能性が生じる。齲蝕原因菌が存在するデンタルプラークはタンパク質の吸着が引き金となり形成される。したがって、齲蝕の二次発生を抑制するためにはCR表面でタンパク質が吸着しないようにすることが極めて重要である。

本研究では細胞膜に存在するリン脂質の極性基(ホスホリルコリン基)と同じ化学構造を分子内に有し、親水性を示す 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)ポリマーに着目した^{9,10)}。MPCポリマーで材料表面を修飾すると、タンパク質の吸着や細胞の接着、細菌の付着を阻止することが認められている。また、材料の埋植に依存する周辺生体組織の炎症反応も抑制される¹¹⁻¹³⁾。これらの性質からMPCポリマーは人工心臓や人工股関節、コンタクトレンズ等の様々な医療機器に応用されてきた¹⁴⁻¹⁷⁾。このMPCポリマーを用いてCRを表面処理することでタンパク質吸着から始まる細菌付着とバイオフィルムの形成が抑制されて二次齲蝕発生を低減できると考えた。歯科領域では、poly(methyl methacrylate) (PMMA) ベースレジンの表面を

poly(MPC-*co*-*n*-butyl methacrylate) (PMB)で表面処理を行うことで防汚性が高まると報告されている¹⁸⁾。溶液による単純な表面処理によって PMB 層はベースレジン表面に物理的に接着し、これによって *S.mutans* のバイオフィーム形成が抑制された¹⁷⁾。また、初野らは PMMA ベースレジンの表面を PMB で表面処理を行うことでカンジダ症の原因である *Candida albicans* の付着を抑制したと報告した¹⁹⁾。歯科用レジン表面への PMB を用いた物理的な表面処理法は簡便ではあるが、PMB 層の接着安定性については口腔内で長期間使用するには不十分である。この PMB 層の接着安定性を向上させるために PMB に光反応性を付与した PMBPaz の合成を行い、PMMA ベースレジン床義歯の表面処理に用いたという報告もある²⁰⁻²²⁾。PMBPaz はベースレジンと強固に結合することが可能で、ヒトの口腔内で 10 日間持続して良好な細菌付着抑制を示すことができる。歯科用レジンの表面特性を改質させる他の方法論として、MPC を歯科用レジンのベースモノマーに混ぜ込むという方法が挙げられる^{23,24)}。しかしながら、硬化した CR は水環境に曝されると水を吸収する性質がある²⁵⁾。水分を吸収することで CR の物理的および機械的特性が低下し、その結果、充填された CR の寿命が短くなる可能性がある。MPC は非常に親水性であるため、MPC が重合によって CR の構成成分と反応しても CR の吸水量は増加する¹⁾。

CR のベースモノマーに MPC を含有させた場合、硬化した CR は吸水による悪影響を受けるため、本研究では MPC ポリマーを CR の表面に化学的に結合させた。CR 表面の防汚性は、MPC ポリマーの性質であるタンパク質吸着および細菌付着の抑制に基づいて獲得できる。この表面処理によって CR 表面の機械的性質は変化しない。また、実際の歯科治療の中でこの表面処理法を口腔内で施すことができると考えている。臨床の観点から CR のペーストを窩洞に充填して硬化させた後に口腔内で MPC ポリマーを CR 表面に使用することが望ましい。そのため、口腔内で MPC ポリマーを用いて CR の表面処理を行うためには短時間かつ簡便な操作、歯肉、頬粘膜、舌等の口腔内軟組織に対して低侵襲な溶媒の選択、口腔内は常に湿潤状態にあるため防湿下での表面処理が必要となる。

市販の CR の光重合率は約 55～75 %であるため、硬化した CR には未反応の重合性基である炭素-炭素二重結合($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)が一部残存している^{26,27)}。側鎖に同様の重合性基を有する MPC ポリマーを CR 表面に塗布して光照射することで MPC ポリマーと CR 表面とを化学的に結合させることが可能(図 2)である。

本研究では CR 表面の重合性基である炭素-炭素二重結合($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)との光化学反応による化学結合を可能とすることを目的として側鎖に同様の重合性基($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)を有する MPC ポリマー、PMAMA を合成し、CR の表面処理に用いた。さらには、塗料、被覆材料、接着剤、繊維処理剤、潤滑油添加剤、歯

科材料分散剤等に使用され、耐水性、成膜性を有する 2-ethylhexyl methacrylate (EHMA)ユニットが CR 基板の表面性状や防汚性に与える影響についても評価を行うために EHMA ユニットの PMAMA に含めた PMEAMA も合成し、CR の表面処理に用いた。

MPC ポリマーを用いて口腔内で直接 CR の表面処理を行うことで二次齲蝕の発生を低減させ、国民の歯牙喪失を防ぐことができると考えられる。特に ADL の低下した高齢者は自力での口腔内清掃が困難なため口腔内清掃状態は極めて劣悪な状態となることが多い。タンパク質吸着、細菌付着を抑制できる高分子材料で表面処理された歯科用材料によって自力での口腔内清掃が困難な高齢者であってもある程度良好な口腔内清掃状態が保持できるのではないかと考えられる。

本研究の CR 表面処理方法を実際の臨床において以下の手順で適応させることを想定している。まず、歯質の齲蝕に罹患した部分の削合を行った後に窩洞に CR を充填し、光照射を行うことで CR を硬化させる。次に MPC ポリマーの溶液を充填した CR 表面に小筆にて塗布し、エアブローにて乾燥させてから光照射を行う。この手法は簡便で操作時間は短く、患者に対して安全かつ低侵襲であり、実際の歯科臨床において術者が実際に患者の口腔内で本研究の CR 表面処理法を施すことは容易であると考えられる。また、MPC ポリマーは人間の体内に入れられても無害であることが知られている¹¹⁻¹³⁾。それゆえに、この CR 表面処理法は、実際の臨床での歯科治療に応用できるものである。

また、口腔内環境維持のために、歯ブラシによるブラッシングを行う。歯ブラシによる CR 表面に修飾された MPC ポリマーの剥離による防汚性の低下が懸念されるため、歯ブラシを用いた摺動試験を行い、摺動後の CR 基板の表面特性について解析を行うことで CR 表面に化学結合した MPC ポリマーの物理的耐久性の評価を行うことが必要である。齲蝕や歯周病の有無確認、歯石除去等を目的に一般的には 3~6 ヶ月に一度の歯科医院での健診が推奨される。以前に CR 表面に修飾された MPC ポリマーはブラッシングによる物理的作用により剥離されていることが予想されるため、歯科健診で歯科医院を受診した際に再度 MPC ポリマーにて CR の表面処理を行うことで長期的なメンテナンスを行っていくことを想定している。そのため、本研究の CR 表面処理法を実際の歯科臨床で適用させることを検討した場合には、1 日 3 回ブラッシングを行っても 3~6 ヶ月は CR 表面に修飾された MPC ポリマーの剥離は最小限にとどめ、ある程度の防汚性が維持されるような耐久性が求められる。

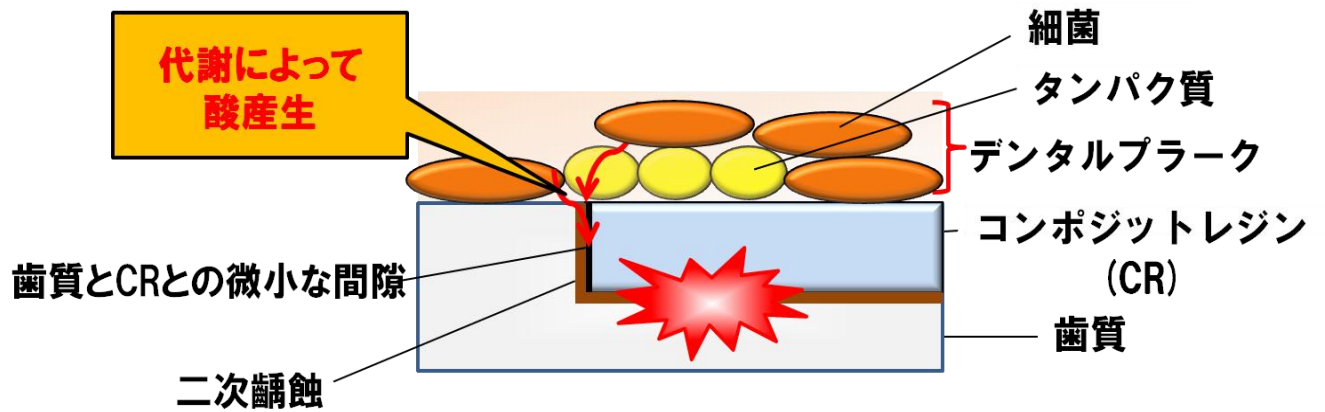


図1 CRの二次齲蝕が発生するメカニズム

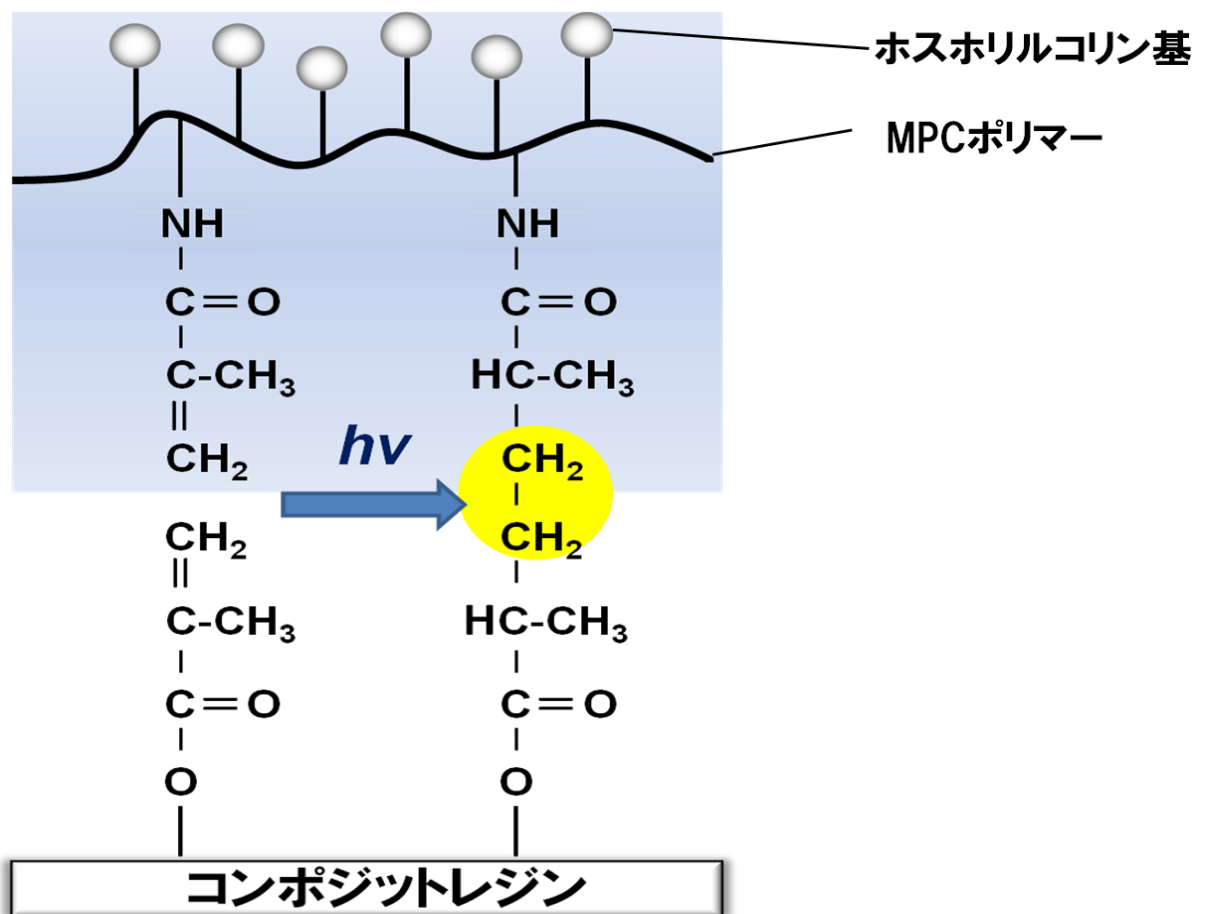


図2 CRと重合性基を有するMPCポリマーが光化学反応にて結合する様式

2 実験材料

CR (クリアフィル マジスティ®)はクラレノリタケデンタル株式会社(東京), ハイドロキシアパタイト(HA)基板(アパタイトペレット®, 10 mm×10 mm×2.0 mm)は HOYA Technosurgical 株式会社(東京), MPC は日油株式会社(東京)より購入した. また, 2-aminoethyl methacrylate hydrochloride (AEMA)とムチンはシグマアルドリッチ(セントルイス, USA)より購入し, AEMA については70 %ethyl acetate と30 %2-propanol との混合物からの再結晶による精製を行った後のものを使用した. Pentafluorophenyl methacrylate (PFMA), 2-ethylhexyl methacrylate (EHMA), camphorquinone (CQ), *N,N*-dimethyl-*p*-toluidine (DMPT)は東京化成工業株式会社(東京)より購入を行い, 精製を行わずにそのまま使用した. 4-Nitrophenyl methacrylate (NPMA)については既に報告された方法に従って合成を行った²⁸⁾.

3 実験方法

3-1 重合性基を有した MPC ポリマーの合成

Poly(MPC-*co*-AEMA) (PMA)と poly(MPC-*co*-EHMA-*co*-AEMA) (PMEA)を重合開始剤として 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN)を用いたフリーラジカル重合による合成にて得た. Poly(MPC-*co*-AEMA-*co*-*N*-methacryloyl ethyl methacrylamide (MAEMA)) (PMAMA)については既報の方法に従って合成することで得た²⁹⁾. Poly(MPC-*co*-EHMA-*co*-AEMA-*co*-MAEMA) (PMEAMA)は PMAMA 合成の際と同様の方法を用いて PMEA と NPMA を反応させることで得た. 各々のポリマーの詳細な合成方法を以下に示す.

