

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10057

研究課題名（和文）電解酸性機能水の超高齢者への含嗽剤としての実用化に関する研究

研究課題名（英文）Research on the practical use of electrolyzed acidic functional water as a mouthwash for super-elderly people

研究代表者

浅野 正岳（ASANO, Masatake）

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：10231896

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：電解酸性機能水（FW）は、食塩水を電気分解して得られる水で、極めて高い殺菌効果を有している。物理的な口腔清掃の困難な超高齢者に対する含嗽剤としての実用化を目指し、市販の含嗽剤との殺菌効果の比較を行った。その結果、FWは他の含嗽剤と比較して遜色ない殺菌効果を示し、さらに、安全性にも優れていることが実証された。また、口腔癌由来の培養細胞を用いた実験から、FWが炎症性サイトカインの一種であるinterleukin-1 alpha（IL-1a）の細胞外放出を促すことが明らかとなっている。炎症性疾患のコントロールにおいて、IL-1aの分泌調節は極めて重要であることから、この分子機構についても検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理機能の低下などにより、歯ブラシなどの物理的口腔清掃が困難な超高齢者は、誤嚥性肺炎などを発症するリスクが高い。本研究で用いた電解酸性機能水（FW）は、極めて高い殺菌効果を有することが明らかとなった。FWは、食塩水の電気分解で得られる水で、安価なうえに安全性にも優れている。FWを超高齢者の口腔清掃に応用できれば、健康寿命の延伸にも寄与するものと考えられる。こうした取り組みは、超高齢社会の到来とともに危惧される社会保障費の抑制にもつながる可能性があり、社会的に極めて意義深いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Electrolyzed acid functional water (FW) is obtained by electrolyzing salt water, and has an extremely high bactericidal effect. Aiming for practical use as a mouthwash for super-elderly people who have difficulty physically cleaning their mouths, we compared the bactericidal effect with a commercially available mouthwash. As a result, it was demonstrated that FW exhibited comparable bactericidal effects compared to other mouthwashes, and was also superior in safety. In addition, experiments using oral cancer-derived cultured cells have revealed that FW promotes the extracellular release of interleukin-1 alpha (IL-1a), a type of inflammatory cytokine. Since the regulation of IL-1a secretion is extremely important in the control of inflammatory diseases, we also investigated its molecular mechanism.

研究分野：口腔病理学

キーワード：電解酸性機能水 含嗽剤 殺菌効果

1. 研究開始当初の背景

本邦の機能水研究振興財団によって機能水とは、「人為的な処理によって再現性のある有用な機能を獲得した水溶液の中で、処理と機能に関して科学的根拠が明かにされたもの、及び明かにされようとしているもの」と定義されている。この中で、低濃度の食塩水を電気分解することによって得られる、電解酸性機能水 (acid-electrolyzed functional water; FW) は、生体には害を及ぼさないうえに、極めて優れた殺菌効果を有するとされていた。

申請者らはこれまでに日本大学歯学部附属歯科病院に来院した総義歯装着患者の協力を得て、FWによる含嗽によって、細菌数の減少、唾液中の分泌型 IgA

(secretory immunoglobulin A; sIgA) 濃度の上昇 (図1) など、口腔内環境の改善と生体防御機能の亢進に対して効果的であると判断してきた。

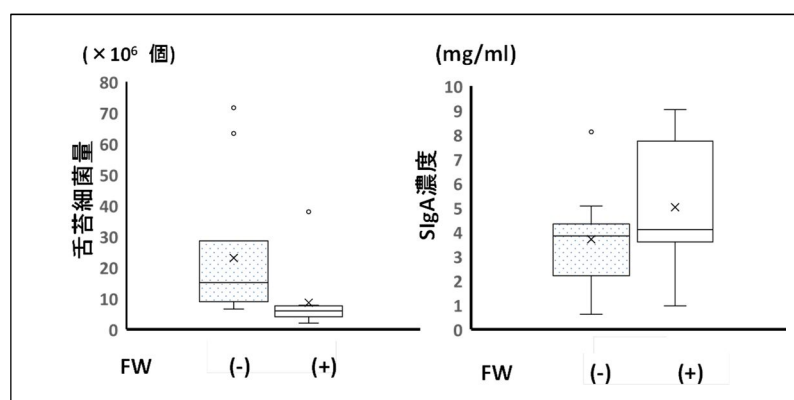


図1 FWによる含嗽の有無で、舌表面の細菌数は減少した。(左図) また、唾液中のsIgA濃度は上昇した。(右図)

2. 研究の目的

本研究では、sIgAの分泌増強などはどのようなメカニズムによるのか、またこれまでに得たFWの効果をもより正確なものとするべく、被検者を大学病院以外にも拡大し、その有用性を確認する。という2点について検討し、簡便で安全安心な口腔清浄剤としてのFWの実用化を目指した。しかし、新型コロナウイルスの蔓延によって、の目的に関してはサンプリングなどが著しく制限されたことから、in vitroにおける培養細胞を用いた検討により、FWの作用メカニズムなどについて実験を行った。

