

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)	岩木達哉(東京都)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	甲第508号
学位授与年月日	令和2年3月31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	High Microbicidal Effect of Peroxynitric Acid on Biofilm-Infected Dentin in a Root Carious Tooth Model and Verification of Tissue Safety (根面う蝕モデルにおけるバイオフィーム感染象牙質に対する過硝酸の高い殺菌効果と組織安全性の検証) Journal of Oral Biosciences 第62巻 第2号 189頁～194頁掲載 2020年6月発行
論文審査委員	主査 教授 細矢哲康 副査 教授 花田信弘 副査 教授 山本雄嗣

内容の要旨

【緒言】

根面う蝕では、う蝕の発生部位や病変の拡大様相が歯冠部う蝕と大きく異なり、加えて歯肉に近接しているため、通常の切削修復処置は難しい。また、高齢者の口腔内は歯周病や義歯の装着で、バイオフィームができやすい環境である。バイオフィーム形成を抑制する目的で、洗口剤や窩洞清掃剤が市販されているが、十分な殺菌効果を得られる濃度での口腔内使用は、生体安全性の観点から現時点では実現困難である。

そこで我々は、低pH法によるプラズマ殺菌法に着目した。この殺菌機構を研究したところ、殺菌活性種は $\text{HO}\cdot$ であることがわかり、その前駆体は過硝酸(PNA; peroxynitric acid)であった。現在では化学合成方法によって、高濃度のPNA溶液を低コストで大量に作るができる。本研究は、PNAの特性を利用することによって、PNA溶液は根面う蝕に対する画期的な治療薬になるのではないかと考え、根面う蝕に対するPNAの殺菌効果について検討を行うことを目的とした。

【方法および材料】

1. PNA合成

1.0 M 硝酸 45 μl と 6.0% 過酸化水素 60 μl を混和し、そこに10%亜硝酸Na 50 μl を加えた。混和は氷上にて行った。合成後、 -80°C の冷凍庫にて保管した。試験時には室温で解凍し、pH3.5 クエン酸バッファーと蒸留水を用いて、pH と濃度の調整を行った。

2. 感染歯質モデル殺菌実験

ヒト抜去前歯根面の唇側に耐水研磨紙で平坦面を形成し、平坦面以外の歯面をコンポジットレジン(CR)で被覆した。CR被覆歯を乳酸溶液に2日間浸漬した後、蒸留水中でオートクレーブ滅菌(121°C , 15分間)した。次いで、歯を *Streptococcus mutans* の菌液の中に入れ、菌液を毎日交換しながら1週間 37°C 下で振盪培養し、根面う蝕モデル歯を作製した。PNA濃度を1.1, 5.4, 11, 16, 22 mMの5条件とし、浸漬時間は10秒間とした。根面う蝕モデル歯をPNA溶液に浸漬する前後でモデル歯根平坦面の3か所から、スチールラウンドバーで象牙質を採取し、その切片をバーごとBHI培地に懸濁した。懸濁液を寒天(TSA)培地に塗抹して2日間培養(37°C , 嫌気下)後、1ラウンドバー当たりの生菌数(CFU/round bur)

を算出した。コントロールとしてバッファーのみと、熱処理（37℃下で1時間静置）した22 mMのPNA溶液を用いた。（鶴見大学倫理審査委員会承認番号856）

3. プレートバイオフィーム実験

S. mutans は10 mlの5%スクロース含有BHI培地で、*Candida albicans* は5% FBS添加RPMI1640培地で培養を行った。濾過滅菌したヒト安静時唾液を24穴プレートの各ウェルに入れ、一晚4℃で静置し、ウェル表面を唾液で一層塗布した。その後、各ウェルに*S. mutans* と *C. albicans* の菌液を同量入れ、一晚37℃の好気下で振盪培養を行い、ウェル底面にバイオフィームを生成させた。ついでウェル内の浮遊菌液を取り除き、生理食塩水で2回洗浄した。PNA溶液の濃度を5.4, 11, 22 mMに調整し、PNA溶液をウェル内に入れ、30秒間静置した。その後、溶液を抜き取り、一度BHI培地でウェル内を洗浄した。洗浄後、Metabolical Redox Indicatorを加えて、1時間後に蛍光強度を測定したのち、ウェル底面のバイオフィームを剥がして回収した。30秒間ホモジナイザーベッセルにてバイオフィームをすりつぶし、その懸濁液をTSA培地に塗抹し2日間培養し、ウェルごとの生菌数（CFU/well）の算出を行った。対照として、pH 3.5クエン酸バッファーと、0.2%と2.0%グルコン酸クロルヘキシジン（CHX）とで同様にを行い、各群5ウェルずつを5回評価した。

4. 切片バイオフィームモデル実験

ヒト抜去小白歯を歯頸部と、歯頸部から歯根方向へ5 mmのところまで切断し、幅7 mm、厚さ2 mmになるように切片を作製した。切片を蒸留水に浸漬して、オートクレーブにて滅菌した。24穴プレートのウェルの中に、滅菌した切片を入れ、切片表面に唾液を一層塗布し一晚4℃で静置した。新しいウェルに*S. mutans* と *C. albicans* の菌液を同量ずつと切片を入れ、培養は3日間繰り返し行い、菌液とウェルは毎日新しいものに変え、37℃の好気下でゆっくり振盪培養を行った。切片にバイオフィームを生成後、切片をウェルから取り出し、pH 3.5クエン酸バッファーに浸漬して洗浄した。洗浄後、22 mMのPNA溶液に切片を浸漬した。60秒後に切片を取り出し、BHI培地に浸漬した。切片ごとBHI培地をボルテックスにかけて懸濁した後、懸濁液をTSA培地に塗抹して2日間培養し、切片ごとの生菌数（CFU/dentin-slice）を算出した。対照として、pH3.5バッファーのみと2.0% CHXで同様にを行い、各群4切片で評価した。

