

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792371

研究課題名(和文) iPS細胞をより安全に臨床応用するための感染制御方法の検討

研究課題名(英文) A methodological study on infection control for safe clinical application of iPS cells

研究代表者

岡田 彩子 (Okada, Ayako)

鶴見大学・歯学部・寄附講座助教

研究者番号：60515584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔領域の再生医療成功の鍵の1つは、口腔細菌やバイオフィルムの制御である。すなわち感染制御する一方で、軟組織への影響を考慮し、さらに分化を妨げない歯科技術が必要である。機能水の1種である次亜塩素酸電解水は、強い殺菌性を示す一方で、食塩水を原料とする電解水であることから安全性が期待されている。本研究において、抗菌試験及び細胞毒性試験を行い、1) 短時間で殺菌効果を発揮、2) バイオフィルム浸透殺菌効果を有するおよび3) 硬軟組織への影響が僅かである次亜塩素酸電解水を選択し、口腔領域における再生医療への応用についてその可能性を検討した。

研究成果の概要(英文)：In oral regenerative medicine, such as clinical application of iPS cells, infection control is of the utmost importance in order to maintain the healthy oral environmental balance. In recent years, electrolyzed saline solutions are gaining interests among the medical and dental professionals for their anti-bacterial potentials in shortest possible application time. In the present study, some reactive oxygen species (ROS) based electrolyzed saline solutions containing hypochlorous acid (HClO); also known as super-oxidized water (SOW) have been examined for their anti-bacterial effects, potency of biofilm penetration and cytotoxicity. Results have indicated that SOW containing 125 (~145) mg/L active chlorine and 6.8 pH value can be effective enough to control oral pathogens. In addition, it was understood that this kind of highly purified SOW might be useful in oral regenerative medicine as it showed very low level of cytotoxicity on KB cells derived from pharyngeal mucosal epithelium.

研究分野：社会歯学

キーワード：機能水 口腔再生医療 感染制御 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

口腔領域の再生医療成功の鍵は、徹底した細菌やバイオフィルムの制御である。そのため iPS 細胞の臨床応用に当たっては、化学療法剤の使用が必要になることが想定される。しかし感染源であるバイオフィルムに阻まれ、殺菌効果は減弱し、濃度や作用時間の増長の傾向が予想される。その結果、軟組織に及ぼす影響や常在菌叢の均衡破綻などが懸念される。さらに iPS 細胞培養時には分化制御が困難であるため、抗菌薬は添加していないが、実際に iPS 細胞から分化した骨組織を移植する際、未分化細胞が残存した場合に癌化が懸念される。以上の背景からバイオフィルムを制御する一方で、軟組織、常在菌叢、および分化に影響を及ぼさない歯科独自の技術開発が求められている。

次亜塩素酸電解水は、機能水の 1 つであり、強い殺菌力を示す一方で、食塩水を原料とする電解水であることから安全性が期待されている。すでに内視鏡などの医療器具洗浄には使用が認められており、また最近では、歯科器材や口腔内洗浄の適正濃度を検証している報告も増えている (Morita C et al, 2011, Arch Oral Bio)。したがって、本研究では、口腔再生医療における新たな感染制御方法として期待できる次亜塩素酸電解水の応用に向け、基盤となる研究を行った。

2. 研究の目的

次亜塩素酸電解水は、過酸化水素水やオゾン水と同様に活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) による強い酸化力を利用して殺菌する super-oxidized water として知られている。その一方で過剰な酸化ストレスは口腔内の軟組織への傷害が懸念され、再生医療への応用を視野にいれた場合に、ROS の細胞増殖や分化に及ぼす影響を詳細に検証する必要がある。また近年、電解装置の開発が進み、酸性からアルカリ性までの幅広い pH や有効塩素濃度が異なる次亜塩素酸電解水を生成できるようになった。このように多様化した次亜塩素酸電解水の殺菌効果や細胞毒性については、各々について慎重な検証が必要である。

