

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19014

研究課題名(和文) 過酸化水素光分解殺菌法を応用した低侵襲齲蝕治療の確立

研究課題名(英文) Pursuing the less-invasive caries treatment using hydrogen peroxide photolysis

研究代表者

白土 翠 (Midori, Shirato)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：60708501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化水素光分解殺菌法とは、過酸化水素に波長 400 nmの光を照射することで生成される活性酸素を利用した新しい殺菌技術である。本研究では、その技術を齲蝕治療の分野に応用することを目的とし、齲蝕関連細菌のバイオフィーム(細菌の集合体・口腔内では歯垢として存在)に対する殺菌効果および、齲蝕進行抑制効果を検証した。一連の研究で、本殺菌法は口腔内で齲蝕を引き起こす歯垢に対する高い殺菌効果を発揮し、その殺菌効果に伴って齲蝕の進行を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年若年者の齲蝕有病率は大きく減少しているが、一生を通してみると大多数の国民が齲蝕を経験することが歯科疾患実態調査等で報告されている。齲蝕は痛みを伴い、進行すれば歯の喪失の原因ともなるためQOLに大きく関わる疾患である。本殺菌法は低侵襲で高効率な齲蝕治療法として確立できる可能性があり、この研究成果は広く国民のQOL維持・向上に貢献すると考えられ、学術的・社会的意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：Our research group has developed a novel bactericidal technique using one of the reactive oxygen species generated by irradiation to hydrogen peroxide (hydrogen peroxide photolysis). This technique has shown potent bactericidal effects against several oral bacteria in short time. Thus, this study aimed to evaluate if the technique has a possibility to be a new caries treatment. Through some experiments, it was found that the treatment of hydrogen peroxide photolysis exerted bactericidal effects against biofilms (=dental plaque) related to dental caries and inhibited demineralization. These results suggest that this technique could inhibit caries progression by its strong bactericidal effects and become an effective caries treatment.

研究分野：活性酸素制御学

キーワード：過酸化水素光分解殺菌法 バイオフィーム 低侵襲齲蝕治療 ヒドロキシルラジカル

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、若年者の齲蝕有病率は大きく減少しているが、一方で高齢者では残存歯数増加に伴って齲蝕有病率も上昇する傾向にある。したがって、低侵襲かつ高効率な齲蝕治療法の確立は未だ歯科治療における課題である。

申請者の研究グループでは、過酸化水素に光を照射することで生成される活性酸素(ヒドロキシルラジカル)の強い酸化力を応用した殺菌技術(過酸化水素光分解殺菌法、図1)を研究開発してきた。本殺菌法は、抗菌薬とは異なり耐性菌の発現を誘導することなく¹⁾齲蝕病原細菌である *Streptococcus mutans* を含む様々な口腔内細菌に対する高い殺菌効果を示すことが分かっている²⁾。さらに、口腔内で使用される消毒剤や光線力学殺菌法と比較した場合には、*S. mutans* バイオフィームに対して有意に高い殺菌効果を発揮することを発見した(図1)³⁾。

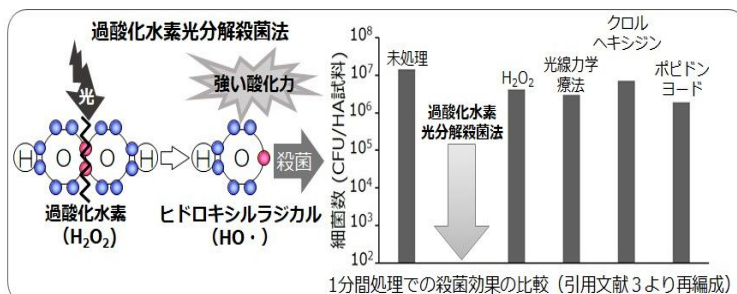


図1. 過酸化水素光分解殺菌法のメカニズムと *S. mutans* バイオフィームに対する殺菌効果

S. mutans に対する高い殺菌

効果は、本殺菌法を齲蝕治療へ応用できる可能性を強く示唆している。本殺菌法を併用することで齲蝕治療の確実性を担保し、最大限の歯質保全および歯髓刺激軽減の達成が期待できる。

1. Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, **Shirato M** et al. *In vitro* evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide. *PLoS ONE* 8: e81316, 2013.
2. Ikai H, Nakamura K, **Shirato M** et al. Photolysis of hydrogen peroxide, an effective disinfection system via hydroxyl radical formation. *Antimicrob Agents Chemother* 54:5086-5091, 2010.
3. **Shirato M** et al. Time-kill kinetic analysis of antimicrobial chemotherapy based on hydrogen peroxide photolysis against *Streptococcus mutans* biofilm. *J Photochem Photobiol B*, 173: 434-440, 2017.

