

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2015年度 博士論文

歯科材料における

ポリマイクロバイアルバイオフィルムの付着性

Adhesion of polymicrobial biofilms on dental materials

2015年 8月 18日

寺中 文子

Ayako Teranaka

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

クリニカル・バイオマテリアル講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
2015年度 博士論文

歯科材料における

ポリマイクロバイアルバイオフィルムの付着性

Adhesion of polymicrobial biofilms on dental materials

2015年 8月 18日

寺中 文子

Ayako Teranaka

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

クリニカル・バイオマテリアル講座

二瓶 智太郎准教授 指導

論文内容要旨

一般的に、細菌性プラークの付着には被着体の表面自由エネルギー (SFE) が関与し、50 mN/m より低い場合に付着しにくくなると報告がある。したがって、歯および歯科材料の SFE を十分に低下させることができれば、継発する齲蝕と歯周病を減少することが可能と考えられる。我々は、これまでに歯科材料の表面性状に観点を置き、種々な歯科材料の表面粗さ、接触角、ならびに SFE との関係の研究を進めてきた。

本研究では、各種歯科材料の表面粗さの違いに対する細菌付着の違いを口腔内のバイオフィームに近似した環境を再現可能なポリマイクロバイアル (PM) バイオフィームモデルを用いて検討した。また、細菌付着と表面性状の関連を比較検討した。

本研究では、カバーガラス (GL)、ジルコニア (Zr)、セラミックス (VB)、アパタイトペレット (HAP)、金銀パラジウム合金 (Pd)、床用レジン (UB)、およびコンポジットレジン (CR) の計 7 材料を試料とした。GL 以外の各試料は、耐水研磨紙 #600 で研磨した群 (粗研磨: RS) と、#2000 およびダイヤモンドスラリーで研磨した群 (鏡面研磨: MS) の粗さの異なる 2 群を作製した。各試料表面の中心線平均粗さ (Ra)、SFE、ゼータ電位を測定し算出した。培養方法は、刺激唾液を加えた buffered McBain medium に試料を懸架して 37°C で 10 時間嫌気培養後、唾液を含まない新たな培地に移して 14 時間培養し、PM バイオフィームを形成させた。その後、試料からバイオフィームを剥離、分散し、血液寒天培地で嫌気条件下 37°C、4 日間培養して生菌数 (CFU) を算定し、試料 1 mm² 当たりの PM バイオフィームの付着量を算出した (n=6)。また、走査電子顕微鏡を用いて試料に付着したバイオフィームの表面観察も行った。実験で得られた値に対して正規性の検定を行ったところ、11 項目中 8 項目が正規分布に従うことが確認され、その他の項目も正規分布に近いことから、平均値と標準偏差を求め、One-way ANOVA、その後の検定として Tukey の多重比較検定を行った。また、CFU と表面性状との関連について Pearson の相関係数を求めた。なお、有意水準は 5% とした。ヒト唾液を使用するにあたり、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の承認を得た (承認番号: 第 206 番)。なお、被験者の人権擁護上の配慮研究遂行による不利採、インフォームド・コンセント等についてはヘルシノキ宣言を遵守した。

その結果、各群の Ra は、GL は 0.007 μm、他の 6 材料は RS 群では 0.055–0.370

μm , MS 群では 0.024–0.052 μm であった. SFE は, GL は 70.5 mN/m であったのに対し 6 材料は RS および MS 群共に 50 mN/m 以下であった. ゼータ電位は, GL は -65.0 mV であり, VB は -39.03 mV と最も低い電位となった. CFU は, RS と MS 群間で有意差が認められたのは Zr, VB, HAP, CR および UB であった ($p < 0.05$). その中でも Zr, VB, HAP は著明に低い値を示した. また, バイオフィルムの表面観察像は CFU と同様な結果が得られた.

各種歯科材料の表面粗さの違いに対する細菌の付着性について, 口腔内に近似した環境を再現できる PM バイオフィルムモデルを用いて検討した結果, 1. 歯科材料における PM バイオフィルム形成因子は表面粗さが影響する傾向があることが示唆された. 2. 鏡面研磨した歯科材料における PM バイオフィルム形成には, ゼータ電位が関与することが示唆された. 3. 接触角および表面自由エネルギーは PM バイオフィルム形成因子に影響を与える因子としては低いと考えられた. 4. MS 群の Zr は PM バイオフィルム付着能が低いことが示唆された.

論文審査要旨

学位論文である「歯科材料におけるポリマイクロバイアルバイオフィルムの付着」は、口腔内のバイオフィルムに近似した環境を作り出すポリマイクロバイアル (PM) バイオフィルムモデルを用いて検討したところ、歯科材料によりバイオフィルムの付着性の違いを科学的に見出した論文である。

口腔のバイオフィルムは歯垢、あるいはデンタルプラークと呼ばれ、口腔の二大疾患の齲蝕と歯周病の直接的な原因となっている。歯や修復材料表面に対するプラークの付着やその形成のメカニズムを調べ、齲蝕や歯周病さらに誤嚥性肺炎等を予防することは、今後の高齢社会における歯科臨床に貢献することは明らかであり、意義ある研究目的である。

研究方法は以下の通りである。カバーガラス (GL)、ジルコニア (Zr)、セラミックス (VB)、アパタイトペレット (HAP)、金銀パラジウム合金 (Pd)、床用レジン (UB)、およびコンポジットレジン (CR) の計 7 材料を試料とした。GL 以外の各試料は、耐水研磨紙#600 で研磨した群 (粗研磨: RS) と、#2000 およびダイヤモンドスラリーで研磨した群 (鏡面研磨: MS) の粗さの異なる 2 群を作製した。各試料表面の中心線平均粗さ (Ra), SFE, ゼータ電位を測定し算出した。培養方法は、刺激唾液を加えた buffered McBain medium に試料を懸架して 37°C で 10 時間嫌気培養後、唾液を含まない新たな培地に移して 14 時間培養し、PM バイオフィルムを形成させた。その後、試料からバイオフィルムを剥離、分散し、血液寒天培地で嫌気条件下 37°C, 4 日間培養して生菌数を算定し、試料 1 mm² 当たりの PM バイオフィルムの付着量を算出した (n=6)。また、走査電子顕微鏡を用いて試料に付着したバイオフィルムの表面観察も行った。得られた結果は、有意水準 5% で One-way ANOVA および Tukey の多重比較検定を用い、各材料における PM バイオフィルムの付着性を統計学的に比較検討した。また、生菌数と表面性状との関連について Pearson の相関係数を求めた。

結果として、PM バイオフィルムは、歯科材料の表面性状によって異なることが明らかとなり、特にジルコニアには付着が少ないことという興味ある結果を示した。また、それらに影響する因子として、表面粗さが関与しているという新しい知見を見出したことは高く評価できる。

本審査委員会は、今回の実験に用いた試料材料の選択基準と臨床とのかかわり・統計処理の方法とそれに対する結果の解釈、結果の表示法について指摘がなされ、それらに対して、一部修正を含め十分な回答が行われた。さらに、修復材料の表面性状における新しい知見は、高齢社会を迎えた歯科臨床に大きく

貢献し、予防歯学の発展につながるとの結論に至った。そこで、本審査委員会は、申請者の博士論文が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2015年8月18日

主査：木本 克彦 教授

副査：木本 茂成 教授

副査：山本 龍生 准教授

目 次

緒 言	1
実験材料および方法	2
結 果	7
考 察	11
結 論	19
謝 辞	20
文 献	22
付図説明	31
Table および Figure	
Table 1	33
Table 2	34
Fig.1.	35
Fig.2.	36
Fig.3.	37
Fig.4.	38
Fig.5.	39
Fig.6.	40

緒 言

口腔のバイオフィルムは歯垢，あるいはデンタルプラークと呼ばれ，口腔の 2 大疾患とされるう蝕と歯周病の直接的な原因となっている^{1,2)}．歯や修復材料表面に対するプラークの付着やその形成のメカニズムに関する研究は数多く報告されている³⁻⁹⁾．唾液由来のペリクルは十分に歯面清掃を行った歯の表面に直ちに形成され¹⁰⁾，細菌はペリクルとの化学的または静電氣的相互作用や，細菌細胞表面の抗原などにより吸着するとされている¹¹⁾．次いで細菌は，菌体外多糖 とよばれる細胞外ポリマーを産生して定着すると，さらに唾液中に浮遊する多様な細菌種が付着して多菌種からなるプラークを形成する．その後もプラークは付着と脱離を繰り返し，細菌叢はより複雑化したものになる^{12,13)}．こうして肥厚したバイオフィルムは，物理的に清掃する以外は容易に除去されずに，蓄積され歯質の脱灰や歯肉の炎症を生じさせる．したがって，う蝕および歯周病の予防と改善にはバイオフィルムの制御が不可欠である．これらペリクルやプラークの付着は被着体の表面粗さの他に表面自由エネルギー（SFE）に影響されると言われており¹⁴⁻¹⁶⁾，Busscherらは歯面のSFEが 50 mN/mより低い場合にプラークが付着しにくいと報告している¹⁷⁾．したがって，歯および歯科材料のSFEを十分に低下させることができれば，継発するう蝕と歯周病を減少させることが可能と考えられる．

近年，修復や補綴装置の材料の開発が盛んで，多種多様な歯科材料が使用されており，各材料の表面に形成されるプラーク量には差があることを臨床で度々経験す

る。しかしながら、歯科材料の表面性状に対するバイオフィルムの付着、形成に関する報告は少なく^{18,19)}、辺縁性二次う蝕や歯周炎誘発との関連性も明らかではない。我々は、これまでに歯科材料の表面性状に観点を置き、種々な歯科材料の表面粗さとSFEとの関係の研究を進めてきた²⁰⁾。

そこで本研究では、各種歯科材料とそれらの表面粗さの違いに対する細菌の付着性について、Exterkateらが報告した口腔内に近似したバイオフィルムを口腔外で再現できるポリマイクロバイアル (PM) バイオフィルムモデル²¹⁾を用いて検討した。また、表面粗さ、接触角、SFE、ならびにゼータ電位を測定し、細菌の付着と表面性状の関連を比較検討した。

実験材料および方法

1. 材 料

1) 試料作製

実験に供した材料は、カバーガラス (GL ; Menzel, Braunschweig, Germany), ジルコニア (Zr ; LavaTM Plus Zirconia XL, 3M ESPE, Germany), セラミックス (VB ; VITABLOCS[®] Mark II for CEREC[®]/in Lab[®], VITA, Germany), 焼結アパタイト (HAP ; Apatite pellet APP-100, HOYA Technosurgical, 東京), 金銀パラジウム合金 (Pd ; キャストウエルM.C., GC, 東京), 床用レジン (UB ; URBAN, 松風, 京都), およびコンポジットレジン (CR ; クリアフィル マジェスティアー ES2, MX, クラ

レ・ノリタケ, 東京) の計 7 材料とした (Table 1). GL, Zr, HAP, Pd は市販されている 1 枚のサイズ (GL: ϕ 12 mm, 厚さ 0.15 mm, Zr: 10×10 mm, 厚さ 0.8 mm, HAP: 10×10 mm, 厚さ 2 mm, Pd: 6.3×9.5 mm, 厚さ 1.6 mm) を使用した. VB は, ブロック (10×12 mm) を低速精密切断器 (ISOMET, BUEHLER, USA) にて, 厚さ 1 mm に切り出した. UB は粉液を業者指示通りに混和し, 10×10×400 mm の金型に 2.9 MPa, 3.4 MPa, 3.9 MPa で填入, 普通石膏 W/P=0.26 で埋没し, フラスコを水温から 100°C まで約 30 分で沸騰する程度の速度で加熱し, 沸騰後約 40 分間係留して加熱重合を行った. 係留後, 室温放置し, フラスコ冷却後に PMMA 硬化体を取り出し, 精密切断機にて 10×10×1 mm に切り出し試料とした. CR はスライドガラス上に静置した 10×10×1 mm のプラスチックモールド内に填塞, 2 kg で圧接し, カバーガラスを介して上下面より 60 秒間光照射 (オプチラックス LCT, サイブロン・デンタル, 東京) し試料とした.

