

## 論文の内容の要旨

氏名：平野 頼 是

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Singlet oxygen generated by a new nonthermal atmospheric pressure air plasma device exhibits bactericidal effect against oral pathogens

（試作大気圧低温空気プラズマ発生装置により生成された一重項酸素は口腔病原性細菌に対して殺菌効果を示す）

代表的な口腔疾患には、齲蝕、歯周病および根尖性歯周炎がある。これらの疾患は細菌による複合感染が原因であり、病変部から多種の細菌が検出される。とくに、各疾患の発症に重要な役割を担っている細菌として、齲蝕では *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)、歯周病では *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) および根尖性歯周炎では *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) や *Porphyromonas endodontalis* (*P. endodontalis*) などが知られている。各疾患の治療では、これらの細菌を排除することは重要であるが、狭小な病変部の解剖学的複雑性などに起因して完全にコントロールすることは困難であり、生体為害性の少ない新たな殺菌方法を検討する必要がある。

近年、大気圧低温プラズマから生成される活性酸素種を利用し、プラスチックなどの様々な非耐熱性製品を対象として殺菌する方法が注目されている。本プラズマは、真空圧力下で用いる従来の方法と異なり、大気圧下で放電し室温程度の気体温度となる。すなわち、照射対象物に熱負荷を与えないため適応範囲が広く、生体への殺菌も可能となる。その特徴を活かし、現在では口腔病原性細菌に対する有効性についても検討されている。しかし、多くのプラズマ発生装置は効率的に活性酸素を生成するために、ヘリウムやアルゴンなどの希ガスを放電気体として利用していることから、付加的な希ガス発生装置が必要となる。そこで著者は、大気を放電気体として用い、空気プラズマを発生させる新たな大気圧低温空気プラズマ発生装置を試作した。本研究では、この装置を用いて活性酸素種である一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) の産生と口腔病原性細菌 (*S. mutans*, *P. gingivalis*, *E. faecalis* および *P. endodontalis*) に対する殺菌効果を検討した。さらに、本装置のプラズマ照射が口腔病原性細菌の酸化ストレスに及ぼす影響についても検討を加えた。

実験に用いたプラズマ発生装置として、高電圧極短パルス電源で大気を放電気体として利用する大気圧低温空気プラズマ発生装置（出力電圧：7.5 ± 0.5 kV、パルス繰返し周波数：200 Hz）を新たに試作した。本装置により産生される  $^1\text{O}_2$  の測定は、電子スピン共鳴（ESR）法を用いた。すなわち、400  $\mu\text{L}$  の phosphate buffered saline (PBS)、50  $\mu\text{L}$ （最終濃度 100  $\mu\text{M}$ ）のスピントラップ剤（2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxy-piperidinol）および 50  $\mu\text{L}$  の蒸留水を 24 ウェルプレート内で混和した。溶液表面より本装置ハンドピース先端までが 1, 3, 5 mm の照射距離で、それぞれ 1, 3, 5, 7 分間照射を行い、それらの溶液を  $^1\text{O}_2$  測定用試料とした。各実験条件の  $^1\text{O}_2$  生成量は ESR 法で測定したスピントラップ剤から得られる信号強度を計測した。また、 $^1\text{O}_2$  消去剤として L-histidine を添加（最終濃度 50  $\mu\text{M}$ ）した試料も同様に測定した。一方、本装置の照射による口腔病原性細菌に対する殺菌効果を検討するために、*S. mutans* ATCC 25175 株、*P. gingivalis* ATCC33277 株、*E. faecalis* JCM5803 株および *P. endodontalis* JCM8526 株を使用した。菌懸濁液作製後、前述した条件下で照射を行い、菌液を希釈して *S. mutans* と *E. faecalis* は brain heart infusion (BHI) 寒天培地にて好気培養し、*P. gingivalis* と *P. endodontalis* は hemin (5 ppm) と menadione (0.5 ppm) を添加した BHI 寒天培地にて嫌気培養した。培養後、各細菌の colony forming unit/mL を算出し、殺菌効果を評価した。なお、L-histidine（最終濃度 50  $\mu\text{M}$ ）を添加した試料についても、同様の方法で殺菌効果を評価した。口腔病原性細菌の酸化ストレスに及ぼす影響は、前述した菌懸濁液にプラズマ照射後、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 生成量および superoxide dismutase (SOD) 活性を測定し、菌のストレスレベルとして評価した。各測定は菌体を破砕した溶液に反応液を添加し、分光光度計にて吸光度を計測する方法で行った。なお、コントロール

としてプラズマ照射を行わなかった試料についても同様に測定した。

実験の結果、本装置から生成される  $^1\text{O}_2$  生成量は、照射時間の延長に伴って有意に増加し、照射距離が長くなるほど有意に減少した。また、L-histidine を添加することによって  $^1\text{O}_2$  は有意に減少した。口腔病原性細菌に対しては、プラズマ照射によって *S. mutans* は照射時間 5 分、*P. gingivalis* は照射時間 1 分、*E. faecalis* は照射時間 7 分および *P. endodontalis* は照射時間 1 分でコロニー形成が認められなかった。また、照射距離の違いによる殺菌効果に有意差はなかった。さらに、L-histidine を添加することによってこれらの殺菌効果は有意に抑制された。プラズマ照射が口腔病原性細菌の酸化ストレスに及ぼす影響では、コントロールと比較して  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成量は有意に増加する一方、SOD 活性は有意に減少し、プラズマ照射によって菌は強い酸化ストレスを受けることが推察された。

以上の結果から、本研究で試作した大気圧低温空気プラズマ発生装置の照射によって  $^1\text{O}_2$  が生成され、口腔病原性細菌に対して酸化ストレスを与えることで殺菌効果を示すことが明らかとなった。したがって、本装置は口腔疾患の原因となる細菌を殺菌する方法として有効であることから、臨床応用への可能性が示唆された。