①PMAMA95/5 の合成方法

モノマーの仕込み比が MPC/AEMA = 95/5 (by mole fraction)となるような二元系共重合体(PMA95)の合成を行った. MPC を 3.5 g , AEMA を 8.1×10^{-2} g および重合開始剤として AIBN を 2.1×10^{-2} g 秤量した. 重合開始剤の量は全モノマー/重合開始剤 = 100/1 (by mole fraction)とした. 重合溶媒として ethanol を 21 mL 加え、全モノマー濃度 0.50 mol/L, 全量 25 mL である重合溶液を調製した. 溶媒中の酸素の除去のため Ar ガスにて 10 分間バブリングを行った後に封管した. その後, 60 °C のオイルバス中で 24 時間重合を行った. 開管後に貧溶媒として diethylether/chloroform = 7/3 (v/v) 500 mL 中に滴下した. 得られた沈殿物を貧溶媒で 1 回, diethylether で 1 回洗浄した後, 一晚減圧乾燥することで白色固体を得た. さらに, 未反応のモノマー除去するために得られた白色固体を蒸留水に溶解させ, 半透膜を用いて 4 日間透析を行い, 凍結乾燥さ

せることで PMA95 の白色固体を得た.

次に PMA95 の白色固体 1 g を 50mL の ethanol に溶解させた後にこの溶液に dimethyl sulfoxide(DMSO)を 50 mL 加えた. この溶液に PFMA を 4.4 g 滴下させ, オイルバスにて加熱させて 50 °C で 2 日間反応させた. 得られた反応生成物を濃縮させ, 1000 mL の diethylether に滴下させてポリマーを再沈殿させた. この沈殿物を濾過し, 20 mL の methanol に溶解させてからさらに 300 mL の diethylether に滴下させて 再沈殿を行い, 得られた沈殿物を真空乾燥させることで PMAMA95/5 の黄色固体を得た.

②PMAMA70/30 の合成方法

モノマーの仕込み比が MPC/AEMA = 70/30 (by mole fraction)となるような二元系共重合体(PMA70)の合成を行った. MPC を 2.6 g , AEMA を 0.48 g および重合開始剤として AIBN を 2.1×10^{-2} g 秤量した. 重合開始剤の量は全モノマー/重合開始剤 = 100/1 (by mole fraction)とした. 重合溶媒として ethanol を 22 mL 加え、全モノマー濃度 0.50 mol/L, 全量 25 mL である重合溶液を調製した. 溶媒中の酸素の除去のため Ar ガスにて 10 分間バブリングを行った後に封管した. その後, 60 °C のオイルバス中で 24 時間重合を行った. 開管後に貧溶媒として diethylether/chloroform = 7/3 (v/v) 500 mL 中に滴下した. 得られた沈殿物を貧溶媒で 1 回, diethylether で 1 回洗浄した後, 一晚減圧乾燥することで白色固体を得た. さらに, 未反応のモノマー除去するために得られた白色固体を蒸留水に溶解させ, 半透膜を用いて 4 日間透析を行い, 凍結乾燥させることで PMA95 の白色固体を得た.

次に PMA95 の白色固体 1 g を 50mL の ethanol に溶解させた後にこの溶液に dimethyl sulfoxide(DMSO)を 50 mL 加えた. この溶液に PFMA を 31 g 滴

下させ、オイルバスにて加熱させて 50 °C で 2 日間反応させた。得られた反応生成物を濃縮させ、1000 mL の diethylether に滴下させてポリマーを再沈殿させた。この沈殿物を濾過し、20 mL の methanol に溶解させてからさらに 300 mL の diethylether に滴下させて 再沈殿を行い、得られた沈殿物を真空乾燥させることで PMAMA70/30 の黄色固体を得た。

③PMEAMA80/10/10 の合成方法

モノマーの仕込み比が MPC/EHMA/AEMA = 80/10/10 (by mole fraction) となるような三元系共重合体(PMEA80)の合成を行った。MPC を 3.0 g , EHMA を 0.25 g , AEMA を 0.16g および重合開始剤として AIBN を 2.1×10^{-2} g 秤量した。重合開始剤の量は全モノマー/重合開始剤 = 100/1 (by mole fracition) とした。重合溶媒として ethanol を 22 mL 加え、全モノマー濃度 0.50 mol/L, 全量 25 mL である重合溶液を調製した。溶媒中の酸素の除去のため Ar ガスにて 10 分間バブリングを行った後に封管した。その後、60 °C のオイルバス中で 24 時間重合を行った。開管後に貧溶媒として diethylether/chloroform = 7/3 (v/v) 500 mL 中に滴下した。得られた沈殿物を貧溶媒で 1 回, diethylether で 1 回洗浄した後、一晚減圧乾燥することで白色固体を得た。さらに、未反応のモノマー除去するために得られた白色固体を蒸留水に溶解させ、半透膜を用いて 4 日間透析を行い、凍結乾燥させることで PEMA80 の白色固体を得た。

次に PEMA80 の白色固体 1 g を 50mL の ethanol に溶解させた後にこの溶液に dimethyl sulfoxide(DMSO)を 50 mL 加えた。この溶液に NPMA を 0.15 g 滴下させ、オイルバスにて加熱させて 50 °C で 2 日間反応させた。得られた反応生成物を濃縮させ、1000 mL の diethylether に滴下させてポリマーを再沈殿させた。デカンテーション(静置)させた後に diethylether にて洗浄を行い、得られ

た沈殿物を真空乾燥させることで PMEAMA80/10/10 の白色固体を得た。

④PMEAMA70/20/10 の合成方法

モノマーの仕込み比が MPC/EHMA/AEMA = 70/20/10 (by mole fraction) となるような三元系共重合体(PMEA70)の合成を行った。MPC を 2.6 g , EHMA を 0.50 g, AEMA を 0.16g および重合開始剤として AIBN を 2.1×10^{-2} g 秤量した。重合開始剤の量は全モノマー/重合開始剤 = 100/1 (by mole fraction)とした。重合溶媒として ethanol を 22 mL 加え、全モノマー濃度 0.50 mol/L, 全量 25 mL である重合溶液を調製した。溶媒中の酸素の除去のため Ar ガスにて 10 分間バブリングを行った後に封管した。その後, 60 °C のオイルバス中で 24 時間重合を行った。開管後に貧溶媒として diethylether/chloroform = 7/3 (v/v) 500 mL 中に滴下した。得られた沈殿物を貧溶媒で 1 回, diethylether で 1 回洗浄した後, 一晚減圧乾燥することで白色固体を得た。さらに, 未反応のモノマー除去するために得られた白色固体を蒸留水に溶解させ, 半透膜を用いて 4 日間透析を行い, 凍結乾燥させることで PEMA70 の白色固体を得た。

次に PEMA70 の白色固体 1 g を 50mL の ethanol に溶解させた後にこの溶液に dimethyl sulfoxide(DMSO)を 50 mL 加えた。この溶液に NPMA を 0.16 g 滴下させ, オイルバスにて加熱させて 50 °C で 2 日間反応させた。得られた反応生成物を濃縮させ, 1000 mL の diethylether に滴下させてポリマーを再沈殿させた。デカンテーション(静置)させた後に diethylether にて洗浄を行い, 得られた沈殿物を真空乾燥させることで PMEAMA70/20/10 の白色固体を得た。

PMAMA および PMEAMA の化学構造については, 重溶媒として ethanol-d₆ を用いて ¹H-NMR(ESC400, 日本電子株式会社, 東京)測定することで分析を行

った。PMAMA, PMEAMA の構造式を図 3 に示す。

PMAMA95/5, PMAMA70/30 および PMEAMA80/10/10, PMEAMA70/20/10 に対して溶解性試験を行った。5 mL サンプル管を用いて各々の固体のポリマーを 1.0 mg/mL の濃度となるように試験溶媒に溶解させた。試験溶媒として water, methanol, ethanol, acetone を用いた。目視による沈殿物の有無で溶解性の評価を行った。

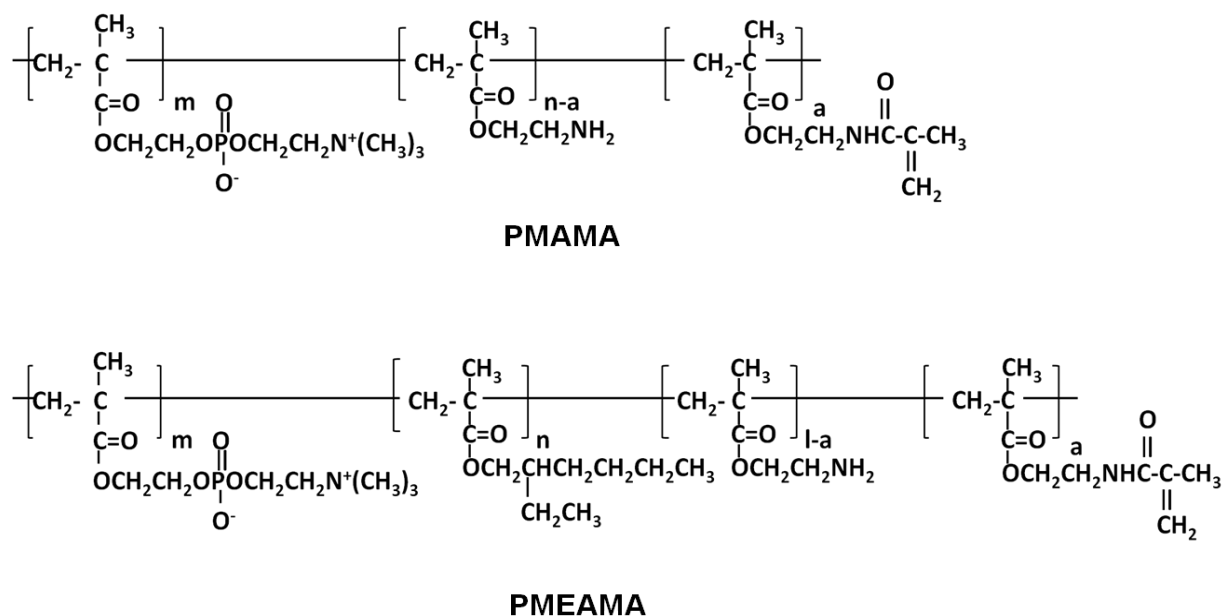


図 3 PMAMA, PMEAMA の構造式

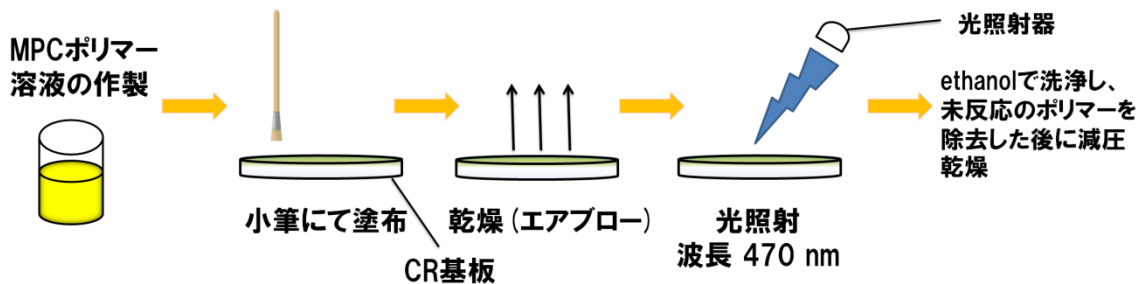
3-2 CR 表面の重合性基の残存評価

全反射減衰(ATR)装置を備えたフーリエ変換赤外(FT-IR)分光光度計(FT-IR 6300, 日本分光株式会社, 東京)を用いて CR のペーストおよび硬化した CR 表面の重合性基の残存についての評価を行った。測定範囲は 4000 cm^{-1} – 650 cm^{-1} ,

分解能 4.0 cm^{-1} , 測定の積算回数は 64 回とした.

3-3 MPC ポリマーを用いた CR の表面処理

MPC ポリマー(1.0 wt%)、CQ(0.50 wt%)および DMPT(0.50 wt%)を ethanol に溶解させた. この混合物の溶液を CR 基板(直径 9.0 mm×厚さ 1.0 mm)の表面に小筆で塗布し, エアブローして乾燥させた後に臨床用の光照射器(ペンキキュア®[®], 株式会社モリタ, 東京)を用いて 20 秒間光照射を行うという操作を 2 回繰り返した. 照射する光の波長は 420–480 nm であった. CR 表面の未反応のポリマーを除去することを目的に ethanol で十分に洗浄を行い, 減圧乾燥を行った(図 4, 5).