GL 以外の各試料は, 全面を耐水研磨紙 #600 (FUJI STAR, 三共理化学, 埼玉) まで研磨 (粗研磨: RS) したものと, 耐水研磨紙 #2,000 まで研磨後, さらにダイヤモンドスラリー ϕ 0.5 μ m (マルトー, 東京) まで研磨 (鏡面研磨: MS) した表面粗さの異なる 2 群とし, 厚さを 0.8 mm とした. それぞれ研磨終了後, 表面の付着物を除去するために 30 分間超音波洗浄した. GL は 1 mol/L の水酸化ナトリウム溶液 (和光純薬, 大阪) と 1 mol/L の塩酸 (和光純薬, 大阪) に各 24 時間浸漬後, 30 分間超音波洗浄した. 各試料は 50°C で 2 時間乾燥させた後, 24-well culture plate の

ステンレス製の上蓋内面に取り付けられたクランプに各試料を装着し、酸化エチレンガスにより 60℃で 20 分間、滅菌を行った。

2) 唾液試料の調製

唾液は、3 か月間抗生物質あるいは抗菌剤の服用の履歴がなく、う蝕や歯周病に罹患していない天然歯列を有する健常成人 1 名から、パラフィルム (Pechiney Plastic Packaging Company, USA) を咀嚼して氷冷下で採取した。採取した唾液は直ちに滅菌グラスウール (NRK GRW-10, Nippon Rikagaku Kikai CO. LTO., Tokyo) で濾過し、滅菌グリセリンにて 70 vol%に希釈し、-80℃で凍結保管した。なお、ヒト唾液を使用するにあたり、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の承認を得た (承認番号: 第 206 番)。また、被験者の人権擁護上の配慮研究遂行による不利採、インフォームド・コンセント等についてはヘルシンキ宣言を遵守した。

2. 方法

細菌の付着と表面性状の関連を比較検討するために、表面粗さ、接触角、SFE, ならびにゼータ電位を測定した。

1) 表面粗さの測定

各試料表面は、接触式表面形状機 (Surfcom590A, 東京精密, 東京) にて測定長さ 4.0 mm, 測定速度 0.3 mm/s, カットオフ値 0.8 mm で表面粗さの測定を行い、表

面粗さのパラメーターとして中心線平均粗さ (Ra) を求めた。

2) 接触角の測定と表面自由エネルギーの算出

試料表面に蒸留水およびジヨードメタン (和光純薬, 大阪) をそれぞれ滴下し, 室温 25°C の環境下で自動接触角計 (DCA-VZ 型, 協和界面科学, 埼玉) を用いて表面に対する接触角を測定し, 得られた接触角値から表面自由エネルギー算出ソフト (FAMAS, 協和界面科学, 埼玉) を用いて, Owen と Wendt の理論式より SFE を算出した。

3) ゼータ電位測定

試料のゼータ電位測定は, 平板状材料の表面電位が測定可能な流動電位法の固体サンプル用ゼータ電位測定装置 (SurPASS, Anton Paar, Austria) を用いた。電解液は 0.001 mol/L の塩化ナトリウム水溶液 (和光純薬, 大阪) を用い, 測定圧力 400 mbar の条件下で計測を行った。

4) 生菌数測定

凍結保存唾液を Exterkate²¹⁾ の方法に従い, buffered McBain semidefined medium (0.2 wt% sucrose, 50 mmol PIPES, mucin, bacto peptone, trypticase peptone, yeast extract, NaCl, KCl, CaCl₂, hemin, vitamin K₁) で 50 倍希釈して 24-well culture plate

に分注後culture plateの蓋に装着した各試料を浸漬し、37°Cで10時間嫌気培養（CO₂ : 10.0%, H₂ : 10.0%, N₂ : 80.0%）した。次いで唾液を添加していないbuffered McBain semidefined mediumにて14時間同様に嫌気培養した。培養終了後、PMバイオフィームが形成された各試料をCysteine Peptone Water（CPW）2 mlに浸漬し、90秒間の超音波振動（Transsonic T780, Elma electric GmbH, Stuttgart, Germany）下でPMバイオフィームを試料から剥離したのち、30秒間の試験管ミキサー（Vortex Tube mixer VTX-3500, BDL, Czech Republic）で分散した。その後、CPWにて段階希釈し、Tryptic soy agar blood plateに50 μL播種し、同一の嫌気条件下37°Cで4日間培養して生菌数を算定し、試料1 mm²当たりの生菌数平均値と標準偏差を算出した。得られた1 mm²当たりの生菌数を対数変換し、logCFU/mm²として分析を行った。

5) バイオフィームの表面観察

試料表面のPMバイオフィームを0.01 Mリン酸緩衝生理食塩水中に30秒間浸漬し、0.1 Mカコジル酸緩衝液で30秒間洗浄を行い、0.1 Mカコジル酸緩衝液と1%グルタールアルデヒドの混合液中に1時間浸漬して固定した。その後、0.1 Mカコジル酸緩衝液で2回（それぞれ30秒間）洗浄した。次いで段階的に50, 70, 80, 90および100%のエタノール中に室温で15分ずつ浸漬した後、さらに100%エタノールに交換して15分間浸漬後、最終的に酢酸イソアミルに浸漬して臨界点乾燥用

の試料とした。

臨界点乾燥した試料を真鍮製の試料台にカーボンテープで固定し、試料表面に厚さ 200 Å の白金蒸着後、走査電子顕微鏡 (SEM ; JSM-820, 日本電子, 東京) を用いて加速電圧 5.0 kV で観察した。

6) 統計学的分析

それぞれの実験で得られた値に対して、正規性の検定を行ったところ、11 項目中 8 項目が正規分布に従うことが確認され、その他の項目も分布が正規分布に近いことから、平均値と標準偏差を求め、One-way ANOVA, その後の検定として Tukey の多重比較検定を行った。また、生菌数と表面性状との関連について Pearson の相関係数を求めた。なお、有意水準は 5% とした。これらの一連の統計解析には IBM SPSS Ver. 20.0 (日本 IBM, 東京) を使用した。

結 果

1. 中心線平均粗さ

接触式表面形状機で測定した各試料の Ra を Fig. 1 に示した。GL では 0.007 (標準偏差 : ± 0.0002) μm , RS 群における Ra は, Zr は 0.055 (± 0.0065) μm , VB は 0.153 (± 0.0273) μm , HAP は 0.152 (± 0.0255) μm , Pd は 0.201 (± 0.0270) μm , UB は 0.370 (± 0.0591) μm , CR は 0.249 (± 0.0418) μm であった。一方, MS 群

においては, Zr は $0.024 (\pm 0.0030) \mu\text{m}$, VB は $0.052 (\pm 0.0131) \mu\text{m}$, HAP は $0.025 (\pm 0.0070) \mu\text{m}$, Pd は $0.024 (\pm 0.0052) \mu\text{m}$, UB は $0.049 (\pm 0.0068) \mu\text{m}$, CR は $0.038 (\pm 0.0077) \mu\text{m}$ であった. GL を除く 6 材料の MS 群は $0.024-0.052 \mu\text{m}$ とばらつきも少なく RS 群と比較して有意に低い値であった ($p < 0.05$). RS 群は全ての試料で $0.055-0.370 \mu\text{m}$ とばらつきが大きく, 特にレジン系の UB と CR は Ra が大きかった. RS 群において, GL と比較して, VB, HAP, Pd, UB, CR の Ra 値は有意に高かった ($p < 0.05$). Zr では, 有意な差は認められなかった ($p > 0.05$). MS 群では, GL と比較して, Zr, VB, HAP, Pd, UB および CR の Ra 値に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$).

2. 接触角

各試料表面の蒸留水およびジヨードメタンに対する接触角を Fig. 2 に示した. 各試料に対する接触角は, RS 群, MS 群ともに GL を除いてジヨードメタンよりも蒸留水が高い値であった. GL の接触角は蒸留水では $14.7 (\pm 3.8)^\circ$, ジヨードメタンでは $50.5 (\pm 1.8)^\circ$ であった. また, 各試料の RS 群での蒸留水の接触角は, Zr は $73.8 (\pm 3.0)^\circ$, VB は $69.1 (\pm 3.6)^\circ$, HAP は $66.5 (\pm 1.7)^\circ$, Pd は $90.6 (\pm 1.7)^\circ$, UB は $94.7 (\pm 5.0)^\circ$, CR は $87.1 (\pm 2.6)^\circ$ であった. ジヨードメタンは, Zr は $45.8 (\pm 2.0)^\circ$, VB は $52.4 (\pm 2.2)^\circ$, HAP は $49.6 (\pm 1.7)^\circ$, Pd は $51.0 (\pm 2.2)^\circ$, UB は $39.9 (\pm 3.4)^\circ$, CR は $36.1 (\pm 3.4)^\circ$ であった. 一方, MS 群での蒸

留水の接触角は, Zr は 78.5 (±2.9) °, VB は 73.7 (±2.9) °, HAP は 76.3 (±4.2) °, Pd は 97.7 (±4.0) °, UB は 85.5 (±2.6) °, CR は 75.7 (±3.7) °であった. ジョードメタンは, Zr は 47.9 (±1.3) °, VB は 50.0 (±1.7) °, HAP は 46.2 (±2.2) °, Pd は 47.4 (±1.8) °, UB は 40.9 (±3.3) °, CR は 49.0 (±2.3) °であった. 蒸留水に対する接触角は, 全ての試料で GL と比較して有意に高い値であり ($p<0.05$), ジョードメタンに対する接触角は, UB の RS 群と MS 群, CR の RS 群で GL と比較して有意に低い値を示した ($p<0.05$).