2. 研究の目的

これまでの研究で *S. mutans* バイオフィームに対する本殺菌法の高い殺菌効果を報告してきたが、口腔内で実際に齲蝕に関連するバイオフィームはデンタルプラークと呼ばれる多菌種バイオフィームである。そこで、本申請研究ではより臨床の状態に近い研究結果を得るため多菌種バイオフィームを用いた過酸化水素光分解殺菌法の殺菌効果、ラット歯を用いた実際の歯質に対する本殺菌法の歯質脱灰抑制効果を検証し、新しい齲蝕治療法の臨床応用に向けた基盤技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 多菌種バイオフィームを用いた *in vitro* 殺菌試験

S. mutans, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *Lactobacillus casei* から成る多菌種バイオフィームモデルを確立するため、培養条件を検討した。また、HA 試料上に形成したバイオフィームを3%過酸化水素に浸漬し、波長 400 nm のLED光を照射して殺菌試験を行い、殺菌効果を検証した。殺菌効果は、処理後のバイオフィームを懸濁した懸濁液をBHI寒天培地および各種選択培地に播種することで評価した。

(2) ラット歯を用いた過酸化水素光分解殺菌技術の歯質脱灰抑制効果の検証

ラット口腔内から採取した上顎第一大臼歯を、*S. mutans* を加えた1%スクロース含有BHI液体培地(BHI-S)に浸漬し、咬合面にバイオフィームを形成した。試験群は過酸化水素光分解殺菌法で処理し、対照群は無処理とした。処理後、2日間再培養を行って歯質脱灰を進行させ、各群の脱灰進行度を評価した。評価項目は以下の通り。

- ・バイオフィーム内のpH測定による酸産生能の評価
- ・殺菌処理後の生菌数評価
- ・マイクロCT上での脱灰深度を測定による歯質脱灰進行度の評価
- ・エネルギー分散型X線分光器(SEM/EDS)を用いた歯質成分評価

(3) ラット口腔内で行う殺菌処理と齲蝕抑制効果の検証

Wistar ラットの口腔内に *S. mutans* を接種し、56%スクロース含有の試料 (Diet 2000) を与えて齲蝕を誘発した。初期齲蝕が形成されたラット左右上顎第一大臼歯を本殺菌法を用いた殺菌処理群または未処理群に分けて (スプリットマウスデザイン) 処理を行い、再び齲蝕誘発時と同様の環境で一定期間飼育した。歯質脱灰進行度の評価は、(2) と同様にマイクロ CT 上で行った。

4. 研究成果

(1) 多菌種バイオフィームを用いた *in vitro* 殺菌試験

BHI 液体培地・BHI-S 液体培地・人工唾液 (AS) を用いて、先述した4菌種のバイオフィームを形成した。形成した多菌種バイオフィームは、以前より実験に用いてきた *S. mutans* 単独バイオフィームと菌対外マトリックス (EPS) の形成や総菌数について比較を行った (下記表)。デンタルプラークの組成としては、*S. mutans* 以外の *Streptococci* が大半を占めているとされており、BHI-S を用いたバイオフィームでは *S. salivarius* の割合が高く、*S. mutans* の存在も確認された。齲蝕原性について考慮すると、*S. mutans* が含まれていること、*S. mutans* が酸を産生するために必要なスクロース (齲蝕誘因因子) が含まれていることも重要となり、その条件下で十分な総菌数をもってバイオフィームを形成していることから、*in vitro* では BHI-S で培養された多菌種バイオフィームが、よりデンタルプラークに近いと判断した。

	使用培地	EPS形成	総菌数 (log/CFU)	90秒処理での効果 (総菌数に対する減少度)		
				過酸化水素光分解殺菌	過酸化水素単独	LED単独
単独バイオフィーム <i>S. mutans</i>	BHI-S	++	8log 程度	7log 以上 (検出限界以下)	1log 以下	1log 程度
多菌種バイオフィーム <i>S. mutans</i> <i>L. casei</i> <i>S. sanguinis</i> <i>S. salivarius</i>	BHI	-	5log~6log	2~3log 程度	1log 以下	1log 以下
	BHI-S	±	7log 程度	4~5log 程度	2log 程度	1log 以下
	AS	-	5log 程度	3log 以上 (検出限界以下)	1~2log 程度	1log 以下

殺菌試験では、殺菌処理群として過酸化水素光分解殺菌処理 (H(+))L(+)) 対照群として過酸化水素単独処理 (H(+))L(-))、LED 単独処理 (H(-))L(+))、未処理 (H(-))L(-)) の4群に分けて実験を行った。バイオフィームは単菌種よりも多菌種になることで、薬剤や殺菌処理への抵抗性が増すことが知られているが、本研究で用いたすべての多菌種バイオフィームに対して過酸化水素光分解殺菌法は高い殺菌効果を示した (上記表参照)。特に、デンタルプラークに近いと考えられる BHI-S で培養されたバイオフィームに対して非常に高い殺菌効果を示しており (図2)、これは、本殺菌法が齲蝕予防および治療に効果を発揮することを示唆する結果である。

