

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） 田 崎 達 也（三重県）
博士の専攻分野 博 士（歯 学）
学 位 記 番 号 甲 第 465 号
学位授与年月日 平成 29 年 3 月 14 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-treated Water Eliminates *Streptococcus Mutans* in Infected Dentin Model
(感染象牙質モデルにおけるプラズマ処理水の *Streptococcus mutans* の殺菌効果)
Dental Materials Journal 第 36 巻 4 号 422 頁～428 頁掲載 平成 29 年 8 月 4 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】

う蝕治療においては最小限の歯質侵襲が求められる。感染象牙質の非侵襲的除去には、現在、歯科用レーザー、オゾン、超音波、薬剤が用いられているが、殺菌の確実性が担保されていない。そこでわれわれは非侵襲的な滅菌方法として新たに開発した大気圧低温プラズマに着目し、前報において、酸性条件下でのプラズマ照射が、う蝕感染象牙質モデルにおける *Streptococcus mutans* に対して顕著な殺菌効果を有することを確認した。しかし、その効果発現には 180 秒間の照射が必要であり、かつチェアサイドに大型のプラズマ発生装置が必要であるなどの課題が残された。本研究は、これらの課題克服に向け、あらかじめ純水にプラズマを照射し調整したプラズマ処理水（PTW）が、前報のプラズマ直接照射と同等の殺菌力を有するか検討した。

【材料と方法】

1. 最小発育阻止濃度（MIC）および最小殺菌濃度（MBC）

PTW（80 μ l）を、pH 3.5 または pH 6.5 に調整したバッファー溶液（200 mM クエン酸ナトリウム）10 μ l と混合し、これに *S. mutans* 培養液 10 μ l を添加した。PTW のヒト体温（37℃）下での挙動を検討するために、37℃で 5 分間処理した PTW を *S. mutans* 培養液と混合し MIC と MBC を評価した。PTW との比較対照として、6%の NaClO 溶液の、25℃および 37℃下での MIC および MBC を評価した。

2. 感染象牙質モデルの作製

鶴見大学倫理審査委員会（承認番号 856）の承認のもと、18 本のヒト臼歯を使用した。咬合面う蝕を想定し咬頭頂から 3 mm の深さまで、直径 3 mm の円柱窩洞を形成した歯を蒸留水中でオートクレーブ（121℃、15 分間）で滅菌処理した。次いで、窩洞象牙質を 40%乳酸（30 μ l）で一定の深さまで脱灰した。調製した *S. mutans* 懸濁液 30 μ l を窩洞内に接種し、好氣的条件下、37℃で培養し、感染象牙質モデルを作製した。このうちの 3 歯を PTW の応用時間と殺菌効果の関係検証実験に割り当て、15 歯を窩洞の深さと殺菌効果の検証実験に割り当てた。

3. 感染象牙質モデルを用いた殺菌

感染象牙質モデルの窩洞を 30 μ l のバッファー溶液で 3 回洗浄した。pH 3.5 バッファー溶液応用前に、滅菌ラウンドバーを用いて窩洞から象牙質サンプルを深さ 0.8, 1.6, 2.4 mm で採取した。象牙質サンプルを採取したラウンドバーを 150 μ l の BHI 培地に浸漬し、30 秒間の超音波振動付加後に培地 100 μ l を寒天プレートに播種し、生菌数を計算した。

次に、pH 3.5 バッファー溶液 30 μ l を同じ窩洞内に 10 秒間応用した後、前述のバッファー応用前と同じ方法でサンプル採取、培養、生菌数の測定を行った。

その後、PTW (1 ml) を pH 3.5 バッファー 100 μ l と混ぜた混合物 30 μ l を同じ窩洞内に 10 秒間応用した。前述と同様に、サンプルを採取、培養、生菌数の測定を行った。全ての生菌数は、CFU/ ラウンドバーの単位で表した。

4. 統計分析

得られたデータは、IBM SPSS Statistics Version19 を用いて統計分析した。ウィルコクソンの符号順位検定 ($\alpha = 0.01$) を用いて、窩洞象牙質の同じ深さ間でデータを分析した。

【結 果】

1. *S. mutans* に対する PTW の抗菌活性 (MIC, MBC)

25°C, pH 3.5 条件下における PTW の MIC および MBC は、PTW ストック溶液の 1/40 希釈に相当した。一方 pH 6.5 条件下で抗菌活性は認められなかった。NaClO の MIC および MBC は、原液の 1/2,560 希釈 (23.4 mg/l) であった。37°C 条件下の PTW では抗菌活性は認められなかった。対照的に、NaClO は、37°C 条件下では 25°C 条件下と同じ MIC および MBC を示した。

2. PTW の各応用時間における殺菌効果

バッファー応用前において、生菌数は 10^{5-6} CFU/ ラウンドバーであった。バッファー応用前と応用後との間の生菌数に統計的な差は見られなかった。PTW を 10, 20, 30 秒間応用した後の生菌数はいずれも検出限界 (2.5 CFU/ ラウンドバー) 以下であった。