3. 表面自由エネルギー

各試料の SFE を Fig. 3 に示した. GL は 70.5 (±2.2) mN/m で, GL を除いた試料の RS 群の SFE は, Zr は 40.1 (±2.3) mN/m, VB は 39.6 (±2.8) mN/m, HAP は 41.9 (±1.8) mN/m, Pd は 33.9 (±1.7) mN/m, UB は 39.8 (±2.4) mN/m, CR は 41.6 (±2.2) mN/m であった. MS 群の SFE は, Zr は 37.7 (±1.8) mN/m, VB は 38.5 (±2.1) mN/m, HAP は 39.1 (±2.7) mN/m, Pd は 36.0 (±1.6) mN/m, UB は 39.4 (±2.2) mN/m, CR は 38.1 (±2.6) mN/m であった. GL を除いたすべての試料の SFE は 50 mN/m 以下であった. また, 各試料の RS 群と MS 群における SFE に有意差は認められなかった ($p>0.05$).

4. ゼータ電位

MS 群の各試料のゼータ電位を Fig. 4 に示した. GL は $-65.0 (\pm 0.5)$ mV, Zr は $-48.1 (\pm 0.5)$ mV, VB は $-39.0 (\pm 1.2)$ mV, HAP は $-43.5 (\pm 0.2)$ mV, Pd は $-55.9 (\pm 2.4)$ mV, UB は $-42.1 (\pm 0.3)$ mV, CR は $-58.8 (\pm 0.4)$ mV であった. GL と比較すると各試料は有意に高い値であった ($p < 0.05$).

5. 生菌数

各試料に付着した生菌数を Fig. 5 に示した. GL の生菌数は, $2.0 \times 10^6 (\pm 1.8 \times 10^5)$ CFU/mm² で, GL を除いた試料の RS 群の生菌数においては, Zr は $2.2 \times 10^6 (\pm 5.7 \times 10^5)$ CFU/mm², VB は $2.2 \times 10^6 (\pm 3.0 \times 10^5)$ CFU/mm², HAP は $3.9 \times 10^6 (\pm 8.1 \times 10^5)$ CFU/mm², Pd は $2.0 \times 10^6 (\pm 4.0 \times 10^5)$ CFU/mm², UB は $3.8 \times 10^6 (\pm 6.2 \times 10^5)$ CFU/mm², CR は $4.6 \times 10^6 (\pm 1.1 \times 10^6)$ CFU/mm² であった. 一方, MS 群においては, Zr は $4.6 \times 10^5 (\pm 1.7 \times 10^5)$ CFU/mm², VB は $7.4 \times 10^5 (\pm 2.1 \times 10^5)$ CFU/mm², HAP は $1.1 \times 10^5 (\pm 3.3 \times 10^5)$ CFU/mm², Pd は $1.7 \times 10^6 (\pm 4.1 \times 10^5)$ CFU/mm², UB は $2.8 \times 10^6 (\pm 8.6 \times 10^5)$ CFU/mm², CR は $3.0 \times 10^6 (\pm 5.3 \times 10^5)$ CFU/mm² であった. GL と比較すると, RS 群の HAP, UB および CR での生菌数が有意に高く, MS 群の Zr, VB および HAP は生菌数が有意に低い値であった ($p < 0.05$). Pd を除く全ての材料は RS 群と MS 群間で生菌数に有意差が認められた ($p < 0.05$). 中でも, MS 群の Zr, VB および HAP は顕著に低い生菌数を示した.

6. バイオフィルムの観察

MS 群の各試料に付着した PM バイオフィルムの観察像を Fig. 6 に示した。Zr と VB は付着細菌間に多くの空隙が認められ、他群と比較して細菌の付着量が少ないことが観察された。HAP は小さな細菌塊が多く存在し、それぞれの細菌塊の間に空隙が点在していた。Pd は細菌塊の間に大きな空隙が確認されたものの、他群と比較して細菌塊は大きく、厚みのあることが判明した。また、UB と CR については全体的に細菌が均等に付着している像が観察された。

7. 生菌数と表面性状との相関関係

生菌数と Ra, 接触角, SFE, およびゼータ電位との関係を Pearson の相関関係にて検討した (Table 2)。生菌数との相関性が認められたのは、RS 群のジョードメタンに対する接触角であり、相関係数が -0.814 ($p=0.03$) であった ($p<0.05$)。残りの表面性状因子は、生菌数との相関性が認められなかった ($p>0.05$)。

考 察

1. 方法について

デンタルプラークは複数菌種から構成される典型的なバイオフィルムである。バイオフィルムの形成は唾液の浮遊菌体がまず表面に付着し、その上に極めて薄い菌膜からなるマイクロコロニーを形成し、さらに菌が重なり、増殖・成長し、きのこ

状に成熟したバイオフィルムとなる。バイオフィルムの本態は、菌体外に合成される莢膜多糖体で糖衣 (glycocalyx) と呼ばれる。バイオフィルム形成細菌である *Actinomyces* 菌種, *Streptococcus* 菌種, *Propionibacterium acnes*, *Porphyromonas gingivalis* の細菌は菌体外多糖体 (EPS) を産出し, その内側で分裂・増殖あるいは凝集してコミュニティを形成し, 表面をフィルム状に被覆する。このような状態をバイオフィルムといい^{10,11}), 口腔内では数分で 1 μm 前後のバイオフィルムが表面を覆う²²). 細菌が歯面へ吸着する機序には, ファンデルワールス力, 静電氣的相互作用などの非特異的相互作用と菌体表層の糖タンパクなどによる特異的相互作用が考えられる。

これまでの *in vitro* のバイオフィルム研究では, 口腔内に近似したバイオフィルムを形成する為に, マイクロタイタープレートの底に形成させる方法²³⁻²⁵), 細菌や唾液の混合物を植菌として使用する方法^{26,27}), または人工口腔プラーク^{28,29}) などのバイオフィルムモデルが使用されてきた。今回, 我々が用いた Exterkate らが報告した PM バイオフィルムモデル²¹) は, 口腔内に存在する多種の細菌からなるバイオフィルムを作製することが可能であり, 一実験中で複数の独立したバイオフィルムの作製や処理に利用でき, また強固な付着を得ることも可能で, 異なった固相 (基質) を同時に使用できるほか, 薬剤の処理時間ならびに処理濃度を容易に調節できる特徴がある³⁰⁻³⁵). そのような条件を満たすバイオフィルムモデルは存在しなかった。Exterkate らは, 従来から使用されてきたバイオフィルムモデルに比べ, 2 つの点で

本モデルが優れていると述べている。1つ目は、従来モデルに比較して菌の固相へのアクティブな付着を得ることができる点である²¹⁾。既存のバイオフィームモデルは、バイオフィームの固相に対する付着がとても脆弱であるという欠点を持っている。2つ目は、形成されたバイオフィーム中の細菌叢が口腔内を反映している点である^{31,32)}。しかしながら、従来法では多種にわたる細菌を含む口腔内バイオフィームの培養や同定が困難であった。多菌種を含むバイオフィームと単一菌あるいは数種の菌のみを含有するバイオフィームでは、抗菌剤処理後のバイオフィームの挙動が異なっていることが報告されている²¹⁾。本研究では、1人の被験者からの唾液を採取し、滅菌グリセリンと混和後、 -80°C 保存することにより、実験ごとに同質のバイオフィームを作成した。

2. 中心線平均粗さと生菌数の関係

本研究では、表面粗さの違いによるプラーク付着性を見るために、カーボランダムポイントやホワイトポイントでの研磨を想定し、耐水研磨紙#600での研磨面を粗研磨のRS群とした。同じ粗さ耐水研磨紙を用いて研磨を行っても、材料の硬度によって、近似した粗さを得るのは困難なため、耐水研磨紙での研磨を統一し実験を行った。

その結果、各試料のRaは、MS群は低い値となったが、RS群では試料により大きな差が生じた。RS群のRaは標準偏差が大きかったが、MS群では標準偏差も小さく

なり、各材料のMS群のRa値は近似していた。一般的にRaの増加に対してプラークの付着量も増加すると、市丸ら⁴⁾、Filizら⁸⁾、Scaranoら¹⁸⁾は、報告している。一方、Bollenらは、0.2 μm以下のRa値は細菌付着に量的、質的な影響を与えないと報告し³⁶⁾、do Nascimentoらは、チタンとジルコニアに対する細菌付着はRaに影響しなかったと報告している³⁷⁾。しかし、Dorkhanらは、唾液コーティングの存在下では粗面に対しても細菌付着性が高く認められたと報告している³⁸⁾。また、コンポジットレジンに対する細菌の付着量については表面性状とは無関係であり、Yamamotoらは、レジン中のフィラーとの付着し易さが大きな影響を与えるとの報告があり³⁹⁾、Busscherらはコンポジットレジン上のバイオフィームは表面劣化が原因であり、バイオフィーム付着をさらに強固にし、金属材料のような伝導性材料は電子引力で細菌付着を増強するかもしれないと報告をしている¹⁹⁾。本研究結果において、Raと生菌数との相関性はRS群のRaと生菌数間に相関関係の有意差は認められなかったが、Raが大きいと生菌数も大きくなる傾向にあることが示唆された。また、Zr, VB, HAP, UBおよびCRのRS群とMS群間に有意差が認められたことから、研磨を行うことで細菌の付着を防げる可能性があることが示唆された。MS群では全試料のRaが小さかったため、相関性が低かったと考えられることから、Raが0.1 μm以下では他の因子が影響していると考えられた。したがって、Raが0.1 μm以上であると生菌数に影響する傾向があることが示唆された。

3. 接触角と生菌数の関係

蒸留水の接触角は, Zr, VB, HAPおよびPdはRS群よりMS群が高い傾向が認められた. UBとCRはRS群よりMS群が低い傾向であった. Wenzelは接触角に及ぼすRaの影響, すなわち粗面効果について論じ, 接触角が70°以上であると粗さにより接触角は見掛け上増加し, 70°以下で減少すると報告している⁴⁰⁾. これはUBとCRのレジジン系材料に当てはまり, 他の材料と比べてRS群はRa値が大きくなり, 蒸留水の接触角も高くなった. この結果はハスの葉の表面に存在する超微細な凹凸による撥水効果のようなロータス効果⁴¹⁾によるものと考えられる. また, BusscherらはRaが0.1 μm以内だと接触角はほぼ一定であったと報告している⁴²⁾. 接触角に影響する因子にはRaによって気孔率が増すために生じる疎水性の効果, 浸漬ぬれの開始, 材料表面分子の立体構造の変化に基づく表面エネルギー効果などが考えられる. 蒸留水とジヨードメタンに対する接触角および生菌数との相関性は, RS群のジヨードメタンは高い負の相関であった. これは, UBのRS群とMS群, CRのRS群がGLと比較するとジヨードメタンの接触角は有意に低く, 生菌数は有意に高い値であったことから, 親油性であるほど生菌数が高いことが示唆された. 一方, RS群の蒸留水, MS群の蒸留水およびジヨードメタンは相関係数の有意差は認められなかったことから ($p>0.05$), 接触角は生菌数に影響を与える因子としては低いものと考えられる.

