

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

高齢者における口腔内清浄度向上を目指したウイルスおよび細菌除去効果を有する含嗽剤の開発および臨床研究

(30-23)

主任研究者 庵原 耕一郎

国立長寿医療研究センター 幹細胞再生医療研究部 (室長)

研究要旨

これまでの長寿医療研究開発費による研究により、ナノバブルと市販の含嗽剤を併用することで、バイオフィルムの除去・除菌効果が市販の含嗽剤と比べて大幅に向上することを明らかにした。よって本研究を継続して、まず、ウイルスや肺炎球菌に対するナノバブルの基礎的研究を行う。また、口腔ケアのための最適な含嗽剤の使用条件および非臨床研究を行い、さらに高齢者施設においてナノバブル含嗽剤の細菌除去効果に対する臨床研究を行う。具体的には、ウイルスに対してはまず *in vitro* において薬剤含有ナノバブル培養液もしくは薬剤含有培養液にノロウイルスを感染させ、ウイルス感染価の変化にて効果を比較検討し、適切な薬剤、濃度を決定する。これにより、高齢者におけるウイルス感染症の予防に寄与できると考えられる。臨床研究については、高齢者施設において、自力での口腔ケアがやや難しい患者においてナノバブル含有含嗽剤の有効性を、前後の歯面、舌、頬部口腔の細菌数の減少により検討する。これにより、誤嚥性肺炎の発症リスクを下げることが期待できる。また、高齢者のう蝕・歯周疾患を減少させ、口腔の健康状態を維持させ、オーラル・フレイルの発症を予防できると考えられる。平成30年度は最適なナノバブルおよびナノバブルに添加する薬剤の決定、およびナノバブルのウイルスへの効果、ナノバブル含有 EDTA の脱灰効果、ナノバブルによるスミヤー層除去効果、ナノバブルの難治性根尖性歯周炎での効果を検討した。平成31年度は**へのナノバブルの浸透促進効果や抗生剤含有ナノバブル含嗽剤の有用性を検討し、また、イヌを用いた実際の臨床研究と同様に行うと想定されるナノバブルの口腔内清掃促進効果の検討を行ったところ、以下のことが判明した。

1. 塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルの**への浸透実験の結果、塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルのほうが、テトラサイクリンの**への浸透が明らかにみられた。また、ナノバブル含有塩化ベンザルコニウムは表皮にのみ浸透し、真皮までは浸透していなかった。これより、新型コロナウイルス (SARS-CoV2) を含む、**に入り込

んだウイルスに対してもナノバブルの薬剤浸透促進効果による薬剤の影響を期待することが出来ると考えられた。今後は、屠殺したイヌではなく、生体に対する効果を確認して、含嗽用ナノバブルの臨床研究にむけて進めていく予定である。(庵原)

2. ナノバブルによる抗生剤の浸透性を検討した結果、ナノバブルはアモキシリン、アジスロマイシン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、シプロフロキサシン、モキシフロキサシンにおいて、混合しても浸透効果を減弱しなかった。これより抗生剤含有ナノバブル含嗽剤は抗生剤によってはナノバブルの浸透効果を期待して使用できる事が明らかになった(庵原)
3. 肺炎球菌の原因菌の一つである *Fusobacterium nucleatum* には低濃度であってもペニシリン以外は効果が見られ、*Enterococcus faecalis* はアジスロマイシン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、シプロフロキサシン、モキシフロキサシンは高濃度でなければ効果はみられなかった。これより適応する際には耐性菌を出現しないように濃度に注意する必要があることが明らかになった。(庵原、松下)
4. イヌを用いた実際の臨床研究と同様に行うと想定される口腔内清掃を行った。歯面を塩化ベンザルコニウムおよびナノバブル含有塩化ベンザルコニウムにて洗浄したところ、ナノバブル含有含嗽液は有意に細菌数の減少がみられた。また、頬および舌面を同様に洗浄したところ、有意差はなかったものの、ナノバブル含有含嗽液は細菌数の減少傾向がみられた。これより前年度に決定した 0.005%塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルの口腔内清掃における有効性が明らかとなった。一方、実際の臨床研究を行う際にはより多くの人数を対象に行う必要があると考えられた。また、多くの人を対象とした臨床研究を行う前に、少人数での臨床研究を行って、人における臨床研究法を確立させる必要がある。(庵原)

主任研究者

庵原 耕一郎 国立長寿医療研究センター 幹細胞再生医療研究部 (室長)

分担研究者

松下 健二 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 (部長)