3. PTW の各窩洞象牙質深さにおける殺菌効果

バッファー応用前の生菌数は、0.8, 1.6, 2.4 mm 深さでそれぞれ $3.1 \pm 1.8 \times 10^5$, $5.6 \pm 3.2 \times 10^4$, $2.0 \pm 1.6 \times 10^4$ CFU/ ラウンドバーであった。バッファー応用後の生菌数は、深さ 0.8 mm で $2.2 \pm 1.0 \times 10^5$ CFU/ ラウンドバー、深さ 1.6, 2.4 mm で $5.4 \pm 2.6 \times 10^4$, $1.6 \pm 1.0 \times 10^4$ CFU/ ラウンドバーであった。バッファー応用前と応用後の生菌数との間に統計的な差はなかった。PTW を 10 秒間応用した後の生菌数は、深さ 0.8 mm で検出限界 (2.5 CFU/ ラウンドバー) 未満であり、1.6, 2.4 mm 深さで 3.0 ± 5.0 CFU/ ラウンドバーであった。バッファー応用の有無にかかわらず、PTW 応用後の生菌数との間に有意差が見られた。

【考 察】

プラズマの直接照射では、感染象牙質モデル内に密に繁殖した *S. mutans* を殺菌するのに 180 秒を要するが、PTW は、わずか 10 秒の応用で窩底から深さ 2.4 mm までの象牙質中の菌を、 10^5 CFU レベルから 10 CFU 以下に激減させる。これは、プラズマを低温下で純水に照射すると、純水中に強力な殺菌作用を有する活性種が蓄積し保存されるためである。PTW は口腔外で調整されるため、プラズマ照射時間を任意により長く設定できることから、本研究で調整した濃度より高い濃度設定も可能である。一方、生物学的安全性については、低温保存された PTW 中の活性種は、人体温度下におかれると瞬時に水に分解してしまう点を利点として挙げたい。また、口腔内で窩洞に直接プラズマ照射する状況では、未知の活性種を伴った高濃度のオゾンや他のガスが発生するが、PTW では原理的にこの現象は起きない。以上から、PTW の応用は、非侵襲的う蝕治療法として大きな可能性を秘めていると考える。

【結 論】

う蝕感染象牙質モデル窩洞内に PTW を 10 秒間応用することで、窩底から深さ 2.4 mm までの象牙質中の *S. mutans* が、 10^5 CFU レベルから 10 CFU 以下に激減した。

審査の結果の要旨

臨床では、最小限の侵襲によるう蝕治療 (MI: minimal intervention) が提唱されている。感染象牙質の非侵襲的除去には、オゾンや薬剤が応用されているが、いずれも殺菌効果に確実性を欠き、未だ定着した臨床応用には至っていない。医療領域におけるプラズマの応用は増加傾向にあり、医療材料の表面の改質や処理、滅菌ならびに衛生管理などにおいて長い研究の歴史がある。田崎氏は、既にプラズマの直接照射が、感染象牙質モデルにおける *Streptococcus mutans* に対し顕著な殺菌効果を有することを報告したが、直接照射には大きな発生装置が必要で、十分な効果を得るためには 180 秒に亘る照射が求められる。

そこで本研究は、臨床応用に即した適用法を検討するために、調整されたプラズマ処理水 (PTW) の殺菌効果を検証す

る目的で行われた。

その結果、本研究では以下のことが明らかとなった。

1. *S. mutans* に対する PTW の抗菌活性 (MIC, MBC) は、25℃, pH 3.5 の条件下で保管された同溶液の 1/40 希釈に相当した。一方、pH 6.5 条件下では抗菌活性は認められなかった。コントロールとした NaClO の抗菌活性は、日常臨床で使用する 1/2,560 希釈であった。37℃ 条件下では、NaClO は 25℃ と同様の効果を示したが、PTW では効果は認められなかった。
2. ヒト抜去歯 (18 本) において、40% 乳酸ならびに *S. mutans* を用いて感染象牙質モデルを作成し、応用時間と殺菌効果ならびに感染象牙質内部 (深さ) への効果について検証したところ、10 秒程度応用することで、深さ 0.8 mm の部位では生菌数は検出限界以下となった。また感染象牙質内部における抗菌効果は、深部に至るほど低下するものの生菌数は激減した。

プラズマの発生熱を応用した、生体組織への直接的使用は既に臨床に導入されているが、本研究で用いた大気圧低温プラズマ由来の、フリーラジカル等の反応活性種の生体応用は多くが研究途中であり、実際の臨床応用を考慮した殺菌効果の検証は非常に重要である。

歯髄の保存療法が十分ではない本邦においては、非侵襲的な感染象牙質の処理は歯や歯髄の保存につながり、う蝕象牙質の再生や再石灰化療法に大きく貢献するものである。

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。