4. 表面自由エネルギーと生菌数の関係

GLを除いたすべての材料のSFEは50 mN/m以下であったことから、Raにばらつきがあっても、SFEはほぼ同様の値を示すことが明らかになった。

SFEは、材料表面の濡れ性に関係し、接触角が小さければSFEは大きくなり、一般的には材料表面への物質の吸着力は大きくなる⁴³⁾。Wenzelや辻井の両者とも、粗い表面においては単位面積当たりのSFEは、粗くなることによる表面積の変化に応じて増大すると報告している^{40,44)}が、本研究ではSFEは粗さに対する大きな影響は認められなかった。固体表面の濡れ性は、材料のSFEとRaで決まり、単位面積当たりのSFEは表面張力 γ ($\text{Nm}^{-1}=\text{Jm}^{-2}$)として表され、小さいほど疎水性が大きい。固体のSFEは表面の官能基など化学構造に依存し、表面修飾などで変化させることができるという報告もある^{45,46)}。前述の理由から、RaはSFEに影響を与えないと示唆された。

van DijkらはSFEが高いとプラークがより付着し¹⁵⁾、そしてQuiynenらは、テフロンのSFEが20 mN/mであると細菌付着量が少なく、プラークの付着量はSFEよりもRaに影響されると報告している¹⁶⁾。本実験ではGLを除く試料のSFEが40 mN/m付近であったことから、試料表面のSFEを20 mN/mまで低下させることが可能であれば細菌付着性はSFEに影響すると考えられる。Ionescuらは長期培養したバイオフィルムよりも、初期付着の場合にSFEは細菌付着に影響されると報告している⁴⁷⁾が、本研究の培養時間が24時間であり初期付着を観察した実験ではないために、結果

に相違が認められたと考えている。本研究ではSFEと生菌数の相関性はRS群、MS群では有意差は認められなかった。したがって、SFEが各群とも近似しているにも関わらず生菌数に有意差が認められなかったことから、バイオフィーム形成には他の因子が影響している可能性があるという示唆された。

5. ゼータ電位測定と生菌数の関係

ゼータ電位はRaに影響するという報告が認められないため、本実験ではMS群のみで計測を行った。ゼータ電位とは、溶液中のコロイド粒子や固体表面の帯電状態を表す値であり、電場中の帯電粒子はそのまわりの電気二重層のゼータ電位に起因する電気力を受けて移動する。このゼータ電位を計測し歯科材料への細菌付着についての研究は行われている^{46,48-50)}が、未だ解明されていないことが多い。細菌は細胞膜表面に存在するタンパク質や糖鎖の影響により表面がわずかに負に荷電している。一方、付着表面も水中では負に帯電していることが多い。よって、細菌が負に帯電した表面に近づく際には、ファンデルワールス力と静電反発力の両方が働き、全エネルギーはそれらの和として表すことができる。中村らは、陶材およびレジンのゼータ電位は、歯冠用レジンが最も負に大きく、次いで床用レジンで陶材が低い値となり、細菌表面のゼータ電位の絶対値が小さいものほど吸着しやすくなり、材料のゼータ電位が負に大きい物ほど吸着菌数が多くなるという報告をしている⁴⁸⁾。また、歯科材料表面に対する口腔内細菌の吸着には静電的相互作用が明らかになり

ゼータ電位は歯科材料への口腔内細菌の吸着現象に重要な因子であると報告されている⁴⁸⁾。松田は、同符号で等価の電気二重層が接近する場合には、静電気相互作用は反発力として作用するが、非等価の場合には、その差が大きくなるにつれて相互作用は斥力型から引力型へ逆転すると報告している⁵¹⁾。また、Scaranoらは、ジルコニアは細菌付着が少なく、電気伝導率が影響すると報告している¹⁸⁾。本研究結果では、ゼータ電位と生菌数との相関の有意差は認められなかったが、中程度の負の相関の傾向があることが示唆された。歯科材料のゼータ電位が負に大きいほど吸着菌数が多くなる傾向があることが示唆された。

6. バイオフィルムの表面観察

MS群の各試料のPMバイオフィルムのSEM観察では、付着形態が歯科材料別に差が認められた (Fig. 6)。GL, UB および CR は細菌が試料全体に多く付着しているのが観察され、Zr および VB は、小さな細菌塊が全体に観察され細菌塊間での空隙が多かった。また、Pd は、他群と比較して厚みをもった大きな島状の細菌塊であった。生菌数と同様な結果が得られたが、付着形態が歯科材料別に違いが認められたことから、歯科材料表面の性状に影響していると示唆された。

現在まで歯科材料表面に対する細菌の付着性について多くの研究が行われてきた。その中で、Busscherらの歯面のSFEが50 mN/mより低い場合に細菌の付着は抑

制されるという報告¹⁷⁾があることから、我々は歯面ならびに歯科材料表面のSFEを低下させ、かつ耐酸性を付与することが可能な歯面改質剤を開発し、プラークの付着、形成、ならびに歯質脱灰を抑制してう蝕および歯周疾患を予防することを目的として研究を進めてきた⁵²⁻⁶⁰⁾。しかし、本研究ではGL以外の歯科材料のSFEが 50 mN/m以下にもかかわらず、生菌数に差が生じたことから、SFE以外の因子が関係すると考えられた。黒坂らはSFEを約 10 mN/mまで低下させた場合、プラーク付着が抑制されたと報告している⁵³⁾が、臨床では研磨操作のみでSFEを下げることは極めて困難であると考えられる。そのため、歯科材料表面に対して細菌の付着を抑制するためには、表面をより滑沢にする、またはSFEを低下させる表面改質を行う、あるいはゼータ電位が高い材料を選択することが重要であると考えられた。

結 論

各種歯科材料の表面粗さの違いに対する細菌の付着性について、口腔内に近似した環境を再現できる PM バイオフィルムモデルを用いて検討した結果、以下の結論を得た。

1. 歯科材料における PM バイオフィルム形成因子は表面粗さが影響する傾向があることが示唆された。
2. 鏡面研磨した歯科材料における PM バイオフィルム形成には、ゼータ電位が関与することが示唆された。

3. 接触角および表面自由エネルギーは PM バイオフィルム形成因子に影響を与える因子としては低いと考えられた.

4. MS 群の Zr は PM バイオフィルム付着能が低いことが示唆された.

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇切なる御指導と御校閲を賜りました神奈川歯科大学大学院歯学研究科クリニカル・バイオマテリアル講座 二瓶智太郎准教授に深甚なる謝意を表します。また、御校閲と御鞭撻をいただきました神奈川歯科大学大学院歯学研究科咀嚼機能制御補綴学講座 木本克彦教授、ならびに口腔機能成育歯科学講座 木本茂成教授、社会歯科学講座 山本龍生准教授に厚く御礼申し上げます。

さらに本研究の遂行にあたり終始御指導を賜りました神奈川歯科大学大学院歯学研究科微生物感染学講座 浜田信城教授、神奈川歯科大学大学院歯学研究科う蝕制御修復学講座 向井義晴准教授、富山 潔講師に深甚なる謝意を表します。

最後に本研究を御支援頂きました神奈川歯科大学大学院歯学研究科クリニカル・バイオマテリアル講座教室員各位に深く感謝致します。

本研究の一部は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成 24 年～平成 26 年）および科学研究費補助金基盤研究（C）（課題番号：25462973）による援助を受けたことを付記し、謝意を表します。なお、本研究で使用した材料および方法については利益相反がないことを付記します。

文 献

1. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow : oral bacterial adherence. J Bacteriol 175 : 3247-3252, 1993.
2. Ruby J, Barbeau J. The buccal puzzle : The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. Can J Infect Dis 13 : 34-41, 2002.
3. 中里剛一郎, 山内六男, 佐藤 勝, 加登基弘, 坪井和義, 中村義則, 並河 勇, 川野 襄二. 口腔内における各種床用材料に対する初期細菌付着に関する研究. 補綴誌 32 : 226-235, 1988.
4. 市丸俊夫, 斎藤設雄, 松崎愛一郎, 安藤良彦, 古川良俊. 各種歯科修復材およびフッ素樹脂のプラーク (*S. mutans*) 付着性に関する検討 (*in vitro*) . 歯材器 8 : 337-348, 1989.
5. 渡辺和志, 東 高史, 西田栄昭, 星原英吉, 大塚秀春, 辰巳順一, 申 基喆, 下島孝裕, 菊池寛高, 花澤重正, 山賀谷一郎, 中嶌 裕, 宮田 隆. ハイブリット修復材に対する *Porphyromonas gingivalis* の付着に関する検討. 日歯周誌 41 : 295-301, 1999.
6. 亀水忠宗, 柿本和俊, 小正 裕. アクリルレジン義歯上のバイオフィルム形成細菌. 歯科医学 71 : 49-58, 2008.

7. Poggio C, Arciola CR, Rosti F, Scribante A, Saino E, Visai L. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different restorative materials. *Int J Artif Organs* 32 : 671-677, 2009.
8. Aykent F, Yondem I, Ozyesil AG, Gunal SK, Avunduk MC, Ozkan S. Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *J Prosthet Dent* 103 : 221-227, 2010.
9. Egawa M, Miura T, Kato T, Saito A, Yoshinari M. *In vitro* adherence of periodontopathic bacteria to zirconia and titanium surface. *Dent Mater J* 32 : 101-106, 2013.
10. 奥田克爾. 口腔内バイオフィーム デンタルプラーク細菌との戦い ; 第1版, 医歯薬出版, 東京, 21-26, 2004.
11. 奥田克爾. 高齢者の静かなる暗殺者 口腔内バイオフィームとの戦い. 老年歯学 24 ; 85-89, 2009.
12. Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surface. *Methods Enzymol* 310 : 523-534, 1999.
13. Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Sakaue Y, Narisawa N, Senpuku H, Ohshima H, Terao Y, Okiji T. Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. *PLoS One* 10, 2015.

14. Van der Valk P, van Pelt AWJ, Busscher HJ, de Jong HP, Wildevuur CR, Arends J. Interaction of fibroblasts and polymer surfaces : relationship between surface free energy and fibroblast spreading. *J Biomed Mater Res* 17 : 807-817, 1983.
15. van Dijk J, Herkströter F, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J. Surface-free energy and bacterial adhesion. An *in vivo* study in beagle dogs. *J Clin Periodontol* 14 : 300-304, 1987.
16. Quiynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free-energy on planimetric plaque growth in man. *J Dent Res* 68 : 796-799, 1989.
17. Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AWJ, de Jong HP, Arends J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 48 : 980-983, 1984.
18. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks : in vivo Human study. *J Periodontol* 75 : 292-296, 2004.
19. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dental Res* 89 : 657-665, 2010.

