

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659930

研究課題名(和文) 活性酸素由来の殺菌能を有する高分子体を応用した固体化殺菌剤の開発

研究課題名(英文) The development of high molecular substance expressing antibacterial activity derived from active oxygen

研究代表者

水野 守道 (MIZUNO, Morimichi)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10125354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円、(間接経費) 420,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は活性酸素発生能を有する高分子化合物を開発し、ブラッシングに代わる口腔内清掃システムを構築しようとするものである。種々高分子化合物を検討した結果グルコース重合体が活性酸素発生能を有する高分子体として適した素材であることが明らかになった。活性酸素を発生するグルコース重合体(固体化活性酸素)は粒径が100から200 μ の場合、安定して活性酸素を保持した。さらに糖とアミノ酸から合成されるMaillard反応産物に固体化活性酸素を安定化する効果のあることも示され、中でもグルコースとヒスチジンから合成されたMaillard反応産物が最も効果的であった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is development of high molecular substance generating active oxygen and establishment of new oral cleaning system instead of tooth brushing. By the several investigations, the polymer composed of glucose molecule was shown to be a suitable material producing the enough amounts of active oxygen. The polymer producing active oxygen was synthesized by the mixing with 1 M of hydrogen peroxide solution, followed by the removal of water and grinding to make a powder (solid active oxygen powder). The solid active oxygen powder was most stable when their particle size was between 100 and 200 micro-meter. Furthermore, Maillard reaction product (MRP) synthesized from monosaccharide and amino acid promoted the stability of active oxygen exist in solid active oxygen powder. Especially, MRP synthesized from glucose and histidine was most effective to stabilize the active oxygen among investigated MRPs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：活性酸素発生能 高分子化合物

1. 研究開始当初の背景

これまでブラッシングに代わる口腔内清掃法として殺菌剤による洗口が行われてきたが明らかな効果があったのは少数例にすぎない。なぜなら洗口剤の効果は瞬間的であり、高濃度の殺菌剤は飲みこむ危険性があるため低濃度とせざるを得ないためである。

すなわちこれまでの殺菌剤には流動性があるので口腔内に留めることが難しく、嚥下機能が低下している障害者や高齢者には使用が難しいという問題があった。

本研究では流動性を無くした、これまでにない殺菌剤の開発を目的とし、将来的には障害者や高齢者でも安心して使用できる口腔清掃法を構築することを目指す。

2. 研究の目的

申請者はこれまで漂白能を有する歯科用レジンの開発に成功し、このレジンを歯牙の漂白治療に用いている（歯界展望 110；145 - 153, 2007）。

過酸化水素は分解する過程で活性酸素であるヒドロキシラジカルを産生し、これらが漂白能を発現する。一方ヒドロキシラジカルは白血球における主要な殺菌物質でもあるので、申請者が開発した漂白能を有するレジンには殺菌効果が期待される。しかしこのレジンからは活性酸素が短時間のうちに大量発生するため活性酸素は短時間で分解、消失する。しかし口腔内清掃に使用するためには活性酸素が安定的に存在し、長時間にわたり殺菌能を発現することが求められる。

本研究では活性酸素が安定的に保持されることで殺菌活性が長時間発現される条件を明らかにし、殺菌活性が長時間にわたり発揮する殺菌剤を開発する。

3. 研究の方法

本研究では活性酸素を安定的に保持し殺菌活性を長期間にわたり発現する高分子化合物を探索し、口腔内に使用可能な殺菌剤を作製する。そのために

- (1) 活性酸素の殺菌活性を保持する天然由来で無害な高分子体を探索する。
- (2) (1)で見いだされた高分子体へ過酸化水素

水溶液を吸収させ、水分を除去することで、活性酸素を保持する高分子体を作製する（固体化活性酸素）

(3) 固体化活性酸素が有する活性酸素量の測定は固体化活性酸素を一定量の蒸留水に溶解した後、含有する過酸化水素量を FOX 法にて測定することで求めた、また固体化活性酸素の殺菌活性は固体化活性酸素を光重合レジんに担持させた後、S.mutans を用いた Agar disc 法で評価した。

4. 研究成果

(1) 活性酸素を保持する高分子体の作製
種々高分子化合物を検討した結果、1M の過酸化水素水溶液をグルコース重合体複合体（アミロース、アミロペクチン、セルロースを 6 : 3 : 1 の割合で混合した糖複合体）に吸収させ 48 時間室温で乾燥した高分子体が本研究の目的に対応可能な特性を示すことが明らかとなったので、本研究ではこの高分子体を用い研究を行った（以下固体化活性酸素と言う）。

