

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861820

研究課題名(和文)新しいラジカル殺菌技術の生体安全性評価ー発癌リスク評価を中心にー

研究課題名(英文) In vivo safety evaluation of novel radical disinfection technique focusing on risk evaluation of carcinogenesis-

研究代表者

林 栄成 (Hayashi, Eisei)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：60375102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化水素光分解殺菌法では、水酸化ラジカルの発癌リスク、薬液として使用予定の市販オキシドールに添加されている安定化剤の変性による変異原性や発癌性誘発のリスクが懸念されていた。そこで本殺菌法の生体局所為害性とオキシドール添加剤を中心に検討を行い、局所粘膜組織に対して為害性を示さないこと、市販オキシドールはレーザー光照射で安定化剤が変性し変異原性等の毒性が懸念されること、安定化剤無添加の過酸化水素水でも安定性が担保できること、が明らかになった。歯周病治療のような短時間処理では変異原性の懸念は払拭されたことから、発癌に関わる試験を実施せずに本技術の安全性を検証することができたと判断している。

研究成果の概要(英文)：In the disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide, stabilizers added in commercially available oxydol products, which had been expected to be used in the final disinfection device as a source of hydrogen peroxide, could be denatured. In addition to hydroxyl radical, such denatured components could be a risk factor of carcinogenesis. In the present study examining in vivo local toxicity and the effect of laser light irradiation on the stabilizers, the following results were obtained. That is, 1) the disinfection treatment did not show any in vivo toxicity in local mucosal tissues, 2) laser light irradiation of oxydol products made stabilizers denatured, and 3) 3% hydrogen peroxide solution without stabilizers was proven to be stable. These results suggest that short-term treatment of periodontitis using the disinfection technique would be free from a risk of carcinogenesis when stabilizer-free hydrogen peroxide solution is used.

研究分野：歯科補綴

キーワード：ラジカル 過酸化水素 殺菌 オキシドール

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の研究グループは、東京工業大学の河野雅弘教授との共同研究により、3%以下の低濃度過酸化水素に405nmの可視光を照射することで、ヒドロキシルラジカルを効率的に生成する方法を見出し、口腔内感染症に応用する新たなラジカル殺菌技術として世界で初めて考案した。(特許出願済：特願2010-222631 歯石除去・消毒装置およびこれに用いるライトガイド)(図1)

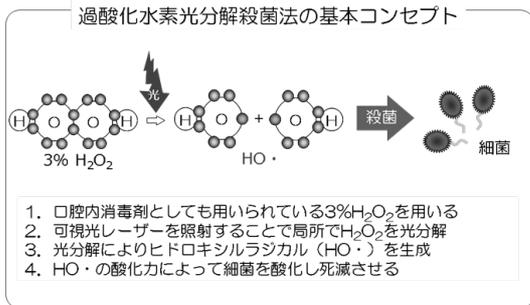


図1 新たなラジカル殺菌技術の原理

(2) 低濃度の過酸化水素に405nmのレーザーを照射することで人為的に発生させたヒドロキシルラジカルがもつ強力な酸化力を、口腔内の様々な感染症の治療に応用するために、照射出力や照射時間等の種々の条件設定の探索や、デバイス及びシステム開発の研究を行っている。これらの研究は、平成24-26年度、科学研究費補助金、基盤研究(B)「ヒドロキシルラジカルの低濃度・局所適用による新規ラジカル殺菌技術の歯科臨床応用」(研究代表者：佐々木啓一)、研究経費：13,100千円として採択されており、申請者も分担者として研究開発を行っている。現在までに試作した治療器(以下：試作治療器)の概要を図2に示す。歯周治療に使用する超音波スケーラーに、ポケット内の局所でラジカル殺菌システムを発現させる新しい機構を付加した試作段階まで開発が完了している。