20. 芹田枝里, 寺中文字子, 大橋 桂, 三宅 香, 清水統太, 原 健一郎, 山口紘章, 押川亮宏, 二瓶智太郎. 各種修復材料の表面粗さと表面自由エネルギーとの関連性. 神奈川歯学 50 : 20-28, 2015.
21. Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res* 44 : 372-379, 2010.
22. Frank RM, Steuer P. Transmission electron microscopy of plaque accumulations in denture stomatitis. *J Prosthet Dent* 53 : 115-124, 1985.
23. 柏原稔也, 弘田克彦, 市川哲雄, 寺田容子, 永尾 寛, 河野文昭. 義歯洗浄剤としての電解水の効果 : *in vitro* の *Candida albicans* バイオフィルムへの影響. 補綴誌 43 : 513-517, 1999.
24. Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 80 : 363-370, 2001.
25. 田村昌平. 2種混合培養における, う蝕原生細菌によるバイオフィルム形成に対する口腔レンサ球菌の影響. 口病誌 75 : 38-48, 2008.
26. Wilson M, Patel H, Noar JH. Effect of chlorhexidine on multi-species biofilms. *Curr Microbiol* 1998 ; 36 : 13-18.

27. MacBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of *in vitro* plaque ecosystems. *Antimicrob Agents Chemother* 47 : 3531-3538, 2003.
28. Deng DM, ten Cate JM. Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. *Caries Res* 38 : 54-56, 2004.
29. Hyati F, Okada A, Kitasako Y, Tagami J, Matin K. An artificial biofilm induced secondary caries model for *in vitro* studies. *Aust Dent J* 56 : 40-47, 2011.
30. Macbain AJ. Chapter 4 *in vitro* biofilm models : an overview. *Adv Appl Microbiol* 69 : 99-132, 2009.
31. Hung X, Exterkate RA, ten Cate JM. Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. *J Dent Res* 91 : 1130-1134, 2012.
32. Exterkate RA, Zaura E, Buijs MJ, Koopman J, Crielaard W, ten Cate JM. The effects of propidium monoazide treatment on the measured composition of polymicrobial biofilms after treatment with chlorhexidine. *Caries Res* 48 : 291-298, 2014.
33. 倉持江里香, 富山 潔, 熊田秀文, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 渡邊清子, 浜田信城, 寺中敏夫, 向井義晴. S-PRG 溶出液のポリマイクロナバイアルバイオフィルムに対する抗菌効果. *日歯保存誌* 57 : 414-420, 2014.

34. Tomiyama K, Mukai Y, Kumada H, Watanabe K, Hamada N, Teranaka T. Formation of subsurface dentin lesions using a polymicrobial biofilm model. *Am J Dent* 28 : 13-17, 2015.
35. Hasegawa H, Tomiyama K, Kumada H, Kawata A, Higashi K, Takahashi O, Hamada N, Mukai Y. Antimicrobial effect of carbamide peroxide against a polymicrobial biofilm model. *Am J Dent* 28 : 57-60, 2015.
36. Bollen CM, Papaioanno W, van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res* 7 : 201-211, 1996.
37. do Nascimento C, da Rocha Aguiar C, Pita MS, Pedrazzi V, de Albuquerque RF Jr, Ribeiro RF. Oral biofilm formation on the titanium and zirconia substrates. *Microsc Res Tech* 76 : 126-132, 2013.
38. Dorkhan M, Chavez de Paz LE, Skepo M, Svensater G, Davies JR. Effects of saliva or serum coating on adherence of *Streptococcus oralis* strains to titanium. *Microbiology* 158 : 390-397, 2012.
39. Yamamoto K, Ohashi S, Taki E, Hirata K. Adherence of oral streptococci to composite resin of varying surface roughness. *Dent Mater J* 15 : 201-204, 1996.
40. Wenzel, R.N. Resistance of solid surface to wetting by water. *Ind Eng Chem* 28 : 988-994, 1936.

41. 下村政嗣. 生物の多様性に学ぶ新世代 バイオミメティック材料技術の新潮流.
科学技術動向 110 : 9-28. 2010.
42. Busscher HJ, van Pelt AWJ, de Boer, de Jong HP, Arends J. The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids Surf* 9 ; 319-331, 1984.
43. 五十嵐崇恭, 広瀬大希, 金子守男, 五十嵐俊男, 吉成正雄. チタンコーティングしたアルミナ薄膜に対する *Porphyromonas gingivalis* の初期付着特性. 日口腔インプラント誌 21 : 311-318, 2008.
44. 辻井 薫. 超撥水と超親水 ; 初版, 米田出版, 千葉, 35-48, 2009.
45. 高原 淳. 固体表面の濡れ性—濡れやすさを決める二つのファクター. 現代化学 447 : 44-49, 2008.
46. 小林元康, 高原 淳. バイオミメティックなアプローチによるソフトマテリアルの濡れ性と摩擦特性の制御. 表面科学 31 : 276-282, 2010.
47. Ionescu A, Wutscher E, Brambilla E, Schneider-Feyrer S, Giessibl FJ, Hahnel S. Influence of surface properties of resin-based composites on *in vitro Streptococcus mutans* biofilm development. *Eur J of Oral Sci* 120 : 458-465, 2012.
48. 中村菜穂子. 補綴材料への口腔内細菌の吸着に関する実験的研究. 歯科学報 95 : 375-390, 1995.

49. 尾崎 均, 三宅達郎. ハイドロキシアパタイト—細菌間の表面ポテンシャルエネルギー. 歯科医学 57 : 475-497, 1994.
50. Satou J, Fukunaga A, Satou N, Shintani H, Okuda K. Streptococcal adherence on various restorative materials. J Dent Res 67 : 588-591, 1988.
51. 松田武久. 高分子表面の生体適合化 界面科学よりみたタンパク質吸着挙動. 高分子 32 : 654-659, 1983.
52. 萩原早紀子, 寺中敏夫, 熊田秀文, 好野則夫. フッ化炭素鎖を含む表面処理剤で改質したコンポジットレジンに対するプラーク付着性と脱離性. 日歯保存誌 38 : 1071-1081, 1995.
53. 黒坂のぶこ, 二瓶智太郎, 三橋早紀子, 熊田秀文, 梅本俊夫, 近藤行成, 好野則夫, 寺中敏夫. ポリフルオロアルキル基を有するイソシアナトシランカップリング剤で表面改質したコンポジットレジンのプラーク付着抑制効果. 日歯保存誌 43 : 1083-1089, 2000.
54. 黒坂のぶこ. ポリフルオロアルキルシランを用いた表面改質によるプラーク付着抑制. 日歯保存誌 44 : 389-400, 2001.
55. 尾本直大, 二瓶智太郎, 倉田茂昭, 近藤行成, 榎本貢三, 好野則夫, 寺中敏夫. リン酸エステル塩型ハイブリット界面活性剤によるエナメル質表面の改質効果(第1報)—新規ハイブリット界面活性剤の改質効果. 日歯保存誌 46 : 192-201, 2003.

56. 尾本直大, 二瓶智太郎, 倉田茂昭, 近藤行成, 榎本貢三, 好野則夫, 寺中敏夫.
リン酸エステル塩型ハイブリッド界面活性剤によるエナメル質表面の改質効果(第
2報) —改質溶液濃度の違いによる効果. 日歯保存誌 47 : 242-252, 2004.
57. 尾本直大, 二瓶智太郎, 倉田茂昭, 近藤行成, 榎本貢三, 好野則夫, 寺中敏夫.
リン酸エステル塩型ハイブリッド界面活性剤によるエナメル質表面の改質効果(第
3報) —改質溶液の pH の違いによる効果. 日歯保存誌 47 : 562-575, 2004.
58. 尾本直大, 二瓶智太郎, 倉田茂昭, 近藤行成, 榎本貢三, 好野則夫, 寺中敏夫.
リン酸エステル塩型ハイブリッド界面活性剤の改質効果—ハイドロキシアパタイ
トプレートに対する改質効果. 日歯保存誌 48 : 128-136, 2005.
59. Nihei T, Omoto N, Ohashi K, Kondo Y, Yoshino N, Teranaka T. Effect of enamel
surface modification by novel aqueous phosphate-type fluoride surfactants. Dent Mater J
32 : 83-87, 2013.
60. 森梨江, 大橋桂, 二瓶智太郎, 近藤行成, 好野則夫, 寺中敏夫. ハイドロキシ
アパタイトに対する新規リン酸エステル塩型ハイブリッド界面活性剤の改質効果.
日歯保存誌 53 : 182-190, 2010.

付図説明

Fig. 1. Surface roughness of dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$). The surface roughness of GL was $0.007 \mu\text{m}$. The surface roughness of RS group specimens were $0.055\text{--}0.370 \mu\text{m}$, and the surface roughness of MS group specimens except for GL were $0.024\text{--}0.052 \mu\text{m}$.

Fig. 2. Contact angle of dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$). The contact angle of RS and MS group with distilled water were significantly higher compared with that of GL ($p < 0.05$). The contact angle of RS and MS group with diiodmethane were not significantly different compared with that of GL ($p < 0.05$).

Fig. 3. Surface free energy of dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$). The surface free energy of GL was 70.5 mN/m . All specimens except for GL were under 50 mN/m .

Fig. 4. Zeta potential of GL and MS group on each dental material

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$). The zeta potential of GL was -65.0 mV. Zr, VB, HAP, Pd, UB and CR were significantly higher compared with GL ($p < 0.05$).

Fig. 5. CFU values of bacteria on dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$). Zr, VB, HAP, CR and UB had significant difference in colony forming unit between RS and MS ($p < 0.05$). Among them, Zr, VB and HAP were especially lower value than GL.

