

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390430

研究課題名(和文) ヒドロキシルラジカルの低濃度・局所適用による新規ラジカル殺菌技術の歯科臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application of a novel disinfection system based on local administration of low concentration hydroxyl radicals

研究代表者

佐々木 啓一 (Sasaki, Keiichi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30178644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、過酸化水素光分解殺菌技術を応用した歯周病治療器の殺菌効果および生体安全性の評価を行った。さらに臨床研究を行い、歯周病治療における有効性を評価した。治療器を用いた殺菌試験では高い殺菌効果が得られることを実証し、ラットを用いた動物試験においては口腔粘膜に有害作用を及ぼすことはないということを確認した。臨床研究においては、超音波スケーリングのみによる治療に比べて、過酸化水素光分解殺菌技術と超音波スケーリングを併用することで、治療の3ヵ月後に1mm程度歯周ポケットが浅くなることが分かった。以上の研究結果から、本治療器を用いることでより効果的歯周治療を行うことができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bactericidal effect and biological safety of a novel therapeutic device utilizing a disinfection technique based on photolysis of hydrogen peroxide for the treatment of periodontal disease were evaluated in the present study. In addition, clinical study was conducted to compare the efficacy of the device in the treatment of periodontitis with that of conventional root debridement. In vitro bactericidal tests demonstrated that device exerted high bactericidal effect, whereas in vivo test showed that it did not cause adverse effect on the oral mucosa of rats. In the clinical study, it was demonstrated that the treatment using the device significantly reduced the probing pocket depth 3 months after the treatment than conventional root debridement. Thus, it is suggested that the periodontal treatment using the device may improve the effect of non-surgical periodontal therapy.

研究分野：歯科補綴

キーワード：ヒドロキシルラジカル 活性酸素 フリーラジカル

1. 研究開始当初の背景

歯科の二大疾患であるカリエスと歯周病の治療は、病原菌の除去に尽きる。従来までの治療法は原因菌の機械的除去がメインであったが、機械的除去は生体除去も含むことから、安全な化学的除去法が模索されている。そこでわれわれは好中球が生体内で発揮するヒドロキシルラジカル (HO・) による化学的殺菌のメカニズムに着目した。そのような中、われわれの研究グループが低濃度過酸化水素に 405 nm の可視光を照射することで、HO・を効率良く生成する方法を見つけ出した (Kanno T et al. 2008)。この殺菌の特徴は、低濃度過酸化水素水と低刺激波長の光の組み合わせであるため安全であり、光の on-off で殺菌力をコントロールできることにあり、歯科臨床応用での取り扱いが非常に容易である点である。本殺菌技術を歯科臨床に応用するためには、本殺菌技術の歯科疾患原因菌に対する殺菌能と生体安全性への影響を評価する必要があると考えた。

2. 研究の目的

われわれは、3%以下の低濃度過酸化水素に 405 nm の可視光を照射することで、HO・を効率的に生成する方法を開発した。本法は、安全性が担保された低濃度過酸化水素水と可視光を用いる点、さらに光量を調節することで殺菌力をコントロールしうる点に特徴を有する。

そこで本研究では、過酸化水素光分解殺菌技術による、歯科疾患原因菌に対する殺菌能の評価、生体安全性を詳細に検討し、前臨床試験および臨床試験へと発展させ、本ラジカル殺菌技術を歯科臨床応用するための基盤を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 殺菌能の評価

実験には、*Staphylococcus aureus* JCM 2413 と、*Streptococcus mutans* JCM 5705 を供試した。これまでのわれわれの殺菌試験は、96 穴プレートの各ウェルに、過酸化水素と菌液を混和し、その上からレーザー光 (LD) を照射するという静的条件下での効果を検証していた。しかし、今回は、実際に治療で使用するような流水条件を再現し、動的条件下で試験を行えるようなシステムを考案した (図 1)。

