

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593179

研究課題名(和文) オゾンジェルによる歯周予防・治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of ozone gel for medicine on preventing and/or treating periodontal disease

研究代表者

王 宝禮(OH, Hourei)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20213613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、歯科ではオゾンを口腔内消毒薬の代替に用いるための議論がなされている。我々はオゾンを含むグリセリン溶液のオゾンジェルを開発してきた。オゾンジェルは不快な匂いも無く長期間にわたり殺菌効果を示し、細菌による耐性を生じさせない特性を有している。本研究では、このオゾンジェルの口腔内粘膜刺激性試験による安全性の評価、止血作用、抗菌作用について評価した。その結果、オゾンジェルは口腔内粘膜に対し極めて刺激が少ないことが明らかとなった。また、止血効果はボスミン溶液は液体トロンピンと同程度の活性を有していた。オゾンジェルはすみやかに抗菌作用を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Currently, ozone is being discussed in dentistry as a possible alternative oral antiseptic agent. We have developed the ozone gel which is a glycerin solution containing ozone. The advantages of ozone gel include its long sterilization effect and a lack of an unpleasant smell, as well as the fact that it does not induce resistance in bacteria. In this study, we evaluated the safety of ozone gel in the treatment of oral mucosa irritation as well as its effects on hemostasis and antimicrobial effects. we revealed that ozone gel was very mild to the oral mucosa. The hemostatic ability of ozone gel was almost equal to the Bosmin solution and Liquid Thrombin. The instantaneous antibacterial effect of ozone gel was observed.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：オゾン ジェル 歯周疾患 歯周病治療薬 抗炎症作用 止血作用 口臭抑制薬 細胞増殖能

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周病治療における局所および全身投与で用いられる抗菌薬の耐性菌や、塩素系消毒薬の副生成物である発癌性のトリハロメタンが世界的な社会問題となっており、生体や社会に優しく、安全性の高い、殺菌剤が必要とされている。このような背景から、耐性菌やトリハロメタンを生成することなく、環境に優しい殺菌方法の一つとしてオゾンが注目されている。オゾンは3つの酸素原子からなる酸素の同素体で、強力な酸化および殺菌作用を示すが、気体のオゾンであるオゾンガスは呼吸器への毒性や殺菌力の半減期が短いことがこれまで知られていた。一方、オゾンを溶解したオゾン水はアルコールの7倍以上の殺菌力があり、オゾンの溶存濃度1.0 ppm以上では、ほとんどの細菌やウイルスが死滅することが報告されている。また、オゾン水に含まれるオゾンは分解されて酸素に変わるため、無害で、安全性も高く、環境にも優しいことから、多くの医療機関で治療や感染症の予防に利用されている。しかし、水中のオゾンもオゾンガスとして気散し、半減期も十分ではないことから、オゾンの優れた殺菌力を活かし、生体や社会に優しく、安全性の高い、殺菌剤の開発のためにオゾンジェルの開発に至った。

2. 研究の目的

本申請では、オゾンガスの気散がほとんどないため毒性を抑えることができ、しかもオゾンの半減期を延長することのできる新オゾン溶存体「オゾンジェル」の開発によって、歯周病菌に対する殺菌作用や創傷治癒能力を期待するという、新しい歯周予防法や治療法に発展することおよび新しい活性を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

まず、オゾンジェルの口腔内適用を想定した最適な基剤の開発を目指した。グリセリンにオゾンを溶解したオゾンジェルを 0ppm, 10ppm, 100ppm, 1000ppm とし、口腔内に使用できる軟膏基剤などからオゾンとの反応性が低くオゾンを分解しないと考えられる候補を化学構造からスクリーニングし、それらの基剤と様々な希釈濃度においてオゾン濃度の減衰並びに粘度など物性の経時変化を測定した。

また、口腔内での保持性を評価するために、少量の水を添加した際の流動性を予め色素にて着色後、スターラーにて攪拌した際の挙動を測定した。また、動物実験による口腔粘膜への安全性試験を行った。

次いで、オゾンによる口腔内の代表的な病原菌である *P. gingivalis*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*、*S. mutans* の4種の菌に対する最小発育阻止濃度を計測した。