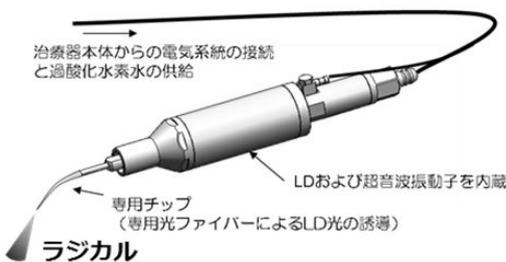


図2 試作治療器

(3) この試作治療器の殺菌効果を検証し、わずか数分間の治療で *S. mutans* の実験的バイオフィルムに対して強力な殺菌力を有していることを証明した。また、試作治療器を用いた動物実験においても十分な殺菌効果を確認している。(Yamada et al, Hayashi et

al, 2012)このようなオリジナルの殺菌原理に基づいた殺菌システムの研究開発を行っているのは、東北大学の研究グループ以外は見当たらず、世界的に見ても最先端の研究であると考えられる。

2. 研究の目的

現在開発中のラジカルを応用した殺菌システムが臨床応用されるためには、長期に使用した場合の生体安全性が担保されることは非常に重要である。我々の殺菌システムでは3%以下の低濃度過酸化水素を利用するが、過酸化水素は既に口腔内の消毒に広く利用されており、アメリカ食品医薬品局(FDA,2003年)においても、過酸化水素の口腔ケアでの使用は低リスクと評価されている。一方で、ヒドロキシルラジカルの *in vitro* 研究の多くは、ある種の活性酸素(ROS)が化学物質誘発性の変異原性や、DNA塩基修飾に間接的に関与していると示唆していることから、ヒドロキシルラジカルが間接的に発がんに関与している可能性がある。加えて、特に重金属への慢性暴露により誘発されるがんに対しては、ヒドロキシルラジカルが一定の役割を演じているとされている。ヒドロキシルラジカルの生体への影響を直接的に調べることが困難な理由として、半減期がナノ秒オーダーと非常に短いため、ヒドロキシルラジカルを定量的に発生させる原理を持ったデバイスの開発が必要なこと、体内のラジカル量を正確に計測するには非常に高度な技術が必要ことが挙げられる。我々はこれまでの研究で、ヒドロキシルラジカルを高効率に発生させる装置開発に成功し、ラジカル計測技術を高いレベルで発展させてきた。そこで、本研究では現在開発中の試作治療器を用いて、ヒドロキシルラジカルが生体に直接的に及ぼす影響を、発がん性という観点から調べ、東北大学オリジナルのラジカル殺菌技術の生体安全性を評価することを目的とし、発癌メカニズムにおけるヒドロキシルラジカルの関与をイニシエーター、プロモーターといった側面から検証する。