MPCポリマー濃度 : 1.0 wt%
開始剤/濃度 : Camphorquinone/0.50 wt%
還元剤/濃度 : N,N-dimethyl-*p*-toluidine/0.50 wt%
溶媒 : ethanol

図 4 MPC ポリマーを用いた CR 基板の表面処理法

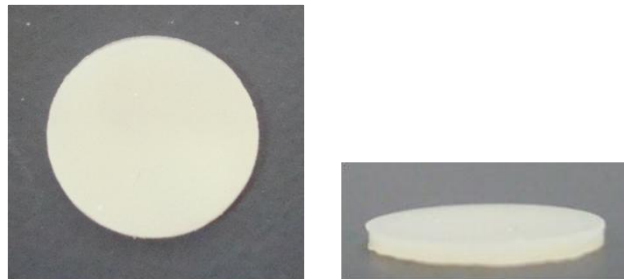


図 5 CR 基板

3-4 CR 表面解析

MPC ポリマーによる表面処理前後の CR の表面性状について走査型電子顕微鏡(SEM; SM-200, 株式会社トプコン, 東京)を用いて観察を行った。その際に金蒸着装置(QUICK AUTO COATER, サンヨー電子株式会社, 東京)にて CR 表面の金蒸着を行った。

表面元素組成については X 線光電子分光法(XPS; AXIS-His 165 Kratos, 株式会社島津製作所, 京都)により評価を行った。光電子放出角は 90° に固定し、元素の結合エネルギーは 285.0 eV の C1s ピークを基に補正し、対応する元素のピーク面積を算出して元素組成の評価を行った。1 つの CR 試料につき 3 箇所測定を行い、それぞれのリン元素(P)とケイ素元素(Si)のピーク面積比を求め、その平均値を算出するとともに、一元配置分散分析と多重比較検定 Tukey にて有意差検定($P<0.05$)を行った。

口腔内は常に湿潤状態にあるため、接触角測定装置(CA-W, 協和界面科学株式会社, 東京)を用いて室温における水中での気泡の静的接触角を測定した。前術した円形の CR 基板では水中での空気の接触角を測定するには小さく、測定が困難となるため $10 \times 30 \times 10$ mm 大の長方形の CR 基板を作製した。接触角の測定を行う前に CR, HA 基板を平衡に保つために 24 時間水中に浸漬させた。未処理の CR, 各々のポリマーで表面処理を行った CR を 5 枚ずつ作成し、1 つの試料につき 5 ヶ所測定を行った。その接触角の大きさの平均値を算出するとともに、一元配置分散分析と多重比較検定 Tukey にて有意差検定($P<0.05$)を行った。

3-5 歯ブラシ摺動試験

摩擦・摩耗試験機はトライボギア TYPE : 38 (新東科学株式会社, 東京)を使用した。摩擦・摩耗試験機の治具に取り付ける歯ブラシは PROSPEC-PLUS(株式会社ジーシー, 東京)を使用した。この歯ブラシを柄の部分から切断して摩擦・摩耗試験機の治具に取り付けた(図 6)。

摩擦・摩耗試験機の水槽に蒸留水を満たし、通常のブラッシング圧を想定して垂直荷重 150 g, 移動距離 10 mm, 移動速度 1200 mm/分, 往復回数 500 回を条件に歯ブラシ摺動試験を行った。

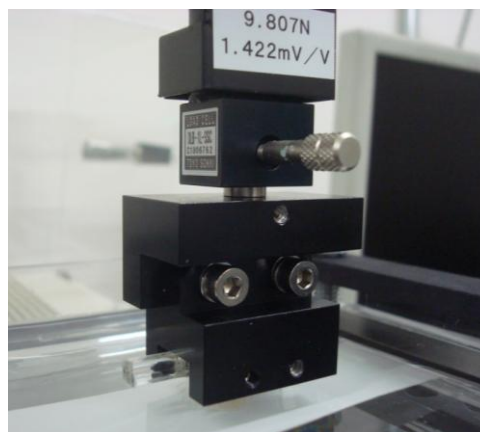


図 6 歯ブラシ摩擦・摩耗試験機の治具に取り付けた歯ブラシ

3-6 タンパク質吸着試験

μ BCA 法を用いて CR, HA のタンパク質吸着量の評価を行った。CR, HA 基板を平衡化させるためにそれらをリン酸緩衝食塩水(PBS)に室温で 24 時間浸漬させた。次に CR 基板をムチン 2.0 mg/mL を含む PBS 溶液中に 37 °C で 2.0 時間静置させた。その後 CR, HA 基板を PBS 溶液で十分にすすぎ, 1.0 wt% *n*-

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)PBS 溶液中に浸漬させてから 10 分間超音波洗浄を行って CR, HA 基板表面に吸着したムチンを剥離させた. SDS 溶液中のムチンの濃度を決定するためにタンパク質分析キット(micro BCA protein assay kit, サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社, ウォルサム, USA)を使用した. micro BCA 試験キットのプロトコルに従って SDS 溶液およびピシニコニン酸試薬を 96 穴マイクロプレートの各々のウェル中で混合して 37 °C で 1.0 時間静置させた. マイクロプレートリーダー(Wallac 1420 ARVO_{sx}, 株式会社パーキンエルマー, ウォルサム, USA)を用いて 562 nm での吸光度を測定し, 標準タンパク質(ムチン)に基づく検量線を用いて溶液中のムチン濃度の算出を行った.

試料として未処理の CR, 各々のポリマーで表面処理を行った CR を 5 枚ずつ用いて試験を行った. 平均値を算出するとともに, 一元配置分散分析と多重比較検定 Tukey にて有意差検定($p < 0.05$)を行った. また, 歯ブラシ摺動試験前後の CR 基板のタンパク質吸着量の評価については平均値の算出, 二元配置分散分析と多重比較検定 Tukey による有意差検定($P < 0.05$)を行った.

3-7 細菌付着試験

本実験はムチンなどのタンパク質を介した細菌の CR への付着ではなく, CR との直接的な付着試験である.

CR, HA 表面における細菌付着試験では *S. mutans* (ATCC 35668)を用いた. Brain heart infusion (BHI) (Bacto, Difco, USA) broth の粉末を蒸留水に溶解し, オートクレーブで 103 kPa/121 °C で 20 分間滅菌することで BHI broth の調製を行った. *S. mutans* を 37 °C で一晩, 好気条件下にて BHI broth 中で培養し,

培養した菌液を遠心分離（3000 rpm/20 分間および 8000 rpm/2.0 分間）することで菌塊を採取した。次に、それらを滅菌 PBS で洗浄し、再び PBS に懸濁させた。*S. mutans* の懸濁液を最終的に 1.3×10^7 CFU mL⁻¹ に希釈し、この懸濁液を CR, HA 基板が置かれた 24 穴マイクロプレートの各々のウェルに 0.50 mL ずつ添加した後にこのマイクロプレートを 37 °C で 1.0 時間静置させた。それぞれの CR, HA 基板を PBS で 3 回洗浄し、別の 24 穴マイクロプレートに移してから各々のウェルに 2.5 % グルタルアルデヒド/PBS 溶液を 0.50 mL ずつ添加して 2.0 時間浸漬させて CR, HA 表面に付着した細菌の固定を行った。CR, HA 基板を蒸留水で十分に洗浄し、凍結乾燥を行った後に金蒸着装置で金を蒸着してから CR, HA 基板表面の SEM 観察を行った。

CR, HA 表面に接着した *S. mutans* の菌数の定量的評価を希釈平板法により行った。24 穴マイクロプレートの各々のウェルに CR, HA 基板を置き、*S. mutans* の懸濁液を 0.50 mL ずつ添加した後に 37 °C で 1.0 時間静置させた。次いで、CR, HA 基板を PBS で洗浄した後に別の 24 穴マイクロプレートに移し、各々のウェルに PBS を 0.50 mL ずつ添加してから CR, HA の表面に付着した細菌をラバーポリスマンで剥離させた。この懸濁液を PBS で希釈してから 0.10 mL 採り、BHI 寒天培地上にプレーティングを行い、この寒天培地を 37 °C で 24 時間静置させた。寒天培地上にみられるコロニー数を数え、菌液の CFU mL⁻¹ を求めることで CR, HA 表面上に付着した *S. mutans* の菌数を算出した。

歯ブラシ摺動試験前後の CR 基板の細菌付着量の評価については試料として未処理の CR, 各々のポリマーで表面処理を行った CR を 3 枚ずつ用いて試験を行った。平均値を算出するとともに、二元配置分散分析と多重比較検定 Tukey にて有意差検定 ($P < 0.05$) を行った。

3-8 バイオフィルム形成試験

CR, HA 表面におけるバイオフィルム形成試験では細菌付着試験と同様に *S. mutans* を用いた. *S. mutans* を 37 °Cで一晩, 好気条件下にて BHI broth 中で培養させ, 15 mL チューブに 5.0 %スクロース含有 BHI broth, 前培養した *S. mutans* の菌液を 0.10 mL, CR, HA 基板を入れて振盪させながらさらに 37 °Cで 48 時間, 好気条件下で培養を行うことで基板表面に *S. mutans* のバイオフィルムを形成させた. CR, HA 基板を 24 穴マイクロプレートに移し, PBS で 3 回洗浄した後に別の 24 穴マイクロプレートに移してから各々のウェルに 2.5 %グルタルアルデヒド/PBS 溶液を 0.50 mL ずつ添加して 2.0 時間浸漬させて CR, HA 表面に形成されたバイオフィルムの固定を行った. CR, HA 基板を蒸留水で十分に洗浄し, 凍結乾燥を行った後に金蒸着装置で金を蒸着してから CR, HA 基板表面の SEM 観察を行った.

CR, HA 表面に形成された *S. mutans* のバイオフィルム形成量の定量的評価を懸濁液の濁度を測定することにより行った. 上記と同様に 15 mL チューブに 5.0 %スクロース含有 BHI broth, 前培養した *S. mutans* の菌液を 0.10 mL, CR, HA 基板を入れて振盪させながらさらに 37 °Cで 48 時間, 好気条件下で培養を行った. 次に CR, HA 基板を PBS で洗浄した後に 24 穴マイクロプレートに移してから各々のウェルに PBS を 0.50 mL ずつ添加してから CR, HA の表面に形成されたバイオフィルムをラバーポリスマンで剥離させ, この懸濁液をそれぞれ 1.5 mL チューブに回収し, 各々の懸濁液の濁度を紫外可視分光光度計 (UV-1200, 株式会社島津製作所, 京都)にて測定を行った.

歯ブラシ摺動試験前後の CR 基板のバイオフィルム形成量の評価については試料として未処理の CR, 各々のポリマーで表面処理を行った CR を 3 枚ずつ用

いて試験を行った。平均値を算出するとともに、二元配置分散分析と多重比較検定 Tukey にて有意差検定($P<0.05$)を行った。

4 結果と考察

4-1 CR の表面処理に用いることを目的に合成した MPC ポリマーの性質

PMA および PMEA はラジカル重合による合成で得られた。これらのポリマーと活性エステル基を有する NPMA との反応で PMAMA, PMEAMA が得られた。PMAMA, PMEAMA の合成結果を表 1 に示す。これより重合性基を有する MAEMA を最も多く含むポリマーは PMAMA70/30 であることが分かった。

また、溶解性試験の結果を表 2 に示す。得られたポリマーはいずれも水およびアルコールに可溶であった。

表 1 MPC ポリマーの合成結果

Polymer	In feed			In polymer			
	(mole fraction)			(mole fraction)			
	MPC	EHMA	AEMA	MPC	EHMA	AEMA	MAEMA *
PMAMA95/5	95	0	5	95	0	3	2
PMAMA70/30	70	0	30	70	0	11	19
PMEAMA80/10/10	80	10	10	80	10	8	2
PMEAMA70/20/10	70	20	10	70	20	9	1

* Determined by ¹H-NMR (solvent : ethanol-d₆)

表 2 MPC ポリマーの溶解性試験結果

Polymer	Solubility			
	water	methanol	ethanol	acetone
PMAMA95/5	+	+	+	-
PMAMA70/30	+	+	+	-
PMEAMA80/10/10	+	+	+	-
PMEAMA70/20/10	+	+	+	-
	Solubility : + In solubility : -			

PMAMA70/30, PMEAMA70/20/10 の $^1\text{H-NMR}$ 測定結果を図 7 に示す. 5.5 ppm および 6.0 ppm 付近でピークが検出された. これらのピークは CR 表面に残存している重合性基との光化学反応に利用可能な重合性基である炭素-炭素二重結合($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)に起因するものであった. MPC ユニットのトリメチルアンモニウム基($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$)に起因する 3.3 ppm においてもピークが検出された. PMAMA95/5 および PMEAMA80/10/10 においても同様のピークが検出された. これらのことから MPC と他のモノマーとが共重合し, ポリマーの側鎖に重合性基が導入されたことが確認された.

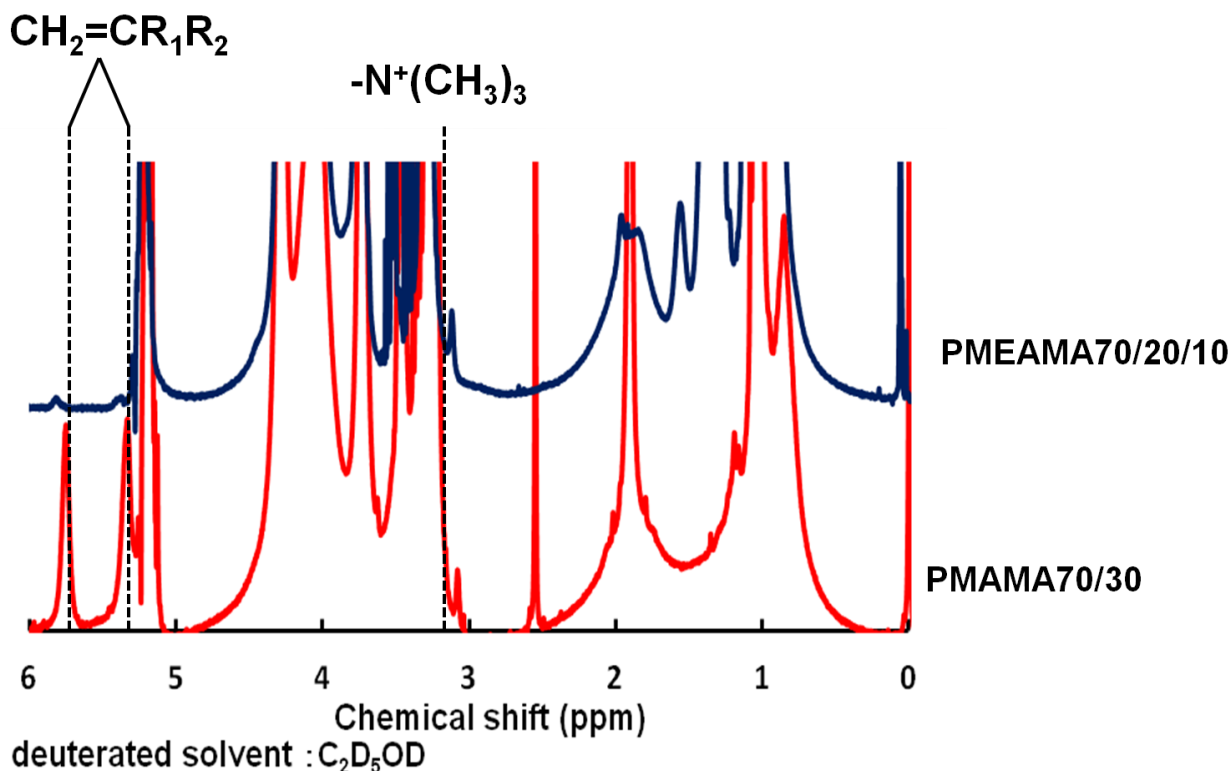


図7 PMAMA70/30, PMEAMA70/20/10の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