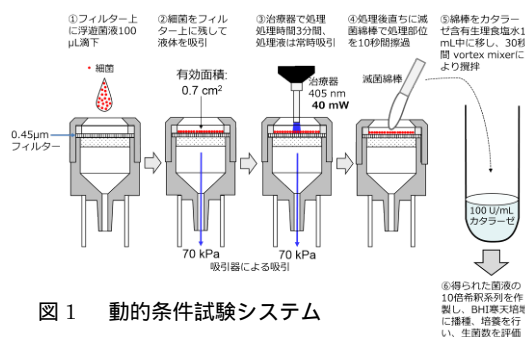


図 1 動的条件試験システム

試験群として、滅菌生理食塩水のみ、滅菌生理食塩水 + LD 照射、1M 過酸化

水素のみ、1M 過酸化水素 + LD 照射、という 4 群を設定した。試験には、実際に歯周病治療を行うことができる試作歯周病治療器 (図 2) を使用し、流水中は 0.45 µm の滅菌フィルターを通して吸引器による吸引を行った。試作治療器からの LD は、波長 405 nm・出力 40 mW であった。処理時間は 3 分間とし、n=3 で試験を行った。



図 2 試作歯周病治療器

(2) 生体安全性の評価

実験には、Wister 系雄性ラット 9 週齢を供試した。過酸化水素濃度は 1M, LD 波長は 405 nm, 流速 10 mL/min, 処理時間 3 分間とした。ペントバルビタールおよびイソフルラン麻酔下でラットを固定し、下記条件で試験を行った。純水、過酸化水素 + LD 照射 (5 mW) 群、過酸化水素 + LD 照射 (10 mW) 群、過酸化水素 + LD 照射 (20 mW) 群、過酸化水素 + LD 照射 (40 mW) 群の 5 群を設定し、各群 3~5 匹で試験を行った。ラットの上顎左側口蓋粘膜部 (図 3)

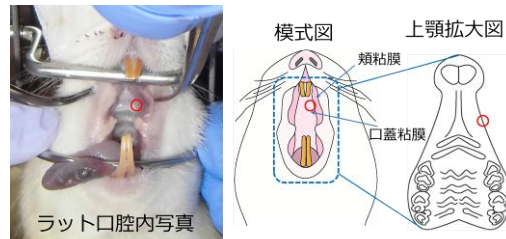


図 3 ラット口腔内写真と模式図

に流水・照射した。1 日 1 回処理を行い、1 回処理後に組織学検査に供したものを 1 回処理群、1 日 1 回 3 日間処理後に組織学検査に供したものを 3 回処理群とした。また、3 日間処理した群は、毎日体重計測を行った。

(3) 臨床研究

研究対象の選定

本研究は東北大学病院臨床研究倫理委員会の承認 (受付番号: 2014-2-20) を得て実施した。

公募により東北大学病院歯科を受診し、歯周病治療を希望する患者群に、本研究の趣旨と方法について文書及び口頭で十分に説明した後、インフォームドコンセントを得られた患者を対象として行った。パノラマ X 線写真検査と口腔内診査を行った。診査結果に基づいて、米国歯周病学会 (1999) および日本歯周病学会 (2006) の分類で広汎型慢性歯周炎 (広汎型の定義は全体の 1/3 以上に歯周病が存在すると定義) と診断された患者 25 名を本臨床研究の対象とした。なお、この患者群の選定に際して以下の基準を設定した。

Inclusion criteria

- ・年齢は 35 歳以上
- ・少なくとも口腔内に 18 歯以上の歯が残っている。
- ・単根歯に関しては、少なくとも歯根の 1/2 以上の歯槽骨の喪失と 6 mm 以上の歯周ポケットを有すること。
- ・大臼歯に関しては、6 mm 以上の歯周ポケットを有すること(分岐部病変は除く)。
- ・全身的に健康であること。
- ・東北大学病院歯科にて歯周病治療を希望する患者群から、本研究の趣旨を説明し、理解と協力を得られる患者

