

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） 山 本 要（神奈川県）
博士の専攻分野 博 士（歯 学）
学 位 記 番 号 甲 第 471 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 The Efficacy of Plasma-treated Water as a Root Canal Irrigant
（根管洗浄剤としてのプラズマ処理水の有効性）
Asian Pacific Journal of Dentistry 第 17 巻 第 1 号 23 頁～ 30 頁掲載 平成 29 年 2 月 28 日発行
論 文 審 査 委 員 主査 教授 桃 井 保 子
副査 教授 前 田 伸 子 副査 教授 細 矢 哲 康

内 容 の 要 旨

【緒 言】

感染根管治療における根管の機械的清掃には一般的に根管切削器具が用いられ、さまざまな拡大形成方法があるが、根管のアンダーカット、イスミス、フィンならびに側枝への到達は困難である。従って清掃性向上のために、化学的清掃を併用することが必須である。従来用いられる次亜塩素酸ナトリウムは強力な殺菌作用を示す反面、組織刺激性が強い。効果的で安全な治療を行うためには、十分な殺菌力を有しながら、生体への為害性が少ない新たな根管洗浄剤の開発が望まれる。

近年、プラズマを応用した殺菌技術が注目されており、中でも大気圧低温プラズマは医療機器の殺菌のみならず生体への照射も可能であり、皮膚の消毒に加え火傷の治癒促進あるいは止血などへの応用も期待されている。この技術の応用はすでに歯科領域においても研究が進んでおり、液中の各種口腔原性微生物に対し優れた殺菌効果が報告されている。われわれは、すでに純水にプラズマ照射を行うことで殺菌力を有する plasma-treated water（以下 PTW）の生成に成功している。

本研究は、ヒト抜去歯ならびにラット臼歯において、PTW を根管洗浄剤として使用した際の有効性を検討することを目的としている。

【材料と方法】

Plasma-treated water の生成

プラズマ生成ガスには数%窒素を含有したヘリウムを用いた。電極を装着した石英管中を緩徐に流れる純水に対し、大気圧低温プラズマを照射し、PTW を生成した。実験に際しては、pH 調整のために 200 mM クエン酸緩衝液（pH3.5）を添加して使用した。

被験微生物と培養

被験微生物は、細菌として *Enterococcus faecalis*、真菌として *Candida albicans* と *Candida glabrata* の計 3 種類とした。それぞれ好気条件で前培養を行い、 $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml の濃度に調整した。*E. faecalis* には BHI 培地、*C. albicans* と *C. glabrata* は TSBD 培地を用いた。

最小発育阻止濃度（MIC）の測定

各被験微生物の菌液を、96 穴のウェルに 10 μ l ずつ分配し、氷温で 200 mM クエン酸緩衝液（pH3.5）10 μ l と PTW80 μ l を加えた。1 分後、それぞれ 100 μ l の培地を注入し、48 時間の好気培養を行った。評価方法は微生物の増殖の有無を培養液の濁度で観察した。被験 PTW は 2 倍連続希釈系列で 5 種類の濃度について観察した。

感染根管モデルの作製

本研究は鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認（No.856）を受けて行った。健全抜去ヒト前歯 76 本を根尖から 10 mm の位置で歯冠を切除し、60 号まで根管拡大形成を行った。オートクレーブで滅菌後、根管をペーパーポイントにて乾燥し、10 μ l の各菌懸濁液を染み込ませた 60 号ペーパーポイントを、無作為に 3 群に分けた根管に挿入した。*E. faecalis* (n=10) 群は 37℃、24 時間、*C. albicans* (n=16) 群ならびに *C. glabrata* (n=26) 群は 30℃、24 時間好気培養して感染根管モデルを作製した。

