

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	堤 千明
論文審査担当者	主査 鈴木 敏彦 副査 宇尾 基弘 水口 俊介
論文題目	Reduction of <i>Candida</i> biofilm adhesion by incorporation of prereacted glass ionomer filler in denture base resin
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p><緒言></p> <p>義歯性口内炎はしばしば口腔粘膜の痛みや不快感, 味覚の変化を引き起こし, 低栄養を招く. 真菌である (<i>Candida albicans</i>: 以下, <i>C.albicans</i>) の異常増殖は義歯性口内炎の主な原因の一つであり, 義歯の機械的な刺激や患者の全身状態と相まって当疾患は引き起こされる. 従って義歯上の <i>C.albicans</i> バイオフィルムを除去することは義歯性口内炎の発症を防止するために有効である. 現在, 義歯性口内炎に対して抗真菌剤が使用されているがそれらの効果は薬剤耐性などの制限がある. また, 義歯上のプラーク除去という観点で防腐剤や殺菌剤, マイクロウェーブの研究がされているが確立していない.</p> <p>S-PRG フィラーはアルミノシリケートガラスとポリアクリル酸の酸塩基反応で作られ, 複数のイオン (Na^+, Sr^{2+}, SiO_3^{2-}, Al^3, BO_3^{3-}, F など) リリース能があることから歯科材料に歯科材料に使用した場合のバイオアクティブな効果が期待されている. 例えば同フィラーを含有するコンポジットレジンは <i>Streptococcus mutans</i> を含む齲蝕病原菌の抑制に寄与している. 一方で, ホウ酸やフッ化物が <i>C.albicans</i> を抑制する事が知られていることから, 同フィラーを含有する義歯床用レジンよりこれらのイオンが放出されれば義歯表面の <i>C.albicans</i> の付着抑制をする可能性があることを示唆している. しかし, 同フィラーを加熱重合型義歯用 PMMA に含有したときの, 真菌付着抑制効果については現在報告されていない.</p> <p>そこで本研究の目的は, S-PRG フィラーを含有した加熱重合型義歯床用レジン表面の <i>C.albicans</i> 付着における影響を調査することとした.</p> <p><方法></p> <p>加熱重合型義歯用 PMMA (Urban, clear light pink, Lot # 130731, 松風) に S-PRG フィラー (松風) を 0% (Control), 5%, 10%, 20% (重量%) 加えて直径 10 mm, 厚さ 2 mm のディスクを製作した (n=85). ディスク表面は粗さ測定器 (Surfcom Flex, 東京精密) で粗さを確認し, エチレンオキサイドガスで滅菌した後実験に使用した. それぞれの群の試料を超純水 (Milli-Q®) 1ml に浸漬し 24 時間後のイオン濃度を F に関してはフッ素イオン電極 (Orion 9609BNWP, Thermo Scientific), Na^+, Sr^{2+}, SiO_3^{2-}, Al^3, BO_3^{3-} に関しては ICP 発光分析装置 (ICPS-7000, 島津製作所) で測定した.</p> <p>それぞれのディスクを 24 ウェルプレートに入れ, YPD 培地に <i>C.albicans</i> (JCM2085) の酵母型菌体を 10^4 cell/ml 含有するように調整しこれをそれぞれのウェルに 1 ml ずつ入れた. プレートを好氣的に 37 °C, 24 時間培養した後, XTT アッセイとクリスタルバイオレット染色 (CV) を行いミトコンドリアの代謝活性量とバイオフィルムの総量を定量化した. 更にバイオフィルムを Live/Dead® FungaLight™ Yeast Viability キットで染色し共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV10i, オリンパス) を用いて視覚的に厚みを観察した. また, 菌の培養初期 (1 時間と 3 時間) の形態変化を SEM (日立) で観察した.</p>	