Fig. 6. Scanning electron micrographs of PM biofilms on MS group

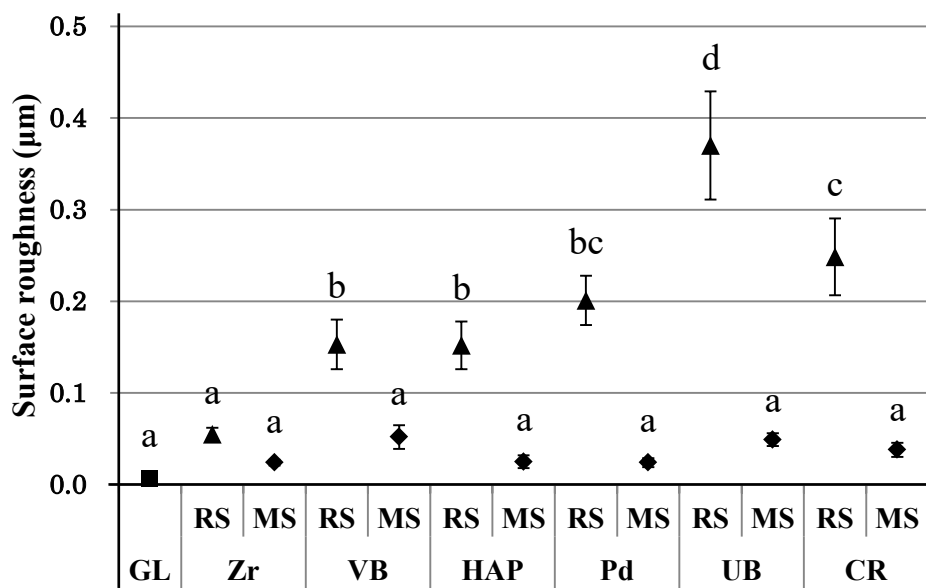
Zr and VB demonstrated a significant decrease of bacteria compared to the other groups.

Table 1 Dental materials used in this study

Sample	Manufacturer	Lot No.	Code
Glass cover slips	Menzel	004710183	GL
Lava™ Plus zirconia	3M Health Care	461045	Zr
VITABLOCS® Mark II for CEREC®/in Lab®	VITA	28300	VB
Apatite pellet APP-100	HOYA Technosurgical	10939210	HAP
CASTWELL M.C.	GC	1310293	Pd
URBAN	Shofu	021242 / 051104	UB
Clearfil Majesty ES2	Kuraray Noritake	2S0002	CR

Table 2 Correlation between surface characteristics and CFU

		Colony forming unit
RS group	Surface roughness	0.718 ($p=0.069$)
	Contact angle (distilled water)	0.325 ($p=0.478$)
	Contact angle (diiodomethane)	-0.814 ($p=0.026$)
	Surface free energy	-0.122 ($p=0.795$)
MS group	Surface roughness	-0.004 ($p=0.993$)
	Contact angle (distilled water)	-0.314 ($p=0.493$)
	Contact angle (diiodomethane)	-0.180 ($p=0.700$)
	Surface free energy	0.394 ($p=0.382$)
	Zeta potential	-0.582 ($p=0.170$)



RS : roughness surface MS : mirror surface (n=6)

Fig. 1. Surface roughness of dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

The surface roughness of GL was 0.007 µm. The surface roughness of RS group specimens were 0.055–0.370 µm, and the surface roughness of MS group specimens except for GL were 0.024–0.052 µm.

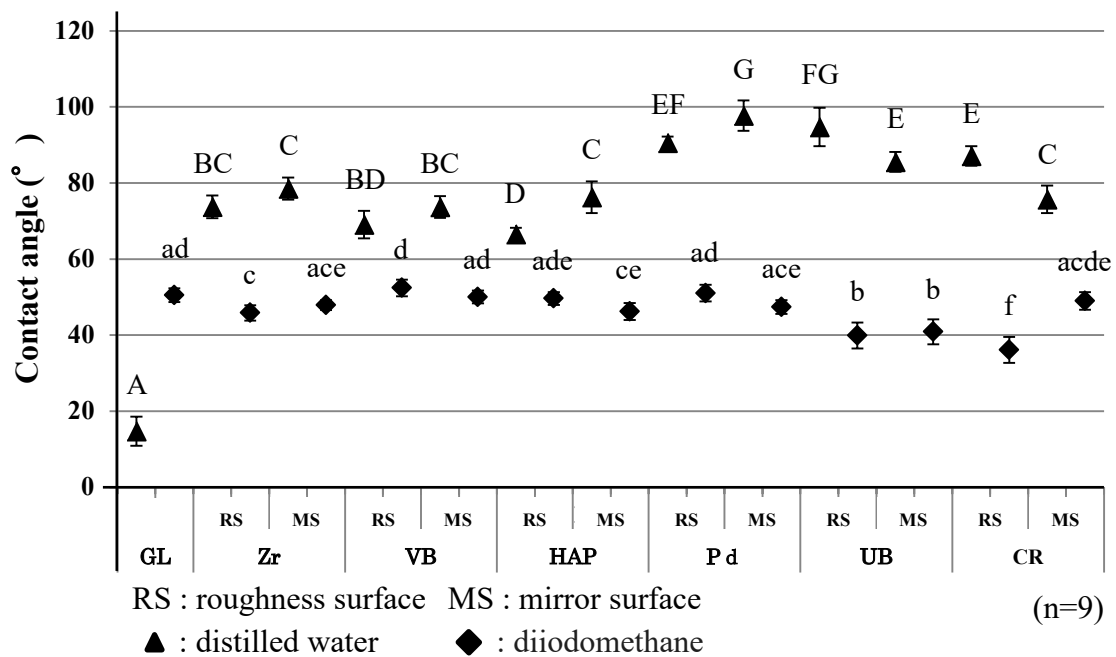


Fig. 2. Contact angle of dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

The contact angle of RS and MS group with distilled water were significantly higher compared with that of GL ($p < 0.05$). The contact angle of RS and MS group with diiodmethane were not significantly different compared with that of GL ($p < 0.05$).

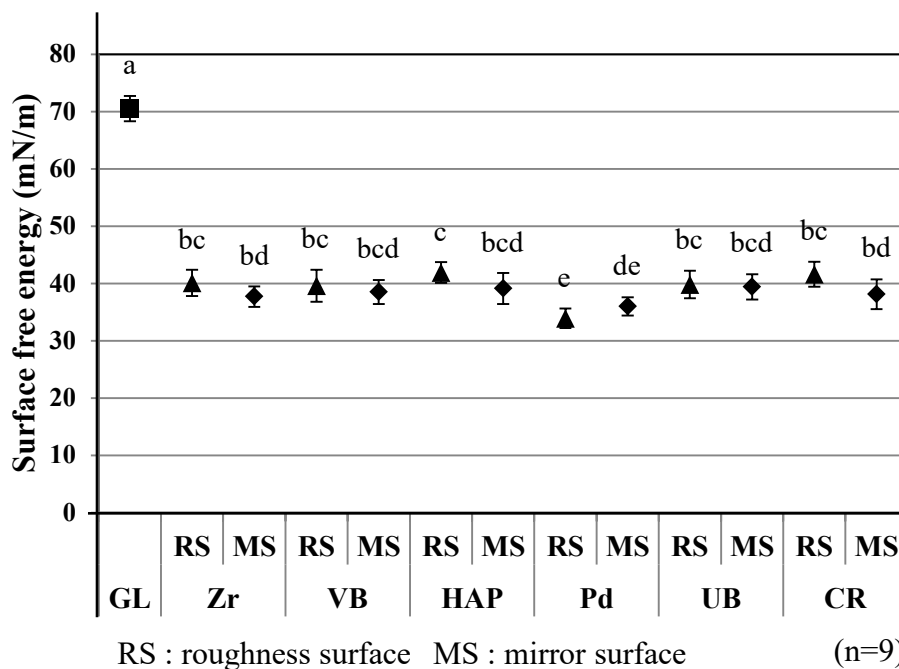


Fig. 3. Surface free energy of dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

The surface free energy of GL was 70.5 mN / m. All specimens except for GL were under 50 mN / m.

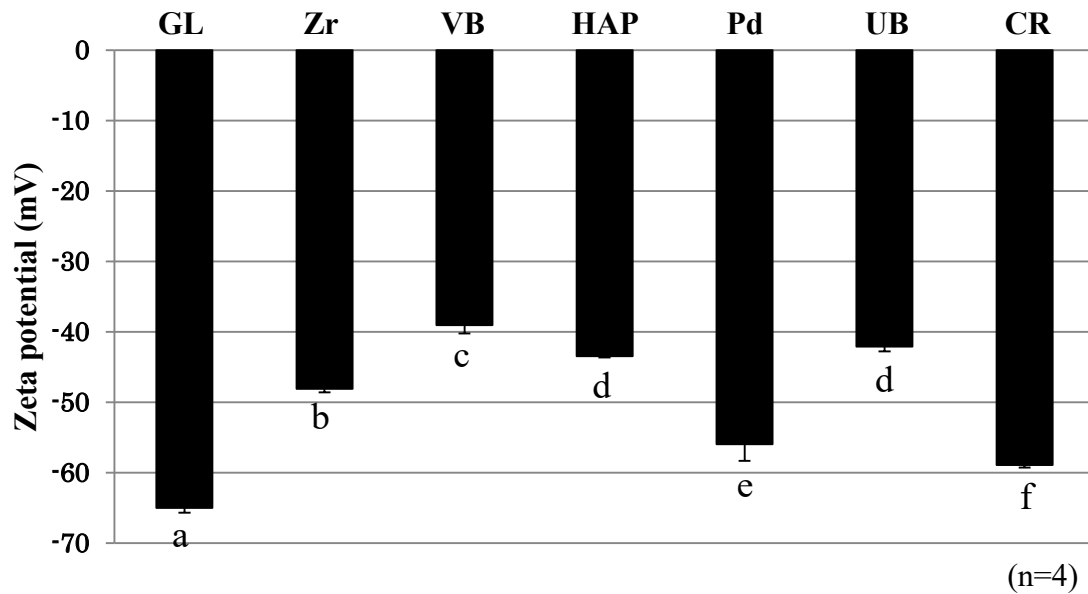


Fig. 4. Zeta potential of GL and MS group on dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

The zeta potential of GL was -65.0 mV. Zr, VB, HAP, Pd, UB and CR were significantly higher compared with GL ($p < 0.05$).

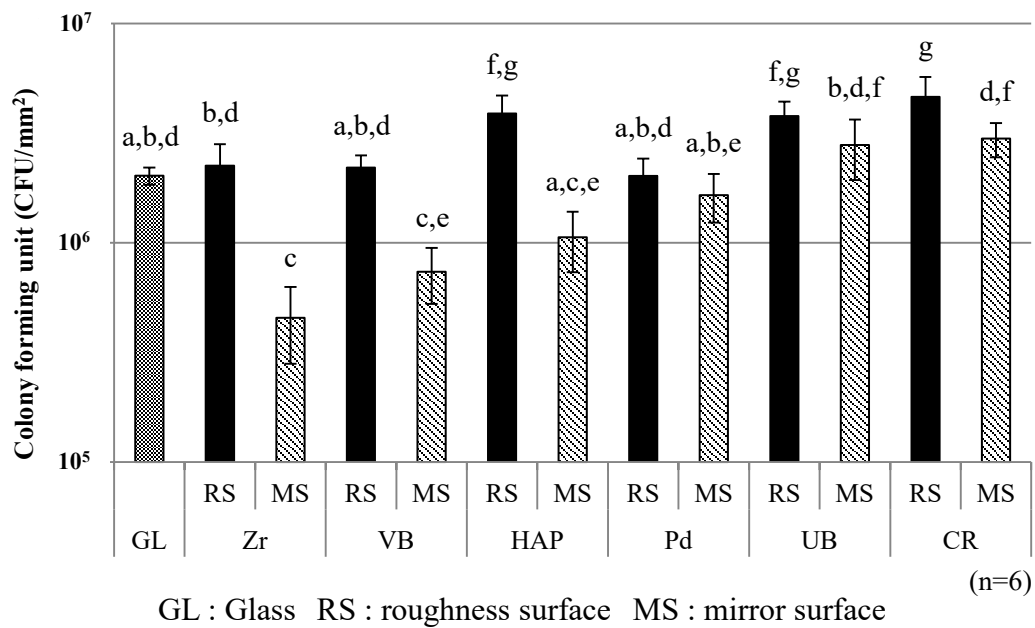


Fig. 5. CFU values of bacteria on dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

Zr, VB, HAP, CR and UB had significant difference in colony forming unit between RS and MS ($p < 0.05$). Among them, Zr, VB and HAP were especially lower value than GL.