感染根管モデルにおける PTW の有効性の観察

菌播種に使われたペーパーポイントを根管モデルから除去後、200 mM クエン酸緩衝液 (pH3.5) 100 μ l を添加した PTW 1 ml で 1 分間根管洗浄を行った。ペーパーポイントで乾燥後、簡易培養の手法で根管内の細菌検査を行った。*C. glabrata* 群においては、上記の実験群 (n=16) に加え PTW による洗浄の前に 200 mM クエン酸緩衝液 (pH3.5) 1 ml で 1 分間の前洗浄を行った群 (n=10) を設定した。対照群として純水で根管洗浄を行った群 (n=4) とクエン酸緩衝液で行った群 (n=4) を被験微生物ごとに設定した。48 時間好気培養後、蛍光灯下で培養液の濁度を観察した。

in situ における PTW の有効性の観察

本研究は鶴見大学歯学部実験動物委員会の承認（No.28A032）を受けて行った。4 週齢の Wistar 系雄性ラット 6 匹の下顎両側第一臼歯 12 本を被験歯とした。エーテルにて鎮静後、1.0 mg/ml 塩酸メドミジン、5.0 mg/ml ミダゾラム、5.0 mg/ml 酒石酸ブトルファノールの 3 種混合麻酔を 0.1 ml/10 g 腹腔内投与した。ø0.8 mm ラウンドバーにて髓腔開拓を行い、15 号まで根管拡大形成を行った。各被験根管には、10 μ l の *E. faecalis* の菌液をマイクロピペットで髓腔ならびに根管に注入した。各ラットにおいて無作為に片側を実験群 (PTW) ならびに反対側を対照群 (純水) とし、各 1 ml で 1 分間の根管洗浄を行った。ペーパーポイントで根管乾燥後、簡易培養の手法で根管内の細菌検査を行った。

統計学的検索

感染根管モデルならびに *in situ* における PTW の有効性は、各条件間においてカイ 2 乗検定法 ($p < 0.05$) を用いて統計学的に検索した。

【結 果】

最小発育阻止濃度

すべての被験微生物に対して PTW の殺菌効果が認められた。PTW の MIC は、*E. faecalis* は希釈倍率 0.125、*C. albicans* と *C. glabrata* は希釈倍率 0.25 であった。

感染根管モデルにおける PTW の有効性

E. faecalis 群と *C. albicans* 群では、前洗浄を行わなくともすべてにおいて残存微生物の増殖は認めなかった。*C. glabrata* 群では前洗浄を行うことですべてにおいて増殖は認めなかった。統計学的解析の結果、有意な有効性を認めた。

in situ における PTW の有効性

ラット臼歯においては、すべての実験群で残存微生物の増殖は認めなかった。統計学的解析の結果、有意な有効性を認めた。

【考 察】

大気圧低温プラズマによる殺菌効果は、その低刺激性から皮膚消毒などの生体への応用が研究されている。また歯科領域においては、口腔内微生物の殺菌効果や、根管への応用も報告されている。本研究では大気圧低温プラズマの応用により生成した PTW の有効性を確認した。

被験微生物には、*E. faecalis*、*C. albicans*、ならびに *C. glabrata* の 3 種類を選択した。*E. faecalis* と *C. albicans* は難治性根尖性歯周炎の感染根管から検出されることがあり、*C. glabrata* も *C. albicans* に次いで多く口腔内から検出される真菌である。

感染根管モデルの作成においては、可及的に均一の根管を形成するために 60 号まで拡大形成を行った。PTW のみによる洗浄で、*E. faecalis* 群ならびに *C. albicans* 群のすべてで検出限界以下の効果を認めた。一方、*C. glabrata* 群の PTW のみによる洗浄では 2 例で菌の増殖を認めたが、前洗浄を行った後に PTW による洗浄を行ったところ、すべてにおいて検出限界以下の効果を認めた。PTW は低 pH 条件下で高い殺菌力を発揮するが、クエン酸緩衝液による根管象牙質の脱灰作用で pH が上昇したことにより殺菌効果が減弱した可能性が考えられる。

ラット臼歯を用いた *in situ* における研究目的は、より臨床に近い実験系において効果を確認することである。PTW による洗浄を行ったすべての根管で検出限界以下の効果が認められた。また、実験中はルーペを用いて PTW が触れた口腔粘膜

