

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11087

研究課題名(和文) 電解酸性機能水の創傷治癒の促進効果に関する研究

研究課題名(英文) Study on the effect of wound healing by functional water

研究代表者

尾曲 大輔 (OMAGARI, Daisuke)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：10608699

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)：電解酸性機能水(FW)は、生体に有利な効果を持つことが知られているが、その詳細なメカニズムに不明な点が多い。口腔粘膜由来細胞を用いてFWの効果を検証した結果、IL-1aやbFGF、EMMPRINなどの分泌が誘導された。IL-1aは創傷治癒の促進効果を有している。また骨欠損モデルを用いた実験では、血管新生因子や骨の再生に関与するサイトカインの産生が増強されていた。これらの因子の発現を誘導させることにより創傷治癒が促進されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Functional water (FW) is known to have an advantageous effect on living bodies, but there are many unclear points on the detailed mechanism. We examined how FW affects oral mucosa-derived epithelial cells. As a result, secretion of IL-1a, bFGF, EMMPRIN etc. was induced. IL-1a has an accelerating effect on wound healing. In experiments using a bone defect model, the production of angiogenic factors and cytokines involved in bone regeneration was enhanced. It was suggested that wound healing is promoted by inducing the expression of these factors.

研究分野：病理学

キーワード：免疫 感染 炎症

1. 研究開始当初の背景

電解酸性機能水 (FW) は食塩水を電気分解することにより得られる水である。FW は、pH3、有効塩素濃度 20ppm 程度であり、強酸性であるがゆえに強力な殺菌作用があり、生体にとって無害であることが報告されている (Arc Oral Biol, 56, 359-366, 2011)。種々の医療現場では、生体にとって有利な効果があることが提唱されてきたが、その科学的に支持する根拠がない。そこで、我々はヒト口腔上皮細胞を用いた実験を試みると、FW が炎症性サイトカインの一種である Interleukin-1 α (IL-1 α) の産生を増強することが明らかとなった。さらに同じ炎症性サイトカインである IL-1 β の産生には全く影響を示さなかったことから IL-1 α には IL-1 β とは異なる機能が備わっている可能性が示唆された。

文献的に IL-1 α は創傷治癒の促進効果があることから、歯肉線維芽細胞における遺伝子発現について検討したところ、皮膚の創傷治癒の促進に貢献する IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) や peroxisome proliferation activation receptor β/δ (PPAR β/δ) の発現を増強させることが分かった。このことは、FW が創傷治癒を促進する可能性を示唆するものであった。そこで、マウスの背部皮膚に人為的に創傷を作製し、作成直後に FW、3% H_2O_2 および生理食塩水を 3 分間作用させて経時的に創傷面積の変化を測定した。その結果、FW を作用させたものでは生理食塩水に比較して創傷作製 1 日後に約 20% の面積の縮小促進が認められた。このことは、FW が創傷治癒の促進効果を有する可能性を支持するものであった。

2. 研究の目的

FW が創傷治癒の促進効果を有する可能性は示唆されたが、FW によって発現が誘導される IL-1 α 自体が真に創傷治癒の促進効果を持つのか不明であった。そこで、本研究では、(1) IL-1 α の創傷治癒の促進効果の有無について明らかにすることとした。つまり、IL-1 α knockout mouse (IL-1 α KO) を用いた上記と同様の実験を行うことで IL-1 α の関与について検討した。また、recombinant IL-1 α (rIL-1 α) を wild type マウス (WT) の創傷部に作用させて治癒状況について観察することで IL-1 α が単独で関与するか検証した。また、(2) FW がどのようなメカニズムで IL-1 α 産生を誘導しているのかという点について明らかにするため、FW の組成について検証し、pH や有効塩素濃度、電気伝導度などの要件が IL-1 α 産生に及ぼす影響について種々の機能水を調整することで検討することにした。

3. 研究の方法

IL-1 α の創傷治癒促進効果を検証するため、IL-1 α KO を用いた実験を行った。IL-1 α KO

と WT の背部皮膚に左右対称性の創傷を作製した。その後、右側には生理食塩水を、左側には FW を 3 分間作用させた。創傷治癒の過程を撮影し、肉眼的に創傷治癒の過程を記録するとともに、画像上で創傷面積を計測して治癒効率を比較した。また、これまでの実験では FW を 3 分間、1 回だけ作用させてきたが、FW を頻回作用させるなど最適な条件を検討した。

