

論文の内容の要旨

氏名：岩 崎 宏 泰

専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：アルカリイオン水の *Porphyromonas gingivalis* に対する殺菌および病原性抑制効果

口腔細菌叢は未同定の菌種を含め、約 700 種にも及ぶ細菌種により構成され、生体と細菌との相互作用によりバランスを保っている。しかし、口腔ケアが欠如した場合、デンタルプラーク（プラーク）中の菌数の増加ならびに遷移が誘導され、過剰のプラークの蓄積によりう蝕ならびに歯周病の発症の原因となる。しかし近年、歯周病が糖尿病などさまざまな全身疾患の誘因となる可能性が報告されており、プラークの形成抑制および除去は口腔のみならず全身疾患の発症予防につながるものと考えられる。一般的なプラークコントロールは、歯ブラシ、デンタルフロスおよび歯間ブラシなどが用いられるが、これらが適正に行われたとしても、機械的除去のみでは不十分であることが多い。そこでプラーク除去率向上を目的に、抗生物質やポビドンヨードなど、さまざまな薬剤が補助的に使用されている。しかし、これら薬剤は副作用として歯の変色、口腔粘膜への刺激、薬剤耐性菌の出現が報告されている。そこで、より副作用や為害性の少ない化学的プラークコントロール剤の開発が急務となっている。

水を隔膜で仕切って電気分解を行うと、陰極側には酸性溶液が、陽極側にはアルカリ性溶液が生成する。この酸性溶液（酸性電解水）は、高い殺菌効果と強い細胞傷害性を持つことが報告されている。一方、アルカリ性溶液の一つであるアルカリイオン水（AIW 溶液）に関しては、飲料による消化器官への影響などを検討した報告はあるものの、抗菌効果ならびに歯科医療分野に関する報告は極めて少ない。しかし、強いアルカリ性はタンパク変性作用を有するとの報告から、AIW 溶液が抗菌効果を示す可能性が考えられるものの、十分な検討はなされていない。

本研究では、AIW 溶液の化学的プラークコントロールとしての可能性を考え、AIW 溶液が歯周病原菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* に及ぼす影響を検討する目的で、AIW 溶液処理による殺菌および口腔上皮粘膜細胞への付着抑制効果やタンパク分解酵素除去などの短時間処理における病原性因子に及ぼす影響について検討した。さらにヒト上皮細胞に対する為害作用についての検討も加えた。

AIW 溶液はアルカリイオン整水器（ミネリッチ ロイヤル[®]、OSG コーポレーション、東京）を用いて、pH が 10.2 ± 0.1、9.2 ± 0.1 および 8.5 ± 0.1 となるように調整した 3 種の溶液を作製した。なお、control として PBS (50 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2) を用いた。被験菌として *P. gingivalis* ATCC33277 株を供試し、GAM broth（ニッスイ、東京）に 7.7 μM ヘミンならびに 2.9 μM メナジオンを添加した培地にて、37°C、48 時間嫌気培養を行った。

培養後の被験菌を遠心操作（4°C、5,000 × g、10 分間）で集菌し、滅菌 PBS にて 2 回洗浄した。遠心分離後約 2.0 × 10⁹ CFU に調整し、pH の異なる AIW 溶液 5 ml を添加して攪拌、室温で 30 秒から 5 分間処理後、10 分の 1 量の 1.0 M PBS (pH 7.2) を添加して pH を 7.2 に補正し、AIW 溶液処理の被験菌とした。

まず、AIW 溶液 (pH 10.2) の *P. gingivalis* に及ぼす殺菌効果について検討したところ、処理時間に依存して形成コロニー数は減少し、30 秒間では約 1/3 に、5 分間では約 1/9 になった。さらに、この殺菌効果と pH との関連性について検討したところ、pH の低下に伴い、形成コロニー数の増加が認められたことから、この殺菌効果は pH に依存している可能性が示唆された。AIW 溶液 (pH 10.2) が最も適当であると思われたが十分な殺菌効果を得るためには 5 分間処理が必要であり、30 秒間処理では形成コロニー数が減少するものの 1/3 程度であったことから殺菌効果は十分に期待できるものではなかった。さらに、5 分間処理は長く口腔内での AIW 溶液の臨床応用はやや困難であると思われる。そこで、AIW 溶液の短時間処理が *P. gingivalis* の病原性に及ぼす影響について検討した。

