

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19317

研究課題名（和文）オゾンナノバブル技術を応用した殺菌性口腔内保湿剤の開発と臨床応用

研究課題名（英文）Development and clinical application of bactericidal oral moisturizers based on O₃ nanobubble water

研究代表者

片岡 正太（Kataoka, Shota）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40808010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：酸素NBWと次亜塩素酸NBW（O₂-NBW・HOCl-NBW）を使用し、口腔細菌叢に及ぼす影響を検討した。16SrRNA分析では、細菌叢の多様性に大きな影響を与えないことが明らかになった。主座標分析により、軽度歯周病：4mmの歯周ポケットの多い群で、HOCl-NBWの曝露がバイオフィーム形成に關与する *Porphyromonas pasteri* を減少させることが明らかになった。全体として、HOCl-NBW曝露は、口腔内細菌叢全体のバランスを維持しながら、バイオフィームの形成を抑制させる可能性があることが明らかになった。この結果は、口腔感染症予防のための洗口液の開発につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究により、これまで歯科臨床で検討されていなかった2種のNBW：酸素NBW・次亜塩素酸NBWについて、次世代シーケンサー解析を含む複数のアッセイ法を使用することで口腔細菌叢に及ぼす影響が明らかにすることができた。本結果の意義として、1) 抗菌薬によらずに細菌の増殖を抑制できるため、薬剤耐性菌の出現頻度を抑えることができる可能性、2) 口腔バイオフィーム形成に作用することが示唆され、歯面清掃が困難なケースでの洗口への応用が考えられる点、3) 口腔細菌叢のバランスを維持できるため免疫力が低下した高齢者や要介護者の日和見感染症の予防に応用できる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We examined the effects of oxygen and hypochlorite NBW (O₂-NBW and HOCl-NBW, respectively) on the microbiota in human saliva. 16S rRNA gene sequencing revealed no significant changes on diversity of the oral microbiome. Principal Coordinate Analysis revealed that exposure to HOCl-NBW reduced *Porphyromonas pasteri*, which is involved in biofilm formation, in the group with mild periodontal disease. Overall, the results revealed that HOCl-NBW exposure of saliva may lead to inhibition in oral biofilm formation while maintaining the balance of the oral microbiome. These results can lead to the development of a novel type of mouthrinse for prevention of oral infectious diseases.

研究分野：予防歯科学

キーワード：酸素ナノバブル 次亜塩素酸ナノバブル 口腔細菌叢 口腔保湿剤 口腔洗口剤 メタゲノム解析

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、液体内に極小の泡を発生させる技術の進展により、マイクロサイズからナノサイズの気体の発生が可能となった。そのうち、 $1\mu\text{m}$ 以下の微細な気泡を水中に溶かした液体のことをナノバブル水 (NBW) と呼び、溶存した気体を長時間保存でき、気泡の周囲に電荷をもたらすといった性質を有することが知られている。産業・環境分野では電子基板の洗浄や湖水の水質改善等に利用されており、歯科分野においては、NBWの1種である O_3 -NBWを根管洗浄や歯周組織の治療、インプラント埋入後の感染予防に用いられてきた経緯がある。しかし、オゾン以外のNBWにおける口腔内細菌叢への影響についての報告は我々が知る限りこれまで認められない。また、NBWを臨床的に口腔内灌流した際の問題点として、誤嚥の恐れのある高齢者に対して応用が難しい点が挙げられる。これまでの先行研究ではNBWの形状を変化させた際の知見は得られていない。そこで誤嚥の問題を解決するため、粘稠性を付加したNBWを作製し、口腔内細菌叢への影響について明らかにすることを考えた。

2. 研究の目的

本研究はNBWを応用して、誤嚥の疑いや有病・多剤服用高齢者に対して使用可能な殺菌性口腔ケア用保湿剤を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 対象者のリクルート

研究対象は2021年10月～12月に近隣の2カ所の協力歯科医院を受診した患者のうち、以下の含有基準を満たした16名とした。全ての対象者に対し本研究の趣旨を説明し、書面にて同意を得た。含有基準として、35～70歳の男性とし、除外基準として、1) 急性の歯周疾患がある、2) 過去1ヶ月以内に抗菌薬を継続的に内服した者、3) 過去3ヶ月以内に抗菌薬口腔内局所投与を受けた者、4) コントロール不良な糖尿病等全身疾患を有する場合、5) 自己免疫疾患によりステロイド治療がなされている場合、6) 口腔乾燥症を主訴とする者とした。

2) 唾液の採取

唾液採取にあたり少なくとも1時間前には、歯磨剤や洗口剤を含む口腔清掃や喫煙を控えてもらった。対象者に採取用ガムを1つ5分間噛んでもらい、15mLのプラスチック試験管に唾液採取を行った。採取した唾液は、直ちに -80°C フリーザーで保管した。

