

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 白井エミ(神奈川県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第433号
学位授与年月日 平成27年3月13日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Plasma Sterilization of Caries-infected Dentin Model with Reduced pH Method
(低pH法を用いたう蝕感染象牙質に対する大気圧低温プラズマの殺菌効果)
日本歯科保存学会雑誌, 第58巻, 第2号 101頁~108頁掲載 平成27年4月30日発行
論文審査委員 主査 教授 細矢 哲 康
副査 教授 前田 伸 子 副査 教授 桃井 保 子

内容の要旨

【緒言】

深在性う蝕において、歯髄が臨床的に健康であると診断できれば、露髄させない治療が重要である (Rickettsら 2006)。このために推奨されているのが歯髄温存療法 (Björndal 2008, Opalら 2014) であるが、現在の術式が煩雑で長期にわたるため、日常臨床に普及しているとは言い難く、残すべき多くの歯髄が抜髄となっている。歯髄温存療法が臨床にもっと根付くためには、感染象牙質の殺菌が、簡便かつより確実にできればならず、治療が待機的でなく即日完了することが重要である。現在、切削によらない非侵襲的な歯質の殺菌技術としては、歯科用レーザー、オゾン治療、薬剤療法が挙げられるが、その殺菌効果は必ずしも確実になく (Berrocalら 2005, Polydorouら 2012, Johanssonら 2009)、各々に短所があるため臨床応用は定着していない。このような状況下で、私達は現在、医療滅菌領域で広く用いられているプラズマの非侵襲的な殺菌能力に着目した。

熱負荷を与えることがない大気圧低温プラズマについて、近年医療応用に関する多くの研究が行われている (Heinlinら 2010, Daeschleinら 2012)。しかし、歯科領域での研究報告は少なく、評価法、殺菌効果いずれにおいても不十分である。濡れ環境である生体系において、低いpH環境におけるプラズマ照射が非常に高い実用的な殺菌力を示したという *in vitro* の実験結果が報告されており、生成された活性酸素種の環境を pH4.7 以下にする低 pH 法を用いることで、大腸菌に対して高い殺菌力を発揮する (Ikawaら 2010)。既に Yamazakiら (2011) は、プラズマと低 pH 法の組み合わせにより、各種口腔病原微生物の菌液およびバイオフィルムに対し、殺菌効果が得られることを報告している。本研究では、大気圧低温プラズマが歯髄温存療法における画期的治療につながることを目指し、プラズマと低 pH 法の組み合わせが、ヒト感染象牙質モデル菌における感染象牙質を効率的に無菌化しうるか検討した。

【材料と方法】

1. プラズマ発生装置

プラズマ装置 (試作モデル, 吉田製作所) である LF ジェットの回路を使用した (Ikawaら 2010, Yamazakiら 2011)。

2. 供試菌株および培養

Streptococcus mutans (*S. mutans*) (ATCC25175 株) を解凍し、Brain heart infusion Broth (Becton Dickinson and company, USA) (BHI) に入れ 37℃、一晚嫌気静置培養し、5% グルコース添加 Tryptic Soy Broth (Becton Dickinson and company, USA) (TSBD) を接種したのち、37℃ 6 時間好気振盪培養した。さらに、その菌液を TSBD に接種後、一

晩好気振盪培養し、 $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml としたものを前培養菌液とした。

3. ヒト感染象牙質モデル菌

ヒト抜去歯を使用した本研究のプロトコールは、鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認を得た（承認番号：856）。大白歯の咬合面象牙質中に直径 3 mm、深さ 3 mm の円柱窩洞を形成後、歯を蒸留水中に浸漬し、オートクレーブ滅菌した（121℃、15 分間）。その後、窩洞内を 40% 乳酸で 2 日間脱灰後 *S.mutans* の菌液（ 10^{6-7} CFU/30 μ l, TSBD, 5% CMC で調整）を 7 日間毎日接種し、37℃ 湿潤下で培養したものを感染モデル菌とした。

4. 殺菌試験

菌液を除去後、窩洞内を pH3.5 のクエン酸バッファーで洗浄した。感染モデル菌を次の 5 条件下で評価した。①プラズマ未照射群（ヘリウムのみ照射）、②～⑤プラズマ照射群（ヘリウムプラズマ照射：30 秒群、60 秒群、120 秒群、180 秒群。）全群 pH3.5 の条件下で実験し、180 秒群については、殺菌効果の pH 依存性を確認するために、pH バッファーの条件のみを変え、中性付近（pH6.5）での殺菌実験も行った。感染象牙質内の生菌数を確認するため、プラズマ照射前後に、スチールラウンドバー（ ϕ 0.8 mm : round bur）で感染象牙質内から象牙質を採取し、その切削片を BHI 培地に懸濁し、寒天培地上に塗抹後 2 日間培養し CFU/round bur を算出した。照射前の感染象牙質内の生菌数は全て $2.7 \pm 1.9 \times 10^5$ CFU/round bur であることを確認した。検出限界は 2 CFU/round bur である。

