



| | |
|--------------|--|
| Title | 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液の歯内療法への応用の探索 |
| Author(s) | 島岡, 毅 |
| Citation | 大阪大学, 2024, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/95997 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (島岡 毅)

論文題名 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液の歯内療法への応用の探索

論文内容の要旨

〈 研究目的 〉

根尖性歯周炎は、う蝕に継発して発症する口腔のバイオフィルム感染症である。感染根管治療を成功に導くには根管内の無菌化が必要であり、そのためには機械的な清掃に加え、薬剤を用いた根管洗浄が重要な役割を果たしている。現在の歯科臨床で根管洗浄に高頻度に用いられる次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl) 溶液は強力な殺菌効果を有する反面、根尖孔外への溢出時に重篤な偶発症が起きることが報告されており、安全性に関しては問題がある。そこで本研究では、生体安全性と殺菌効果を併せ持つ新規薬剤である、要時生成型亜塩素酸イオン水溶液 (Matching Transformation System®: MA-T) に着目し、この薬剤を将来的に根管治療へ応用することを念頭に、MA-T の口腔バイオフィルムに対する殺菌作用と生体安全性を評価することで、その臨床有用性を検討した。

〈 材料および方法 〉

供試菌株

Enterococcus faecalis ATCC 29212株、*Parvimonas micra* GIFU 7745株、*Fusobacterium nucleatum* ATCC 23726株、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株およびヒト歯肉縁上プラークを使用し、浮遊細菌およびバイオフィルム形成における過程において MA-T が与える影響について検討した。歯肉縁上プラークを使用した研究は大阪大学大学院歯学研究科・歯学部および歯学部附属病院倫理審査委員会により承認の上、実施された (承認番号 H30 - E25)。

実験 1 浮遊細菌に MA-T が及ぼす影響

各種細菌の MA-T に対する薬剤感受性を検討するために、日本化学療法学会標準法に準じ、連続希釈法を用いて最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) 測定を行った。

実験 2 バイオフィルム形成に MA-T が与える影響

各種細菌およびプラーク希釈液を 37 °C、嫌気条件下で 3 日間培養し、ハイドロキシアパタイト (HA) ディスク上にバイオフィルムを形成させた。その後、MA-T を加え最終濃度を 100 ppm に調整した培養液に 4 日間作用させた。HA ディスク上に形成されたバイオフィルムの細菌量は、生菌数測定 (各群 n = 3) および共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて観察後、得られた画像を解析し、生菌率を算出した (各群 n = 6)。また、クリスタルバイオレット染色にて検出されるバイオフィルムの総量についても評価した (各群 n = 3)。対照群には滅菌蒸留水を用いた。

実験 3 形成されたバイオフィルムに MA-T が与える影響

各種細菌およびプラーク希釈液を 37 °C、嫌気条件下にて 1 週間培養し、HA ディスク上にバイオフィルムを形成させた。その後、MA-T (100 - 1000 ppm) を作用させ、実験 2 と同様にバイオフィルムの細菌量を生菌数測定 (*E. faecalis*、*P. micra* および *F. nucleatum* は各群 n = 3、ヒトプラークは各群 n = 4)、CLSM 観察 (各群 n = 6)、およびクリスタルバイオレット染色 (各群 n = 3) にて評価した。微細形態学的構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。陰性対照群として滅菌蒸留水、陽性対照群として 2.5% NaOCl 水溶液を使用した。

実験 4 感染根管に MA-T が与える影響の検討

ウシ抜去歯を *E. faecalis* 培養液に 4 週間浸漬して感染根管モデルを作製した。感染の状態は Brown - Brenn 染色にて確認した。MA-T (100 - 1000 ppm) を用いて根管洗浄後、生理食塩水にて薬液を十分に希釈し、ペーパーポイントを用いた鈎菌および H ファイルを用いた全周ファイリングにより、根管内に残存する生菌数を測定した (各群 n = 3)。また、象牙細管内の細菌を CLSM にて観察し、得られた画像解析から、生菌率を算出した (各群 n = 3)。微細形態学的構造は SEM を用いて観察した。陰性対照群として滅菌蒸留水、陽性対照群として 2.5%

NaOCl 水溶液を使用した。

実験 5 MA-Tの安全性の評価

ラット骨芽細胞、ヒト歯根膜線維芽細胞を 10% ウシ胎仔血清添加 Minimum Essential Medium α を用いて 5 日間培養し、その後、MA-T (100 - 1000 ppm) を作用させ、各細胞に与える影響を評価するため、細胞の形態観察、細胞内のアデノシン三リン酸 (ATP) 量測定を行った (各群 $n=3$)。陰性対照群として滅菌蒸留水、陽性対照群として 2.5% NaOCl 水溶液を使用した。

統計学的解析

実験 2 ~ 5 に関し、Shapiro - Wilk test を用いてデータが正規分布していることを確認した。2 群間の比較は Student's t -test、多群間の比較は One - way ANOVA および Tukey's HSD post hoc test を用いて統計解析をおこなった ($\alpha=0.05$)。