3) 唾液細菌叢の分析

採取した唾液を3つの15mLチューブ内に $500\mu\text{L}$ ずつ分注し、4倍に濃縮した滅菌済みBHI培地に超純水、 O_2 -NBWおよび HClO -NBWをそれぞれ加えた。6時間嫌気培養後 $10,000\text{rpm}$ で10分間遠心後、菌体を回収し、DNA抽出キットMORA-EXTRACT (AMR株式会社 東京)を用いてDNAの抽出を行った。抽出したDNAを次世代シーケンサーMiSeqシステムによるメタ16S解析を行い、得られたデータをQiime2にて解析を行った。

4) 解析方法

統計分析にはR ver.4.1.2を用いた。 α 多様性の検定にはKruskal-Wallis検定を用い、 β 多様性の検定にはPERMANOVAを用いた。コントロール群、 O_2 -NBWおよび HClO -NBW群の細菌属占有率の群間比較はFriedman検定で行い、 $\alpha=0.05$ を有意水準とした。

4. 研究成果

まず、ナノバブル水の口腔内細菌叢に対する有効性の検討をおこなった。歯科臨床で使用されているのは O_3 -NBWであるが、 O_3 から O_2 への不安定性や基質との反応性、また、抗菌活性の幅が広く、口腔内細菌叢のバランスを崩す可能性があるという問題があった。そこで、 O_2 -NBWと HClO -NBWを用いた臨床応用の可能性について検討するよう方針の変更を行った。

協力者16名から得られた唾液に、コントロール、 O_2 -NBW、 HClO -NBWで処理を行い、計48個のサンプルの解析を行った。次世代シーケンサーを用いた分析により、細菌種の存在比を同定し、

α 多様性、 β 多様性の評価を行った。 α 多様性の評価には Observed features と Shannon 指数を用いた。いずれにおいても 3 群間で有意差が認められなかった。

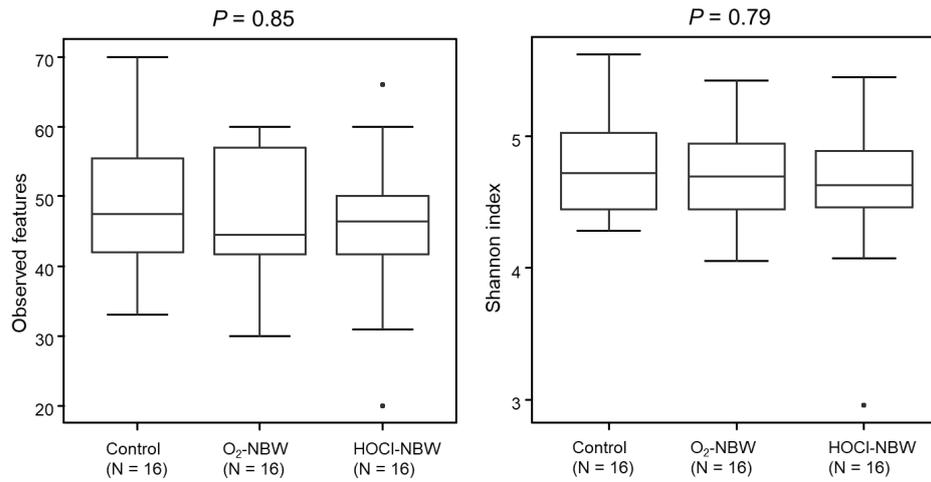


図 1. 唾液サンプルの α 多様性の比較

次に 3 群間の β 多様性について比較を行った。サンプル間の多様性においても有意な変化は認められなかった。以上より、NBW 曝露は細菌叢の多様性に大きな影響を与えないことが明らかになった。

