

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890065

研究課題名(和文)新規の機能水が細菌バイオフィーム及び宿主の免疫系に及ぼす効果の検討

研究課題名(英文) Studies of the effects of the new functional water on bacterial biofilm and host immune system.

研究代表者

早雲 彩絵 (Hayakumo, Sae)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60634128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は歯周病原細菌により引き起こされる慢性炎症性疾患であり、我々はオゾンの強力な殺菌能とナノバブルの長期保存性を併せ持つオゾンナノバブル水(NBW3)を歯周治療に応用することを目的に研究を行っている。

本研究においては、NBW3が歯科用合金材料に及ぼす影響、及び各種耐性菌に対する殺菌効果、の2点について検討を行った。その結果、NBW3は歯科用合金材料に大きな影響を及ぼさないこと、実験に供した薬剤耐性菌全てに対し殺菌能を有することが示され、口腔ケアや器具の消毒等にNBW3を用いることにより、易感染性患者や高齢者に対する歯科治療を安全に行うことができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused by microorganisms existing in a subgingival biofilm. Ozone nano-bubble water (NBW3) seems to be suitable as an adjunct to periodontal treatment owing to its potent antimicrobial effects, high level of safety, and long storage stability. In this study, we examined the effects of NBW3 on dental alloys and drug-resistant bacteria. The results of this study suggest that NBW3 has negligible effects on dental alloys, and possesses potent bactericidal activity against drug-resistant bacteria. The use of NBW3 as an adjunctive antiseptic in dental treatment especially for compromised patients and elderly persons would be a promising strategy for prevention of hospital infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周治療学

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は口腔内のバイオフィームに存在する歯周病原細菌によって引き起こされる慢性炎症性疾患である。55～64歳での有病者率が82.5%となるなど、歯周病は中・高齢者において特に罹患率の高い疾患であり、40歳以降に歯を失っていく主な原因となっている(平成5年歯科疾患実態調査)。近年、歯周病と全身疾患(循環器疾患・糖尿病・誤嚥性肺炎など)との関わりについても盛んに報告されるようになり、歯周病を予防・治療し、口腔の健康を維持することの重要性が認識され始めている。

歯周治療の目的は歯周病原細菌を含む細菌バイオフィームを除去することであり、口腔清掃指導や歯肉縁上・縁下のスクレーピング・ルートプレーニングからなる歯周基本治療が行われる。しかし、機械的デブリドメントのみで歯周病原細菌を完全に除去することは困難であることが知られている(Periodontol 2000 2002)。このため、歯周治療の補助的療法として消毒剤を局所応用する方法が考案され、その有効性が報告されてきた(Periodontol 2000 1996)。現在、歯周治療の補助的療法として世界で最も広く用いられている消毒剤はクロルヘキシジンであり、0.1～0.2%の濃度で強力なプラーク抑制作用があることが確認されている。しかし日本では、アナフィラキシーなどの過敏反応が報告されているため、当該消毒剤の口腔内での使用は0.05%未満の濃度に限定されている。また、クロルヘキシジンには歯牙の着色、味覚障害、口腔粘膜のびらん等の局所的副作用があるため、広く長期的に使用することができない。このため、より強力な抗菌能と高い安全性を併せ持ち、歯周治療の補助的療法としてより有益な消毒剤が必要とされている。

一方、近年、食品加工や歯科治療の領域においてオゾン水が注目され始めている。オゾンは強力な酸化剤であり、様々な細菌に対して抗菌活性を有し、また抗生剤とは違い耐性菌を生じさせないという特徴がある。さらに、真菌、原虫、ウイルスに対しての効果も報告されている。歯周治療にオゾン水を応用した場合、歯肉炎・歯周炎の臨床症状の改善に効果的であることが近年報告された(Indian J Dent Res 2010)。しかし、オゾン水中のオゾンは不安定なため、数十分で水に戻ってしまう。したがって、製造後速やかに使用することが必要であり、現場においてパブリック用の装置やオゾン発生装置などの設備が必要となる。

我々は、オゾン水の強力な殺菌能はそのままに、オゾン水の欠点を克服し長期にわたる保存性を実現させたオゾンナノバブル水(NBW3)を歯周治療に応用することを目的に研究を行っている。ナノバブル水とは、気体(ガス)を直径50nm以下のガス核(ナノバブル)として封入し、salting-out現象によ

