

氏名(本籍) : 佐久間 陽 子

学位の種類 : 博士 (歯学) 学位記番号 : 歯博第553号

学位授与年月日 : 平成23年3月25日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : 蛍光色素 alamar Blue® を用いた義歯材料表面への口腔細菌付着量の新規定量法の開発とその応用に関する研究

論文審査委員 : (主査) 教授 佐々木 啓一
教授 高橋 信博 教授 鈴木 治

論文内容要旨

目的 : 義歯プラークバイオフィームは、種々の口腔疾患や誤嚥性肺炎の原因になることが示唆されており、これらの付着・形成を軽減する方法や義歯材料の開発が強く求められている。そのためには、義歯表面に付着する細菌を定量評価することが不可欠であるが、これまでは放射性同位体 (RI) や電子顕微鏡を用いた方法が主であり、簡便で正確な評価が難しかった。近年、一部の細菌を対象に alamarBlue® などの蛍光色素を使用した非 RI 定量評価法が検討されている。そこで本研究では、代表的口腔細菌 (*Streptococcus mutans* (Sm), *Streptococcus sanguinis* (Ss), *Actinomyces naeslundii* (An), *Actinomyces oris* (Ao), *Veillonella atypica* (Va)) を対象として、alamarBlue® を用いたアクリルレジン (PMMA) への細菌付着定量法を検討し、特に代謝基質添加により、より高感度で高精度な定量法の確立を図り、実際に義歯に使われる材料への付着定量を試みた。

材料と方法 : 各菌懸濁液を作成し、代謝基質の有無で alamarBlue® を加えて蛍光強度の増加を測定し、その感度と定量性を検討した。次に、新規に考案した細菌付着定量装置を用いて、alamarBlue® による各種細菌の PMMA への付着を定量した。PMMA 表面は唾液あるいは KCl buffer (control) で表面処理後、菌懸濁液を加えて細菌を付着(2時間)させた後、余分な細菌は KCl buffer で洗浄した。代謝基質の有無で alamarBlue® 液を加え、付着細菌による蛍光強度の増加を測定した。付着細菌量は、菌量-蛍光強度曲線より算定した。さらに、本定量法を用いて各種汎用義歯材料 (PMMA, 超速硬性常温重合型レジン, 常温重合型レジン, シリコン系軟質裏装材) への細菌付着量の評価を行った。

結果 : Sm, Ss, Ao, Va の菌量は alamarBlue® によって定量可能であることが示された。さらに、代謝基質の添加により定量感度は 6.5 - 110 倍に向上し、測定時間も 3 時間から 30 分へ短縮できた。An においては、菌量-蛍光強度曲線の直線性が改善し定量精度も向上した。本定量法を用いて各細菌の PMMA への付着量を比較したところ、高い順に Ao, Va, An, Ss, Sm であった。PMMA 表面の唾液処理によって Ao と Sm の付

着は増加し、Va, An, Ssの付着は減少した。また各種材料への付着は、材料の違いや細菌種により多様な結果を示した。

考察:新規に考案した細菌付着定量装置と代謝基質を添加した alamarBlue® 法を用いることにより、高感度、高精度、かつ非 RI で簡便な付着細菌定量法を確立し、各種義歯材料試験面への細菌付着量の定量が可能となった。本方法で付着量を定量した結果、細菌種、表面の唾液処理の有無、材料の違いによって付着量が大きく異なり、細菌及び材料の種類によって細菌付着機構が異なる可能性が示唆された。本研究で確立した新規定量法は、義歯材料だけではなく、広くバイオマテリアルへの付着細菌の定量に応用できるものと思われる。

審 査 結 果 要 旨

デンチャープラークは、残存歯のう蝕・歯周病や義歯性口内炎などの口腔疾患のみならず誤嚥性肺炎などの全身疾患の原因となりうることを示されている。高齢化が進んだ本邦では、有床義歯を装着している高齢者が未だに多く存在し、これら患者の健康の維持、増進を図るうえでは、デンチャープラークの付着・形成を軽減する方法や、付着しない義歯材料の開発が強く求められている。このような技術開発に当たっては、義歯表面に付着した細菌の定量評価法の確立が不可欠である。しかし、これまでの細菌の定量評価法は放射性同位体(RI)で標識した細菌を用いる方法や電子顕微鏡で付着細菌を直接観察・算定する方法が主であり、簡便で正確な評価が難しかった。

そこで本研究では、近年、一部の細菌を対象に検討されている蛍光色素 alamarBlue® を使用した非 RI 定量法を応用してアクリルレジン (PMMA) への細菌付着量の定量を検討し、特に細菌の代謝基質添加により、より高感度で高精度な定量法の確立を図り、実際に使われる種々の義歯材料に対する各種口腔細菌の付着量の定量を試みている。さらに、定量法の確立にあたっては、新規の細菌付着量装置の考案を行っている。

実験では、代表的口腔細菌 *Streptococcus mutans* (Sm), *Streptococcus sanguinis* (Ss), *Actinomyces naeslundii* (An), *Actinomyces oris* (Ao), *Veillonella atypica* (Va) を対象として、各菌懸濁液を作成し、代謝基質の有無で alamarBlue® を加えて蛍光強度の増加を測定し、その定量感度と定量精度を検討した。次に、これらの結果に基づき、alamarBlue® による各種細菌の PMMA への付着を、新規に考案した細菌付着量定量装置を用いて評価した。さらに、本定量法を用いて各種汎用義歯材料 (PMMA, 超速硬性常温重合型レジン, 常温重合型レジン, シリコン系軟質裏装材) への各種細菌の付着量の評価を行った。

Sm, Ss, An, Ao, Va の義歯材料への付着細菌量は alamarBlue® を用いた新規細菌付着量装置によって定量可能であることが示された。代謝基質の添加により定量感度は 2.3 ~ 110 倍に向上し、それに伴い定量精度も向上した。さらに、測定時間も 3 時間から 30 分へ短縮できた。加えて、細菌付着量は、材料の違いや細菌種により多様な結果を示すことを明らかにした。

本研究により、新規に考案した細菌付着量装置と代謝基質を添加した alamarBlue® 法を用いて高感度、高精度かつ非 RI で簡便な付着細菌定量法が確立され、各種義歯材料試験面への細菌付着量の定量が可能となった。本研究で確立した新規定量法は、義歯材料だけではなく、広くバイオマテリアルへの付着細菌の定量に応用できるものであり、歯科補綴学、歯科生体材料学の発展に大きな貢献をするものである。よって本論文は、博士 (歯学) の学位に相応しい論文と判断するものである。