

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24593140
研究課題名(和文) 低濃度過酸化水素ラジカル殺菌技術を搭載した電動歯ブラシの開発とその臨床的評価
研究課題名(英文) Development and clinical evaluation of a new electric toothbrush utilizing disinfection technique based on photolysis of hydrogen peroxide
研究代表者
猪飼 紘代 (Ikai, Hiroyo)
東北大学・歯学研究科(研究院)・助教
研究者番号：20431588
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)：これまで研究を行ってきた、過酸化水素光分解殺菌技術を広く民生に応用するために、歯ブラシの毛先から青色可視光を照射可能な歯ブラシの開発を行った。溶着技術を用いて作成した歯ブラシヘッドに小型LEDを装着し、ブラシ先端へ導光できるようにした。また、現在市販されている歯磨剤に含有される過酸化水素濃度の計測、各歯磨剤に青色可視光を照射することにより生成するヒドロキシルラジカル量を計測し、今後行う臨床研究に使用する歯磨剤を選定した。また、ポリフェノールの一種であるプロアントシアニジン(Proanthocyanidin)を過酸化水素に添加することで殺菌効果が高まることから、光る歯ブラシ専用の新規歯磨剤開発の可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to apply the bactericidal action of photolysis of hydrogen peroxide to a wide range of civilian goods, I have developed the toothbrush that emits blue visible light from the tip of bristle. A compact size LED was fixed with the head of toothbrush by using a weld technology so that the light could be introduced to the tip of bristle. In addition, the content of hydrogen peroxide contained in commercially available toothpastes and the yield of hydroxyl radical generated by the blue light irradiation of these toothpastes were determined. Based on the determinations, an optimal toothpaste was chosen to be used in a future clinical study. Besides these studies, since it was found that addition of proanthocyanidin, a group of polyphenols, augmented the bactericidal action of photolysis of hydrogen peroxide, it was suggested that a novel toothpaste containing proanthocyanidin could be applicable to the light emitting toothbrush.

研究分野：補綴学一般

キーワード：ヒドロキシルラジカル 過酸化水素 青色可視光 殺菌

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまで、日常臨床で用いられるオキシドール(1M; 3%)よりも低濃度の過酸化水素に、405 nmの可視光領域の波長のレーザー光(LD)やLEDを照射することで効率的に生成されるヒドロキシルラジカル(HO・)による高い殺菌効果を検証し、その技術(過酸化水素光分解殺菌技術)を歯科臨床に応用してきた。歯科臨床応用の一例として、超音波スケーラー先端から過酸化水素とLDを同時に噴出する歯周病治療器や、内蓋からLEDを発行できる義歯洗浄器の開発を行ってきた。特に歯周病治療器は、経済産業省産学官連携大型事業、厚生労働省産学官連携大型事業に採択され、H27年には医師主導治験を開始するまでに開発が進んでいる。義歯洗浄器においても、第118回日本補綴歯科学会課題口演コンペティション優秀賞を受賞(2009)し、期待を集めている。本殺菌技術の特徴は、すでに安全性が確立されている濃度の過酸化水素を用いること、また、可視光の範囲内という低刺激波長の光を用いること、それにより、安全性の高い殺菌方法であることが第一に挙げられる。さらに、HO・の半減期は非常に短いため、照射されている時のみHO・が生成する。そのため、光のon-offで殺菌力をコントロールできるというのも大きな特徴である。そのような安全性の高い本技術を治療のみならず予防、すなわちオーラルケアの分野に応用することを目的として研究を開始した。

2. 研究の目的

歯科の二大疾患である齲蝕と歯周病の予防には、それらの疾患が細菌により惹起されるものであるため、日常のオーラルケアが必須である。これまで開発してきた歯周病治療器や義歯洗浄器は、プロユースを対象として開発してきたが、このラジカル殺菌技術を日常のオーラルケアに応用できれば、ホームユースとして、患者のみならず健常者にも予防的に取り入れることが可能となる。そこで本研究では、本殺菌技術のホームユースでの応用を目的とし、安全で効果的な最適の光条件・過酸化水素濃度を検証し、光る歯ブラシの試作開発を行うことを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 光る歯ブラシの試作

これまでに、光る歯ブラシは世界中で開発され、特許を取得しているものもある。しかしそのほとんどが単に光るのみで、学術的背景をもとに殺菌効果を謳っているものはほとんど存在しない。そこで、われわれは過酸化水素光分解殺菌技術を応用した光る歯ブラシとして、歯ブラシの毛先端から青色可視光が放出する光る歯ブラシの試作を試みた。

