

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20655

研究課題名(和文) 易感染性宿主のスペシャルニースに依る周術期口腔ケア方法の検討

研究課題名(英文) Circumspect Management of Oral Conditions in the Medically Compromised Patients at Perioperative Period

研究代表者

岡田 彩子 (Okada, Ayako)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：60515584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：易感染性宿主は、健常者では感染が成立しない弱毒病原体に感染しやすい。特に口腔内は常に細菌に曝露する環境のため、口腔細菌由来の重篤な感染症を発症することが多い。しかし周術期、特に抗癌治療後の易感染性宿主は、口腔粘膜炎などに悩まされ、十分な口腔ケアを行うことは難しい。このような易感染性宿主の口腔・全身状態への配慮、すなわち「スペシャルニース」に依る歯科独自の口腔ケア方法が必要である。本研究では、1) 殺菌効果(短時間で作用する)、2) バイオフィルム浸透殺菌効果を有するおよび3) 軟組織への影響が僅かである次亜塩素酸電解水を選択し、周術期における口腔ケアへの応用について、その可能性を検討した。

研究成果の概要(英文)：Medically compromised patients, especially at perioperative conditions are prone to a range of oral complications majorly due to the loss of mucosal integrity. Proper preventive management would minimize the risks of oral and associated systemic complications. In recent years, electrolyzed saline solutions are gaining interests for their anti-bacterial potentials in shortest possible application time. In this study, some reactive oxygen species based electrolyzed saline solutions known as super-oxidized water (SOW) containing hypochlorous acid have been examined for their cytotoxicity. Results have indicated that a highly purified SOW containing 125 mg/L active chlorine concentrations with pH of 6.8 might be safe for useful in management of oral conditions at perioperative period especially for the medically compromised patients as it showed very low level of cytotoxicity on HeLa mucosal epithelial cells.

研究分野：予防歯科

キーワード：易感染性宿主 口腔ケア 次亜塩素酸電解水 細胞毒性 細胞間接着分子 感染制御

1. 研究開始当初の背景

近年、癌が我が国の死因順位1位であることを背景に、抗癌治療は目覚ましい進歩を遂げている。しかし抗癌治療により寛解或いは完治した成功率が高まる一方で、免疫機能が低下した易感染性宿主は増加し、周術期の感染症に苦しむ患者は少なくない。特に、口腔内は常に細菌感染に曝露される環境のため、骨髄抑制による免疫力低下に伴い、誤嚥性肺炎あるいは菌血症から敗血症に移行し、死に至るケースも多い。癌周術期における口腔ケアは必要不可欠であるが、抗癌治療後の口腔内は、口内炎、口腔粘膜炎などの重い副作用を発生し、重篤な炎症に伴う激しい痛みのため、バイオフィルムの機械的除去が難しい。また、殺菌消毒剤は、細菌だけでなく生体細胞に分け隔てなく作用するため、その影響が懸念され、炎症部位の疼痛を増長することから、使用を控えるケースが多い。特にポピドンヨードやクロルヘキシジンは、過敏症やアレルギーなどの報告があるため、粘膜炎部位での使用はできない。そのため、現況では、周術期の口腔感染予防に重点をおくことができず、痛みや炎症に対する疼痛緩和、抗消炎剤による含嗽や、抗生剤投与などの対症療法が主流である。したがって、このような重い副作用に苦しむ易感染性宿主の口腔内における「スペシャルニ - ズ」に因え得る口腔感染予防方法の検討が喫緊の課題である。

次亜塩素酸電解水 (Super-oxidized water; SOW) は、食塩水の電解によって生成される機能水の1つで、有効塩素の酸化ストレスによって殺菌作用を示す。一般的に有効塩素の分解性が高く、残留性が無いため、内視鏡などの医療器具洗浄にすでに使用が認められている。最近では、歯科器材洗浄や口腔内洗浄の適正濃度を検証している報告も増えている。研究代表者は現在までに SOW が、口腔細菌に対するバイオフィルム浸透殺菌作用が強く、短時間で作用するという特徴を見出した。さらに細胞毒性試験の予備実験では、3%過酸化水素水 (H_2O_2) と比較し、HeLa 粘膜上皮細胞に及ぼす影響は少ないことを MTT assay により確認している。

SOW の安全性がより一層明らかとなれば、周術期の口腔ケアへの応用として期待されるため、本研究に至った。

2. 研究の目的

癌周術期の口腔ケアに対する「スペシャルニ - ズ」の1つは、口腔細菌感染を制御する一方で、正常細胞にストレスをできるだけ与えないこと及び抗癌治療の妨げにならないこと、すなわち癌の「再発」と「浸潤・転移」を促進しないことである。SOW が有する酸

