

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17151

研究課題名（和文）過酸化水素光分解殺菌法の根面齲蝕への応用 - 新たな鉤歯齲蝕予防・治療技術に向けて -

研究課題名（英文）Application of a novel technique utilizing hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide to root caries-toward a new prevention and treatment technique for dental caries-

研究代表者

山田 康友 (Yamada, Yasutomo)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：80789991

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：過酸化水素光分解殺菌法とは、3%過酸化水素に青色可視光線を照射することで生成される活性酸素の一種であるヒドロキシルラジカルの強い酸化力を応用した殺菌法である。これまでに、本法は歯周炎に対する治療効果が実証されてきたが、齲蝕予防・治療への応用については十分な有効性および安全性の検証がなされていなかった。そこで本研究では、in vitro齲蝕モデルを構築し、軟化象牙質内に侵入した菌に対する殺菌試験を行った。その結果、本殺菌法を齲蝕治療へ適応するにあたっての最適条件の探索を行い、臨床応用に向けた基礎的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

齲蝕は、本邦では若年者においては近年劇的に減りつつあるが、寿命の長化や無歯症の減少と関連して高齢者において、特に根面齲蝕として増加している。この根面齲蝕は進行が早く、また補綴装置の鉤歯になっている場合は、修復治療後に補綴装置を新たに再製作する必要があるなどの問題があった。そこで、齲蝕部位から最大限歯質を保存しながら、残存細菌を根絶したり不活化させるような補助的な抗菌化学療法が望まれていた。本研究により、過酸化水素光分解殺菌法の、齲蝕予防・治療への応用についての可能性が示唆された。本研究の知見は、齲蝕治療における新規治療法の開発と、それによる患者QOL向上に貢献すると予測される。

研究成果の概要（英文）：A novel antimicrobial technique utilizing hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide (H₂O₂) photolysis has been developed for application to treatments of infectious dental diseases. However, this technique has not been sufficiently validated for its efficacy and safety in application to caries prevention and treatment. In this study, we established an experimental in vitro caries model and performed sterilization tests using this caries model. As a result, we searched for the optimal conditions for caries treatment of this technique and obtained basic knowledge for clinical application.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：過酸化水素光分解殺菌法 ヒドロキシルラジカル in vitro齲蝕モデル 歯髄への影響 殺菌試験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

齲蝕は、ここ数十年で、特に若年層で劇的に減りつつある。しかしながら、世界保健機関(WHO)が行った過去最大規模の健康調査である「世界の疾病負担研究 (Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study、GBD 2010)」によれば、齲蝕は未だ、世界中で重大な問題のままである。未処置の齲蝕の分布は、根面齲蝕の発生により、若年者から高齢者へ推移している。齲蝕は、高齢者の寿命の長化や残存歯数の増加と関連してさらに増える可能性がある。

齲蝕は酸産生細菌により、歯牙硬組織に生じる局所的な破壊である。*Streptococcus mutans* はヒトのデンタルプラークから分離される最も有名な酸産生菌であり齲蝕原因細菌である。*S. mutans* は、糖や炭水化物の代謝の副産物として酸を産生する。実質欠損が生じていない部位は再石灰化される可能性があるが、適切に管理や治療されなければ、齲蝕は進行し齲窩を形成する。一旦、歯質の実質欠損が生じると、多くの場合は切削のような機械的な方法で感染象牙質は除去される。しかしながら、齲蝕治療において最大限に歯質を保存しながら細菌感染を除去することは非常に困難である。従って、残存細菌を殺菌・不活化させるような補助的な抗菌化学療法が望まれている。

過酸化水素を光分解させることによって生じるヒドロキシルラジカルを用いた新しい殺菌技術が開発されてきた。この過酸化水素光分解殺菌法は、齲蝕治療における補助的な抗菌療法として研究されてきた光線力学殺菌療法 (Antimicrobial photodynamic therapy : aPDT) といくつかの類似点を持つ。前者は、3%の過酸化水素と 365-405 nm の波長の光 (LED やレーザー) を照射することで行われ、後者は光増感剤と赤色レーザーの組み合わせで行われる。また、両方法とも活性酸素種の高い酸化力を応用した殺菌効果に依存した治療法である。過酸化水素光分解殺菌法ではヒドロキシルラジカル、aPDT では一重項酸素が殺菌効果の主体を担い、細菌との相互作用により脂質過酸化反応や DNA の酸化障害などの致死的な酸化障害をもたらす。ヒドロキシルラジカルは、一重項酸素よりも高い酸化力を持つため、過酸化水素光分解法の方がより効果的な抗菌化学療法となり得る可能性がある。

齲蝕治療における補助的な抗菌化学療法としての過酸化水素光分解法は、デンタルプラークのようなバイオフィルムを形成している細菌に対する効果に加えて、感染象牙質に侵入した細菌に対しても効果を発揮することが望ましい。しかしながら、過酸化水素光分解法の歯質内に侵入した細菌に対する有効性や象牙質と複合体と考えられている歯髄への影響はほとんど知られていない。