歯ブラシの試作は、樹脂の加工・成型を

得意とする株式会社ホクシンエレクトロニクスに依頼した。

(2) 使用する歯磨剤の検討

光る歯ブラシの使用に際し、LED照射のみではほとんど殺菌効果がないことが分かっている。従って、同時に使用する歯磨剤に、過酸化水素か、あるいは光分解することによりHO・を生成する物質が混和されている必要がある。現在海外も含め市販されている歯磨剤には過酸化水素を配合していることを明記している製品もあり、すでに安全性が確認され市販されているそのような製品を使用するのが最も容易である。そこで、市販歯磨剤に含有されている過酸化水素濃度の計測と、実際に歯磨剤に照射することで生成されるHO・量の計測を行った。

実験に使用した市販歯磨剤は下記のとおりである(以下製品をNo.で表記する)。

1. Colgate OPTIC WHITE (Colgate 社製)
2. Colgate whitening oxygen bubbles (Colgate 社製)
3. PEARL WHITE Advanced Formula (beyond Dental & Health 社製)
4. Opalescence whitening toothpaste (ULTRADENT 社製)
5. Tandkram CLASSIC (apoteket 社製)
6. biotene (Laclede 社製)
7. check-up standard (LION 社製)
8. ConCool ジェルコート F (weltec 社製)

過酸化水素濃度の計測

No.1~5の各歯磨剤に含まれる過酸化水素濃度の測定には、FOX法(キシレノールオレンジ法)を用いた。FOX法とは、過酸化脂質により酸化され生成したFe³⁺をキシレノールオレンジでキレートし、生じた複合体を560nmで比色する方法である。本実験では、各歯磨剤を10 mg/mLで純水に溶解した溶液を、計測可能な濃度にまで希釈し用いた。

HO・量の計測

No.1~8の各市販歯磨剤にLDを照射することで生成するHO・量の計測を、電子スピン共鳴(Electron Spin Resonance: ESR)装置を用いて行った。半減期の短いHO・のスピントラップ剤として、DMPOを使用し、HO・生成量はDMPO-OH量(μM)として示した。

各歯磨剤を100 mg/mLで純水に溶解し、歯磨剤溶液を調製した。用いた光源は、405 nmの青色LDで、出力は300 mW、DMPO混和後60秒間の光照射を行った。

(3) 殺菌効果の検討

殺菌効果の検証には歯周病の代表的な原因菌として、*Porphyromonas gingivalis* JCM 12257 (以下P.g.)を供試した。これまでのわれわれの研究から、P.g.の初発菌数を10⁷~10⁸ CFU/mLに設

定した浮遊菌液あるいはバイオフィルムモデルに対して、500 mM の過酸化水素を用い 405 nm の LD を 300 mW で 30 秒間照射することで 10^5 CFU/mL 以上の殺菌効果が検証されている。デイリーユースの歯ブラシでは、ブラッシングという機械的細菌除去効果もあるため、それほどまでに強い効果は必要ではない。そこで、効果と安全性のバランスが非常に重要となる。安全性に関しては、過酸化水素濃度を下げる、405 nm よりも長い波長の光を用いる、照射出力を下げる、等で対処可能である。そのような方法で安全性に配慮し、その中でも殺菌効果が効率よく発揮できる条件を、殺菌効果を検証することにより導き出す。

さらに、これまでわれわれの研究グループが行ってきた研究では、ポリフェノールの光分解により、過酸化水素が生成し、その過酸化水素がさらに光分解されることで生成する $\text{HO}\cdot$ により殺菌効果が認められることを報告しており、過酸化水素光分解殺菌技術にポリフェノールであるプロアントシアニジン (PA) を添加することで、低濃度の過酸化水素でもより効果的な殺菌が可能かどうかの検討も行う。

(4) 安全性の検証

重層培養したヒト歯肉線維芽細胞 (HGF, Science Cell) を供試した。過酸化水素濃度は、市販歯磨剤に含まれる最大濃度の 12.8 mM、LD 出力は 25 mW とした。過酸化水素ありを H(+), なしを H(-), 光照射ありを L(+), なしを L(-) とし、H(+)/L(-), H(-)/L(+), H(+)/L(+) で、各条件、暴露時間を 3, 5 分と設定した。ポジティブコントロールはクロルヘキシジン (CHX) に 30 秒暴露とした。未処理の細胞を 100% として、細胞生存率を評価した。