〈結果および考察〉

実験 1 浮遊細菌に MA-T が及ぼす影響

MA-Tの各種細菌に対する MIC と MBC はそれぞれ 3.9 ~ 15.6 ppm、3.9 ~ 31.3 ppm であった。供試したいずれの細菌に対しても MIC と MBC が近似した値を認め、抗菌薬として高い効果を持つことが示された。

実験 2 バイオフィーム形成に MA-T が与える影響

MA-T は生菌数測定において、バイオフィーム形成時の細菌の増殖を抑制した ($p<0.01$)。CLSM 観察では、供試した各菌株において対照群の生菌率は 90% 以上を示したが、MA-T 添加群では 20% 以下まで生菌率が減少し、生菌率に有意差を認めた ($p<0.01$)。クリスタルバイオレット染色によりバイオフィーム総量を定量すると、MA-T はバイオフィーム量を有意に抑制した ($p<0.05$)。MA-T と各種細菌を共培養し長時間作用させた際に MA-T は強力な抗バイオフィーム効果を示したことから、MA-T はバイオフィームに対し、時間依存的に作用する可能性が示された。これらの結果より、MA-T が根管洗浄剤だけでなく、将来的には根管貼薬剤としても有用である可能性が示唆された。

実験 3 形成されたバイオフィームに MA-T が与える影響

MA-T は供試したすべての形成されたバイオフィームにおいて、生菌数測定より、*E. faecalis* および *P. micra* のバイオフィームに対し、1 分間作用させることで陰性対照群と比べ生菌数を有意に減少させた ($p<0.05$)。*F. nucleatum* に対しても、MA-T はすべての濃度において、5 分間以上作用させることで生菌数を有意に減少させた ($p<0.05$)。CLSM 観察よりヒトプラーク、*P. gingivalis* および *F. nucleatum* では 30 分間 MA-T を作用させることにより 1 分間作用時と比べ、生菌率が 60% 以上減少し、すべての濃度の MA-T でバイオフィーム内の死菌が有意に増加した ($p<0.05$)。しかし、クリスタルバイオレット染色および SEM による微細形態学的観察より、バイオフィームの総量ならびにバイオフィームや菌体の構造に形態的变化は認められなかった。以上より、形成されたバイオフィームに対しては、バイオフィーム構造に変化を与えず、バイオフィーム細菌を殺菌することが示唆された。

実験 4 感染根管に MA-T が与える影響の検討

感染根管モデルにおいて、ペーパーポイント群では 1 分間根管洗浄をおこなうことで、陰性対照群と比較し根管内の細菌を有意に減少させた ($p<0.05$)。また、全周ファイリング群では、MA-T 500 ppm を用いて 5 分間根管洗浄をおこなうことで、対照群と比較して根管内の細菌を有意に減少させた ($p<0.05$)。また CLSM 観察においては 1 分間根管洗浄をおこなっても根管内の細菌は減少しなかったが、15 分間根管洗浄をおこなうことで陰性対照群と比較し、全濃度の MA-T で根管内細菌を有意に減少させた ($p<0.05$)。SEM 観察では、MA-T を用いた根管洗浄では滅菌蒸留水の場合と比較し、根管壁に付着しているバイオフィームが減少した。これらの結果より、MA-T を用いた根管洗浄により、根管内ならびに象牙細管内の細菌量が減少していることが明らかとなったが、ペーパーポイント群では薬剤の効果が過大評価されてしまう可能性が示された。

実験 5 MA-Tの安全性の評価

MA-T を各種細胞に作用させた結果、細胞の形態観察では作用前と変化を認めず、ATP 量は陰性対照群と比べ有意に低く、NaOCl 水溶液と比べて、高い値を示した ($p<0.05$)。従来から生体安全性が問題視されている NaOCl 水溶液に比べ、MA-T は細胞に影響が少なく、根管洗浄をはじめとする歯内療法へ応用できる可能性が示された。

〈結論〉

MA-T は、根管内バイオフィーム中の細菌を抑制し生体安全性も備えていることにより、新たな根管洗浄剤として臨床応用できる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 (島 岡 毅) | | |
|---|-----|-----------|
| | (職) | 氏 名 |
| 論文審査担当者 | 主 査 | 教授 林 美加子 |
| | 副 査 | 教授 川端 重忠 |
| | 副 査 | 准教授 野崎 剛徳 |
| | 副 査 | 講師 竹立 匡秀 |
| <p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、要時生成型亜塩素酸イオン水溶液 (MA-T) の歯内療法への応用を目指し、口腔バイオフィルムに対する抗菌効果と、生体安全性を評価したものである。</p> <p>その結果、MA-T が口腔バイオフィルム中の根尖性歯周炎に関与する細菌に対して殺菌効果を示し、従来から使用されている次亜塩素酸ナトリウム水溶液と比較して、宿主細胞に対する細胞傷害性が低いことが明らかとなった。</p> <p>以上の研究成果は、MA-T を歯内療法に応用する上で重要な知見を提供するものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p> | | |