5. 上皮性組織毒性試験

規格（OECD TG 439）に従って、3次元培養モデルによる表皮刺激試験を行った。試験溶液は、PNA 22 mMと220 mM、熱処理したPNA溶液22 mMと220 mMを用いた。対照として、2.0% CHX、pH 3.5クエン酸バッファーを用いた。

【結果】

感染菌質モデルでは、PNAの濃度が上昇するにつれて、浸漬後の生菌数は減少していき、22 mMでは検出限界以下（< 2.5 CFU/round bur）となった。それに対して、バッファーのみの場合と、熱処理したPNA溶液での場合は、浸漬前後で生菌数の変化は認められなかった。

プレートバイオフィームモデルでは、PNAとCHXにおいて、ともに濃度が高くなるにつれて生菌数は減少していき、PNA溶液は11 mM以上、CHXは2.0%の濃度で検出限界以下（< 5 CFU/well）となった。バイオフィーム全体の活性を示す蛍光強度はPNAとCHXのどちらも濃度が高くなるにつれて有意に低くなった。

切片バイオフィームモデルでは、CHXに浸漬したときの*S. mutans* と *C. albicans* の生菌数はバッファー浸漬と比べ、それぞれ一桁ほどの減少であった。それに対しPNA溶液はバッファー浸漬よりも 10^{4-5} レベルで両菌を減少させることができ、2.0%CHX以上の殺菌力を示した。

上皮性組織毒性試験では、PNA溶液は220 mM以下の濃度において、毒性は認められなかった。それに対して、2.0% CHXは毒性を認めた。

【考察】

PNAはヒト歯根面に定着させたい蝕原性細菌に対しても、また蝕原性細菌のバイオフィームに対しても、短時間の応用で著明な殺菌効果を示すことがわかった。また、組織安全性については、現在、日常臨床で多用されているCHXと比較評価したところ、バイオフィームを短時間で殺菌し得る高濃度のCHX溶液には毒性が認められたが、PNA溶液では、殺菌実験で用いたPNA溶液の10倍の濃度でも毒性が認められなかった。このように、高い殺菌性能と生体安全性を合わせ持ち、低価格で量産できるPNAは、通常の切削修復が適応できない根面う蝕に対して、今後、有効な非侵襲的治療の一例となると考えられる。

【結論】

ヒト根面う蝕モデルとう蝕バイオフィームモデルを用いた今回の研究により、過硝酸はう蝕原性細菌とそのバイオフィ

ルムに対して高い殺菌効果があり、かつ組織安全性を有することが示され、根面う蝕の殺菌に有効である可能性が示された。

審査の結果の要旨

高齢者の口腔内では、エイジングに伴う歯根露出と口腔バイオフィルムが形成しやすい環境が重なり、根面う蝕の増加が問題視されている。

本研究では、バイオフィルムの形成抑制ならびに根面う蝕処置における感染歯質の殺菌を目的に、過硝酸（PNA）溶液の殺菌効果ならびに組織安全性に関して検討した。過硝酸はプラズマ殺菌の際に発生する活性種であるヒドロペルオキシラジカル（ $\text{HOO}\cdot$ ）の前駆体である。

研究は合成したPNA溶液を用いて、1. ヒト抜去歯を用いた感染歯質モデルにおける殺菌効果の観察、2. プレート上でのバイオフィルムの形成抑制効果の観察、3. ヒト抜去歯片でのバイオフィルム形成抑制効果の観察、4. OECD毒性試験ガイドラインに準拠した刺激性試験（TG 439）から構成されている。

1. 感染歯質モデルは、乳酸溶液で脱灰したヒト抜去歯を、*Streptococcus mutans* の菌液中で培養し根面う蝕モデルを作製した。5通りの濃度（1.1, 5.4, 11, 16, 22 mM）のPNA溶液に被験モデルを浸漬し、培養後に象牙質を採取して生菌数を測定した。濃度依存的に生菌数は減少し、22 mMでは検出限界以下となった。

2. プレートバイオフィルムでは、濾過滅菌したヒト唾液を介して、*S. mutans* と *Candida albicans* のバイオフィルムを形成し、3通りの濃度（5.4, 11, 22 mM）のPNA溶液の効果を、蛍光強度ならびに生菌数により観察した。コントロールは、クエン酸バッファーと0.2%ならびに2.0%グルコン酸クロールヘキシジン（CHX）とした。バイオフィルム活性ならびに生菌数は、PNA溶液ならびにCHXともに濃度依存的に低下した。PNA溶液は11 mM以上、CHXは2.0%で検出限界以下であった。

3. 歯片バイオフィルムでは、歯根部象牙質片にヒト唾液を介して、*S. mutans* と *C. albicans* のバイオフィルムを形成し、22 mM PNA溶液の効果を生菌数により観察した。PNA溶液は2.0%CHXに比べて強い殺菌効果が認められた。

4. 刺激性試験では、220 mM以下のPNA溶液には有意な有害性は認められなかった。

本研究では、プラズマ殺菌の有効成分が過硝酸であることに着目し、合成PNA溶液が、*S. mutans* に対する抗菌効果ならびに *S. mutans* と *C. albicans* のバイオフィルム形成抑制効果を有することを明らかとし、根面う蝕の予防ならびにMIに基づく治療への応用の可能性を示唆した点は、歯科臨床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。