組織の観察を行った。実験中に口腔粘膜組織への影響も認められなかったことから、残留活性は直ちに消退していると考えられる。

PTW は pH 調整のためにクエン酸緩衝液を添加している。クエン酸にはキレート作用があり、無機質溶解性を有していることから、スミヤー層除去能が報告されており、PTW にも同様の効果が期待できる。また、PTW は強力な殺菌力を有するが、含有活性種の半減期が短いことから、残留活性が低く極めて安全性の高い根管洗浄剤といえる。このような従来の消毒薬にはなかった短時間で無毒化するという特徴は、生体に応用する消毒薬として高い優位性を有している。

本研究で用いた PTW は、1 分程度の作用で根管内微生物に殺菌効果を示しただけでなく、微細構造への到達も確認された。PTW は -80°C での凍結保存が可能で、解凍後の使用でも殺菌効果に影響を与えないことが確認されている。長期間の保存性に加え移動に際しての利便性も兼ね備えることから、研究や臨床への応用範囲が拡大すると考えられる。

今後は、PTW の硬組織ならびに軟組織に対する具体的な影響を調査し、実用化に向けて生体安全性を確認する必要がある。

【結 論】

PTW は、*E. faecalis* と *C. albicans* ならびに *C. glabrata* に対して殺菌効果を示し、根管洗浄剤としての有効性が示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は、医療分野で消毒や創傷治癒への応用が進んでいる大気圧低温プラズマが、根管洗浄剤として十分な殺菌力を有し、かつ組織刺激性が少ないことを検証したものである。

検証は、純水にプラズマ照射し生成したプラズマ処理水 (pH3.5 クエン酸緩衝液添加) を対象とし、ヒト抜去菌を用いた実験とラット臼歯を用いた動物実験にて行われた。

被験微生物は 3 種、*Enterococcus faecalis*、*Candida albicans* と *Candida glabrata* である。各菌を前培養し、 $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml の濃度に調整し菌液としている。

各菌液に、氷温下でプラズマ処理水を加え、48 時間培養後、菌の増殖の有無を培地の濁度で観察した。この結果、プラズマ処理水の最小菌発育阻止濃度は、*E. faecalis* で希釈率 0.125、*C. albicans* と *C. glabrata* で 0.25 と、全ての菌に対して殺菌性が確認されている。

感染根管モデルは、抜去ヒト前歯の根管を拡大形成し、各菌液を浸透させたペーパーポイントを根管内に挿入した後培養したものである。プラズマ処理水の殺菌性は、感染根管内をプラズマ処理水で洗浄した後、簡易培養で細菌検査が行われている。*C. glabrata* についてはプラズマ処理水洗浄前にクエン酸緩衝液で 1 分間前洗浄した群を加えて設定している。いずれも 48 時間好気培養後、培養液の濁度を観察し、*E. faecalis* 群と *C. albicans* 群において、また *C. glabrata* 群では前洗浄群において、全ての微生物の増殖が無かったと報告している。

動物実験は、4 週齢の Wistar 系雄性ラット 6 匹の下顎両側第一臼歯 12 本を被験歯に行われた。ラウンドバーで髓腔開拓を行い根管拡大形成後、*E. faecalis* の菌液を根管に注入した後、プラズマ処理水で根管洗浄を行い、根管内の細菌検査を行った。この結果、プラズマ処理水による洗浄を行った全ての根管で検出限界以下の殺菌効果を認めている。また、処理水が接触した口腔粘膜組織には何らの変化も確認できなかったとしている。

また、プラズマ処理水は -80°C で長期保存が可能で、解凍後も殺菌効果に変化せず、含有活性種の半減期が短いことから、残留活性が低く生体安全性が高いと思われると結語している。

以上、本研究は、プラズマ処理水が根管洗浄剤として十分な殺菌力を有し、かつ組織刺激性が少ないことを検証し、歯内治療における新たな治療技術を見出した点で高く評価できる。

よって、本論文は博士 (歯学) の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。