口腔上皮粘膜細胞を採取し、AIW 溶液で短時間処理した被験菌の粘膜細胞付着能を検討したところ、AIW 溶液の pH 上昇に伴って付着菌数の減少が認められた。この結果は、AIW 溶液処理が被験菌表層の付着関与構造に何らかの変化を与えるものと考えられた。そこで、AIW 溶液処理後の被験菌を走査電子顕微鏡で観察したところ、control で観察された表層に存在する無数のフィラメント状構造物が AIW 溶液処理で消失しており、被験菌の表層構造物を除去することで付着能が低下した可能性が示唆された。*P. gingivalis* の表層には線毛やタンパク分解酵素などが存在し、これらは口腔内諸組織への付着、他口腔常在菌との共凝集

ならびに宿主組織の破壊など、*P. gingivalis* の重要な病原性因子であることが報告されている。したがって、AIW 溶液処理によって *P. gingivalis* の病原因子である菌表層の線毛やタンパク分解酵素などが除去される可能性が考えられた。

次に、AIW 溶液処理により、上清中に遊離する成分について検討を加えた。処理後の遠心上清中のタンパク量を測定したところ、control と比べて有意に上昇し、AIW 溶液処理で菌表層のタンパク成分が上清中に遊離することが示された。*P. gingivalis* が産生するタンパク分解酵素の大部分は、トリプシン様のシステインプロテアーゼであることから、BAPNA を基質としてのプロテアーゼ活性を測定したところ、AIW 溶液処理上清中に高い活性が認められ、*P. gingivalis* のタンパク分解酵素が AIW 溶液処理により遊離していることを確認した。

さらに、上清中へと遊離する成分として *P. gingivalis* の付着に関与する線毛が存在する可能性が考えられることから、同様に抗 FimA 抗体を用いて検討した。その結果、AIW 溶液処理では約 41-、約 55-ならびに約 67-kDa にバンドを認め、上清サンプル中に線毛成分が検出された。AIW 溶液処理による口腔上皮粘膜細胞への付着能の低下は、AIW 溶液処理による線毛の消失が関与している可能性が強く示唆された。

P. gingivalis の付着能にタンパク分解酵素が深く関与していることが報告されている。そこで、*P. gingivalis* が産生するタンパク分解酵素の大部分がジンジパインであることから、上清中のジンジパインの存在を確認するために、抗アルギニン-ジンジパイン (RGP) 抗体を用いてウエスタンブロット法で解析を行った。その結果、AIW 溶液処理では約 44-kDa にバンドが認められ、RGP の存在を確認した。AIW 溶液処理による前述のタンパク分解酵素の菌表層からの遊離は、付着阻害にも働くものと示唆された。今後、リジン-ジンジパイン (KGP) に関する検討が必要であると思われる。

一方、ヒト細胞に対する為害性について検討する目的で、ヒト上皮細胞 Ca9-22 株に対する AIW 溶液の毒性について検討した。その結果、AIW 溶液処理では細胞毒性が 10%で、control と有意差は認められず、為害性は低いと考えられた。

以上のように本実験の結果から、AIW 溶液の *P. gingivalis* に及ぼす影響は、pH 依存性を示し、pH が高いほど菌数が抑制されることが確認された。また、長時間の処理では殺菌作用を、短時間では付着能やタンパク分解能など病原性を抑制することが示された。さらに、毒性が低いことからプラークコントロール剤としての臨床応用の可能性が示唆された。今後、口腔内において使用する場合、唾液などの環境因子による影響についても、検討を加えることが必要と思われる。