

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01422

研究課題名（和文）高周波集束型流水超音波作用による創傷治癒および感染コントロールの検討

研究課題名（英文）Study of wound healing and infection control by High-frequency of ultrasonic water flow

研究代表者

滝口 尚（Takiguchi, Takashi）

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：60317576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、集束型超音波洗浄技術を用いて創傷治癒に与える影響と術後創面の感染コントロールに対する影響を評価した。その結果、印加電力、作用時間依存的に洗浄効果を増加した。また、印加電力依存的にバイオフィーム除去が確認された。サンプルをFT-IRによるバイオフィームの赤外吸収スペクトルの測定を行った結果、バイオフィーム特異的な波形が観察された。歯肉上皮細胞株を用いて細胞障害性LDH値、Cell viabilityと炎症性サイトカインへの影響を評価した。その結果、IL-8の産生はレーザーにより増加するもの、超音波の併用によりその増加は低下傾向した。また、VEGFの産生は超音波の併用により増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラントは多孔質化などの改良が進み、口腔に露出すると微生物が表面の孔窩に入り込み、菌体除去は困難となる。そこで超音波を用いた医療機器を検討している。超音波の利点は、薬剤を用いなくて殺菌するなどがある。しかし超音波を作用させるには水槽が必要となり、歯科の現場で口腔内に適量な水槽を維持することは容易ではない。そこで我々は流水に超音波エネルギーを印加することで、水分子が振動し、その振幅作用により汚れを落とすことを可能とした。これはチタン表面上の細菌を非接触で除去が可能で、インプラントの除染が可能であることを証明した。近年は本技術を用いた創傷治癒と感染コントロールへの効果を検討している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the effect of wound healing and postoperative wound surface infection control using by High-frequency of ultrasonic water flow. As a result, the cleaning effect increased depending on the applied power and the action time. Moreover, biofilm removal was confirmed depending on the applied power. In the sample biofilm-specific waveform was observed by FT-IR. The effects on cytotoxic LDH level, cell viability and inflammatory cytokines were evaluated using a gingival epithelial cell line. As a result, the production of IL-8 was increased by laser, but decreased by the combined use of ultrasonic waves. Moreover, the production of VEGF was increased by the combined use of ultrasound.

研究分野：歯周病治療

キーワード：超音波 バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、歯表面にプラークが慢性的に付着し引き起こされる炎症性組織破壊が原因である。インプラント周囲炎も、オーバーロードの付加により生じた骨吸収部では、嫌気性の環境へ変化し、インプラント周囲炎の原因にも歯周病原性細菌が関与している。天然歯はコラーゲンとハイドロキシアパタイトの複合体であり細菌の生体付着性が強く、一方でインプラント体は骨への生体親和性向上を目的に、表面の多孔質化などの改良が進んでいるため、ひとたび口腔に露出すれば微生物が微細な表面の孔窩に入り込むことで、菌体除去はますます困難となる。

一方で、ラジカルの殺菌効果を利用して局所的な歯周病原性細菌の殺菌する方法としてフォトダイナミックセラピー (PDT) も注目されている。しかし、ラジカルを発生させるために、メチレンブルー または H_2O_2 からなる薬剤を用いる必要がある。OH ラジカルや H ラジカルには、強い酸化力を有することから細胞壁へダメージを与えることで殺菌効果があることが知られている。水分子は超音波キャビテーションにより高温・高圧のもとで熱分解すると H_2O OH ラジカル、H ラジカルに分解されるため、薬剤を使用せず、超音波の機械的作用と同時に化学的作用が期待できる。海外の医科領域では、皮膚科領域で難治性潰瘍に非接触下で超音波ミストを用いて効果を上げている。超音波による殺菌の利点は、「低温度で殺菌ができる」「薬剤を用いない」「殺菌時間が短い」などがあげられる。しかし水分子に超音波エネルギーを作用させるには水槽が必要となり、生活排水処理など大きな施設では試験運用されているが、歯科臨床の現場で口腔内に適量な水槽を維持することは容易ではない。また近年、低出力超音波パルス (LIPUS) を利用した骨折治療が用いられており、この原理は微弱な超音波照射が骨芽細胞を分化促進することで骨折の治癒を促進させ、血管新生にも作用している。このように、創傷治癒の分野でも超音波は注目されている。

この装置の特徴は流水に超音波エネルギーを印加することで、水分子が振動し、その振幅作用により汚れを落とすことが可能である。この技術を利用して開発した流水超音波歯垢機は、チタン表面上のヒト口腔内バイオフィルムを非接触下で除去が可能で、インプラントフィクスチャー内の細菌も除染可能である。一方で、超音波治療の有害作用である組織に対する熱変性は、流水下で作用させるため問題はなく、動物を用いた非臨床試験において歯肉組織、歯髄組織に対する安全性を担保している。これらのことから、本技術を用いた創傷治癒と感染コントロールへの効果を検討する。

2. 研究の目的

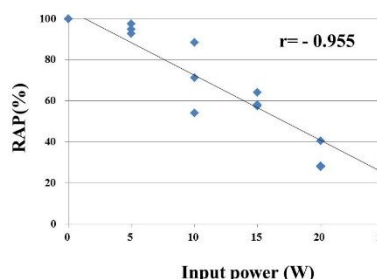
歯周治療の予知性を高める目的で、粒子加速度を基本原理とする集束型流水超音波の技術を応用して、歯周外科またはインプラント外科を想定した創傷治癒に与える影響と術後創面の感染コントロールに対する影響を併せて評価する。

