

Development of Tissue Conditioner Capable of Binding with Antimicrobial Protein Lactoferrin

山本, 大吾
Faculty of Dental Science, Kyushu University

<https://doi.org/10.15017/14249>

出版情報 : 九州大学, 2008, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



抗菌性蛋白質ラクトフェリン結合能を有する ティッシュコンディショナーの開発

Development of Tissue Conditioner Capable of
Binding with Antimicrobial Protein Lactoferrin

2008 年

山本 大吾

九州大学大学院歯学研究院

口腔機能修復学講座

咀嚼機能制御学分野

(指導教員：寺田 善博 教授)

本研究の一部は以下の学術雑誌に投稿中である

Application of an Antimicrobial Protein Lactoferrin for Tissue Conditioner

Daigo Yamamoto, Yoshinori Shinohara, Hatsumi Nagadome, and Yoshihiro Terada (2008)

Journal of Prosthodontic Research

本文の内容の一部は、下記学会において発表した。

- International Symposium for Adhesive Dentistry 2008 in Kanazawa

「Development of Antimicrobial Denture Base Resin Applied by Anti-fungal Protein」

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 ヒトラクトフェリンの <i>C. albicans</i> に対する抗菌性	6
2-1 序論	7
2-2 材料と方法	
2-2-1 材料	11
2-2-2 ヒトラクトフェリンの <i>C. albicans</i> に対する抗菌試験	12
2-3 結果ならびに考察	
2-3-1 ヒトラクトフェリンの <i>C. albicans</i> に対する抗菌性	13
2-3-2 統計学的分析	14
第 3 章 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーの諸性質	17
3-1 序論	18
3-2 材料と方法	
3-2-1 材料	21
3-2-2 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに対するヒトラクト フェリン結合量の測定	23
3-2-3 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに結合したヒトラク	

トフェリンの <i>C. albicans</i> に対する抗菌試験	25
3-2-4 細胞毒性試験	26
3-2-5 機械的強度試験	28
3-2-6 経時的重量変化の測定	29
3-2-7 色調安定性試験	30
3-2-7 統計学的分析	31
3-3 結果ならびに考察	
3-3-1 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに対するヒトラクト フェリン結合量	32
3-3-2 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに結合したヒトラク トフェリンの <i>C. albicans</i> に対する抗菌性	34
3-3-3 細胞毒性	35
3-3-4 機械的強度	37
3-3-5 経時的重量変化	38
3-3-6 色調安定性	40
第 4 章 総括	63
謝辞	65

参考文献	66
----------------	----

表一覧

表 3-1：ティッシュコンディショナーの一般組成・・・・・・・・・・・・・・ 41

表 3-2：松風ティッシュコンディショナーの組成と構造・・・・・・・・・・・・ 42

図一覧

図 2-1 : hLF の立体構造	15
図 2-2 : 各 hLF 濃度の 24 時間後の抗菌性	16
図 3-1 : T-con 試料中の樹脂の hLF との結合	43
図 3-2 : ポリメチルメタクリレートおよび ポリエチルメタクリレートの化学式	44
図 3-3 : 可塑剤の化学式	45
図 3-4 : BCA 法の原理	46
図 3-5 : 樹脂含有 T-con を浸漬した hLF 溶液濃度	47
図 3-6 : 樹脂含有 T-con の hLF 結合量	48
図 3-7 : 樹脂含有 T-con の抗菌性	49
図 3-8 : 樹脂含有 T-con の 40% 溶出液に対する細胞毒性 (培養 3 日間)	50
図 3-9 : 樹脂含有 T-con の 80% 溶出液に対する細胞毒性 (培養 3 日間)	51
図 3-10 : 樹脂含有 T-con の 40% 溶出液に対する細胞毒性 (培養 7 日間)	52
図 3-11 : 樹脂含有 T-con の 80% 溶出液に対する細胞毒性 (培養 7 日間)	53
図 3-12 : 樹脂含有 T-con 溶出液とともに培養した Balb/c 3T3 mouse fibroblast cell の 細胞像 (培養 3 日間 : $\times 100$)	54

図 3-13：樹脂含有 T-con 溶出液とともに培養した Balb/c 3T3 mouse fibroblast cell の

細胞像 (培養 7 日間 : $\times 100$) 56

図 3-14：樹脂含有 T-con の圧縮弾性率 58

図 3-15：樹脂含有 T-con の経時的重量変化 59

図 3-16：樹脂含有 T-con の L*表色系の色調 60

図 3-17：樹脂含有 T-con の a*表色系の色調 61

図 3-18：樹脂含有 T-con の b*表色系の色調 62

第 1 章 緒言

緒言

高齢社会であるわが国において、高齢者が健康的な生活を送るために口腔内環境を整えることは必須である。平成 17 年調査における 80 歳の 1 人平均現在歯数の推定値は 9.8 本であり、半数が全歯を喪失し総義歯なしには食物の咀嚼もままならない状況である（厚生省：平成 17 年歯科疾患実態調査報告書）。そのため、喪失した歯の代替物である義歯の口腔内へ与える影響は大きく、その維持管理はもっとも重要な課題のひとつとなる。

一方、近年歯科在宅医療が盛んに行われているが、要介護患者の多くが免疫力の低下した易感染性であるため、義歯の不十分なメンテナンスにより、口腔カンジダ症による義歯性口内炎を引き起こす。口腔カンジダ症の主な原因菌と言われている

Candida albicans（以下、*C. albicans*）は健常人においても口腔粘膜にコロニー形成をする常在酵母であるが（Cannon RD et al. 1999）、ヒトにとって主な真菌病原体でありしばしば粘膜と全身的な日和見感染の原因となる。（Sangeorzan JA et al. 1994）

（Wozniak KL et al. 2002）また、これらは誤嚥性肺炎、細菌性心内膜炎の引き金になり、症状が重篤になる可能性は高い。要介護者の口腔環境の改善によって、日和見感染の予防はもとよりQOLの向上・意識レベルの回復など多くの効果があることが期待される。

ティッシュコンディショナーは不適合義歯や咬合不調和などによる義歯床下粘膜

の歪み、変形（圧痕）、発赤、褥瘡性潰瘍など、非生理的状态になった組織を生理的状态に回復することを目的とした材料である。

しかしながら、ティッシュコンディショナーは表面性状が軟質であり、ブラシなどによる機械的清掃が難しく、著しく汚れを除きにくい。さらに時間が経過すると硬化し変性し、微生物によるコロニー形成を受けやすくなる（Okita N et al. 1991）。ティッシュコンディショナーの汚れは、義歯の汚れ（デンチャープラーク）と同様に*Candida*を主体とした微生物によって構成されている（Johanson WG Jr et al. 1972, Terpenning MS et al. 2001, Nikawa H et al. 1998）。またレジン床義歯に裏装されたティッシュコンディショナーからは、レジン床義歯と比較して*Candida*が多数検出されるという報告もある（Allison RT et al. 1973）。故に、義歯環境同様にティッシュコンディショナーのメンテナンスと*Candida*のコロニー形成と増殖の抑制は口腔衛生においてきわめて重要である。

近年、多くの抗真菌剤をティッシュコンディショナーに添加した試みがなされている（Thomas CJ et al. 1978, Quinn DM. 1985, Lamb DJ et al. 1988, Schneid TR. 1992, Truhlar MR et al. 1994, Nikawa H et al. 1997）。しかし、生体に対してのアレルギーのような為害性を抗真菌剤はもたらす可能性がある。

一方、口腔内における唾液と歯肉溝滲出液には、非免疫グロブリン防御因子のような抗体にぶつかる前に依存しない抗微生物物質と同様の抗体が含まれている。これらの因子の多くは多くの乳汁、涙、唾液といった外分泌とほぼ共通しており、非常に良

く似た抗微生物体のパターンを分担している。特に代表的な酵素として、リゾチーム、ペルオキシダーゼ、ラクトフェリンがある。リゾチームは、人間の様々な器官に存在しているが、特に様々な濃度で体液にみられる。リゾチームは、真正細菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解する酵素であり、この作用があたかも細菌を溶かしているように見えることから溶菌酵素とも呼ばれる。工業的には卵白から抽出したリゾチームが食品や医薬品に応用されている。ペルオキシダーゼは抗酸化物質であり、その２大機能として、抗微生物活性と過酸化水素毒性から宿主細胞を保護することがあげられ、体内に過剰に発生した活性酸素を抑える働きがある。ラクトフェリンは鉄結合性糖蛋白質で、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、カンジダ属、他の腸内細菌といった広い微生物に対して静菌効果を及ぼす。今回我々はこのラクトフェリンに注目した。

ラクトフェリンはトランスフェリンファミリーに属し、アミノ酸分子量 83,000 残基からなる鉄結合蛋白質（77 kDa）であり（Kanyshkova et al. 2001）、哺乳動物の乳汁中や、鼻汁、涙、尿などの外分泌液中や、好中球にも多く分布しており、免疫賦活作用、抗炎症作用、抗酸化作用、鉄吸収調節作用、細胞増殖作用など多彩な作用を持つとされている。口腔内においては唾液や歯肉溝浸出液に多く含まれる。

ラクトフェリンの生物学的機能は、微生物の成長に必要な遊離鉄を隔離すること、細胞に直接結合することが加わってより強力に発育を阻止することにより殺菌的に作用すること、細胞表層の構造を変化させて蛋白質の漏出を引き起こすことなどであ

る。

そこで我々は材料自体には抗菌性を持たせず、陽イオン交換樹脂や抗体を材料に添加することで口腔内の抗菌性蛋白質であるラクトフェリンを材料に結合・集中させることにより、抗菌効果を高め、なおかつ生体に対して為害性が少ないという全く新しい概念の義歯材料の開発を試みた。この抗菌材料が開発され、義歯自体に抗菌性を持たせることができれば、義歯性口内炎、誤嚥性肺炎の害をなくすもしくは減少させることができ、高齢者、ハンディキャップを持つ人々への助けとなる。また、義歯清掃の簡略化、介助者の手助けにもなり、きたる超高齢化社会に対して貢献することができると思われる。

本研究において、陽イオン交換樹脂をティッシュコンディショナーへ添加し、ヒトラクトフェリンの結合量測定を行い、このラクトフェリンを結合したティッシュコンディショナーの義歯性口内炎の起炎菌 *C. albicans* に対する抗真菌性を評価した。さらに陽イオン交換樹脂を添加したティッシュコンディショナーの細胞毒性、機械的性質、経時的重量変化、色調安定性についても検討した。

第2章 ヒトラクトフェリンの *Candida albicans* に対する抗菌活性

2-1 序論

ラクトフェリンは、分子量約 80 kDaの鉄結合性糖蛋白質で(Kanyshkova et al. 2001)、相同性の高いN-ローブとC-ローブで構成されている (Bellamy W et al. 1992, Viejo-Díaz M et al. 2003)。ラクトフェリンは弱い蛋白質の加水分解によって分けられる上記二つの領域があり、それぞれが可逆性に一つの Fe^{3+} の分子と結合することができる。

ラクトフェリンはトランスフェリンファミリー蛋白質に分類されており、トランスフェリンファミリー蛋白質は、一次構造上の類似性が高く、かつ金属イオン結合に関与する部位のアミノ酸残基が進化の過程において保存されている。また、多核白血球（歯肉溝に多い）と腺表皮細胞で合成されそれぞれ高濃度（0.2-2.2 mg/ml）で全ての粘膜液に存在し（唾液など）同様に血液や乳汁中にも存在し、様々な感染で濃度が増加する（ Kanyshkova TG et al. 2001, Lonnerdal B et al. 1995 ）。

ラクトフェリンの多様な機能は、微生物との関係においても発揮され、その対象および作用機構が非常に多面的である。ラクトフェリンの示す抗菌性には静菌作用と殺菌作用がある。静菌作用とは、細菌がその生育に必要としている鉄イオンを、ラクトフェリンが奪うために生育が抑えられたと考えられる（ Reiter B. 1975, 清澤 功. 1988 ）。ラクトフェリンの抗菌スペクトルは、グラム陽性菌からグラム陰性菌まで幅広いが、菌株によって感受性が異なる。他方、ラクトフェリンの殺菌作用としては複数のメカニズムが提唱されている。その一つは、ラクトフェリンのN-ローブに存在する塩基性の強い部分がリポ多糖に結合し、菌膜から遊離させて外膜にダメージを与え、菌を崩壊させるとの説である。*Escherichia. coli*および*Salmonella typhimurium*にラ

クトフェリンを作用させた実験で、³H-リポ多糖の遊離が報告されている (Ellison RT. 1988)。

また、ラクトフェリンは微生物・ウイルスに対する直接的な働きかけだけではなく、免疫系システムを賦活化することによって、さらに他の生体成分との協同作用によって生体防御システムを構築している。ラクトフェリンは腸管免疫系を刺激することによって、局所免疫系・全身免疫系を活性化し、結果として抗感染能を高めることも間接的なラクトフェリンの抗菌的な効果であり (Debbabi. 1998) 口腔カンジダ症 (*Candida albicans*) による日和見感染に対する動物実験でも証明されている (高倉南津子. 2004)。

Candida albicans (*C. albicans*) は健常人においても口腔粘膜にコロニー形成をする常在酵母であるが (Cannon RD et al. 1999)、ヒトにとって主な真菌病原体であり粘膜と全身的な日和見感染の原因となる。 (Sangeorzan JA et al. 1994, Wozniak KL et al. 2002)。

義歯性口内炎を有する患者から単離された *Candida* 属の割合は *C. albicans* が約 73%、*Candida glabrata*、*Candida tropicalis* がそれぞれ約 9%であった (Marcos-Arias C et al. 2008)。*C. albicans* はヒトから分離される *Candida* 属酵母の中で最も高頻度に検出され、表在性あるいは深在性真菌症や日和見感染もしくは菌交代現象としてのカンジダ症を惹起する。また、*C. albicans* はヒト口腔領域においては、急性偽膜性カンジダ症や慢性皮膚粘膜カンジダ症、カンジダ性義歯性口内炎等を引き起こすことが知られている (Odds. 1988) 。

また、高齢社会の到来により、何らかの全身的疾患を持ち、衰弱の

著しい高齢の患者が増加していることや HIV 感染者、とりわけ AIDS 発症者の増加などが、深在性カンジダ症発症のリスクが高い集団の増加に拍車を掛ける結果となっている。

ヒト真菌感染症の原因菌として重要な *C. albicans* の特徴は、環境条件によって酵母形でも菌糸形でも生育、増殖できる二形性真菌であることである。すなわち、出芽により増殖する酵母形細胞、酵母形細胞の一端より細胞壁が伸長して生じる発芽管、発芽管がさらに伸長し、隔壁を形成しつつ糸状に成長した菌糸、あるいは、菌糸状にやや伸びた細胞であるが、くびれのある細胞からなる仮性菌糸が生育環境によって、各々単独で、もしくはこれらが共存して形成される（久和彰江, 1986）。また、コーンミール寒天培地のような低栄養条件下で本真菌を培養すると、菌糸の先端に本真菌に特徴的で、本真菌の形態学的な同定に利用される厚膜胞子が形成される。

初期の文献において、ヒトラクトフェリンは抗カンジダ効果があったとされており（Arnold RR et al. 1980, Kirkpatrick CH et al. 1971）、この効果はhLFの鉄奪取効果よりも、*C. albicans*細胞表面への結合によるとされ、細胞壁へのダメージを示した最近のいくつかの報告からもこの考えは支持されている（Nikawa H et al. 1993, Nikawa H et al. 1995, Xu YY et al. 1999）。また、ヒトラクトフェリンの抗菌活性はヒトラクトフェリンのアミノ酸配列の1～42残基のラクトフェリシンと153～183残基のカリオシン-1と細菌膜の相互作用によると考えられている。（Bellamy W et al. 1992, Viejo-Díaz M et al. 2003）

