

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月26日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792163

研究課題名（和文）ナノバブルを応用した新しい根管洗浄システムの開発とその臨床応用

研究課題名（英文）Development of a new root canal irrigation system using nanobubbles and its clinical application

研究代表者

辺見 浩一（HENMI KOUICHI）

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：80586389

研究成果の概要（和文）：

低濃度次亜塩素酸ナトリウム溶液にナノバブルを併用した新しい根管洗浄システムを開発する目的で、まず殺菌効果確認法の確立および組織傷害を惹起しない次亜塩素酸ナトリウム溶液の濃度の決定を行った。その結果、細菌の ATP 活性をルシフェラーゼ活性に置き換えることで簡便に細菌数を測定できること、0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液であればラット口角においてほとんど組織傷害を惹起しないことが明らかになった。次に 200ul ピペットチップを根管に模した実験系にて殺菌効果の検討を行い、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液においてもある程度の殺菌能を示すが、そこにナノバブルと超音波を併用することにより、有意な細菌数の減少を認めた。このナノバブルと超音波による殺菌効果の増強のメカニズムについて明らかにする目的で、透過型電子顕微鏡（TEM）により検討した。慢性根尖性歯周炎の遷延化の要因の一つとされる *Enterococcus faecalis* に対して、ナノバブルおよび超音波を作用させることにより、細菌表面が破壊されたような像が多数観察された。細菌表面の破壊が殺菌剤の効率的な導入を促進し、その結果殺菌効果が増強されたと推察された。

研究成果の概要（英文）：

The objectives of this study were development of a new root canal irrigation system using nanobubbles and its clinical application. A simple and reliable protocol to detect the number of bacteria measuring their ATP activity which was converted to luciferase activity was established. Next, concentration of sodium hypochlorite which is not harmful to tissues was determined to be 0.5%. Enhanced effects of nanobubbles conjunction with ultrasounds were determined. The bacterial solution was placed in the disposable pipet tips of 200ul which were used as artificial root canals. Sodium hypochlorite (0.5%) in the presence or absence of nanobubbles with ultrasounds was applied to the bacterial solution. Nanobubbles with ultrasounds significantly enhanced the bactericidal effects of low concentrated sodium hypochlorite. Morphological effects of nanobubbles with ultrasounds for bacteria were evaluated by transmission electron microscopy (TEM). There was no morphological change on the surface of *Enterococcus faecalis* (EF) by ultrasound or nanobubbles only, however the destruction of the surface of EF was induced by nanobubbles with ultrasound. Destruction of the cell surface of bacteria by nanobubbles with ultrasound may be involved in the enhancement of bactericidal effects of low concentrated sodium hypochlorite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：ナノバブル、根管洗浄、*Enterococcus fecalis*、次亜塩素酸ナトリウム溶液、超音波

1. 研究開始当初の背景

根管治療の目的は根管内の無菌化とその永続化であり、根管内の無菌化において主要な役割を担うのは次亜塩素酸ナトリウム溶液(以下 NaClO)による根管洗浄である。根管洗浄液としての NaClO の濃度は 6% (あるいは 10%) が最も一般的である。NaClO の特徴はその非特異的かつ強力な殺菌力であり、また経済的にも優れた薬液である。しかし作用が強力な分、副作用も強く、根尖孔外に漏出すると粘膜・軟組織の損傷を起す。また、口腔内に漏出した場合にも、粘膜、皮膚の損傷を引き起こす。このような場合、患者は強い痛みを訴え、癒痕化して治癒することもあり、医療訴訟の原因の一つとなっている。NaClO は漂白剤であるので、着衣にかかると脱色を起す、あるいは穴を開けてしまうこともある。このような場合にも弁償を含めた補償が必要となる。現在、ラバーダムおよびエンドバキュームを使用し、術者の注意深い操作により、そのような事故が起きないように配慮しているが、完全にこのような事故を防ぐのは不可能である。このような事故を防ぐためには、組織傷害性の低い NaClO を使用すべきと考えられるが、根管治療の目的である根管内の無菌化を十分に図ることの出来るだけの殺菌力を有すると同時に、組織傷害性の低い根管洗浄液は今のところ存在しない。

ところでナノレベルのバブルリポゾームは、近年細胞内へのドラッグデリバリーにおける画期的な方法として注目を集めている。ナノサイズのリポゾームを超音波により破砕するとジェット流が発生し、その周囲の細胞あるいは細菌表面に微細な穴があき、そこから試薬が取り込まれる。このシステムは大変効率が高く、安全性も高いと報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、組織傷害を起こさない濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液にナノバブルを併用し、効果的に根管内の細菌の除去を行うことができるかを検討することである。

