

## 論文審査の結果の要旨

氏名：伊 澤 万 貴 子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Clarification of the sterilization mechanism of antimicrobial photodynamic therapy for *Candida albicans*  
(*Candida albicans* に対する抗菌的光線力学的療法の殺菌メカニズムの解明)

審査委員：(主 査) 教授 福 本 雅 彦  
(副 査) 教授 辻 本 恭 久  
教授 平 塚 浩 一

口腔カンジダ症（oral candidiasis; OC）は比較的頻繁に遭遇する疾患である。OCは口腔内常在菌の一つである口腔カンジダ菌（特に *Candida albicans*: *C. albicans*）が原因であると言われている。*C. albicans*は、栄養環境によって菌糸型（仮性菌糸型）と酵母型の2つの形を示し、菌糸が粘膜へ侵入、強固に付着する事により再発を繰り返し難治性OCを惹起する事も少なくない。超高齢社会に伴い、要介護者によるOC罹患者は増加傾向にあり、誤嚥による肺真菌症を引き起こす可能性も高くなる事から、口腔ケアの重要性が深く注目されている。従来からOCに対する治療法として、抗真菌薬が使用されているがバイオフィルム深部まで到達せず、結果として耐性菌を生じさせてしまうなどの欠点があった。

近年、副作用が少なくかつ安全である一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) を応用した新規殺菌法である抗菌的光線力学的療法 (antimicrobial Photodynamic therapy: a-PDT) が脚光を浴び、真菌をはじめウイルスなどに対する殺菌効果の有効性が多数報告されている。 $^1\text{O}_2$ は不対電子を持たないためフリーラジカルではないが、活性酸素種に属するので、基質に対する反応性は非特異的であることから繰り返し作用させても耐性菌を生じさせないという大きな利点がある。また、a-PDTは①酸素、②光感受性物質、および③光が必要となるが、肝・腎で代謝される多くの薬剤を服用している要介護者や高齢者にとって、経口投与しないOCの治療法でかつ生体為害性も少ない点において画期的な殺菌法であるといえる。しかしながら、OCに対するa-PDTの有効性を論ずる報告は増えつつあるが、そのエビデンスとなる $^1\text{O}_2$ の発生量と殺菌効果の関連性、および $^1\text{O}_2$ の殺菌メカニズムを検討した報告はない。

そこで本論文では、以下の2つを解明する事を目的とし研究を行った。

1. 光感受性物質である methylene blue (MB) に励起光である 660 nm (200 mW) の半導体レーザーを 600 秒 ( $106 \text{ W/cm}^2$ )、1,200 秒 ( $212 \text{ W/cm}^2$ ) および 1,800 秒 ( $318 \text{ W/cm}^2$ ) 間照射することで発生する  $^1\text{O}_2$  と *C. albicans* の殺菌効果について検討し、OC の治療法に対する a-PDT を行うガイドラインを検討する。
2. 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて a-PDT による *C. albicans* の殺菌メカニズムを経時的に観察する。  
方法は、光感受性物質として MB を、照射源として石英ファイバーのチップ ( $\phi 300 \mu\text{m}$ ) の半導体レーザーを使用し、照射距離を 3 cm と設定した。照射時に発生する  $^1\text{O}_2$  は、電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR) 法を用いて 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (4-oxo-TMP) から 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone-N-oxyl (4-oxo-TEMPO) に変化する量をラジカル標準試薬から得られた signal intensity (SI) に基づいて算出した。その後、得られた  $^1\text{O}_2$  発生量と *C. albicans* の殺菌効果の関係性について検討した。また、a-PDT より発生した  $^1\text{O}_2$  の殺菌メカニズムを形態学的に評価するため、照射 600、1,200 および 1,800 秒後の *C. albicans* の菌体表層を SEM を用いて検討した。レーザーの照射の有無を L(+) または L(-) で、MB の有無を M(+) または M(-) とし、L(+)M(-)群、L(-)M(+)群、L(+)M(+)群、およびコントロール群として L(-)M(-)群の4群を設定した。得られた結果は分散分析後、多重比較検定 (Tukey's test) を有意水準 ( $P < 0.05$ )において行った。

得られた結果は以下の通りである。

1. 4-oxo-TMP を用いた ESR 法より、 $^1\text{O}_2$  が発生した際に生じる 4-oxo-TEMPO を示す 1 : 1 : 1 の ESR シ

ゲナルを得た。照射 600, 1,200 および 1,800 秒後の  $^1\text{O}_2$  発生量は、それぞれ約 82.7, 159.4 および 245.3  $\mu\text{M}$  であった。

2. *C. albicans* の殺菌効果は  $^1\text{O}_2$  発生量に依存的に増加し、99.99%以上の殺菌には少なくとも約 245.3  $\mu\text{M}$  以上の  $^1\text{O}_2$  発生量が必要であった。
3. a-PDT により *C. albicans* 同士の融合や真菌表層に不規則な凹凸が SEM 観察で認められた。

以上の結果より本研究において、カタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼなどの抗酸化酵素を有する *C. albicans* に対しても  $^1\text{O}_2$  は有効であることが示された。また, ESR 法を用いて  $^1\text{O}_2$  量を直接的に検出・定量することにより, *C. albicans* を 99.99%以上殺菌可能な  $^1\text{O}_2$  発生量を明らかにした。さらに a-PDT 療法により, *C. albicans* に対する  $^1\text{O}_2$  の長時間暴露による形態学的変化を SEM で観察したところ, *C. albicans* 表面を傷害し殺菌に至ることが確認できた。

本論文は a-PDT の根拠となる  $^1\text{O}_2$  の発生, それによる *C. albicans* の菌体表面への傷害を経て殺菌する一連のメカニズムを実証したものである。このことは, OC に対して科学的根拠に基づく a-PDT は歯科医療への応用が可能であるものと考え。さらに, 高齢有病者が増加傾向にある本邦において, 副作用が少なく, 安全に行える代替歯科治療法として期待できるものと考え。

よって本論文は, 博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和2年1月23日