生体において安全でかつ高い抗菌効果を持つような歯科材料の開発に先立ち、この
ヒト口腔領域において様々な疾病を引き起こす *C. albicans* に対してのヒトラクトフ
ェリンの抗真菌活性を検討した。

2-2 材料と方法

2-2-1 材料

A. ラクトフェリン溶液の作製

抗菌性蛋白質としてヒトラクトフェリン（Sigma 社製；以下、hLF とする）を購入した（図：2-1）。購入時、hLF は凍結乾燥されており、5 mM potassium phosphate buffer（以下、PPB とする, pH 6.0）に溶解して、200・800・1600 $\mu\text{g/mL}$ に調整後、実験に用いた。

B. 菌と培養条件

供試菌として *Candida albicans* ATCC 10231（以下、*C. albicans* とする）を用いた。*C. albicans* については、-80 で凍結保存されたグリセロールストックから Sabouraud dextrose agar（以下、SDA とする）に接種後、Sabouraud dextrose broth（以下、SDB とする）にて 30 で 24 時間好気培養した。培養後、遠沈（2000 rpm、10 分間、4 ）し、培養液の 3 倍量の PPB での洗浄を 2 回繰り返すことにより集菌した。分光光度計（Smartspec Plus, BIO-RAD 社製）を用いて濁度を測定し（ OD_{600} ）、菌液を 2.0×10^5 CFU/mL（濁度 0.04）に調整した（以下、調整菌液とする）（Viejo-Díaz M et al. 2004）。

2-2-2 ヒトラクトフェリンの *C. albicans* に対する抗菌試験

調整菌液 500 μ Lに 200・800・1600 μ g/mL hLF溶液 500 μ Lを各々加え、各懸濁液 1 mLが菌濃度 1.0×10^5 CFU/mL・hLF濃度 100、400、800 μ g/mL になるように調整し、24時間、25℃好気条件下で振盪しその抗菌効果を検討した。菌数の測定はPPBを用いて250倍に希釈後、各希釈液の 0.2 mLをSDAに播種し、37℃にて48時間好気培養を行い生菌数を測定した。

2-3 結果ならびに考察

2-3-1 ヒトラクトフェリンの *C. albicans* に対する抗菌性

図 2-2 に *C. albicans* に対する hLF 溶液の 24 時間後の抗菌性を示した。hLF 濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ での生菌数は 2.4×10^5 CFU/mL、hLF 濃度 400 $\mu\text{g/mL}$ での生菌数は 1.2×10^5 CFU/mL、hLF 濃度 800 $\mu\text{g/mL}$ での生菌数は 1.3×10^5 CFU/mL であった。また菌液のみでは 3.2×10^5 CFU/mL であった。

hLF 濃度 100、400、800 $\mu\text{g/mL}$ において、初期濃度 1.0×10^5 CFU/mL の *C. albicans* 菌液に対して、24 時間培養後で抗菌性を示した。培養 24 時間後において hLF は 100 ~ 800 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で *C. albicans* に対して量依存的に抗菌性を示すことがわかった。

2-3-2 統計学的分析

データはすべて ANOVA とシェッフェ多重比較検定により統計学的分析を行った。

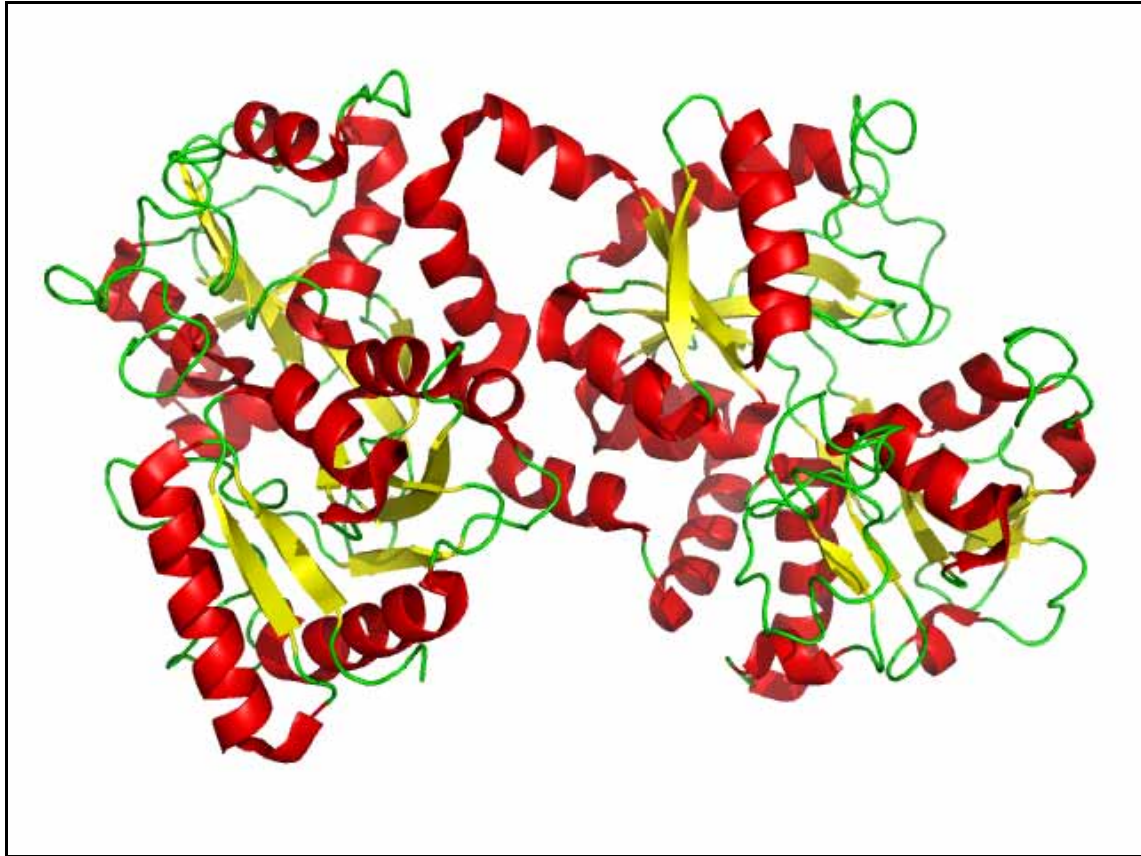


図 2-1 : hLF の立体構造

ヒトラクトフェリンは、分子量 76.5 kDa の鉄結合性糖蛋白質で、相同性の高いN-ロ
ープとC-ロープで構成されている

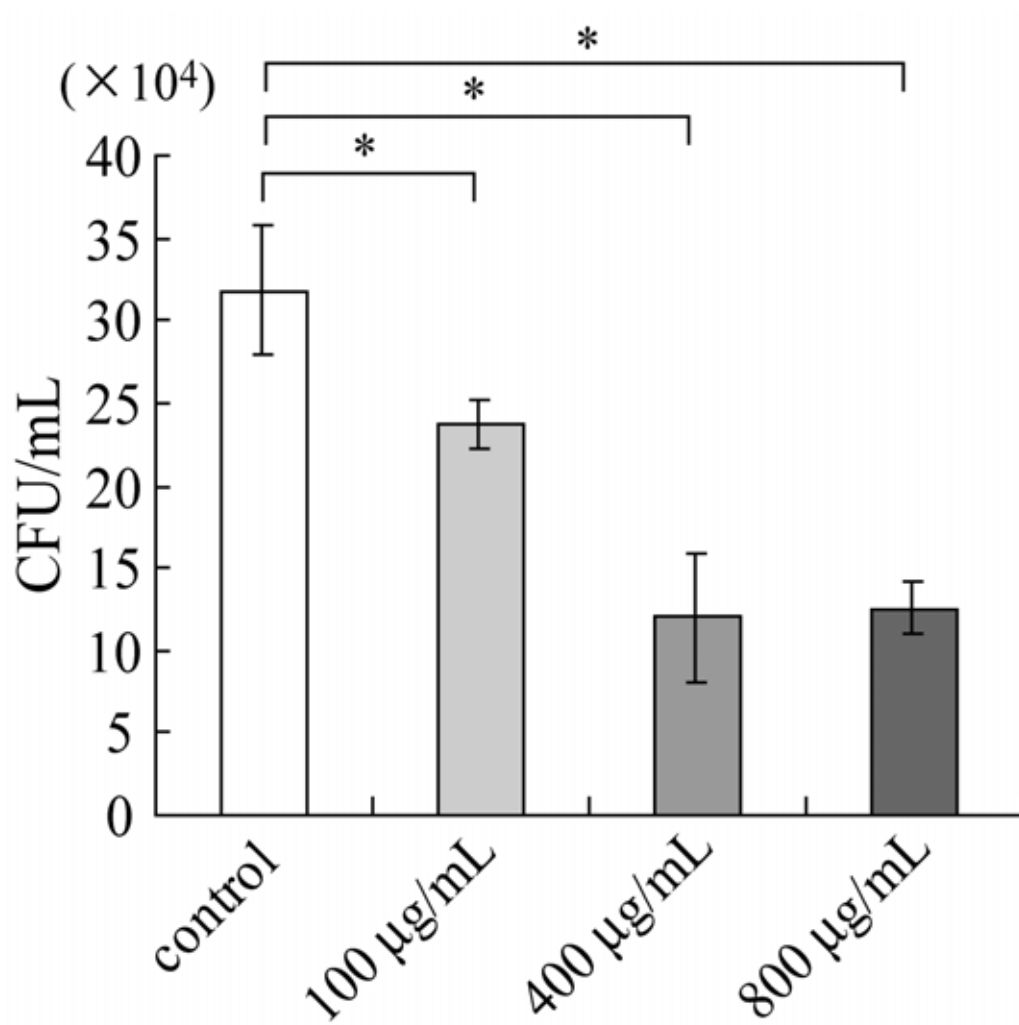


図 2-2：各 hLF 濃度の 24 時間後の抗菌性

C. albicans の 24 時間後の生菌数を示す。試料間の有意差を*で示す ($p < 0.05$)

第3章 陽イオン交換樹脂含有 ティッシュコンディショナーの諸性質

3-1 序論

イオン交換樹脂はイオン交換基を持ち、イオン性物質（有機酸、有機塩基、アミノ酸等）分離を行う方法（イオン交換クロマトグラフィー）に使用される。イオン交換体は、イオン交換基とそのイオン交換基を固定化している支持体である。支持体としては、有機ポリマー（スチレンとジビニルベンゼンの共重合体、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシメタクリノール等）が用いられる。固定相中の陽イオンあるいは陰イオン交換基は、電解質水溶液中で解離し、水溶液中にイオンを放出しイオン化状態となる。このイオン化状態にある固定相に、荷電した成分が接触すると、放出したイオンと同じ符号の電解質イオンや試料イオンを吸着し保持する。陽イオン交換用として、強酸性交換基のスルホン酸基（ $-\text{SO}_3\text{H}^+$ ）または弱酸性交換基のカルボキシル基（ $-\text{COO}^-\text{H}^+$ ）等がある。イオン交換体の強弱はpHによってイオン交換基の解離度がどの程度変化するかに関係しており、弱イオン交換体は解離度がpHとともに大きく変化する。

本研究で用いた陽イオン交換樹脂 TOYOPEARL CM-650M（図 3-1）は、弱イオン交換体に属し親水性ビニルポリマーを基材としたゲル濾過クロマトグラフィー用充填剤 TOYOPEARL HW-65 にカルボキシル基類（ $-\text{O}-\text{CH}_2\text{COO}^-$ ）を導入したものである。この陽イオン交換樹脂は口腔内環境（pH 7 付近）において正に荷電した性質を持つ抗菌性蛋白質ラクトフェリン（等電点 8.2～9.2）を結合すると考えられる。

無歯顎の口腔粘膜はその部位により厚さも被圧縮度も、健康の程度もすべて異なり、義歯を装着する際には健全な状態の粘膜上に床を置くことが必要である。

ティッシュコンディショナーは粉末と液より構成されている（表 3-1, 2）。粉末はポリエチルメタクリレート（PEMA）やこれに関連した供重合体がおもに使用されている（図 3-2）。液は芳香族エステル可塑剤とエチルアルコールの混合物である（図 3-3）。

ティッシュコンディショナーはその軟質性により暫間的な裏装材として使用される（Braden M et al. 1995）。また、機能印象のために組織の歪みを調整する。

ティッシュコンディショナーは、義歯床下粘膜に対する粘膜調整（Chase WW. 1961, Pound E. 1962, von Krammer R et al. 1971, Farrell DJ. 1975）のみならず、動的印象（Chase WW. 1961, Pound E. 1962, Tryde G et al. 1965）あるいは即時義歯や顎義歯の暫間裏装（Loh HS et al. 1968, Farrell DJ. 1975）にも応用されている。また、基礎床へのアンダーカット部への使用（Coffield B. 1987）、オブチュレーターなど顎顔面補綴への応用（Farrell DJ. 1975, Gonzalez JB. 1977, Loh HS et al. 1968）抜歯、乳頭状過形成の切除や歯周病などに対する外科処置後のドレッシング（Levin MP et al. 1969, Frisch J et al. 1968）義歯性口内炎の治療（Budtz-Jørgensen E et al. 1970）にも用いられている。

粘膜調整において、ティッシュコンディショナーは不適合義歯や咬合不調和などによる義歯床下粘膜の歪み、変形（圧痕）、発赤、褥瘡性潰瘍など、非生理的状态になった組織を生理的状态に回復することを目的とした材料である。義歯床下粘膜に歪み

あるいは病変などが存在したまま印象を採得したのでは、完成した義歯により再び床下粘膜の疼痛、変形や歯槽骨の吸収を招く恐れがあるため、義歯作製や裏装のための印象採得に先駆け、粘膜の調整を行うことは欠くことのできない処置である。

また、ティッシュコンディショナーを用いることで単に義歯の安定の効果が先行し、患者もこれのみで満足してしまう結果、長期に使用している場合もある。

ティッシュコンディショナーは物性が変化しやすく、掃除が困難であり、汚れやすいことが欠点である。また、真菌がティッシュコンディショナーの内部に侵入していることも認められるため、抗菌対策が必要である。

今回、陽イオン交換樹脂をティッシュコンディショナーへ添加し、ヒトラクトフェリンの結合量測定を行い、このラクトフェリンとティッシュコンディショナー複合体の義歯性口内炎の起炎菌 *C. albicans* に対する抗真菌性を評価した。またイオン交換樹脂を添加したティッシュコンディショナーの機械的性質、細胞毒性、色調安定性についても検討した。

3-2 材料と方法

3-2-1 材料

A. ラクトフェリン溶液の調整

抗菌性蛋白質としてヒトラクトフェリン（Sigma 社製；以下、hLF とする）を購入した。購入時、hLF は凍結乾燥されており、5 mM potassium phosphate buffer（以下、PPB とする, pH 6.0）に溶解して、800 µg/mL に調整後、実験に用いた（以下、hLF 溶液とする）。

B. 菌と培養条件

供試菌として *Candida albicans* ATCC 10231（以下、*C. albicans* とする）を用いた。*C. albicans* については -80℃ で凍結保存されたグリセロールストックから Sabouraud dextrose agar（以下、SDA とする）に接種後、Sabouraud dextrose broth（以下、SDB とする）にて 30℃ で 24 時間好気培養した。培養後、遠沈（2000 rpm、10 分間、4℃）し、培養液の 3 倍量の PPB での洗浄を 2 回繰り返すことにより集菌した。分光光度計（Smartspec Plus, BIO-RAD 社製）を用いて濁度を測定し（OD₆₀₀）を測定して、菌液を 1.0×10^5 CFU/mL（濁度 0.02）に調整した（以下、調整菌液とする）（Viejo-Díaz M 2004）。