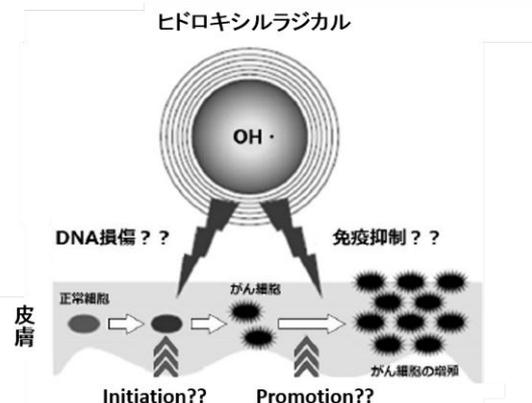


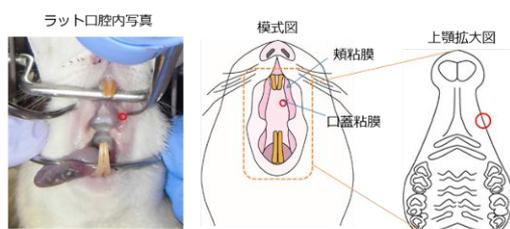
図3 本研究の目的

3. 研究の方法

(1) 過酸化水素光分解殺菌法のラット口腔粘膜組織に対する影響

これまで過酸化水素を波長 405 nm の可視光で光分解することにより水酸化ラジカルを効果的に発生させて殺菌を行う技術の研究開発を行い、高い殺菌効果が得られることを確認してきた。しかしながら、過酸化水素や水酸化ラジカルは、高い酸化力のため生体組織に対しても毒性を示すことが懸念される。本殺菌法の安全性研究としては、ラット口腔内投与での局所粘膜組織に対する影響およびラット皮膚全層欠損創モデルでの治療過程に対する影響を検討し、急性の局所に対する毒性は極めて低いことを報告している(Yamada et al. J. Toxicol Sci. 37:329-335, 2012)。本試験では、用量試験に準ずる形でレーザー光の出力を変えた(水酸化ラジカルの生成量を変えた)条件下で、ラットの口腔粘膜に対する影響を組織学的に調べ、本殺菌法の安全性に関するさらなる知見を得ることを目的とした。

実験には Wistar 系雄性ラット 9 週齢を供試した。ペントバルビタール(20~40 mg/kg, ip)およびイソフルラン(吸入)麻酔下でラットを固定台に仰向けに固定した。1 M 過酸化水素(流速 10 ml/min)と各種出力 405 nm レーザを3分間口腔の上顎側から右頬側にかけて処理した(図4)。比較対照群には、過酸化水素の代わりに生理食塩水を用いて同様に処理した。処理に際しては、口腔内から食道および気管内に過剰な生理食塩水あるいは過酸化水素水が流入しないように歯科用バキュームを用いて適宜吸引操作を行った。前述の方法で1回処理後、および1日1回3日間処理後に動物を頸椎脱臼により犠牲死させ、口腔局所組織を摘出し、10%ホルマリン中で固定した。常法に従いパラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施した後、鏡検を行った。レーザー出力は、40 mW を上限として公比 1/2 で4段階の出力で試験を実施した(40, 20, 10 および 5 mW)。



図中の赤丸で示した部位に対して3分間レーザー照射を行った。
図4 レーザ照射部位：上顎左側口蓋粘膜部

(2) 局所制御型ラジカル殺菌治療器(歯周病治療器)のハムスターにおける口腔粘膜刺激性試験

局所制御型ラジカル殺菌治療器(歯周病治療器)の生物学的安全性評価の情報を得るた

めに、シリアンハムスターにおける口腔粘膜刺激性試験を実施した。

適用方法

本被験物質は歯周病治療器であり、臨床において口腔内で使用することから、適用部位を頬袋粘膜とした。

適用時間および適用回数の設定理由

被験物質の臨床使用方法は、チップ先端より 405 nm のレーザー光(最高出力: 80 mW)を照射し、専用過酸化水素水を流速 10~30 ml/min で最大 7 分間、病巣へ向けて放出した。よって、1 回の適用時間は臨床での最大治療時間であると想定している 7 分間とした。また、適用回数は臨床における 1 日の治療回数は 1 回を想定していることから、より過酷な 3 回繰り返す適用を設定した。なお、適用の間隔は ISO 10993-10, Annex B.3 を参考に 1 時間以上とした。

適用量の設定理由

臨床使用条件を参考に、機器(被験物質)の設定可能な最大流速である 26.5~33.0 を設定した。

適用方法

混合麻酔薬(液量としてドミトールを 0.4 ml, ドルミカム注射液 10 mg を 0.4 ml, ベトルファールを 1.0 ml の割合で混合した液)を動物へ腹腔内注射(2.0 ml/kg)し、全身麻酔を施した。なお、覚醒がみられた場合には適量の麻酔薬を追加した。次いで、綿棒等を使って注意深く動物の頬袋を引き出し、片手で引き出した頬袋を軽くつまみ、生理食塩液を用いて頬袋粘膜の洗浄とともに、綿棒を用いて頬袋粘膜に付着した飼料等の異物を取り除いて、清潔にした。次に、頬袋粘膜に異常がないことを確認した後動物を仰向けに保定し、綿棒等で片側の頬袋を引き出した。先端を保護した鉗子で頬袋を広げるように摘み、先端チップから 1 cm 以内の距離に頬袋の中心が来るように固定した。両側の頬袋の適用操作終了後、動物をケージに戻した。この手順で順次、各動物に適用し、3 回繰り返した。