4-2 MPC ポリマーで表面処理を行った CR の表面解析

硬化前のペースト状態の CR, 光照射して硬化させた CR, MPC ポリマー (PMAMA70/30) で表面処理を行った CR の ATR/FT-IR スペクトルの測定結果を図 8(A) に示す. $1638, 1610 \text{ cm}^{-1}$ 付近にピークが検出されたが, これは重合性基 ($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$) に起因するものであった³⁰⁾. また, $1500, 1735 \text{ cm}^{-1}$ 付近のピークはそれぞれ CR のベンゼン環, メタクリレート部分のカルボニル基に起因する³⁰⁾. 硬化前のペースト状態の CR, 硬化した CR, MPC ポリマー (PMAMA70/30) で表面処理を行った CR の P2/P1 比について図 8(B) に示す. P2/P1 比とは, ATR/FT-IR スペクトルの炭素-炭素二重結合 ($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$) のピーク面積と $\text{C}=\text{O}$ のピーク面積の比を意味する. CR を硬化させると, P2/P1 比は

硬化前のペースト状態の CR の P2/P1 比よりも低値となった。この結果は硬化した CR にも炭素-炭素二重結合($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)，すなわち重合性基が残存しているということを明確にした。歯科治療で用いられる CR はベースモノマーとファイラーで構成されている。可視光線の照射を行うことで光分解によるラジカルが発生し，CR のベースモノマーの重合を開始させることができる。光照射後も CR 表面には重合性基が残存するという結果から，光照射することでこれらの CR 表面に残存した重合性基と同様の重合性基を有する MPC ポリマーとを共有結合させることを検討した。

また，PMAMA70/30 で表面処理を行った CR の P2/P1 比が硬化後の CR の P2/P1 比よりも低値になったのは PMAMA70/30 の重合性基と硬化後の CR 表面の重合性基が反応したためと考えられる。

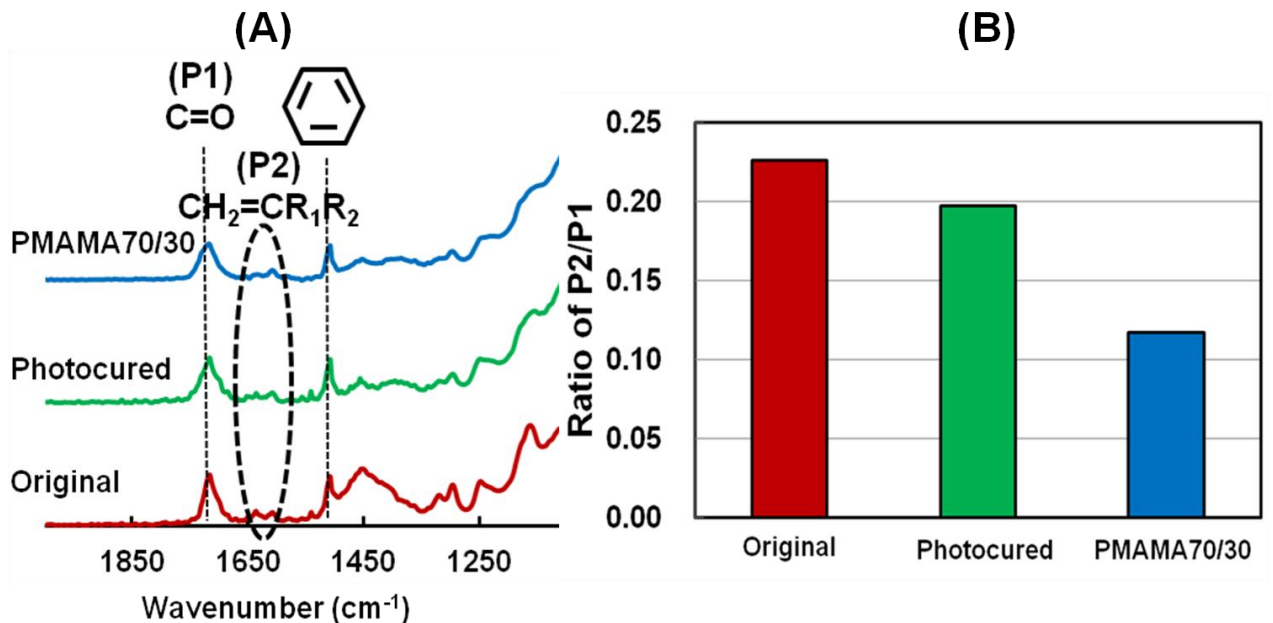


図 8 硬化前のペースト状態の CR，光照射して硬化させた CR，MPC ポリマー (PMAMA70/30) で表面処理を行った CR の ATR/FT-IR スペクトル(A)と P2/P1 比(B) (P1 : C=O ピーク面積，P2 : $\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$ ピーク面積)

未処理の CR と PMAMA70/30 で表面処理を行った CR の表面の走査型電子顕微鏡像を図 9 に示す。図 9 より、いずれの CR についても表面は多孔質で粗造であることが分かる。CR の表面は多孔質で粗造であるため、エリプソメトリーによる計測や原子間顕微鏡による観察などの一般的な方法では CR 表面に修飾された MPC ポリマー層の厚さおよび密度を明らかにすることはできない。また、CR 表面に修飾された MPC ポリマー層は薄いため、走査型電子顕微鏡像では未処理の CR と MPC ポリマーで表面処理された CR 表面とで形態的な違いは観察されなかった。

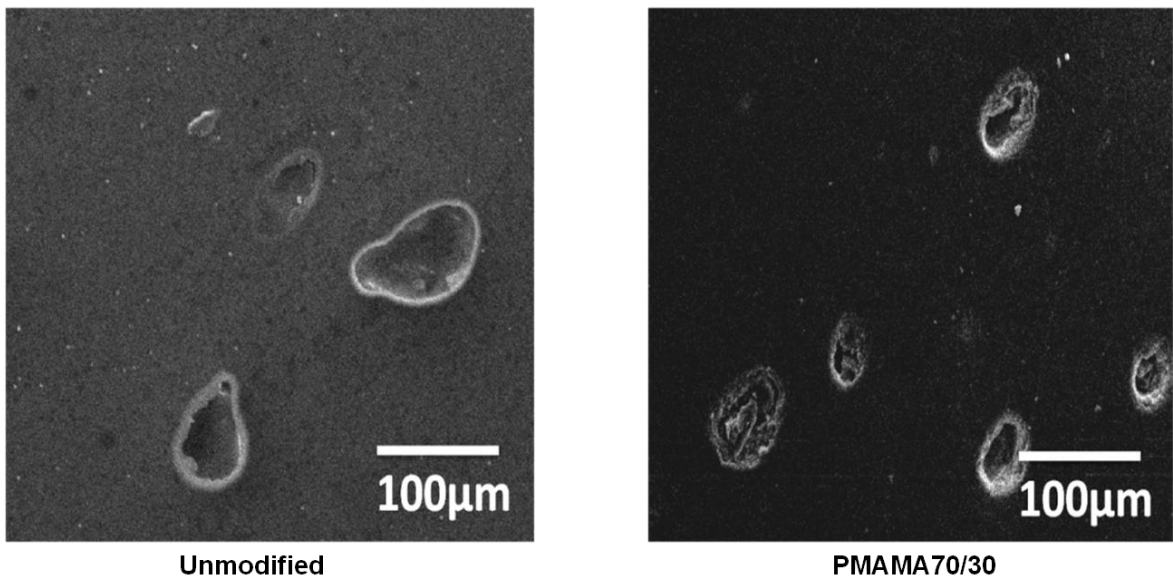


図 9 未処理の CR, PMAMA70/30 により表面処理された CR の表面の走査型電子顕微鏡像

未処理の CR, PMAMA70/30, PMEAMA70/20/10 で表面処理を行った CR 表面の XPS チャートを図 10 に示す。未処理の CR の XPS チャートとは異なり、MPC ポリマーにて表面処理された CR では 403 および 133 eV にピークが観察

された。PMAMA95/5, PMEAMA80/10/10 で表面処理を行った CR 表面においても同様のピークが確認できた。これらのピークは、それぞれ MPC ユニットのホスホリルコリン基の窒素およびリン原子に起因する。この結果より MPC ポリマーによって表面処理された CR 表面にはホスホリルコリン基が付与されたことが示された。

CR にはフィラーとしてシリカ粒子が含まれており、このフィラーのケイ素原子は CR 表面で化学反応した MPC ポリマーの量を評価するための基準として使用することができる。未処理の CR, MPC ポリマーにて表面処理された CR 表面の P/Si 比を図 11 に示す。P/Si 比とは、XPS スペクトルの P のピーク面積と Si のピーク面積の比を意味する。未処理の CR 表面においては P/Si 比は算出されなかったが、MPC ポリマーで表面処理された CR においてはいずれにおいても P/Si 比を求めることができた。MPC ポリマーで表面処理された CR において、P/Si 比の値は MPC ポリマーの化学的構造および組成に依存した。図 11 より CR が PMAMA70/30 で表面処理された場合が最も高い P/Si 比を示したことが分かる。表 1 より PMAMA70/30 の重合性基を有する MAEMA ユニットの組成比が最も大きいことが分かる。また、図 11 より PMEAMA70/20/10 で表面処理された CR の P/Si 比が最も低値を示していることが、これも表 1 から分かるように PMEAMA70/20/10 の MAEMA ユニットの組成比が最も小さいからである。PMAMA95/5 で表面処理された CR と PMAMA70/30 表面処理された CR で比較した場合、表 1 より PMAMA70/30 の方が MAEMA ユニットの組成比が大きいため P/Si 比も PMAMA70/30 の方が高値になる。同様に PMEAMA80/10/10 で表面処理された CR と PMEAMA70/20/10 表面処理された CR で比較した場合は、表 1 より PMEAMA80/10/10 の方が MAEMA ユニットの組成比が大きいため P/Si 比も高値を示すと考えられる。この結果より P/Si 比の値はポリマーの