り安定化させた機能水であり、2010年、独立行政法人産業技術総合研究所環境管理研究部門と株式会社REO研究所との共同で、世界で初めてナノバブル水の製造と安定化技術の確立に成功した(機能水の製造方法:特許公開2010-167365)。オゾンガスをナノバブルとして含有するNBW3は、通常数時間で散逸してしまう水中のオゾンを6カ月以上にわたって保持することができ、オゾン自体の持つ強力な殺菌能とナノバブルの長期安定性から、通常のオゾン水では難しい「薬液」としての利用が可能である。NBW3は容器に入れた状態で持ち運びや保存が可能であり、誰でも手軽に利用できるという利点がある。また、NBW3は強力な殺菌能を呈し、さらに抗炎症作用をも有している可能性が示唆されており、細菌感染症かつ炎症性疾患である歯周治療の補助的療法としての将来性は極めて大きいと期待される。

我々は、これまでにNBW3が代表的な歯周病原細菌である*P. gingivalis*や*A. actinomycetemcomitans*に対して強力な抗菌活性を有すること、ヒト口腔組織に対して高い安全性を有することを*in vitro*において確認している。また、NBW3を歯周病患者に対する超音波スクレーピング時のイリゲーション液として使用した場合の臨床的・細菌学的効果について臨床試験を実施し、その有用性を報告した(Hayakumo et al. Clin Oral Investig 2012)。NBW3の医療分野における応用に関しては、この我々の報告が世界初、かつ唯一の報告である。これまでの研究をさらに発展させ、NBW3の歯周治療への応用に関するエビデンスを積み重ねていくことで、今や国民病とも言われる歯周病の新たな治療法を確立し、社会的利益につなげたいと考えている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌バイオフィームに起因する慢性炎症性疾患であるという歯周病の性格を踏まえ、NBW3が細菌バイオフィームに及ぼす影響を検討することと、NBW3が宿主の免疫系に与える影響を検討することである。

上記の通り、我々はこれまでにNBW3が代表的な歯周病原細菌である*P. gingivalis*や*A. actinomycetemcomitans*に対して強力な殺菌能を有することを*in vitro*において確認済である。当該研究は浮遊細菌に対する効果の検討であったが、実際の口腔内では歯周病原細菌は歯肉縁下バイオフィームを形成しているため、本研究では、NBW3が細菌バイオフィームに及ぼす影響について検討する。具体的には、NBW3の(1)歯肉縁下バイオフィーム中の歯周病原細菌に対する殺菌能、(2)バイオフィーム形成に与える影響、の2点について検討を行う。さらに近年、オゾンの創傷治癒促進効果や、消化管に対しNBW3を使用した際の粘膜の局所免疫の増強が報告さ

れたことを踏まえ、NBW3 の(3)創傷治癒に及ぼす影響、(4)口腔粘膜に作用させた場合の局所への免疫担当細胞の誘導現象、の2点についても組織学的に解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) NBW3 が歯科用合金材料に及ぼす影響を評価することを目的とし、浸漬実験を行った。歯科で多用される歯科用合金材料として、金合金、金銀パラジウム合金、Ag-Sn-Zn系合金、Ag-In-Zn系合金を各1種類ずつ使用した。20×10×1mmのアクリル板の一端に直径約3mmの孔をあけ、これをパターンとしてクリストパライト埋没材で埋没し、遠心鑄造法により各合金試料の鑄造を行った。鑄造した各合金の表面を#800耐水ペーパーで研磨した後、超音波で洗浄し、試料として用いた。100mLのガラス瓶に50mLの試験溶液(NBW3、0.9% NaCl)を入れ、これに合金試料をガラス棒で懸垂して全浸漬し、3日間37℃で保存した。浸漬前後の合金表面の色差と重量変化率について算出し、歯科用合金材料をNBW3に浸漬したときの変色と重量変化について検討した。

(2) NBW3 の各種耐性菌に対する殺菌効果について検討することを目的とし、実験を行った。代表的な薬剤耐性菌としてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌、バンコマイシン耐性腸球菌、多剤耐性緑膿菌を実験に使用した。これらの耐性菌にNBW3を作用させ、Time-kill studyにてNBW3の各種耐性菌に対する殺菌効果を検討した。

### 4. 研究成果

(1) NBW3 が口腔内の歯科用合金材料に及ぼす影響を評価することを目的とし、浸漬実験を行った結果、NBW3は口腔内の歯科用合金材料に大きな影響を及ぼさないことが示された(図1、2)。我々はこれまでに、NBW3がヒト口腔組織に対して高い安全性を有することを*in vitro*において確認しており、今回の結果と併せると、NBW3の口腔内への使用は安全面から問題ないと考えられる。今後、NBW3がチタンなどの他の金属やレジンなどに及ぼす影響についても検討を行う予定である。また、NBW3に歯科用合金を浸漬した場合の溶出金属の解明や金属表面の性状変化など、より詳細な検討も行う予定である。