5. 統計解析

得られた値の解析には統計解析ソフト SPSS14.0 を使用した。各実験の多群間の比較として Kruskal-Wallis の検定、プラズマ照射前後の 2 群間の結果を Wilcoxon 検定で解析した（ $\alpha = 0.01$ ）。

【結 果】

大気圧低温プラズマは pH3.5 の環境下において、感染象牙質中の *S.mutans* の菌数を照射時間依存的に有意に減少させ、照射時間 180 秒では感染象牙質をほぼ完全に無菌化した（検出限界以下）。一方、pH6.5 の環境下においては、照射 180 秒後においても殺菌効果が見られず、プラズマを照射せず酸性環境下に置くだけの条件では、感染菌質は殺菌されなかった。

【考 察】

本研究では、Yamazaki ら（2011）が行った *in vitro* の用いた培地や細菌懸濁液の実験設定を一步進め、より臨床に近いう蝕感染象牙質モデルにおいて、う蝕病巣に対するプラズマ殺菌の有効性を評価した。今回、感染象牙質モデル菌において、この象牙質が極度に軟化しう蝕検知液で濃染すること、臨床におけるいわゆる“う蝕象牙質外層”であることを確認した。う蝕感染象牙質に対するプラズマの殺菌効果が、pH およびプラズマ照射時間依存的であった理由は、プラズマが照射されることで、プラズマ付近に活性種が発生し、これが低 pH のバッファー内部に取り込まれ、バッファー中の O_2^- ラジカルが HOO ラジカルに変換されるためと考えられる。このようにして、バッファー内で照射時間依存的に濃度の高まった HOO ラジカルが高い殺菌効果を示すというのが、私達の考える殺菌機序である。Ikawa ら（2010）は、 O_2^- ラジカルは低 pH 条件下でさらに HOO ラジカルに変換され（ $O_2^- + H^+ \rightleftharpoons HOO \cdot$ ）、高い殺菌効果を持つと考察しており、これは本研究における私達の考えと一致するものである。今回有効であった pH3.5 については、現在臨床で多用されているさまざまな接着材、酸処理剤、スミヤー層除去剤などと同等レベルであり、数分程度の殺菌に必要な照射時間程度では生体への影響が少ないと考えている。照射時間については、今回 180 秒という結果であったが、今後、プラズマ源の最適化により、供給する活性種の量を増やすことで無菌化に必要な時間を短くすることが可能と考えている。今後、様々な改良を加えることで、本法が歯髄温存療法における画期的な治療技術につながることを期待できる。

【結 論】

大気圧低温プラズマは、pH3.5 の環境下において感染象牙質中の *S.mutans* の菌数を照射時間依存的に有意に減少させ、照射時間 180 秒では感染象牙質を完全に無菌化した。

審査の結果の要旨

象牙質歯髄複合体の活性化あるいはバイオアクティブ材料による、う蝕象牙質の再生あるいは再石灰化を導くためには、感染象牙質の確実な殺菌が必要である。現行のレーザーやオゾンの利用、薬剤による殺菌効果は確実性を欠き臨床応用は定着していない。

近年、医療領域でのプラズマ滅菌法の応用が増加しており、医療材料表面の改質や処理ならびに滅菌・衛生管理などにおいては長い研究の歴史があり、既に広く実用化されている。発生熱を応用した生体組織への直接的使用も既に導入されている

るが、本研究で用いた大気圧低温プラズマにより生成される、フリーラジカル等の反応活性種の生体応用への研究は展開中であり、歯の硬組織への効果と影響を知る上では非常に重要な研究と思われる。本研究は、低 pH 環境におけるプラズマ応用が殺菌に有効であるとの報告から、ヒト感染象牙質モデル歯を用いて、プラズマと低 pH 法の組合せ応用による殺菌効果を評価する目的で行われた。

ヒト感染象牙質モデル歯は、窩洞内の象牙質を乳酸にて脱灰し *S.mutans* を感染させて作製した。低 pH 環境をクエン酸バッファで調整し、4 通りの照射時間で殺菌効果を観察した。殺菌状況は象牙質の残存菌数を測定することで判定した。

その結果、本研究では以下のことが明らかとなった。

1. pH3.5 環境下において、大気圧低温プラズマを感染象牙質に照射することで、照射時間依存的に *S.mutans* が有意に減少した。さらに照射時間 180 秒で、感染象牙質中の *S.mutans* は検出限界以下となった。
2. pH6.5 環境下において、180 秒間にわたりプラズマ照射を行っても殺菌効果は認められなかった。また感染象牙質を酸性環境下に保存しても、感染状況に変化は認められなかった。

本研究では、う蝕検知液に濃染し物理的強度も低下した、極めて臨床状況に類似したう蝕感染象牙質モデル歯を作製し、大気圧低温プラズマならびに低 pH 法を併用した殺菌効果を観察したことから、臨床への応用性が高い研究と考えられる。

大気圧低温プラズマを応用した短時間で効果的な感染象牙質の殺菌は、歯や歯髄の保存を目的に行われるう蝕象牙質の再生や再石灰化療法において、今後の臨床応用への可能性が十分に考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。