4. 研究成果

(1) 光る歯ブラシの試作

ブラシ先端から導光するには、ブラシ毛自体を光ファイバーとして利用し、導光することになる。従来の植込み歯ブラシの植毛方法では、植毛する付け根の部分を屈曲して束ね、植毛しているため、ブラシ毛に高効率に入光させることが困難となる。歯ブラシ先端から照射可能な植毛方法として、「溶着技術」での植毛方法というものを、東大阪市の(株)稲田歯ブラシからご教示いただいた(図1)。溶着技術で大量生産を行うには、非常に高額な設備を要するが、数本程度であれば手作業でも試作可能ということであった。そこで、仙



図1 溶着歯ブラシの1例

台市の磁化発電ラボ株式会社に依頼し、市販の歯ブラシを溶着歯ブラシに改造・試作していただいた。

通常、溶着技術は、脱毛予防やブラシ以外の材料(ラバー素材のステインクリーナー等)を取り付けるため、あるいは行・列に拘らずさまざまな形態でより高密度に植毛するという目的などで使用するが、今回は、導光が目的であったため、透明の一般的なブラシ毛を用いて、市販の歯ブラシ(プロスペックヤング(GC社製))と同様の形態とし、植毛方法のみを溶着で行う



図2 試作溶着歯ブラシ(歯ブラシヘッド背面より撮影)

ものとした(図2)。具体的には、市販歯ブラシからブラシ毛を除去し、新たなブラシ毛を溶着技術で植毛した。市販歯ブラシは、導光の違いを調査するため、柄が透明のものと濃い青色のものを2種類試作した。試作した溶着歯ブラシのヘッド背面部にエポキシ樹脂のモールドイングでLED基盤を取り付け、LED光の出力を調節可能な光る歯ブラシを、(株)ホクシンエレクトロニクスに試作していただいた(図3, 4)。

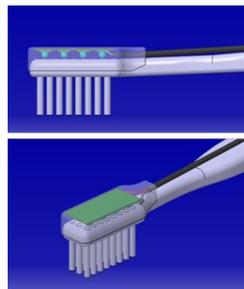


図3 光る歯ブラシ設計図

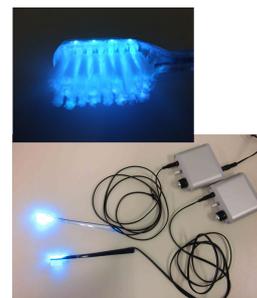


図4 試作光る歯ブラシ

405 nm の LED は、紫外光を含むこと、歯ブラシに採用するにはコストがかかることなどを考慮し、基盤に用いる LED は、その形状・波長から判断し、stanlay 社製 1105W(波長 470 nm)を採用した。柄が透明の試作光る歯ブラシからは、最高で 15 mW の照度が得られたのに対し、柄が濃青色の試作歯ブラシからは 5 mW 程度しか確認できなかった。したがって、光る歯ブラシとして採用するには柄が透明のものの方が効率良く照度を確保できることを確認した。

(2) 使用する歯磨剤の検討

過酸化水素濃度の計測

No.1~5 の各市販歯磨剤を 10 mg/mL で純水に溶解し、その溶液を計測可能な濃度にまで希釈し、比色法により過酸化水素濃度の計測を行った。表 1 にその結果を示す。

表 1 市販歯磨剤に含有される過酸化水素濃度

		H ₂ O ₂ 濃度 (uM)
1	OPTIC WHITE	1281.23
2	whitening OXYGEN BUBBLES	6.60
3	PEARL WHITE	5.91
4	Opalescence	5.18
5	Tandkram CLASSIC	7.23

No.1 の製品には、1%過酸化水素が含まれているとの記載があり、その他の製品には過酸化水素は含まれていない。しかし、例えば製品 No.2, 3 には過酸化カルシウム、二酸化チタンが含有されており、これらの物質が分解し、生成したわずかな過酸化水素を検出したものと思われる。No.1 の製品に記載がある 1%過酸化水素は、約 300 mM であるが、歯磨剤 10 mg に含有する過酸化水素濃度が 1281 μM であることから、128 mM 過酸化水素が製品中に含有されていることを検出した。