Exclusion criteria

- ・妊婦
- ・喫煙者
- ・3 ヶ月以内に歯肉縁下に及ぶ全顎的な歯周治療を行っている。
- ・少なくとも3 ヶ月以内に抗生物質投与の既往がある。
- ・歯周疾患の臨床的徴候に対して影響を与える可能性がある薬剤を現在使用している。

試作治療器の仕様

- ・外観は図 2 を参照
- ・超音波周波数と振幅：32 kHz, 20 μ m
- ・レーザーユニット
 - 出力：20 mW
 - レーザー波長：405 nm
 - レーザークラス：3B
- ・過酸化水素（日本薬局方オキシドール）
 - 濃度：3%
 - 流量：20~45 mL/min
- ・本体：サイズ 170 x 280 x 200mm 以下、重量 4kg 以下

割付

研究参加患者の口腔内を上下片顎それぞれにおいて左右に分けるスプリットマウスデザインにて安全性と効果検証のための比較試験を実施した。このデザインは、歯科治療の有効性を比較するためのデザインとして一般的に用いられる方法であり、同一被験者内で比較するため個人差の影響を低減できる。本試験では、前述の通り上下顎の左右側においてスクリーニング検査時に PPD 6 mm で、ベースライン検査時に PPD 5.5 mm を有する被験歯を有する患者を被験者として登録した。割付は登録順に従って 1/4 顎毎に行った。なお、患者の歯周病検査は治療の割付を知らない評価者が行った（評価者盲検試験）。

試験手順

研究デザインの概要を図 4 に示す。

1) 口腔清掃

患者の歯周組織検査とインフォームドコンセントを確認し、介入治療実施 2 週間前と 1 週間前に、歯科医師による口腔衛生指導（OHI：Oral Hygiene Instruction）と専門的な歯の機械的清掃（PMTC：Professional Mechanical Tooth Cleaning）を行った。治療後は最終評価が行われるまで、継続しての

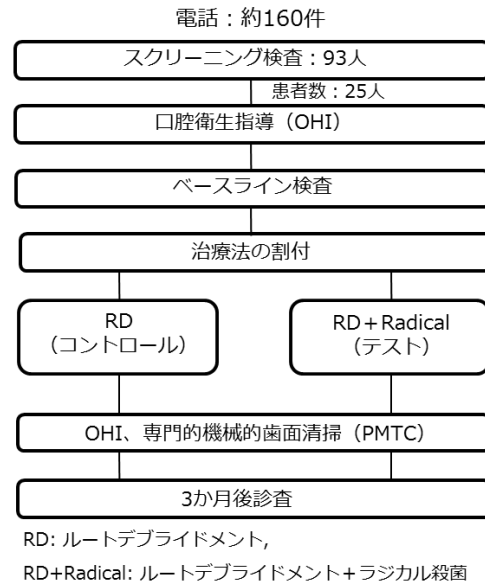


図 4 研究デザインの概要

OHI と PMTC を行い、歯肉縁上の徹底的なプラークコントロールを行った。

2) 治療方法

コントロール群に対しては、局所麻酔下（1/4 顎あたり 2%エピレナミン含有塩酸リドカイン 1.8~5.4ml）で、超音波スケーラーを用いて歯周ポケット内の RD を 3~7 分間行った。テスト群に対しては、局所麻酔下での超音波スケーリング後に 3%過酸化水素と 405 nm レーザー光（出力：20 mW）を併用した治療を 3~7 分間行った。治療時間は術者の判断によって決定した。

