

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) 寺田 知加(埼玉県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 乙第 265号
学位授与年月日 平成31年3月14日
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
学位論文題目 The Effect of Irradiation with a 405 nm Blue-Violet Laser on the Bacterial Adhesion on the Osteosynthetic Biomaterials
(骨接合材料表面に付着した細菌に対する405 nm 青紫色レーザー光の照射効果)
International Journal of Photoenergy Volume 2018, Article ID 2635964, 10 pages
平成30年11月13日発行
論文審査委員 主査 教授 濱田 良樹
副査 教授 花田 信弘 副査 教授 里村 一人

内容の要旨

【緒言】

顎顔面領域における骨接合材料として、生体適合性や物理的性質の特長から Ti が多く使用されてきた。1990 年代にポリ-L-乳酸 (PLLA) を主成分とする吸収性骨接合材料が開発され、2006 年に未焼成ハイドロキシアパタイト (HA) 粒子と PLLA の複合体 (HA-PLLA) からなるミニプレートシステムの臨床応用が開始されると吸収性骨接合材料の使用はさらに高まり、現在までに多くの症例に使用されている。しかしながら、骨接合材料を使用した手術の術後合併症として術後感染は未だ一定数の報告がある。さらに、HA-PLLA からなる吸収性骨接合材料を用いた手術では術後相当の時間が経過した後に手術部位の炎症や膿瘍形成がみられる症例が報告されている。それらの詳細な機序については未だ解明されておらず、有効な予防法も未だ確立されていない。ひとたび感染が成立してしまうと骨接合材料の除去が必要となることもあり、骨組織再生や創部治癒の不全を招き、患者にとって大きなデメリットをもたらす。特に、吸収性骨接合材料についてはその特徴的利点が損なわれてしまう。

術後感染の原因菌として多くの菌が同定されているが、中でも *Staphylococcus aureus* は周術期の手術部位感染 (SSI: Surgical Site Infection) の原因菌として最も多く分離される菌の一つである。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を初めとする数々の耐性菌の出現に伴い、抗菌薬を用いた薬物療法に代わる代替治療法の確立が望まれており、その一つとして可視光による殺菌に対して高い期待が寄せられている。様々な菌種に対していくつかの波長の光による殺菌効果が検証されているが、われわれはこれまでに代表的歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* や難治性感染根管から分離される *Prevotella intermedia*、さらには口腔カンジダ症の原因真菌である *Candida albicans* に対して 405 nm 青紫色レーザー光が強い殺菌効果を有していることを見いだしているが、この波長の光は *Staphylococcus aureus* に対しても殺菌効果を有していることが明らかとなっている。

本研究では術後感染の効果的予防法の確立を目的とし、Ti および HA-PLLA 製骨接合材料における 405 nm 青紫色レーザー光照射による物理化学的作用を利用した殺菌法の有効性の検討を行った。

【材料と方法】

1. 材料表面性状の比較

直径 10 mm、厚さ 2 mm の Ti および HA-PLLA 製円盤状サンプルを用意し、表面粗さおよび水接触角にて各材料表面の形態学的特徴を検討し、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて表面性状を観察、比較した。併せて、両材料における 405 nm 波長

に対する反射率および透過率の計測を行った。

2. 材料表面への細菌付着性の観察

各材料表面に 1×10^4 CFU/ml に調整した *S. aureus* 菌懸濁液 100 μ l を播種し, 3, 6, 24, 48 時間培養した後, SEM にて材料表面への細菌付着性を観察した。

3. 洗浄後の細菌増殖の検証

redox indicator assay を用いて洗浄後も材料表面に残存した細菌増殖のモニタリングを行った。材料表面に菌が付着した各材料のディスクを蒸留水中で 30 秒間ヴォルテックス洗浄し表面に付着した細菌を洗い落した後, redox indicator (alamarBlue[®]) を含む BHI 培養液内で培養し, 経時的に吸光度を 570 nm 波長で測定した。加えて, 30 秒間ヴォルテックス洗浄後に 24 時間培養した群の材料表面を SEM にて観察した。

4. 405 nm 青紫色レーザー光による殺菌効果の検証

各材料表面に 1×10^4 CFU/ml に調整した *S. aureus* 菌懸濁液 100 μ l を播種し, 3 時間培養した後, 材料表面へ 405 nm 青紫色レーザー光照射を行った。照射は 0.2 W で 0 秒 (コントロール), 180 秒 (27 J/cm²), 300 秒 (45 J/cm²) 行った。照射後ディスクを寒天培地にスタンプし, 12 時間培養後 CFU を計測した。

【結 果】

1. 各材料の特徴

表面粗さ, 水接触角に大きな差は認めなかったが, SEM による観察では両材料の表面性状には違いが認められた。両材料とも透過率は低い, 反射率は HA-PLLA が高かった。