C. 陽イオン交換樹脂

陽イオン交換樹脂として TOYOPEARL CM650（TOSOH 社製；以下、樹脂とする）

を使用した。この樹脂は親水性ビニルポリマーを基材としたものにイオン交換基であるカルボキシメチル基 ($-O-CH_2COO^-$) を導入した弱陽イオン交換樹脂である。この樹脂の 20% エタノール保存液を除去後、樹脂容量の 3 倍の PPB にて 3 回洗浄を行った。その後、凍結乾燥機 (FREEZE DRYER FD-5N, 東京理科器械社製) にて樹脂を凍結乾燥させ粉末状にしたものを使用した。

D. 粘膜調整材

粘膜調整材は柔らかく弾性のある物質であり、粘膜調整、動的印象、暫間裏装に使用される。粘膜調整材として TISSUE CONDITIONER II (松風社製; 以下、T-con とする) を使用した。

3-2-2 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに対するヒトラクトフェリン結合量の測定

蛋白質濃度の定量

蛋白質濃度の定量にはBCATM Protein Assay Kit (PIERCE社製)を使用し、BCA法を用いた。アルカリ条件下ではタンパク質溶液中のペプチド結合により Cu^{2+} が還元され、四配位の Cu^{1+} 錯体が形成される (Biuret 反応: 水色に呈色)。これにビスニコニン酸 (BCA) を添加するとBCA 2 分子と Cu^{1+} による錯体が形成され、赤紫色の可視吸光 (562 nm) を生じることで蛋白質濃度が定量できる (図 3-4)。

樹脂含有 T-con への hLF 結合量の測定

樹脂を添加したT-conへのhLF結合量の測定を行った。実験試料として樹脂を 4、8 wt%含むT-conを作製した。過去の文献より、hLF濃度が 1.25 ~ 5 μM (約 100 ~ 400 $\mu\text{g/mL}$) hLF溶液で*C. albicans*に抗菌性を示した (Viejo-Díaz M et al. 2004)。そのため、約 100 ~ 400 μg の範囲でhLF量が結合するようにT-conへの樹脂の添加量を決定した。実験試料は練和後、直径 3 mm、高さ 6 mmの穴を開けたテフロン板に填入し 25 で硬化させた。通常の粉液比で作製した樹脂を添加しないものをコントロール試料として実験試料と同様に作製した。24 時間経過後、テフロン板から取り外しクリーンベンチ内でUV下にて蒸留水に 24 時間浸漬した。試料をhLF溶液 (800 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL中に

10 バルクずつ、25 ℃ にて 24 時間浸漬し hLF を結合させた(以下、hLF 結合試料とする)。

浸漬後、各 hLF 溶液の濃度を BCATM Protein Assay Kit (PIERCE 社製) を使用して計測

した。試料への hLF 結合量は初期 hLF 溶液濃度(800 $\mu\text{g/mL}$)との比較により算出した。

3-2-3 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに結合したヒトラクトフ ェリンの *C. albicans* に対する抗菌試験

各調整菌液 1 mL 中に hLF 結合試料を浸漬し、24 時間、25℃ 好気条件下で振盪しその抗菌効果を検討した。菌数の測定は PPB を用いて 250 倍に希釈後、各希釈液の 0.2 mL を SDA に播種し、37℃ にて 48 時間好気培養を行い生菌数を測定した。コントロール試料として樹脂を 4、8 wt%含む T-con を作製し、hLF 溶液の代わりに PPB 中に浸漬したものを使用した。細胞生存率を下記のように表した。

細胞生存率 (%) = $\frac{\text{コントロール試料または実験試料の CFU}}{C. albicans \text{ 菌液の CFU}} \times 100$

3-2-4 細胞毒性試験

1) 細胞の培養

供試細胞としてBalb/c 3T3 mouse fibroblast細胞を 96 穴マルチプレートで 1 穴当たり 1×10^4 個の細胞を 5% CO₂・95%Air、湿度 100%、37°Cのインキュベーターで前培養したものを、培養液として 10% fetal bovine serumと 100 U/mLペニシリン 100 μ Lを加えたDulbecco's Modified Eagle Medium (以下、DMEMとする) を 2 mL用いた。

2) 試料の浸漬液の作製

実験試料として樹脂を 4、8 wt%含む直径 3 mm、厚さ 6 mmのT-conを作製した。通常の粉液比で作製した樹脂を添加しないものをコントロール試料として実験試料と同様に作製した。各試料は 70%エタノールとPBS で洗浄し、DMEM 2 mLに 3 日間浸漬し、5% CO₂・95%Air、湿度 100%、37°Cのインキュベーターで浸漬液を調製した。浸漬後、浸漬液が 40% (以下、Eluates 40%とする) 80% (以下、Eluates 80%とする) になるよう新鮮DMEMで希釈して細胞毒性用の調整浸漬液を作製した。試料の表面積はISOスタンダード (0.5-6.0 cm²/mL) に沿った 0.541 cm²/mLに設定した (Wataha JC et al. 1999)。

3) 細胞毒性試験

細胞毒性を検索するために細胞増殖度の算定と細胞形態の観察を行った (Yang Y et

al. 2002)。細胞を前培養した 96 穴マルチプレートそれぞれのwellからDMEMを吸引し、Eluates 40%、Eluates 80%を 100 μ L 注入し、コントロールおよび実験群とした。細胞は調整浸漬液を加えて 3、7 日間培養した。培養後、各ウェルにWST-8 溶液 (5 mg/mL) を 10 μ L 添加し、5% CO₂・95%Air、湿度 100%、37°Cのインキュベーターで 2 時間、37 で呈色反応を行った。ウェルそれぞれの上清を 96 穴マルチプレートに移し替え、オートプレートリーダーImmunoMini microplate reader (Inter Med社製)を使い OD_{450} を測定した。コントロールまたは実験群とDMEMのみで培養した細胞数との相対値を百分率で表した。

細胞生存率 (%) = コントロールまたは実験群における細胞数 / DMEM のみで培養した細胞数 $\times 100$

また、細胞形態の観察には倒立位相差顕微鏡(CKX41, オリンパス社製)を用いた。

3-2-5 機械的強度試験

実験試料として、樹脂を 4、8 wt%含む直径 10 mm、高さ 20 mm の T-con を、ステンレスの型に填入しスライドガラスを介して適度な圧で圧接することで作製した。通常の粉液比で作製した樹脂を添加しないものをコントロール試料として実験試料と同様に作製した。レオメーター（サン科学社製）を用いて、試験片に速度 20 mm/min で 10%の圧縮ひずみを加え、そのときの応力とひずみから圧縮弾性率を算出した。試験片は作製後、25℃で保存し、練和開始後、24 時間の時点で測定を行った。1 試料について最低 5 個の試験片を作製し、測定に供した。応力—ひずみ曲線から圧縮弾性率を算出した。

3-2-6 経時的重量変化

実験試料として、樹脂を 4、8 wt%含む直径 10 mm、高さ 20 mm の T-con を、ステンレスの型に填入しスライドガラスを介して適度な圧で圧接することで作製した。通常の粉液比で作製した樹脂を添加しないものをコントロール試料として実験試料と同様に作製した。試料作製 2 時間後、0.0001 g の精度で試料の重量を測定し、37℃、蒸留水に浸漬した。試料の重量は蒸留水から取り出し、30 秒間清潔なガーゼでふき、15 秒間空気中で振った後、天秤皿の上に置き、蒸留水から取り出してから 1 分後に測定した。8、24 時間後、2、4、7、14、21 日後に重量を再測定した。

重量変化率を試料再測定時の重量と試料の 2 時間後の重量との百分率で表した。

重量変化率 (%) = 試料再測定時の重量 / 試料の 2 時間後の重量 × 100

3-2-7 色調安定性試験

実験試料として、樹脂を 4、8 wt%含む直径 10 mm、厚さ 2 mmのT-conを、テフロン板に填入しスライドガラスを介して適度な圧で圧接することで作製した。通常の粉液比で作製した樹脂を添加しないものをコントロール試料として実験試料と同様に作製した。24 時間後の各試料をKODAK Gray Scaleの「10」上で測色を行った。測色にはCrystaleyeスペクトルフォトメーターCE100-DC/JP(OLYMPUS社製)を用いて、 L^* 、 b^* 、 a^* 表色系の値を求めた。

3-2-7 統計学的分析

データはすべて ANOVA とシェッフェ多重比較検定により統計学的分析を行った。

3-3 結果ならびに考察

3-3-1 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに対するヒトラクトフェリン結合量

図 3-5 において 24 時間浸漬後の試料プロテインアッセイによる hLF 溶液の濃度を示す。コントロール試料を浸漬した hLF 濃度は $717 \pm 5.4 \mu\text{g/mL}$ 、4wt%試料の hLF 濃度は $542.0 \pm 18.4 \mu\text{g/mL}$ 、8 wt%試料の hLF 濃度は $319.5 \pm 10.2 \mu\text{g/mL}$ であった。hLF 濃度はそれぞれの間に有意差があった ($P < 0.05$)。

図 3-6 において試料に結合した hLF 量を示す。24 時間 hLF 溶液に浸漬し、結合した hLF はコントロール試料で $52.3 \mu\text{g}$ 、4wt%試料で $228.0 \mu\text{g}$ 、8 wt%試料で $450.5 \mu\text{g}$ であった。結合した hLF 量はそれぞれの試料間で有意差があった ($P < 0.05$)。少量の hLF がコントロール試料に結合したが、これは T-con の小孔に非特異的に吸着したのではないかと考えられる。だが 4、8 wt%試料はコントロール試料と比較してそれぞれ約 4、9 倍の hLF を結合した。したがって、本実験モデルでは、hLF は樹脂の添加量に依存して結合すると考えられる。

また、ヒト唾液サンプル中の hLF の平均濃度は $24 \mu\text{g/mL}$ であり (Cole MF et al. 1981)、本研究では唾液 1 mL に含まれる hLF 量の約 10 から 20 倍量が実験試料に結合した。また、一日の唾液分泌量は 1000 ~ 1500 mL (Navazesh M et al. 2008) と言われている。

このことにより唾液中には一日最大 36 mg の hLF が存在すると考えられる。また、歯肉溝滲出液には多くの hLF が含まれておりこれも利用することができると考えられる (Suomalainen K et al. 1996)。

樹脂の添加量と hLF の結合量は時間依存的に結合するかどうかは検討する必要があるが、口腔内においては十分に hLF が供給されるため抗菌濃度に達する可能性が示唆される。一方、口腔内にはリゾチームやナトリウムイオン、カリウムイオンなどイオン強度、濃度が hLF より高いものが存在し、樹脂への結合時に拮抗する可能性があるため、外液をヒト唾液の組成に極めて近い環境にして検討する必要がある。

3-3-2 陽イオン交換樹脂含有ティッシュコンディショナーに結合したヒトラクトフ ェリンの *C. albicans* に対する抗菌性

図 3-7 に hLF を結合した T-con の *C. albicans* に対する 24 時間後の抗菌活性を示す。

4、8 wt%試料はコントロール試料に対して有意に抗菌性を示した ($P<0.05$)。実験試料の 4 wt%と 8 wt%間には有意差があるとは言えなかったが、4 wt%でも十分な抗真菌作用を示した。これらの結果から樹脂を含有した T-con は hLF を結合し、*C. albicans* に対して抗菌性を有することが示唆された。すなわち、樹脂の修復物への臨床応用によって、病変部において口腔内の抗菌性蛋白質を集中させることにより義歯性口内炎や他の口腔内疾患の予防及び治療法に寄与できると考えられる。

樹脂を添加したコントロール試料のviabilityは 100%を上回った。これは樹脂を添加することで構造が変化しT-conに含有されているエチルアルコールの溶出が大きくなっている可能性が高く、これを炭素源として*C. albicans*を栄養しているためではないかと考えられる (Zeuthen ML et al. 1988)。

熱安定性において、hLF は 72℃ までその構造を維持する (Zhang J et al. 2008)。また、過去の報告より 37℃ において hLF は変性せず抗菌性を示すことが分かっている (Viejo-Díaz M et al. 2004)。このことから、hLF が結合した実験試料は口腔内環境下において変性せずに抗真菌性を示すと考えられる。

3-3-3 細胞毒性

細胞毒性試験として a Balb/3T3 fibroblast cell を使用し、MTT assay を行った。3、7 日の培養後、4、8 wt% 試料とも高い細胞生存率を示した。

図 3-8 に樹脂含有 T-con の 40% 溶出液に対する 3 日間培養の細胞毒性の結果を示す。コントロール試料で $113.2 \pm 20.4\%$ 、4wt% 試料で $95.6 \pm 8.8\%$ 、8wt% 試料で $115.9 \pm 11.2\%$ であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P > 0.05$)。

図 3-9 に樹脂含有 T-con の 80% 溶出液に対する 3 日間培養の細胞毒性の結果を示す。コントロール試料で $104.1 \pm 12.6\%$ 、4wt% 試料で $103.5 \pm 4.4\%$ 、8wt% 試料で $120.2 \pm 16.0\%$ であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P > 0.05$)。

図 3-10 に樹脂含有 T-con の 40% 溶出液に対する 7 日間培養の細胞毒性の結果を示す。コントロール試料で $100.7 \pm 6.6\%$ 、4wt% 試料で $89.4 \pm 0.6\%$ 、8wt% 試料で $101.1 \pm 1.3\%$ であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P > 0.05$)。

図 3-11 に樹脂含有 T-con の 80% 溶出液に対する 7 日間培養の細胞毒性の結果を示す。コントロール試料で $95.6 \pm 10.2\%$ 、4wt% 試料で $97.1 \pm 1.3\%$ 、8wt% 試料で $100.4 \pm 6.2\%$ であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P > 0.05$)。

図 3-12・13 には Balb/c 3T3 mouse fibroblast cell の細胞像を示した。

細胞毒性試験に関して、コントロール試料と実験試料 (4、8 wt%) は対照群と同様の細胞増殖度を示した。また、このことから T-con の構成成分は細胞毒性の発現には

関与しないことが推測される。

これらの結果から樹脂を含有した T-con は生体適合性において毒性を有しないということが示唆された。

過去の文献では silver-zeolite (SZ) を含有させた何種類かのティッシュコンディショナーの細胞毒性試験において、SZ の添加量が増加すると細胞生存率が減少することが示されている (Abe Y et al. 2003)。このことの理由として SZ から銀イオンが放出されることにより細胞に対する毒性を示しているのではないかとしている。また、他の文献では Microban (広い抗菌性スペクトルをもつトリクロサン) を軟性裏装材に添加させると細胞毒性は示さなかったが抗真菌性も示さなかったと報告している (Lefebvre CA et al. 2001)。しかしながら、今回の実験では実験試料は細胞生存率を減少させることなく、hLF を結合することにより抗真菌性を示した。

3-3-4 機械的強度

軟性裏装材の使用は咀嚼機能や粘膜面の著しい改善をもたらす。その上で実験試料の機械的強度を検討することは重要である。

図 3-14 に圧縮弾性率を示す。4 wt%試料の値はコントロールに比較してわずかに高かったが、有意差はなかった。一方、8 wt%試料はコントロールと 4 wt%試料それぞれに対して有意に高い値を示した。これは、樹脂含有量を大きくすることにより T-con の構造に変化が起こり、エチルアルコールの溶出が早まった可能性があることと関係があるのではないかとと思われる。義歯裏装材に関しては物理的・機械的性能において様々な可変性を考慮しなければならず (Dootz ER et al. 1992) 必要な性能は明らかになってはいない。

一つの基準として、無歯顎患者の口腔粘膜の弾性率がある。この値は 0.66–4.36 Mpa であり、その平均は 2.73 MP である (Inoue K et al. 1985) 今回の実験では 4、8 wt%試料の圧縮弾性率の値はそれぞれ 0.27、0.33 MPa であり、無歯顎患者の口腔粘膜の弾性率値よりも低値であった。このことより実験試料は口腔内においても使用できる可能性が示唆された。