2．研究の目的

本研究では、象牙質を用いた *in vitro* 実験的齲蝕モデルを用いて過酸化水素光分解殺菌法の有効性を検証し、さらに *in vivo* 歯髄刺激性試験において安全性を評価することを目的とした。

過酸化水素光分解法は、表面に付着したバイオフィルムを機械的に除去した後の象牙質に残存した細菌に対して効果的であると仮説を立てた。そこで、*S. mutans* が脱灰を引き起こしながら、歯質内に侵入できるように象牙質上で培養した *in vitro* の齲蝕モデルを確立し、このモデルを用いて、過酸化水素光分解法の殺菌効果を検証することで、上記仮説を検証した。また、安全性の観点からも、本殺菌法の適応による歯髄組織への為害作用の有無をラットを用いて組織学的に検証した。

3．研究の方法

(1) 有効性の検証

・試料作製

ウシ抜去歯の歯根部を、歯科用マイクロモーターを用いておよそ 3×3 mm の大きさに象牙細管が可及的に直行する方向で切り出した。耐水研磨紙で 3.0 × 3.0 mm の大きさになるように調整した。常温重合レジンで包埋した後に、象牙質表面が平面になるように耐水研磨紙で研磨した。象牙質試料は、超音波洗浄し、121 °C で 15 分間 高圧蒸気滅菌した。

・ *in vitro* 齲蝕モデル

細菌は、JCM (the Japan Collection of Microorganisms) から供試された *S. mutans* を用いた。細菌は、BHI 培地に嫌氣的に 37 °C で 24 時間培養した。この培地から、滅菌生理食塩水を用いて菌懸濁液を作製した。先行研究を参考にし、象牙質試料上に齲蝕原生バイオフィルムを作製した。高圧蒸気滅菌した象牙質試料を 48 ウェル上に置き、菌液とスクロースを添加した BHI 液体培地中で 37 °C で嫌氣的に培養した。

バイオフィルムの機械的除去後に、感染歯質中に残存した菌数を評価した。0、1、2、3、5、7日の培養期間後に、象牙質試料上に形成されたバイオフィルムを綿棒でふき取り、除去した。その後、感染歯質を、エキスカベータを用いて採取した。採取した象牙質をマイクロチューブ中の200 μ Lの生理食塩水に懸濁して激しく攪拌した。試料の10倍希釈系列を作製し、各希釈液を10 μ LずつBHI培地に播種し、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。培養後、コロニー数を計測した。

軟化象牙質形成を確認するため、マイクロビッカース硬度試験を行った。また脱灰された象牙質層の深さは、マイクロCTによって評価した。以上より、多角的に齲蝕モデルの評価を行った。

・過酸化水素光分解殺菌法による殺菌効果の検証

殺菌効果の評価は、*S. mutans*を3日間培養した象牙質試料を用いて行った。試料を以下の4つの処理群に分けた1) H(+)L(+), 2) H(+)L(-), 3) H(-)L(+), and 4) H(-)L(-)。H(+)では3%過酸化水素を用い、L(+)では、LED照射(波長365 nm)を行った。一方、H(-)は過酸化水素の代わりに滅菌した純水を用い、L(-)は遮光箱中で処理を行った。従って、H(+)L(+)が過酸化水素光分解処理を意味する。LED装置は、放射照度が1000 mW/cm²の条件で用いた。試料の上に20 μ Lの過酸化水素水または純水で象牙質全面を覆うように置き、光をそれぞれ0、15、30、60秒間照射した。処理後は、過酸化水素の効果を止めるため、500 μ Lの生理食塩水で2回、洗浄した。その後、処理した象牙質を前述の方法で採取し、生菌数を調べた。

(2) 安全性の検証

・SEMによる表面性状の観察

本殺菌法で処理した歯質の表面性状をSEMにて観察を行い、本殺菌法が微細構造に及ぼす影響も確認した。

・歯髄に対する組織学的評価

本動物実験は東北大学の動物実験専門委員会の承認を受けて実施した(承認番号: 2017DnA-021)。ラットの上顎第一大臼歯近心面にラウンドバーにて窩洞を形成して象牙質を露出させ、下記の通り処理を行った 過酸化水素+光照射、過酸化水素+遮光、純水+光照射、純水+遮光、無処理(窩洞形成あり)、無処理(窩洞形成なし)。翌日、ラットを犠牲死させ歯髄の切片標本作製し、歯髄組織に炎症性変化が惹起されていないかを確認した。