評価

治療効果の比較・評価には PPD と BoP をパラメーターとして用いた。これらのパラメーターの測定をベースライン、治療後 2, 4, 8, および 12 週で行った。プロービングにはクリックプローブ（KerrHawe, Switzerland）を用いて定荷重（20~25 g）で行い、PPD は 0.5 mm 単位で記録した。フォローアップ期間中は来院時毎の OHI と PMTC を継続し歯肉縁上のプラークコントロールを行った。また、ベースラインと治療後 1, 12 週で細菌検査を行った。細菌検査は、被検部位の縁上プラークを除去した後、滅菌ペーパーポイント 1 本をポケット底部相当部まで挿入し、10 秒後、輸送培地 1mL 中（Anaerobe Broth MIC）に投入した。このポケット内細菌を採取した輸送培地を 10~10⁴ 倍に滅菌生理食塩水で希釈した。ブルセラ血液寒天培地（ブルセラ HK 寒天培地, 5%馬脱繊維血）に各希釈液を 10 μ L ずつ接種し、37 $^{\circ}$ C で 7 日間嫌気培養を行い、ブルセラ血液寒天培地に生えた全コロニー数（TVC）を総嫌気性菌コロニー数とし、同培地から Black-pigmented anaerobic rods (BP) コロニー数も計測した。治療後の細菌検査については本方法のみでは検出限界以下になることが予想されるため、希釈していない菌液 100 μ L を接種する

培養も同時に行った。これにより、細菌の検出限界を < 10 CFU (Colony Forming Unit)/site とした。

上記の検査項目に加えて、治療開始前 (OHI1 回目実施前) ベースライン検査、治療後 2, 4, 8, 12 週の検査時に被験部位のプラークインデックスを評価した。また、治療開始前 (OHI1 回目実施前) と治療後 12 週の検査時には口腔内全体 (すべての残存歯) を対象としたプラークインデックスを評価した。

4. 研究成果

(1) 殺菌能の評価

図 5 に、*S. mutans* の殺菌試験の結果を示す。

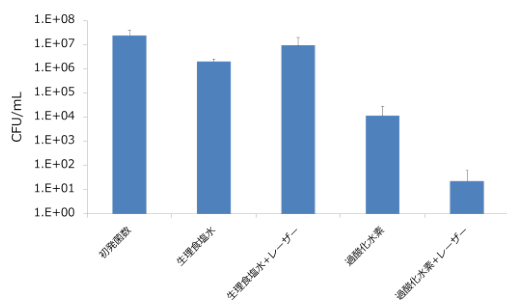


図 5 *S. mutans* の殺菌試験結果

試作治療器を用いた動的条件下での殺菌試験においても、これまで行ってきた静的条件下で得られた結果と同様に、過酸化水素 + LD 照射群の殺菌効果が最も高い結果となった。本結果より、治療時の条件と同じ流水下においても、本殺菌技術は非常に高い殺菌効果が得られることが確認された。

(2) 生体安全性の評価

図 6 に 3 回処理群の組織学像を示す。1 回処理群も 3 回処理群も過酸化水素 + LD 処理の最高出力 40 mW においても、口腔粘膜組織に異常所見は認められなかった。

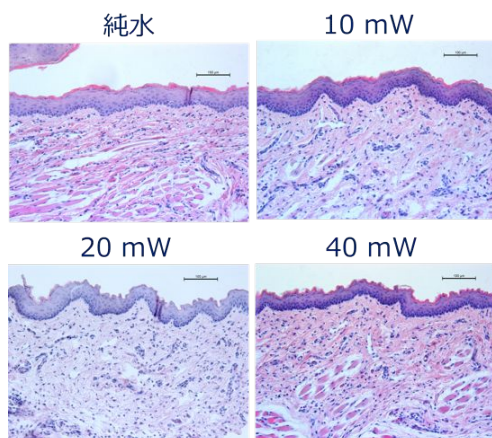


図 6 3 回処理群の組織学像

体重については、分散分析の結果、試験群および処理日数による有意な影響は認められなかった。本処理により、摂餌量が落ちる等の毒性症状はないことが推察された。

(3) 臨床研究

25 人の被験者のうち 2 人が本研究への参加を撤回した。1 人は治療時の局所麻酔で気分が悪くなったことを理由とし、もう 1 人は歯肉縁下の治療後に疼痛が出たことと過酸化水素の使用に由来すると考えられる咽頭部の違和感を理由とした。ただし、当該被験者によると歯肉縁下の疼痛および咽頭部違和感は 1 週間程度で解消した。残りの 23 人の被験者については治療後 12 週まで経過観察を行った。