さらに、口臭抑制実験として、検知管式気体測定器にて、オゾンによる硫化水素、メチ

ルメルカプタン濃度変化を測定した。

また、マウス尾部切断創のオゾン水による局所止血効果を判定した。実験において、5週齢 SPF の ICR 系雄性マウスを使用した。被験薬には、オゾン水 (OW)、オゾンジェル (OG)、局所止血薬ボスミン (BS)、トロンビン局所溶液 (LT)、歯科用 TD ゼット (TDZ)、グリセリン (GI) を用いた (表 1)。

表 1 本実験に用いた被験薬

Code	Composition	Manufacturers
OG	Glycerin, 1000 ppm of ozone	VMC Co., Ltd., Japan
OW	Purified water, 4ppm of ozone	Authors' laboratory-made
BS	Epinephrine 0.1%	Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Japan
LT	Thrombine, JP 1000 unit/ml	Sankyo Co., Ltd., Japan
TD	Aluminium chloride 25% Cetylpyridinium chloride 0.5% Lidocaine, JP 5.25%	Bee Brand Medico Dental Co., Ltd., Japan
NS	Sodium chloride 0.9%	Authors' laboratory-made
GI	glycerin	Nacalai, Kyoto, Japan

4. 研究成果

ヒト由来の歯肉線維芽細胞への増殖能を確認でき、その至適濃度が、炎症性サイトカインを抑制した。さらに、口臭誘発物質である硫化水素、メチルメルカプタン濃度は抑制された。

齶蝕・歯周病原因菌で代表的な *P. gingivalis*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*、*S. mutans* の4種の菌について最小発育阻止濃度を計測したところ、コントロールであるグリセリンのみの場合に比べオゾンを含むグリセリンであるオゾンジェルを用いた場合有意に歯周病原因菌の発育を阻止した (図 1)。

Species	Number of viable bacteria (Log CFU/ml)	
	Glycerin	Ozone gel
<i>E. coli</i>	8.0	<2.0 <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	8.0	<2.0
<i>C. albicans</i>	8.0	<2.0
<i>K. pneumoniae</i>	8.0	<2.0
<i>S. mutans</i>	8.0	3.0
<i>P. gingivalis</i>	8.0	<2.0 <sup>a</sup>
<i>P. intermedia</i>	7.2	<2.0
<i>F. nucleatum</i>	6.8	<2.0
<i>E. corrodens</i>	8.1	5.0

<sup>a</sup>Limit of detection.

図1 最小発育阻止濃度

オゾンジェルの局所止血効果を示す。それぞれ、NS:生理食塩水、G1:グリセリン、OG:オゾンジェル、OW:オゾン水、BS:ボスミン溶液、LT:液体トロンビン、TD: TDZ 歯科用液を示す。出血時間の測定は、マウスの尾部切断創を用いる方法に準拠した。本研究では、マウスの尾尖部をカミソリで出血状態を作り、オゾンならびに歯科で用いられる局所用止血薬を切断創に適用して止血に要する時間を比較した(図2)。

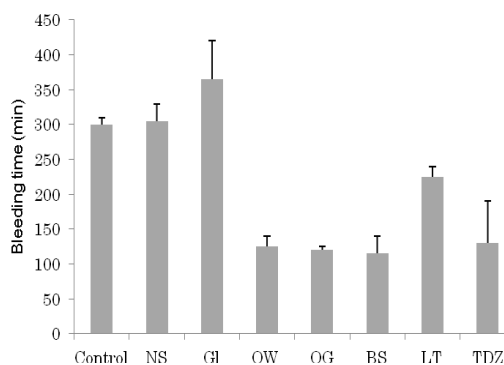


図2 局所止血効果

オゾンジェル、オゾン水はマウスの尾部切断創の出血時間を有意に短縮し、それはボスミン液、トロンビン、TD ゼット同等か同等以上だった。また、興味深いことにオゾン水の濃度が 0.5-4ppm においてほぼ止血効果時間は同等であった(図3)。オゾングリセ