したがって、本研究ではすでに歯科で用いられている 3% 過酸化水素水、口腔内での使用を目的として開発された無隔膜電解装置および 3 室ダブルイン型電解装置で生成された 2 種類の次亜塩素酸電解水の殺菌効果を確認すると共に、細胞に及ぼす影響について検証した。

3. 研究の方法

(1) 殺菌作用の検証

材料

i) 供試溶液

無隔膜電解装置で電気分解して生成した次亜塩素酸電解水 (有効塩素濃度 125 mg/L, pH7.8) および 3 室ダブルイン型電解装置で生成した次亜塩素酸電解水 (有効塩素濃度 125 mg/L, pH6.8) の 2 種類を選択し、さらに 3% 過酸化水素水 (H_2O_2) を準備した。

ii) 供試細菌

う蝕原性細菌 3 菌種 ; *Streptococcus mutans* MT8148、*Streptococcus sobrinus* 6715 および *Streptococcus gordonii* ATCC10558 を選択した。

細菌に及ぼす影響についての検証

上記 3 菌種の細菌懸濁液を準備し、各供試溶液を室温下にて 20 秒および 60 秒間振動を加え作用させた。その後、LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit を用いて染色後、蛍光顕微鏡観察による生死判定を行った。また、Mitis Salivarius 寒天培地に各供試溶液を作用させた後の懸濁液を播種し、37 度 48 時間培養後に、コロニ - 数を計測 (CFU/ml) した。

(2) 細胞毒性についての検証

材料

i) 供試溶液

上記と同様の供試溶液を選択した。

ii) 供試細胞

10% ウシ胎児血清及び抗生剤含有 DMEM にて、37°C、5% CO_2 及び 95% Air 条件下にて 3 日間 KB 細胞を培養し、コンフルエントになった時点で、実験に用いた (1.2×10^6 cells/ml)。

細胞に及ぼす影響についての検証

各供試溶液を 20 秒間作用させ、新たな培地と交換した。作用直後、3、5 及び 7 日後の KB 細胞に、MTT 試験 (MTT Cell Growth Assay Kit, Millipore Corporation) 及び蛍光顕微鏡観察による生死判定により検証した。

さらに E-cadherin の抗体を用いて免疫組織化学染色方法により、各供試用溶液の KB 細胞の細胞間接着分子に及ぼす影響を比較検証した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

殺菌作用の検証

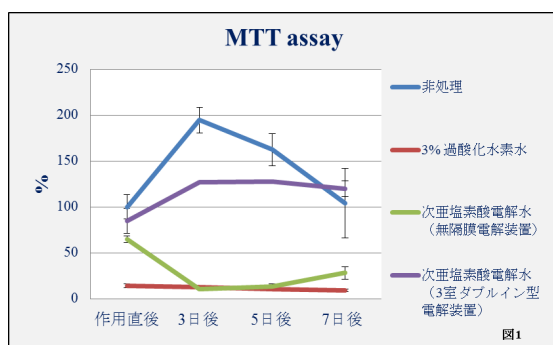
2 種類の次亜塩素酸電解水は、う蝕原性細菌 3 菌種を、ほぼ全て死滅した。一方、3% H_2O_2 は、生死判定試験の結果、作用時間の増長に伴い、死菌数が増加した。コロニ - 数を

計測した結果では、全群において検出限界以下であった。

以上の結果より、ROS を殺菌主成分とする各供試溶液は、う蝕原性細菌 3 菌種に対して殺菌効果を示した。また 2 種類の次亜塩素酸電解水は、非常に短時間で殺菌効果を発揮することがわかった。