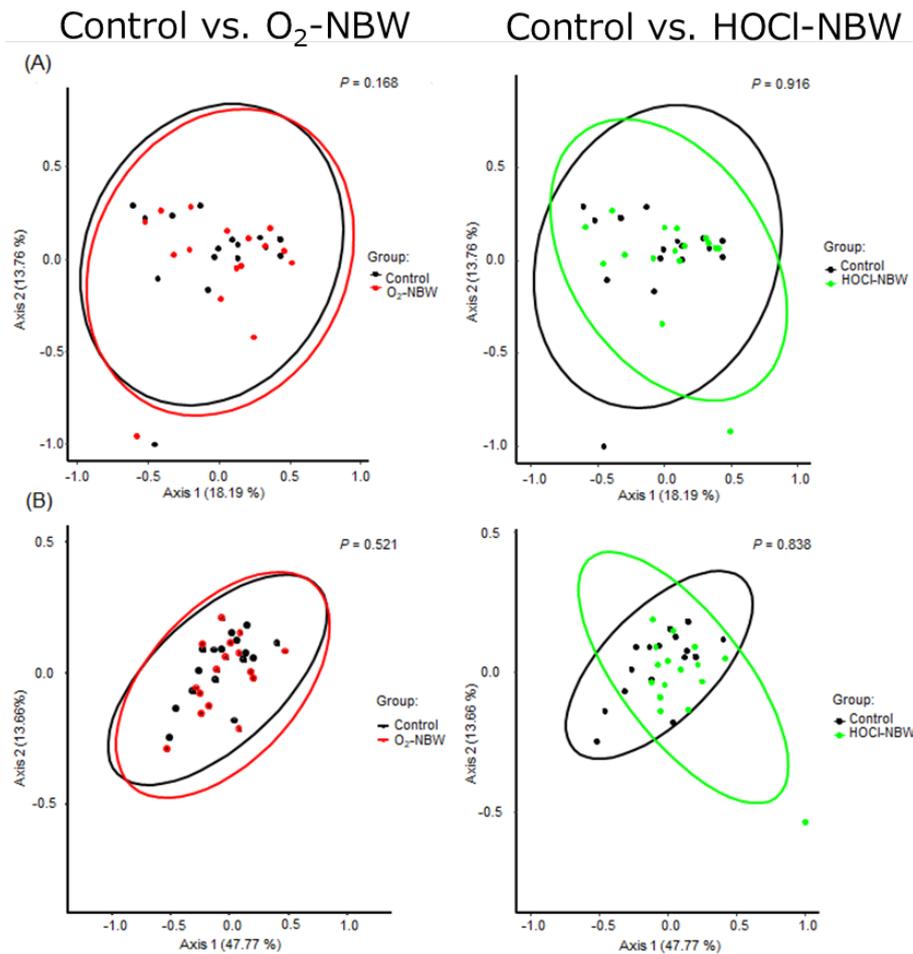


図 2. 唾液サンプルの β 多様性（主座標分析）の比較

図3に検出された OTU と細菌属名を示す。検出された L6 OTU のうち、検出率が 1%以上であった細菌属 14 種について反復測定分散分析を行った結果、3 群間で有意な関連性がみられたのは *Porphyromonas* 属であった。検出率が 1%以上であった細菌種 14 種について反復測定分散分析を行った結果、3 群間で有意な関連性がみられたのは、*Porphyromonas pasteri* (*P. pasteri*)であった (P=0.008)。多重検定の結果、*P. pasteri* においてコントロールと HOCl-NBW の間に有意な差が認められた (P = 0.028)。

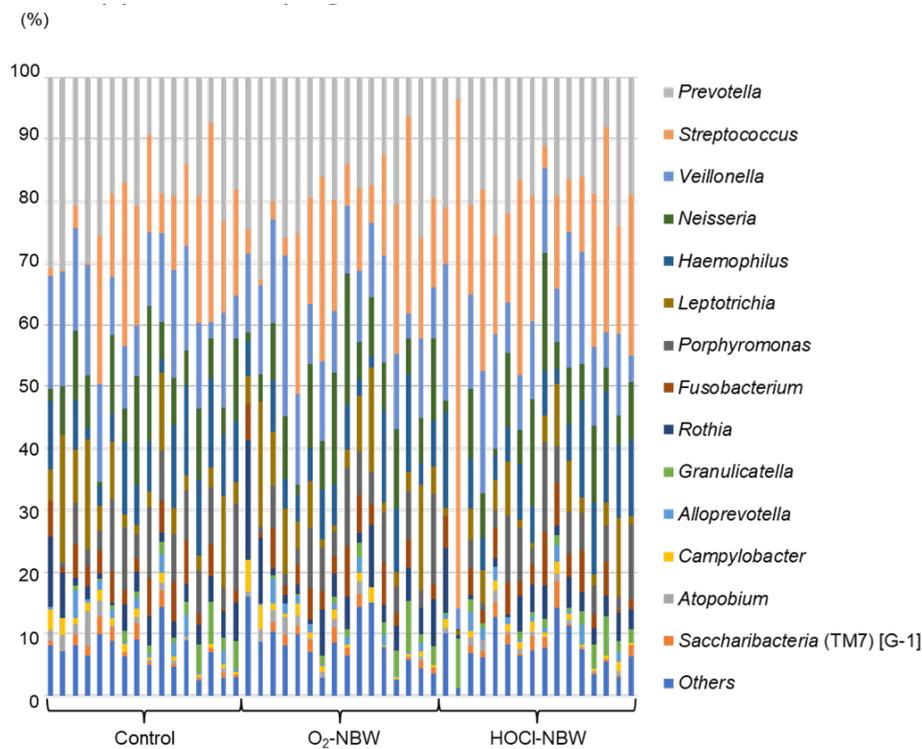


図 3. 各サンプルの細菌属の構成

細菌種	Control	O ₂ -NBW	HOCl-NBW	O ₂ -NBW	HOCl-NBW
<i>Prevotella melaninogenica</i>	9.660	8.674	9.317	-	-
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	8.011	6.504	8.540	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	7.725	8.052	10.223	-	-
<i>Neisseria</i> spp.	7.447	7.859	6.474	-	-
<i>Porphyromonas pasteri</i>	6.000	5.282	4.934	-	*
<i>Veillonella dispar</i>	5.305	5.094	5.101	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	4.715	5.096	9.796	-	-
<i>Rothia mucilaginosa</i>	3.679	5.326	3.294	-	-
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	3.594	3.710	3.708	-	-
<i>Veillonella atypica</i>	3.418	3.385	2.892	-	-
<i>Leptotrichia</i> sp. HMT417	2.569	2.399	1.981	-	-
<i>Prevotella pallens</i>	2.428	2.444	2.284	-	-
<i>Veillonella parvula</i>	2.366	2.169	2.507	-	-
<i>Veillonellarogosae</i>	2.223	1.982	2.201	-	-
<i>Prevotella</i> spp.	2.140	2.418	1.759	-	-
<i>Granulicatella adiacens</i>	1.737	1.531	2.001	-	-
<i>Leptotrichia</i> sp. HMT221	1.484	1.253	0.938	-	-
<i>Streptococcus parasanguinis</i> clade411	1.360	1.348	2.320	-	-
<i>Neisseria subflava</i>	1.350	1.384	1.286	-	-
<i>Prevotella</i> sp. HMT313	1.320	1.189	1.022	-	-
<i>Prevotella salivae</i>	1.226	1.283	0.946	-	-
<i>Campylobacter concisus</i>	1.182	1.433	0.961	-	-
<i>Leptotrichia</i> sp. HMT215	1.116	1.590	1.020	-	-
<i>Saccharibacteria</i> (TM7) [G-1] bacterium HMT352	1.105	0.946	1.123	-	-
<i>Atopobium parvulum</i>	1.079	0.854	0.698	-	-

Data indicate median. *P < 0.05, - : NS.

Statistical analysis was performed with repeated-measures ANOVA between control and O₂-NBW or HOCl-NBW.

表 2. NBW の曝露による細菌種の相対的存在率の比較

主座標分析の結果に基づき階層的クラスター分析の結果、Weighted UniFrac 距離では2つのサブクラスターが認められた。そのうち、軽度歯周病と考えられている4mmの歯周ポケット数の多いクラスターにおいて、HCIO-NBWが*P.pasteri*を減少させていることが明らかになった。

以上のように本研究では、歯科領域で今まで使用されていなかった2種類のNBWの曝露による唾液細菌叢への影響を調べた点が画期的である。その結果、1) 唾液細菌叢の多様性に影響を及ぼさなかった、2) HCIO-NBWの曝露により、特に4mmの歯周ポケット数の多いクラスターにおいて、*P.pasteri*の占有率が減少することがわかった。*P.pasteri*はバイオフィーム形成過程において早期定着菌と後期定着菌の架け橋になっていることが示唆されていることから、HCIO-NBWがバイオフィーム形成段階に関与している可能性がある。

また、O₂-NBWの効果としてOrange Complexの占有率の減少が見られたが有意な関連ではなかった。これは本研究対象者の多くが軽度・中程度歯周病患者であったことが原因と考えられる。

本研究の臨床的意義として、1) 抗菌薬によらずに細菌の増殖を抑制できるため、薬剤耐性菌の出現頻度を抑えることができると考えられる点、2) 口腔バイオフィーム形成の成熟期に作用する可能性があることから、歯面清掃が困難なケースでの洗口への応用が考えられる点、3) 口腔細菌叢のバランスを維持できるため免疫力が低下した高齢者や要介護者の日和見感染症の予防に有用と考えられる点、の3点が考えられる。今後、方針の変更により検討が間に合わなかった、臨床応用に向けた生体への影響や形状の変化などについて詳細に検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Sagara Ken, Kataoka Shota, Yoshida Akihiro, Ansai Toshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 The effects of exposure to O2- and HOCl-nanobubble water on human salivary microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-023-48441-6	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相良 献, 吉田 明弘, 安細 敏弘.
2. 発表標題 ナノバブル水の曝露による唾液細菌叢への影響に関する予備的検討.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021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	安細 敏弘 (Ansai Toshihiro) (80244789)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究協力者	吉田 明弘 (Yoshida Akihiro) (20364151)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	
研究協力者	李 丞祐 (Lee Seung-Woo) (60326460)	北九州市立大学・国際環境工学部・教授 (27101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	相良 献 (Sagara Ken)	九州歯科大学・歯学部 (27102)	

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