検査・観察

全例の両側の頬袋について、各群の各回の適用終了時および最終適用後 24±2 時間(解剖日)に頬袋粘膜の状態を観察し、評価点を記録した。なお、肉眼的観察の評価法は ISO 10993-10, Annex B.3 「Table B.2 Grading system for oral and penile reactions」に記載されている観察基準および評価点に従って、紅斑および痂皮形成の程度に評価点を付けた。また、その他に見られた所見についても記録する。得られた観察結果をもとに、各試験群あるいは対照群ごとに、評価点を合計し、観察部位数で除して平均値(小数第一位四捨五入)を求め、総合評価の参考資料とした。

病理学的検査

全例について、最終適用後 24 時間(第 2 日)の肉眼的観察および写真撮影終了後、バ

ルピタール系麻酔下で腋窩動脈を切断して放血屠殺する。頬袋を周囲皮膚組織とともに採取し 10%中性緩衝ホルマリン液で固定する。なお、組織採取に当たり、粘膜以外の周囲組織の異常の有無を確認し、異常が認められた場合は記録し、組織学的検査を実施した。固定後、適用部位頬袋の粘膜が確実に組織標本上で観察できるように、採取した皮膚とともに広範囲に切り出した後、定法に従ってヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本作製した。

組織学的検査

光学顕微鏡を用いて組織学的検査を実施する。なお、組織学的観察基準の評価法は次頁に示した ISO 10993-10, Annex B.3 「Table B.3 Grading system for microscopic examination for oral, penile, rectal and vaginal tissue reaction」に記載されている光学顕微鏡による観察基準に従って、粘膜上皮、白血球浸潤 (40 倍の対物レンズを用いて 10 視野平均値を算出)、充血および浮腫の程度について評価点を付ける。また、その他に見られた所見も記録した。

(3) 市販オキシドールの光分解殺菌効果の検討

これまでの実験では 30%過酸化水素原液を希釈して評価を行ってきたが、実際に臨床で使用する場合、すでに安全性が担保された市販オキシドールを用いるのがより簡便であり、品質的にも安定していると考えられる。そこで本研究では、市販オキシドールを光分解することにより生成する水酸化ラジカル (HO·) 量の計測と殺菌実験を行い、過酸化水素原液を希釈した場合 (Reference control (RC)) と比較検討した。

具体的には 11 種類の市販オキシドールと RC を用いて以下の項目について実験を行った。過酸化水素光分解殺菌法による HO· 生成量は、電子スピン共鳴法により測定した。過酸化水素濃度は、ヨウ化物の酸化反応を利用した分光学的分析により行った。オキシドール単独および光分解殺菌法での殺菌効果を *Staphylococcus aureus* 及び *Streptococcus mutans* を供試菌として調べた。殺菌効果の最も高かったオキシドールについて、その原因解明のため pH および配合成分が殺菌効果に及ぼす影響を調べた。

(4) オキシドールに添加されている安定化剤に対するレーザ照射の影響

PMDA での事前相談で水酸化ラジカルそのものは、その寿命の短さおよび処理時間の短さから発がんも含めた変異原性は問題ないが、市販のオキシドールには安定化剤が含まれており、それら安定化剤がレーザ照射により変性した場合、変性化合物による変異原性が懸念される、というコメントを頂いた。そこで市販オキシドールに添加されている安定化剤であるフェナ