MAEMA ユニットの組成比に依存し、PMAMA70/30 が最も効率的に CR 表面と光化学反応を起こし、結合することが明らかとなった。

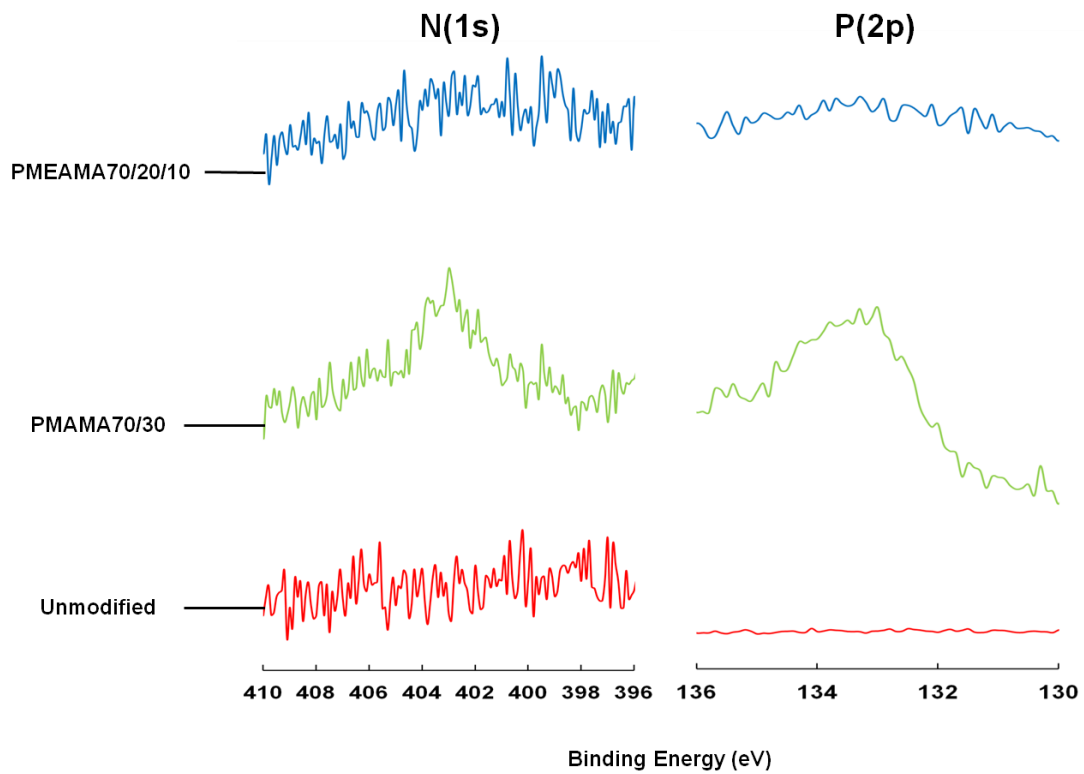


図 10 未処理の CR, PMAMA70/30, PMEAMA70/20/10 で表面処理を行った CR 表面の XPS チャート

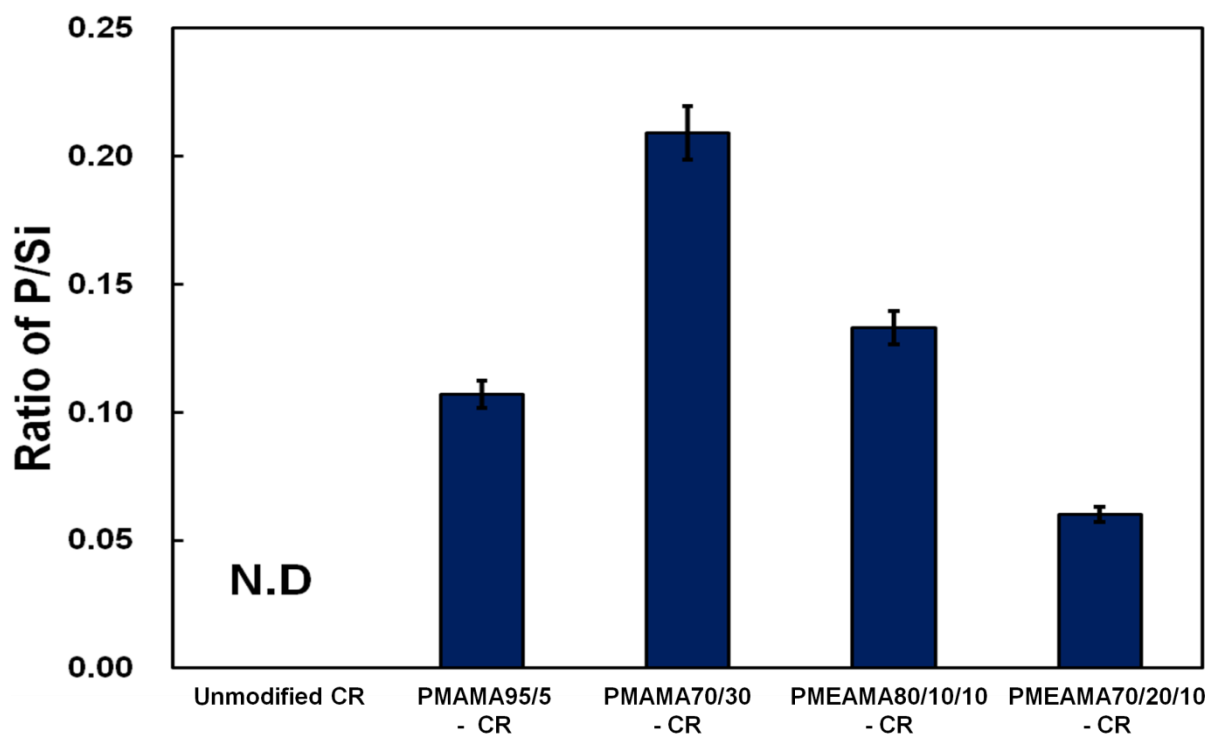


図 11 未処理の CR, MPC ポリマーで表面処理された CR の P/Si 比

Data are mean (Error bars : standard deviation). (n=3)

*いずれの試料間においても有意差が認められた. ($P < 0.05$)

図 12 は未処理の CR, MPC ポリマーで表面処理された CR, HA の表面における水中での空気の接触角を示す. 未処理の CR 表面の水中での空気の接触角は 66° であったのに対し, MPC ポリマーで表面処理された CR 表面の空気の接触角の値は有意に減少した. PMAMA70/30 で表面処理された CR の表面の空気の接触角は 32° で最小であった. 図 12 より, MPC ポリマーを用いて表面処理を行うことで CR 表面が親水性となったことが分かる. MPC ポリマーは側鎖にホスホリルコリン基を有するため親水性を示す^{10,11)}. MPC ポリマーにて表面処理を行った場合に CR 表面で高い親水性が得られたのは, 水中で CR 表面に親水性の MPC ユニットの側鎖であるホスホリルコリン基が配向したためと考えら

れる。

MPC ポリマー中の EHMA ユニットの影響について考慮した際に PMEAMA と PMAMA を比較してみると、図 11 より、PMEAMA70/20/10 で表面処理された CR よりも PMAMA70/30 で表面処理された CR の方が P/Si 比が大きいことが分かる。また、図 12 からは PMAMA70/30 で表面処理を行った CR 表面の水中の空気の接触角は PMEAMA70/20/10 で表面処理を行った CR 表面のそれよりも小さいことが分かる。これらの結果より PMAMA70/30 は PMEAMA70/20/10 よりも親水性が高いことが言えるが、これは EHMA ポリマーが主に塗料、被覆材料、接着剤、繊維処理剤、潤滑油添加剤、歯科材料分散剤等に使用され、疎水性、耐水性、成膜性を有するため、EHMA ユニットのポリマー中に含む PMEAMA の方が PMAMA よりも疎水的であるためと考えられる。

PMAMA95/5 で表面処理された CR と PMAMA70/30 で表面処理された CR で比較した場合、接触角の大きさは後者の方が小さく、親水性が大きいことが分かるが、これは表 1 より PMAMA70/30 の方が PMAMA95/5 よりも MAEMA ユニットの組成比が大きく、図 11 より PMAMA70/30 の方が PMAMA95/5 よりも P/Si 比が高値であることが理由と考えられる。

さらに、PMEAMA80/10/10 表面処理された CR と PMEAMA70/20/10 で表面処理された CR で比較した場合、接触角の大きさに有意差は認められなかった。表 1 より PMEAMA80/10/10 の方が PMEAMA70/20/10 よりも重合性基を有する MAEMA ユニットの組成比が大きく、図 11 から PMEAMA80/10/10 で表面処理された CR の P/Si 比が PMEAMA70/20/10 で表面処理された CR の P/Si 比よりも高値となっているにも関わらず両方で接触角の大きさに有意差が認められなかったのは、両者とも疎水性を示す EHMA ユニットの有しており、この

EHMA ユニットの影響によるものと考えられる。

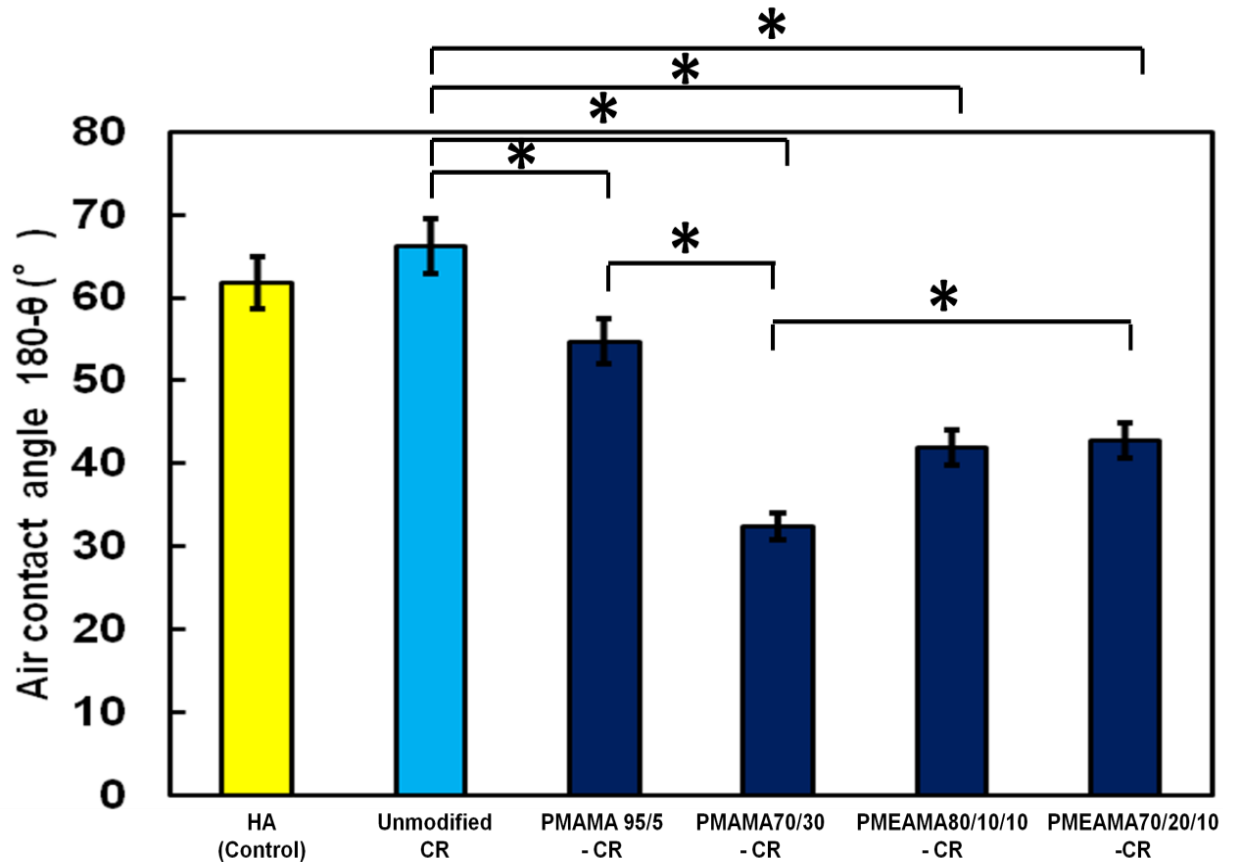


図 12 未処理の CR, MPC ポリマーで表面処理された CR, HA の表面における水中での空気の接触角

Data are mean (Error bars : standard deviation). (n=25) * $P < 0.05$

4-3 MPC ポリマーで表面処理を行った CR 表面の防汚性, 物理的耐久性の評価

タンパク質吸着は生体応答を支配する重要な事象の 1 つである。細菌付着やバイオフィルムの形成もまたタンパク質吸着層によって誘導される³¹⁾。細菌の

付着抑制の観点から、MPC ポリマーのような双性イオンの性質を持ったポリマーがいくつか研究、開発されている^{32,33)}。タンパク質吸着の評価を行うことで生体応答に関する有用な情報を得ることができる。口腔内細菌の付着およびバイオフィルムの形成はムチンの吸着と強く関連している³⁴⁾。未処理の CR と MPC ポリマーで表面処理を行った CR、HA の表面に吸着したムチンの相対吸着量を図 13 に示す。図 9 に示すように CR 表面は多孔質で粗造であり、CR の表面積を正確に求めることが困難なため相対値を用いた。一般的には、MPC ポリマーで表面処理を行うことでタンパク質吸着を著しく抑制させることが可能である^{12,13)}。CR 表面上に MPC ポリマーを修飾させて光照射することでその効果が現れてくる。

図 13 より MPC ポリマーで CR の表面処理を行うことで表面に吸着するムチンの吸着量が減少していくことが明らかであり、PMAMA70/30 で表面処理を行った場合に CR 表面のムチン吸着量は最少となった。μBCA 法で高いタンパク質付着抑制能が得られたのは CR 表面に親水基が存在することで生体反応の起因となるタンパク質と CR 表面との疎水性相互作用が生じにくいことにより、タンパク質の吸着も抑制されたためと考えられる。また、MPC ポリマーの表面電位は -0.4 mV とほぼゼロであり、タンパク質表層は陽性に荷電しているため静電的相互作用が抑制される^{35,36)}。このこともタンパク質の吸着抑制の理由と考えられる。前述のように CR 表面が親水性となることでタンパク質吸着が抑制される。このことから図 12 より最も親水性が大きい PMAMA70/30 で表面処理された CR のタンパク質吸着量が最小となることが分かる。

PMAMA95/5 で表面処理された CR と PMAMA70/30 で表面処理された CR を比較すると、図 13 より PMAMA70/30 で表面処理された CR 表面のタンパク質吸着量が少ないことが分かるが、これは図 12 から分かるように

PMAMA70/30 で表面処理された CR の方が PMAMA95/5 で表面処理された CR よりも親水性が大きいからと考えられる。同様に PMEAMA80/10/10 表面処理された CR と PMEAMA70/20/10 で表面処理された CR で比較した場合、タンパク質吸着量に有意差が認められなかったが、図 12 から分かるように両者の接触角、親水性にも有意差がないことに関係していると考えられる。

PMAMA70/30 で表面処理された CR と PMEAMA70/20/10 で表面処理された CR を比較すると、図 13 より PMAMA70/30 で表面処理された CR 表面のタンパク質吸着量が少ないことが分かるが、これは図 12 から分かるように PMAMA70/30 で表面処理された CR の方が PMEAMA70/20/10 で表面処理された CR よりも親水性が大きいからと考えられる。PMEAMA の EHMA ユニットがムチン吸着に何かしらの影響を与えているのではないかと考えられるが、これはムチンの分子は接触角測定に使用される気泡よりも小さいため、ムチンの分子はポリマー層を透過し、疎水性である EHMA ユニットまたは CR 表面に直接吸着されるためと考察できる。