化ストレスは、細菌に対しては殺菌作用を持つが、細胞に対する影響も少なくはない。

したがって、本研究では、1) SOW の細胞毒性についておよび 2) SOW の癌細胞の浸潤・転移への影響について、主にこれらの2点に絞って、臨床応用に向けた基礎データを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料

供試用溶液

口腔内での使用を目的として開発された無隔膜電解装置で電気分解した次亜塩素酸電解水 (有効塩素濃度 125 mg/L、pH7.8) および 3 室型電解装置で生成された次亜塩素酸電解水 (有効塩素濃度 125 mg/L、pH6.8) の 2 種類を選択した。対照群として 3% H_2O_2 を準備した。

供試細胞

10% ウシ胎児血清および抗生剤含有 D-MEM にて、37°C、5% CO_2 および 95% Air 条件下にて HeLa 粘膜上皮細胞を 3 日間培養し、細胞がコンフルエントになった時点で、実験に用いた (1.2×10^6 cells/ml)。

(2) 方法

細胞毒性についての検証

上記の HeLa 粘膜上皮細胞に各供試用溶液を 20 秒間作用させ、すぐに新しい培養液と交換した。E-plate 16 に新しい培養液 100 μ L を分注後、で準備した各細胞懸濁液を 100 μ L 播種し、 2.0×10^4 cells/well になるように調整した。E-plate 16 を細胞培養用インキュベーター内に設置した Real Time Cell Analyzer (RTCA, xCELLigence) にセットした。プロトコルの設定後 (2 時間おきに 100 時間後まで Cell Index を測定) 細胞解析を行った。

細胞間接着分子 E-cadherin への影響についての検証

これまでの実験において SOW 及び H_2O_2 を作用した HeLa 粘膜上皮細胞像を蛍光顕微鏡観察した結果、SOW と比較して、 H_2O_2 における死細胞の多くは扁平形態が失われ、剥離していることを確認している。そこで代表的な細胞間接着分子である E-cadherin 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。さらに、フロサイトメトリーを用いて、各群の E-cadherin の発現について比較検討した。

2 種類の次亜塩素酸電解水のイオン成分について検証

2 種類の次亜塩素酸電解水のイオン成分 (ナトリウムイオン、塩素イオン) についてイオンクロマトグラフィを用いて検証した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

細胞毒性についての検証

RTCAの結果、Cell Indexは、3% H₂O₂が最も低く、無隔膜電解装置で電気分解した次亜塩素酸電解水、3室型電解装置で生成された次亜塩素酸電解水と順に高くなり、未処理群が最も高かった(図1)。これはMTT assayの結果とも一致する。

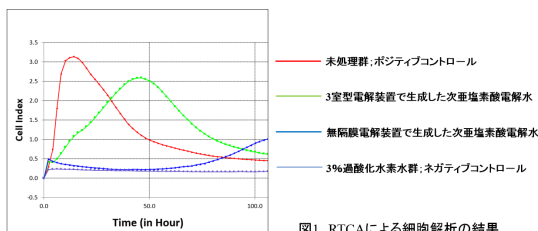


図1 RTCAによる細胞解析の結果

細胞間接着分子 E-cadherin への影響についての検証

E-cadherin 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った結果は、3室型電解装置で生成した群では発現が最も多く見られ、3% H₂O₂ 群では僅かであった。また、フローサイトメトリ - を用いて各群の E-cadherin 抗体に対する抗原発現について比較検討した結果についても同様の傾向を示した。これらの結果から3% H₂O₂ は、HeLa 粘膜上皮細胞の接着分子に強く影響を及ぼし、細胞接着不全に起因する細胞死が誘因された可能性が示唆された。

2 種類の次亜塩素酸電解水のイオン成分について検証

イオンクロマトグラフィ - を用いて検証した結果、無隔膜電解装置で電気分解した次亜塩素酸電解水中のナトリウムイオンおよび塩素イオン濃度は、3室型電解装置で生成した次亜塩素酸電解水と比較し、7倍程度高かった。3室型電解装置で生成した次亜塩素酸電解水は、食塩がほとんど混じることなく安定したイオン活性力を有していることがわかった。

次亜塩素酸電解水は、生成方法により、pHの違いだけでなく不純物の割合あるいはイオン活性力など様々な因子に影響を及ぼすことがわかり、多種多様に開発されている各次亜塩素酸電解水の効果および安全性について十分な検証が必要不可欠である。

以上より、3室型電解装置により生成した次亜塩素酸電解水の細胞毒性は、無隔膜電解装置で生成した次亜塩素酸電解水および臨床で用いる3% H₂O₂と比較し、僅かであることがわかった。これらの結果は、易感染性宿主の口腔内における「スペシャルニ - ズ」に応える口腔ケア方法を検討する上で一助となり得るデータであると考えられる。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクトおよび今後の展望