3-3-5 経時的重量変化

図 3-15 に各 T-con の経時的重量変化を示す。ティッシュコンディショナーは、水中に浸漬されるとエチルアルコールおよび可塑剤の溶出と水分の吸収が起こる (Braden M et al. 1971)。コントロール試料の重量は、21 日後まで減少したままであった。4 wt% 試料においては 14 日後、8 wt% 試料においては 3 日後まで重量は減少した。これは可塑剤およびエチルアルコールの溶出によるものと考えられる。過去の文献では、浸漬初期におけるエチルアルコールの拡散は水の吸収よりも速く、そのため重量が減少すると報告されている (Braden M et al. 1971, Ellis B et al. 1977, 1979, Jones DW et al. 1991, Wilson J. 1992)。

4 wt% 試料において 21 日後、8 wt% 試料においては 3～5 日後の間に重量は増加したが、これはエチルアルコールの溶出よりも水分の吸収が大きいことによるものと考えられる。また、樹脂含有量が増加するにともないその重量が増加する傾向にあった。樹脂は水分を吸収し膨潤する性質があり (日本分析化学会九州支部. 1996)、このことが試料間の重量変化の差に現れていると考えられる。

吸水およびエチルアルコールの経時的な溶出は、本剤の粘弾性的性質の経時変化、寸法変化あるいは表面の荒れなどの劣化に直接影響する。エチルアルコールの溶出により初期の流動性は失われ、一般的には硬くなる (Murata H et al. 1998)。ティッシュコンディショナーの耐久性は、吸水量と成分の溶出量と密接な関係があり、これらの

量をいかに少なくするかが本材の開発において重要な因子の一つであると考えられる。

3-3-6 色調安定性

図 3-15 に各 T-con の 24 時間後の色調を L*表色系により示した。作製 24 時間後における L*値はコントロール試料で 77.0 ± 1.1 、4 wt%試料で 76.9 ± 0.7 、8 wt%試料で 77.6 ± 1.6 であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P > 0.05$)。

図 3-16 に各 T-con の 24 時間後の色調を a*表色系により示した。作製 24 時間後における a*値はコントロール試料で -1.75 ± 0.11 、4 wt%試料で -1.55 ± 0.12 、8 wt%試料で -1.45 ± 0.20 であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P > 0.05$)。

図 3-17 に各 T-con の 24 時間後の色調を b*表色系により示した。作製 24 時間後における b*値はコントロール試料で -0.91 ± 0.14 、4 wt%試料で -1.15 ± 0.11 、8 wt%試料で -1.12 ± 0.23 であった。それぞれの間に有意差はなかった ($P > 0.05$)。

これらの結果より樹脂を含有した T-con には色調変化が認められず、元の色調に影響を与えないことがわかった。

他の物質をティッシュコンディショナーに添加した場合の色調変化について、後藤らはティッシュコンディショナーに銀ゼオライトを応用した場合、銀イオンが T-con 成分中の塩化物イオンと反応し塩化銀を生成し褐色化を呈する場合がありますと考察している (後藤 他. 2003)。

表 3-1：ティッシュコンディショナーの一般組成

粉末	液
ポリマー（アクリル系） PEMAまたはこれに関連した共重合体 PEMAとPBMAの混合物	エチルアルコール 可塑剤（エステル） 芳香族 BPBG DBP BBP BB 脂肪族 DBS

PBMA：poly (butyl methacrylate)

PEMA：poly (ethyl methacrylate)

BPBG：butyl phthalyl butyl glycolate

DBP：dibutyl phthalate

BBP：benzyl butyl phthalate

BB：benzyl benzoate

DBS：dubutyl sebacate

表 3-2：松風ティッシュコンディショナーの組成と構造

粉末			液		粉液比 (重量比)
化学組成 (wt%)	平均分子量	平均粒子径 (μm)	可塑剤 (wt%)	エチルアルコール (wt%)	
PEMA	3.54×10^5	50.3	DBP	13	1.17