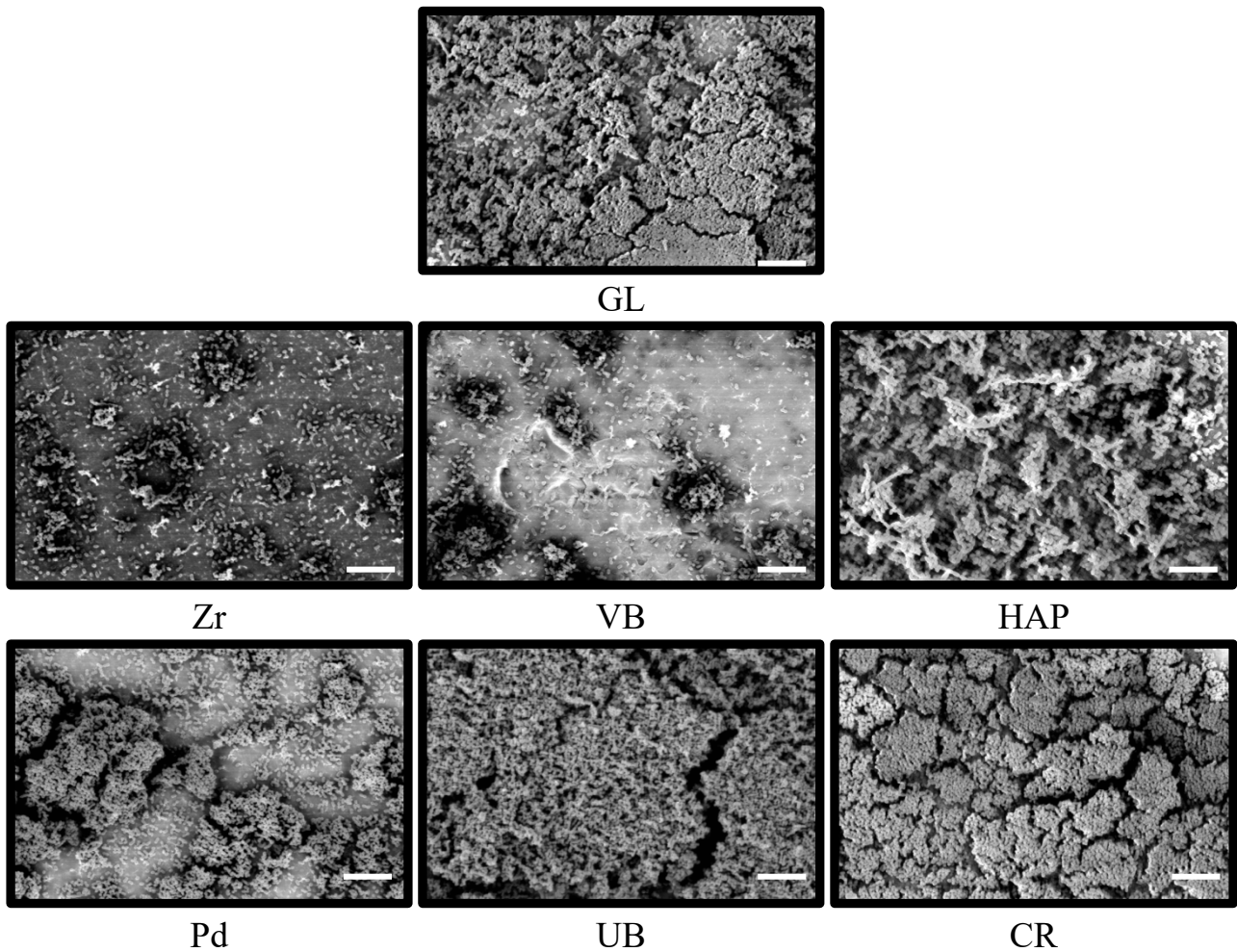


Fig. 6. Scanning electron micrographs of PM biofilms on MS groups

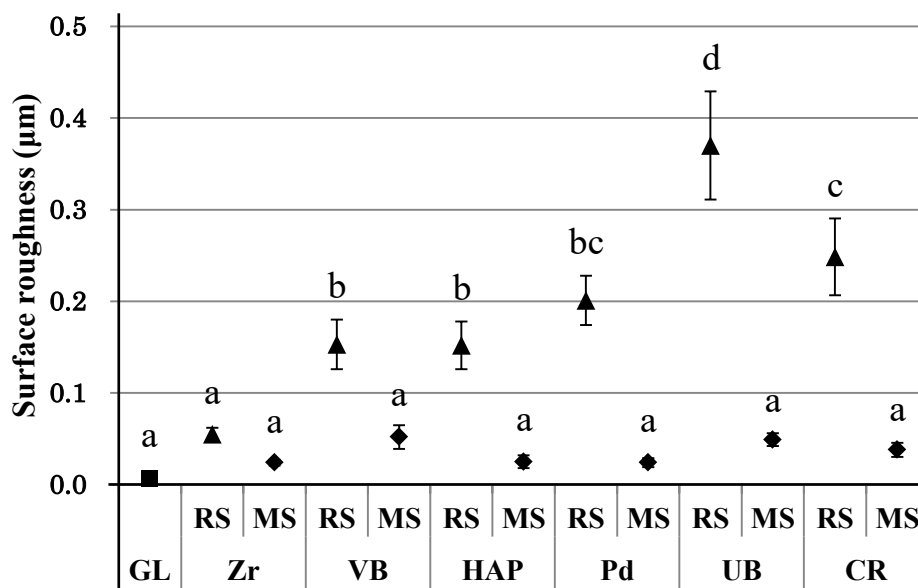
Zr and VB demonstrated a significant decrease of bacteria compared to the other groups. Bars, 10 μm .

Table 1 Dental materials used in this study

Sample	Manufacturer	Lot No.	Code
Glass cover slips	Menzel	004710183	GL
Lava™ Plus zirconia	3M Health Care	461045	Zr
VITABLOCS® Mark II for CEREC®/in Lab®	VITA	28300	VB
Apatite pellet APP-100	HOYA Technosurgical	10939210	HAP
CASTWELL M.C.	GC	1310293	Pd
URBAN	Shofu	021242 / 051104	UB
Clearfil Majesty ES2	Kuraray Noritake	2S0002	CR

Table 2 Correlation between surface characteristics and CFU

		Colony forming unit
RS group	Surface roughness	0.718 ($p=0.069$)
	Contact angle (distilled water)	0.325 ($p=0.478$)
	Contact angle (diiodomethane)	-0.814 ($p=0.026$)
	Surface free energy	-0.122 ($p=0.795$)
MS group	Surface roughness	-0.004 ($p=0.993$)
	Contact angle (distilled water)	-0.314 ($p=0.493$)
	Contact angle (diiodomethane)	-0.180 ($p=0.700$)
	Surface free energy	0.394 ($p=0.382$)
	Zeta potential	-0.582 ($p=0.170$)



RS : roughness surface MS : mirror surface (n=6)

Fig. 1. Surface roughness of dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

The surface roughness of GL was 0.007 µm. The surface roughness of RS group specimens were 0.055–0.370 µm, and the surface roughness of MS group specimens except for GL were 0.024–0.052 µm.

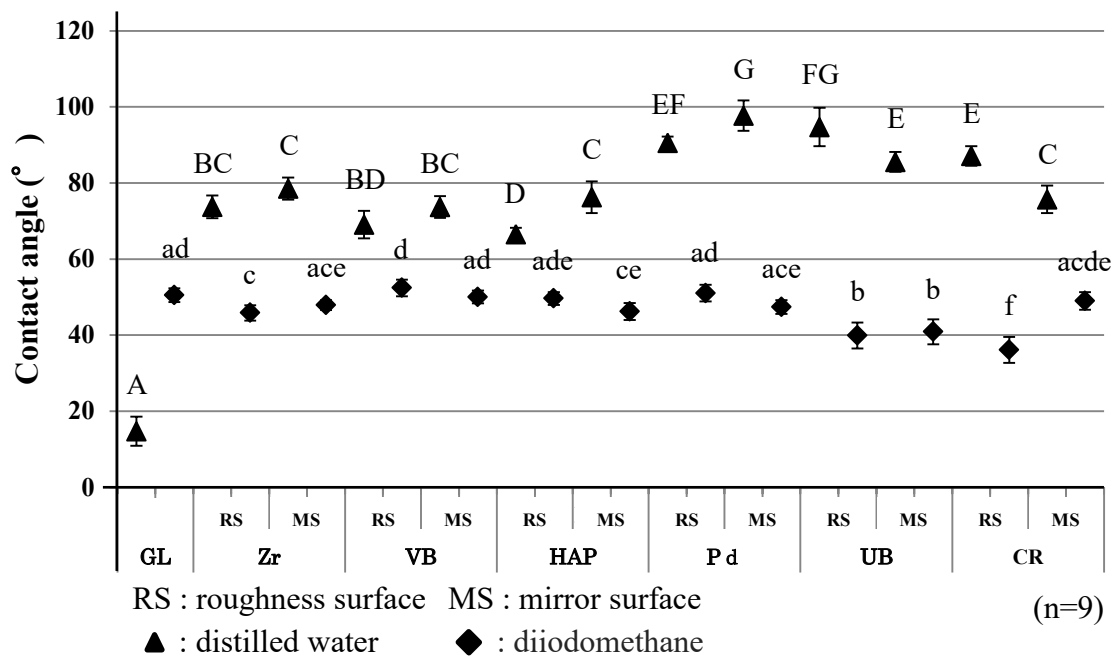


Fig. 2. Contact angle of dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

The contact angle of RS and MS group with distilled water were significantly higher compared with that of GL ($p < 0.05$). The contact angle of RS and MS group with diiodmethane were not significantly different compared with that of GL ($p < 0.05$).

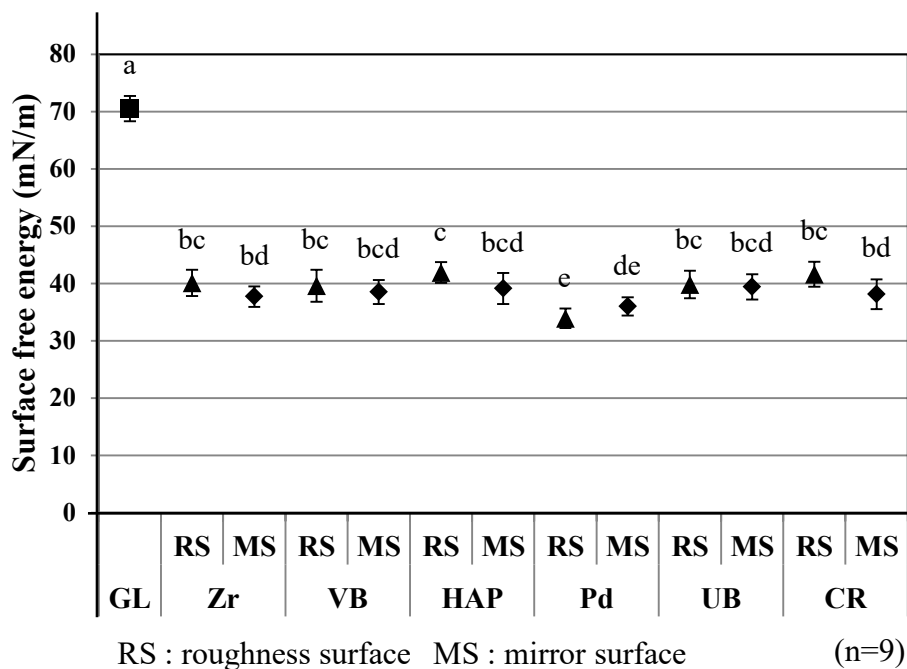


Fig. 3. Surface free energy of dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

The surface free energy of GL was 70.5 mN / m. All specimens except for GL were under 50 mN / m.

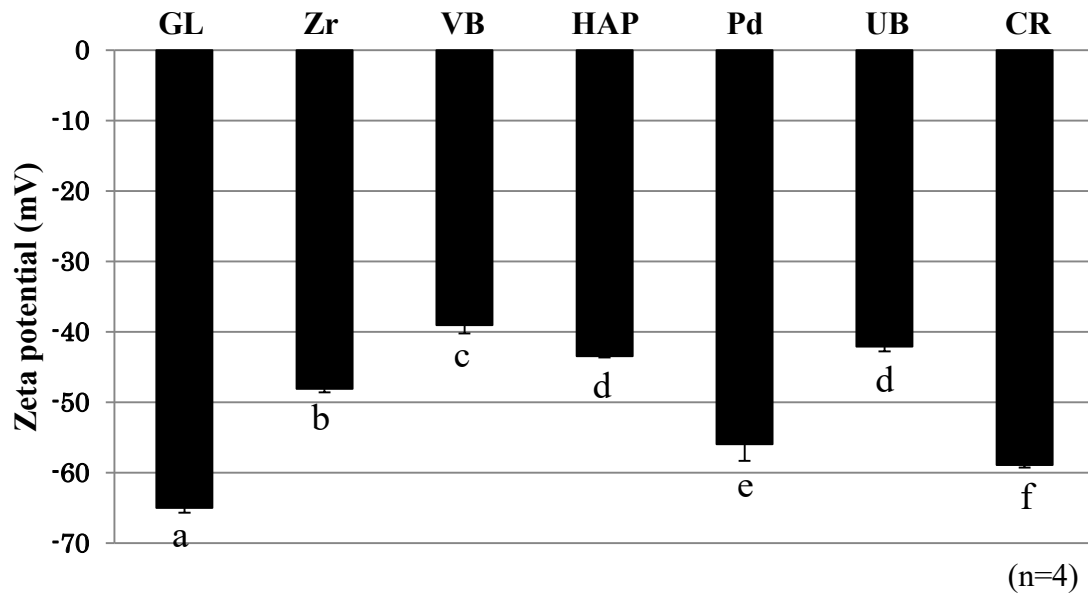


Fig. 4. Zeta potential of GL and MS group on dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

The zeta potential of GL was -65.0 mV. Zr, VB, HAP, Pd, UB and CR were significantly higher compared with GL ($p < 0.05$).

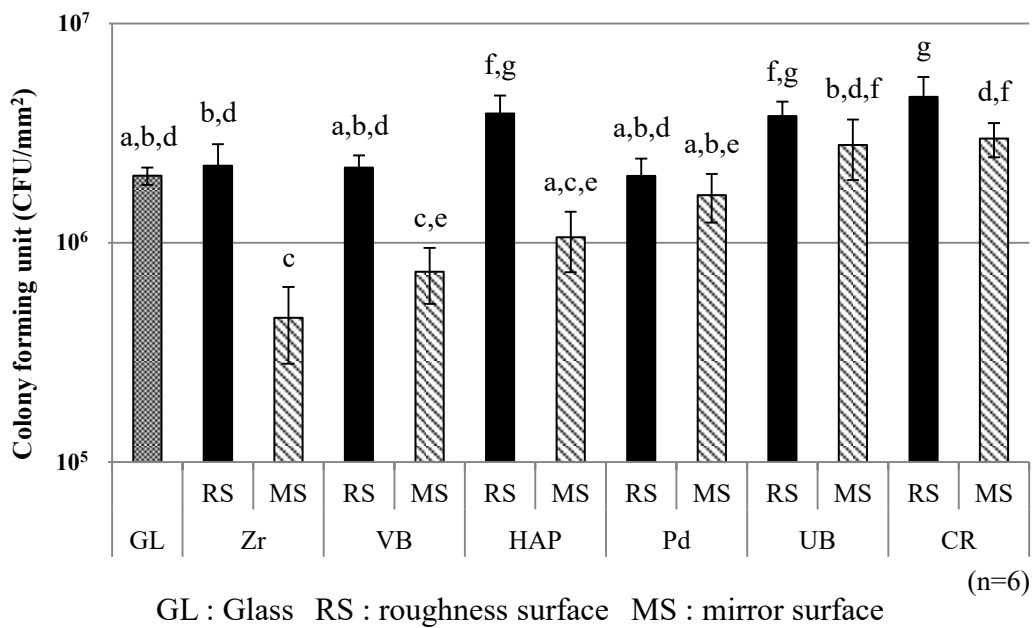


Fig. 5. CFU values of bacteria on dental materials

There was no significant difference with the bars labeled with the same letters in each dental materials (One-way ANOVA and Post-Hoc Tukey's multiple comparison tests, $p < 0.05$).

Zr, VB, HAP, CR and UB had significant difference in colony forming unit between RS and MS ($p < 0.05$). Among them, Zr, VB and HAP were especially lower value than GL.

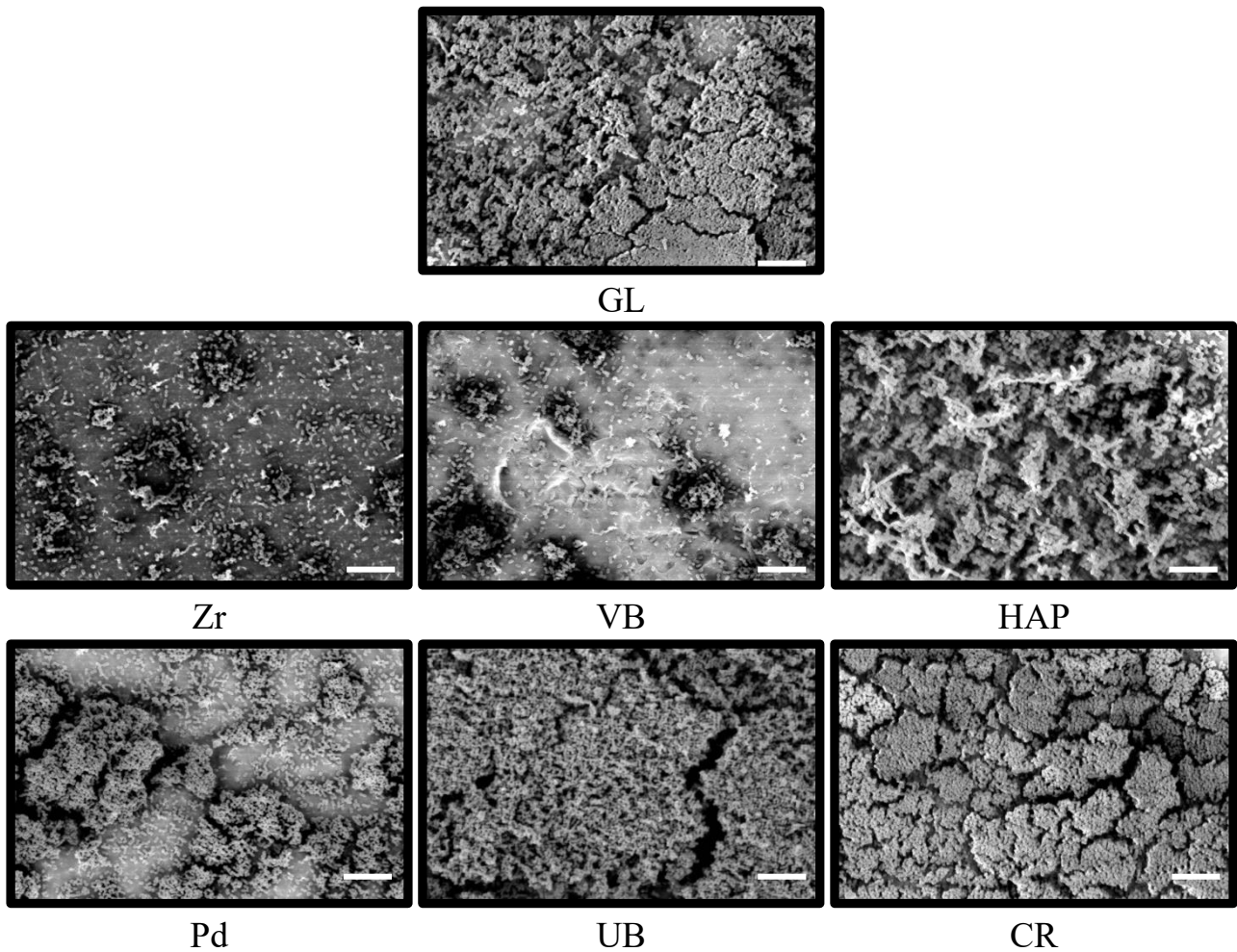


Fig. 6. Scanning electron micrographs of PM biofilms on MS groups

Zr and VB demonstrated a significant decrease of bacteria compared to the other groups. Bars, 10 μm .