HO・量の計測

No.1 ~ 8 の各市販歯磨剤を 100 mg/mL で純水に溶解し、405 nm, 300 mW の LD を 60 秒間照射した際に生成する DMPO-OH の量を計測した。また、過酸化水素濃度の計測で、最も過酸化水素濃度の高かった No.1 の製品中には 128 mM 含有していたという結果を受け、測定する歯磨剤の希釈を考慮し、12.8 mM 過酸化水素から同条件下で生成する DMPO-OH 量も計測した。その結果を図 5 に示す。

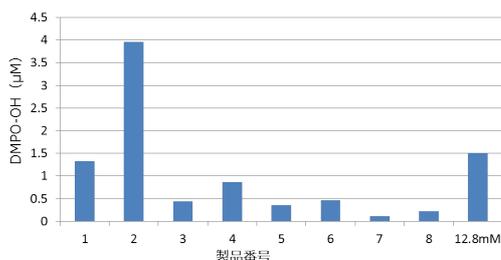


図 5 各種歯磨剤から生成する HO・生成量

過酸化水素濃度が最も高い No.1 は、それと同濃度である 12.8 mM 過酸化水素とほぼ同程度の DMPO-OH 生成量を示した。No.2 の製品では、過酸化水素濃度は No.1 以外の製品とほぼ同程度に低濃度であったにも関わらず (表 1)、非常に高い DMPO-OH 生成量を示した。No.2 には、光分解により HO・を生成可能であると考えられる物質、過酸化カルシウム、二酸化チタンが含有されているが、これは No.3 にも含有されており、含有量の差によるものかもしれない。

(3) 殺菌効果の検討

われわれの研究グループでは、これまで

にポリフェノール自体に照射することで過酸化水素を生成し、その過酸化水素がさらに光分解されることで HO・を生成することを確認してきた。

そこで、低濃度過酸化水素でも PA を添加することにより、より高い殺菌効果が得られるかどうかの試験を行った (図 6)。

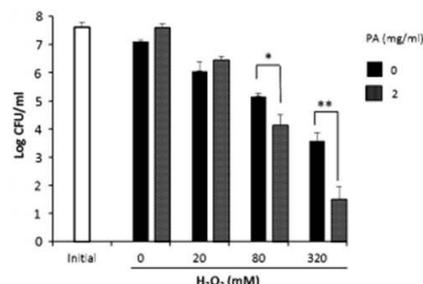


図 6 *P. g.* に対する PA の過酸化水素光分解殺菌増強効果

この試験は、光源に 405 nm の LD を 300 mW・30 秒照射で用いて行った。PA 濃度は 0, 2 mg/mL、過酸化水素濃度は 0, 20, 80, 320 mM とした。その結果、80 mM 以上では PA 添加により有意に高い殺菌効果が認められた。

開発した光る歯ブラシの条件に合わせて、さらに低出力の光源で、照射時間を延長して試験を行った。LD 照射ありを LD(+), LD 照射なしを LD(-) とし、LD(+) は 405 nm の LD を 10 mW・3 分間照射した。また、過酸化水素は 20 mM と 50 mM を設定し、それぞれ過酸化水素のみの場合と PA を 1 mg/ml 添加した場合の殺菌効果を比較した (図 7)。その結果、

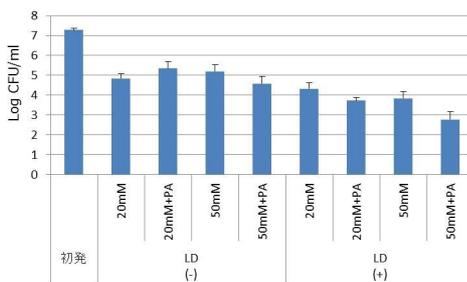


図 7 PA 添加条件下での殺菌効果

P. g. に対して 20 mM や 50 mM といった低濃度の過酸化水素でも LD 照射なしで 3 分間作用させると 10² CFU/ml 程度の殺菌効果を確認した。10 mW 程度の低い出力の LD 照射では、過酸化水素光分解殺菌効果は低いですが、そこに PA を添加することで、過酸化水素単独より約 10¹ CFU/ml 程度殺菌効果が増強することを確認した。

(2)の結果から、市販歯磨剤に含まれている過酸化水素は最大で 12.8 mM であり、上記試験で供試した濃度より低い。また、開発した光る歯ブラシから確実に出力できるのは 15 mW 程度であった。そこで、*P. g.* に対し、12.8 mM の過酸化水素と 15 mW の光照射で殺菌効果を確認した。さらに、No.1 の歯磨剤以外の過酸化水素含有量はどれも約 60 μ M 程度であることが