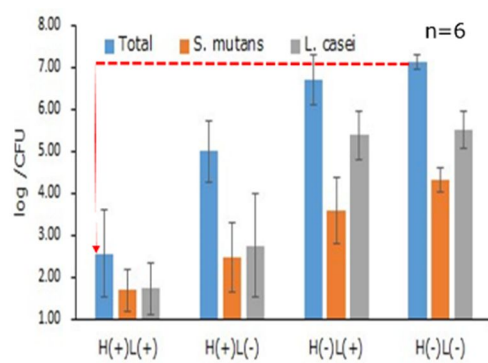


図2. 多菌種バイオフィーム (BHI-S) に対する殺菌効果

(2) ラット歯を用いた過酸化水素光分解殺菌技術の歯質脱灰抑制効果の検証

ラット口腔内から採取した第一大臼歯を用いて、*ex vivo* 試験を行った。当初は多菌種バイオフィームを想定していたが、歯質脱灰を考えた場合に、*S. mutans* 単独バイオフィームの方がより酸産生能が高く過酷な条件であるため、本殺菌法の脱灰抑制効果をより検証できると考え単独バイオフィームを用いることとした。ラット歯上に *S. mutans* バイオフィームを形成させることでマイクロ CT 画像上では明らかな脱灰様透過像が確認でき (図3)、歯質成分分析により歯質内のカルシウムとリンが減少し、炭素が増えて

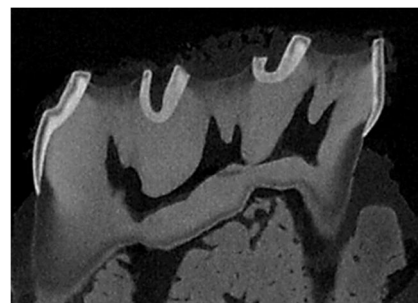


図3. ラット歯のマイクロCT画像

いることから脱灰が起きていることが示された。ラット歯上に形成されたバイオフィームは、過酸化水素光分解殺菌処理により内部の細菌数が減少するが、再培養により未処理の群と同程度の細菌数に回復していた。しかしながら、バイオフィーム内の pH を測定したところ殺菌処理群 (H(+)/L(+)) は対照群 ((1) と同様) に比べて明らかに pH が高いことが分かった。マイクロ CT 画像上で脱灰深度を測定したところ、特に象牙質における殺菌処理群の脱灰深度が明らかに浅く (図 4)、本殺菌法の脱灰進行抑制効果が示唆される結果となった。