細胞毒性についての検証

MTT assay の結果、無隔膜電解装置で生成した次亜塩素酸電解水は、非処理群 (NT) と比較し、作用直後は 65% の吸光度を示したが、それ以降は減少傾向を示した。3 室ダブルイン型電解装置によって生成された次亜塩素酸電解水は、作用直後の吸光度は NT と比較しわずかに減少し、3 日目以降は上昇を示した。3% H_2O_2 は、作用直後から 7 日目の全日程において NT の 15% 以下であった (図 1)。蛍光顕微鏡観察による生死判定の結果、無隔膜電解装置で生成した次亜塩素酸電解水の作用直後は、30% 程度の死細胞が観察されたが、それ以降は死細胞の割合は増加し、細胞数も減少していた。3 室ダブルイン型電解装置によって生成された次亜塩素酸電解水の結果は、NT 群と比較し、わずかに死細胞は増加したが、80% 以上の生細胞が認められた。3% H_2O_2 は、作用直後で 50% 以上の死細胞が認められ、3 日目以降では全細胞が死滅していた。細胞形態は、3 日目以降は扁平形態が失われ、また、接着能の低下により培養プレート基底面から剥離し、細胞数が減少していた。



さらに 2 種類の次亜塩素酸電解水および 3% H_2O_2 とでは蛍光顕微鏡観察像が大きく異なったため、細胞間接着分子の 1 つである E-cadherin 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。その結果、3 室ダブルイン型電解装置で生成した群では発現が最も多く見られ、3% H_2O_2 群では僅かであった。3% H_2O_2 が KB 細胞の接着分子に作用し、細胞接着不全に起因する細胞死が誘因された可能性が示唆された。

これらの結果から、3 室ダブルイン型電解

装置で生成した次亜塩素酸電解水の KB 細胞に及ぼす影響は、臨床で用いる 3% H_2O_2 と比較して小さいことがわかった。また次亜塩素酸電解水は、有効塩素濃度が一致していたとしても、生成過程が異なった場合、細胞に及ぼす影響に差が認められた。有効塩素濃度以外の様々な因子 (pH、有効塩素の成分比率、不純物の割合あるいは有効塩素の安定性など) も含めて、次亜塩素酸電解水の安全性を検証していくことが重要であると思われる。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクトおよび今後の展望

近年、接着分子 (細胞間接着分子および細胞外基質間接着分子) は、接着という物理的な機能だけでなく、組織の発生・再生に対して重要な役割を担っていることが多くの論文で報告されている。最近では E-cadherin を介した細胞間接着が iPS 細胞樹立に重要であることを示した論文も発表された (Chen T et al, 2010, Stem Cells)。したがって本研究において、3 室ダブルイン型電解装置で生成した次亜塩素酸電解水の細胞間接着分子 E-cadherin に及ぼす影響が臨床で用いる 3% H_2O_2 と比較して小さかったことは、次亜塩素酸電解水の口腔領域における再生医療の新たな感染制御方法としての可能性に期待がもてる結果となった。一方、3% H_2O_2 が E-cadherin に強く影響を及ぼした点については、 H_2O_2 が生体分子への直接的な傷害だけでなく、細胞間接着に関わる様々な転写因子 (Snail, SIP1, Twist, E2A (E47/E12) など) を介して、細胞接着不全を誘因することが報告されており (Barnett P et al, 2011, Biochem Biophys Res Commun)、本研究の結果を裏付けていると考える。

今後は、各供試溶液の KB 細胞および口腔組織由来の様々な細胞 (ヒト由来口腔粘膜上皮細胞、歯周靭帯線維芽細胞など) の接着分子 (CD44, CD166 および E-カドヘリンなど) に対する酸化ストレスの影響に関し、分子生物学的に検証する予定である。これらの検証により、口腔領域の再生医療において新しい感染制御方法として次亜塩素酸電解水を応用するための必要な基礎データを得るばかりではなく、酸化ストレスに関する重要な情報も得ることができると考える。

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 2 件)

Terai T, Okumura T, Imai S, Nakao M, Yamaji K, Ito M, Nagata T, Kaneko K, Miyazaki K,

Okada A, Nomura Y and Hanada N. Screening of probiotic candidates in human oral bacteria for the prevention of dental disease. PLoS One. 2015; 10: e0128657. 査読有り. DOI: 10.1371/journal.pone.0128657

Sogabe-Ashigaki K, Imai S, Okada A, Matin K, Terai T, Okumura T, Hanada N, Kawahara H. Effects of *Lactobacillus crispatus* as a candidate for oral probiotic bacteria on *Haemophilus influenzae*. Asian Pac J Dent 2015; 15: 3-11. 査読有り.

