

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592917

研究課題名(和文) 機能的抗菌作用を有する歯科材料の研究・開発

研究課題名(英文) Research and development of the dental material having a functional antibacterial action

研究代表者

野村 雄二 (NOMURA, YUJI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：80218370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内の虫歯の原因の一つが、乳酸等の酸を産生する細菌である。そこで、細菌が酸を産生している時に有効に作用する消毒剤および歯科材料の研究・開発を行った。この研究のために用いたものが二酸化塩素の水溶液である。二酸化塩素は、幅広い抗菌スペクトルときわめて低濃度で強力な殺菌力を有しており、生体に対する安全性もたかい。この性質を利用して、細菌が酸産生能を有したときに、より強力で滅菌効果を示す機能的消毒薬および歯科材料の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：The acid such as lactic acid which bacteria produces in the mouth is one of the cause of the dental caries. So we performed the development of the disinfectant and dental materials which acts effectively when bacteria was producing an acid. The one used for this study is an aqueous solution of chlorine dioxide. Chlorine dioxide possesses a wide antibacterial spectrum and strong sterilizing power on the very low concentration, and the safety to a living body is also high. Using this nature, the functional disinfectant and the dental materials have been developed which indicate the more strong sterilization effect when bacteria possessed an acid production.

研究分野：生体材料

キーワード：機能的消毒作用 二酸化塩素 歯科材料 歯科器機

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトには700種におよぶ細菌などの微生物が共生しており、なかでも、口腔内には300種類以上の細菌が存在している。これらの微生物は、ヒトが健康な状態では共存状態にあるが、免疫系が落ちたり、微生物同士のバランスが崩れたりするとヒトに対して害となりえる。口腔内殺菌薬として、塩化ベンザルコニウムやイソジン等様々な薬剤が使用されている。しかしながら、これらの薬剤は、口腔内の有用な微生物を含めてほとんどの微生物を殺すととも微生物のバランスを失いかねない。そこで、本研究では、通常は細菌やウイルスに対して静菌的に働き、微生物が生体にとって有害性を示す状態の時にだけ滅菌作用を示す歯科材料の開発を目指すものである。口腔内において、この目的のために、もっとも適した薬剤が二酸化塩素をベースにしたものであると考えられる。二酸化塩素は、幅広い抗菌スペクトルときわめて低濃度で強力な殺菌力を有することが知られている。さらに、二酸化塩素は、次亜塩素酸ナトリウムのように発ガン性物質であるトリハロメタンを生じることがなく安全性が高いといわれている(亜塩素酸水、食品安全委員会、厚生労働省、2008年)。二酸化塩素は、即効性が強く耐性菌が生じにくいとされており、申請者らの研究成果においても次亜塩素酸ナトリウムと比較してきわめて安全性が高いことが検証されている。

また、二酸化塩素は水溶液中でガス状とイオン性の両方の性質を併せ持ち、細菌の産生する酸強度に比例して二酸化塩素はガス状に移行し、細菌の細胞壁にたいする透過性が向上する。この性質は細菌が産生物質を産生したときに、より強力に殺菌性を発揮することができる。申請者は、このメカニズムに注目し、この二酸化塩素をベースにして、短期的に口腔内で使用され、かつ抗菌性が要求される仮封材やティッシュコンディショナー等に機能的抗菌作用を付与した歯科材料の開発を行うことを着想した。

2. 研究の目的

口腔内細菌においてカンジダやミュータンス菌は、齲蝕や日和見感染症の原因菌として重要視されているが、これらの菌は増殖期に酸を産生することが知られている。そこで、産生された酸濃度に比例して抗菌作用を増強させる歯科材料を、飲料水の滅菌や食品添加物として使用されている二酸化塩素を利用して、安全で機能的抗菌作用を有した歯科材料の開発を目的とする。

3. 研究の方法

酸産生能を有するカンジダやミュータンス菌は、菌の増殖安定期やバイオフィルム期よりも増殖が活発な指数増殖期により多くの酸を産生する可能性が高く、さらに炎症により体内の血清成分が漏出すると菌の増殖は増大する。よって、以下の方法により機能的抗菌作用を有した歯科材料の研究・開発を行う。