口腔内全体のプラークインデックスについては、治療開始前の平均が 1.36 であったのに対して治療後 12 週では 0.21 となった。また、被験部位ごとにプラークインデックスを評価した結果、テスト群もコントロール群も治療開始前は 1.5 以上であったのに対して、OHI 後のベースライン時には 0.5 未満となり治療後 12 週検査までその値が維持された。したがって、患者による歯肉縁上のプラークコントロールは十分に実施されたものと考えられる。

図 7 に PPD の変化を示す。治療後にはテスト群およびコントロール群で PPD および BoP の減少が認められた。各診査時における PPD を t-test で検定すると 4 週後および 8 週後に、テスト群で有意に低い PPD が認められた。

ベースライン検査時に PPD 5.5 mm の部位に対して超音波スケーリングに過酸化水素光分解殺菌治療を併用することで術後 4 週、8 週、12 週で RD のみによる治療部位に比べて有意に PPD が浅くなること示された。PPD の減少値の差は術後 4 週、8 週でそれぞれ 0.53、0.87、1.05 mm であった。

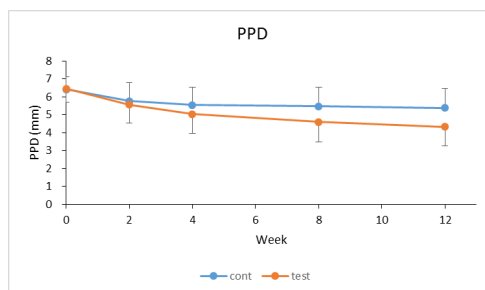


図 7 PPD の変化

一方、BoP については、数値上は 10 ~ 20% 程度の改善が認められた。しかしながら、治療後の BoP は程度としては BoP の数値で表される以上に非常に軽度となっており臨床的な感覚からは十分に治癒傾向が認められたため、本研究における BoP は偽陽性を多く

含んでいる可能性が考えられる。これに関しては今回採用したプロービング方法による影響が大きいと考えられる。今回用いたクリックプローブは樹脂製であり、通常の金属製のプローブよりも弾力があるため歯周ポケットへの挿入が困難であり、プローブ挿入時に通常よりも強い圧が加わったことが考えられる。また、本研究では PPD を 0.5 mm 刻みでできるだけ正確に診査することに優先順位をおいたため一部位当たりのプロービング検査に時間がかかり、繰り返して歯周ポケット内の組織を機械的に損傷したことも考えられる。これらが結果として BoP 偽陽性につながった可能性がある。

細菌検査の結果、総菌数 (TVC) および黒色素産生菌数 (BP) が治療後に減少することが確認された。また、TVC および BP に関してテスト群の方が平均値では低い値が認められたが統計学的な有意差は認められなかった。TVC に占める BP の割合もテスト群とコントロール群で差は認められなかった (図 8)。

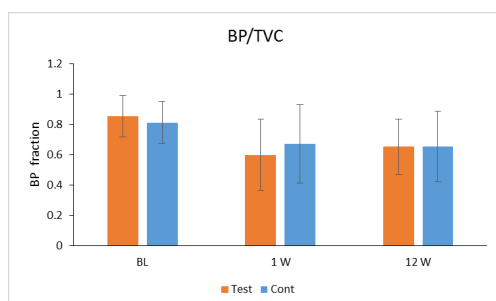


図 8 総菌数に占める BP の割合の変化

一方、ベースライン検査時 (BL) と比較して治療後の検査時に菌数が減少した頻度、および BL と比較して菌数が 1/10 となった頻度を TVC と BP について分析した結果、テスト群の方が高い頻度を示す傾向が認められた。特に、TVC に関しては 1 週間後の細菌検査において BL よりも菌数が減少した頻度が、テスト群で有意に高く ($p < 0.05$) BP に関しても 1 週間後の細菌検査において BL よりも菌数が 1/10 となる頻度がテスト群で有意に高くなった ($p < 0.05$)。菌数を平均値で評価した場合にはデータの大きなばらつきにより群間で有意な差が認められなかったが、被験者毎に菌数減少の程度について頻度で比較するとテスト群の方がコントロール群よりも効果があることが示唆された。ラジカル殺菌歯周病治療器の殺菌効果によるこれらの細菌学的指標の改善が臨床的指標 (PPD) の改善につながった可能性が考えられる。