<結果>

試験片の表面粗さは含有量 20%が算術平均粗さ (Ra) において Control 群と比較するとわずかであるが有意に増加した ($p<0.05$)。十点平均粗さ (Rz) と最大高さ (Rzmax) に関しては全フィラー含有群が Control と比較してわずかであるが有意に増加したが ($p<0.05$)、フィラー含有群間には有意差が見られなかった。24 時間浸漬後のイオンリリースに関しては全てのイオン濃度はフィラー含有量が増すと有意に上昇した ($p<0.05$)。

次に菌に対する評価の結果を示す。全てのフィラー含有群は Control 群と比較すると有意に低いミトコンドリア代謝活性と有意に少ない総バイオフィルム量を示したが ($p<0.05$)、両評価において、どのフィラー含有群間にも有意差は見られなかった。バイオフィルムの厚みの視覚的評価ではフィラー含有群は Control 群と比較するとバイオフィルムが薄くなった。厚みにおける顕著な違いはフィラー含有群間では見られなかった。SEM 画像では Control 群は 1 時間で菌糸型が出現しており、3 時間では長い菌糸を伸ばす菌が顕著に多く見られた。一方で、全てのフィラー含有群は 1 時間で菌糸型がはっきりと見られず、3 時間では菌糸型が出現するが、その菌糸の長さは Control と比較すると短かった。

<考察>

本研究では、研磨された義歯用 PMMA 表面の *C.albicans* の付着・増殖は S-PRG フィラーを 5% (重量%) 以上含有すると減少することが示された。これは *C.albicans* が付着し比較的初期の段階で、酵母型から菌糸型への変換が阻害されたことに関連があると考えられる。

本研究では、フィラー含有群間ではミトコンドリアの代謝活性、総バイオフィルム量そしてバイオフィルムの厚みにはわずかな差しか見られなかったがこれらの結果に関しては本研究内で説明できないがフィラー含有群の表面粗さの有意な増加があったことは注目すべき点である。表面粗さは *C.albicans* の酵母型から菌糸型への変換を促進し、菌糸は接触屈性を利用してレジン上の隆起や傷に入り込み成長しバイオフィルムを形成する。表面粗さは $Ra=0.2\ \mu\text{m}$ を下回ると、付着した菌の病原性や総量において有意な差が出ないとされている。本研究では Ra を $0.1\ \mu\text{m}$ 未満としたが顕微鏡下でのフィラー含有群の表面の凹凸は明らかでフィラー含有に伴う表面粗さの増加がミトコンドリアの代謝活性、総バイオフィルム量そしてバイオフィルムの厚みの更なる減少を制限している可能性は考えられる。

PMMA に含有される S-PRG フィラーが 20%よりも多くなると曲げ強さは ISO1567 の要件を満たさなくなる。そこで本研究では 20%よりも多いフィラー含有量では実験を行わなかった。*C.albicans* に対する S-PRG フィラーの効果のメカニズムは過去の報告より予想することができる。ホウ酸は *Candida* 細胞膜を不安定にし、菌糸先端の細胞骨格要素を崩壊させ増殖を阻害する。またフッ化物は酵母の形質膜と相互作用し抗真菌効果を発現する。更にナトリウムは高浸透圧ストレス環境を作り出し、菌の増殖速度を低下させる。上記の報告は S-PRG フィラーより放出されるいくつかのイオンが *C.albicans* に対して抗真菌効果があることを示している。*C.albicans* (10^7cell/ml) を抑制する BO_3^{3-} の濃度は 177ppm であるが、本研究ではこのイオン濃度よりも試験片からの BO_3^{3-} のリリース量は低濃度であった。また、これまでに報告されている F⁻の有効量よりも本研究での F⁻リリース濃度は低かった。過去の研究では、*C.albicans* への抗真菌効果をもたらす効果的な溶液中の抗真菌物質の濃度を調査しているが、本研究ではディスク表面での抗真菌効果を調査している。従って、リリースされた BO_3^{3-} 及び F⁻ の濃度が過去に報告されてきた効果的な濃度よりも少ないという事実はこれらのイオンの *C.albicans* への阻害効果を必ずしも否定するものではない。そして BO_3^{3-} 、F⁻、Na⁺ (浸透圧) の小さなストレスの複合ストレスが *C.albicans* の殺菌や増殖抑制に関して影響を及ぼしていることも考えられる。