癌細胞の浸潤・転移は、接着分子(細胞間

接着分子と細胞外基質間接着分子)の変異が関与していることが認知されている。特に E-cadherin は、代表的な上皮細胞における細胞間接着分子であり、発現低下などによって原発巣からの離脱(転移)が起こる原因の1つとされる。したがって本研究において、3室型電解装置で生成した次亜塩素酸電解水を供した HeLa 粘膜上皮細胞の E-cadherin に及ぼす影響が臨床で用いる3% H₂O₂と比較して小さかったことは、癌周術期における易感染性宿主の口腔ケアのツ - ルとして期待が持てる結果となった。また、3% H₂O₂ が E-cadherin に強く影響を及ぼした点については、H₂O₂ が生体分子への直接的な傷害だけでなく、細胞間接着に関わる様々な転写因子を介して、細胞接着不全を誘因することが報告されており(Barnett P et al, 2011, Biochem Biophys Res Commun)、本研究の結果を裏付けていると考える。

今後さらなる検証を行うことで、癌周術期における易感染性宿主の口腔ケア方法として次亜塩素酸電解水を応用するための必要な基礎データを取得するばかりではなく、酸化ストレスに関する重要な情報も得ることができると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Okada A, Nomura Y, Sogabe K, Oku H, Sato Gillbreath A, Hino F, Hayashi H, Yoshino H, Utsunomiya H, Suzuki K, Koresawa K, Koba K, Uetani K, Kotoh M, Nishitsuji N, Akutsu S, Nakasone T, Tobi Y, Fukuzawa Y, Yabuki Y, Naono Y, Yajima M, Shimizu K, Hanada N. Comparison of salivary hemoglobin measurements for periodontitis screening. J Oral Sci. 2017;59:63-69.

doi: 10.2334/josnusd.16-0204. (査読あり)

Nomura Y, Takeuchi H, Shigemoto S, Okada A, Shigeta Y, Ogawaand T, Hanada N. Secondary Endpoint of the Prosthodontics. Int J Clin Case Stud 2017.

<https://doi.org/10.15344/2455-2356/2017/117>(査読あり)

Nomura Y, Takeuchi H, Okamoto M, Sogabe K, Okada A, Hanada N. Chair-side detection of Prevotella Intermedia in mature dental plaque by its fluorescence. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017.

doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.04.010. (査読あり)

Nomura Y, Okada A, Kakuta E, Gunji T, Kajiura S, Hanada N. A new screening method for periodontitis: an alternative to the community periodontal index. BMC Oral Health 2016.

doi: 10.1186/s12903-016-0216-x. (査読あり)

Okada A, Sogabe K, Takeuchi H, Okamoto M, Nomura Y, Hanada N. Characterization of the Sampling Specimens for the Evaluation of Periodontal Bacteria. J Oral Sci. 2016 (in press). (査読あり)

Hakuta C, Okada A, Sogabe K, Kakuta E, Endo K, Imai S, Okamoto M, Nomura Y and Hanada N. Opportunistic Bacteria in Tonsil and Dental Plaque are Indicator for Oral Care. J Oral Craniofac Sci 2016;2: 30-34. (査読あり)

Okada A, Nomura Y, Matsumoto K, Yamane K, Yoshida T, Hatano M, Miyamatsu S, Fukaishi N, Amagasaki T, Nagamatsu K, Yoshikawa H, Gunji T, Kajiura S and Hanada N. Predication of the Prognosis after Initial Periodontal Treatment by Salivary Biomarkers. Asian Pacific Journal of Dentistry 2015, 15, 25-31. (査読あり)

〔学会発表〕(計 16 件)

岡田彩子, 有吉芽生, 村田貴俊, マティンカイルル, 花田信弘ら. Liquid Carrier Type 3DSトレ - を用いた殺菌洗口液の細菌学的・臨床的効果. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会, 2017 年 5 月 31 日 - 6 月 2 日, 山形テルサ (山形県山形市).

野邑浩美, 井田 亮, 岡田彩子, 山田秀則, 野村義明, 花田信弘ら. フッ化物歯面塗布の臨床効果に関する研究. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会, 2017 年 5 月 31 日 - 6 月 2 日, 山形テルサ (山形県山形市).

古藤真実, 矢吹義秀, 福澤洋一, 岡田彩子, 野村義明, 花田信弘ら. 唾液を用いた歯周病のスクリーニング検査による地域健康診断システム構築 ~ 平成 28 年度実施結果報告 ~. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会, 2017 年 5 月 31 日 - 6 月 2 日, 山形テルサ (山形県山形市).