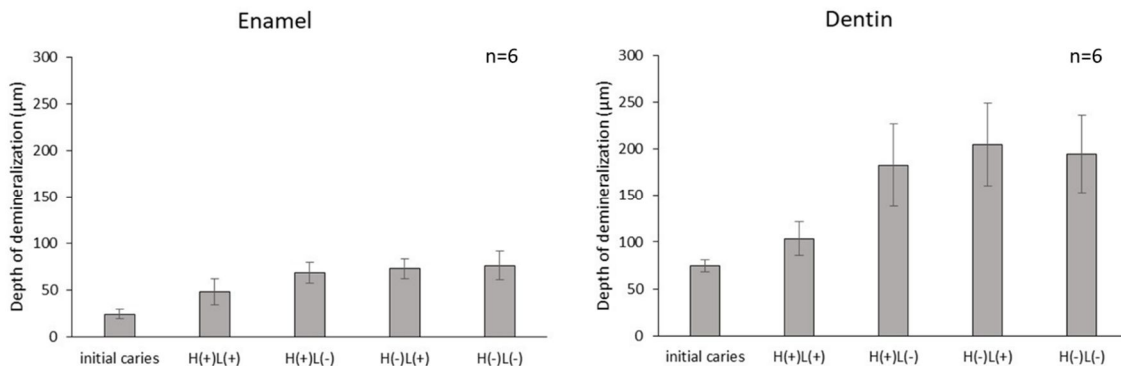


図 4. エナメルと象牙質の脱灰深度

(3) ラット口腔内で行う殺菌処理と齲蝕抑制効果の検証

本研究では、ラット口腔内に *S. mutans* を 4 日間連続で接種し、摂取後は高スクロース含有飼料を与えることにより齲蝕を誘発した。撮影したマイクロ CT 画像上で、ラット歯に脱灰が生じていることが確認できた (図 5、矢印)。マイクロ CT 上で脱灰部の面積を測定し、各歯の脱灰体積を算出したところ殺菌処理群の体積が未処理群よりも小さくなる傾向は見られたものの、(2) で得られた結果のような統計的に明らかな差は得られなかった。同個体に殺菌処理群と未処理群を割り当てることができるスプリットマウスデザインを採用したが、個体差が大きいことが原因の一つと考えられる。特に、未処理群を個体間で比較すると齲蝕体積に大きな差が認められた。これは、摂餌量のコントロールが難しいためスクロースへの暴露が必ずしも均等でない可能性や、スクロースへの感受性の差などに起因するかもしれない。飲料水にも高濃度でスクロースを混合するなど、スクロースへの暴露の機会を増やすプロトコルを修正する必要があると考えられる。また、*in vivo* で認められた齲蝕は図 5 から分かる通り裂溝に形成されており、(2) で認められた齲蝕 (図 3 参照、咬頭部に形成) と部位が異なっていた。この特徴により、(2) の実験手技と同様の方法では過酸化水素が十分に届かず、殺菌効果を発揮できるだけの過酸化水素光分解が患部で起きていなかった可能性も考えられる。個体差が大きいことを考慮したサンプル数、齲蝕誘発プロトコルの修正、確実に患部で過酸化水素光分解を起こすための実験手技の見直し等が今後の課題である。

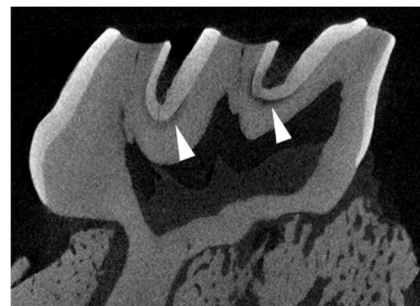


図 5. ラット歯のマイクロ CT 画像

(1) ~ (3) を通して以下の結果が得られた。

- ・過酸化水素光分解殺菌法は多菌種バイオフィームに対しても、単一菌バイオフィームに対して同様に高い殺菌効果を発揮した。
 - ・実際の歯質上の *S. mutans* バイオフィームに過酸化水素光分解殺菌処理を行うことにより、特に象牙質の脱灰進行を抑制した。
 - ・*In vivo* で誘発された齲蝕に対して過酸化水素光分解殺菌処理を行ったところ、統計的有意差は得られなかったものの殺菌処理群で齲蝕の進行が抑制される傾向が認められた。
- 上記結果は、本殺菌法が有する齲蝕治療応用への可能性を示唆するものであり、当初の臨床応用に向けた基盤技術の確立という目的を概ね達成できたと考えている。今後、本研究で明確になった課題を精査し、関連研究を進めていくことで新しい齲蝕治療法の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shirato M, Nakamura K, Tenkumo T, Kano Y, Ishiyama K, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y, Matsuura H.	4. 巻 201: 111633
2. 論文標題 Oral mucosal irritation potential of antimicrobial chemotherapy involving hydrogen peroxide photolysis with high-power laser irradiation for the treatment of periodontitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Photochem Photobiol B	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotobiol.2019.111633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura K, Shirato M, Shishido S, Kanno T, Niwano Y, Sasaki K, Lingstrom P, Ortengren U.	4. 巻 212: 112042
2. 論文標題 Reactions of dental pulp to hydrogen peroxide photolysis-based antimicrobial chemotherapy under ultraviolet-A irradiation in rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Photochem Photobiol B	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotobiol.2020.112042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 白土翠、中村圭祐、天雲太一、菅野太郎、佐々木啓一、庭野吉己。
2. 発表標題 歯周病原菌によって汚染されたチタン表面の清浄化技術の開発：過酸化水素光分解で生成する水酸化ラジカルの応用。
3. 学会等名 第46回日本防菌防黴学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ortengren U, Shirato M, Lingstrom P, Nakamura K.
2. 発表標題 Time-kill kinetic analysis of antimicrobial chemotherapy based on hydrogen peroxide photolysis.
3. 学会等名 The Annual Swedish Dental Congress of 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白土翠、中村圭祐、菅野太郎、庭野吉己
2. 発表標題 過酸化水素光分解殺菌法によるう蝕治療有効性評価のための多菌種バイオフィルムモデルの検討.
3. 学会等名 第48回日本防菌防黴学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shirato M, Nakamura K, Tenkumo T, Niwano Y, Kanno T, Sasaki K, Lingstrom P, Ortengren U.
2. 発表標題 Treatment with hydrogen peroxide photolysis inhibits tooth demineralization caused by Streptococcus mutans biofilm.
3. 学会等名 International Symposium for Interface Oral Health Science 2022. (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	庭野 吉己 (Niwano Yoshimi)		
研究協力者	中村 圭祐 (Nakamura Keisuke)		
研究協力者	宍戸 駿一 (Shishido Shunichi)		

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			
スウェーデン	イエテボリ大学			