<結論>

本研究では S-PRG フィラー含有加熱重合型義歯床用レジンの表面への *C.albicans* 付着・増殖は抑制されることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲第 5006 号	堤 千明
論文審査担当者	主査 鈴木 敏彦 副査 宇尾 基弘 水口 俊介	
論文題目	Reduction of <i>Candida</i> biofilm adhesion by incorporation of prereacted glass ionomer filler in denture base resin	
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>義歯性口内炎は口腔内の清掃が困難となった義歯装着患者にとって大きな問題となっている。口腔粘膜の痛みや不快感、味覚の変化を引き起こし、その結果として低栄養を招く。真菌である <i>Candida albicans</i> の異常増殖は義歯性口内炎の主な原因の一つであり、義歯上の <i>C.albicans</i> バイオフィルムを除去することは義歯性口内炎の発達を抑制するための第一選択となる。抗真菌剤や防腐剤、殺菌剤などの薬剤は持続的に予防的な投与をすることが難しく、義歯性口内炎に対する治療及び予防の手段を確立することは臨床上極めて重要である。</p> <p>今回、堤らは新規材料である S-PRG フィラーを添加した義歯用 PMMA の <i>Candida</i> バイオフィルムの付着・増殖抑制効果について検討した。S-PRG フィラーのう蝕病原菌に対する効果は多く報告されてきたが、<i>C. albicans</i> に対する効果は未だ報告されておらず新しい義歯性口内炎に対する治療及び予防法として今後期待される。</p> <p>試験に使用されるアクリルレジンドディスクは S-PRG フィラーを加熱重合型義歯用 PMMA に重量%0 (Control) , 5, 10, 20%含有させて製作した。全ての試験片の表面粗さを測定し試験片を超純水に浸漬してリリースされたイオン Na⁺, Sr²⁺, SiO₃²⁻, Al³⁺, BO₃³⁻, F⁻の元素量を測定した。それぞれのディスク上で <i>C.albicans</i> (JCM2085) を培養し、ミトコンドリア活性代謝の定量、バイオフィルムの総量の定量、バイオフィルムの厚みを測定し、更に菌の培養初期 (1 時間と 3 時間) の形態変化を観察した。</p> <p>本研究で得られた主な結果は以下の通りである。</p> <p>試料表面の粗さはフィラー含有量の増加に伴い有意に増加した。バイオフィルムの評価では代謝活性量と総バイオフィルム量が全フィラー含有群で Control よりも有意に少なくなった。バイオフィルムの厚みはフィラー含有群が Control よりも薄くなる傾向があった。また、SEM の結果では、全ての群において 3 時間で菌糸が現れたが、菌糸の長さは Control よりも短い傾向があった。</p> <p>本研究の結果より、S-PRG フィラーよりリリースされる各種イオンは複合的に菌に働くことで菌糸の発達を抑え、静菌的に働いていると示唆された。このことより同フィラーを含有する義歯用 PMMA が義歯性口内炎に対して、治療及び予防的な効果を発揮することが期待できる。</p> <p>本研究において同フィラーを添加した加熱重合型義歯用 PMMA が <i>C.albicans</i> に効果があることを示したことは、確立した治療及び予防手段のない義歯性口内炎の新しい治療・予防法として今後応用できる可能性が高いという意味で、臨床的意義が大きい。本研究は綿密な研究計画をもとに実施され、適切な解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。</p> <p>以上の成果は今後の歯科医学の発展に寄与するところが大きく、よって、本論文は博士 (歯学) の学位を申請するに十分値するものと認められた。</p>		