3. 研究の方法

(1) FWは、pH 2.7、有効塩素濃度 30 ppm、酸化還元電位 1,100 mV以上で、三浦電子社製オキシライザーによって生成したものを用いた。

(2) 培養細胞として、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞およびヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 Ca9-22 および HSC3 細胞などを用いた。

(3) FW 刺激に応じて、培養細胞から産生されるサイトカイン interleukin-1 α (IL-1 α) は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によって測定した。また、IL-1 α 分泌に対する IL-1 receptor type 2 (IL-1R2)の影響については、HeLa 細胞に対する IL-1R2 発現ベクターを transfection することにより確認した。

(4) 細菌や真菌に対する殺菌効果については、FWでの処理後、brain heart infusion (BHI) 培地上に播種し、colony forming unit (CFU)を測定することによって行った。また、FWの殺菌

効果を市販の含嗽剤と比較するために、ConCool F (Weltec 社製) および LISTERINE (Johnson & Johnson 社製) を用いた。

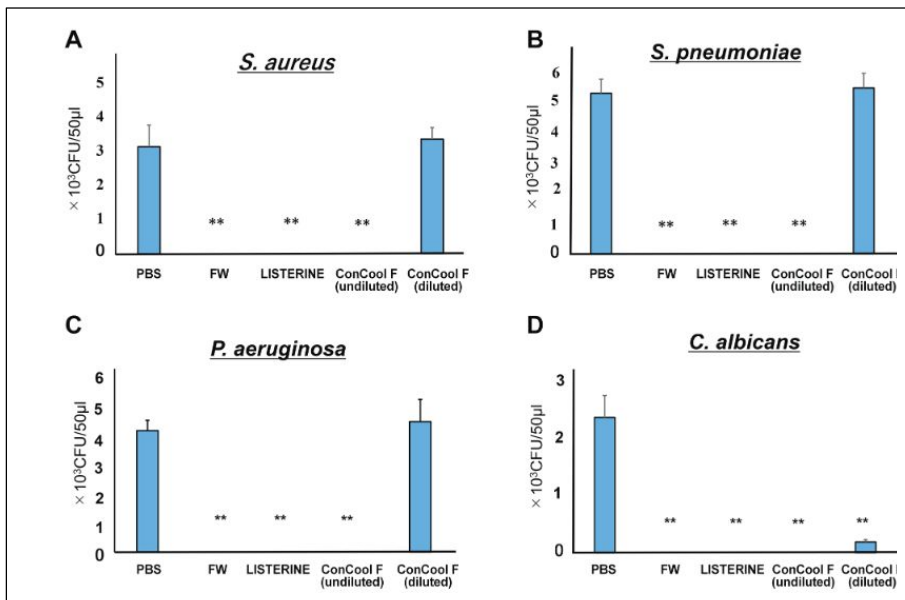
(5) FW 処理後の各種細菌によって産生される superoxide dismutase (SOD) は、処理後の細菌を Zirconia beads (NIPPON genetics 社製) によって粉碎し、SOD assay kit (Cayman Chemical 社製) を用いて測定した。

(6) FW の細胞毒性については、処理後の細胞の培養上清を XTT Cell Proliferation Assay Kits (Cayman Chemical 社製) により測定した。

4 . 研究成果

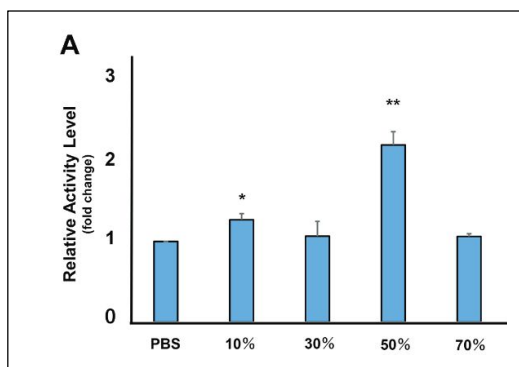
(1) 殺菌効果の測定

口腔内に存在する各種細菌および *Candida albicans* に対する FW の殺菌効果を CFU 測定により行った。その結果、FW は市販の含嗽剤と同程度の殺菌効果を示すことが明らかとなった。また、希釈した ConCool F は、殺菌効果が低いことが判明した。