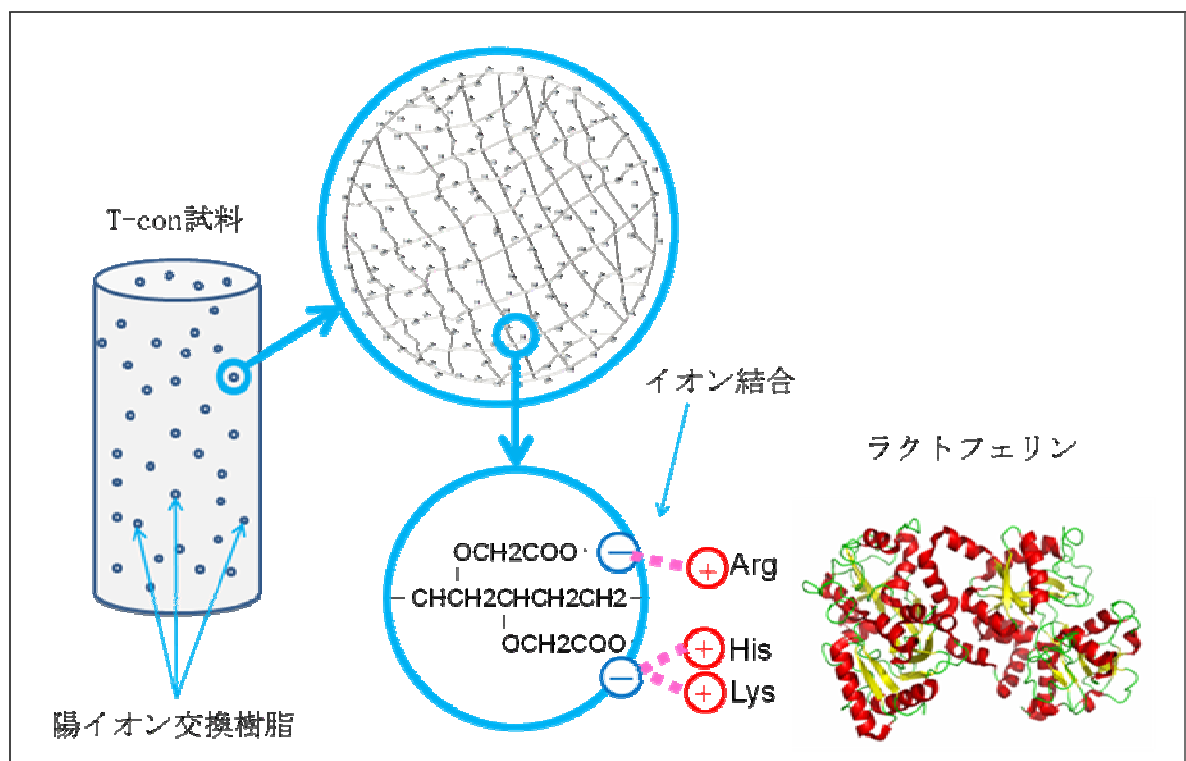


図 3-1 : T-con 試料中の樹脂と hLF との結合

樹脂は親水性ビニルポリマーを基材とし、カルボキシメチル基 (-O-CH₂COO⁻) を導入したものである。

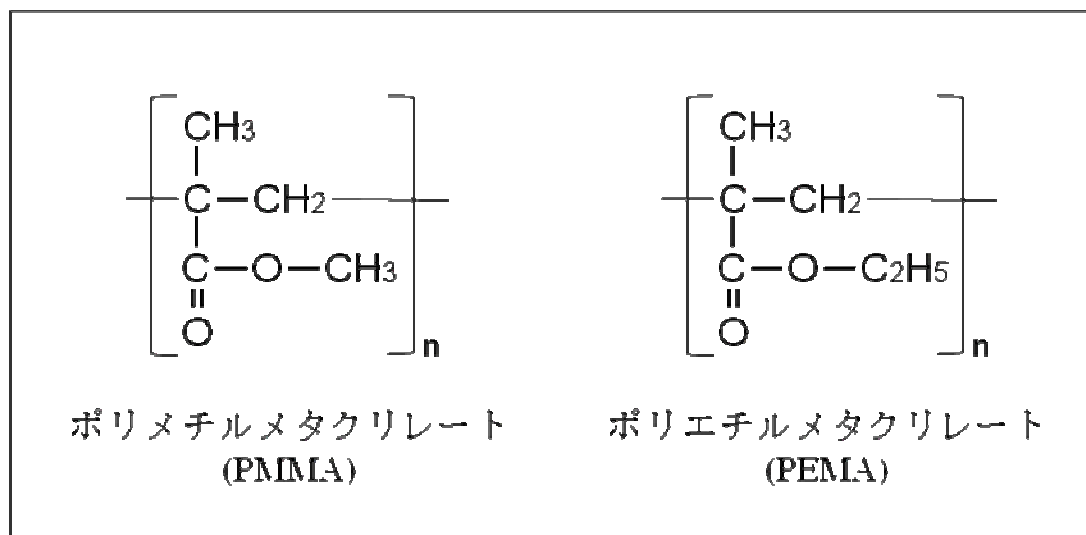


図 3-2：ポリメチルメタクリレートおよびポリエチルメタクリレートの化学式

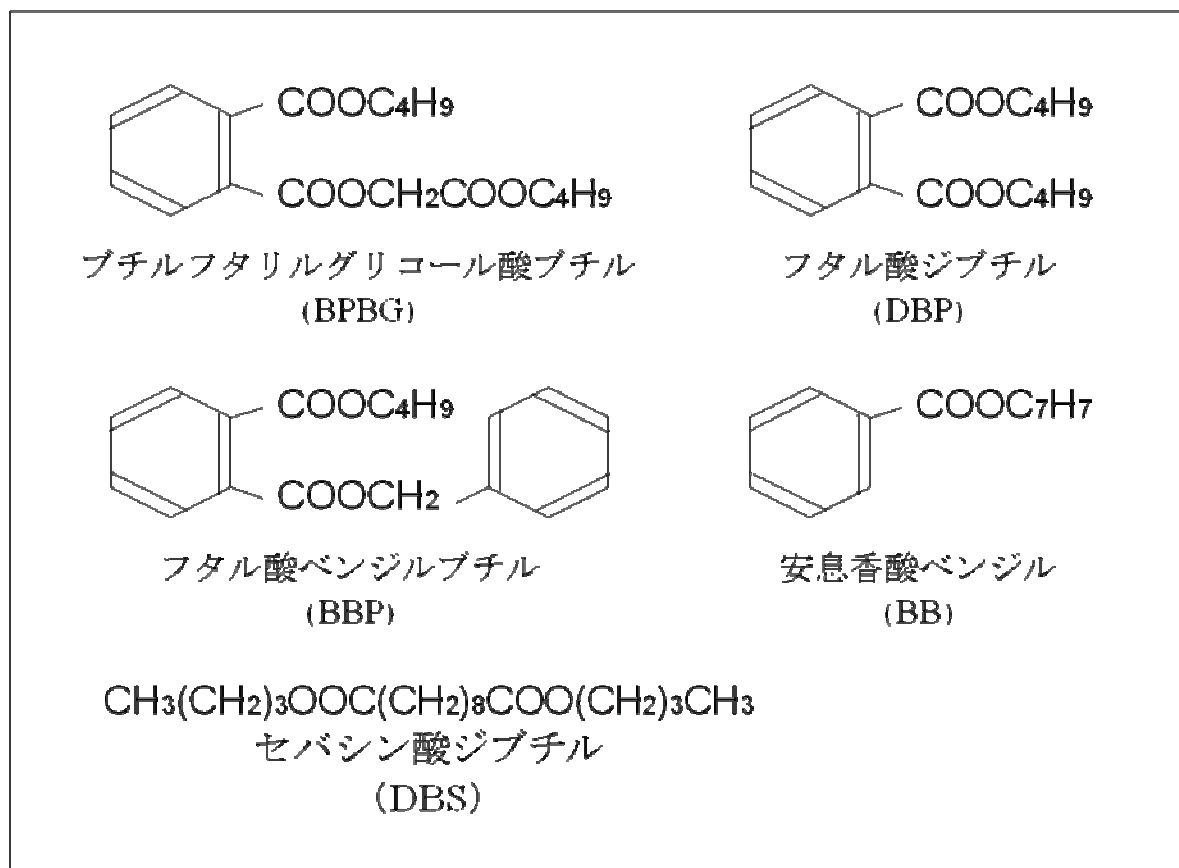


図 3-3：可塑剤の化学式

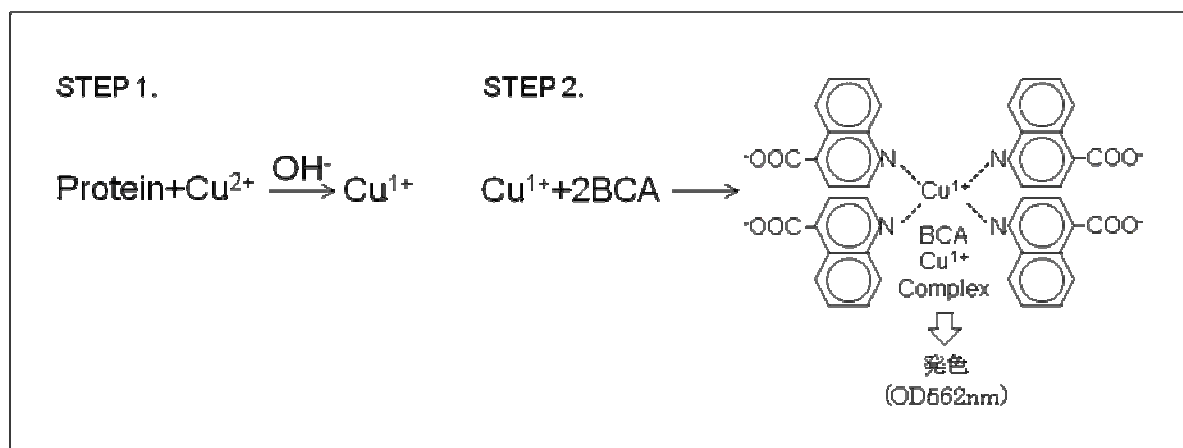


図 3-4 : BCA 法の原理

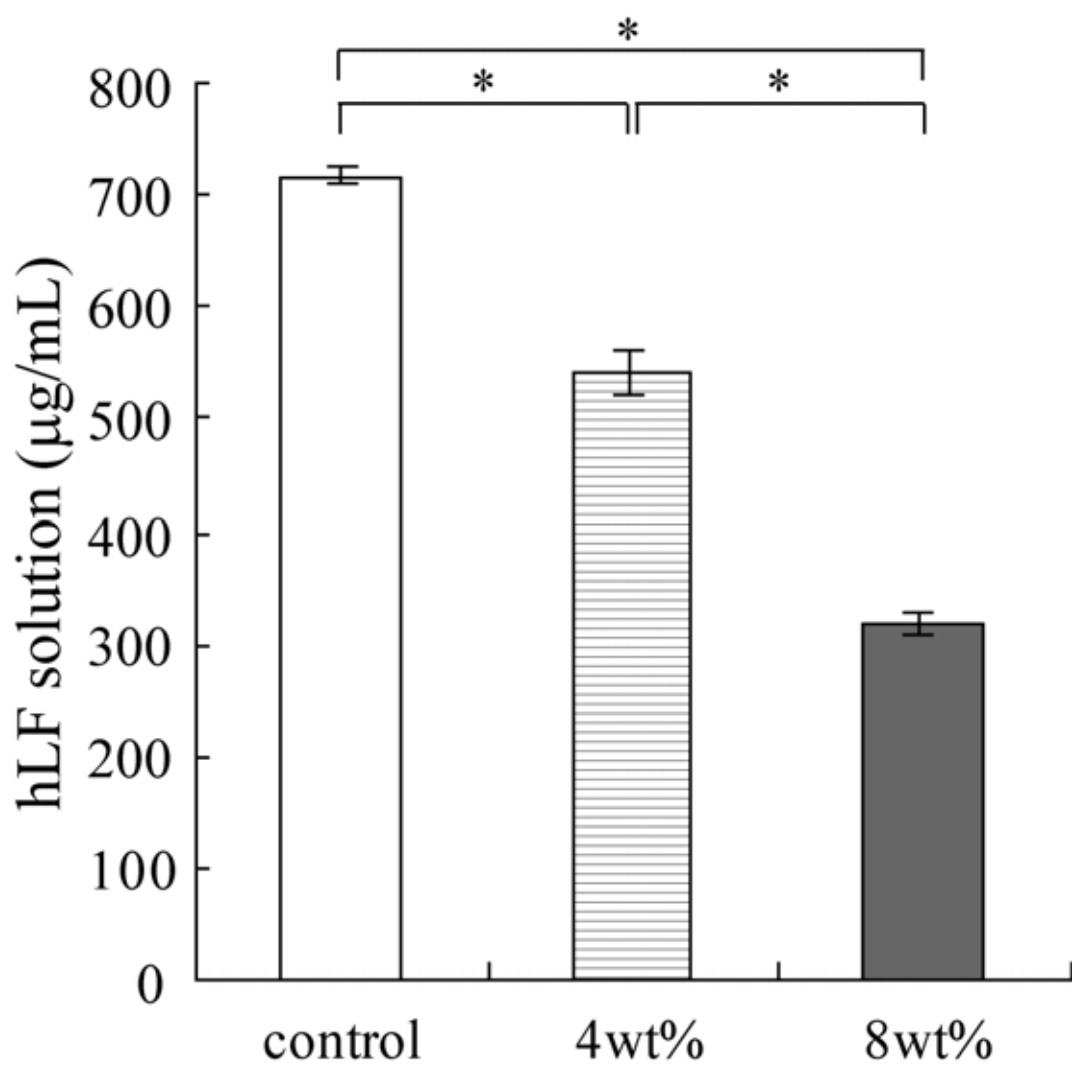


図 3-5：樹脂含有 T-con を浸漬した hLF 溶液濃度

試料間の有意差を*で示す ($p < 0.05$)

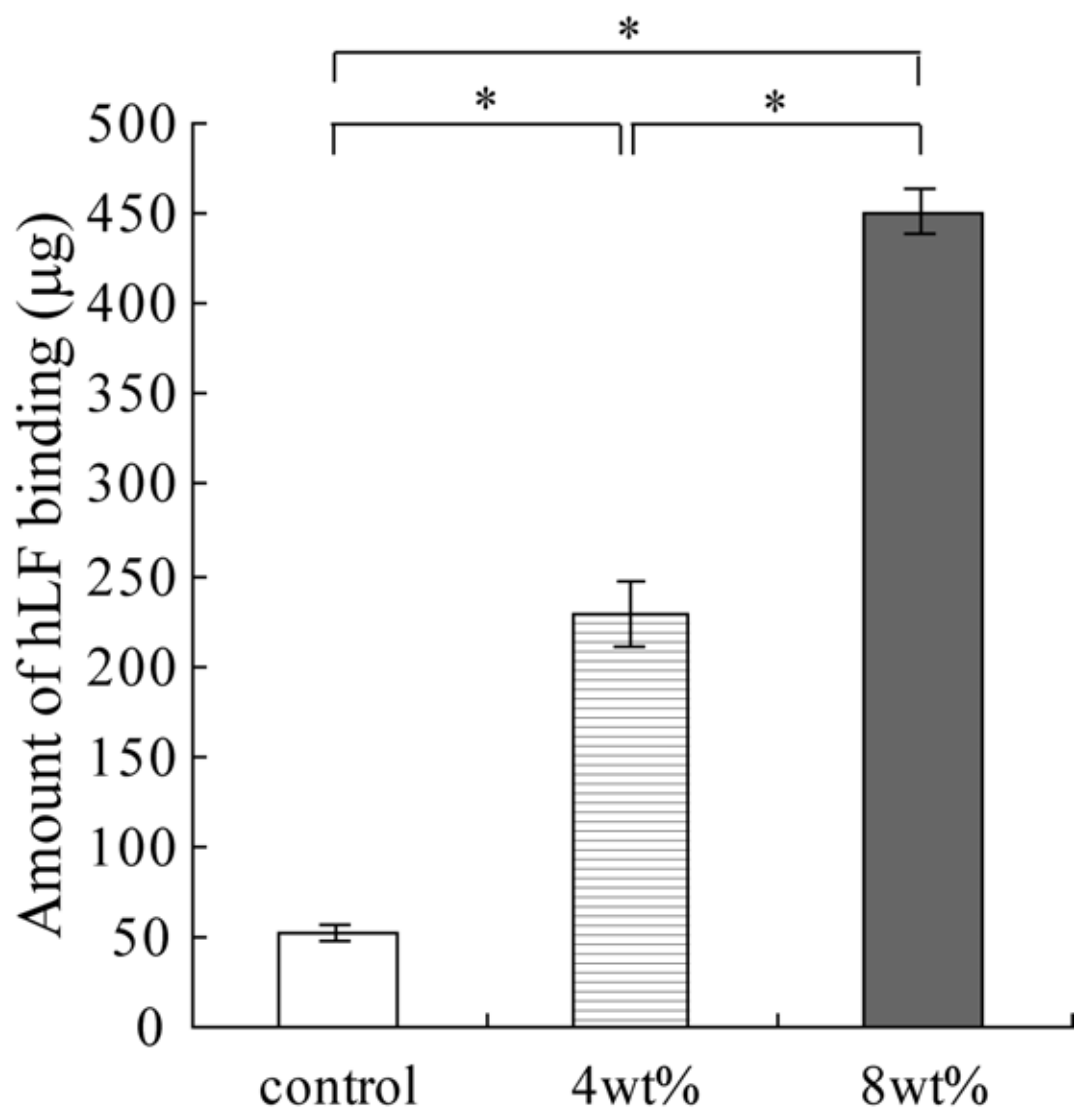


図 3-6：樹脂含有 T-con の hLF 結合量

試料間の有意差を*で示す ($p < 0.05$)

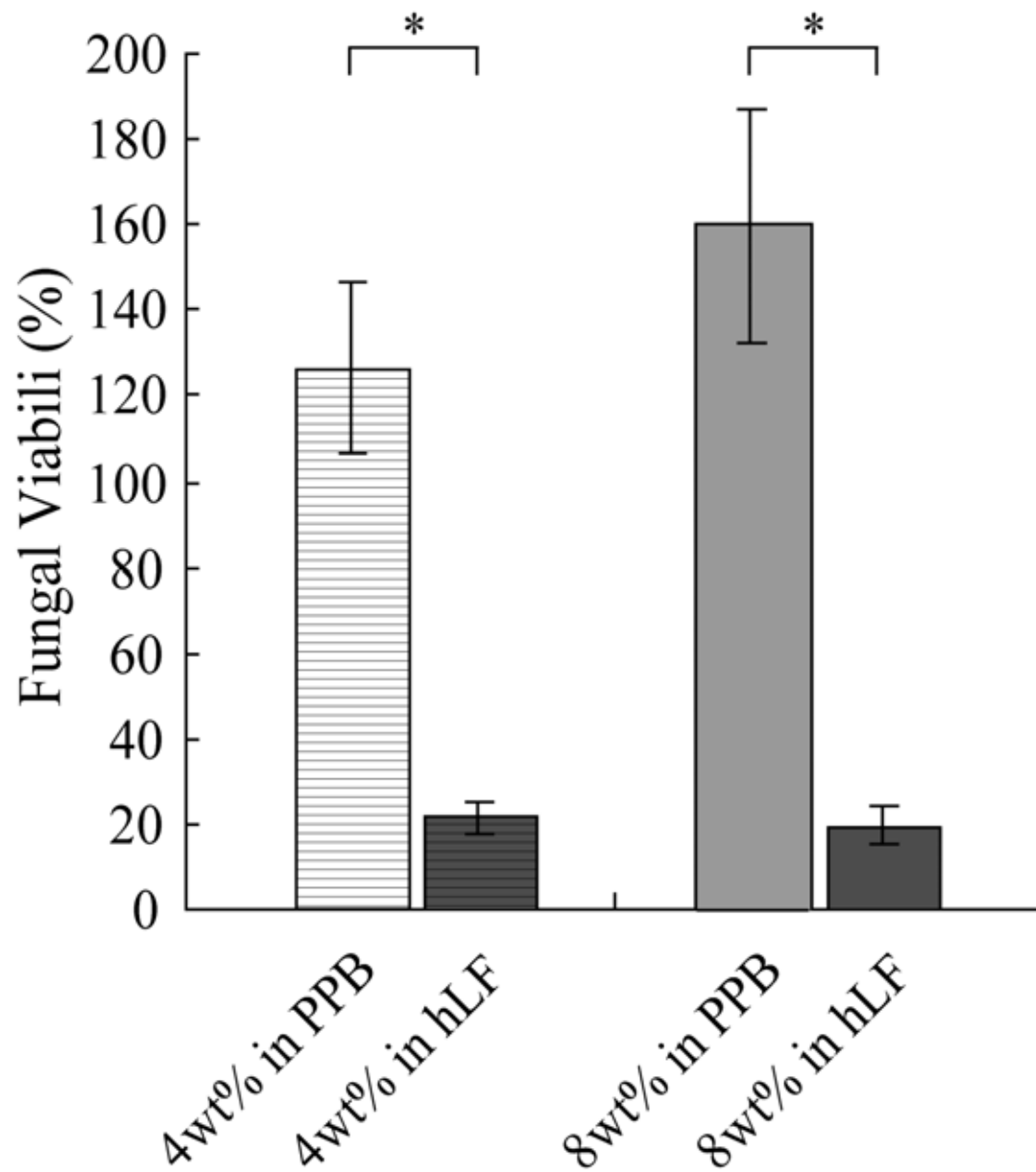


図 3-7：樹脂含有 T-con の抗菌性

樹脂を 4、8 wt%含む T-con を作製し、hLF 溶液に浸漬したものを実験試料とした（4 wt% in hLF、8 wt% in hLF）。樹脂を 4、8 wt%含む T-con を作製し、PPB に浸漬したものをコントロール試料とした（4 wt% in PPB、8 wt% in PPB）。試料間の有意差を*で示す（ $p<0.05$ ）

