

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 26 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20471

研究課題名(和文) 感染根管治療のための大気圧低温プラズマによる無菌化グレードの新規殺菌技術の開発

研究課題名(英文) Development of a novel microbicidal technology with sterilization grade using atmospheric low frequency plasma for root canal disinfection therapy

研究代表者

山崎 弘光(Yamazaki, Hiromitsu)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：20609929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧低温プラズマ照射およびプラズマ処理水を用いた感染歯質を完全に殺菌できる新たな治療技術の開発を目指し、感染歯質モデルおよび感染根管モデルを用いた口腔病原微生物に対する殺菌効果の評価を行い、臨床応用の可能性を評価することを目的とした。口腔内細菌として難治性根尖性歯周炎関連病原体の感染歯質および感染根管モデルで検討したところ、プラズマ照射では十分な効果が得られなかったが、産生活性種を濃縮できるプラズマ処理水では検出限界以下までに殺菌され、ラットを使ったin vivoモデルでも同様の効果が示された。したがって、プラズマ処理水は感染歯質を無菌化グレードに殺菌できる新たな技術であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科医療での感染性微生物のコントロールはきわめて重要であるが、複雑な微細構造を持つ歯質の無菌化方法は未だ確立されていない。感染根管治療では、強力な消毒薬を用いるため事故例や残留毒性の問題が報告されているが、治療後20～30%程度が再発するとされている。これらを解決する新たな殺菌方法の開発が必要と考えられたので、大気圧低温プラズマ技術に着目し感染歯質を完全に殺菌できる治療技術の開発を目的とし研究を行ったところ、プラズマ処理水が期待していたレベルの結果を示し、臨床応用の可能性が期待された。それにより、歯質の切削が最小限に抑えられ、残存歯質を生かした補修治療法が生まれる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：For the development of a new treatment technology that can completely disinfect the infected teeth using atmospheric pressure low temperature plasma irradiation and plasma treated water, the purpose of this study was to evaluate the possibility of clinical application by evaluating bactericidal effects against oral pathogens using infected tooth model and infected root canal model.

When treated with the infected tooth and infected root canal model of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, which are intractable apical periodontitis related pathogens, although the plasma irradiation did not have a sufficient effect, plasma-treated water that can concentrate active species was able to sterilize to below the detection limit, and similar effects were shown in an in vivo model using rats. Therefore, it has been shown that plasma-treated water is a new technology capable of sterilizing infected tooth quality to a sterilization grade.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：プラズマ医療 感染根管モデル 感染歯質モデル 殺菌効果 プラズマ処理水

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

物質の状態は通常、固体、液体、気体であるが、プラズマは物質の第4の状態である。一般にプラズマは放電することにより生成され、物質は非常に高温になることで電離してイオンと電子に解離しプラズマになり、反応性が高いことが特徴である。近年、応用物理学の分野で真空装置を必要とせず大気圧下にて比較的簡単に生成可能な大気圧低温プラズマが注目されている¹⁾。研究協力者である大阪大学大学院工学研究科で考案された大気圧低温プラズマ発生装置は、安価で簡単なメカニズムでプラズマ照射が可能であり、歯科臨床の現場で将来的に広く使用できる可能性を十分に有している³⁾。従来のプラズマ装置と異なる利点は、発生させたプラズマの温度が指で触れられるほど低温であるにもかかわらず、電子温度は高いため、高エネルギーで反応性の高いプラズマが得られることである²⁾。このような大気圧低温プラズマを安定して発生させられることにより、今まで困難であった口腔内でのプラズマ照射を可能にし、感染歯質に対しての殺菌など歯科応用の可能性が広がってきた。

歯科臨床の場で口腔内微生物(おもに根管内および根尖の微生物)に対する処置としては、リーマーやファイルを使用して行う機械的拡大や洗浄、あるいは、水酸化カルシウムに代表される各種薬剤による貼薬、レーザー照射、イオン導入法など様々な研究がなされてきている。う蝕に継発する歯髄炎は大部分が微生物による感染が原因であり、その後根管治療が行われるが、その成功率は70-80%程度である。根管治療の予後不良の原因は根管内の殺菌と封鎖性が不完全であることによると考えられている。このことから感染象牙質を完全に無菌化できるような新たな治療術式の開発が求められている。鶴見大学に導入された上記プラズマ生成装置を用いた実験により、口腔内微生物 *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* の基準菌株に対する殺菌効果を、寒天培地表面、液相中浮遊菌を用いて検証し、非常に高い殺菌効果を確認している⁴⁾。口腔内微生物に対して殺菌効果が認められたことから、歯科臨床応用の可能性が高まっており⁵⁾、感染象牙質の無菌化に向けた次なる検証として歯科臨床応用するために、感染歯質モデルおよび感染根管モデルを用いた口腔内微生物に対する殺菌効果の評価が必要である。