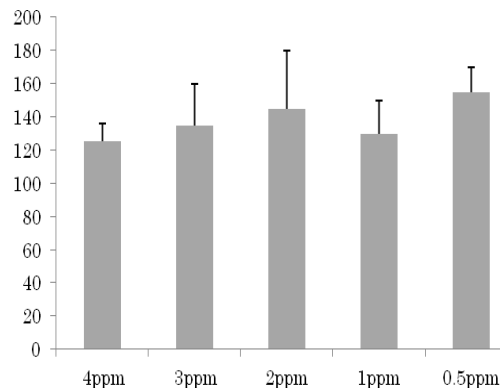


図3 局所止血の濃度効果

リンに溶解し、口腔内適用を想定した最適な基剤の開発に成功した。そのオゾンジェルを動物実験の頬粘膜に一定期間塗布し、安全性を確認できた。これらの結果より、オゾンジェルは確かに局所止血の時間を短縮することを見いだした。

止血は重要な生理機序であり、一方、血栓症は病的状態であり、脳梗塞、心筋梗塞、肺塞栓に代表されるように、状態によっては、人間の生命に関わる疾患である。しかし、興味あることに、止血という生理機序と血栓という病態は表裏一体である。すなわち、血管を反応の場として「血小板」と「凝固因子」が協力して止血し、同じく血小板と凝固因子が協力して血栓症も発症させてしまうからである。止血機序は、「1次止血」と「2次止血」に区別できる。血管が破れると血管の収縮が起こり、傷口を小さくする。次に血液にある血小板が傷口に集まってきて、フォン・ヴィレブランド因子を仲介して傷口と結合し、血小板による血栓を作り、傷口をふさぐ。これが1次止血(血小板血栓)と呼ばれるものである。しかし、血小板だけの血栓では、血を止めるには脆くて不安定である。そこで、1次止血に引き続き、血液中の凝固因子と呼ばれる一群のタンパク質が働き、最終的にはフィブリンの網の膜が血小板血栓の全体をおおい固めて、止血が完了する。これを2次止血(フィブリン血栓)と呼んでいる。2次止血は複雑な過程を経る。この止血の過程には、12種類の凝固因子が関係している。現在歯科医療においては、止血機序解明から、様々な血管強化薬と局所止血薬が使用されている。カルバゾクロムは毛細血管に作用して血管透過性亢進を抑制し、血管壁を強化・補強して出血時間を短縮し止血作用を示す。ビタミンCの投与によりビタミンC欠乏症(壊血病)は治療できる。フィブリン接着剤は、フィブリノゲンがトロンビン、凝固第XIII因子、カルシウムの作用により架橋化フィブリンとなり、組織の接着・閉鎖作用を発揮する。ゼラチン吸収性スポンジ、酸化セルロースはフィブリンと同等の止血効果をあらわす可吸収性止血薬である。アドレナリン(ボスミン)は血管を収縮させ局所止血作用

を示す。塩化アルミニウムの収斂作用(組織や血管を縮める作用)による止血作用を示す。今回の動物実験では、オゾン水、オゾンジェルはアドレナリン以上の止血効果があった。アドレナリンの止血効果は、血管に局所に適用すると $\alpha$ 受容体に結合し、末梢血管を収縮し止血作用を現す。オゾンが $\alpha$ 受容体に結合することは明らかでない。今回の実験系からは、1次止血の段階で血小板の接着や凝集に関与している可能性がある。今後はオゾンと受容体、血小板や凝固因子との関係を探求する予定である。

本邦において、既にオゾンは食品、農業、畜産、工業、医療分野など多方面に利用されている。本研究より開発されたオゾンジェルは、炎症性サイトカイン抑制から抗炎症作用を確認できた。オゾンによる濃度依存的に齶蝕・歯周病の代表的菌群への殺菌効果、口臭の主な原因物質である揮発性硫黄化合物である硫化水素、メチルメルカプタンの濃度より口臭抑制効果、止血の短縮時間の比較よりエピネフリン同等の止血効果を確認できた。外科治療中にオゾンを用いた場合に、予後が良いという臨床科の声が多い。その理由は、これらの薬理作用だと考えられた。以上から、オゾンは一般的な歯科治療をはじめ、歯周外科、インプラント治療など口腔外科的治療には歯科医療に期待の大きい物質である。さらに、本研究で解明されたオゾンがもつ、抗炎症作用、齶蝕・歯周病菌への殺菌効果、口臭抑制効果及び止血効果から新しい発想での治療薬に発展する可能性を秘めている。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