〔学会発表〕(計 12 件)

岡田彩子, 村田貴俊, Khairul Matin, 宮之原真由, 芦垣 薫, 大塚良子ら. 新規 3DS トレ - を用いた次亜塩素酸電解水の臨床的評価, 第 16 回口腔機能水学会学術大会, 2015 年 3 月 28-29 日, 鶴見大学 (神奈川県横浜市).

Okada A, Matin K, Imai S, Kikuchi T and Hanada N. Cytotoxicity of Reactive Oxygen Species Based Disinfectants on Epithelial Cell, 93rd General Session & Exhibition of the IADR, March 11-14, 2015, Boston (USA).

Matin K, Okada A, Nebuka K, Imai S, Hanada N and Tagami J. Antibacterial Effects of a Flavored Superoxidized Water on Oral Pathogens, 93rd General Session & Exhibition of the IADR, March 11-14, 2015, Boston (USA).

Ashigaki K, Imai S, Akimaru G, Okada A, Okumura T, Terai T, et al. Probiotic Effects of *Lactobacillus crispatus* YIT 12319 on *Haemophilus influenzae* Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. the 62nd Annual meeting of JADR, December 4-5, 2014, Osaka (Japan).

菊地朋宏, 今井奨, 岡田彩子, 奥村剛一, 花田信弘. ミュータンスレンサ球菌および *Lactobacillus gasseri* の相互作用について, 第 63 回日本口腔衛生学会・総会, 2014 年 5 月 29 日-31 日, 熊本市市民会館 崇城大学ホール (熊本県熊本市).

角田衣理加, 山田秀則, 岡田彩子, 宮之原真由, 阿保備子ら. 全身的な健康を歯科から考える "予防医科" としての概念を歯科へ 『3DS 除菌外来』の試み (第一報), 第 63 回日本口腔衛生学会・総会, 2014 年 5 月 29 日-31 日, 熊本市市民会館 崇城大学ホール (熊本県熊本市)

岡田彩子, マティン カイルール, 根深研一, 今井奨, 花田信弘, 田上順次. 2 種次亜塩素酸電解水の細胞毒性に関する検討, 第 139 回日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会, 2013 年 10 月 17 日-18 日, 秋田県総合生活文

化会館 (秋田県秋田市).

岡田彩子, 今井奨, 菊地朋宏, 花田信弘. 活性酸素種の KB 細胞に対する細胞毒性の検討, 第 62 回日本口腔衛生学会・総会, 2013 年 5 月 15 日-17 日, キッセイ文化ホール (長野県松本市).

村田貴俊, 武内博朗, 阿保備子, 宮之原真由, 岡田彩子, 角田衣理加ら. 専門的口腔ケア普及のための 3DSe-ラーニングシステム開発の試み, 第 61 回日本口腔衛生学会・総会, 2012 年 5 月 25 日-27 日, 神奈川歯科大学 (神奈川県横須賀市).

山田秀則, 野村義明, 角田衣理加, 村田貴俊, 阿保備子, 岡田彩子ら. 唾液検査値と医療費の関連についての予備的検討, 第 61 回日本口腔衛生学会・総会, 2012 年 5 月 25 日-27 日, 神奈川歯科大学 (神奈川県横須賀市).

野村義明, 石川美佐緒, 新井千博, 八城祐一, 野田晃司, 山口貴央, 岡田彩子ら. iPS 細胞の安全性に関する検討 (第 2 報) 核型異常について, 第 61 回日本口腔衛生学会・総会, 2012 年 5 月 25 日-27 日, 神奈川歯科大学 (神奈川県横須賀市).

福田雄, 西川智子, 岡田彩子, 村田貴俊, 阿保備子, 角田衣理加ら. *Streptococcus anginosus* 用選択培地の開発, 第 61 回日本口腔衛生学会・総会, 2012 年 5 月 25 日-27 日, 神奈川歯科大学 (神奈川県横須賀市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 彩子 (OKADA, Ayako)

鶴見大学・歯学部・寄附講座助教

研究者番号: 60515584