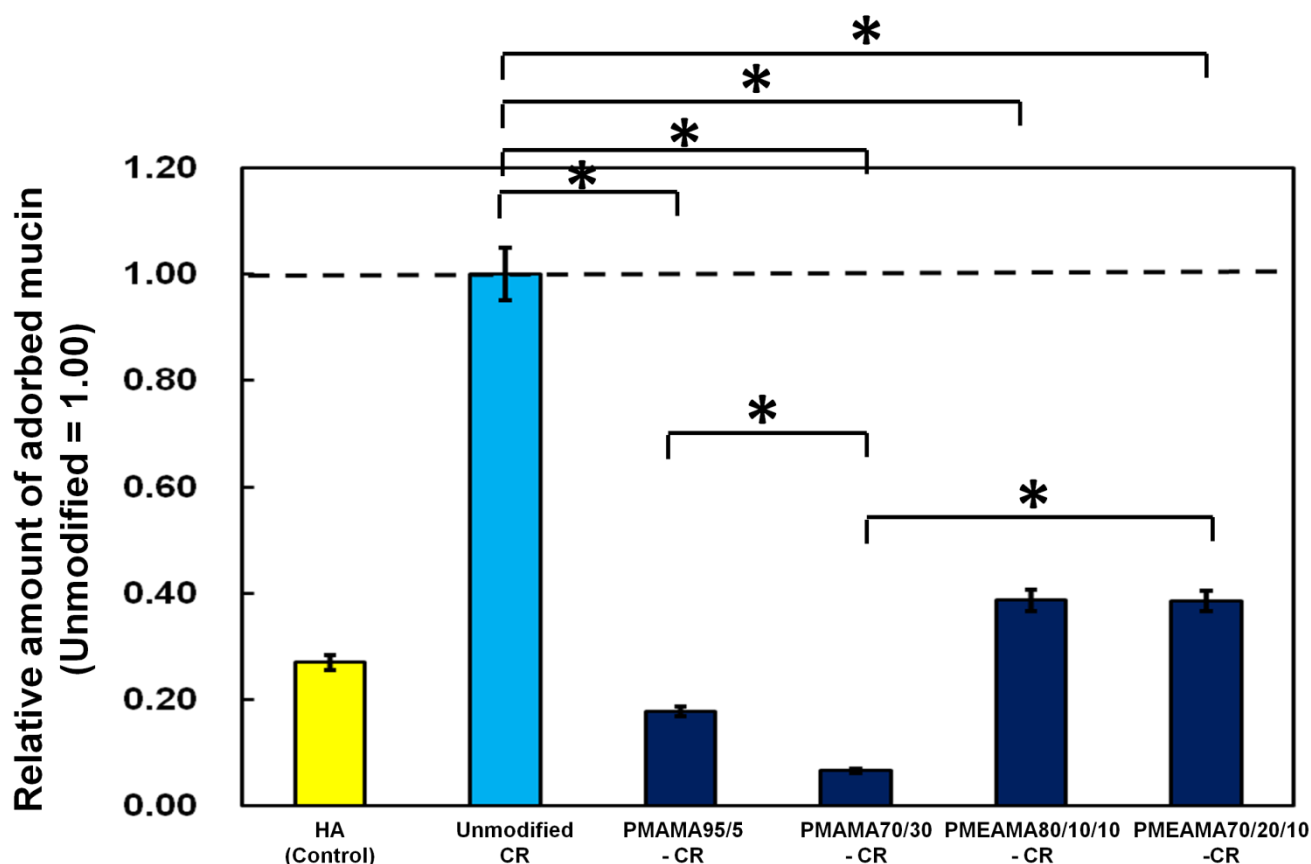


図 13 未処理の CR, MPC ポリマーで表面処理を行った CR, HA 表面のムチンの相対吸着量

Data are mean (Error bars : standard deviation). (n=5) * P <0.05

図 13 より PMAMA を用いて表面処理を行った CR の表面の方が PMEAMA を用いて表面処理を行った CR の表面よりもタンパク質吸着抑制能が大きいことが示された。この結果より以下の細菌付着試験, バイオフィーム形成試験では PMAMA で表面処理された CR のみを使用して評価を行った。

また, 普段歯ブラシによるブラッシングを行うため CR 表面に修飾した MPC ポリマーの物理的耐久性の評価も行った。未処理の CR, MPC ポリマーで表面処理された CR の表面を摩擦・摩耗試験機の治具に取り付けられた歯ブラシで摺動した後の CR を試料として用いてタンパク質吸着試験(μ BCA 法), 細菌付着

試験, バイオフィーム形成試験を行い, 摺動後の CR 表面の防汚性を解析することで CR 表面に修飾された MPC ポリマーの物理的耐久性の評価を行った. 図 14 に歯ブラシで 500 回摺動させた後の未処理の CR と PMAMA70/30 で表面処理を行った CR の表面の走査型電子顕微鏡像を示す. 歯ブラシで 500 回摺動させた後でも未処理の CR と PMAMA70/30 で表面処理を行った後の CR の表面にはいずれも明らかな摩耗痕はみられなかった.

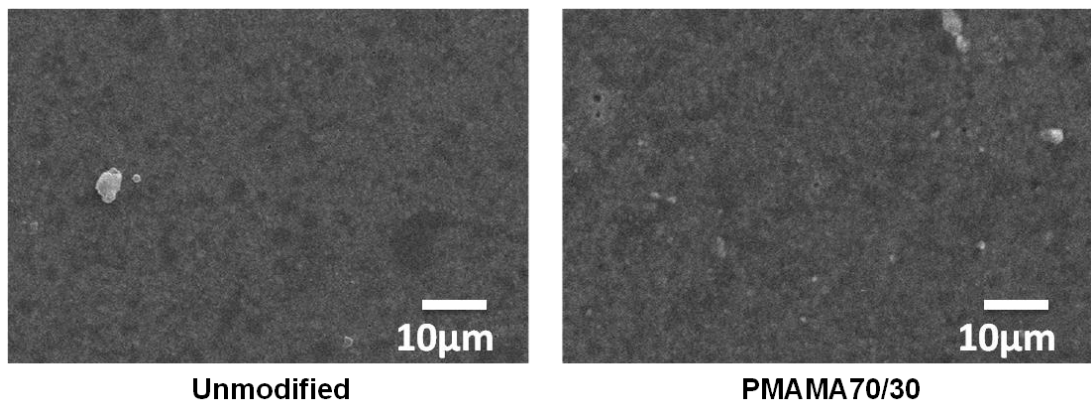


図 14 歯ブラシで 500 回摺動させた後の未処理の CR 及び PMAMA70/30 により表面処理された CR の表面の走査型電子顕微鏡像

図 15 に歯ブラシでの摺動試験前後の未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面に吸着したムチンの相対吸着量を示す. 図 15 より 500 回歯ブラシ摺動後でも未処理の CR よりも PMAMA で表面処理された CR のタンパク質吸着量が有意に少なく、特に PMAMA70/30 で表面処理された CR のタンパク質吸着量が最少となることが分かる.

また、PMAMA95/5, PMAMA70/30 で表面処理された CR において摺動前後の CR 表面のタンパク質吸着量を評価していくと、歯ブラシで 500 回摺動されることでタンパク質吸着量がそれぞれ 3.9 倍, 6.8 倍増加することが示された.

この結果は歯ブラシで CR 表面を 500 回摺動することで表面に化学結合した PMAMA の層の一部が剥離することを示唆していると考えられる。

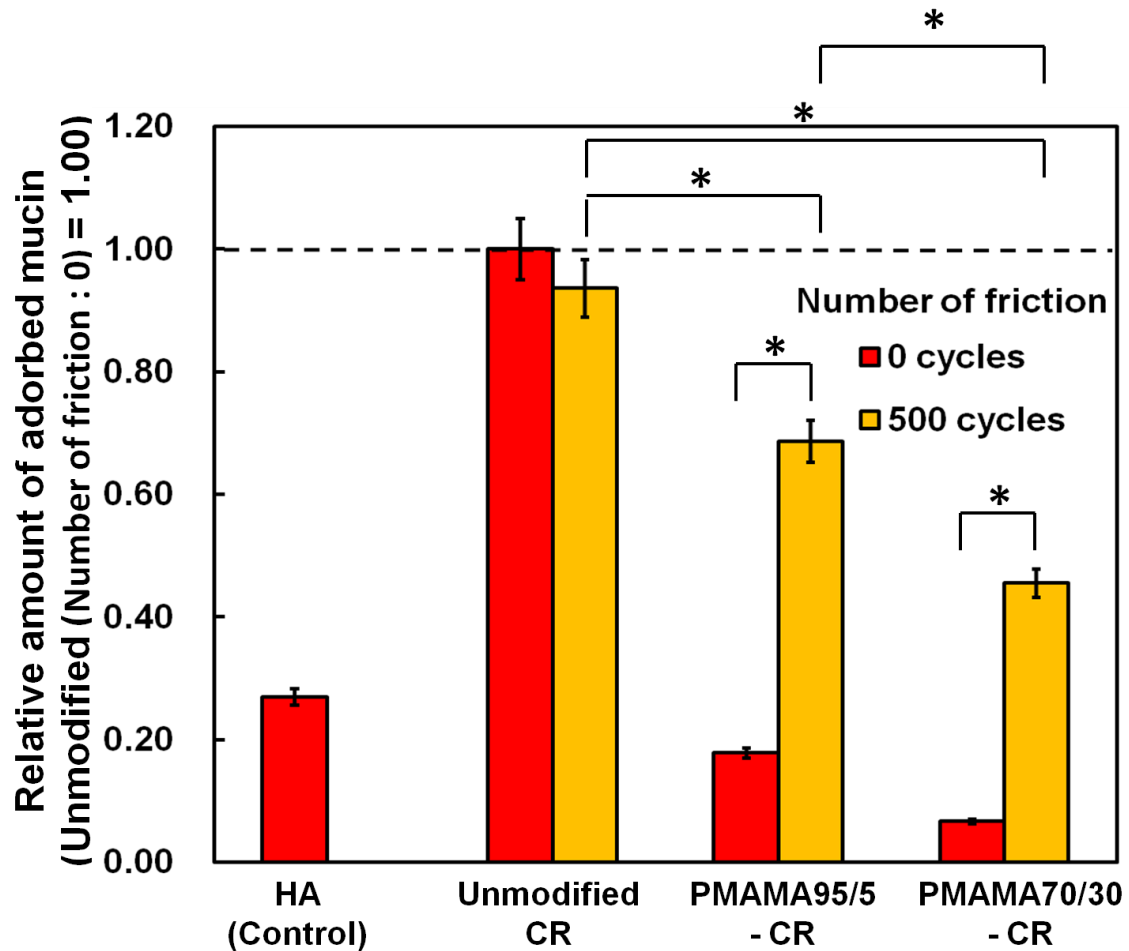


図 15 歯ブラシによる摺動前後の未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面のムチンの相対吸着量

Data are mean (Error bars : standard deviation). (n=5) * $P < 0.05$

未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面に付着した細菌 (*S.mutans*) の走査型電子顕微鏡像を図 16 に示す。図 16 より PMAMA で表面処理された CR 表面では未処理の CR 表面と比べて *S.mutans* 付着数が減少したことが分かる。

歯ブラシでの摺動試験前後の未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面に付着した細菌(*S.mutans*)の相対付着量について図 17 に示す. タンパク質吸着試験の際と同様, CR 表面は多孔質かつ粗造で表面積の算出が困難なため相対値を用いて細菌付着量の評価を行った. 図 17 より摺動前後いずれにおいても PMAMA で表面処理された CR 表面では未処理の CR 表面と比べて *S.mutans* 付着数が有意に減少した. 特に PMAMA70/30 で表面処理された CR の細菌付着量が最少となった.

また, PMAMA95/5, PMAMA70/30 で表面処理された CR において摺動前後の CR 表面の細菌付着量を評価していくと, CR は共に 500 回摺動されることで CR 表面の細菌付着量がそれぞれ 1.6 倍, 1.1 倍増加することが示された. これは歯ブラシで CR 表面を 500 回摺動させることで表面に化学結合した PMAMA の層の一部が剥離するためと考えられる.

図 16, 17 より PMAMA を用いて CR の表面処理を行うことでタンパク質吸着抑制能だけでなく細菌付着抑制能をも獲得することができたと言える. しかし, CR 表面で歯ブラシを 500 回摺動させることで MPC ポリマー層の一部が剥離することで細菌付着抑制能が低減すると考えられる. MPC ポリマーで表面処理された CR 表面が細菌付着抑制能を獲得したのは, タンパク質吸着抑制能を獲得した理由と同様で CR 表面に親水基が存在することで細菌と CR 表面との疎水性相互作用が抑制されることで細菌の表面への付着も抑制された, さらに, MPC ポリマーと細菌表層との静電的相互作用も抑制されたからと考察できる.

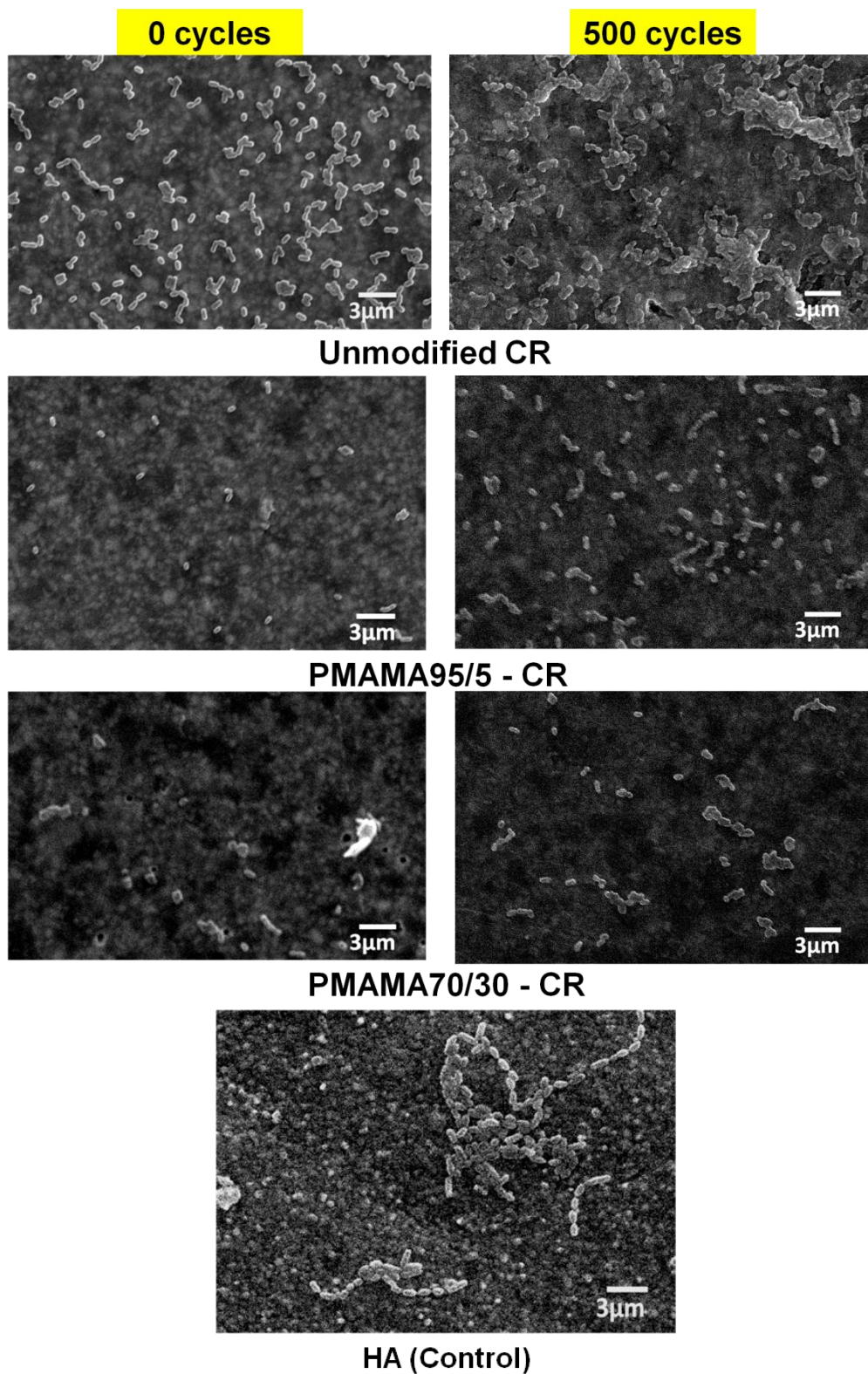


図 16 未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面に付着した細菌(*S.mutans*)の走査型電子顕微鏡像