また、rIL-1 α による検討を WT を用いて上記の実験と同様に行った。すなわち、WT の背部に創傷を作製した後、種々の濃度に調整した rIL-1 α を塗布し、生理食塩水を塗布した群との差異を比較検討した。

さらに、FW のどの成分が IL-1 α 産生に関与するのか、有効塩素濃度、pH、酸化還元電位を段階的に変え、これらの 3 要素をさまざまに組み合わせた FW を作製し IL-1 α 産生を指標にして検証した。具体的には種々に作製した FW をヒト口腔癌由来細胞である HSC3 細胞に 30 秒間作用させて ELISA にて IL-1 α 濃度を測定した。

4. 研究成果

IL-1 α KO の背部に人為的に作製した創傷に FW または生理食塩水および 3% H_2O_2 を塗布した後、創傷の面積を経時的に計測したところ WT では FW 作用群で作用後 1 日目で約 20% の創傷治癒の促進がみられたが、IL-1 α KO では、創傷治癒促進の効果はみられなかった (図1、2)。

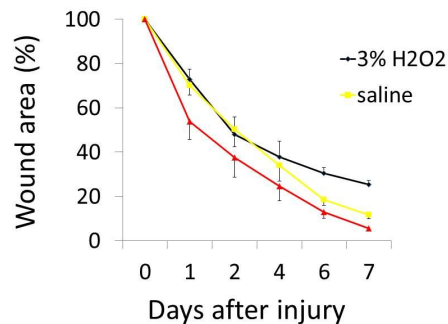


図1 WT における創傷治癒の促進効果

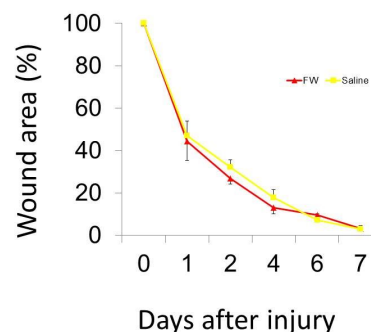


図2 IL-1 α KO の創傷治癒の促進効果

このことから FW により誘導される IL-1 α は創傷治癒促進における主体的分子であることが示唆された。そこで、IL-1 α の効果について検証するために WT の皮膚に同じように創傷を作製して rIL-1 α を作用させた実験では、予想に反して創傷治癒促進に影響は認められなかった。

FW のどの成分が IL-1 α 産生に関与しているのかを検証するために、有効塩素濃度、pH、酸化還元電位を段階的に変え、これらの3要素をさまざまに組み合わせた FW を100種類ほど作成し、IL-1 α 産生を指標にして検証した。

HSC3 細胞に 30 秒間作用させて ELISA にて IL-1 α 濃度を測定したところ、有効塩素濃度は20~50ppm の範囲で pH はより酸性領域、酸化還元電位は、2,000mV 程度の組合せで最も効率的な IL-1 α 産生を認めた。この3要素はすべてが上記要件を満たす必要があり、FW の作用は極めて微妙にコントロールされているものであることが分かった。

そこで、FW の創傷治癒促進効果についてさらなるメカニズム解明を行うため、FW を口腔上皮細胞 (HSC-3, Ca9-22) に作用させたところ IL-1 α 以外にも EMMPRIN が増強することを見出した (図3)。

