

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861807

研究課題名(和文) 歯周治療への応用に向けた、新規の機能水の特性の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the characteristics of a new functional water, ozone nano-bubble water, for application to periodontal treatment

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

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の歯周病原細菌に対する強力な殺菌能、口腔粘膜に対する高い安全性、強力なウイルス不活化能等が示され、NBW3の歯周治療の補助的療法としての有用性が示唆された。

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.

The results of this study suggest that NBW3 possesses potent bactericidal activity against representative periodontopathogenic bacteria and is not cytotoxic to cells of human oral tissues. NBW3 also has potent virus inactivation activity. The use of NBW3 as an adjunct to periodontal therapy would be promising.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：オゾンナノバブル水 歯周治療

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、こうした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ている(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、現場においてバブリング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

って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ヶ月以上の長期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

上記の我々の研究により、NBW3を歯周治療の補助的療法として使用した場合の臨床的・細菌学的有用性が示唆された(Hayakumo et al. Clin Oral Investig 2012)が、NBW3の特性については未だ不明な点が多く、更なる解明が必要である。本研究の目的は、歯周治療における応用を見据え、NBW3の(1)宿主の免疫系に与える影響、(2)歯周治療後の歯血症予防効果を検討することである。

近年、低侵襲の消化管外科手術(経管腔内視鏡手術:NOTES)の前処置としての消化管の洗浄・殺菌にNBW3を用いた際の粘膜の局所免疫の増強が報告された。このように、NBW3は強力な殺菌能だけでなく、宿主の免疫系に対する効果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。NBW3の殺菌能以外の特性については未だほとんど解明されていないことから、本研究の第一の目的は、NBW3が宿主の免疫系に与える影響について検討することである。具体的には、NBW3の(1)創傷治癒に及ぼす影響、(2)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。

一方、超高齢社会を迎え、有病者に対する歯周治療の機会が急増している昨今、歯周治療後の菌血症発症に対する有効な予防法の確立が急務となっている。歯磨きやフロスによる清掃、歯周組織検査、SRP、抜歯などの歯周治療により、細菌が繰り返し血流へと侵入し一過性の菌血症が引き起こされることが知られており、歯周病患者に対するSRP後の菌血症の発症頻度は90%との報告がある(*J Periodontol* 2010)。健常人では血流に侵入した細菌は早期に排除されるため問題とならないが、潜在的风险を有する患者では、歯周治療による一過性の菌血症が感染性心内膜炎などの誘因となりうる。近年、クロルヘキシジンなどの消毒剤による歯肉縁下イリゲーションを術前に行うことにより口腔内の病原菌を除去し、菌血症発症を予防する方法が検討され始めているが、未だ有効な方法は確立されていない。NBW3は強力な殺菌能に加え、局所免疫の増強効果も有する可能性が示唆されていることから、術前にNBW3を用いて歯肉縁下イリゲーションを行うことにより、歯周治療後の菌血症予防効果が得られることが想定される。本研究の第二の目的は、NBW3による歯周治療後の菌血症予防効果について臨床研究を実施し、確認することである。

3. 研究の方法

(1)NBW3の歯周病原細菌に対する殺菌能を確認するため、Time-kill studyを行った。

代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* JCM12257 と *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JCM8577 にNBW3を所定時間(30秒、1、1.5、5分)作用後、10倍段階希釈列を作成し、各0.1mlを培地20mLと混合後、培養し出現したコロニー数をカウントした。

(2)NBW3の殺菌メカニズムを明らかにするため、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、NBW3を作用させた歯周病原細菌の微細構造の変化について観察を行った。

代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*(TDC60)及び *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC43718)にNBW3、0.9%NaCl、コンクール®をそれぞれ5分間作用させ、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて細菌微細構造の変化について観察を行った。

(3)NBW3の抗ウイルス活性について検討するため、プラーク法を用いてウイルス不活化試験を行った。

5µlのNBW3にSARS-コロナウイルス液[10%牛胎児血清、100µg/mlストレプトマイシン、100U/mlペニシリンを含むダルベッコMEM中]5µlを加え室温で任意の時間(0、10、30、60秒間)反応後、0.1%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液(pH7.0)で10倍段階希

釈を行い、それぞれの希釈液の0.2mlを感受性細胞に室温で60分間感染させ、プラーク法でウイルス力価を測定した。

(4)TEMを用いてウイルスの微細構造の変化についても観察を行った。インフルエンザウイルス(A型、PR8株)にNBW3、0.9%NaClをそれぞれ5分間作用させ、TEMを用いてウイルス微細構造の変化について観察を行った。