3. 研究の方法

(1) 微細な細菌感染まで容易に検出できるシステムの構築

一般的に細菌数を検討する場合には、寒天プレートに希釈した細菌液を播種し、形成されたコロニー数をカウントする。この方法は、手間および時間がかかり、様々なサンプルからの細菌数の検討には向いていない。今回、我々は細菌の産生する ATP によりルシフェラーゼが活性化され、ルシフェリンに作用して発光することにより細菌数を同定するシステムを検討した。この反応は ATP 量に依存して増強するため、定量的な測定が可能である。

(2) 根管洗浄液の至適濃度の決定

組織傷害を起こさない濃度を検討する目的でラット口角に様々な濃度の NaClO を作用させ、反応を評価した。

(3) ピペットチップを用いた模擬根管における細菌除去効果の検討

根管の形態に見立てた細かいピペットチップ内で NaClO にナノバブルを併用し、殺菌効果を検討した。

(4) 走査電子顕微鏡 (SEM) ・透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いたナノバブルの細菌に対する作用の検討

ナノバブルが細菌にどのような作用を及ぼしているかについて検討を行った。ナノバブルを作用させた細菌を走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察した。細菌には、慢性根尖性歯周炎の遷延化と関連が深いと報告されている *Enterococcus faecalis* (EF) を使用した。

4. 研究成果

(1) 微細な細菌感染まで容易に検出できるシステムの構築

細菌の ATP をルシフェラーゼにより検出を行った (ルシフェール 250 プラス: キューマン、ルミネッセンサー PSN: アトー)。その結果、本システムを用いることで、細菌数を簡便に検討できることが明らかになった。

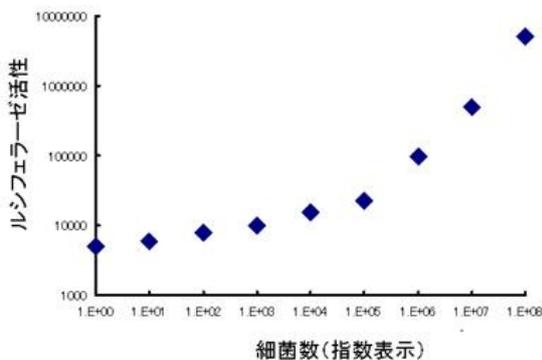


図 1 : 大腸菌 (1×10^8 個) を段階希釈して得られたルシフェラーゼ活性
縦軸に ATP 活性に基づくルシフェラーゼ活性、横軸に寒天プレート上のコロニー数 (CFU) を示す。

大腸菌の段階希釈懸濁液を、本システムにて ATP 活性を測定するとともに、寒天プレートに播種し、24 時間後の寒天プレートにおけるコロニー数から CFU (Colony Forming Unit) を求めた。ATP 活性を元にした本システムは、細菌数 100-1000 オーダーから検出が可能であることが分かった。

(2) 安全な NaClO 濃度の検討

ラット口角に様々な濃度の NaClO を留置し炎症反応の有無を検討した。10 分留置により口角における発赤が起きない NaClO の

濃度は 0.5% 以下であることが明らかになった。

(3) ピペットチップを用いた模擬根管における殺菌効果の検討

実験には、一般細菌のコンタミを防ぐため、カナマイシン耐性遺伝子を組み込んだ大腸菌を用いた。ナノバブル溶液は使用前に細胞破碎装置 (マイクロスマッシュ MS-100: トミー デジタルバイオロジー) により活性化した。

実験群 A: NaClO (0.5%, 40ul) + 飽和バクテリア溶液 (7.5ul) + ナノバブル溶液 (2.5ul) + 超音波処理 (SonoPoreKTAC-4000: NepaGene, 30秒)

実験群 B: NaClO (0.5%, 40ul) + 飽和バクテリア溶液 (7.5ul) + 生理食塩液 (2.5ul) + 静置 (30秒)

実験群 C: 生理食塩液 (40ul) + 飽和バクテリア溶液 (7.5ul) + 生理食塩液 (2.5ul) + 超音波処理 (SonoPoreKTAC-4000: NepaGene, 30秒)

実験群 D (対照群): 生理食塩液 (40ul) + 飽和バクテリア溶液 (7.5ul) + 生理食塩液 (2.5ul) + 静置 (30秒)