(1) 口腔内常在菌の増殖および分化の実態を明らかにする

ヒトに炎症やう蝕等の有害性を示すカンジダ等の真菌類およびミュータンス菌等の酸産生能を有した口腔内常在菌の増殖期、分化期およびバイオフィルム形成期における実態を明らかにし、各期における酸産生能を調べる。さらに、口腔内細菌同士の相互作用による酸産生能に関しても明らかにする。

(2) 機能的抗菌作用を有する抗菌剤の調整

二酸化塩素は、水溶液中でガス状とイオン性の性質を併せ持ち、ガス状では細菌の細胞壁の脂

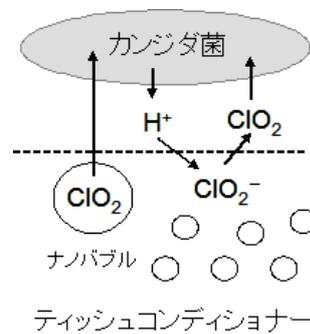
質層を透過し細胞質および核の活性を阻害する。イオン状態では細菌の細胞壁に影響を与える。このガス状とイオン状態の存在比を細菌の酸産生能に合わせて、細菌の産生する酸に特に強い殺菌性を発揮するように調整する

(3) 機能的抗菌作用を有する歯科材料の作製

二酸化塩素は仮封材やティッシュコンディショナー等の有機歯科材料と反応性が高く、二酸化塩素をナノバブル内に封入して歯科材料(仮封材およびティッシュコンディショナー)に混入する。ナノバブル発生装置(バブルタンク社製)は、共同研究を行っている当大学大学院医歯薬学総合研究科歯科補綴研究室の設備備品を使用する。

(4) 機能的抗菌作用を有する歯科材料

下図に二酸化塩素のカンジダ菌に対する殺菌作用を示す。ナノバブルに封入された二酸化塩素は除放的にカンジダ菌に取り込まれて殺菌作用を示し、ティッシュコンディショナー内の二酸化塩素イオンは、



カンジダ菌の産生する酸によりガス状の二酸化塩素となってカンジダ菌に吸収される。これらの滅菌作用は、カンジダ菌を主体とした微生物の培養実験で検証する。測定方法は、マイクロバイアピリティ法(WST法)、コロニー法および細菌

染色による光学的観察にて行う。

(5) 生体に対する安全性の確立を行う

機能的抗菌作用を有する歯科材料から溶出する成分分析は、当大学大学院中央研究室のLCMSおよびGCMSで行う。さらに、in vitroでの細胞毒性、遺伝毒性、アポトーシス等の安全性評価試験を行うと同時に、in vivoでの安全性評価試験を行う。

4. 研究成果

口腔内の虫歯の原因の一つが、乳酸等の酸を産生する細菌である。そこで、細菌が酸を産生している時に有効に作用する消毒剤の研究を行った。この研究のために用いたものが二酸化塩素の水溶液である。この水溶液は、酸性側では二酸化塩素水(ClO_2)となり、アルカリ性側ではイオン化(ClO_2^-)して亜塩素酸水となる。この溶液を、酸産生菌の一つであるグラム陽性連鎖球菌 *Streptococcus mutans* に作用させ、菌が酸産生能を有したときに殺菌作用をしめす機能的な殺菌剤の開発を目的として、その有効性についての検討を行った。

(1) 材料及び方法

二酸化塩素水、亜塩素酸水の調整と、*Streptococcus mutans* の培養

アクアハート・カイロジェット(カイロ・ケム社、ドイツ)のA液(亜塩素酸ナトリウム水溶液)とB液(塩酸)を混合し、3000ppmの二酸化塩素水を生成し、滅菌水で希釈後、1、5、10ppmの曝露用二酸化塩素水と亜塩素酸ナトリウムを滅菌水で希釈後、10、50、100ppm曝露用亜塩素酸ナトリウムを作成した。グラム陽性通性嫌気性菌 *S. mutans* の培養にはBHI培地を用い、5mlの培地に対し20μlの *S. mutans* を摂取し、37℃で24時間培養を行った。

