

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 河相 安彦
(副査) 教授 平塚 浩一
教授 福本 雅彦

現在、日本の人口動態統計における誤嚥性肺炎は死因第 7 位であり、今後も増加傾向にあるといえる。誤嚥性肺炎の原因としては脳血管障害などの後遺症、薬物による副作用、摂食嚥下能力の低下および口腔内環境が挙げられる。そのため、歯科医療介入による嚥下能力の機能向上や口腔内衛生の改善がその予防に大きく寄与するものと考えられる。一方、高齢者の口腔内は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、加齢によるオーラルフレイルや歯の喪失が多くなる現状がある。8020 運動により残存歯数は以前と比較し増加傾向にあるものの、歯の喪失により必要となる義歯装着患者は未だ多く、その義歯の清掃不良が口腔環境の悪化を引き起こす重要な因子となり得る。特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し、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。現在行われている義歯洗浄法は、機械的洗浄と化学的洗浄を組み合わせられることが推奨されているが、化学的洗浄は作用時間も長く完全な殺菌には至らない。そのため、化学的洗浄法を安全で、効率かつ短時間でいう洗浄法が望まれている。そのような背景から、本研究の目的は *C. albicans* が繁殖しうる義歯をはじめ、口腔内装置に対して過酸化水素 (H_2O_2) を光触媒として用いた抗菌的光線力学療法 (antibacterial photodynamic therapy: a-PDT) の殺菌効果および a-PDT 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ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) 量と *C. albicans* の殺菌効果を検討することである。

本研究では、上記目的を達成するために、本論文の著者は 2 つの実験を構成した。

- 1) $\cdot OH$ 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 ($8.69 mW/cm^2$) を用いて最大 300 秒間照射を行った。
 $\cdot OH$ 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 $37^\circ C$ 、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 ($10,000 rpm \times 10 min$) し、phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄後、 1×10^6 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 ($510 \mu L$) に対して *C. albicans* 混濁液 ($90 \mu L$) 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。
- 2) 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、標準マーカーであるマンガンマーカー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、著者は以下の結論を得ている。

- 1) 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 ($p < 0.05$)。

2) 405 nm + H₂O₂ 群では, DMPO-OH の spin adduct を示す 1:2:2:1 (超微細結合定数 aN=1.49 mT)を示し, LED 照射時間依存的に・OH 発生量は増加した。すなわち, ・OH 発生量は照射 60 秒で約 59 μM、照射 180 秒で約 143 μM, さらに照射 300 秒で約 179 μM 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 ($p<0.05$)。H₂O₂ 群では時間依存的に・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・OH の発生は認めなかった。

すなわち, ・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・OH 発生量が約 59 μM, 143 μM および 179 μM がそれぞれ必要であることが示唆された。

以上のことから, 本研究は ESR 法を用いて・OH を検出・定量することによって, H₂O₂ を光触媒とした a-PDT が *C. albicans* の殺菌効果について詳細に解明したものであり, 光源出力や H₂O₂ 濃度の条件設定を変えることにより今後一層 a-PDT が, より有効な口腔内装置洗浄法としての可能性を得た。それ故, a-PDT の活用は誤嚥性肺炎の予防に大きく寄与できると期待され, 意義あるものと評価できる。よって本論文の著者は, 博士 (歯学) の学位を授与されるに値すると認められる。

以 上

令和 3 年 1 月 2 1 日