

論文の内容の要旨

氏名：小 林 慶 美

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Hydroxyl radicals generated from a low concentration hydrogen peroxide with ultrasonic irradiation exhibit bactericidal effect against *Enterococcus faecalis*
(超音波照射により低濃度過酸化水素水から発生したヒドロキシラジカルは *Enterococcus faecalis* に対し殺菌効果を示す)

根尖性歯周炎の主な原因として、根管内の細菌およびその産生物などの病原性因子が挙げられる。感染根管治療の目的は病原性因子の除去と根管の緊密な封鎖であるが、根管形態が複雑な場合にはこれを完全に除去することは不可能である。そこで、一連の感染根管治療において根管系を可及的に無菌状態にするため、多くの消毒用薬剤が使用されてきた。しかし、薬剤漏洩などによる根尖周囲組織への局所的為害作用、発癌性や突然変異誘発性などが指摘されており、生体安全性が担保された新たな根管消毒法を検討する必要がある。

近年、超音波を根管内に加えた液体に照射することで得られたキャビテーション効果による根管清掃法 (passive ultrasonic irrigation: PUI) が推奨されている。複雑な根管系に存在する病原性因子を除去するためには、各種根管治療用切削器具を利用した機械的清掃法と、同法の適用が困難な部位に対する PUI の併用は有効と考えられている。

一方、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の一つである過酸化水素水 (hydrogen peroxide: H_2O_2) に紫外線や超音波を照射すると分解が促進され、異なる ROS が発生し殺菌効果に寄与することが報告されている。根管治療に頻用される代表的な根管清掃剤である 3-5% H_2O_2 に対して、PUI を追加応用することで新たな ROS が発生し、消毒・殺菌効果をより効果的に発現する可能性が考えられる。

そこで著者は、このような H_2O_2 と PUI との併用効果に着目し、生体安全性の高い新規根管消毒法の開発を目的として、超音波照射により H_2O_2 から発生した ROS を同定および定量するとともに、口腔細菌に対する影響を検討した。

第 1 章では、超音波ホモジェナイザー (UR-20P, トミー工業) を超音波発振装置として使用し、低濃度 H_2O_2 に超音波照射した際に発生する ROS を同定および定量するとともに、代表的な難治性根尖性歯周炎の原因菌である *Enterococcus faecalis* に対する影響について検討した。すなわち、0.5 mol/L および 1.0 mol/L H_2O_2 と ROS を特異的に補足するスピントラップ剤である 5 mmol/L 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (CYPMPO) を 0.6 mL マイクロチューブに入れ、超音波ホモジェナイザーのチップを挿入し、出力 10 および 20 W で 1, 2 および 3 分間超音波照射したものを ROS 測定用試料とした。電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance: ESR) 法にてスピンアダクトを測定後、signal intensity として発生した ROS を算出した。なお、コントロールとして H_2O_2 の濃度調整に使用する 25 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.0) を用いた。生成された ROS の *Enterococcus faecalis* JCM 5803 への影響については、菌懸濁液に対して同条件にて超音波照射し、brain heart infusion 寒天培地に塗抹し、培養後、生菌数を colony forming unit (CFU) として算定した。

その結果、すべての測定用試料から ROS の一種であるヒドロキシラジカル (hydroxyl radical: $HO\cdot$) 特有のシグナルである CYPMPO-OH スピンアダクトが 10 および 20 W いずれの条件下で検出され、照射時間の延長に伴って有意に増加した。とくに、1.0 mol/L H_2O_2 に超音波照射を行った群では、0.5 mol/L H_2O_2 およびコントロール群と比較すると、出力の違いにかかわらず、すべての照射時間で有意に高かった。さらに、 $HO\cdot$ の消去剤である dimethyl sulfoxid を添加した際に本スピンアダクトのシグナル強度が減弱したことから、本実験条件下での $HO\cdot$ の発生が確認された。口腔細菌への影響では、出力 10 W の場合で 1.0 mol/L H_2O_2 においては照射時間の延長に伴って生菌数は減少し、3 分間照射で 4 log CFU/mL 以上の生菌数の減少が認められた。また、0.5 mol/L H_2O_2 およびコントロールにおいては、すべての照射時間で生菌数に対数レベルの変化はみられなかった。出力 20 W の場合、いずれの H_2O_2 濃度においても照射時間の延長に伴って生菌数は減少し、0.5 mol/L H_2O_2 では 3 分間照射で、1.0 mol/L H_2O_2 では 2 分間照射でそれぞれ 4 log₁₀ CFU/mL 以

上の生菌数の減少が認められた。一方、コントロールでは照射時間にかかわらず生菌数に対数レベルの変化はなかった。これらのことから、低濃度 H_2O_2 に超音波を照射することによって HO^\cdot が発生し、*E. faecalis* に対して殺菌効果を示すことが明らかとなった。

そこで第2章では、本法の臨床応用を考えて、超音波ホモジェナイザーの代用として臨床で使用されている歯科用超音波発振装置を用いて第1章と同様な検討を行った。すなわち、使用する H_2O_2 濃度は生体安全性を考慮して 0.5 mol/L とし、PUI を模倣するため歯科用超音波発振装置 (ENAC 10W, 長田電機工業) に歯科用超音波チップ (ST21, 長田電機工業) を装着し、0.6 mL マイクロチューブ内の H_2O_2 中にチップ先端を挿入した。発振出力は製造者指示に従って出力目盛3とし、照射時間を30, 60 および90秒間としてROS測定用試料を調製した。なお、溶液として25 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.0) および超音波照射を行わなかったものをそれぞれコントロールとして用いた。生成されたROSは第1章と同様にCYPMPOをスピントラップ剤としてESR法でスピニアダクトを測定後、生成されたCYPMPO-OH濃度を4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidinoxyl (TEMPOL) を標準物質として算出した。*E. faecalis* に対する影響についても第1章と同様の方法でCFUを算定した。

その結果、 H_2O_2 において HO^\cdot の発生を示すCYPMPO-OHスピニアダクトが検出され、照射時間の延長に伴って有意に増加した。とくに、超音波を照射した H_2O_2 では照射しなかったものと比較すると、すべての照射時間で有意に高いCYPMPO-OHスピニアダクトが検出された。さらに、 HO^\cdot の消去剤として0.1 mol/L アスコルビン酸を添加することによってスピニアダクトが消去されたことから、本実験系における HO^\cdot の発生が確認された。なお、Tris-HCl buffer では超音波照射の有無に関わらず、すべての照射時間で有意差は認められず、 H_2O_2 と比較し有意に低かった。一方、*E. faecalis* に対する HO^\cdot の影響においては、90秒間の超音波照射を行った H_2O_2 では他の条件と比較して生菌数に有意な減少は認められたが、第1章の成績でみられたような対数レベルの減少ではなかった。従って、歯科用超音波発振装置を用いて十分な殺菌効果を得るためには、PUIによって発生する HO^\cdot の量を増加させる必要性が考えられた。

本研究の結果から、適切な超音波出力、照射時間および H_2O_2 濃度などを用いることによって低濃度 H_2O_2 から HO^\cdot の発生が可能であり、口腔細菌の生菌数を減少させることが示された。今後、発生した HO^\cdot に対する安全性の検討が必要であると考えられるが、超音波発振装置や超音波チップなどの改良により、新たな根管消毒法として臨床応用が可能であると示唆された。