コロニー法による *S. mutans* の再生能の検討

BHI 液体培地で 37、24 時間培養した *S. mutans* を、ブルケルチュルク計算盤でカウントし、 10^4 cell/ml になるように菌液を滅菌水で希釈した。チューブに菌液 1ml、曝露液に (二酸化塩素水、亜塩素酸水、コントロールとして滅菌水) を 1ml ずつ入れ、曝露時間 (1、3、5 分) 後、10 μ l を BHI 寒天培地に滴下し、白金耳で塗抹し、37、24 時間培養した。その後、コロニー数をカウントし、2 (希釈倍数)、100 (10 μ l を 1ml に換算) をかけて CFU/ml に換算した。

pH の測定

BHI 培地を用いて *S. mutans* を 37、24 時間培養し培養後、3000rpm、10 分間遠心し、その後上清を取り、精製水を 1ml 入れ、よく混和した。

予め、用意しておいた 1%スクロース、3%スクロース、5%スクロース、コントロール (精製水と菌液) に作成しておいた菌液を 80 μ l 入れ、混和させ pH を測定した。1 時間培養後、pH 測定と菌数算定をそれぞれ測定した。12 時間、24 時間培養し、pH と菌数を測定した。

5%スクロース培地における菌の増殖能

BHI 培地を用いて *S. mutans* を 37、24 時間培養し培養後、5%スクロースを添加したものと、添加していないものを用意し、二酸化塩素水 1ppm、5ppm、10ppm と亜塩素酸水 10ppm、50ppm、100ppm に培養した菌をそれぞれ 1ml ずつ添加し混和後、BHI 培地に 10 μ l ずつ添加し、白金耳を用いて塗抹し 24 時間培養し、コロニー数を算定した。

(2) 結果

二酸化塩素水による *S. mutans* の再生能の検討

二酸化塩素水による *S. mutans* に対する曝露では、1ppm から 10ppm へと濃度が高くなるにつれ、有意に増殖能は低下し、*S. mutans* に対して効果的な曝露濃度であることが示唆された。(ANOVA 及び POST-hoc test) この二酸化塩素水の結果と同様な値を示した亜塩素酸水の曝露濃度は、10ppm から 100ppm 程度であった。

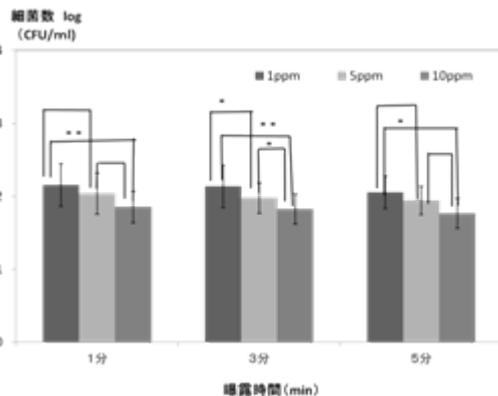


図1 コロニー法 二酸化塩素

pH による *S. mutans* の酸産生能の測定

5%スクロースを用いた pH 測定では、スクロースを添加した場合、濃度が高くなるにつれ、12 時間培養で pH が約 7 から 5 付近まで急速に低下していた。また、スクロースを添加していない場合は、各培養時間において pH の減少は見られず、ほぼ一定だった。

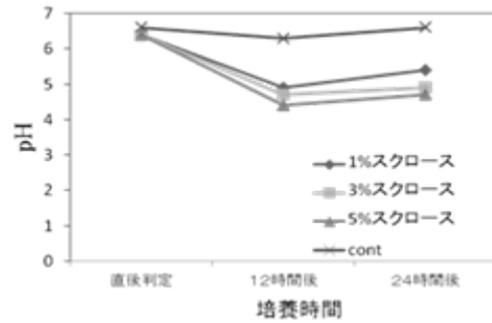


図2 pH 各スクロース水溶液

5%スクロースにおける菌の増殖能

二酸化塩素水と亜塩素酸水を用い菌の増殖能を比較したところ、二酸化塩素水は、*S. mutans* が酸を産生してもその効果に有意な差は小さかったが、亜塩素酸水は、*S. mutans* が酸を産生することで、殺菌効果を大きく増すことが分かった。

