

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：32665  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2016～2021  
課題番号：16K20700  
研究課題名(和文) オゾンナノバブル水灌流マウスガードを用いたう蝕および歯周病予防・改善効果の検討  
研究課題名(英文) Prevention and improvement of dental caries and periodontal disease using a mouth guard with ozone nanobubble water irrigation  
研究代表者  
齋藤 真規 (SAITO, Masanori)  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号：30434096  
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)：オゾンナノバブル水(ONW)は強い殺菌効果をもつ液体である。しかしながら、唾液のタンパクや歯垢中の細菌には効果を発揮しない。そこで、専門家による歯垢を除去した後、速やかにマウスガードを装着し、オゾンナノバブル水を灌流した。灌流実験は週1回、3週連続で行われた。実験前後に唾液を採取し、次世代シーケンサーを用いて菌叢の比較解析を行った。

菌叢を比較した結果、ONW処理後には歯周病原細菌や口腔の多剤耐性菌などが減少した。一方、増加したのはFusobacteriales門の細菌だった。

以上の結果から、本研究では一部歯周病原細菌が減少したことから歯周病予防効果があるものと推察された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

オゾンナノバブル水(ONW)は薬剤耐性菌を発生させることなく、強い殺菌効果を発揮するピンク色の液体であり、その効果が失われると無色透明になる。今回、ONWを口腔内に灌流させるため、マウスガードに穴を開け、歯科用チェアユニットのパキュームとつなぎ、パキュームの吸引力を利用して灌流実験を行った。本実験は歯科医院で日常行われる口腔清掃の後に行うことを想定して考案した簡便な方法であり、虫歯や歯周病の予防効果が期待できる。また、ONW以外の抗菌性の液体も本法で行うことが可能である。

本研究は国民の健康維持に寄与し、現在問題となっている莫大な医療費の削減にも期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：Ozone nanobubble water (ONW) is a liquid with a strong bactericidal effect. However, it is not effective against salivary proteins or bacteria in dental plaque. Therefore, after dental plaque was removed by a specialist, a mouth guard was promptly fitted and irrigated with ONW. Irrigation experiments were conducted once a week for three consecutive weeks. Saliva samples were collected before and after the experiment, and comparative analysis of the bacterial flora was performed using a next-generation sequencer.

Comparison of the bacterial flora showed that periodontopathogenic bacteria and oral multidrug-resistant bacteria decreased after ONW treatment. On the other hand, bacteria of the phylum Fusobacteriales increased.

Based on these results, it was inferred that the present study had a preventive effect on periodontal disease, since some periodontopathogenic bacteria were reduced.

研究分野：感染免疫学

キーワード：オゾンナノバブル水 マウスガード

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の政策である「健康日本 21」における歯周疾患の標的年齢（35～44 / 45～54 歳）の歯周疾患の有病率は、加齢により増加傾向にあり、歯周炎が歯の喪失原因の約半数を占めているにもかかわらず画期的な治療方法および予防方法は開発されていない。また、う蝕においては、永久歯の一人平均う蝕数は減少傾向が認められてはいるものの 13 歳でのう蝕有病者率が 90% を超えている。学校保健統計調査（平成 24 年）では学齢期の好発疾患についてまとめており、幼稚園、小学校、高等学校の疾患・異常被患率の第一位はう蝕だった。近年、歯周病原細菌やう蝕原性細菌が動脈硬化症、心内膜炎、誤嚥性肺炎、糖尿病、骨粗鬆症、脳膿瘍などの様々な全身疾患に関わっているということが報告されており、口腔ケアによる歯周疾患およびう蝕の予防・改善に注目が集まっている。う蝕予防や歯周病予防・治療のために抗菌薬ペーストをマウスガード内面に塗布して一定時間口腔内に作用させるドラッグデリバリーシステムが行われることがある。しかし、耐性菌の出現もあり得ることから予防・治療に不安が残る。オゾンナノバブル水は薬剤耐性菌を生み出さない強力な殺菌力を発揮する安全な液体であることが知られているが、唾液に含まれるタンパク質で殺菌効果が失活することや歯の表面で細菌が凝集してできたバイオフィルム（歯垢）には浸透殺菌できないことがわかっている。そこで、耐性菌を産生しないオゾンナノバブル水を使用した新規のドラッグデリバリーシステムを構築することが必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

歯科診療で来院した際、専門家による機械的歯面清掃（Professional Mechanical Tooth Cleaning: PMTC）でバイオフィルムを除去後、唾液に触れないように防湿した状態でマウスガードを装着し、オゾンナノバブル水を口腔内に作用させることで口腔二大疾患に關与する病原微生物を駆逐するという新たなドラッグデリバリーシステムを構築し、歯周炎やう蝕になるリスクを軽減することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) オゾンナノバブル水灌流マウスガードの作製