研究期間 平成31年4月～令和2年3月

A. 研究目的

虫歯や歯周病を放置すると、歯を喪失することが少なくない。すなわち、噛む力や舌の動

きが低下し、食べられるものが限られるためバランスの良い食事を摂れなくなり、食欲低下となることがある。このような歯や口の機能が低下して虚弱になることを「オーラル・フレイル」という。オーラル・フレイルは低筋力や低身体機能などのサルコペニアや低栄養などによる生活機能の低下を招き、ひいては要介護状態に陥ることが懸念されている。私達はこれまで、歯をできるだけ残存させるべく、ナノバブル薬剤導入法による感染制御の研究を行ってきたが、これまでの長寿医療研究開発費により臨床でう蝕・根管治療や歯周疾患治療等に用いることができる閉鎖系のナノバブル発生装置を完成させ、この効果をう蝕・感染根管・歯周疾患モデルを用いて検討してきた。この結果、ナノバブルと市販の含嗽剤を併用することで、バイオフィルムの除去・除菌効果が市販の含嗽剤と比べて大幅に向上することを明らかにした。よって本年度は、まず、ウィルスや肺炎球菌に対するナノバブルの基礎的研究を行う。次年度にイヌを用いたナノバブル含嗽剤の有効性および安全性の非臨床研究を行う。最終年度に高齢者施設においてナノバブル含嗽剤の細菌除去効果に対する臨床研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 0.005%塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルの**への浸透を確認するため、屠殺後のイヌの**に適応し、UV照射下の実態顕微鏡にて観察することで行った。(庵原)。
2. ナノバブルによる抗生剤の浸透性を検討するために、ブタ歯根を用いた *in vitro* 根管モデルを作製した。ナノバブルに各種抗生剤を混合することによる象牙細管への薬剤浸透の比較検討をブタ抜去歯にて UV 照射下の実態顕微鏡にて観察することで行った。(庵原)。
3. 抗生剤の口腔内細菌に対する最適な濃度を検討するため、感受性試験を行った。具体的には *Enterococcus faecalis* および *Fusobacterium nucleatum* を BHI 培地 5 ml にて培養し、培養した培地を BHI 寒天培地にスプレッダーで塗抹した。この上に下記の表の薬剤を浸したろ紙を置いて 37℃にて培養した。(庵原・松下)
4. ナノバブル含有塩化ベンザルコニウム含嗽剤による口腔内細菌の変化の検討するため、細菌カウンタによるナノバブル洗浄前後の歯垢、舌苔、頬##細菌数測定値の比較を行った。

(倫理面への配慮)

感染実験に対する配慮

国立長寿色由研究センターの感染実験安全委員会の承認(承認番号 感 31-4)を得てその定める規則に基づき実験を行った。

実験動物に対する動物愛護上の配慮

動物愛護上の配慮を徹底し、国立長寿色由研究センターの動物実験倫理委員会の承認（承認番号 動 31-17）および、愛知医科大学の動物実験倫理委員会の承認（承認番号 2019-93）を得てその定める規則に基づき実験を行った。

C. 研究結果

1. 塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルの**への浸透実験の結果、塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルのほうが、テトラサイクリンの**への浸透が明らかにみられた。また、ナノバブル含有塩化ベンザルコニウムは表皮にのみ浸透し、真皮までは浸透していなかった。（庵原）
2. ナノバブルによる抗生剤の浸透性を検討した結果、ナノバブルはアモキシリン、アジスロマイシン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、シプロフロキサシン、モキシフロキサシンにおいて、混合しても浸透効果を減弱しなかった。（庵原）
3. 肺炎球菌の原因菌の一つである *Fusobacterium nucleatum* には低濃度であってもペニシリン以外は効果が見られ、*Enterococcus faecalis* はアジスロマイシン、バンコマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、シプロフロキサシン、モキシフロキサシンは高濃度でなければ効果はみられなかった。（庵原、松下）
4. 歯面を塩化ベンザルコニウムおよびナノバブル含有塩化ベンザルコニウムにて洗浄したところ、ナノバブル含有含嗽液は有意に細菌数の減少がみられた。また、頬##および舌面を同様に洗浄したところ、有意差はなかったものの、ナノバブル含有含嗽液は細菌数の減少傾向がみられた。（庵原）

D. 考察と結論

今回の結果より、新型コロナウイルス（SARS-CoV2）を含む、##に入り込んだウイルスに対してもナノバブルの薬剤浸透促進効果による薬剤の影響を期待することが出来ると考えられた。今後は、屠殺したイヌではなく、生体に対する効果を確認して、含嗽用ナノバブルの臨床研究にむけて進めていく予定である。

また、抗生剤含有ナノバブル含嗽剤は抗生剤によってはナノバブルの浸透効果を期待して使用できる事が明らかになったが、適応するには耐性菌が出現しないように濃度に注意する必要がある。

また、前年度に決定した 0.005%塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルの口腔内清掃における有効性が明らかとなった。一方、今回の実験はイヌ 4 頭を用いて行われたが、頬##と舌面における有効性は傾向が認められるものの、有意差を明らかにすることはできなかった。これより、実際の臨床研究を行う際にはより多くの人数を対象に行う必要があると考えられる。また、本研究はイヌを用いたため実際に日常で行う含嗽を行っていない、こ