以上の研究結果から、過酸化水素光分解殺菌技術は、殺菌効果が高く、生体安全性も担保され、臨床応用するに値する殺菌技術であり、実際の臨床研究においても、本殺菌技術により高い歯周病の改善が確認された。

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 23 件)

- (1) Toki, T., Nakamura, K., Kurauchi, M., Kanno, T., Katsuda, Y., Ikai, H., Hayashi, E., Egusa, H., Sasaki, K., Niwano, Y.: Synergistic interaction between wavelength of light and concentration of H₂O₂ in bactericidal activity of photolysis of H₂O₂. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015 Mar;119(3):358-362. (査読有) doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.08.015.
- (2) Tsuruya, M., Niwano, Y., Nakamura, K., Kanno, T., Nakashima, T., Egusa, H., Sasaki, K.: Acceleration of proliferative response of mouse fibroblasts by short-time pretreatment with polyphenols. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014; 174(6): 2223-2235. (査読有) doi: 10.1007/s12010-014-1124-7
- (3) Odashima, Y., Nakamura, K., Ikai, H., Kanno, T., Meirelles, L., Sasaki, K., Niwano, Y.: Postantibiotic effect of disinfection treatment by photolysis of hydrogen peroxide. *Journal of Chemotherapy* 26(2):92-100, 2014. (査読有) doi.org/10.1021/jf303177pl
- (4) Nakahara T, Harada A, Yamada Y, Odashima Y, Nakamura K, Inagaki R, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. Influence of a new denture cleaning technique based on photolysis of H₂O₂ the mechanical properties and color change of acrylic denture base resin. *Dent Mater J*. 2013, 32(4); 529-536. (査読有) doi: 10.4012/dmj.2013-047
- (5) Oyamada A, Ikai H, Nakamura K, Hayashi E, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. In vitro bactericidal activity of photo-irradiated oxydol products via hydroxyl radical generation. *Biocontrol Sci*. 2013, 18(2); 83-88. (査読有) http://doi.org/10.4265/bio.18.83
- (6) Nakamura K, Shirato M, Ikai H, Kanno T, Sasaki K, Kohno M, Niwano Y. Photo-irradiation of proanthocyanidin as a new disinfection technique via reactive oxygen species formation. *PLoS One*. 2013, 8(3); e60053. (査読有) doi:10.1371/journal.pone.0060053
- (7) Ikai, H., Odashima, Y., Kanno, T., Nakamura, K., Shirato, M., Sasaki, K., Niwano, Y.: In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide. *PLoS ONE*, 8(11):e81316, 2013. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0081316
- (8) Ikai, H., Nakamura, K., Kanno, T., Shirato, M., Meirelles, L., Sasaki, K., Niwano, Y.: Synergistic effect of proanthocyanidin on the bactericidal action of the photolysis of H₂O₂. *Biocontrol Science*, 18(2):137-141, 2013. (査