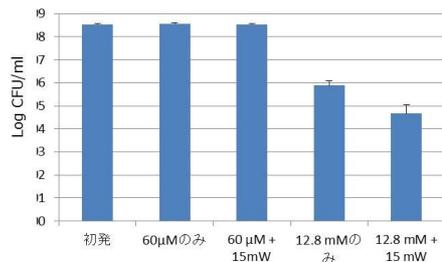
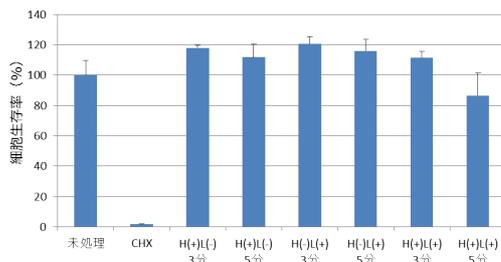


図 8 実際の歯磨剤条件に合わせた殺菌効果

ら、その濃度でも試験を行った。照射は 3 分間行った。図 8 にその結果を示す。60 μ M では、LD 照射を行っても殺菌作用は認められなかった。12.8 mM では、過酸化水素単独でも 10^2 CFU/ml 程度の殺菌効果が認められたが、LD 照射を行うことで、さらに約 10^1 CFU/ml 程度の殺菌効果の増強が確認できた。

(4) 安全性の検証

重層ヒト歯肉線維芽細胞を用いた MTT 試験による細胞毒性評価の結果を図 9 に示す。



H(+)(L)(+)5 分の処理では、わずかに細胞毒性がみられたが、それ以外の条件では、

図 9 各処理による細胞毒性評価

毒性はみられなかった。

以上の結果から、市販の歯磨剤 No.1 と、試作光る歯ブラシの使用により、安全で、より高い殺菌効果が期待できることが示唆された。また、PA 入りの歯磨剤を開発することにより、さらに高い殺菌効果が期待できる可能性も示唆された。

歯磨剤含有過酸化水素濃度と HO \cdot 生成試作歯ブラシを用いた臨床研究において、HO \cdot 生成量が多い歯磨剤の方が効果的であれば、その成分を調査し、より効率の良い歯磨剤の開発につなげたい。また、本試作歯ブラシは市販するには値しない形

態・機能であり、更なる開発が必要である。

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 7 件)

- (1) Toki, T., Nakamura, K., Kurauchi, M., Kanno, T., Katsuda, Y., Ikai, H., Hayashi, E., Egusa, H., Sasaki, K., Niwano, Y.: Synergistic interaction between wavelength of light and concentration of H₂O₂ in bactericidal activity of photolysis of H₂O₂. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.08.015>. (査読あり)
- (2) Odashima, Y., Nakamura, K., Ikai, H., Kanno, T., Meirelles, L., Sasaki, K., Niwano, Y.: Postantibiotic effect of disinfection treatment by photolysis of hydrogen peroxide. *Journal of Chemotherapy* 26(2):92-100, 2014. dx.doi.org/10.1021/jf303177pl. (査読あり)
- (3) Ikai, H., Odashima, Y., Kanno, T., Nakamura, K., Shirato, M., Sasaki, K., Niwano, Y.: In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide. *PLoS ONE*, 8(11):e81316, 2013. (査読あり) dx.doi.org/10.1021/jf303177pl
- (4) Ikai, H., Nakamura, K., Kanno, T., Shirato, M., Meirelles, L., Sasaki, K., Niwano, Y.: Synergistic effect of proanthocyanidin on the bactericidal action of the photolysis of H₂O₂. *Biocontrol Science*, 18(2):137-141, 2013. (査読あり)
- (5) Nakamura, K., Shirato, M., Ikai, H., Kanno, T., Sasaki, K., Kohno, M., Niwano, Y.: Photo-irradiation of proanthocyanidin as a new disinfection technique via reactive oxygen species formation. *PLoS ONE*, 8(3):e60053, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0060053. (査読あり)
- (6) Oyamada, A., Ikai, H., Nakamura, K., Hayashi, E., Kanno, T., Sasaki, K., Niwano, Y.: In vitro bactericidal activity of photo-irradiated oxydol products via hydroxyl radical generation. *Biocontrol Science*, 18(2):83-88, 2013. (査読あり)
- (7) Nakamura, K., Yamada, Y., Ikai, H., Kanno, T., Sasaki, K., Niwano, Y.: Bactericidal action of photo-irradiated gallic acid via reactive oxygen species formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40):10048-10054, 2012. dx.doi.org/10.1021/jf303177pl. (査読あり)

