

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	森田 侑宜
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 堀田 正人 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 玉置 幸道 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 村上 幸孝
論文題目	
新規 Zn 置換 Hydrotalcite の歯周病関連菌産生 H ₂ S の吸着効果と抗菌作用	
論文内容の要旨	
<p>【目 的】</p> <p>口腔内で産生した揮発性硫黄化合物 (Volatile Sulfur Compounds 以下, VSC) は唾液中に溶解し, 揮発することで悪臭となる. したがって, 口腔内は唾液に満たされており, 液相中での除去が不可欠である. そこで本研究では, より口腔内に近い条件下で吸着能の優れたセラミック多孔体である Hydrotalcite (HDT) の開発に取り組み, 500°C で熱処理した MgHDT500 と Mg を Zn に置換した新規 ZnHDT を合成した. さらに, 偏性嫌気性菌の歯周病関連菌を用いて, 供試菌培養下における各種 HDT を混入した場合の H₂S 濃度をガスクロマトグラフで測定し, H₂S 吸着効果と供試菌に対する増殖度から各種 HDT に抗菌作用を有するかどうかを明らかにし, 口臭抑制材料として臨床応用が可能な材料であるかどうかを検討した.</p> <p>【材料および方法】</p> <p>1. 供試材料とその分析評価</p> <p>各種 HDT の合成は MgHDT: $[Mg_{1-x}Al_x(OH)_2][A^{n-}_{x/n} \cdot mH_2O] (A^{n-}:CO_3^{2-}, x=0.33)$ と, ZnHDT: $[Zn_{1-x}Al_x(OH)_2][A^{n-}_{x/n} \cdot mH_2O] (A^{n-}:CO_3^{2-}, x=0.33)$ を共沈法により行った. また, MgHDT を電気炉にて 500°C で 30 分間熱処理したものを MgHDT500 とし, 3 種類の HDT を用いた. 合成物は, 粉末の合成面を X 線回折 (XRD) し, フーリエ変換赤外分光装置 (FT-IR) と分析ソフトでスペクトル解析を行った. さらに FE-SEM で観察し, エネルギー分散型 X 線分析装置 (EDS) を用いて組成分析した.</p> <p>2. H₂S 濃度の測定</p> <p>1) 標準物質の測定と検量線の作成</p> <p>H₂S は標準物質を用いて, N₂ で希釈し, 濃度を 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10ppm となるように調整後, 各濃度の H₂S を 3ml 採取し, ガスクロマトグラフに注入した. H₂S は 3.358 秒の保持時間にピークが現れ, 各濃度の H₂S について 3 回繰り返して, 得られたピーク面積から検量線を作成した.</p>	

2) 供試細菌の H₂S 濃度の測定

細菌由来の H₂S 濃度を測定するため、*Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (*F. nucleatum*) , *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (*P. gingivalis*) , *Prevotella intermedia* ATCC 25611 (*P. intermedia*) , *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (*S. mutans*) を用いた。各菌の培養方法は藤井らの方法に準じて 37°C で嫌気培養後、アシストチューブに L-システイン添加の菌液を 2ml ずつ分注し、アシストチューブ内の気体を直ちにガスクロマトグラフに注入し、H₂S を 1 週間測定した。

3) *F. nucleatum* に各種 HDT を混入した試料の H₂S 濃度の測定

4 菌種の中で最も H₂S を産生した *F. nucleatum* を同様の方法で培養したアシストチューブ内に MgHDT, MgHDT500, ZnHDT 試料をそれぞれ 0.02g 加えたものと HDT なしのを試料とした。H₂S 測定には、アシストチューブ内の気体を供試細菌の H₂S 濃度測定と同様に濃度測定を行った。測定時間は、2 時間おきに 8 時間行い、合計 3 回実施した。また、得られた値は、一元配置分散分析 (ANOVA) と多重比較検定 Fisher' s PLSD test ($\alpha=0.05$) を用いて有意差検定を行った。

3. 細菌増殖試験

H₂S 濃度測定と同様に培養し、アシストチューブに 4 ml ずつ分注後、MgHDT (0.04g) , MgHDT500 (0.04g) , ZnHDT (0.04g) を別々に加え、37°C で嫌気培養を行った。菌液を接種後、培養液の OD 値を分光光度計にて 600nm の波長により経時的な増殖曲線を求めた。また、細菌増殖曲線にて HDT を添加していない菌液の OD 値が 1.0 に到達した時間における各種 HDT を添加した菌液の生菌数を Colony Forming Unit (CFU/ml) にて算出した。

【結果および考察】

1. MgHDT 試料は典型的な MgHDT の XRD と比較して、ピークの強度はほとんど一致していた。FT-IR から炭酸型であった。MgHDT500 は XRD から MgO のピーク位置、強度が比較的一致し、アモルファス相の存在が示唆された。FT-IR から層間に含まれる層間水と炭酸イオンの脱離が確認された。ZnHDT は XRD から典型的な ZnHDT と回折角、強度が一致し、MgHDT 試料に比べて結晶性が高かった。FT-IR から炭酸型であることが確認された。

2. HDT の SEM 像と EDS 分析結果から、MgHDT は 0.2~0.3 μm の粒子の凝集で、EDS から Mg/Al 比は 2.0 の組成のものが得られていた。MgHDT500 は 0.2~0.3 μm の粒子の凝集はなくなり、粒子間の隙間が小さくなっていた。Mg/Al 比は 1.9 であり熱処理前と変化はなかった。ZnHDT は 0.2~0.3 μm の板状晶であった。MgHDT とは異なり粒子の凝集はなかった。ZnHDT の Mg/Al 比は 2.0 であった。

3. 各種供試菌の H₂S 濃度の経時変化は、各菌液とも H₂S の産生を認めたが、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* が最初の 8 時間で最も産生し、その後減少した。*P. intermedia* は 40 時間後でピークに達し、その後減少した。最も H₂S を産生したのは、*F. nucleatum* であった。

4. *F. nucleatum* に各種 HDT を添加した試料の H₂S 濃度は、ZnHDT が 2 時間後ですでに H₂S は検出されず、8 時間までほとんど検出されなかった。MgHDT と MgHDT500 は 4 時間後までは HDT なしの場合と同程度の H₂S 濃度であったが、6 時間と 8 時間後では MgHDT500 の H₂S 濃度が低下し、8 時間後には MgHDT が HDT なしの H₂S 濃度に比べて低下した。

5. 各種 HDT の *F. nucleatum* は、HDT なしと比べて、MgHDT と MgHDT500 の発育曲線はほとんど同じで、菌への発育の影響はほとんどなかった。ZnHDT は 4 時間後から発育の影響を認め、30 時間まで持続していた。また、ZnHDT は CFU においてもコロニー数の低下を認めた。

*F. nucleatum*が産生した H₂S 濃度の著しい低下は、ZnHDT の硫化物に対する吸着性によるものと細菌の増殖を抑制する作用によることが、本実験から示唆された。

【結 論】

Zn を含むセラミック多孔体である ZnHDT は、液相環境においても VSC を効率的に除去でき、VSC を発生する細菌に対して抗菌性を示すことから、唾液や口腔内細菌の影響が考えられる口臭を抑制することに効果的であり、臨床応用に有用であることが示唆された。