マウスガードの材料はポリオレフィン系弾性材料である MG-21(レギュラー、クリア、丸形 120、厚さ 4 mm、ライテック社)を使用した。アルジネート印象材で上下顎の印象を採得後、硬石膏で作業模型を作成した。作業模型の歯面と辺縁歯肉部分にオゾンナノバブル水の流路となるスペースを確保するため、シートワックス#28(厚さ 0.36 mm、GC 社)を貼付した。シートの成型は加圧成型器エルコプレス ES-200E(エルコデント社)で行った。歯科用コントラアングルに MS スチールバー HP ラウンド 025(モリタ社)を装着後、マウスガードの両側第二大臼歯遠心部と両側中切歯舌側隣接面付近に直径 5 mm の孔を設置し、チューブコネクター L 字管 PP 6(TGK 社)を挿入した。前歯部 L 字管にシリコンチューブを装着し、オゾンナノバブル水のタンクと接続することでオゾンナノバブル水流入口とした。チューブコネクター Y 字管 PP 6(TGK 社)の三か所にシリコンチューブを装着し、両側臼歯部の L 字管および歯科用チェアユニット(長田電機工業社)のバキュームと接続することで廃液路とした(図 1)。

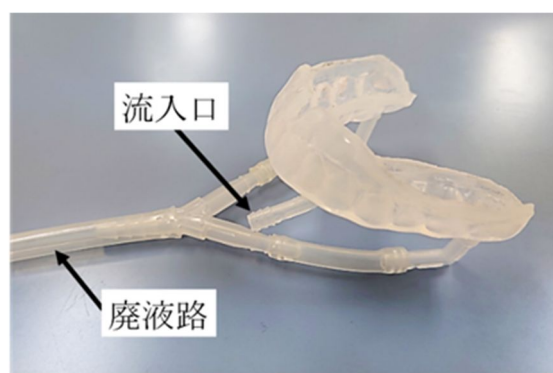


図1 オゾンナノバブル水灌流マウスガード(上顎)

#### (2) オゾンナノバブル水灌流実験

被験者は 20～30 歳台の喫煙歴のない健康な男性 4 名と女性 1 名を対象とした。オゾンナノバブル水灌流実験は週 1 回、3 週間連続で行われた。マウスガードの装着前に、装着する歯列に対し、クリーニングジェル PMTC (Weltec 社)を用いて PMTC を行い、速やかにマウスガードを装着した。オゾンナノバブル水のタンクは 180 cm の高さに設置し、サイフォンの原理とバキュームの吸引力によってオゾンナノバブル水を灌流した(流速: 約 100 ml/min, 片顎作用時間: 2 min)。なお、本研究は「日本大学松戸歯学部倫理委員会」にて審査後、学部長の承認を得て行われた(EC18-001)。

#### (3) 唾液細菌叢の群間比較解析

オゾンナノバブル水灌流実験前後で、唾液を 1 ml 採取した。採取した唾液に Lysis Solution

F (ニッポンジーン社)を添加後、Shake Master Neo (bms 社)を用いて、1,500 rpm で2分間粉碎した。破碎したサンプルは、65℃、10分間静置後、12,000 x g で2分間遠心分離を行い、上清を分取した。MPure-12 システムと MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio 社)を用いて分取した溶液から DNA を精製した。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を ExTaq HS (Takara 社)を用いた 2-step traileed PCR 法で増幅し、シーケンス用のライブラリーを作製した。シーケンス解析は MiSeq システムと Miseq Reagent Kit v3 (Illumina 社)を用いて、2 x 300 bp の条件で行った。シーケンス解析で得られた結果を群間比較解析用プログラムの LEfSE (ver.1.0.8)で解析し、オゾンナノバブル水灌流実験前後の唾液細菌叢における相対的存在量の異なる系統を検索した。

#### 4. 研究成果

LEfSE を用いた唾液細菌叢の群間比較解析の結果、相対的存在量に有意差があった細菌で正式な学名が付与された菌は検出できなかった。オゾンナノバブル水灌流実験前に有意に多かった *Lachnospiraceae* 科およびその下位の分類階級である *Oribacterium* 属、*Selenomonas* 属、*Xanthomonadales* 目およびその下位の分類階級である *Xanthomonadaceae* 科、*Stenotrophomonas* 属、さらに *Rhizobiales* 目およびその下位の分類階級である *Methylobacteriaceae* 科の細菌が減少した。一方、実験後では *Fusobacteria* 門およびその下位の分類階級である *Fusobacteriia* 綱、*Fusobacteriales* 目の細菌が有意に増加した。