(5)NBW3の口腔組織に対する安全性を検討することを目的とし実験を行った。

ヒト口腔組織3次元モデル(EpiGingival model®, EpiOral model®)を用いて、NBW3、リステリン®、Triton-Xを作用させた細胞のviabilityの変化をMTTアッセイにより確認した。

(6)NBW3による歯周治療後の菌血症予防効果について検討するため、下記の臨床研究を計画した。

東京医科歯科大学歯学部附属病院歯周病外来を受診した歯周炎患者30名を被験者とした。被験者の選定基準は、全身疾患を有しておらず健康である、少なくとも20歯以上の歯が残存している、5mm以上の歯周ポケットを有する歯が1/2顎ごとに3本以上存在している、こととした。

30名の被験者を、SRPの術前にNBW3による歯肉縁下イリゲーションを行う群(NBW3群)、水道水による歯肉縁下イリゲーションを行う群(水道水群)、術前に歯肉縁下イリゲーションを行わない群(コントロール群)の3群に無作為に振り分けた。

術前に末梢血と歯肉縁下プラークのサンプリングを行い、その後、コントロール群では局所麻酔下で手用スケーラーを用いてSRPを行った。NBW3群および水道水群では、SRP開始20分前に100mlのNBW3または水道水にてSRP予定部位の歯肉縁下イリゲーションを行った後、コントロール群と同様にSRPを行った。3群ともに、SRP開始6分後に再度、末梢血の採取を行った。また、SRP後1週間の時点で再度、末梢血と歯肉縁下プラークの採取を行った。

<歯肉縁下プラークサンプルの採取・評価法>

SRP施行部位の最深ポケット3箇所から、#40ペーパーポイント2本を用いて歯肉縁下プラークサンプルを採取した。PCR-インベダー法を用いて総菌数、*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*P. intermedia*の3菌種の菌数・対総菌数比率を定量的に評価した。

<末梢血の採取・評価法>

末梢血は肘前窩の静脈から、22ゲージのバタフライ採血針を用いて採取した。採取量は10mlとした。嫌気用ボトルに採取した末梢血を入れ、血液培養自動分析装置バクテック™9050にて6日間、ボトル内の微生物増殖を

モニターした。陰性ボトルは廃棄し、陽性ボトルについては、生化学的微生物同定キットを用いて嫌気性菌、好気性菌、レンサ球菌それぞれの同定を行った。

4. 研究成果

(1) 代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* JCM12257 と *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JCM8577 に NBW3 を作用させたところ、30 秒後においてどちらの細菌も定量下限値未満となった。一方、ネガティブコントロールである生理食塩水を作用させた細菌においては、5 分後においても初発と比較して、出現コロニー数に差異は認められなかった(図 1、2)。

(2) 0.9%NaCl を作用させたネガティブコントロール群においては、両細菌とも正常な細菌微細構造が観察された。

コンクール®を作用させた細菌においては、細胞膜・細胞壁が破壊され、細胞質成分が漏出している像が観察された。

NBW3 を作用させた細菌では、細胞壁の障害は認められるものの明らかな溶菌や細胞質成分の漏出は観察されなかった。また、NBW3 を作用させた細菌の細胞質内にはタンパク質の凝集が認められた。

(3) NBW3 のウイルス不活化能について検討するため、プラーク法を用いてウイルス力価を測定した。SARS-コロナウイルス液(10^1)に NBW3 を 10 秒間作用させ、 10^{-5} 希釈した希釈液を感受性細胞に播種したところ、ウイルスに感染して細胞変性を起こした部分(プラーク)がコントロール群と比較して 1/10 以下に減少した。さらに、60 秒間 NBW3 を作用させたものではプラークは全く観察されなかった(図 3)。以上のことから、NBW3 は SARS-コロナウイルス、インフルエンザウイルス等に対して顕著な抗ウイルス活性を有することが明らかとなった。

(4) NBW3 作用ウイルスの微細構造の変化について、TEM を用いて観察を行った結果、0.9% NaCl を作用させたネガティブコントロール群においては、正常な丸いウイルス粒子の像が観察された。一方、NBW3 作用群では、ウイルス粒子が壊れて凝集したと考えられる黒い塊が観察された。

(5) NBW3 をヒト口腔組織 3 次元モデルに作用させた場合の ET_{50} (無添加の細胞と比較し、生細胞数が半減する時間)は 24 時間以上であり(図 4、5)、NBW3 をヒト口腔組織に応用する際の安全性が確認された。

図 1 : *Porphyromonas gingivalis* JCM12257 に対する NBW3 の殺菌効果(Time-kill study)