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 猪飼紘代, 目代貴之, 中村圭祐, 菅野太郎, 庭野吉己. 過酸化水素光分解殺菌技術を応用した新規歯周病治療器の安全性と有効性の検証 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会 平成 26 年 9 月 25

- 日(東京)
- (2) 中村圭祐, 菅野太郎, 猪飼紘代, 庭野吉己. 活性酸素 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会 平成 26 年 9 月 25 日(東京)
- (3) 倉内美智子, 唐木英俊, 中村圭祐, 菅野太郎, 勝田悠介, 猪飼紘代, 林栄成, 佐々木啓一, 庭野吉己. 過酸化水素光分解殺菌技術における光の波長と過酸化水素濃度の相乗作用 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会 平成 26 年 9 月 25 日(東京)
- (4) 猪飼紘代, 中村圭祐, 小田島優, 白土翠, 菅野太郎, 庭野吉己. 過酸化水素光分解殺菌法の耐性誘導試験 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会 平成 25 年 9 月 10 日~11 日(大阪 豊中)
- (5) 小田島優, 中村圭祐, 猪飼紘代, 菅野太郎, 佐々木啓一, 庭野吉己. 過酸化水素光分解殺菌法の短時間処理が残存細菌に及ぼす増殖抑制効果 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会 平成 25 年 9 月 10 日~11 日(大阪 豊中)
- (6) 中村圭祐, 石山希里香, 猪飼紘代, 菅野太郎, 庭野吉己. 各種ポリフェノールに対する青色可視光照射で得られる殺菌効果の比較検討 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会 平成 25 年 9 月 10 日~11 日(大阪 豊中)
- (7) Ikai H, Odashima Y, Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. Advantages of new disinfection treatment utilizing photolysis of hydrogen peroxide -Postantibiotic effect and low risk of inducing bacterial resistance- The innovative research for Biosis-Abiosis intelligent Interface Summer Seminar in Sendai. 平成 25 年 8 月 29 日~30 日(宮城 蔵王)
- (8) Ishiyama K, Nakamura K, Ikai H, Kanno T, Sasaki K, Niwano Y. Bactericidal action of photogenerated singlet oxygen from photosensitizers used in plaque disclosing agents. The innovative research for Biosis-Abiosis intelligent Interface Summer Seminar in Sendai. 平成 25 年 8 月 29 日~30 日(宮城 蔵王)
- (9) 庭野吉己, 石山希里香, 中村圭祐, 猪飼紘代, 菅野太郎, 佐々木啓一. 歯垢染色剤に含まれる各種キサンテン系色素を光感受性物質とした一重項酸素依存性光線力学殺菌療法の比較 第 23 回日本光線力学学会学術大会 平成 25 年 6 月 7 日~8 日(旭川)
- (10) 菅野太郎, 中村圭祐, 猪飼紘代, 庭野吉己, 佐々木啓一. 過酸化水素光分解殺菌技術を応用した新規歯周病治療器の開発 日本歯周病学会 2013 年春季学術大会(第 56 回) 平成 25 年 5 月 31 日~6

- 月 1 日(東京)
- (11) 猪飼紘代, 白土翠, 中村圭祐, 菅野太郎, 佐々木啓一, 庭野吉己. 過酸化水素光分解殺菌のカテキン類・生薬併用効果 日本防菌防黴学会第 39 回年次大会 平成 24 年 9 月 11 日~12 日(東京)
- (12) 小山田晃, 猪飼紘代, 中村圭祐, 菅野太郎, 佐々木啓一, 庭野吉己. 市販オキシドールの光分解殺菌効果 日本防菌防黴学会第 39 回年次大会 平成 24 年 9 月 11 日~12 日(東京)
- (13) 中村圭祐, 山田康友, 猪飼紘代, 菅野太郎, 佐々木啓一, 庭野吉己. ポリフェノールへの青色可視光照射により生成される活性酸素を応用した新規殺菌技術 日本防菌防黴学会第 39 回年次大会 平成 24 年 9 月 11 日~12 日(東京)

〔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
猪飼 紘代 (Ikai, Hiroyo)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 20431588
- (2) 研究分担者
()
研究者番号:
- (3) 連携研究者
()
研究者番号: