

Title	種々の口腔細菌バイオフィルムに対するEr : YAGレーザーの影響に関する基礎的研究
Author(s)	勝本, 哲史
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47615">https://hdl.handle.net/11094/47615</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	かつもとてっし 勝本哲史
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 21068 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	種々の口腔細菌バイオフィームに対する Er : YAG レーザーの影響に関する基礎的研究
論文審査委員	(主査) 教授 恵比須繁之  (副査) 教授 川端 重忠 助教授 秋山 茂久 講師 田中 宗雄

## 論文内容の要旨

### 【研究目的】

口腔感染症の多くは、オーラルバイオフィームに起因する感染症である。バイオフィーム細菌は化学的コントロールに抵抗性を示すため、バイオフィームの排除・抑制には、急性期を除いて機械的コントロール法が用いられてきた。しかし、機械的除去が困難な部位に形成されたバイオフィームは、口腔感染症の難治化・慢性化を引き起こす原因となる。このようなバイオフィームに対しては、従来の機械的コントロール法とは着想を異にしたバイオフィームの排除・抑制法の開発が必要である。一方、Er : YAG レーザーが根管内の残存バイオフィームに対して有用であったという臨床報告があるが、レーザー照射のバイオフィームへの影響に関する基礎的なエビデンスはほとんど存在しない。そこで本研究では、種々の口腔細菌の単一細菌バイオフィームモデルに対するレーザーの影響を検索することにより、レーザーのバイオフィーム排除・抑制法としての有用性およびその作用機序について考察した。

### 【材料および方法】

#### 1. 各種口腔細菌によるバイオフィームモデルと Er : YAG レーザーの照射

グラム陽性細菌である *Enterococcus faecalis* SS497、*Streptococcus mutans* MT8148、*Actinomyces naeslundii* ATCC19246、*Propionibacterium acnes* ATCC11827、*Lactobacillus casei* ATCC4646、グラム陰性細菌である *Fusobacterium nucleatum* 1436、*Porphyromonas gingivalis* 381、*Eikenella corrodens* 1073、*Prevotella nigrescens* ATCC33563 の計 9 菌種 9 菌株を供試した。ハイドロキシアパタイト (HA) ディスク上に、直径 2 mm の穴を開けた粘着シールを貼付し、modified Robbins device (MRD) を用いて HA 表面に単一細菌種バイオフィームを形成した。Er : YAG レーザー (波長 2,936 nm) は、出力を 20、40、あるいは 80 mJ (n=10) に設定し、10 pps、照射時間 10 秒、焦点距離 3 mm で使用した。また、レーザー非照射のディスクをコントロール群 (n=10) とした。

#### 2. 残存したバイオフィーム中の生菌数の定量と微細形態学的観察

HA ディスク表面のバイオフィーム試料は、マイクロチップアプリケーションター® (GC) で採取した後、超音波処理により拡散させ、細菌培養法にて生菌数を定量した。コントロール群とレーザー照射群間の統計学的有意差の検定には、Student t-test (p<0.05) を用いた。また、各群のレーザー照射前・後の HA ディスクの一部は浸漬固定し、脱水後、置換、凍結乾燥、白金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 下で観察した。

### 3. バイオフィーム中の生菌と死菌に関する3次元的観察

直径 6 mm のセルロイドディスクを MRD に装着し、9 供試細菌の菌液をそれぞれ灌流させた。そして、共焦点レーザー顕微鏡 (CLMS) 観察で厚さ 50  $\mu$  m 以上の単一菌バイオフィームがみられた細菌種を用いて、40 mJ、10 秒間でレーザー照射した後、Live/Dead<sup>®</sup> (Invitrogen、アメリカ) にて染色し、CLMS 観察を行った。

#### 【結果】

#### 1. レーザー照射後に生存したバイオフィーム細菌の検索

*E. faecalis* と *P. acnes* の生菌数は、コントロール群と 20 mJ 照射群では有意な差はみられなかったが、40 および 80 mJ 照射群では有意に減少した。*A. naeslundii* と *S. mutans* は、全ての照射群で有意に生菌数が低下した。一方、*L. casei* のバイオフィームでは、いずれの照射群においてもコントロール群と比較して有意差は認められなかった。

*F. nucleatum*、*P. gingivalis*、*E. corrodens*、*P. nigrescens* のグラム陰性菌種では、全照射群で生菌数が有意に減少した。

#### 2. レーザー照射後の細菌バイオフィームの微細形態学的観察

*P. acnes* のバイオフィームでは、コントロール群とレーザー照射群間で明確な形態的相違がみられなかったが、他の 8 種の細菌では、バイオフィーム表層の菌体細胞に菌体輪郭の消失や不明瞭化といった形態的变化が観察された。*L. casei* に関しては、HA ディスク表面に脱灰層が観察され、脱灰層内部への細菌の侵入が認められた。

#### 3. バイオフィーム中の生菌と死菌に関する3次元的観察

形成されたバイオフィームの厚みが 70~80  $\mu$  m であった *S. mutans*、*A. naeslundii*、ならびに *F. nucleatum* は、いずれもレーザー照射により厚さが減少し、バイオフィーム表層には死菌が広く観察された。照射群は非照射群に比べ、バイオフィームの厚みが約 40  $\mu$  m 薄く、全層にわたり死菌が優位に観察された。

#### 【考察および結論】

Er:YAG レーザーは、*L. casei* を除く 8 細菌種のバイオフィームモデルに対して明確な抑制効果を示した。*L. casei* においては、バイオフィーム表層の細菌は他の菌種と同様死滅していたが、HA ディスク表層に形成された脱灰局内へ生菌が侵入しており、この HA ディスク脱灰層内へはレーザーの作用が及ばず、レーザー照射群と非照射群との間に残存生菌数に関する統計学的な有意差を認めなかったものと考えられる。

概して、グラム陽性菌に比べグラム陰性菌のバイオフィームに対して顕著な抑制効果がみられた。このことから、グラム陽性菌は陰性菌に比べレーザーに対する抵抗性が高いことが示唆された。この理由については不明であるが、菌体細胞壁の構造の相違から、グラム陽性菌が物理的ストレスに対する抵抗性が高いことが原因として考えられる。

本研究より、Er:YAG レーザーは、バイオフィームの排除・抑制に有用であり、その作用には、蒸散によるバイオフィームの剥離と、残存したバイオフィーム細菌に対する熱による殺菌効果の 2 種類があることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、慢性および難治性の口腔疾患の原因となるバイオフィームを排除する新たな手法として Er:YAG レーザーに着目し、単一細菌バイオフィームモデルを用いてレーザーの影響を検索し、その有用性および作用機序について考察したものである。

その結果、グラム陽性細菌である *Enterococcus faecalis*、*Streptococcus mutans*、*Actinomyces naeslundii* および *Propionibacterium acnes* と、グラム陰性細菌である *Fusobacterium nucleatum*、*Porphyromonas gingivalis*、*Eikenella corrodens* および *Prevotella nigrescens* が形成するバイオフィームに対し Er:YAG レーザーは有効であった。そして、その作用には蒸散によるバイオフィームの剥離と、残存したバイオフィーム細菌に対する殺菌作用があることが示された。一方、ハイドロキシアパタイトに脱灰層を形成する *Lactobacillus casei* のバイオフィームに対しては脱灰層内部までレーザーの作用は及ばないことが示された。

以上の研究成果は、口腔内の慢性疾患の治療や予防に対する歯科用レーザーの有用性を示唆する科学的知見であり、本研究は博士 (歯学) の学位授与に値するものと認める。