

## 論文の内容の要旨

氏名：中西 一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：過酸化水素と 405 nm LED 照射から発生したヒドロキシラジカルによる *Candida albicans* の殺菌効果

2017 年より厚生労働省が人口動態統計の中で「肺炎」から「誤嚥性肺炎」を独立して集計するようになった。誤嚥性肺炎は本邦死因の第 7 位である。肺炎は今後、減少傾向を辿ると予測されている。一方、誤嚥性肺炎は将来的に 2030 年まで増加が予想される。そのため超高齢社会を進む我が国において、今後歯科診療所のみではなく、在宅や介護施設において高齢者の口腔環境を良好に保つことが誤嚥性肺炎予防対策として重要課題とされている。しかしながら、高齢者は加齢や何らかの全身疾患に対する服薬などによる唾液量の減少や歯の喪失により必要となる義歯の清掃不良など口腔環境の悪化を引き起こす因子をもつことが多くなり、とくに義歯床粘膜面においては *Candida albicans* (*C. albicans*) をはじめとする真菌が繁殖する傾向にある。この *C. albicans* により難治性口腔カンジダ症に進行することも稀ではない。さらに、口腔内環境が悪化することで誤嚥により真菌性肺炎を惹起するリスクも高くなる。それ故、*C. albicans* の生息の温床となり得る口腔内装置のデンタルプラークを効率よくコントロールすることは極めて重要であると考えられる。現在、義歯洗浄する方法としては機械的の清掃法と化学的の清掃法が行われているが完全な除菌に至るのは困難を極めるのが現状であり、かつ殺菌には少なくとも一晩薬液に浸すことが望ましいとされている。そのため、本研究では短時間でかつ効率よく殺菌を行うため、抗菌的光線力学療法 (a-PDT) に着目した。そのなかでも、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を用いた可視光分解により発生したヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) を応用する a-PDT は、う蝕病原菌、歯周病関連菌および難治性根尖性歯周炎関連菌に対して有効な殺菌効果を示し、その予防・治療に有効である報告が散見される。しかしながら、難治性口腔カンジダ症や誤嚥性肺炎などの原因菌とされる *C. albicans* に対する知見は乏しい事が現状であり、さらに a-PDT が活性酸素種を使用した殺菌法であるにもかかわらず、発生した  $\cdot OH$  と *C. albicans* の殺菌効果について未だ明らかになっていない。

そこで本研究の目的は、*C. albicans* が繁殖しうる義歯をはじめとする口腔内装置に対して  $H_2O_2$  を光触媒として用いた a-PDT の殺菌効果および a-PDT 洗浄法が安全で科学的根拠に基づく口腔内装置洗浄法としての可能性を評価するため、電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR) 法を応用し発生した  $\cdot OH$  量と *C. albicans* の殺菌効果を検討することである。

$\cdot OH$  発生系の光触媒として 1M  $H_2O_2$  を使用し、光源には可視光 405 nm LED 照射器 ( $8.69 \text{ mW/cm}^2$ ) を用いて最大 300 秒間照射を行った。まず初めに  $\cdot OH$  を用いた a-PDT による殺菌効果を検討するため、*C. albicans* は BHI 培地を用いて  $37^\circ\text{C}$ 、24 時間好気培養を行った。その後、増殖した菌体を遠心分離 ( $10,000 \text{ rpm} \times 10 \text{ min}$ ) し、phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄後、 $1 \times 10^6$  個/mL となるように調整した。実験群は control 群、 $H_2O_2$  群、405 nm 群および 405 nm +  $H_2O_2$  群と設定した。つまり、*C. albicans* の殺菌試験では  $H_2O_2$  ( $510 \mu\text{L}$ ) に対して *C. albicans* 混濁液 ( $90 \mu\text{L}$ ) を混合後、各群の条件にて 60 秒、180 秒および 300 秒作用させ、連続段階希釈法にてサブロー寒天培地に播種し、48 時間好気培養を行ったのち、コロニー数を計測し control 群と比較した生存率を計測した。その結果、control 群および 405 nm 群では 300 秒作用した際、殺菌効果は全く認められなかった。また  $H_2O_2$  群では、作用 180 秒後から生存率 60% 程度、300 秒後で 56% 程度と *C. albicans* の生存率は、control 群および 405 nm 群と比較して有意な低下を示した ( $p < 0.05$ )。一方、405 nm +  $H_2O_2$  群においては作用 60 秒後より生存率が 34% 程度、180 秒後では 7%、300 秒後では 2% と LED 照射時間依存的に生存率の低下を認め、60 秒後以降で control 群、405 nm 群および  $H_2O_2$  群間と比較して有意な *C. albicans* 生存率の低下を認めた ( $p < 0.05$ )。

また  $H_2O_2$  の光分解から発生した  $\cdot OH$  量と *C. albicans* 殺菌効果の関係を検討するため、上記 4 群から発生した  $\cdot OH$  量を ESR 法において測定した。すなわち、DMPO (2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide) を  $\cdot OH$  ラジカル捕捉材として使用し、60, 120, 180, 240, 300 秒後の  $\cdot OH$  発生による酸化によって生じた DMPO 付加物 (DMPO-OH) spin adduct 測定した。さらに得られた spin adduct は、標準マーカであるマンガンマーカとの高さの比からそれぞれ signal intensity (SI 値) を求め、予め測定しておいた安定な標準物質である 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidine-1-oxyl (TEMPOL) の各濃度から得た SI 値と比較することで、発生した  $\cdot OH$  量を定量した。その結果、405 nm +  $H_2O_2$  群では、DMPO-OH の spin adduct を示す 1:2:2:1 (超微細結合定数  $a_N = 1.49 \text{ mT}$ ) を示し、LED 照射時間依存的に  $\cdot OH$  発生量は増加した。すなわち、 $\cdot OH$  発生量は照射 60 秒で約  $59 \mu\text{M}$ 、照射 180 秒で約  $143 \mu\text{M}$  さらに照射 300 秒で約  $179 \mu\text{M}$  であった。また、照射 60 秒後からすべての群間との比較において DMPO-OH 生成量は有意に増加した ( $p < 0.05$ )。また、 $H_2O_2$  群では時間依存的に  $\cdot OH$  発生量は増加したが、control 群と比較し DMPO-OH 生成量に有意な差は認めなかった ( $p > 0.05$ )。一方、control 群および 405 nm 群においてはほとんど  $\cdot OH$  の発生は認めなかった。

以上ことから、 $\cdot\text{OH}$ を応用した a-PDT は *C. albicans* に対して短時間で有効な殺菌効果を示した。さらに *C. albicans* を 60%、90%および 95%以上殺菌するためには少なくとも  $\cdot\text{OH}$  発生量が約 59  $\mu\text{M}$ 、143  $\mu\text{M}$  および 179  $\mu\text{M}$  が必要であることが示唆され、本法は  $\cdot\text{OH}$  発生依存的に殺菌可能な科学的根拠のある洗浄法であるといえる。また、光源出力や  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度の条件設定を変えることによりさらに難治性口腔カンジダ症や誤嚥性肺炎の予防の有効な方法として期待できた。