*Oribacterium* 属菌は 2004 年 Carlier らによって原発性免疫不全症候群の患児の上顎洞炎の膿瘍から初めて分離され、2022 年現在までにヒト口腔から 2 菌種が追加されている。*Selenomonas* 属は歯周疾患や口臭に関与することが報告されている運動性菌である。*Stenotrophomonas* 属で代表的な菌種は *Stenotrophomonas maltophilia* である。本菌種は口腔常在菌であり、肺炎などの呼吸器感染症に関与するカルバペネム自然耐性の日和見病原体である。*Methylobacteriaceae* 科の下位分類階級である *Methylobacterium* 属菌は主に湿潤環境中でピンク色のカロテノイド色素を産生するバイオフィルム形成菌である。2005 年に Anesti らによって口腔常在菌であることが報告されており、免疫低下に伴う日和見感染症が報告されている。これらの結果からオゾンナノバブル水によって薬剤耐性菌などの日和見感染症起因細菌を低下させることが示唆された。

*Fusobacteriales* 目における口腔常在菌は *Fusobacterium* 属と *Leptotrichia* 属である。*Fusobacterium* 属で最も高頻度で見られるのは *Fusobacterium nucleatum* であり、他の口腔細菌と共凝集することで歯肉縁上歯垢の形成において中心的な役割を担っている。また、本菌は歯周炎の病巣局所から分離されることから歯周病の原因の 1 つと考えられている。また、*Leptotrichia* 属は歯肉縁下歯垢中に生息している大型の細菌であるが歯周病との関連は不明である。

オゾンナノバブル水灌流実験において直接的にう蝕原性細菌および歯周病原細菌を排除することはできなかったが、多剤耐性菌や日和見感染症起因細菌を有意に減少させることができた。マウスガードを使用することで誤嚥のリスクが低下することからオーラルフレイルを有する高齢者や免疫不全症の患者に対し、チェアサイドで簡便にできる口腔ケアシステムになるものと考えられる。

#### < 引用文献 >

齋藤真規, 續橋治, 川島義章, 尾関由倫, 高田和子, オゾンナノバブル水の含嗽剤としての可能性 - 第 1 報 抗菌作用に対する物理・化学的因子の影響 -, 日大口腔科学, 35 巻, 2009, 103-108

齋藤真規, 續橋治, 石田聡, 高田孝一, 高田和子, オゾンナノバブル水の含嗽剤としての可能性 - 第 2 報 付着菌体と人工歯垢形成菌体に対する抗菌効果 -, 日大口腔科学, 35 巻, 2009, 114-118

Carlier JP, K'ouas G, Bonne I, Lozniewski A, Mory F, *Oribacterium sinus* gen. nov., sp. nov., within the family 'Lachnospiraceae' (phylum Firmicutes), Int J Syst Evol Microbiol, 54, 2004, 1611-1615

Anesti V, McDonald IR, Ramaswamy M, Wade WG, Kelly DP, Wood AP. Isolation and molecular detection of methylotrophic bacteria occurring in the human mouth. Environ Microbiol, 7, 2005, 1227-38.

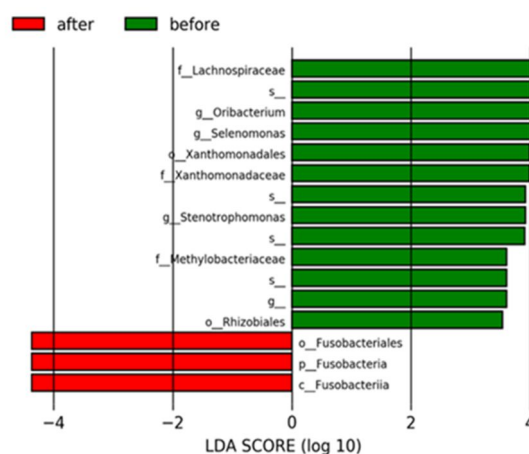


図2 群間比較解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Gotouda H, Shinozaki-Kuwahara N, Saito M, Tsuzukibashi O, Fukatsu A, Osawa S, Matsune K, Kurita-Ochiai T	4. 巻 19
2. 論文標題 Distribution and Evaluation of <i>Streptococcus sobrinus</i> in Saliva Samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 117-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5466/ijoms.19.117	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Masanori, Shinozaki-Kuwahara Noriko, Tsudukibashi Osamu, Hashizume-Takizawa Tomomi, Kobayashi Ryoki, Kurita-Ochiai Tomoko	4. 巻 62
2. 論文標題 <i>Pseudopropionibacterium rubrum</i> sp. nov., a novel red-pigmented species isolated from human gingival sulcus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 388 ~ 394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Saito M, Shinozaki-Kuwahara N, Hashizume-Takizawa T, Kurita-Ochiai T
2. 発表標題 Basic study on antimicrobial effect of luohanguo extract on oral microorganisms
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saito M, Shinozaki-Kuwahara N, Tsuzukibashi O, Kurita-Ochiai
2. 発表標題 <i>S. dentiloxodontae</i> sp. nov., isolated from oral cavity of elephants
3. 学会等名 第90回日本細菌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤真規, 栗原紀子, 續橋治, 瀧澤智美, 小林良喜, 落合智子
2. 発表標題 ヒト歯肉溝から分離された赤色集落を呈する新菌Propionibacterium gingivaerubrumの解析
3. 学会等名 第58回歯科基礎医学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関