読有) doi: 10.4265/bio.18.137

- (9) Nakamura, K., Yamada, Y., Ikai, H., Kanno, T., Sasaki, K., Niwano, Y.: Bactericidal action of photo-irradiated gallic acid via reactive oxygen species formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40):10048-10054, 2012. (査読有) doi.org/10.1021/jf303177pl
- (10) Hayashi, E., Mokudai, T., Yamada, Y., Nakamura, K., Kanno, T., Sasaki, K., Niwano, Y.: In vitro and in vivo anti-Staphylococcus aureus activities of a new disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(2):193-197, 2012. (査読有) doi: http://doi.org/10.4265/bio.18.137
- (11) Kanno, T., Nakamura, K., Ikai, H., Hayashi, E., Shirato, M., Mokudai, T., Iwasawa, A., Niwano, Y., Kohno, M., Sasaki, K.: Novel denture cleaning system based on hydroxyl radical disinfection. *International Journal of Prosthodontics*, 25(4):376-380, 2012. (査読有)
- [学会発表](計 15 件)
- (1) 倉内美智子, 唐木英俊, 中村圭祐, 菅野太郎, 勝田悠介, 猪飼紘代, 林栄成, 佐々木啓一, 庭野吉己. 過酸化水素光分解殺菌技術における光の波長と過酸化水素濃度の相乗作用 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会 平成 26 年 9 月 25 日 (東京)
- (2) 生宏, 中村圭祐, 菅野太郎, 佐々木啓一, 庭野吉己. 過酸化水素の光分解および水の超音波分解を併用したヒドロキシラジカル生成系の殺菌効果 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会 平成 26 年 9 月 25 日 (東京)
- (3) Sheng H, Nakamura K, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. Bactericidal effect of H2O2 in combination with sonolysis of water via hydroxyl radical generation. 5th International Symposium for Interface Oral Health Science 平成 26 年 1 月 20 日 ~ 21 日 (仙台)
- (4) 小田島優, 中村圭祐, 猪飼紘代, 菅野太郎, 佐々木啓一, 庭野吉己. 過酸化水素光分解殺菌法の短時間処理が残存細菌に及ぼす増殖抑制効果 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会 平成 25 年 9 月 10 日 ~ 11 日 (大阪 豊中)
- (5) Ikai H, Odashima Y, Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. Advantages of new disinfection treatment utilizing photolysis of hydrogen peroxide -Postantibiotic effect and low risk of inducing bacterial resistance- The innovative research for Biosis-Abiosis intelligent Interface Summer Seminar in Sendai. 平成 25 年 8 月 29 日 ~ 30 日

(宮城 蔵王)

- (6) 菅野太郎, 中村圭祐, 猪飼紘代, 庭野吉己, 佐々木啓一. 過酸化水素光分解殺菌技術を応用した新規歯周病治療器の開発 日本歯周病学会 2013 年春季学術大会 (第 56 回) 平成 25 年 5 月 31 日 ~ 6 月 1 日 (東京)
- (7) 白土翠, 猪飼紘代, 中村圭祐, 菅野太郎, 佐々木啓一, 庭野吉己. 過酸化水素光分解殺菌法に対する熱エネルギーの相乗効果 第 22 回日本歯科医学会総会 平成 24 年 11 月 9 日 ~ 11 日 (大阪)
- (8) 小山田晃, 猪飼紘代, 中村圭祐, 菅野太郎, 佐々木啓一, 庭野吉己. 市販オキシドールの光分解殺菌効果 日本防菌防黴学会第 39 回年次大会 平成 24 年 9 月 11 日 ~ 12 日 (東京)
- (9) Kanno T, Nakamura K, Ikai H, Shirato M, Mokudai T, Niwano Y, Sasaki K. New Denture-Cleaning Device Utilizing Hydroxyl Radical Disinfection. International Workshop on Biosis-Abiosis intelligent Interface Science. 平成 24 年 8 月 2 日 ~ 3 日 (宮城 蔵王)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 啓一 (SASAKI, Keiichi)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 3 0 1 7 8 6 4 4

(2) 研究分担者

菅野 太郎 (KANNO, Taro)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 3 0 3 0 2 1 6 0

林 栄成 (HAYASHI, Eisei)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
研究者番号: 6 0 3 7 5 1 0 2

猪飼 紘代 (IKAI, Hiroyo)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 2 0 4 3 1 5 8 8

中村 圭祐 (NAKAMURA, Keisuke)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 3 0 4 3 1 5 8 9

庭野 吉己 (NIWANO, Yoshimi)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 4 0 3 7 5 1 8 4

河野 雅弘 (KOHNO, Masahiro)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
研究者番号: 7 0 3 3 3 2 2 6