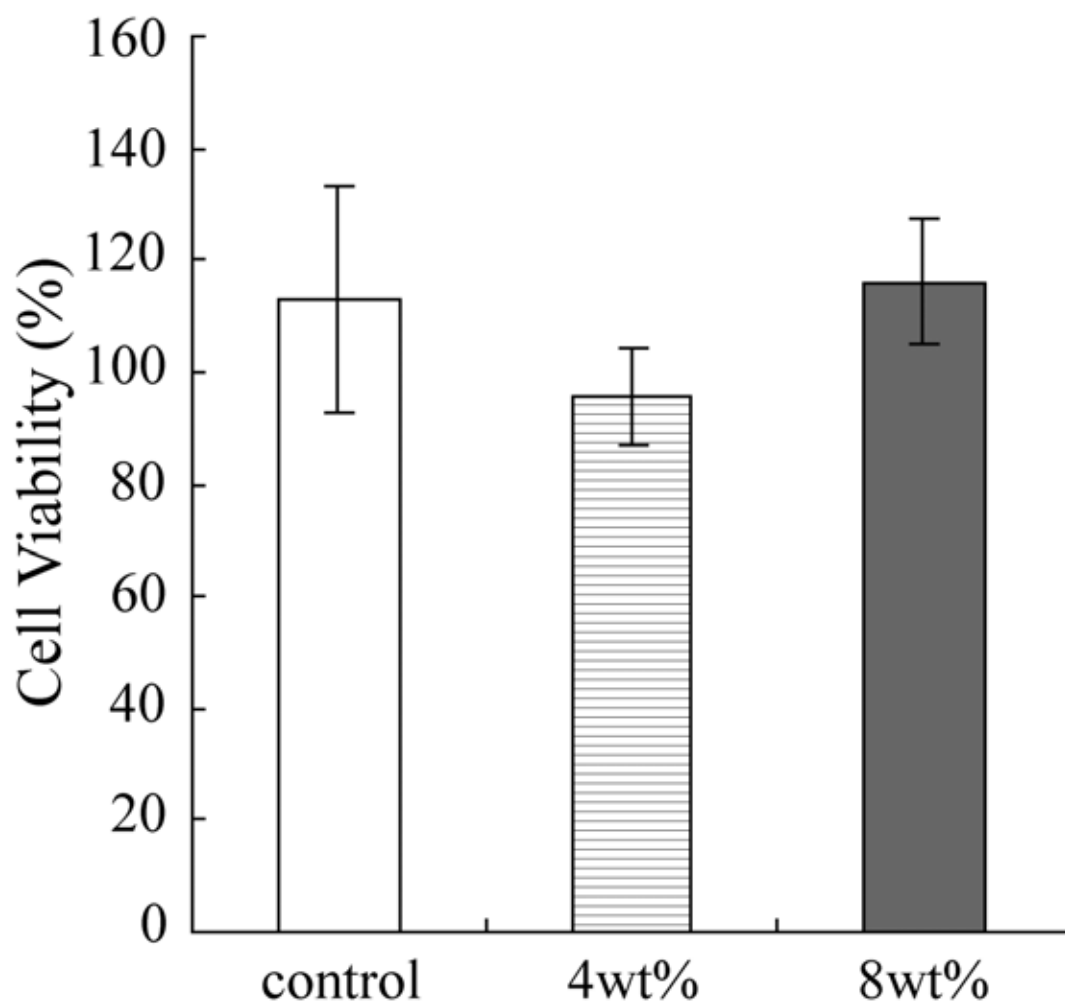


図 3-8：樹脂含有 T-con の 40%溶出液に対する細胞毒性（培養 3 日間）

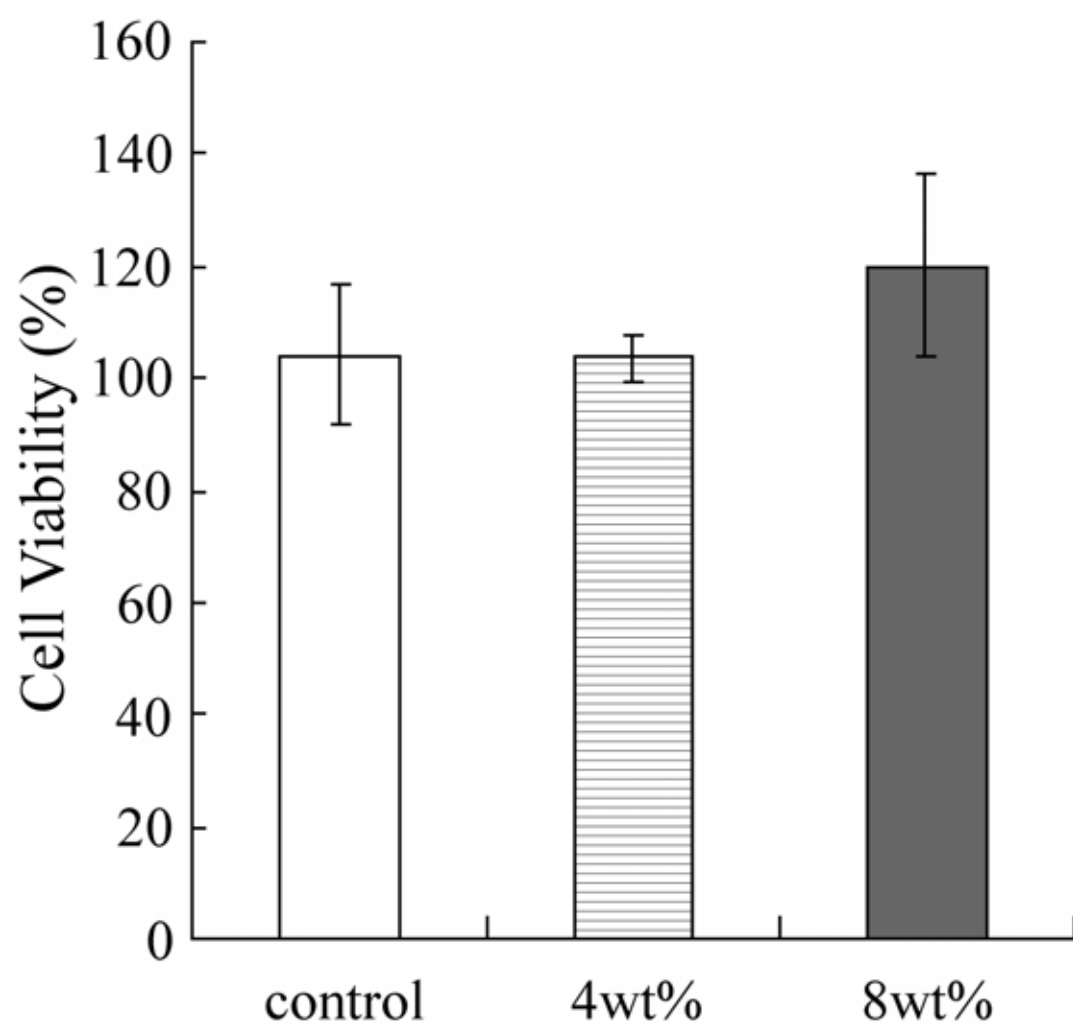


図 3-9：樹脂含有 T-con の 80%溶出液に対する細胞毒性（培養 3 日間）

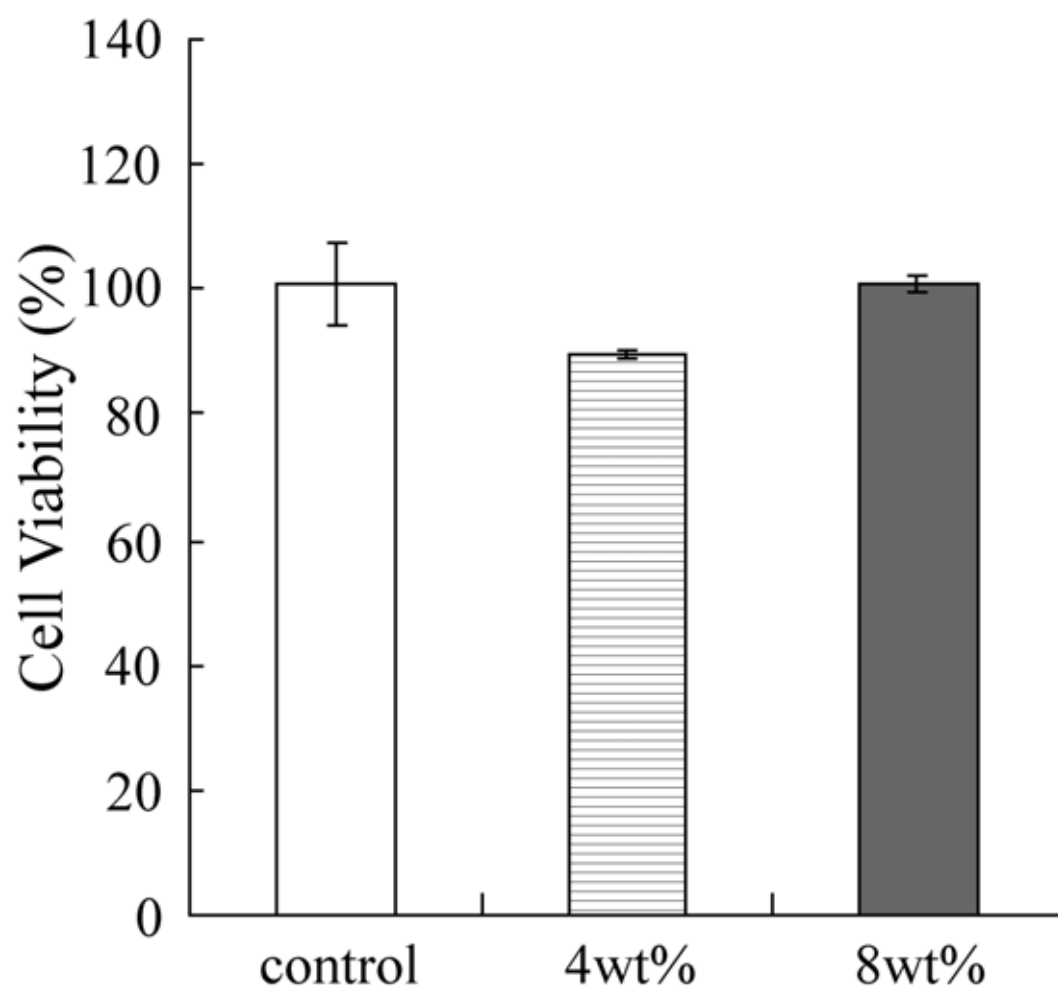


図 3-10：樹脂含有 T-con の 40%溶出液に対する細胞毒性（培養 7 日間）

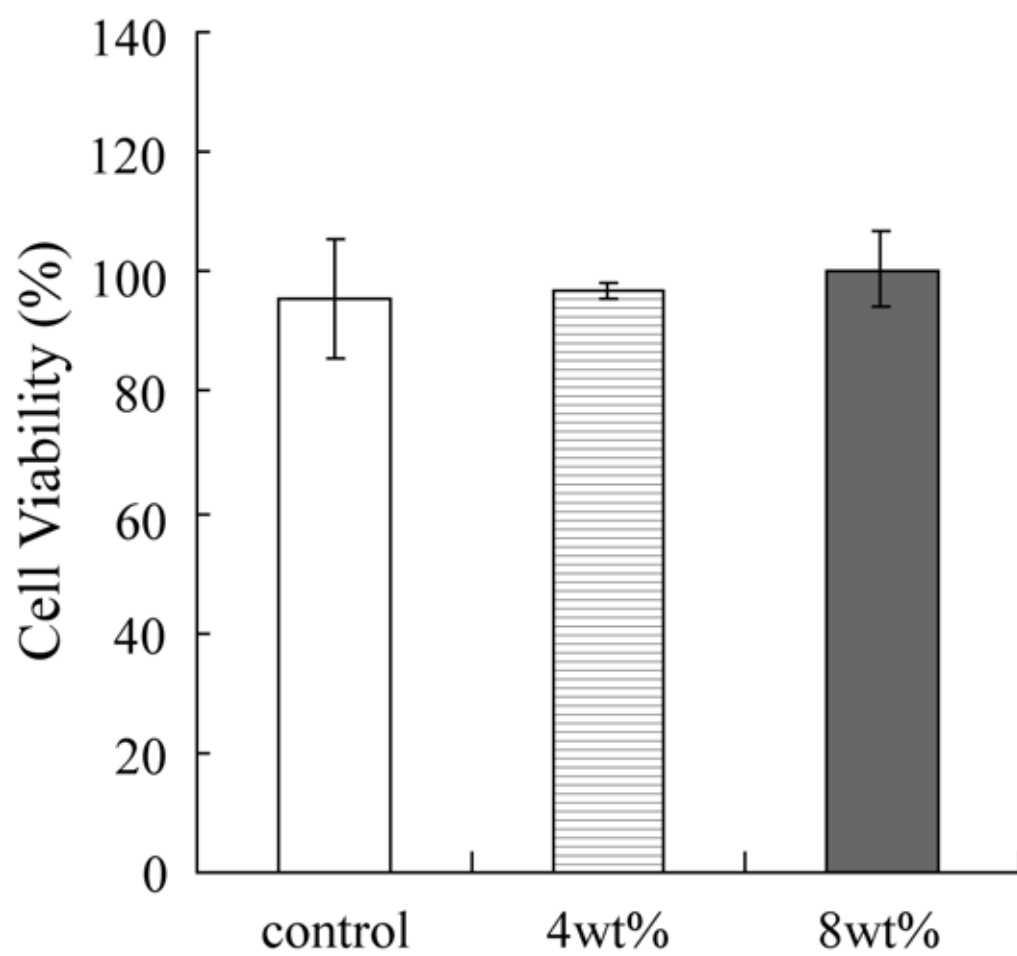
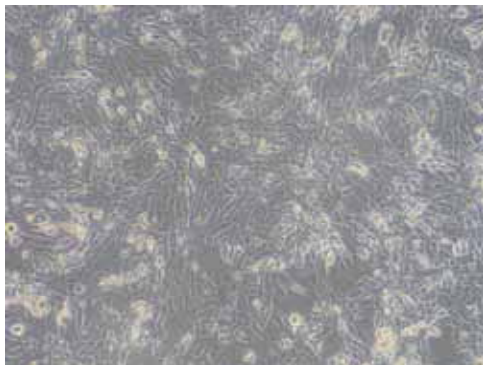
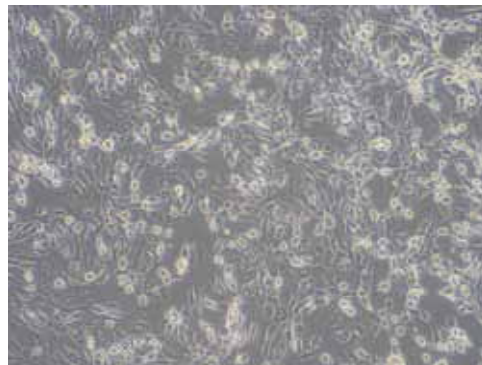


図 3-11：樹脂含有 4.06g の 80% 溶出液に対する細胞毒性（培養 7 日間）

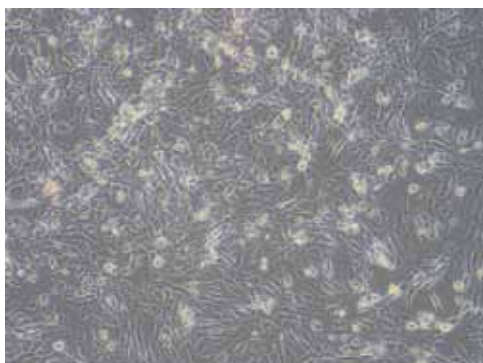
(a) control (0wt%) eluate 40%



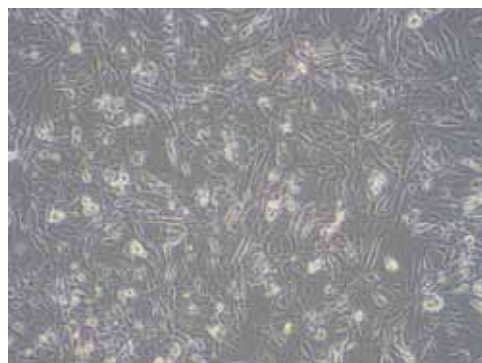
(b) control (0wt%) eluate 40%



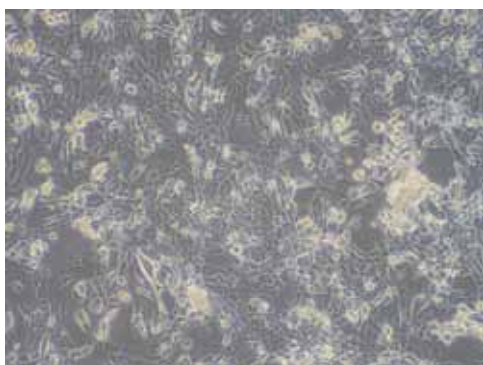
(c) 4wt% eluate 40%



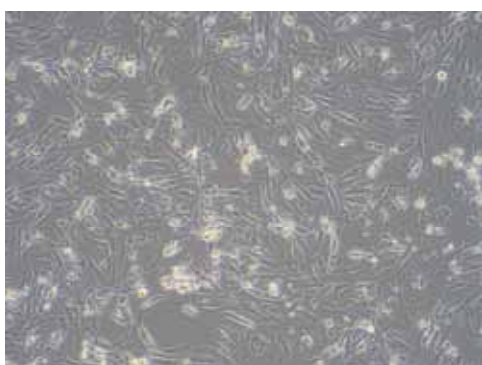
(d) 4wt% eluate 80%



(e) 8wt% eluate 40%



(f) 8wt% eluate 80%



(g) 対照

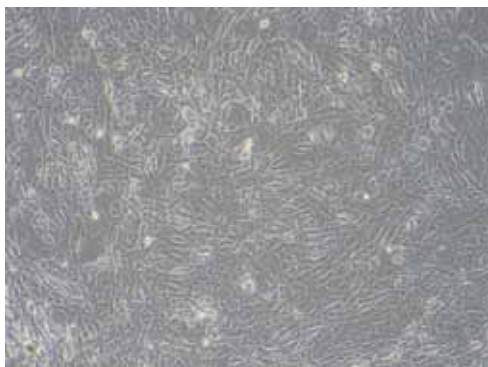
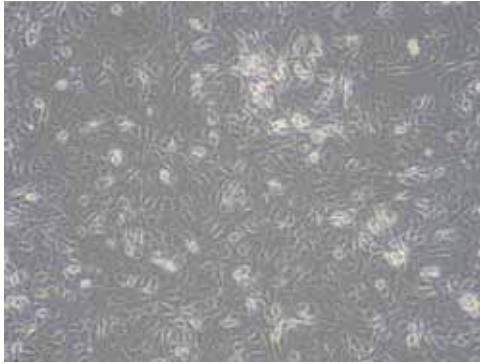
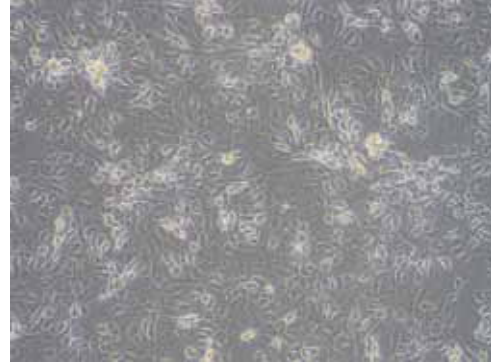


図 3-12：樹脂含有 T-con 溶出液とともに培養した Balb/c 3T3 mouse fibroblast cell の細胞像（培養 3 日間：×100）