(2) 代表的な薬剤耐性菌にNBW3を作用させ、Time-kill studyにてNBW3の各種耐性菌に対する殺菌効果を検討した結果、今回検討したすべての細菌種について、所定のインキュベーション時間で出現コロニー数は検出限界以下となり、NBW3は各種多剤耐性菌に対し殺菌能を有することが示された(図3-5)。近年、抗菌薬の乱用により耐性菌の出現頻度が高まり、それらによる院内感染が問題となっ

ている。超高齢社会を迎え、全身疾患罹患患者などの易感染性患者に対する歯科治療の機会が増加しており、歯科診療所はもちろんのこと、訪問歯科診療においても耐性菌に対する対策は今後より一層重要になると予想される。今回の結果より、歯科診療所や訪問歯科診療の場において、院内感染対策の一環としてNBW3を用いた口腔ケアやユニット水管路内の殺菌、器具や手指の消毒を行うことにより、易感染性患者や要介護高齢者に対する歯科治療を安全に行うことができ、また誤嚥性肺炎の予防にも効果的である可能性が示唆された。

図1：浸漬前後の合金表面の色差

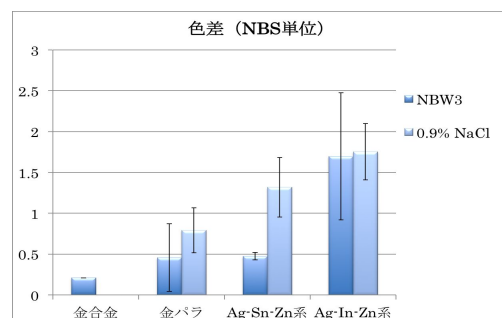


図2：浸漬前後の合金の重量変化率

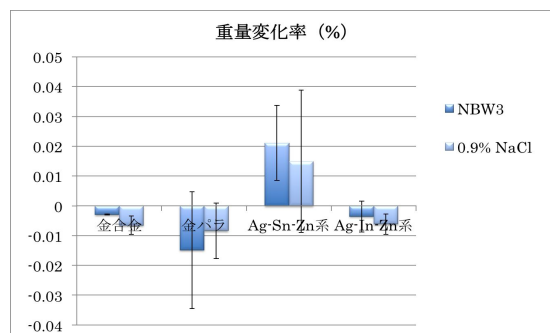


図3：多剤耐性黄色ブドウ球菌に対するNBW3の殺菌効果

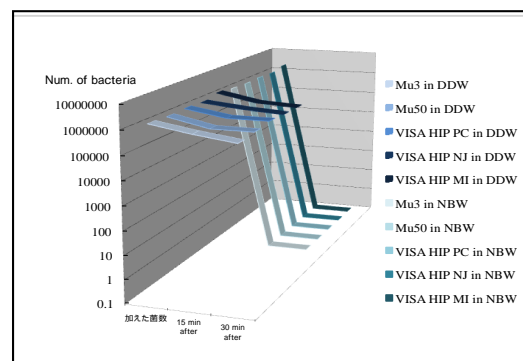


図4：バンコマイシン耐性腸球菌に対する

## NBW3 の殺菌効果

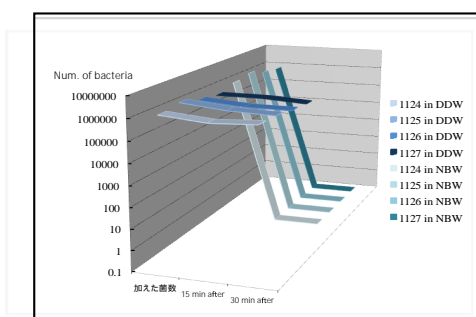
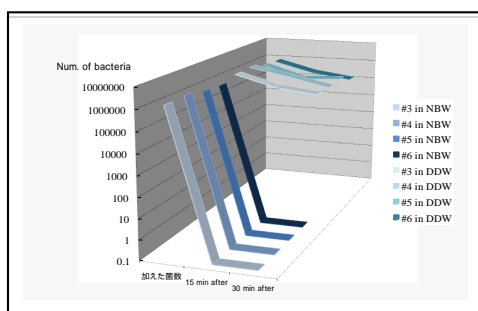


図 5: 多剤耐性緑膿菌に対する NBW3 の殺菌効果



## 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)

早雲 彩絵、オゾンナノバブル水の各種耐性菌に対する殺菌効果の検討、第 15 回日本口腔機能水学会学術大会・総会、2014 年 3 月 29 日～3 月 30 日、東京・日本歯科大学生命歯学部 100 周年記念館

早雲 彩絵、歯科用金属材料をオゾンナノバブル水に浸漬したときの变色と重量変化、第 14 回日本口腔機能水学会学術大会、2013 年 3 月 23 日～3 月 24 日、北海道・北海道歯科医師会館

〔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

早雲 彩絵 (HAYAKUMO, Sae)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60634128

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：