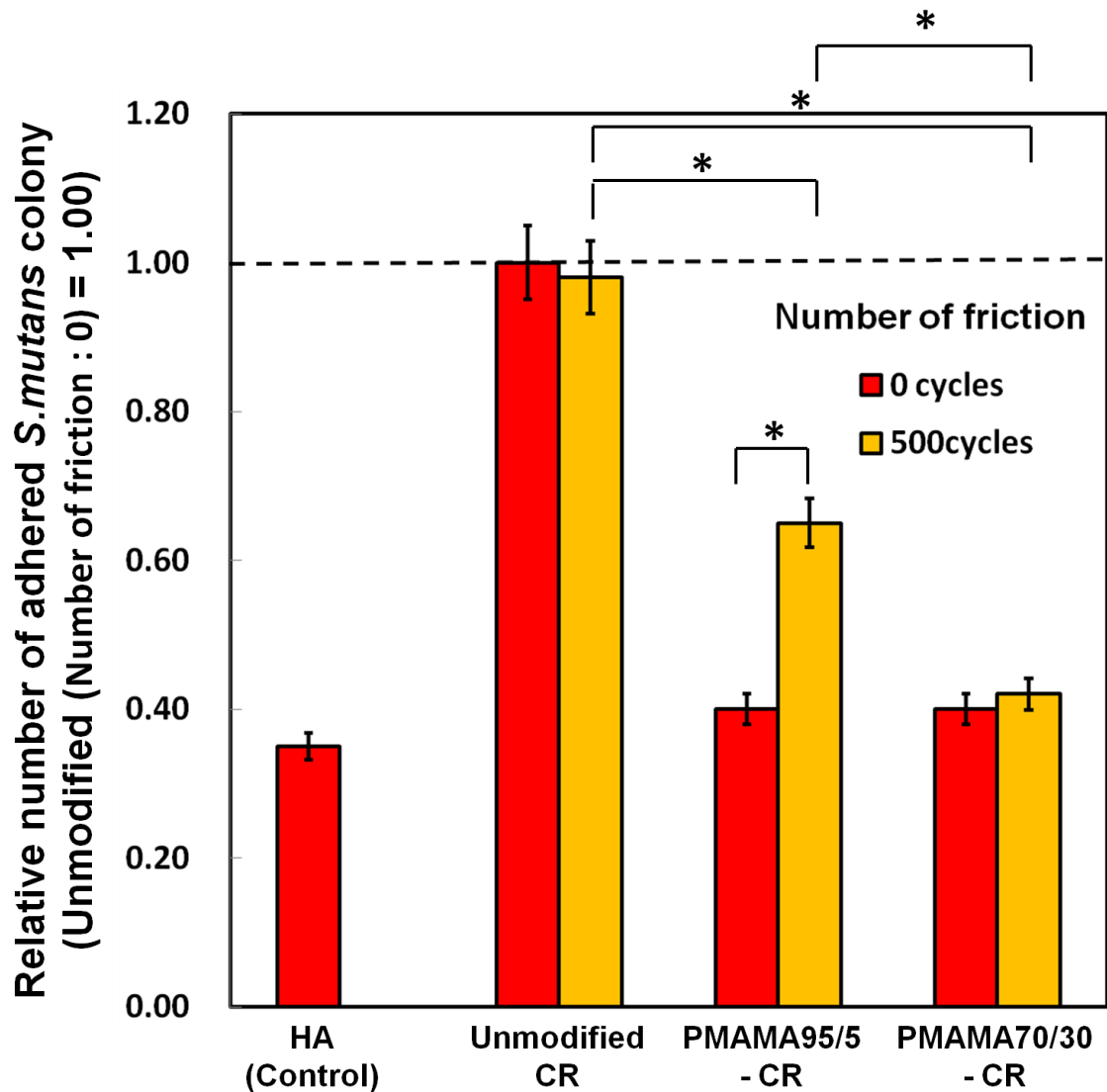


図 17 歯ブラシによる摺動前後の未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面の細菌(*S.mutans*)相対付着量

Data are mean (Error bars : standard deviation). (n=3) * $P < 0.05$

図 18 に未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面に形成された *S.mutan* バイオフィルムの走査型電子顕微鏡像を示す. 図 18 より PMAMA で表面処理された CR 表面では未処理の CR 表面と比べて有意にバイオフィルム形成量は減少したことが分かる. 摺動試験後の CR についても同様の結果とな

った。

歯ブラシでの摺動試験前後の未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面に形成された *S.mutans* バイオフィルム相対形成量について図 19 に示す。タンパク質吸着試験, 細菌付着試験と同様に相対値を用いてバイオフィルム形成量の評価を行った。図 19 より PMAMA で表面処理された CR 表面では未処理の CR 表面と比べてバイオフィルム形成量が減少し, さらには PMAMA95/5 を用いて表面処理を行った場合と PMAMA70/30 を用いて表面処理を行った場合と比較すると, PMAMA70/30 で表面処理を行った CR 表面の方がバイオフィルム形成量は少なかった。また, PMAMA95/5, PMAMA70/30 で表面処理された CR は共に歯ブラシで 500 回摺動されることで CR 表面のバイオフィルム形成量がそれぞれ増加することが示された。これは前述したように歯ブラシ摺動試験による摩耗によって CR 表面に化学結合した PMAMA の層の一部が剥離したためだと考えられる。

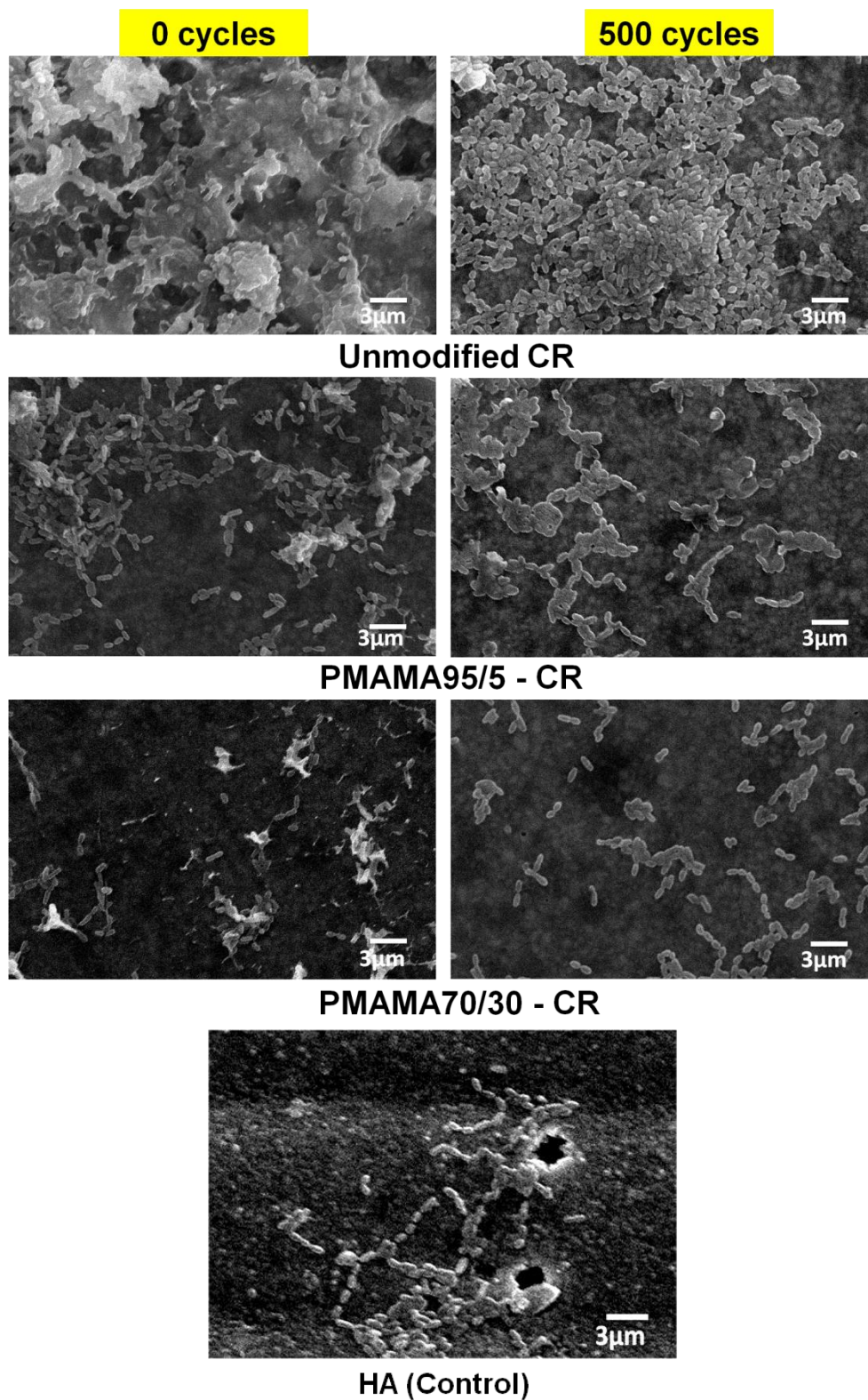


図 18 未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面に形成された *S.mutan* バイオフィルムの走査型電子顕微鏡像