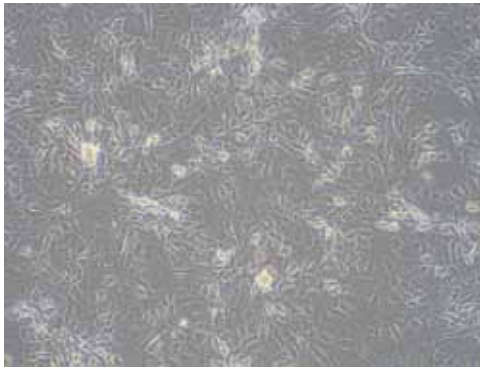
(a) control (0wt%) eluate 40%



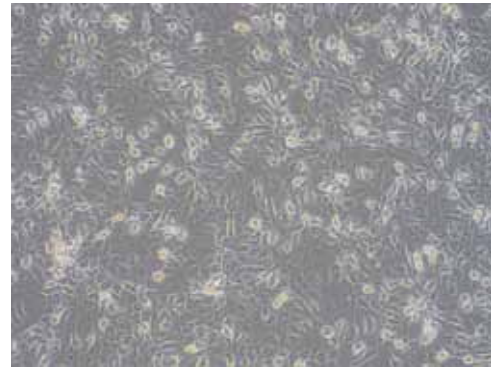
(b) control (0wt%) eluate 40%



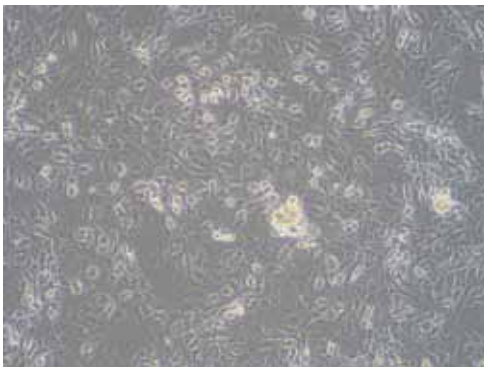
(c) 4wt% eluate 40%



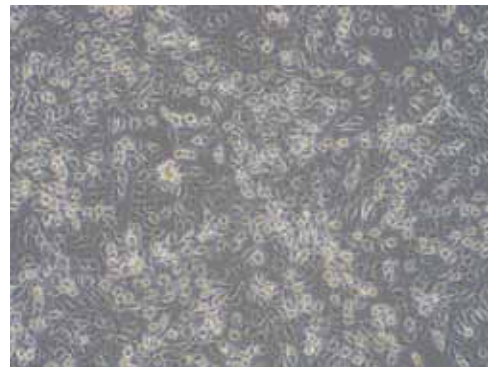
(d) 4wt% eluate 80%



(e) 8wt% eluate 40%



(f) 8wt% eluate 80%



(g) 対照

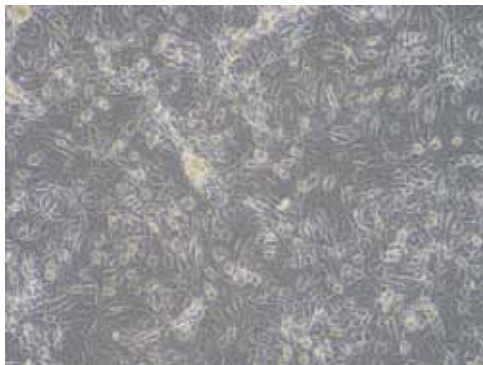


図 3-13：樹脂含有 T-con 溶出液とともに培養した Balb/c 3T3 mouse fibroblast cell の細胞像（培養 7 日間：×100）

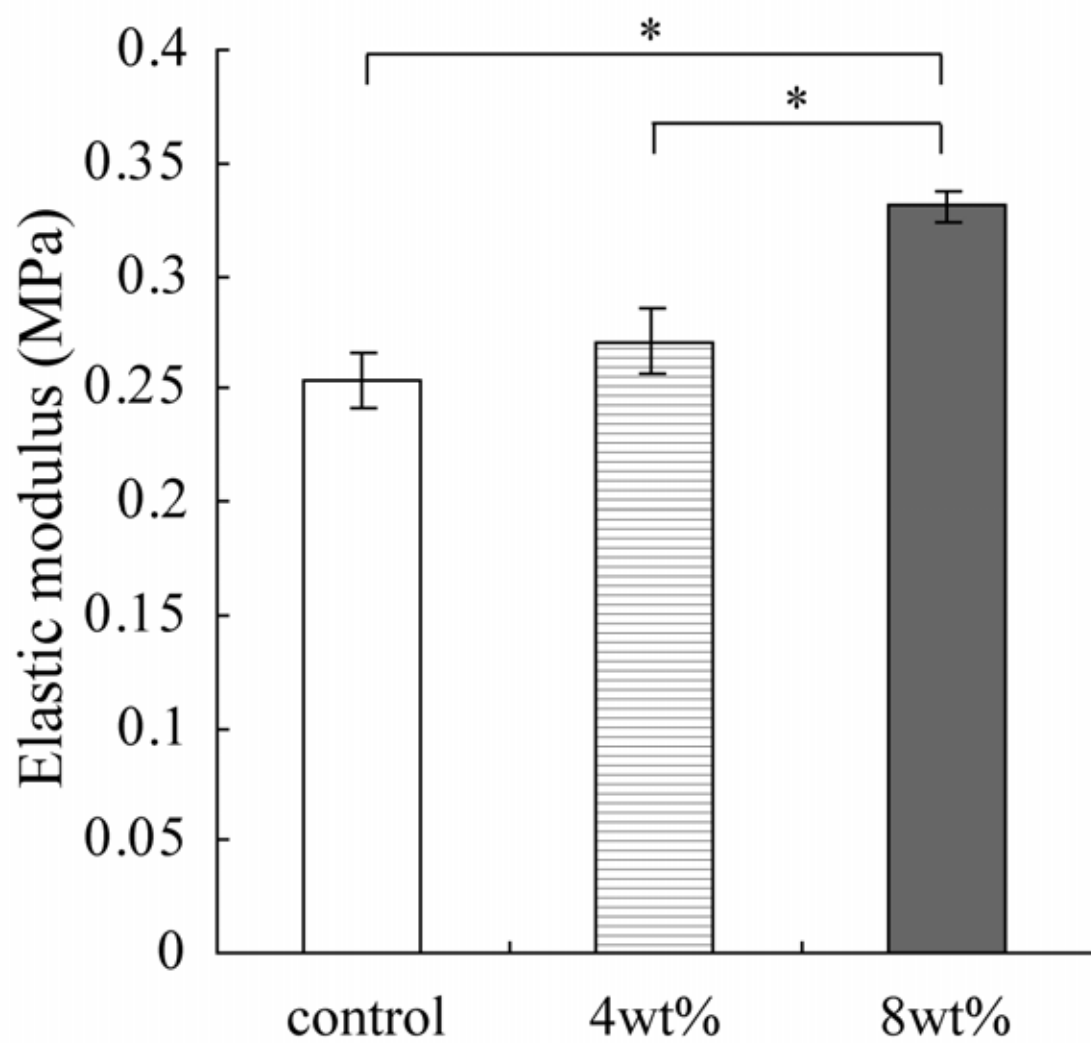


図 3-14：樹脂含有 T-con の圧縮弾性率

試料間の有意差を*で示す ($p < 0.05$)

