

令和元年6月26日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11229

研究課題名(和文) 大気圧低温プラズマ処理を利用した再生医療における低侵襲性の組織無菌化に関する検討

研究課題名(英文) Study on minimally invasive tissue sterilization in regenerative medicine using atmospheric pressure low temperature plasma treatment

研究代表者

大島 朋子 (OHSHIMA, Tomoko)

鶴見大学・歯学部・学内教授

研究者番号：50233101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：再生移植組織および宿主受容組織を非侵襲的に無菌化できる技術開発のための基礎研究として、大気圧低温プラズマを評価することを目的とした。プラズマによって産生される活性種により十分な殺菌活性を示すこと、かつ短時間に活性が消失し残留活性を示さないことを検証した。感染モデルの検証では、照射法よりプラズマ処理水の方がより短時間で非常に高い効果を示した。そこで、移植片受容組織および移植細胞(単層細胞および移植組織シート)モデルでのプラズマ処理水の安全性試験を行った結果、代謝活性障害は認められず、高い安全性が示された。したがって、プラズマ処理水は高い殺菌活性と生体組織安全性を併せ持つと結論された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の再生医療は臨床での実用化レベルに達しており、再生組織のベースとなるiPS細胞が高率に分離される歯髄の使用が増加すると思われるが、口腔からの感染と隣り合わせである。しかし既存の消毒薬は組織の損傷・細胞毒性が懸念されるため使用できず、抗菌薬に依存しているため、抗菌薬アレルギー患者は適応外とされているが、そのような症例も等しく再生医療を受けられる必要性に迫られると予想される。プラズマ処理水に含まれる活性種は、検出限界以下まで殺菌する一方で、ほぼ組織毒性を示さないことが今回の研究で明らかとなった。したがって再生医療のみならず、広く医療全般での有用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate atmospheric low temperature plasma as a basic research for the development of technology that can non-invasively sterilize regenerated transplanted tissues and host recipient tissues. It was verified that the active species produced by the plasma show sufficient bactericidal activity and that the activity disappears in a short time and does not show residual activity. In the verification of the infection model, plasma treated water showed a very high effect in a shorter time than the irradiation method. As a result of conducting a safety test of plasma treated water in a graft recipient tissue and transplanted cell (monolayer cell and graft tissue sheet) model, no metabolic activity failure was observed, and high safety was shown. Therefore, it was concluded that plasma-treated water has high bactericidal activity and biological tissue safety.

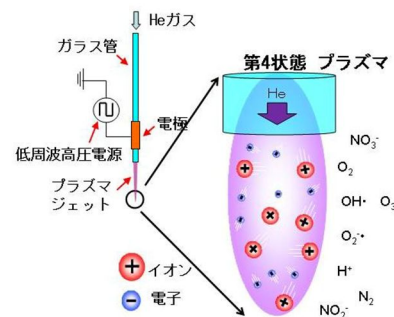
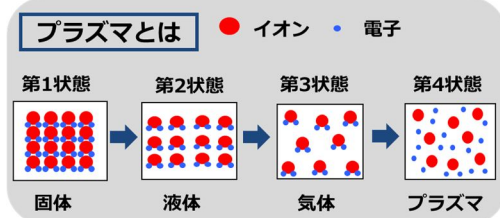
研究分野：口腔微生物学

キーワード：プラズマ医療 感染根管モデル プラズマ処理水 殺菌効果 生体安全性

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

1. 研究開始当初の背景

日本の再生医療の高度な技術や材料・製品開発の進展は目覚しく、基礎研究から臨床での実用化レベルに達したことを受け、2013年度には法令化が進み「再生医療推進法」「改正薬事法」「再生医療安全確保法」が成立した。2014年度には実際の加齢黄斑変性症患者におけるiPS細胞を使った角膜再生医療がスタートした。再生組織のベースとなるiPS細胞は、歯髄細胞から高率に分離されることが知られおり歯科処置が介在する場合が増加することが考えられるだけでなく、抜髄後の歯髄再生の可能性にも注目が集まっている。しかし、口腔常在菌や齲蝕、歯周病の存在を考慮すると、常に感染と隣り合わせである。再生医療において、細胞レベルでの再生が最初の関門であるが、最終的にはその再生細胞あるいは組織が生体内に定着・機能することが必須である。それを妨げる要因として、生体内での感染がある。現在、その感染を逃れる方法としては、移植受容患者の抗菌薬投与とされている。すなわち、感染による組織再生の妨害から免れるための手段は、抗菌薬に依存しているのが現状である。患者由来の細胞からiPSを分離し移植可能に到達するまでには1年弱の培養期間を有する。その間、組織は抗菌薬漬けであり、さらに移植段階の宿主も抗菌薬投与が欠かせない。したがって日本再生医療学会承認の再生治療プロトコルでは、数種の抗菌薬に対してのアレルギー患者を除外基準としている。しかし、近い未来にはそのようなアレルギー患者にも等しく再生医療を受けられ、また抗菌薬耐性菌の問題を憂慮することない手段を見出す必要性に迫られると予想される。既存の消毒薬は組織の損傷・細胞毒性が懸念されるため使用できない。近年、大気圧低温プラズマは、注目されている生成技術の進歩によりプラズマプロセスを利用し、医療応用に関する研究が多く行われてきている。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(下図左)。