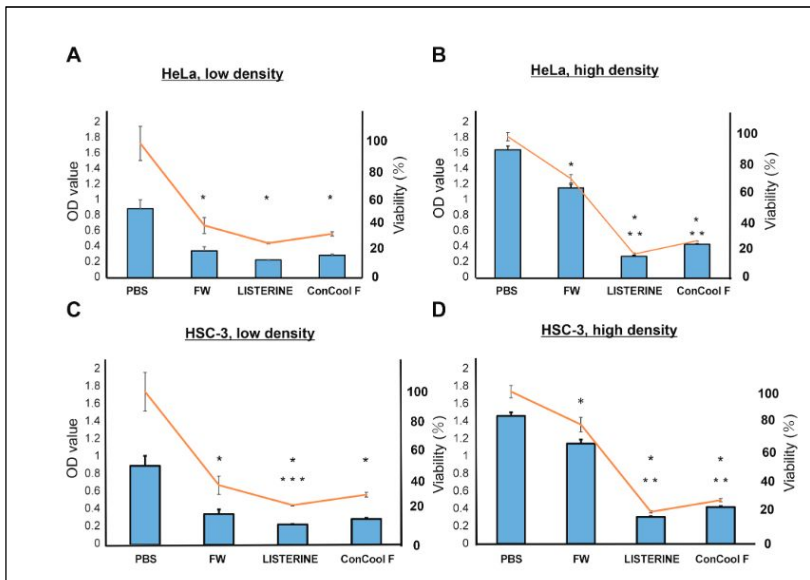
(2) SOD 産生量

FW 処理後の細菌における SOD 産生量を測定したところ、50% FW 溶液による処理によって、最も高い SOD 産生が認められた。



(3) 細胞毒性の評価

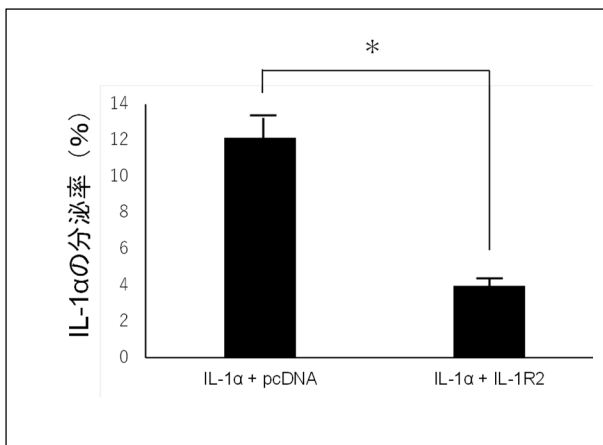
HeLa 細胞および HSC3 細胞を、それぞれ 1×10^4 ないし 1×10^5 の濃度で播種し、FW 処理後の生存率を測定したところ、FW 処理は市販の含嗽剤と比較して、低い細胞毒性を持つことが明らかとなった。



(4) IL-1 α 分泌に対する IL-1R2 の影響

FW による培養細胞の処理によって、細胞内に存在する IL-1 α が細胞外に放出されることが明らかとなっている。そこで、このメカニズムについて検討し、細胞内における IL-1 α の産生が促進された結果によるものでないことなどを報告した。その後の研究によって、IL-1 α のレセプターとして知られる、IL-1R2 がシグナル伝達に寄与しない、decoy receptor であり、その機能に未だ不明な点が多いことを知った。そこで IL-1R2 の機能について、さらなる検討を加えることとした。

IL-1 α は細胞内で、約 34kDa の前駆体 precursor IL-1 α (pIL-1 α) として産生され、Calpain 3 や GramzymeB などの酵素によって propeptide (pp) IL-1 α と mature (m) IL-1 α に分断される。分断後、pIL-1 α と mIL-1 α は細胞外に放出され、サイトカインとして炎症反応を惹起することがわかっている。pIL-1 α の細胞外放出に対する IL-1R2 の機能について検討を行った。その結果、IL-1R2 は、pIL-1 α の放出を阻害することが判明した。また、IL-1R2 の細胞膜貫通領域を欠失させた mutant では、この阻害効果が失われていた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kudo Y, Tamagawa T, Nishio K, Kaneko T, Yonehara Y, Tsunoda M.	4. 巻 64
2. 論文標題 Nuclear localization of propeptide IL-1 in HeLa cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 151-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.21-0540. Epub 2022 Mar 2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takemoto T, Kaetsu R, Hanayama M, Ishiyama Y, Sadamura M, Nishio K, Tsunoda M, Asano M, Motoyoshi M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Acid-electrolyzed functional water-induces interleukin-1 release from intracellular storage sites in oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1746-1752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/ijms.53999. eCollection 2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角田麻里子、工藤 圭紘、浅野正岳
2. 発表標題 IL-1 N末断片の機能解明
3. 学会等名 第110回 日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角田麻里子、浅野正岳
2. 発表標題 IL-1 の processing と機能
3. 学会等名 第32回 日本臨床口腔病理学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	西尾 健介 (Nishio Kensuke) (50780558)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------