のため多くの人を対象とした臨床研究を行う前に、少人数での臨床研究を行って、人における臨床研究法を確立させる必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表（原著、総説）

- 1) Zayed MH., Iohara K., Nakashima M. CCR3 antagonist protects against induced cellular senescence and promotes rejuvenation in periodontal ligament cells for stimulating pulp regeneration in the aged dog. Scientific Report (in press)
- 2) Nakashima M. Iohara K., Zayed M. Pulp Regeneration: Current Approaches, Challenges, and Novel Rejuvenating Strategies for an Aging Population. J Endodontics. (in press)
- 3) Iohara K., Zayed M., Takei M., Watanabe H., Nakashima M. Treatment of Pulpectomized teeth with trypsin prior to transplantation of mobilized dental pulp stem cells enhances pulp regeneration in aged dogs. Aging cells. (投稿中)
- 4) 庵原 耕一郎、中島 美砂子：「難治性根尖性歯周炎における抗菌ナノパーティクル含有ナノバブル水による根管内除菌効果の検討」：日本歯科保存学雑誌.63(1): 73-82, 2020.
- 5) 庵原 耕一郎、中島 美砂子：「閉塞根管拡大のためのナノバブル水含有 EDTA による脱灰効果促進」：日本歯科保存学雑誌. 62(3)：152-158, 2019.
- 6) 庵原 耕一郎、中島 美砂子：「ナノバブル水を用いた新規根管洗浄液のスミヤー層除去効果の検討」：日本歯科保存学雑誌. 62(3)：159-164, 2019.
- 7) 中島 美砂子、庵原 耕一郎—患者まで届いている再生医療— 「歯髄・象牙質再生治療の現状」日本再生医療学会雑誌 再生医療 2019 18 巻 1 号 p. 34-39

2. 学会発表

- 1) Iohara K., Nakashima M.: 「Enhanced delivery of EDTA by nanobubbles into dentin for efficient demineralization to enlarge constricted root canals.」 IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Meeting. Portland, Oregon, USA. June 24, 2019.
- 2) 渥美優介, 島垣昌明, 栗原欣也, 中本和希, 蒔苗亜紀, 中島美砂子, 庵原耕一郎, 川島伸之, 興地隆史, 鈴木孝尚：「新規開発多孔膜を備えた膜分取培養容器 VIVANT-CELL(r)にて分離・培養した歯髄幹細胞の特性評価」組織培養学会 東京 2019 年 7 月 6 日

- 3) 庵原耕一郎、Mohammed Zayed、中島美砂子:「トリプシン前処理および CCR3 拮抗剤含有非細胞性根管充填材を用いた若齢歯の歯髄再生」第 151 回日本歯科保存学会春季学術大会 福岡 2019 年 11 月 8 日
- 4) 庵原耕一郎:「帯電性ナノバブルの難治性感染根管菌に対する治療効果促進」第 8 回日本マイクロ・ナノバブル学会学術大会 福岡 2019 年 12 月 8 日

3. その他

(1) シンポジウム、特別講演

- 1) Nakashima M, Iohara K. Symposium: Pulp Regeneration: Current approaches, challenges, and novel rejuvenating strategies for an aging population. Potential utility of nanobubbles for pulp regeneration and root canal treatment. IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Meeting. June 23, 2019. Portland, Oregon, USA.
- 2) Nakashima M, Iohara K. Lessons Learned from a Clinical Study for Total Pulp Regeneration in Mature Permanent Teeth. 97th General Session and Exhibition of International Association for Dental Research (IADR). June 22, 2019. Vancouver, Canada
- 3) 庵原耕一郎: シンポジウム 近未来の歯科医療「歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生治療と今後の展望」International Congress of Oral Implantologists (ICOI) 東京 2019 年 7 月 14 日
- 4) 庵原耕一郎: 「歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療と今後の展望」第 4 回しづい細胞プロジェクトイノベーション研究会 岐阜 2019 年 12 月 13 日

(2) 受賞

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

発明者：庵原耕一郎、中島美砂子

発明の名称：象牙質再生用細胞培養物

出願番号：特願 2019-147175

出願日：2019 年 8 月 9 日

2. 特許取得

1) 発明者：発明者：中島洋司(有限会社中島工業)、中島美砂子、庵原耕一郎、山田和正、

発明の名称：患部浸透亢進性薬剤組成物の製造方法

特許登録番号：6574785

登録日：2019 年 8 月 23 日

2) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

発明の名称：非抜歯根管充填材及び非抜歯による歯組織再生方法

出願日：2010年9月10日

PCT 出願番号：PCT/JP2010/005536

特許取得：2019年4月17日（欧州）イギリス、ドイツ、フランス

特許証：特許 EU 2,476,442

権利者：国立長寿医療研究センター

3. 実用新案登録

なし

4. その他

なし