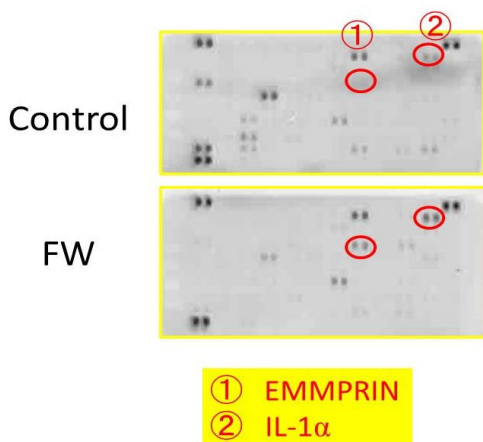


図3 上皮細胞における EMMPRIN の誘導

IL-1 α は代表的な alarmin であることから、FW によって同様に誘導、分泌される EMMPRIN も alarmin の一種ではないかとの着想を得た。alarmin とは、細胞が障害を受け壊死に陥る際に、周囲の組織や細胞に、自身が置かれた危機的な状況を知らしめるために分泌される。そこで、HSC-3 および Ca9-22 の両細胞に FW を作用したところ、培養上清中に EMMPRIN の有意な増加を確認した。しかし、FW 作用群と control 群では EMMPRIN 遺伝子の発現に有意な相違はなかった。さらに FW 作用後 1 時間で培養上清中の EMMPRIN が有意に増強し、細胞内溶液中の EMMPRIN は有意に減少した。このことは、培養上清中の EMMPRIN 発現

増強は細胞内に含有されている EMMPRIN が FW の作用により細胞外に排出される現象であり、IL-1 α と同様の結果となった。FW 以外の非感染性刺激 (H₂O₂, 42 °C ヒートショック) で HSC-3 および Ca9-22 を刺激し、IL-1 α および EMMPRIN の分泌の変化を比較検討したところ、IL-1 α と EMMPRIN の分泌に相関関係があることが分かった。さらに、EMMPRIN の基本的作用については、ヒト単球性白血病由来細胞 (THP-1) を用いて実験を行ったところ、FW が誘導する EMMPRIN は THP-1 において PDGF 遺伝子発現を有意に増強した。PDGF は血管新生を促進させるため、創傷治癒促進に関与すると考えられる。以上より、EMMPRIN は細胞のストレス条件下で IL-1 α と同様に分泌促進されたことから alarmin の一種である可能性が示唆された。

FW によって分泌促進される alarmin の創傷治癒に対する効果を検証するために、ラット頭蓋骨に作製した骨欠損モデルを用いて実験した。実験には骨補填剤として collagen と hydroxyapatite の複合物 (HAP/Col) を用いた。骨の形成量の変化を実験動物用マイクロ CT により観察したところ、HAP/Col または FW 単独使用群と比較して HAP/Col と FW を併用した群で、新生骨容積と骨密度共に有意に増加していた。

さらに、頭蓋骨手術前後の末梢血を採取し、alarmin の一種である bFGF の濃度変化について ELISA により測定すると、併用群では他の群と比較して手術後 1, 6, 24 時間後で濃度の上昇がみられた (図4)。

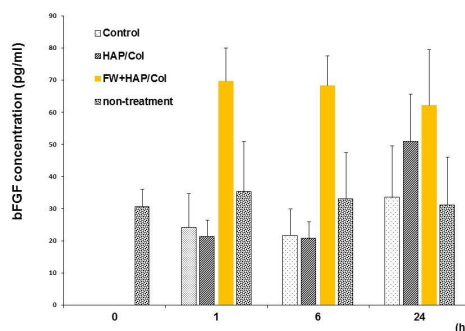


図4 末梢血中の bFGF 濃度

そこで、bFGF 分泌亢進に伴う骨増生効果を検討した。欠損部周囲の組織を採取し、血管新生および骨増生に関与する因子について real-time PCR により遺伝子発現の変化について検索した結果、併用群では他の群と比較して、血管新生因子である IL-8, VEGF、骨新生に寄与する M-CSF, RANKL, BMP7 などの因子の発現増強がみられた。

FW によって分泌誘導された alarmin 分子が、血管新生や骨の再生に関与するサイトカインなどの産生を増強することにより、創傷治癒が促進される可能性が示唆された。

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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

浅野 正岳、酸性電解機能水の創傷治癒促進のメカニズム 日本機能水学会第16回学術大会、2017

楠 正文、五條堀 孝廣、太田 裕崇、菅野直之、浅野 正岳、佐藤 秀一、電解酸性機能水によるEMMPRIN分泌について 日本機能水学会第15回学術大会、2016

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0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 0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

尾曲 大輔 (OMAGARI, Daisuke)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号：10608699

(2)研究分担者

浅野 正岳 (ASANO, Masatake)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：10231896

勝呂 尚 (SUGURO, Hisashi)
日本大学・歯学部・専任講師
研究者番号：90318452

五條堀 孝廣 (GOJOURI, Takahiro)

日本大学・歯学部・助教
研究者番号：10755573

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()