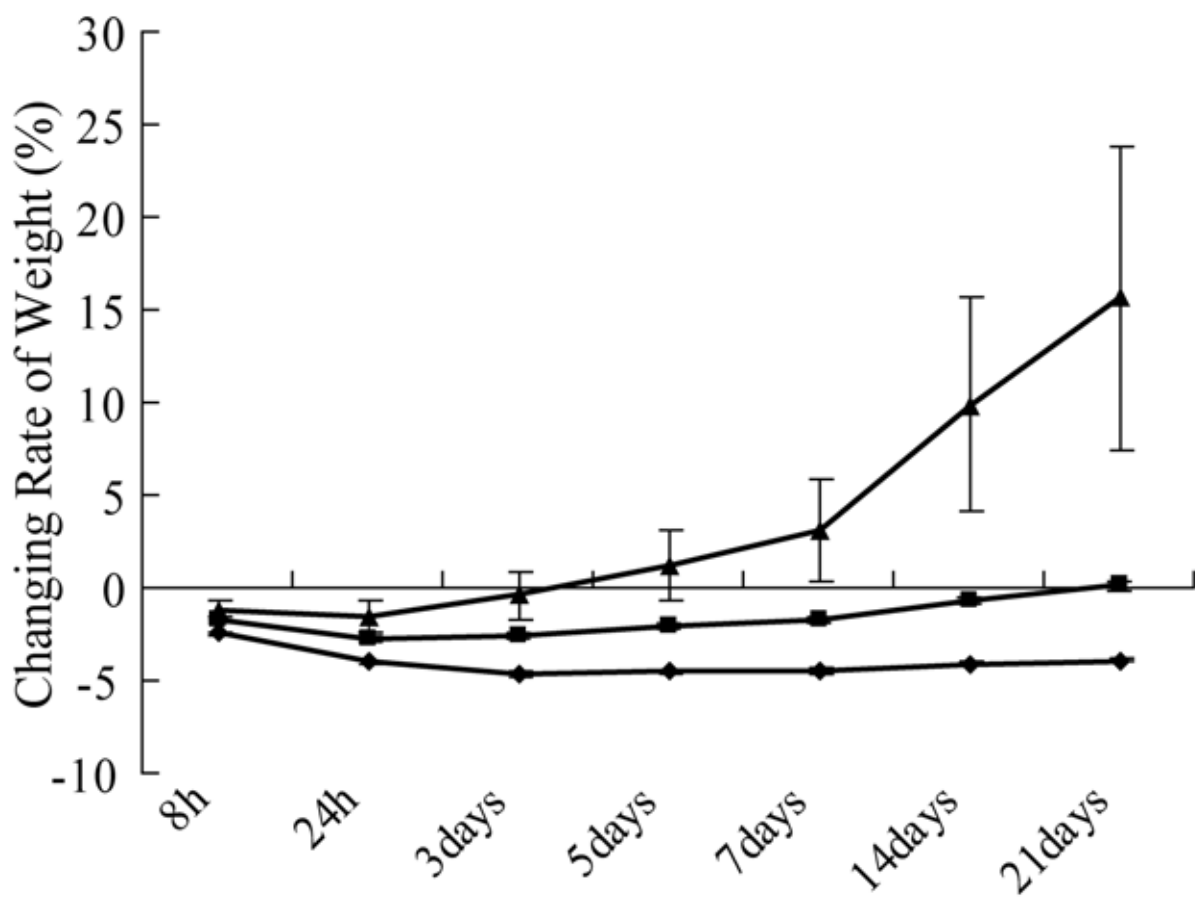


図 3-15：樹脂含有 T-con の経時的重量変化

コントロール試料 (□)、4 wt%試料 (○)、8 wt%試料 (△) の 8、24 時間、2、4、7、14、21 日後の重量変化率を示す。

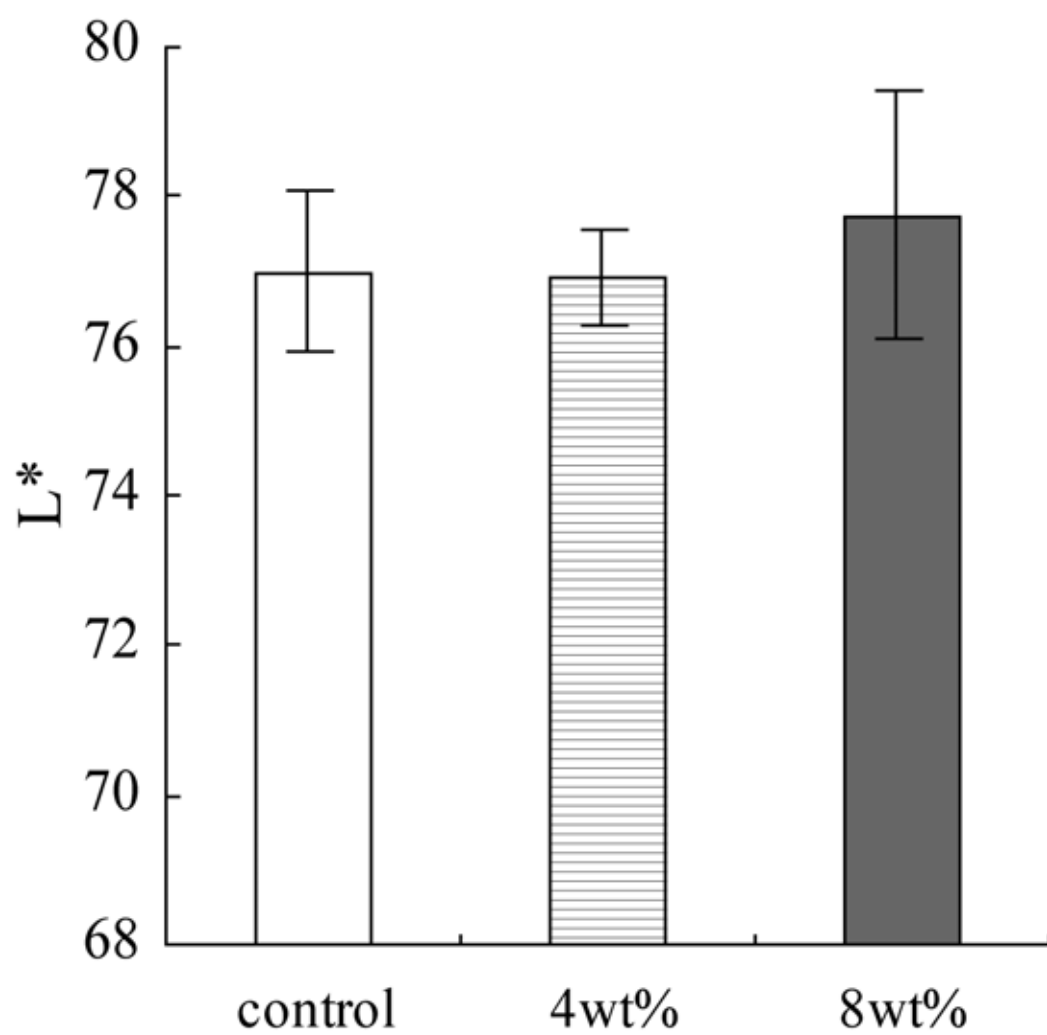


図 3-16：樹脂含有 T-con の L^* 表色系の色調

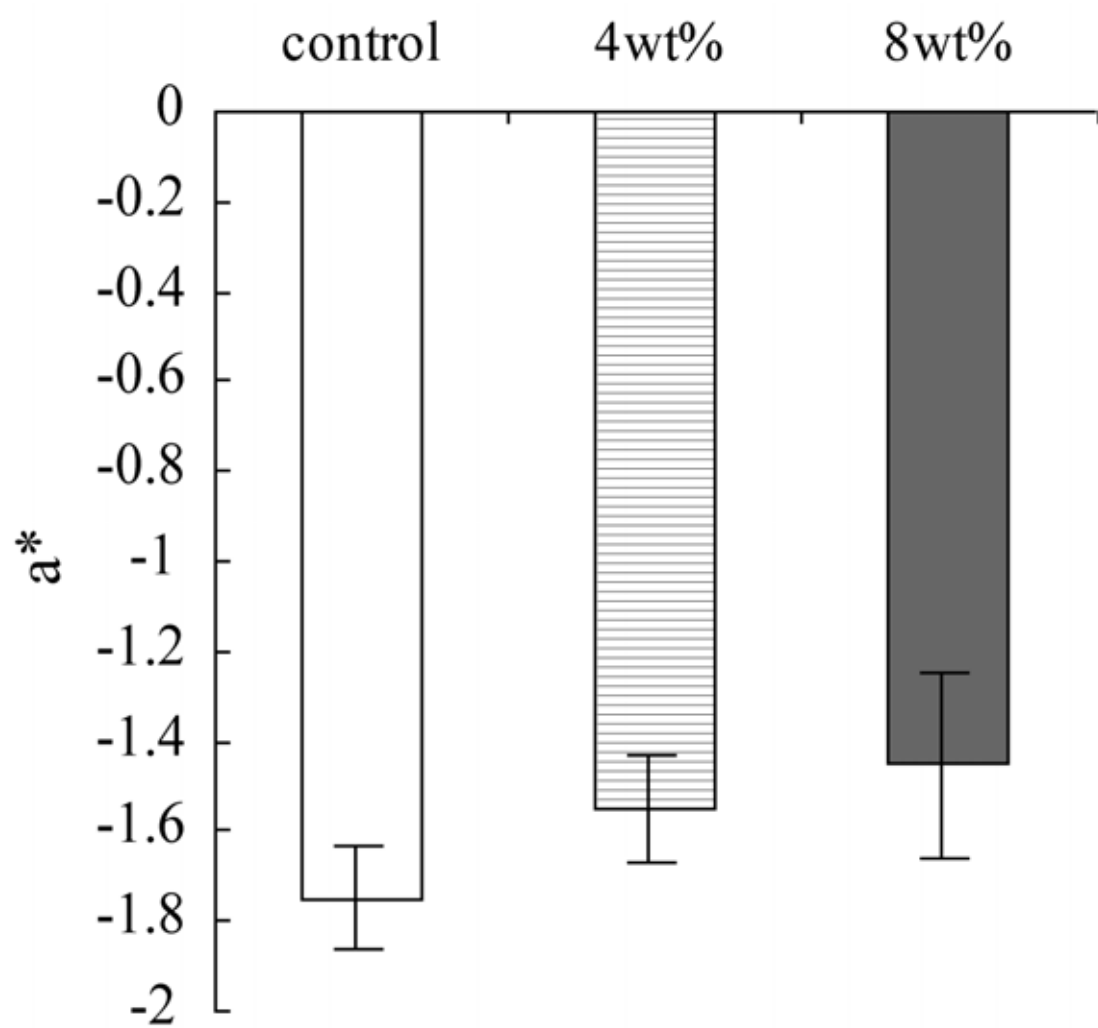


図 3-17：樹脂含有 T-con の a^* 表色系の色調

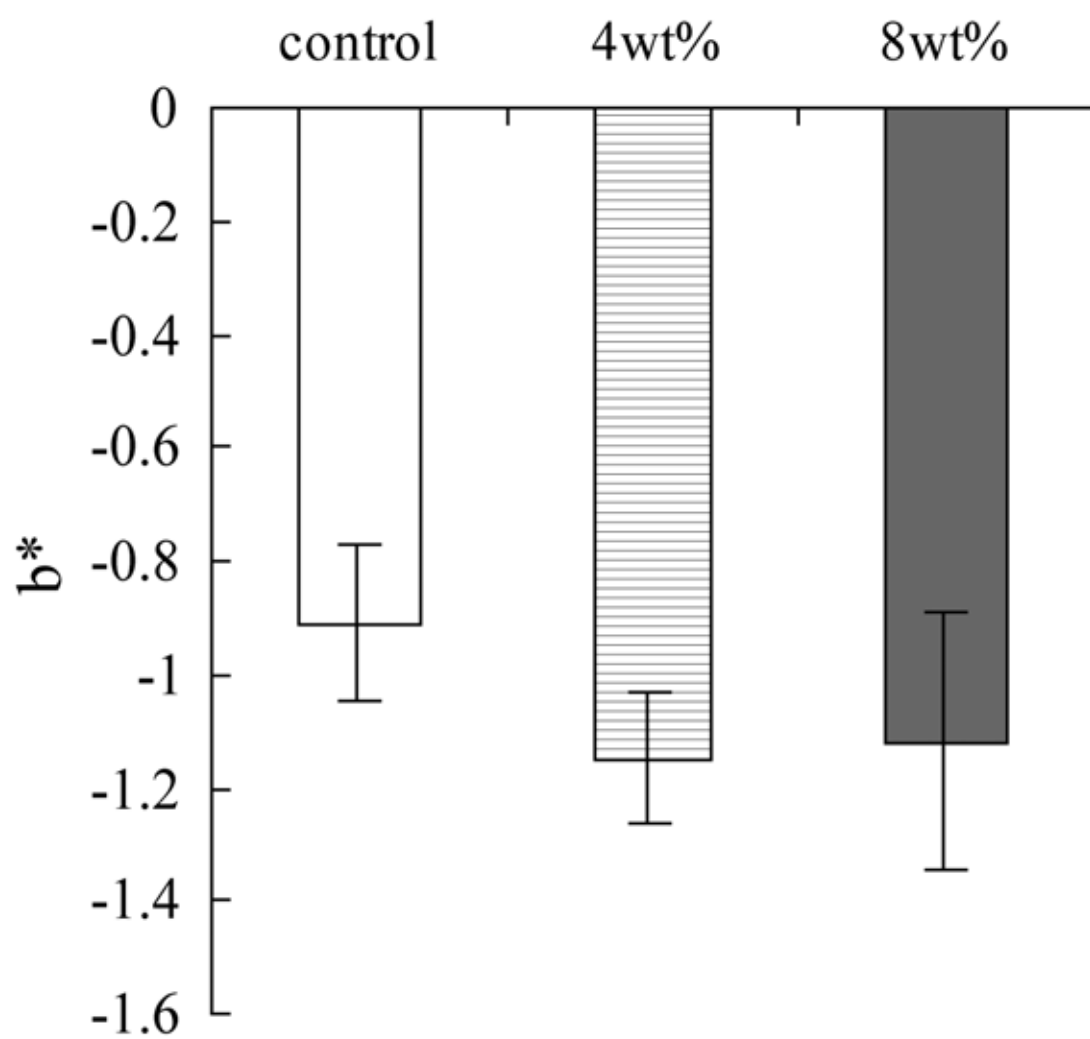


図 3-18：樹脂含有 T-con の b^* 表色系の色調

第 4 章

総括

急速な高齢社会を迎え、全身疾患を有する高齢者においては義歯床下粘膜の変化が著しく、ティッシュコンディショナーの使用頻度が高い。

近年多数の口腔内の疾病を防ぐための抗菌材を歯科材料に加える試みが行われている (Imazato S et al. 2001, Abe Y et al. 2004)。しかし、これらの材料は生体に対してアレルギーなどのような為害性を及ぼす可能性がある。そのため、口腔内において生体安全性の高い抗菌性蛋白質の局所濃度を上昇させるイオン交換樹脂の補綴物への応用は義歯性口内炎や日和見感染症の防止に有用であると考えられる。この恩恵の特に大きな利点は身体が不自由あるいは認知症の高齢者にもたらされると思われる。

本研究において試作したティッシュコンディショナーは *Candida albicans* に対して抗菌性を示し、また、細胞毒性試験結果からも臨床応用の可能性が示唆された。

しかしながら、陽イオン交換樹脂を添加することによる物性の低下が少なからず認められたため、イオン交換樹脂そのものを添加するのではなく、イオン交換基を分子レベルでティッシュコンディショナーのポリマー成分に導入することを検討していきたいと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました九州大学大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 咀嚼機能制御学分野 寺田善博 教授に深甚なる謝意を表します。また、終始、直接的な御援助、御指導を賜りました九州大学大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 咀嚼機能制御学分野 永留初實 先生、篠原義憲 先生に深謝致します。併せて本研究を遂行するにあたり、多大な御助言と御協力を頂きました九州大学大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 咀嚼機能制御学分野の皆様方に厚く御礼申し上げます。最後に私をここまで育てていただいた両親に深く感謝の意を表します。

参考文献

Abe Y, Ishii M, Takeuchi M et al. Effect of saliva on an antimicrobial tissue conditioner containing silver-zeolite. *J Oral Rehabil* 2004; 31: 568-573.

Abe Y, Ueshige M, Takeuchi M et al. Cytotoxicity of antimicrobial tissue conditioners containing silver-zeolite. *Int J Prosthodont* 2003; 16: 141-144.

Allison RT, Douglas WH. Micro-colonization of the denture-fitting surface by *Candida albicans*. *J Dent* 1973; 1: 198-201.

Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun* 1980; 28: 893-898.

Bellamy W, Takase M, Yamauchi K et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1121: 130-136.

Braden M, Causton BE. Tissue conditioners. 3. Water immersion characteristics. *J Dent Res*. 1971; 50: 1544-1547.

Braden M, Wright PS, Parker S. Soft lining materials--a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 1995; 3: 163-174.

Budtz-Jørgensen E, Bertram U. Denture stomatitis 1. The effect of antifungal and prosthetic treatment. *Acta Odontol Scand* 1970; 28: 283-304.

Cannon RD, Holmes AR, Mason AB et al. Oral Candida: clearance, colonization or candidiasis? *J Dent Res* 1995; 74: 1152–1161.

Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 359-383.

Chase WW. Tissue conditioning utilizing dynamic adaptive stress. *J Prosthet Dent* 1961; 11: 804-815

Coffield B. Stabilized bases using available undercuts for retention and stability. *J Prosthet Dent* 1987; 57: 525.

Cole MF, Hsu SD, Baum BJ et al. Specific and nonspecific immune factors in dental plaque fluid and saliva from young and old populations. *Infect Immun* 1981; 31: 998-1002.

Dabbabi H, Dubarry M, Rautureau M et al. Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. *J Dairy Res* 2004; 65: 283-293.

Dootz ER, Koran A, Craig RG. Comparison of the physical properties of 11 soft denture liners. *J Prosthet Dent* 1992; 67: 707-712.

Ellis B, Al-Nakash S, Lamb DJ et al. A study of the composition and diffusion characteristics of a soft liner. *J Dent* 1979; 7: 133-140.

Ellis B, Lamb DJ, Al-Nakash S. Water sorption by a soft liner. *J Dent Res* 1977; 56: 1526.

Ellison RT, Giehl TJ, LaForce FM. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun* 1988; 56: 2774-2781

Farrell DJ. Tissue conditioning and tissue conditioners. *Dent Clin North Am* 1975; 19: 255-268.

Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 499–511.

Frisch J, Levin MP, Bhaskar SN. Clinical study of fungal growth on tissue conditioners. *J Am Dent Assoc* 1968; 76: 591-592.

Gonzalez JB. Use of tissue conditioners and resilient liners. *Dent Clin North Am* 1977; 21: 249-259.

Imazato S, Torii Y, Takatsuka T et al. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *J Oral Rehabil* 2001; 28: 314-319.

Inoue K, Arikawa H, Fujii K et al. Viscoelastic properties of oral soft tissue. 1. A method of determining elastic modulus of oral soft tissue. *Dental Mater* 1985; 4: 47-53.

Johanson WG Jr, Pierce AK, Sanford JP et al. Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern*

Med 1972; 77: 701-706.

Jones DW, Hall GC, Sutow EJ et al. Chemical and molecular weight analyses of prosthodontic soft polymers. J Dent Res 1991; 70: 874-879.

Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA. Lactoferrin and its biological functions. Biochemistry (Mosc) 2001; 66: 1-7.

Kirkpatrick CH, Green I, Rich RR et al. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. J Infect Dis 1971; 124: 539–544.

Lamb DJ, Duoglas CW. Treatment of denture stomatitis by a sustained drug-delivery device: a preliminary study. J Dent 1988; 16: 219-221.

Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM et al. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. J Prosthet Dent 2001; 85: 352-356.

Levin MP, Frisch J, Bhaskar SN. Tissue conditioner dressing for free tissue grafts. J Periodontol 1969; 40: 271-273.

Loh HS, Tan PH. Tissue conditioners as obturators in maxillofacial surgery. Aust Dent J 1986; 31: 452-454.

Lönnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. Annu Rev Nutr 1995; 15: 93–110.

Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. Arch Oral Biol 2008; in press.

Murata H, Haberham RC, Hamada T et al. Setting and stress relaxation behavior of resilient denture liners. J Prosthet Dent 1998; 80: 714-722.

Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. J Am Dent Assoc 2008; 139: 35S-40S.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque--past and recent concerns. J Dent 1998; 26: 299-304.

Nikawa H, Samarayanake LP, Hamada T. Modulation of the anti-*Candida* activity of apo-lactoferrin by dietary sucrose and tunicamycin in vitro. Arch Oral Biol 1995; 40: 581-584.

Nikawa H, Samarayanake LP, Tenovuo J et al. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. Arch Oral Biol 1993; 38: 1057-1063.

Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T et al. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. J Oral Rehabil 1997; 24: 350-357.

Odds FC. *Candida* and Candidosis, 2nd ed. Bailliere Tindall Co, London, England, 1988, 1-6, 42-59, 117-123, 269-273.

Okita N, Orstavik D, Orstavik J et al. In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. *Dent Mater* 1991; 7: 155-160.

Pound E. Conditioning of denture patients. *J Am Dent Assoc* 1962; 64: 461-468

Quinn DM. The effectiveness, in vitro, of miconazole and ketoconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*. *J Oral Rehabil* 1985; 12: 177-182.

Reiter B, Brock JH, Steel ED. Inhibition of *Escherichia coli* by bovine colostrums and postcolostral milk. 2. The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum susceptible and serum resistant strain of *E. coli*. *Immunology* 1975; 28: 83-95.

Sangeorzan JA, Bradley SF, He X et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 1994; 97: 339-346.

Schneid TR. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. *Spec Care Dentist* 1992; 12: 245-250.

Suomalainen K, Saxén L, Vilja P et al. Peroxidases, lactoferrin and lysozyme in peripheral blood neutrophils, gingival crevicular fluid and whole saliva of patients with localized juvenile periodontitis. *Oral Dis* 1996; 2: 129-134.

Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE et al. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49: 557-563.

Thomas CJ, Nutt GM. The in vitro fungicidal properties of Visco-gel, alone and combined with nystatin and amphotericin B. *J Oral Rehabil* 1978; 5: 167-172.

Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. *J Prosthet Dent* 1994; 71: 517-524.

Tryde G, Olsson K, Jensen SA et al. Dynamic impression methods. *J Prosthet Dent* 1965; 15: 1023-1034.

Viejo-Díaz M, Andrés MT, Fierro JF. Modulation of in vitro fungicidal activity of human lactoferrin against *Candida albicans* by extracellular cation concentration and target cell metabolic activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1242-1248.

Viejo-Díaz M, Andrés MT, Pérez-Gil J et al. Potassium-efflux induced by a new lactoferrinderived peptide mimicking the effect of native human lactoferrin on the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochemistry* 2003; 68: 217–227.

Von Krammer R, Cirupano-Dentista. Tissue conditioners. *J Prosthet Dent*. 1971; 25: 244-250.

Wataha JC, Rueggeberg FA, Lapp CA et al. In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clin Oral Investigat* 1999; 3: 144-149.

Wilson J. In vitro loss of alcohol from tissue conditioners. *Int J Prosthodont* 1992; 5: 17-21.

Wozniak KL, Leigh JE, Hager S et al. A comprehensive study of *Candida*-specific antibodies

in the saliva of human immunodeficiency virus-positive individuals with oropharyngeal candidiasis. *J Infect Dis* 2002; 185: 1269-1276.

Xu YY, Samaranayake YH, Samaranayake LP et al. In vitro susceptibility of *Candida* species to lactoferrin. *Med Mycol* 1999; 37: 35-41.

Yang Y, Chen Q, Zhang JT. Structural and functional consequences of mutating cysteine residues in the amino terminus of human multidrug resistance-associated protein 1. *J Biol Chem* 2002; 277: 44268-44277.

Zeuthen ML, Dabrowa N, Aniebo CM et al. Ethanol tolerance and the induction of stress proteins by ethanol in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1988; 134: 1375-1384.

Zhang J, Li L, Cai Y et al. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. *Protein Expr Purif* 2008; 57: 127-135.

上原至雅、亀井克彦、菊池 賢 他. わが国における深在性真菌症の現状と対策-発生動向に関するアンケート調査の結果から-. *Jpn J Antibiot* 2001; 54: 448-472

清澤功. 母乳の栄養学. 金原出版 1988.

後藤光三, 作誠太郎, 山本宏治. 銀無機系抗菌剤 YDA フィラーのティッシュコンディショナーへの応用. *老年歯学* 2003; 18: 117-128.

高倉南津子, 若林裕之, 山内恒治 他. ラクトフェリンの感染防御効果とその作用メカ

ニズム. ミルクサイエンス 2004; 53: 187-191,

日本分析化学会九州支部. 機器分析入門 (改訂第 3 版). 南江堂 1996.

久和彰江. 二形性真菌 *Candida albicans* の発芽管および出芽形成時における細胞壁微細構造変化. 歯学 1986; 73: 1586-1602.