1. Fukui T, Masuno K, Makita Y, Fujiwara S, Fujiwara S, Shiota G, Imamura Y, Shiba A, Wang P. Evaluation of Oral Mucosa Irritation produced by Ozone Gel. J Hard Tissue Biol, 2014; 24: 104-106. (査読有)
2. Sakai D, Makita Y, Masuno K, Fujiwara S, Okazaki J, Wang P. Local Hemostatic Effect of Aqueous Ozone in Cutting Wound Surface. J Hard Tissue Biol, 2014; 23: 245-248. (査読有)
3. Fukui T, Masuno K, Makita Y, Fujiwara S, Shiota G, Imamura Y, Shiba A, Wang P. Antimicrobial Effects of Ozone Gel against Periodontal Bacteria. J Hard Tissue Biol, 2014; 23: 445-448. (査読有)
4. 王 宝禮. オゾン水, オゾンジェルによる止血作用の薬理学的考察. オゾン医療, 2014;3:8-14. (査読有)
5. 王 宝禮. 歯科医療へのオゾン療法-口腔

疾患への臨床応用と院内感染予防-  
OZONNEWS, 2014;90:14-19. (査読有)

#### 〔学会発表〕(計12件)

1. 王 宝禮. オゾンによる口臭除去効果の解明. 第6回オゾン医療研究会 2014.12.7 文京学院大学(東京)
2. 王 宝禮, 廣田 健, 瀧沢 努, 村川 昇, 松永省三, 五味 章, 益野一哉. オゾン水・オゾンジェルの歯科医療における新しい生理活性の探求 一殺菌・患部止血・口臭抑制・歯牙漂白-. 第32回日本歯科東洋医学会 2014.11.9 じゅうろくプラザ(岐阜県・岐阜市)
3. 王 宝禮. 院内感染や耐性菌を考えた最適な抗菌療法とは?オゾンとナノシルバーと漢方薬. 2014年度春季学術大会 第140回日本保存学会 2014.6.20 滋賀県立芸術劇場(滋賀県・大津市)
4. 益野一哉, 佐藤哲夫, 倉 知子, 王 宝禮. オゾンの局所止血作用効果. 第57回春季日本歯周病学会 2014.5.23. 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)
5. Wang P. What is oral medicine?. 2014 Conference of The Korean Academy of Preventive Dentistry 2014.4.26. Dankook University (Korea Seoul)
6. 廣田 健, 王 宝禮, 中室克彦, 村上 弘. オゾンを活用した日常歯科臨床および院内感染予防対策. 第17回日本統合医療学会 2013.12.21 日本赤十字看護大学(東京)
7. 塩田剛太郎, 芝 燁彦, 王 宝禮, 須藤 英俊, 岡本太郎. オゾンジェルを用いた新しいホワイトニング方法の検討. 第14回日本口腔機能水学会 2013.3.23 北海道歯科医師会館(北海道・札幌市)
8. 廣田 健, 王 宝禮. 根管治療と歯周基本治療. 第18回日本医療・環境オゾン学会 2013.2.21 文京学院大学(東京)
9. 王 宝禮. オゾンにおける止血効果の解明 第3回オゾン医療研究会 2012.12.2 文京学院大学(東京)
10. 廣田 健, 王 宝禮. オゾン水およびオゾンジェルを活用した日常歯科臨床. 第3回オゾン医療研究会 2012.12.2 文京学院大学(東京)
11. 廣田 健, 王 宝禮. 日常歯科臨床と院内感染対策へのオゾンの有用性. 第30回

日本歯科東洋医学会 2012. 10. 6 福岡県歯科医師会館(福岡県・福岡市)

12. 和久本雅彦, 王 宝禮, 芝 燁彦, 塩田剛太郎. オゾンクリームの歯周病治療への応用 第 55 回秋季日本歯周病学会 2012. 9. 22 つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 宝禮 (OH, Hourei)  
大阪歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 20213613