セチンおよびアセトアニリドの含有量がレーザ照射で変化するかどうかを HPLC により分析した。

(5) 安定化剤なしの 3%過酸化水素水の安定性

(4) でフェナセチンおよびアセトアニリドの濃度が変化し、酸化劣化産物と考えられるピークの出現が認められたこと、並びに安定化剤は鉄などの金属をトラップすることで過酸化水素の分解を抑制しているが 3%過酸化水素水を調製する水は純水であり金属の混入は考えられないことから、安定化剤なしの 3%過酸化水素水の安定性を加速試験により検討した。

4. 研究成果

(1) 過酸化水素光分解殺菌法のラット口腔粘膜組織に対する影響

本試験における代表的な組織像を図 4 に示す。

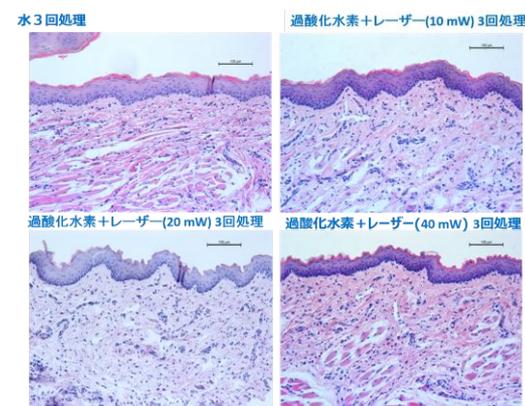


図 5 3 回処理後のラット口腔粘膜組織像 (HE 染色)

ラットを用いた局所安全性試験では、過酸化水素 + レーザ 1 回処理および 3 回処理条件下、最高出力の 40 mW でレーザを照射した場合においても口腔粘膜組織に壊死などの組織障害、炎症性細胞浸潤などの異常所見は認められなかった。

(2) 過酸化水素光分解殺菌系のヒドロキシルラジカル生成に対するカタラーゼ陽性菌の影響

レーザ光最高出力 (80 mW) での過酸化水素光分解殺菌法に暴露された頬袋の代表的な写真および病理組織像 (図 5) を示すが、どちらにも異常所見は認められない。

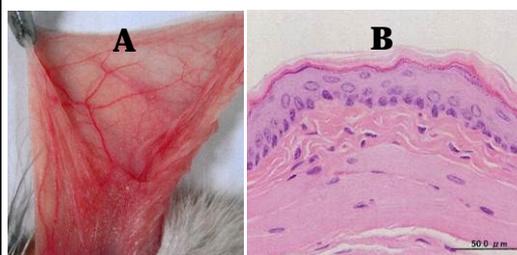


図 6 レーザ出力 80 mW での過酸化水素光分解殺菌法に暴露されたハムスター

A: 頬袋写真 B: 頬袋組織像

表 1 に示す評価点基準に従い評価した肉眼的観察において、各試験群および対照群のいずれも平均評価点は「0」であった。また、表 2 に示す評価基準に基づいて評価した病理組織学検査においても各試験群および対照群のいずれも平均評価点は「0」であった。

表1 粘膜刺激性評価基準

(紅斑および痲皮形成)	評価点
紅斑なし	0
極めて弱い紅斑(やっと認められる程度)	1
明瞭に識別できる紅斑	2
中等度の紅斑	3
重度の紅斑(ビート赤色)から痲皮形成により紅斑格付不可能のレベルまで	4

表2 病理組織評価基準

観察項目	反応	評価点
1) 粘膜上皮	正常、無傷	0
	細胞変性	1
	化生	2
	局所のびらん	3
	広範なびらん	4
2) 白血球浸潤(高い倍率での一視野当たりの数)	なし	0
	ごく軽度(25以下)	1
	軽度(26~50)	2
	中等度(51~100)	3
	重度(100を超える)	4
3) 血管充血	なし	0
	ごく軽度	1
	軽度	2
	中等度	3
	重度、血管破壊	4
4) 浮腫	なし	0
	ごく軽度	1
	軽度	2
	中等度	3
	重度	4