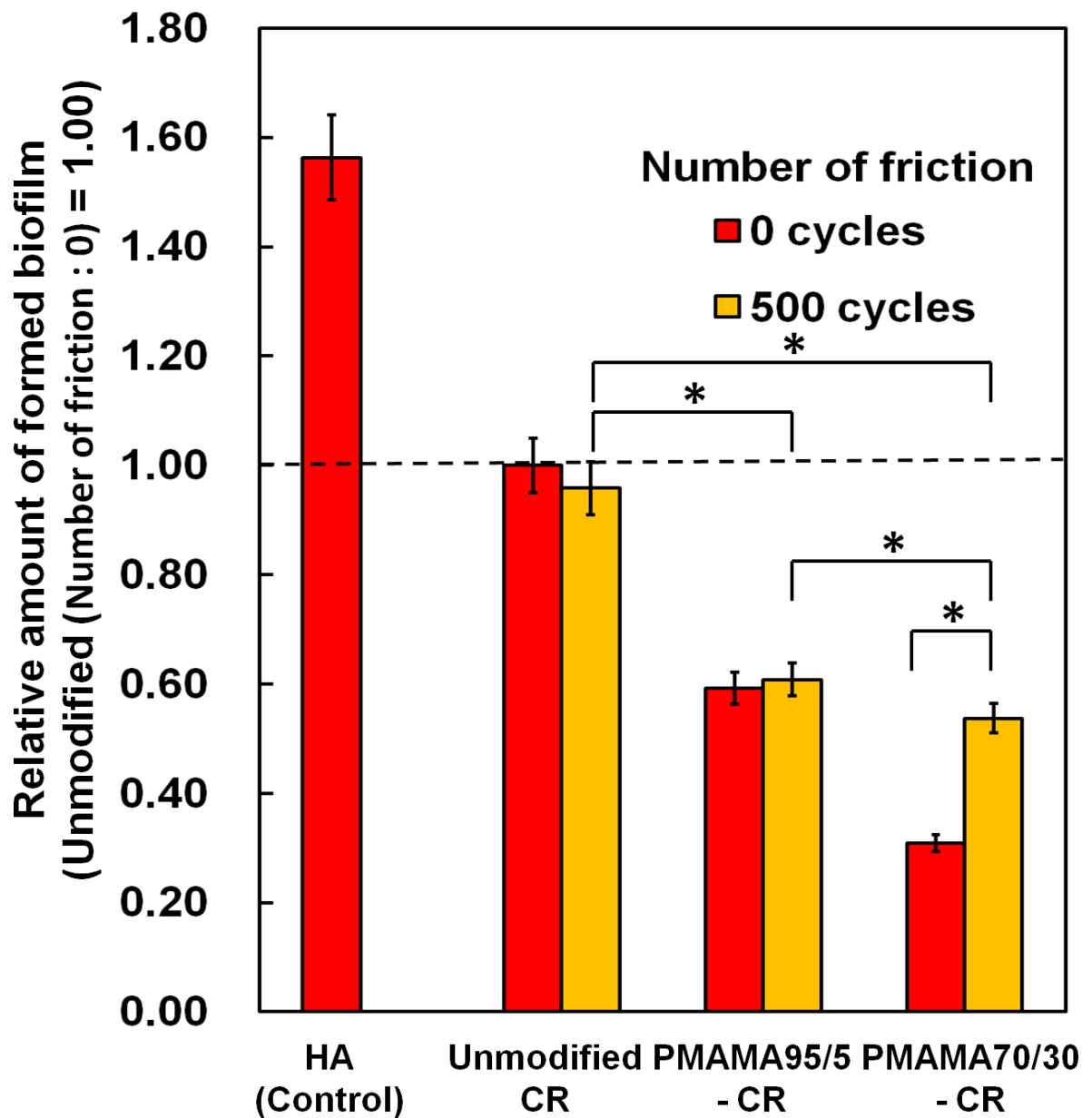


図 19 歯ブラシによる摺動前後の未処理の CR, PMAMA で表面処理された CR, HA 表面に形成された *S.mutans* バイオフィルム相対形成量

Data are mean (Error bars : standard deviation). (n=3) * $P < 0.05$

以上の実験結果より本研究では PMAMA70/30 で表面処理を行った CR の表面が最も優れた防汚性を示すことが明らかとなった。MPC ポリマーを CR 表面

に修飾させて光化学反応を起こすことで十分な密度の MPC ポリマー層を得ることができたが、歯ブラシで 500 回摺動されることで一部の MPC ポリマー層が剥離することが示唆されたため、防汚性の低下が懸念されることから物理的耐久性のさらなる向上が今後は要求される。日常のブラッシングの際に 1 歯につき歯ブラシが 5 回往復、1 日に 3 回ブラッシングをすると仮定すると 500 回の往復は約 1 ヶ月分に相当する。一般的には 3~6 ヶ月に一度、歯科医院での健診が推奨されるため、少なくとも 1 日 3 回ブラッシングを行っても 3~6 ヶ月はある程度の防汚性が維持されるような耐久性が求められる。さらに防汚性、物理的耐久性、操作性を高めた表面処理法の開発に向けて大学院卒業後も研究を重ねていきたいと思う。医科領域では前に述べたように MPC ポリマーは既に臨床応用されているが、これまでに歯科領域においては口腔洗浄剤に添加することしかなされていない。MPC ポリマーは歯科領域では未だに臨床応用されていない。また研究報告についても少ない。特に CR 表面と MPC ポリマーとを化学結合させて安定な表面処理層を形成する報告は渉猟する限り認められない。CR 表面に残存する未反応の重合性基($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)と同様の重合性基を導入した MPC ポリマーを合成し、この溶液を CR 表面に塗布して光照射することで CR 表面に MPC ポリマーを化学結合させるという表面処理法は歯科臨床手法に基づいた条件で、新規性があり、本研究の特色・独創的な点である。本研究が実際の歯科臨床に応用されることを目標に卒業後も努力を続けていきたい。

MPC ポリマーは人体に無害であり、本研究の表面処理法は簡便で、操作時間も短いため、患者の口腔内で実際に適用することは可能であると考えられる。本研究の表面処理法は CR 表面に対してのみの適応であるため、実際に防汚性が獲得できたのは CR 表面のみである。充填された CR 表面以外の歯質のエナメル質表面は重合性基($\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$)を有さないため、本研究室で用いた PMAMA,

PMEAMA は修飾されず，エナメル質は防汚性を有さない．エナメル質表面に化学結合可能な他の高分子の合成が必要となる．本研究の防汚処理の対象が CR のみとなっているため，充填された CR 辺縁近傍のエナメル質へのタンパク質吸着や細菌付着，バイオフィーム形成は免れない．また，CR の重合収縮によって生じた CR と歯質との間隙へのタンパク質，細菌，細菌の糖代謝によって生じた酸の侵入を妨げ，二次齲蝕の発生を完全に抑制することは困難であると考えられる．今後はエナメル質，CR の双方と化学結合が可能な高分子の設計と合成，表面処理法の開発が必要となるだろう．

5 結論

重合性基である炭素-炭素二重結合を有する MPC ポリマーを合成することができた。また、CR 表面にこれらの MPC ポリマーを塗布してから光照射を行うことで光化学反応によって MPC ポリマーを CR 表面に結合させることができた。MPC ポリマーを用いて CR の表面処理を行うことでその表面は高い親水性、タンパク質吸着・細菌付着・バイオフィーム形成抑制能を示した。物理的耐久性の点ではまだ課題点が残るが、CR 表面の新たな防汚処理法を確立させた。また、本研究の MPC ポリマーを用いた CR 表面処理法は、実際の臨床での歯科治療に応用できる。本研究は歯科用修復物の優れた防汚処理技術の開発に繋がり、国民の口腔内環境維持に貢献することが期待できる。

6 謝辞

本研究は著者が自治医科大学大学院医学研究科博士課程在学中に同大学院医学系研究科歯科口腔外科学講座 森良之教授，東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 石原一彦教授の御指導と御支援のもとに行った。また，本研究は国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED) の S-イノベーション「革新的医療を実現するためのバイオ機能材料の創製」によって行われた。

大学院入学前に大学院では生体材料の研究を行いたいと申し上げた私にこのような貴重な機会を与えてくださりました森良之教授，東京大学大学院工学系研究科での研究に際して，素晴らしい実験環境と貴重な御助言，御指導を多く与えてくださりました石原一彦教授にここに深く感謝の意を表します。また，実験手法の御指導，研究の御助言を多くいただきました東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻石原研究室の井上祐貴助教，深澤今日子学術支援専門職員に心より感謝申し上げます。佐賀大学医学部病因病態学講座微生物学分野の菖蒲池健夫助教には細菌培養や細菌付着試験の実験手法について御指導、御支援いただきました。先生の御指導がなければ本研究の防汚性の評価を行うことが困難でした。心より感謝申し上げます。

最後に自治医科大学歯科口腔外科学講座医局員の皆様，東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻/バイオエンジニアリング専攻石原研究室の皆様
の御支援，御協力に深謝致します。

7 参考文献

- 1) L. Wang, X. Xie, S. Imazato, MD. Weir, MA. Reynolds, HH. Xu, A protein-repellent and antibacterial nanocomposite for Class-V restorations to inhibit periodontitis-related pathogens, *Mat. Sci. Eng. C Mater.* 67 : 702-710 , 2016.
- 2) S. Xiao, K. Liang, MD. Weir, L. Cheng, H. Liu, X. Zhou, Y. Ding, HH. Xu, Combining bioactive multifunctional dental composite with PAMAM for root dentin remineralization, *Mater.* 10 : 89(1-17), 2017.
- 3) X. Xie, L. Wang, D. Xing, K. Zhang, MD. Weir, H. Liu, Y. Bai, HH. Xu, Novel dental adhesive with triple benefits of calcium phosphate recharge, protein-repellent and antibacterial functions, *Dent. Mater.* 33 : 553-563, 2017.
- 4) N. Zhang, MA. Melo, MD. Weir, MA. Reynolds, Y. Bai, HH. Xu, Do dental resin composites accumulate more oral biofilms and plaque than amalgam and glass ionomer materials?, *Mater.* 9 : 888(1-13), 2016.
- 5) N. Zhang, K. Zhang, MA. Melo, MD. Weir, DJ. Xu, Y. Bai, HH. Xu, Effects of long-term water-aging on novel anti-biofilm and protein-repellent dental composite, *Int. J. Mol. Sci.* 18 : 186(1-15), 2017.

- 6) F. A. Scannapieco, Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 5 : 203-248, 1994.
- 7) S. Kang, M. Lee, M. Kang, M. Noh, J. Jeon, Y. Lee, J.-H Seo, Development of anti-biofouling interface on hydroxyapatite surface by coating zwitterionic MPC polymers containing calcium-binding moieties to prevent oral bacterial adhesion, *Acta Biomater.* 40 : 70-77, 2016.
- 8) M. Lee, H. Kim, J. Seo, M.Kang, S. Kang, J. Jang, Y. Lee, J.-H. Seo, Surface zwitterionization: Effective method for preventing oral bacterial biofilm formation on hydroxyapatite surfaces, *Appl. Surf. Sci.* 427 : 517-524, 2018.
- 9) K. Ishihara, T. Ueda, N. Nakabayashi, Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membranes, *Polym. J.* 22 : 355-360, 1990.
- 10) T. Ueda, H. Oshida, K. Kurita, K. Ishihara, N. Nakabayashi, Preparation of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine copolymers with alkyl methacrylates and their blood compatibility, *Polym. J.* 24 : 1259-1269, 1992.
- 11) K. Ishihara, R. Aragaki, T. Ueda, A. Watanabe, N. Nakabayashi,

Reduced thrombogenicity of polymers having phospholipid polar groups, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 : 1069–1077, 1990.

- 12) K. Ishihara, NP. Ziats, BP. Tierney, N. Nakabayashi, JM. Anderson, Protein adsorption from human plasma is reduced on phospholipid polymers, *J. Biomed. Mater. Res.* 25 : 1397–1407, 1991.
- 13) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi, Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption?, *J. Biomed. Mater. Res.* 39 : 323-330, 1998.
- 14) AL. Lewis, TA. Vick, AC. Collias, LG. Hughes, RR. Palmer, SW. Leppard, JD. Furze, AS. Taylor, PW. Stratford, Phosphorylcholine-based polymer coatings for stent drug delivery, *J Mater Sci Mater Med.* 12 : 865-870, 2001.
- 15) T. Moro, Y. Takatori, K. Ishihara, T. Konno, Y. Takigawa, T. Matsushita, UL. Chung, K. Nakamura, H. Kawaguchi, Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis, *Nat. Mater.* 3 : 829-836, 2004.
- 16) S. Monge, B. Canniccioni, A. Graillet, JJ. Robin, Phosphorus-containing polymers: a great opportunity for the biomedical field, *Biomacromolecules.* 12(6) : 1973-1982, 2011.

- 17) Y. Iwasaki, K. Ishihara, Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 13 : 064101 (14pp), 2012.
- 18) Y. Shibata, Y. Yamashita, K. Tsuru, K. Ishihara, K. Fukazawa, K. Ishikawa, Preventive effects of a phospholipid polymer coating on PMMA on biofilm formation by *oral streptococci*, *Appl. Surf. Sci.* 390 : 602-607, 2016.
- 19) K. Hatsuno, H. Mukohyama, S. Horiuchi, Y. Iwasaki, N. Yamamoto, K. Akiyoshi, H. Taniguchi, Poly(MPC-co-BMA) coating reduces the adhesion of *Candida albicans* to poly(methyl methacrylate) surfaces, *Prosthodont. Res. Pract.* 5 : 21-25, 2006.
- 20) N. Takahashi, F. Iwasa, Y. Inoue, H. Morisaki, K. Ishihara, K. Baba, Evaluation of the durability and antiadhesive action of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine grafting on an acrylic resin denture base material, *J. Prosthet. Dent.* 112 : 194-203, 2014.
- 21) M. Fukunishi, Y. Inoue, H. Morisaki, H. Kuwata, K. Ishihara, K. Baba, A Polymethyl methacrylate-based acrylic dental resin surface bound with a photoreactive polymer inhibits accumulation of bacterial plaque, *Int. J. Prosthodont.* 30 : 533-540, 2017.

- 22) K. Ikeya, F. Iwasa, Y. Inoue, M. Fukunishi, N. Takahashi, K. Ishihara, K. Baba, Inhibition of denture plaque deposition on complete dentures by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer coating: A clinical study, *J. Prosthet. Dent.* 119 : 67-74, 2017.
- 23) N. Zhang, C. Chen, MA. Melo, Y. Bai, L. Cheng, HH. Xu, A novel protein-repellent dental composite containing 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, *Int. J. Oral. Sci.* 7 : 103-109, 2015.
- 24) N. Zhang, J. Ma, MA. Melo, MD. Weir, Y. Bai, HH. Xu, Protein-repellent and antibacterial dental composite to inhibit biofilms and caries, *J. Dent.* 43 : 225-234, 2015.
- 25) P.E. Lagouvardos, P. Pissis, A. Kyritsis, D. Daoukaki, Water sorption and water-induced molecular mobility in dental composite resins, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14 : 753-759, 2003.
- 26) J.E. Elliott, L.G. Lovell, C.N. Bowman, Primary cyclization in the polymerization of bis-GMA and TEGDMA: a modeling approach to understanding the cure of dental resins, *Dent. Mater.* 17 : 221-229, 2001.
- 27) J.W. Stansbury, S.H. Dickens, Determination of double bond conversion in dental resin by near infrared spectroscopy, *Dent. Mater.* 17 : 71-79,

2001.

- 28) S. Thamizharasi, P. Gnanasundaram, S. Balasubramanian, Copolymers derived from 4-nitrophenyl methacrylate(NPMA) and methylmethacrylate (MMA) – synthesis, characterization, and reactivity ratios, *JMS-Pure Appl. Chem.* 35 : 1835-1852, 1998.
- 29) Y. Kawasaki, Y. Iwasaki, Surface modification of poly(ether ether ketone) with methacryloyl-functionalized phospholipid polymers via self-initiation graft polymerization, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 25 : 895-906, 2014.
- 30) C. Conti, E. Giorgini, L. Landi, A. Putignano, Giorgio Tosi, Spectroscopic and mechanical properties of dental resin composites cured with different light sources, *J. Mol. Struct.* 744-747 : 641-646, 2005.
- 31) A. Boyd, A.M. Chakrabarty, Pseudomonas aeruginosa biofilms: role of the alginate exopolysaccharide, *J. Ind. Microbiol.* 15 : 162-168, 1995.
- 32) L. Mi and S Jiang, Integrated antimicrobial and nonfouling zwitterionic polymers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53: 1746-1754, 2014.
- 33) Y.N. Chou, T.C. Wen, Y. Chang, Zwitterionic surface grafting of

epoxylated sulfobetaine copolymers for the development of stealth biomaterial interfaces, *Acta Biomater.* 40 : 78-91, 2016.

- 34) M.L. Mei, Q L. Li, C H. Chu, Inhibition of cariogenic plaque formation on root surface with polydopamine-induced-polyethylene glycol coating, *Mater.* 9 : 414, 2016.
- 35) 石原 一彦, 米山 隆之, ポリマーナノ修飾による金属材料表面の生体適合化, *まてりあ.* 43 : 118-121, 2004
- 36) 石原 一彦, ポリマーバイオマテリアル, コロナ社, 76-81, 2009.