細菌数は ATP 活性を指標として測定した。統計処理は Student's t-test を用い、有意水準 5% あるいは 0.5% で検定を行った。

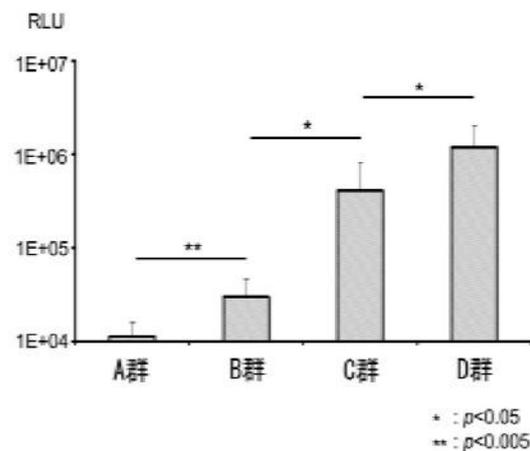


図 2 : 実験的根管模型における細菌数の比較

ナノバブルに超音波を併用した A 群において、最も効果的に細菌を排除した。

その結果、超音波処理のみ(実験群 C)によって対照群(実験群 D)の約 70%まで細菌数の減少が認められた。さらに、0.5% NaClO を 30 秒間適用する(実験群 B)ことにより、対照群の約 30%まで細菌数の減少が認められた。さらに、0.5% NaClO にナノバブル溶液と超音波を併用(実験群 A)することにより、対照群の約 1%まで細菌数が減少した。各群間には有意差が認められ($p < 0.05$)、特に実験群 A は、どの群と比較しても有意に細菌数が減少した($p < 0.005$)。以上の結果より、低濃度(0.5%) NaClO による殺菌効果は、ナノバブル溶液および超音波を併用することにより増強されることが明らかになった(図 2)。

(4) TEM を用いたナノバブルの細菌に対する作用メカニズムの解明

E. Faecalis は、2ml の Trypticase Soy Broth 培地 (BD) にて一晚振とう培養し、対数増殖期にある細菌を用いた。1ml の細菌懸濁液を遠心し、菌体を滅菌生理食塩液にて洗浄した後、再び 1ml の滅菌生理食塩液に懸濁した。*E. Faecalis* 懸濁液を 95ul 採取し、2ml のエッペンドルフチューブに入れ、さらに 5ul のナノバブル(福岡大学医学部解剖学教室により制作されたものを使用)あるいは滅菌生理食塩液(コントロール)を加え、超音波発生装置 SonoPoreKTAC-4000 (ネッパジーン 処理条件 Frequency 2.015MHz Voltage 100V Duty 50% Burstrate 5.0Hz Duration 30sec) にて 30 秒間処理を行った。なお、超音波処理をしなかったサンプルも作成した。処理終了と同時に 100ul の 5% のグルタルアルデヒド溶液 (TAAB) を加えて固定を行った。

E. Faecalis およびナノバブルをそれぞれ単独でグルタルアルデヒド固定を行った。その後、各サンプルはネガティブステイニング処理を行った後、透過型電子顕微鏡 (H-7100: 日立) にて倍率 20000~10000 倍で観察を行った。ナノバブルの粒径はほぼ均一であり、おおよそ 100~200nm であり明瞭に観察された。一方 *E. Faecalis* は、おおよそ 1 μ m であった。*E. Faecalis* にナノバブルを添加したサンプルにおいては、*E. Faecalis* の周囲に多数のナノバブルが密着している像が観察された。ナノバブルを添加しないで超音波処理を行ったコント

ロール群においては、*E. Faecalis* に著しい形態学的変化は認められなかった。一方、ナノバブル存在下で超音波処理を行った *E. Faecalis* においては、破壊されたような像が多数認められた。

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 4 件)

1、2011 年 3 月 2 日
超音波分子診断研究会
福岡大学

「ナノバブルを併用した新しい根管洗浄法に関する基礎的研究」

○辺見浩一、川島伸之、須田英明、鈴木考尚、山下直也、立花克朗、中島美砂子

2、2011 年 6 月 9~10 日
第 134 回 保存学会 平成 23 年度春季大会
東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート

「低濃度次亜塩素酸ナトリウム溶液にナノバブルを併用した新しい根管洗浄法の開発」

○辺見浩一、川島伸之、鈴木考尚、山下直也、立花克郎、中島美砂子、須田英明

3、2012 年 11 月 22 日~23 日
第 137 回 保存学会 平成 24 年度秋期大会
広島国際会議場

「ナノバブルを作用させた *Enterococcus faecalis* の透過型電子顕微鏡を用いた観察」

○辺見浩一、川島伸之、市野瀬志津子、立花克朗、中島美砂子、須田英明

4、2013 年 5 月 23~26 日

第 9 回世界歯内療法会議
東京国際フォーラム

「Effect of nano-bubbles on *Enterococcus faecalis*: transmission electron microscope investigation」

○辺見浩一、川島伸之、中島美砂子、須田英明

〔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

辺見浩一

東京医科歯科大学歯学部非常勤講師

研究者番号：80586309

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：