3. 研究の方法

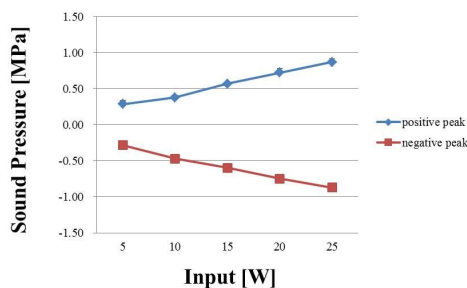
- ・各周波数の集束型超音波照射条件における超音波強度と熱エネルギー
- ・集束型超音波照射による感染コントロール
- ・歯肉上皮細胞、上皮組織に対する影響

4 . 研究成果

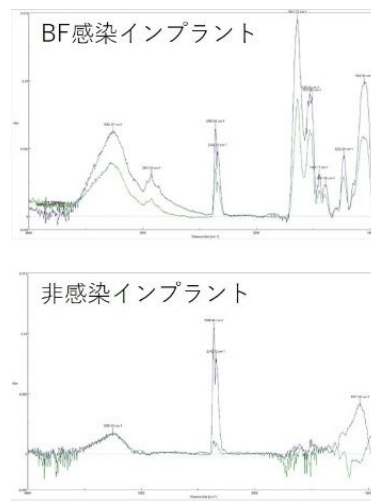
集束型超音波洗浄技術を有する洗浄技術を組み入れた試作器を用いて周波数、印加電力、音圧、洗浄効果、殺菌効果を対象に実験を進めた。音圧シミュレーションから、200kHz以上の周波数帯で超音波の集束することが想定されたが、実際は320kHz以上で超音波が集束し洗浄が可能であったため、今回は400kHz帯で実験を進め、人工プラークを用いて至適条件を検討した。その結果、印加電力、作用時間依存的に洗浄効果を増加し、負の相関関係を示した。(図1)



また、ヒト口腔内バイオフィームは印加電力依存的(0 - 25 W)にバイオフィーム除去が確認された。音圧に関しては、印加電力依存的に音圧が上昇し、最大電力15W時に0.62MPaを維持した。これを入力電力に基づく音圧で推定すると $p_0-p = 1.4 \times E \times 2/S \times pc.$: 0.5, $E=15W$ と仮定した場合、 $p_0-p = 1.4 \times 3.75/201 \times 10^{-6} \times 1.5 \times 10^6$ (MPa) = 0.236(MPa)と推定された。オシロスコープから音圧が焦点で約2.5倍であると仮定すると、0.23 MPaの音圧は焦点で約0.59MPaになるため実際の値と一致した。(図2)

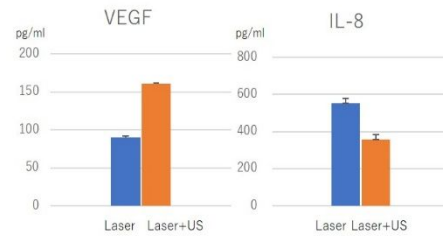


洗浄技術を組み入れた試作器にて前年度に評価したサンプルの一部を用いて FT-IR によるバイオフィームの赤外吸収スペクトルの測定を行った。この結果、過去の文献と同様なバイオフィーム特異的な波形が観察され、これは、術後サンプルにおいても同様の波形は観察された。(図3) 当技術は、表面に付着した細菌に対して細菌量を減少させる効果は顕著であるが、術後表面には生菌が残存するため、殺菌効果は少ないと考えられた。



次に創傷に対する影響を調べるため、歯肉上皮細胞株 (Ca9-22 細胞) を用いて細胞障害性 LDH 値 (Lactate Dehydrogenase : 乳酸脱水素酵素) を測定した。その結果、コントロール群として使用したレーザと比較して LDH の上昇は僅かであった。また、Cell viability (CCK-8) アッセイを行った結果、レーザ群は約 60%の生存率に対して、当技術は約 70%であった。

次に歯肉上皮細胞株（Ca9-22 細胞）を用いて炎症性サイトカインおよび創傷治癒に及ぼす影響を評価した。条件は細胞障害性 LDH 値を参考に行った。その結果、IL-8 の産生はレーザーにより増加するもの、超音波の併用によりその増加は低下傾向した。また、VEGF の産生は超音波の併用により増加した。（図 4）



次に、C57BL/6J マウスの背部において、高周波メスまたはレーザーによる切開後の予後に超音波の影響を評価した。切開部位は、肉眼的に3日目には創面の閉鎖が観察され、組織学的には上皮の肥厚が観察され、高周波メス群は熱変性が著明であった。超音波の影響は、組織学的に著明な変化は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 滝口尚 山田純輝 小田中響 山本松男
2. 発表標題 フィクスチャー表面のバイオフィルム除去に対する流水式超音波歯垢除去器の有効性
3. 学会等名 第60回日本歯周病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 滝口尚 山田純輝 山本松男
2. 発表標題 流水式超音波歯垢除去器によるインプラントフィクスチャー表面のバイオフィルム除去効果
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----