山田秀則, 岡田彩子, 宮之原真由, 曾我部薫, 村田貴俊, 花田信弘ら. 全身的な健康を歯科から考える “予防医学” としての概念を歯科へ『3DS 除菌外来』の試み (第四報). 第 66 回日本口腔衛生学会・総会, 2017 年 5 月 31 日 - 6 月 2 日, 山形テルサ (山形県山形市).

大塚良子, 今井 奨, 岡田彩子, 花田信弘, 桃井保子, 熊谷 崇. がん治療周術期における口腔内環境の変化 - 1 症例報告 -. 第 66 回日本口腔衛生学会・総会, 2017 年 5 月 31 日 - 6 月 2 日, 山形テルサ (山形県山形市).

山田秀則, 岡田彩子, 宮之原真由, 村田貴俊, 武内博朗, 花田信弘ら. 全身的な健康を歯科から考える “予防医学” としての概念を歯科へ『3DS 除菌外来』の試み (第三報). 第 65 回日本口腔衛生学会・総会, 2016 年 5 月 27 日 - 5 月 29 日, 東京医科歯科大学 (東京都).

宮之原真由, 村田貴俊, 山田秀則, 岡田彩子, 石川芽生, 花田信弘ら. 3DS 除菌外来における疲労測定システム (自律神経測定セン

サー) の導入. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会, 2016 年 5 月 27 日 - 5 月 29 日, 東京医科歯科大学 (東京都).

吉野浩和, 矢吹義秀, 古藤真実, 岡田彩子, 野村義明, 花田信弘ら. 唾液を用いた歯周病のスクリーニング検査による地域健康診断システム構築 ~ 平成 27 年度実施結果報告 ~. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会, 2016 年 5 月 27 日 - 5 月 29 日, 東京医科歯科大学 (東京都).

岡田彩子, 村田貴俊, マティンカイルル, 宮之原真由, 桐原 大, 花田信弘ら. 3DSトレ - を用いた次亜塩素酸電解水の臨床的評価: 第 2 報. 第 17 回日本口腔機能水学会学術大会, 2016 年 3 月 26 日 - 27 日, 梅田センタービル (大阪府大阪市).

Okada A, Murata T, Matin K, Miyanohara M, Sogabe K, Otsuka R, Kirihara M, Matsuzawa M, Sudo T, Imai S, Tagami J, Hanada N. Trial of a Liquid Carrier Type Dental Drug Delivery Tray. the 63rd Annual meeting of JADR, October 30-31, 2015, Fukuoka (Japan).

Imai S, Okada A, Okamoto M, Miyanohara M, Oota K, Nomura Y, Momoi Y, Tomonaga M and Hanada N. Biofilm formation and demineralization by mutans streptococci from humans and chimpanzees. the 63rd Annual meeting of JADR, October 30-31, 2015, Fukuoka (Japan).

岡田彩子, 村田貴俊, マティンカイルル, 芦垣薫, 大塚良子, 花田信弘ら. 3DSトレ - を用いた殺菌消毒液の臨床的評価. 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, 2015 年 5 月 27 日 - 29 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市).

マティンカイルル, 岡田彩子, 阿保備子, 大塚良子, 今井 奨, 花田信弘ら. スポンジを用いた口腔細菌採取法の有効性について. 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, 2015 年 5 月 27 日 - 29 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市).

村田貴俊, 岡田彩子, 今井 奨, 山田秀則, 野村義明, 花田信弘ら. *Streptococcus mutans* にフッ化物耐性を付与する遺伝子の同定. 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, 2015 年 5 月 27 日 - 29 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市).

久保宏史, 古藤真実, 矢吹義秀, 岡田彩子, 野村義明, 花田信弘ら. 歯周病のスクリーニングを目的とする唾液生化学検査の有用性、継続性に関する受診者の意識調査. 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, 2015 年 5 月 27 日 - 29 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市).

野邑浩美, 井田 亮, 岡田彩子, 山田秀則, 野村義明, 花田信弘ら. 唾液検査と歯面除菌清掃法 (3DS) を併用した定期管理の 10 年間の評価. 第 64 回日本口腔衛生学会・総会, 2015 年 5 月 27 日 - 29 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市).

〔図書〕(計1件)

武内博朗、泉福英信、野村義明、花田信弘、
村田貴俊、山田秀則、岡田彩子、宮之原真由、
有吉芽生、曾我部 薫、浦口昌秀ら. デンタル
ダイヤモンド社. 歯科発アクティブライフプ
ロモ - ション 21 健康増進からフレイル予
防まで. 2017 年. P1-P199

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 彩子 (OKADA Ayako)
鶴見大学・歯学部・学部助手
研究者番号：60515584