4. 研究成果

(1) 有効性の検証

・in vitro 齲蝕モデル

歯質から採取した菌数は、培養開始から3日までは菌数が増加したが3日後以降はほぼ一定となった。また齲蝕モデルと健全な象牙質も硬さをマイクロビッカース試験で評価したところ、硬さに有意差が認められた。マイクロCTによる評価でも、齲蝕モデルでは、明らかなX線透過像が観察され、歯質の脱灰が示唆された。以上により、*S. mutans*バイオフィルムによる歯質脱灰を伴う齲蝕モデルを作製できたことが確認された。

2). 殺菌試験

本殺菌法で処理した群〔H(+)L(+)〕では、時間依存的に生菌数が減少していた。一方で、過酸化水素単独〔H(+)L(-)〕および光照射単独の群〔H(-)L(+)〕は、対照群〔H(-)L(-)〕と比較したところ有意な殺菌効果は認められなかった。次に、処理時間および放射照度を固定し、光の波長を365 nm および400 nm に変化させ同様の殺菌試験を行ったところ、両波長に差は認められなかった。これは、波長が長い方がより象牙質の深部まで到達するためと考察した。続いて処理時間および波長を固定し、放射照度を変化させ殺菌試験を行ったところ、放射照度が大きい方がより殺菌効果が高いという結果が得られた。

(2) 安全性の検証

・SEMによる表面性状の観察

エナメル質、象牙質とともに、本殺菌法を適応しても表面の微細構造に変化は認められなかった。よって本殺菌法は歯質に傷害を与えないことが示唆された。

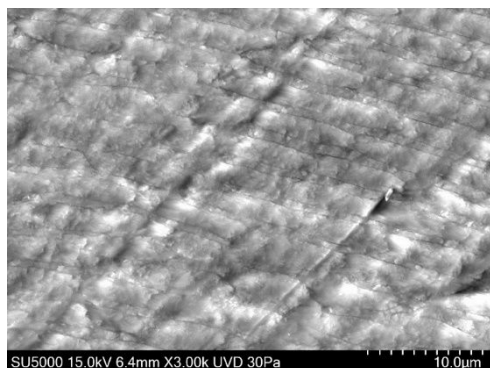


図 1 . 本殺菌法を適応した場合の牛エナメル質の SEM 画像

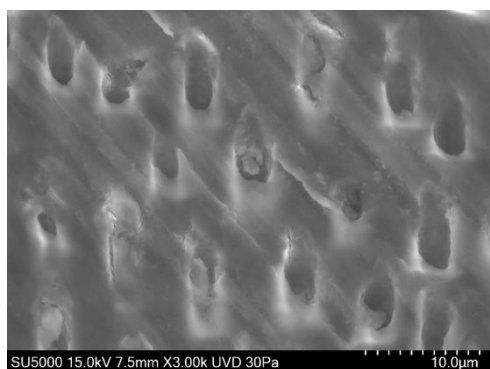


図 2 . 本殺菌法を適応した場合の牛象牙質の SEM 画像

・ 歯髄に対する組織学的評価

窩洞形成時の刺激による生じたと思われる炎症細胞浸潤が認められたが、本殺菌法の処理群と対照群で所見の差は認められなかった。よって、ラットを用いた本研究では、本殺菌法により、歯髄組織に炎症が惹起されることはないことが示唆された。

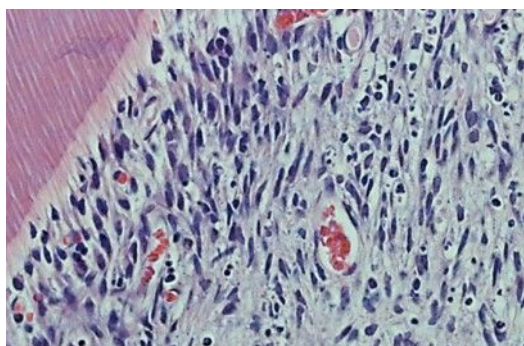


図 3 . 本殺菌法適応群〔H(+)/L(+)] のラット歯髄の組織像

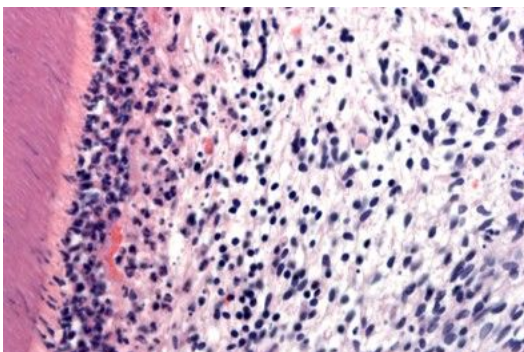


図 4 . 対照群〔H(-)/L(-)] のラット歯髄の組織像

一連の実験や観察からは、将来的な臨床応用に当たって、安全性に懸念を及ぼす可能性がある知見は得られなかった。

したがって、本研究の結果から、本殺菌法は感染象牙質内の細菌に対しても殺菌効果があり、

かつ歯髄に対する為害作用は最小限であることが確認されたので齲蝕治療に応用できる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----