大気圧低温プラズマの殺菌効果は、産生される短寿命活性種によるものであることがわかっており³⁾⁵⁾、その活性種をより高濃度に根管内に供給するため、直接照射だけでなく、活性種を濃縮したプラズマ処理水を作成し注入することで、感染歯質モデル内部の微細構造にまで侵入した口腔内微生物に確実な殺菌効果をもたらすと予想される。この技術により感染歯質を完全に殺菌できれば、根管治療における新たな治療技術の開発に繋がるため、臨床応用の可能性を探る基礎研究として、本研究を立案した。特に歯科分野でのプラズマ医療において、小動物を用いた *in vivo* での殺菌評価は他に実施例が無く、今後の臨床応用の可能性を評価する意味でもきわめて重要な知見をもたらすと考えられる。

<参考文献>

- 1) 北野勝久, 浜口智志: 低周波大気圧マイクロプラズマジェット. 応用物理 77(4):383-389 2008.
- 2) 北野勝久, 浜口智志: 冷たいプラズマによる液中化学反応 - 重合から殺菌まで - 現代化学 460(7)25-31, 2009.
- 3) 北野勝久, 井川 聡, 浜口智志: 小型プラズマ発生装置を用いた殺菌. 月刊バイオインダストリー26(6)16-22, 2009.
- 4) 山崎弘光, 大島朋子, 坪田有史ほか: 低周波大気圧プラズマジェットによる口腔病原微生物に対する殺菌効果の検討. 日本歯科理工学会誌 30(3) 175-176, 2010
- 5) H.Yamazaki, T.Ohshima, Y.Tsubota, H.Yamaguchi, A.Jayawardena Y. Nishimura: Microbicidal activities of low frequency atmospheric pressure plasma jets on oral pathogens. Dent Mater J, 2011; 30(3): 384-391.

2. 研究の目的

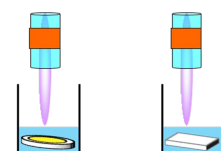
歯科医療において感染性微生物のコントロールはきわめて重要であるが、複雑な微細構造を持つ歯質の無菌化方法は未だ確立されていない。現在の感染根管治療では、強力な消毒薬を用いているにもかかわらず、システムティックレビューでは治療後20~30%程度が再発するとされている。また、強力な消毒薬による事故例や残留毒性による有害事象例も報告されている。したがってこのような問題点を克服できる新たな殺菌方法の開発が必要と考えられる。そこで大気圧低温プラズマおよびプラズマ処理水を用いた感染歯質を完全に殺菌できる新たな治療技術の開発を目指し、感染歯質モデルおよび感染根管モデルを用いた口腔病原微生物に対する殺菌効果の評価を行い、臨床応用の可能性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 感染歯質モデルを用いた大気圧低温プラズマ照射による殺菌効果の検討

歯冠部象牙質を厚さ2mmにスライスし、超音波洗浄後の試料、および歯の主要無機成分であるハイドロキシアパタイトペレットを象牙質比重(2.14g/cm³)と同等レベルに焼成させた試料を121、15分間オートクレーブ後、10⁶-10⁷CFU/10μlに調整した *Enterococcus faecalis*, *Candida*

プラズマ照射イメージ

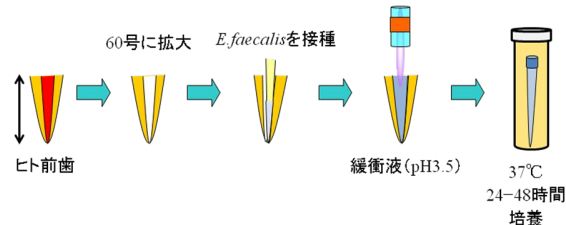


albicans をハイドロキシアパタイトペレットおよび象牙質スライスに接種して一晚培養し感染歯質モデルとした。

マイクロプレートに感染歯質モデルとクエン酸緩衝液 (pH3.5, 4.5) 500 μ l 入れ、5 分間プラズマ照射を行い、緩衝液を取り除き、評価は細菌の呼吸活性を検出する Redox indicator (Alamar Blue, TREK Diagnostic Systems, CA, USA) の蛍光度で生菌数を評価した。