2. 材料表面への細菌付着

SEM による観察では両材料間には表面性状の違いを認めたが, 細菌の付着に関しては差を認めなかった。培養開始後 24 時間では材料表面に小さな菌塊が形成され, 48 時間後には大きな菌塊形成を認めた。

3. 洗浄後の残存細菌の増殖

30 秒間ヴォルテックス洗浄後, 培養を継続すると, いずれの群でも細菌の増殖および菌塊形成がみられた。培養 4 ~ 5 時間後では HA-PLLA 群の方がより多くの細菌増殖を認めた。SEM による観察でも 24 時間培養後には菌塊の形成が認められた。

4. 材料表面に付着した細菌に対する 405 nm 青紫色レーザー光照射の効果

両材料ともに 405 nm 青紫色レーザー光照射による材料表面での有意な細菌増殖抑制効果を認めた。Ti では 180 秒 (27 J/cm²) 照射群で 76%, 300 秒 (45 J/cm²) 照射群では, 93 ~ 99%, HA-PLLA ではそれぞれ 90% と 99% の細菌増殖抑制効果を認めた。

【考 察】

術後感染症の原因菌の一つである *S. aureus* が Ti あるいは HA-PLLA の骨接合材料表面に容易に付着し, 生存し得ることが確認された。さらにいずれの骨接合材料も表面がいったん細菌で汚染されると, 洗浄後も一定量の細菌が定着残存し, その後一定の条件下で増殖を開始し, 材料表面に菌塊を形成することが確認された。本結果からは, 術中いかなる注意を払ってもわずかな細菌の混入を完全に防止あるいは混入した細菌を完全に除去することは困難であることが明らかとなった。この事実は, 骨接合材料を用いた手術後に生じる炎症の一部には, 材料表面に付着して生体内に持ち込まれた微量の細菌の増殖が原因であるものがある可能性を示すとともに, 閉創直前時における材料表面の殺菌・除菌が術後感染の効果的予防につながる可能性を示唆しているものと考えられた。

これまで *S. aureus* に対する 405 nm 青紫色レーザー光の有効性はいくつか検証されているが, 照射時間が長く臨床応用には問題があったが, 本研究により 0.2 W, 300 秒の照射で十分な殺菌効果があることが確認でき, 臨床応用への有用性が確かめられた。

【ま と め】

405 nm 青紫色レーザー光照射による Ti および HA-PLLA の骨接合材料表面における付着細菌の増殖抑制効果が確認されるとともに, Ti および HA-PLLA からなる骨接合材料を用いた手術の術後感染予防に対する 405 nm 青紫色レーザー光の臨床的有用性が確認された。

審査の結果の要旨

現在、顎顔面領域で一般的に用いられている骨接合材料は Ti 製と未焼成ハイドロキシアパタイト (HA) 粒子と PLLA の複合体 (HA-PLLA) 製である。一方、骨接合材料を使用した手術における術後感染は後を絶たず、術後感染が生じると骨接合材料の早期における除去を要することもあり、術後経過としては大きなマイナス要因となる。そのため、術後感染の予防として周術期における抗菌薬投与が行われてきたが、耐性菌の問題もあり抗菌薬に代わる代替手段が求められている。

そこで申請者らは、抗菌薬に頼らない術後感染の効果的な予防法の確立を最終目的として、本研究では Ti および HA-PLLA 製骨接合材料表面における 405 nm 青紫色レーザー光照射による殺菌効果について検討することとし以下の実験を行った。①試料として直径 10 mm, 厚さ 2 mm の Ti および HA-PLLA 製円盤状サンプルを用いて材料表面性状を比較した。②各材料表面に 1×10^4 CFU/ml に調整した *S. aureus* 菌懸濁液 100 μ l を播種し、培養後に SEM にて材料表面への細菌付着性を観察した。③②の処理にて材料表面に菌が付着した試料を蒸留水中で 30 秒間ヴォルテックス洗浄した後の細菌増殖について検証した。④②の処理後 3 時間培養した材料表面に 405 nm 青紫色レーザー光を照射しその殺菌効果を検証した。

その結果、以下の知見が得られた。①両材料の表面性状に違いがあり、405 nm 波長の光に対する反射率は HA-PLLA で高かったが、透過率はともに低値であった。②細菌付着性に両材料間の差はなく、48 時間培養後にはともに大きな菌塊形成を認めた。③材料表面の洗浄後も、培養を継続すると両材料表面に細菌の増殖・菌塊形成がみられた。④405 nm 青紫色レーザー光照射による細菌増殖抑制効果は、Ti では 180 秒 (27 J/cm²) 照射群で 76%, 300 秒 (45 J/cm²) 照射群では、93 ~ 99%, HA-PLLA では各々 90% と 99% であった。

以上より本研究は、骨接合材料を用いた手術の術後感染予防において、材料表面への 405 nm 青紫色レーザー光照射が大きな効果を発揮することを示唆するもので、歯科・口腔外科の臨床においては注目に値する成果と考えられる。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。