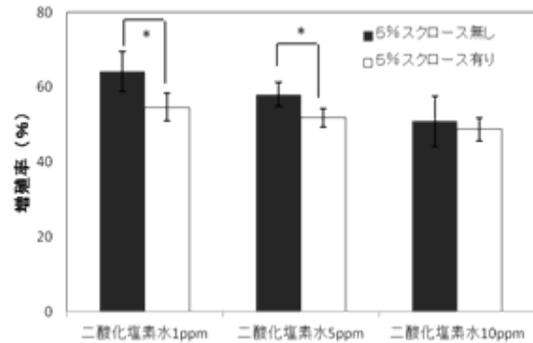


図3 5%スクロースにおける菌の増殖能 二酸化塩素水の場合

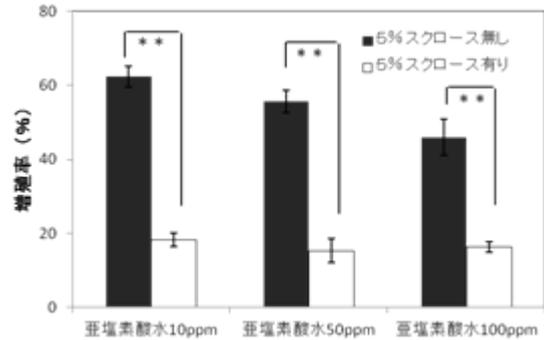


図4 5%スクロースにおける菌の増殖能 亜塩素酸水の場合

(3) 考察

口腔内には、約 300 種類の細菌が存在しており、生体と共存して生活している。それらは微妙なバランスのもとで生活しており、それらの菌は生体にとっても必要であると考えられる。よって、菌が生体にとって害となるようなときに、より殺菌作用を示す機能的消毒剤の研究を行った。今回は、酸産生能細菌に注目したために、pH の違いによって殺菌作用の違いを呈する二酸化塩素の水溶液を使用して実験を行った。その結果、酸性側の二酸化塩素水は、アルカリ性側の亜塩素酸水に比較してより低濃度で殺菌効果を示すことが分かった。

pH 測定では、5%スクロースを添加した場合、時間の経過とともに pH が減少していたが、一方添加して

いない場合では、pHの低下は見られなかった。よって、スクロースを添加した方のみpHの低下が見られたことから、菌はスクロースを利用して乳酸を産生しpHを酸性傾向にしていることがわかった。

二酸化塩素水と亜塩素酸水を用いた場合の菌の増殖能を比較したところ、亜塩素酸水は殺菌効果が弱い、*S mutans* が産生する乳酸により殺菌効果が増大する事が分かった。

以上より、二酸化塩素水は酸産生菌の酸に影響されること無く効果的に働き、亜塩素酸水は通常は殺菌作用が弱いものの、菌が酸を産生すると殺菌効果を増大させるために機能的消毒剤として使用できるものと考えられる。

今回の研究により、二酸化塩素水は低濃度で *S mutans* の再生能を低下させることができ、亜塩素酸水は殺菌作用は弱い菌が産生する酸と反応することで、殺菌効果が増大することが分かった。

よって、亜塩素酸水を歯科材料に含有させることにより、機能的で除放性を兼ね備えた歯科材料を開発できることが示唆された。

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 1 件)

1. Fujita K., Nomura Y., Sawajiri M., Mohapatra P.K., El-Shemy H.A., Nguyen N.T., Hosokawa M., Miyashita K., Maeda T., Saneoka H., Fujita S., Fujita T., The extracts of Japanese willow tree species are effective for apoptotic desperation or differentiation of acute myeloid leukemia cells, Pharmacognosy Magazine, 2014 10(38), 125-131. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 二酸化塩素の *C. albicans* バイオフィルムに対する抗菌効果：堀 智治，野村 雄二，呉本 晃一，貞森 紳丞，赤川 安正：第 121 回日本補綴歯科学会学術大会、横浜、2012 年 5 月 26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：二酸化ハロゲンを含む水溶液製造方法及び水蒸気発生装置

発明者：野村雄二、澤尻昌彦

権利者：医療環境テクノ株式会社、ミカサ商事株式会社

種類：特許

番号：特願 2014-113404

出願年月日：2014 年 5 月 13 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 雄二 (NOMURA YUJI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：80218370

(2) 研究分担者

澤尻 昌彦 (SAWAJIRI MASAHIKO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：20325195

(3) 連携研究者

高橋 徹 (TAKAHASI TORU)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：70369122