(2) 感染根管モデルを用いた大気圧低温プラズマ照射による殺菌効果の検討

ヒト抜去前歯の歯冠部を切断し、歯根部 10mm に規定。歯根部を抜髄し、60 号ファイルで根管拡大後、*E. faecalis* を接種して一晚培養し感染根管モデルを構築した。根管内にクエン酸緩衝液 (pH3.5) を注入後にプラズマを照射し、滅菌ペーパーポイントを根管内に挿入・浸漬したものを液体培地にて培養した。37、24-48 時間培養後、濁度により無菌化の判定を行った。



(3) 感染根管モデルを用いたプラズマ処理水による殺菌効果の検討

(2)と同様の感染根管モデルを使用した。大気中で滅菌水に大気圧低温プラズマを数分間照射し、プラズマ処理水を作製し、プラズマ処理水を根管内に注入し、1 分間浸漬後、滅菌ペーパーポイントを根管内に挿入・浸漬したものを液体培地にて培養した。37、24-48 時間培養後、濁度により無菌化の判定を行った。

(4) 感染根管動物モデルを用いたプラズマ照射・処理水の殺菌効果の検討

ラット (Wistar 系) を用い臼歯を抜髄後、培養微生物を感染させ、感染根管動物モデルとした。上記(2)、(3)と同様な方法により殺菌効果の評価を行った。



4. 研究成果

(1) 感染歯質モデルを用いた大気圧低温プラズマ照射による殺菌効果の検討：口腔細菌として難治性根尖性歯周炎起因菌で作成した感染歯モデルで、大気圧低温プラズマ照射試験をしたところ、殺菌効果の評価は細胞の呼吸活性を検出する Redox indicator の酸化型と還元型の量比を検出し、照射時間を決定した。その条件での試験結果から、どちらの系でも検出限界以下となり、プラズマ照射による殺菌の有効性が示された。

(2) 感染根管モデルを用いた大気圧低温プラズマ照射による殺菌効果の検討：ヒト抜去前歯を抜髄、根管拡大後、(1)同様に菌を接種して培養し、感染根管モデルを構築し大気圧低温プラズマ照射し殺菌効果を評価した。評価ポイントは照射後、再培養し検出限界以下であることを判断する濁度判定で行ったが、検出限界以下の結果が得られたものは半数程度であった。このことから、細長い空間である感染根管にはプラズマ直接照射により生成される活性種が行き届かないものと考えられたので、それを解決するために活性種を濃縮方法で作成するプラズマ処理水の殺菌効果を検討することとした。プラズマ処理水を作成し、使用微生物に対するプラズマ処理水の最小発育阻止濃度 (MIC)、最小殺菌濃度 (MBC) を試験管内で測定すると、高い殺菌力を確認することができた。次にヒト抜去前歯の感染根管モデルでプラズマ処理水の有効性を検討したところ、十分な殺菌効果が得られるに至った。

(3) 実験動物での感染モデルでの検証：in vitro に加え、実験動物での感染モデルをラットの臼歯において作成し、プラズマ処理水での殺菌効果の検討を行った。その結果、検出限界以下にまで病原微生物を抑制できることが示された。

したがって、感染歯質および根管の殺菌には、プラズマ直接照射より、プラズマ処理水の効果の有効性が高く、無菌化グレードに近い状態が得られることがわかった。これは歯科医療における新たな殺菌技術を提供すると期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamamoto K, Ohshima T, Kitano K, Ikawa S, Yamazaki H, Maeda N & Hosoya N. Low-temperature atmospheric pressure plasma in root canal disinfection: the efficacy of plasma-treated water as a root canal irrigant. Asian Pacific J Dent. (査読有) 17. 2017. 23-30.

〔学会発表〕(計 1 件)

Kaname Yamamoto, Tomoko Ohshima, Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Hiromitsu Yamazaki, Noriyasu Hosoya, Nobuko Maeda. Efficacy of Plasma-Treated Water in Root Canal Disinfection, 94th General Session & Exhibition of the IADR. 2016.

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大島 朋子、前田 伸子、山本 要、細矢 哲康、井川 聡、北野 勝久

ローマ字氏名：(OHSHIMA Tomoko, MAEDA Nobuko, YAMAMOTO Kaname, HOSOYA Noriyasu, IKAWA Satoshi, KITANO Katsuhisa)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。