(2) 固体化活性酸素の物性が活性酸素の安定性に与える影響の検討

活性酸素発生能を有するレジンにレジンの粒径に関わらず活性酸素を短期間しか保持することができなかった。そこで今回開発した固体化活性酸素でもレジンの場合と同様の現象が見られるのか検証した。

固体化活性酸素を 100 μm 以下と 100 から 200 μm それから 200 μm 以上の 3 サイズに分けた後、固体化活性酸素が 10%重量になるよう光重合レジンに混和したレジンを作製した。これらレジンに 37℃、100%湿度下に置き 1 週間後と 2 週間後のレジンに残存する活性酸素量を測定した。

その結果 1 週目、2 週目いずれも 100 から 200 μm の粒径の固体化活性酸素が最も高い活性酸素量を示した。この結果から固体化活性酸素の粒径が活性酸素の安定性に影響していることが判明した。

殺菌性高分子体の粒径が活性酸素の安定性に与える影響について

粒径	H2O2 (μM)	
	7 days	14 days
200 μ 以上	898 ± 131.2	49 ± 26.7
100-200 μ	2009 ± 160.1	201 ± 37.7
100 μ 以下	953 ± 99.2	51 ± 19.1

数値は5例の測定結果から平均値と標準偏差で表した

(3) 活性酸素を安定化する因子の探索

固体化活性酸素の活性酸素に由来する殺菌活性は、固体化活性酸素のみをレジンに含有させた場合短時間で消失する。

その理由として固体化活性酸素に含まれる過酸化水素はそれ自身が殺菌活性を示すわけではなく、過酸化水素が分解する過程で生じるヒドロキシラジカルが強い酸化作用を示すことで細菌を酸化し死滅させることによる、即ち殺菌活性を司る直接の因子はヒドロキシラジカルである。しかしヒドロキシラジカルは非常に不安定なため短時間で消滅してしまう。故に固体化活性酸素は短時間で殺菌活性を消失すると考えられる。固体化活性酸素の殺菌活性を長時間保持する方策として大量の過酸化水素をグルコース重合体複合体へ含有させることで常時ヒドロキシラジカルを発生させることが考えられる。しかし本研究で採用された高分子体に大量の過酸化水素を含有させることは難しいので、ヒドロキシラジカルを安定化させることで活性酸素を長期間安定的に保持することを試みた。

殺菌活性を長期間保持するには殺菌活性を安定化する因子の存在が不可欠である、そこで種々因子を検討したが既存のスピントラップ剤はいずれも毒性があるため口腔内で使用することは不可能である。そこで天然物質でスピントラップ効果があると言われる Maillard 反応産物の効果を検討した。

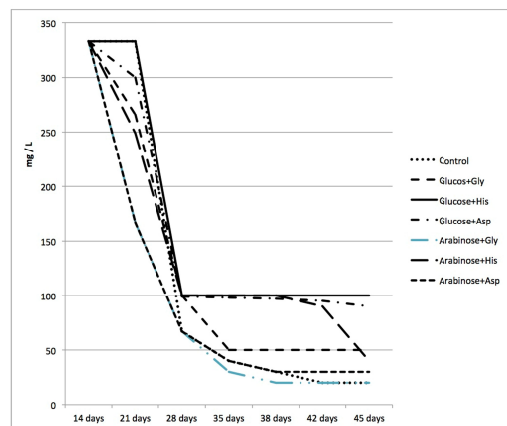
本研究では単糖（グルコース、アラビノー

ス）とアミノ酸（グリシン、ヒスチジン、ヒスチジン塩酸塩、アスパラギン酸、ロイシン）から合成された 10 種類の Maillard 反応産物を作製した（以下 MRP という）。MRP の作製は Morareles らの方法に従い 100mg の単糖と同量のアミノ酸を 2ml の生理的食塩水に混合した後 120℃、30 分、1.2 気圧下で加熱し Maillard 反応を進行させた。その結果特異的な褐色を呈する反応産物が得られた（下図）。



作製した 10 種類の MRP からまず 6 種類について固体化活性酸素と混合した後、光重合レジンに含有させた。レジンは 30℃ 乾燥状態で放置し、経時的にレジン中の活性酸素量を半定量的に測定した。