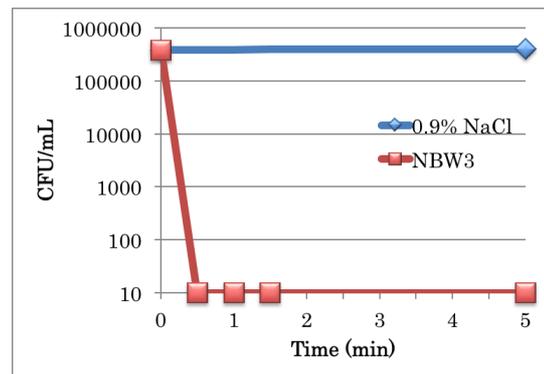


図 2 :

Aggregatibacter actinomycetemcomitans JCM8577 に対する NBW3 の殺菌効果(Time-kill study)

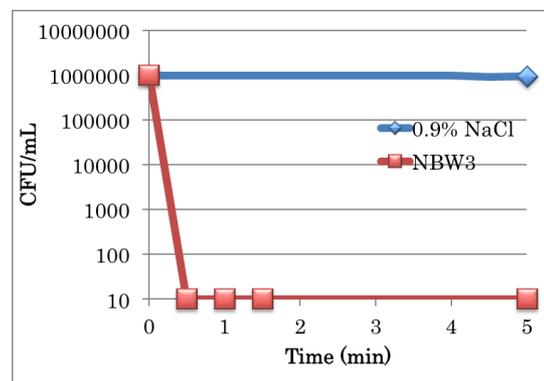


図 3 : SARS-コロナウイルスに対する NBW3 のウイルス不活化能

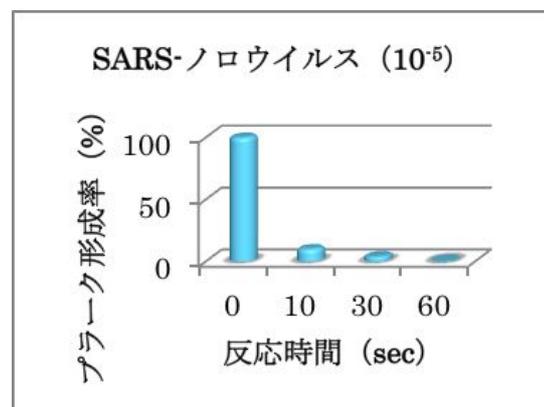


図 4 : ヒト口腔粘膜 3 次元モデル (EpiOral™) に対する NBW3 の為害性試験 (MTT アッセイ)

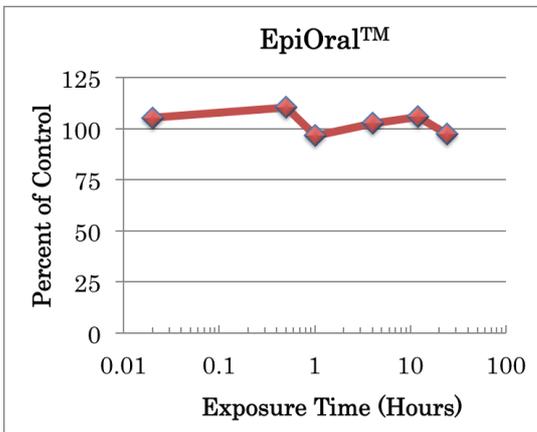
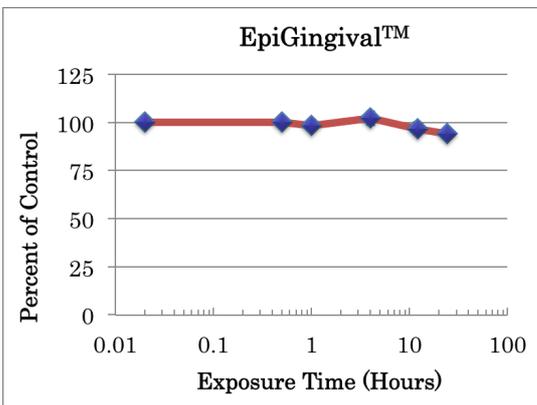


図 5：ヒト口腔上皮 3 次元モデル (EpiGingival™) に対する NBW3 の為害性試験 (MTT アッセイ)



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 1 件)
Sae Hayakumo, Shinichi Arakawa, Masayoshi Takahashi, Keiko Kondo, Yoshihiro Mano and Yuichi Izumi. Effects of ozone nano-bubble water on periodontopathic bacteria and oral cells - *in vitro* studies. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 査読あり 2014, Volume15, 055003.
 doi:10.1088/1468-6996/15/5/055003

〔学会発表〕(計 0 件)
 〔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