各試験群から対照群の平均評価点を差し引いて算出した刺激指数は、いずれの試験群も「0」であった。よって、病理組織学的検査結果による判定はいずれの試験群も「刺激なし」であった。

以上の結果をもとに表 3 に示す刺激性総合評価基準に従って、本試験条件下における局所制御型ラジカル殺菌機器はハムスター頬袋粘膜に対して、刺激性は認められないと評価した。

表3 刺激性総合評価基準

刺激指数*	判定
0	刺激なし
1~4	ごく軽度の刺激
5~8	軽度の刺激
9~11	中等度の刺激
12~16	重度の刺激

*:5箇所適用部位の平均値

(3)市販オキシドールの光分解殺菌効果の検討

HO・生成量は、HO・のスキャベンジャーであるエタノールを含有したいくつかの製品で RC に比べ軽度ではあるが有意に低い結果となったが、それ以外の製品は、RC と同程度であった。11 種類のオキシドールの過酸化水素濃度は 2.9~3.2 w/v% であり、日本薬局方で規定されている濃度の範囲内であった。

製品間で有意差があるものも見られたが、その濃度の違いは 0.3 % 以内であり、今回供試した製品間での過酸化水素の濃度差は過酸化水素光分解殺菌技術においては重要視すべき問題でないことが示唆された。*S. aureus* および *S. mutans* に対する殺菌効果は、どの市販オキシドールを用いても、光照射の有無に関わらず RC と同程度かそれ以上であった。特に 11 製品中 1 社のオキシドール製品(以降 I と記す)が RC と比較して有意に高い殺菌効果を示した。I の pH が最も低かったこと、および I のみ EDTA が配合されていることに着目し pH と EDTA 添加が殺菌活性に及ぼす影響を検討したが、オキシドールの抗菌活性の増強にはいずれも関与していなかったことから、I の高い殺菌効果についてはその理由を解明できなかった。

市販オキシドールにレーザ光照射することより生成する HO・量の結果を図 7 に、*S. aureus* に対するレーザ光照射市販オキシドールの殺菌効果の結果を図 8 に示す。

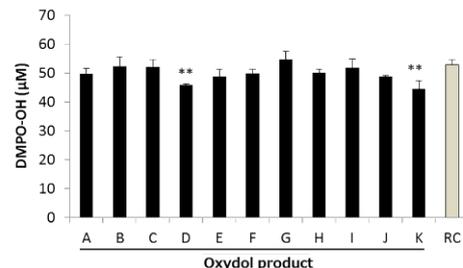


図 7 各種市販オキシドールの光照射によって生成されたヒドロキシルラジカル量 (** p<0.01, RCに対する有意差)

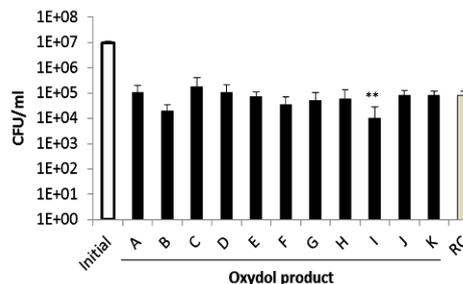


図 8 *S. aureus* に対する各種オキシドール光分解殺菌効果 (** p<0.01, RCに対する有意差)

(4)オキシドールに添加されている安定化剤に対するレーザ光照射の影響

表 4 に示すアセトアニリドあるいはフェナセチンを単体で含有するものを分析の対象とした。さらにフェナセチンの場合には濃度の影響を調べるために濃度の異なる 2 種類を用いた。

表4 供試オキシドール

Code	安定剤	アセトアニリド濃度 (ppm)	フェナセチン濃度 (ppm)
A	フェナセチン		81
F	フェナセチン		334
J	アセトアニリド	177	

A, FおよびJへレーザー光照射した時のHPLCクロマトグラムの一例をそれぞれ図9, 10および11に示す。

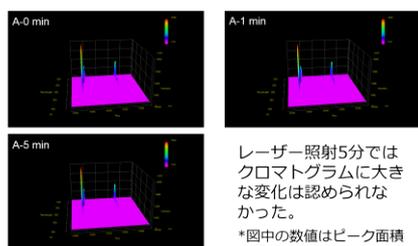


図9 A (フェナセチン 81 ppm 含有) へレーザー光照射時のHPLCクロマトグラムの変化

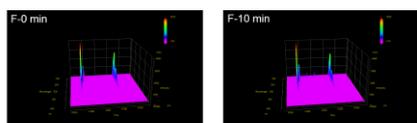


図10 F (フェナセチン 334 ppm含有) へレーザー光照射時のHPLCクロマトグラムの変化

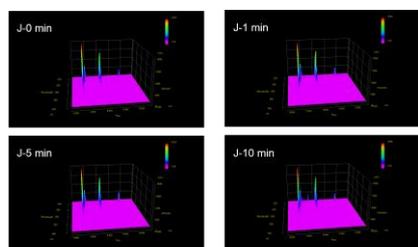


図11 J (アセトアニリド 177 ppm含有) へレーザー光照射時のHPLCクロマトグラムの変化

以上の結果は、フェナセチンおよびアセトアニリドともにレーザー光照射により変性することを示しており、市販オキシドールを薬液として光分解殺菌法に使用する場合には、変性化合物の変異原性試験などの安全性試験が必要であることが判明した。

そこで、安定化剤なしの過酸化水素水の安定性試験を行うに先立ち、希釈水の金属分析を行った結果、過酸化水素を分解する鉄、銅ともに検出限界以下であることを確認した。

(5)安定化剤なしの 3%過酸化水素水の安定性

加速試験の結果を表5に示す。6倍速の加速試験で過酸化水素濃度およびpHとも変化が認められなかったことから、安定化剤なしでも3%過酸化水素水は、遮光下室温条件で3年間は安定であることが示された。

表5 安定化剤なしの3%過酸化水素水加速試験

試料NO	初期値	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	初期値	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
	過酸化水素濃度 (w/v%)	過酸化水素濃度 (w/v%)	過酸化水素濃度 (w/v%)	過酸化水素濃度 (w/v%)	pH	pH	pH	pH
	8.7測定	9.9測定	11.8測定	12.7測定	8.7測定	9.9測定	11.8測定	12.7測定
⑦	3.01	3.03	3.02	2.96	4.12	4.08	4.14	4.10
⑧	3.06	3.03	3.03	3.02	4.13	4.04	4.16	4.15
⑨	3.04	3.03	3.04	2.99	1.12	1.07	1.18	1.16

備考：定基値は各検体 n=2 の平均より算出した。

(6)まとめ

以上のように 本過酸化水素光分解殺菌法は、局所粘膜組織に対して為害性を示さないこと、市販オキシドールを使用する場合にはレーザー光照射で変性した安定化剤が変異原性等の毒性を発揮することが懸念されること、安定化剤を添加しない過酸化水素水でも安定性が担保できること、が本研究から明らかになった。歯周病治療のような短時間処理では変異原性の懸念は払拭されたことから、発がんにかかわる試験を実施せずに本技術の安全性を検証することができたと判断している。

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)

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. 119(3):358-362, 2015 (査読有)

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.08.015

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 Sci. 18(2):83-88, 2013 (査読有)

DOI:org/10.4265/bio.18.83

〔学会発表〕(計1件)

倉内美智子、唐木俊英、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、2014年9月24-25日、東京

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 栄成 (HAYASHI, Eisei)

東北大学・大学院・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60375102