その結果下図のように MRP の種類により、活性酸素量の経時変化に差異が認められた。



今回作製した 6 種類の MRP の中で最も活性酸素の安定に効果があったのは、グルコース

とヒスチジンから作製した MRP であることが示されたので、さらに詳しく経時的に活性酸素の安定性に対する効果を検証した。

その結果、下表に示すようにグルコースとヒスチジンから合成された MRP は 6 週目において対照群に比べ 2 倍高い活性酸素量を示し明らかに活性酸素を安定化していることが示された。

week after incubation	Control	H2O2 content $\mu\text{M}/\text{mg}$	Melanoidine
0	6.23 \pm 0.802		6.02 \pm 1.093
2	6.62 \pm 0.793		6.27 \pm 1.093
4	6.65 \pm 0.699		6.13 \pm 0.874
5	4.66 \pm 0.715		5.74 \pm 0.606
6	2.21 \pm 0.42	P<0.1	4.31 \pm 0.525
7	0.42 \pm 0.189	P<5	0.89 \pm 0.278
8	0.17 \pm 0.056		0.29 \pm 0.087
9	0.11 \pm 0.063		0.13 \pm 0.053

3回の独立した実験から得られた結果から算定した

MRP による活性酸素安定化作用のメカニズムについて詳細は不明だが、これまでの研究からヒドロキシラジカルと結合しヒドロキシラジカルの分解を抑制することで安定化するスピントラップ剤としての働きが提案されている。従って本実験系においても同様なメカニズムが考えられる。一方 MRP には金属イオンと結合するキレート作用のあることが報告されている。過酸化水素が分解しヒドロキシラジカルを産生する過程では鉄イオンが必要なので、鉄イオンがキレートされ過酸化水素の分解が抑制されと結果的にヒドロキシラジカルが長期間保持されることが考えられる。現段階ではどちらの可能性が高いかは不明なので、今後さらに研究を進め MRP の作用機構を解明する予定である。

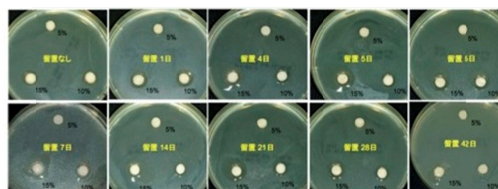
(4) 固体化活性酸素を組み込んだレジンが有する殺菌活性の安定性評価

本研究の目的である口腔内を清掃するシステムにおいて必要とされる殺菌装置には口腔内の環境で長時間殺菌活性を維持することが望ましい。特にブラッシングが難しい障害者や高齢者では簡単に使用できることが必要である。例えば清掃装置を義歯のような形状の装置とすることで清掃したい時に歯に装着する

だけで容易に口腔内を殺菌することが期待される。そのためには固体化活性酸素を組み込んだ装置が口腔内の環境でも殺菌活性を安定的に保持することが必要である。そこで本研究では固体化活性酸素と MRP を組み込んだ光重合レジン を 37℃, 100%湿度の条件下に放置し殺菌活性の推移を調べた。

殺菌活性は齲蝕の原因菌とされる Streptococcus mutans を播種した BHI Agar plate 上に上記条件下で処理したレジン を置き、一晚嫌気的条件下で培養した後、溶解班の有無を評価した。

結果を下図に示す。



固体化活性酸素を 5%, 10%, 15% 含むレジンはいずれも 42 日間, 37℃, 100%湿度下で放置後も殺菌活性を保持していることが明らかになった。この結果は申請者が開発した固体化活性酸素は口腔内の環境でも一ヶ月以上殺菌活性を保持する能力があることを示すものである。

(5) 固体化活性酸素の展開

今度は人での実証実験を行うための装置の製作に取り組む予定である。さらに他分野への展開として、義歯への応用を検討している。固体化活性酸素は高分子樹脂への混入が可能なので固体化活性酸素を組み込むことで殺菌能がある義歯の作製が可能となる。

従来義歯の夜間装着はプラークの増殖を促進するものとして禁忌だったが、義歯自体が殺菌能を持てば装着しているだけでプラークの形成を抑えることができる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

水野守道 . 過酸化水素を担持した殺菌性歯科
用レジンに対するメラノイジンの効果 .

2013年9月21日 . 第55回歯科基礎
医学会総会 岡山コンベンションセンター
(岡山市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
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

水野 守道 (MIZUNO, Morimichi)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号 : 10125354

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :