論文の内容の要旨

氏名：河　野　　　由

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Effects of S-PRG filler eluate on oxidative stress-related oral bacterial growth and pathogenicity
（S-PRG フィラー溶出液が酸化ストレスに関連した口腔細菌の発育と病原性に及ぼす影響）

近年，口腔内細菌叢の遷移および数の増加は齲蝕や歯周病のみならず，糖尿病，誤嚥性肺炎，循環器系疾患およびアルツハイマー型認知症などの全身疾患にも関係していることが多く報告されている。したがって，これらの疾患予防には口腔内細菌叢コントロールを目的とした口腔ケアが重要となる。口腔ケアにおいてブラッシングによる歯垢除去は最も重要であるが，より効果を上げるために消毒薬や抗生薬を配合した口腔ケア剤が使用されている。しかし，消毒薬や抗生薬の使用による口腔内諸組織への傷害や耐性菌の出現などが報告されており，この問題を解決した新しい抗菌成分の発見が必須である。

活性酸素は細胞伝達物質や免疫機能として働く一方，過剰な存在は酸化作用によって細胞を傷害することが知られている。活性酸素の傷害から自らを防御するために抗酸化防御機構が備わっているが，活性酸素の産生が抗酸化防御機構を上回った状態では酸化ストレスが生じ，脂質の過酸化，タンパク質の変性，酵素の失活および DNA の損傷と誤複製が惹起され，がん，心血管疾患および生活習慣病などの発症に関与する。

S-PRG（surface reaction-type pre-reacted glass-ionomer）フィラーは，6 種類のイオン（F^-，Sr^{2+}，Al^{3+}，SiO_3^{2-}，BO_3^{3-}，Na^+）を放出するとともにリチャージ可能な機能を持つ新規生体活性材料であり，歯科では歯質の強化や酸緩衝能による脱灰抑制など幅広い分野での応用が期待されている。S-PRG フィラーから放出されるイオンは動・植物および真菌に酸化ストレスを与えることが報告されているが，口腔細菌に及ぼす影響についての報告はない。

本研究では，S-PRG フィラーを精製水に浸漬して抽出したイオン水（SPE）を供試し，口腔細菌への酸化ストレス誘発と発育抑制抑制効果について検証した。また，発育阻止が認められない濃度の SPE においても為害作用を有する菌の病原性を抑制することができれば疾患発症予防の一助になると考え，低濃度の SPE が口腔細菌の病原因子の付着・凝集能およびタンパク質分解酵素産生能に及ぼす影響も検討した。

酸化ストレス誘発実験では，SPE を各種濃度で添加した BHI または GAM 培地に *Streptococcus mutans*（ATCC25175 株），*S. oralis*（ATCC6249 株）および *Porphyromonas gingivalis*（ATCC33277 株）を接種し，24 時間，好気もしくは嫌気培養後，被験菌を破砕して上清中のスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性，過酸化水素量，酸化型グルタチオン（GSSG）量および総グルタチオン量を各種キットで測定した。発育抑制実験では被験菌としてグラム陽性菌は *S. mutans*，*S. oralis*，*S. gordonii* および *Actinomyces naesulundii*，グラム陰性菌は *P. gingivalis*，*Fusobacterium nucleatum* および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* を用いた。濁度法ではグラム陽性菌は BHI 培地にて，グラム陰性菌は GAM 培地にて 24 時間，好気もしくは嫌気培養後の濁度で評価した。また，寒天平板培地を用いた Colony Forming Unit（CFU）法による測定も行い，濁度法の実験結果と合わせて 50%最小発育阻止濃度（MIC50）を調べた。病原因子への影響についての実験は，まず付着抑制実験としてハイドロキシアパタイト（HA）を *S. mutans* と様々な濃度に調整した SPE 懸濁液に 1 時間浸漬した後，HA に付着した菌数を CFU にて測定することにより検討した。ノイラミニダーゼ（NA）活性の測定は， SPE を種々の濃度で添加した培地で *S. oralis* を培養した後の上清を検体として，NA 活性測定をキットで定量した。*P. gingivalis* の赤血球凝集能は，ヒツジ脱繊維血液に菌と SPE を添加し，37℃，1 時間培養後の凝集を肉眼で判定した。また，*P. gingivalis* を SPE 添加培地で培養後， 培養上清と菌体破砕物中の Arginine-gingipain（Rgp）と Lysine-gingipain（Kgp）の活性を比色定量法で測定することによりジンジパイン活性を調べた。

実験の結果，SOD 活性は *S. mutans* と *S. oralis* においては SPE 添加濃度に依存して増加したが，*P. gingivalis* では変化が認められなかった。過酸化水素量は *S. oralis* と *P. gingivalis* では SPE 濃度依存的

に増加した一方，*S. mutans* においては減少した。GSSG 量は 3 菌株ともに濃度依存的に増加した。SPE 添加により総グルタチオン量は *S. mutans* においては変化が認められなかったが，*S. oralis* と *P. gingivalis* では著しい増加が認められたため，すべての被験菌で SPE により酸化ストレスが発生していることがわかった。濁度法による発育抑制実験結果から，SPE 添加濃度に依存してすべての被験菌の発育抑制が認められた。特にグラム陰性菌では濁度が低く，SPE 濃度 12.5%でほぼすべての被験菌の発育抑制効果が認められた。CFU 法でも同様の効果が認められたため MIC50 の濃度を比較した結果，グラム陰性菌群では両者にほとんど差は見られなかった、しかし，グラム陽性菌では CFU 法の方が低い濃度で発育抑制効果があることがわかり，培養方法の違いに起因することが示唆された。次に，*S. mutans* の付着実験では，SPE 濃度 6.25%より CFU の減少が見られ，25%で著しい付着抑制効果が認められた。また，*S. oralis* の NA 活性は SPE の濃度依存的に低下し，SPE 濃度 12.5%で有意差がみられた。*P. gingivalis* の赤血球凝集能は SPE 濃度 6.25%より低下が見られ，SPE 濃度 3.13%で完全に抑制された。さらに，ジンジパイン活性は SPE 添加濃度に依存して低下したが，Rgp 活性に対しては SPE 濃度 1.56%で低下が認められたのに対して，Kgp 活性においては 0.78%とより低濃度で有意差が認められた。したがって，SPE は低濃度で菌の病原因子を抑制することが明確となった。

以上の結果より，SPE は口腔細菌に酸化ストレスを誘発することにより，口腔細菌の発育を抑制することがわかった。また，SPE は発育抑制の認められない低濃度においても各菌種の有する病原因子の付着・凝集能やタンパク質分解酵素活性能を抑制することが明らかとなった。したがって，S-PRG フィラーは口腔細菌の発育と病原性を制御可能な新規口腔ケア剤の成分として有用であり，臨床応用の可能性と口腔疾患のみならず全身疾患の予防に役立つ可能性が示唆された。