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(右図)。以前は、プラズマを安定した状態で生成するには、大きな装置と、高いコストが要求され装置によっては真空条件が必要であったが、大気圧下でプラズマを生成する技術が進歩し、大気圧低温プラズマとして液体への処理も可能となり注目されている(Yamazaki et al., Dent Material J 30(3); 384-391, 2011)。この液体の殺菌技術を生体に利用した場合、短時間での殺菌作用の後、活性種の素早い消失により残留毒性がないため組織非侵襲性が十分期待され、かつて類を見ない新しい殺菌法とすることができ、再生医療の移植術での組織無菌化が可能であることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、大気圧低温プラズマによる再生移植組織および宿主受容組織を無菌化できる技術開発のための基礎研究を目指し、非侵襲的に短時間で組織を無菌化する新たな治療技術となり得るかを評価することを目的とした。すなわち、大気圧低温プラズマによって産生される活性種を液相中に一定濃度保ち十分な殺菌活性があること、かつ短時間に残留活性が消失することを評価し、ヒト臨床試験前までの有用性・安全性を評価することが目的である。

日本再生医療学会承認の再生治療プロトコルでは、抗菌薬アレルギー患者を除外基準としている。すなわち、感染による組織再生の妨害から免れる手段は、抗菌薬に依存しているのが現状である。既存の消毒薬は組織傷害・細胞毒性が懸念されるため使用できない。本研究では、大気圧低温プラズマによる再生移植組織および宿主受容組織を無菌化できる技術開発のための基礎研究を目的とし、非侵襲的に短時間で組織を無菌化する新たな治療技術となり得るかを評価する。

3. 研究の方法

(1) 大気圧低温プラズマ処理水の作成、および各種微生物に対する殺菌活性の測定：感染の可能性のある菌種に対するプラズマ処理水の最小発育阻止濃度(MIC)および最小殺菌濃度(MBC)を通常法に準じて測定した。バイオフィルム形成菌に対しては、REDOX indicatorでの生菌活性の検出法で測定した。

(2) 殺菌作用メカニズムの解明(活性種の同定): プラズマ処理水に含まれる活性種を電子スピン共鳴法(ESR)で測定した。

(3) プラズマ処理水の安全性の検討：移植片受容組織および移植細胞(単層細胞および移植シート)のモデルとして、上皮系培養細胞および3次元重層培養上皮組織を用い、プラズマ処理水の毒性試験を行った。

4. 研究成果

(1) 大気圧低温プラズマ処理水の作成、および各種微生物に対する殺菌活性の測定：

プラズマ処理水の作成パラメーターの検討と殺菌反応パラメーターを詳細に検討した。感染の可能性のある菌種の MIC, MBC 測定を、う蝕原因菌 *Streptococcus mutans*、難治性感染根管関連菌 *Enterococcus faecalis*、口腔カンジダ症原因真菌 *Candida albicans* で行った結果、すべてにおいて殺菌性が確認された。またバイオフィルム菌についても同様であった。

(2) 殺菌作用メカニズムの解明（活性種の同定）およびそれに基づく殺菌条件の決定：先行研究によりプラズマ照射により様々なラジカル種が生成されることが示されており、その活性種が直接・間接作用として殺菌効果があることも知られている。実際に生成されるラジカル種を測定した。

あらかじめ純水をプラズマ処理し、一定濃度以上安定に存在する活性種を測定した。電子スピン共鳴法（ESR）で測定したところ、酸素ラジカルの存在が確認された。

で判明した結果から酸素ラジカルの最適な殺菌条件について、詳細に検討した。

A. 反応 pH と保存 pH：殺菌反応 pH は 4.8 以下で劇的に活性が高くなり、保存 pH は処理水そのままの 2.5 以下が適していた。B. 反応温度と保存温度：殺菌反応は室温～37℃ が適しているが、保存は凍結が必須であった。C. 反応時間と保存時間：反応時間は 10 秒で十分であり、保存時間は温度依存性に低温である程長期安定であった。

2つのタイプの移植片受容組織の感染モデルにおける殺菌評価試験を行った。軟組織モデル：ラット歯髄および根管をリザーバーとして細菌(*E. faecalis*)を接種し感染モデルとした。プラズマ処理水で洗浄し、根管周囲組織の殺菌効果を検証したところ、検出限界以下に到達する高い殺菌効果が認められた。硬組織モデル：感染歯質モデルとして、ヒドロキシアパタイトディスクおよびデンディンペレットの *S. mutans* 感染モデルと、ヒト抜去歯の *E. faecalis* と *C. albicans* 感染根管モデルを作成し、プラズマ照射またはプラズマ処理水での殺菌試験を行った。すべての系で、検出限界以下に到達する高い殺菌効果が認められた。

大気圧低温プラズマ処理水の作成方法の確立および各種微生物に対する殺菌活性が示され、殺菌作用メカニズムの解明（活性種の同定）およびそれに基づく殺菌条件を決定し、移植片受容組織の感染モデルにおける殺菌評価試験から、軟組織モデルであるラット根管感染モデルとでの高い殺菌効果と、硬組織モデルとしてヒドロキシアパタイトディスクおよびデンディンペレットを使用した感染歯質モデル(*S. mutans* 感染モデル)と、ヒト抜去歯の *E. faecalis* と *C. albicans* 感染根管モデルを作成し、プラズマ照射またはプラズマ処理水での殺菌試験を行い、すべての系で検出限界以下に到達する高い殺菌効果が認められたが、プラズマ処理水の方がより短時間で高い効果を示した。

(3) プラズマ処理水の安全性の検討：活性種は低温で保管できるが、体温で速やかに失活した。これは生体に使用する際に、高い殺菌性を持ちながら安全であると予想された。そこで移植片受容組織および移植細胞（単層細胞および移植シート）モデルでのプラズマ処理水の安全性試験により検証を行った。その結果、細胞および組織に対し、代謝活性の障害は認められず、高い安全性を有していることが示された。したがって、大気圧低温プラズマによる処理水は高い殺菌活性と生体組織安全性を併せ持つと結論された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ohshima T, Ikawa S, Kitano K, Maeda N. A proposal of remedies for oral disease caused by Candida: A mini review. *Front. Microbiol.* (査読有) 9. 2019. DOI:1522. 10.3389/fmicb.2018.01522

〔学会発表〕(計 15 件)

北野勝久、井川聡、中島陽一、谷篤史、横山高史、大島朋子、座古保. 過硝酸溶液を用いた殺菌技術 ~プラズマ 2.0~. 10th バイオメディカルインターフェースワークショップ. 2018

北野勝久、井川聡、横山高史、大島朋子、桃井保子. プラズマ処理水による生体消毒と生体安全性. 第 35 回プラズマ・核融合学会年会. 2018

K. Kitano, S. Ikawa, Y. Nakashima, T. Ohshima, A. Tani. Application of peroxy-nitric acid in plasma-treated water for safe and effective disinfection. 第 28 回日本 MRS 年次大会 (招待講演). 2018

岩木達哉、田崎達也、大島朋子、井川聡、北野勝久、前田伸子、桃井保子. 過硝酸溶液の濃度が根管う蝕モデル歯の殺菌効果に及ぼす影響. 日本歯科保存学会 2018 年度秋季学術大会 (第 149 回). 2018

北野勝久、井川聡、中島陽一、谷篤史、大島朋子、座古保. 過硝酸溶液を用いた画期的な殺菌法. 9th バイオメディカルインターフェースワークショップ. 2017

大島朋子、田崎達也、山本要、寺脇大紘、桃井保子、細矢哲康、前田伸子、井川聡、北野勝久. ヒト感染歯モデルでのプラズマ処理水の高度殺菌能の検証. 第 64 回応用物理学会春季学術講演会. 2017

北野勝久、井川聡、中島陽一、谷篤史、大島朋子. プラズマ処理水中のキー殺菌化学種の同定 & 合成. バイオメディカルインターフェース 2017. 2017

田崎達也、大島朋子、臼井エミ、井川聡、北野勝久、前田伸子、桃井保子. プラズマ処理水のヒト歯肉感染象牙質モデルにおける殺菌効果. 鶴見大学歯学会. 2016

Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Yoichi Nakashima, Atsushi Tani, Takashi Yokoyama, Tomoko Ohshima. Bactericidal active ingredient in cryopreserved plasma-treated water with the reduced-pH method for plasma disinfection. 69th Annual Gaseous Electronics Conference. 2016

寺脇大紘、横山高史、田崎達也、大島朋子、井川聡、北野勝久. ヒト抜去歯を用いた歯肉感染象牙質モデルのプラズマ処理水による殺菌. 第77回応用物理学会秋季学術講演会. 2016

Katsuhisa Kitano, Satoshi Ikawa, Yoichi Nakashima, Atsushi Tani, Takashi Yokoyama, Tomoko Ohshima. Identification of chemical species for bactericidal effects of cryo-preserved plasma-treated water. 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6). 2016

Takashi Yokoyama, Tatsuya Tasaki, Kaname Yamamoto, Tomohiro Terawaki, Emi Usui, Tomoko Ohshima, Satoshi Ikawa, Nobuko Maeda, Noriyasu Hosoya Yasuko momoi, Katsuhisa Kitano. Disinfection of infection models using human extracted tooth and porcine skin by plasma-treated water with the reduced-pH method. 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6). 2016

Tatsuya Tasaki, Emi Usui, Tomoko Ohshima, Satoshi Ikawa, Nobuko Maeda, Katsuhisa Kitano, Yasuko Momoi. Plasma-treated water disinfected cariogenic bacteria in infected dentin model. 94th General Session & Exhibition of the IADR. 2016

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

北野勝久、井川聡、中島陽一、谷篤史、大島朋子、横山高史. 大気圧低温プラズマならびプラズマ処理水を用いた先進的消毒技術. 日本医療・環境オゾン学会 21回研究講演会. 2016

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。