高齢者における口腔内洗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—ナノバブル含嗽剤への応用—

(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、頬部口腔粘膜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、以下のことが判明した。

- 1) ナノバブル（ナック社）、///ナノバブル（++++）、酸素ナノバブル（****）は浸透促進効果を有していた。
- 2) ナノバブル（ナック社）、///ナノバブル（++++）、酸素ナノバブル（****）は、ハイドロキシアパタイトを用いたバイオフィルム除去モデルにおいて、細菌の除去効果がみられた。
- 3) ///ナノバブルにおいてはブタの抜去歯を用いた *in vitro* 根管内無菌化モデルにおいて、///ナノバブル単体では殺菌効果がみられなかった。
- 4) 最適なナノバブルに添加する薬剤の検討で、塩化ベンザルコニウムは 0.01% 以上で阻

止円が確認でき、ナノバブル含有していた場合でも結果は同様であった。また、塩化セチルピリジニウムは0.012%以上、~~~~~は1/20希釈で阻止円が確認できた。

- 5) 塩化ベンザルコニウムの最適適応時間は、少なくとも塩化ベンザルコニウムの濃度を0.01%以上3分で適応する必要があることが明らかになった。
- 6) ハイドロキシアパタイトを用いたう蝕モデルにおいては、塩化ベンザルコニウムの濃度を0.01%以上、塩化セチルピリチジウムは0.012%以上、~~~~~を使用する場合には50倍希釈以上でナノバブルに添加して使用する必要があることが明らかになった。
- 7) ノロウィルスを用いてナノバブルのウィルスの非活性効果および塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルの非活性効果を確認したところ、ナノバブルは単体ではウィルスに対する非活性効果はなく、また塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルはウィルスに対する非活性効果はあったものの、塩化ベンザルコニウム単体での非活性効果と変わらなかった。
- 8) ナノバブルは薬剤の象牙質深部への浸透を高めEDTAの脱灰作用を促進させることが明らかとなった。
- 9) ナノバブル水は根管治療におけるスミヤー層除去に有用であることが示された。
- 10) イヌ難治性感染根管モデルにおいてナノバブル水と抗菌薬を併用して根管洗浄および貼薬を行ったところ、数回の根管治療で、有意に除菌できた。その後歯髄幹細胞を移植して歯髄および根尖部歯周組織が再生されることを明らかにした。

1年間で、英文論文2論文、日本語論文3論文、著書0報、学会発表及び講演4件、受賞1件、国内特許取得0件、海外特許取得1件、国内出願2件の研究成果を得た。

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)

中西 章 国立長寿医療研究センター 老化制御研究部 遺伝子治療研究室 (室長)

研究協力者

中島 美砂子 国立長寿医療研究センター 幹細胞再生医療研究部 (部長)

研究期間 平成30年4月～平成31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) ナノバブルの種類（ナノバブル（ナック社）、///ナノバブル（++++）、ナノバブル（N社）、酸素ナノバブル（****））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）。
- 2) う蝕モデルとして、*Streptococcus mutans* の培養液にハイドロキシアパタイトディスクを浸漬し、48時間培養して歯垢・バイオフィルムを形成した。その後、ナノバブル（ナノバブル（ナック社）、///ナノバブル（++++）、酸素ナノバブル（****））を3分作用させ、その除去効果を走査電子顕微鏡にて観察した。また、同様に Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits component (*In vitro*gen)にて染色し、蛍光顕微鏡（Keyence:VE7000）にて観察した。（庵原・松下）。
- 3) ブタ抜去歯に、*Enterococcus Faecalis* を感染させた後、///ナノバブルを5分間適用させ、48時間後、共焦点レーザー顕微鏡にて細菌の有無を観察した（庵原）。
- 4) 感受性試験を *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (BSL1) を BHI 寒天培地にスプレッダーで塗抹し塩化ベンザルコニウム、塩化セチルピリチジウム、および殺菌作用を有する~~~~~を浸したろ紙を置いて 37℃にて培養した。（庵原・松下）。
- 5) 最適な塩化ベンザルコニウムの適応を決定するため、対数増殖期の *Streptococcus mutans* に 0.001%、0.01%、0.1%の塩化ベンザルコニウムを1分および3分適応したのち、寒天培地上に播種して効果を確認した。（庵原・松下）
- 6) う蝕モデルとして、*Streptococcus mutans* の培養液にハイドロキシアパタイトディス

クを浸漬し、48 時間培養して歯垢・バイオフィルムを形成した。その後、塩化ベンザルコニウム、塩化セチルピリチジウム、および~~~~~含有ナノバブルを 3 分作用させ、その除去効果を走査電子顕微鏡にて観察した。また、同様に Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits component にて染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。(庵原・松下)

- 7) マウスノロウイルスをマウスマクロファージ系培養細胞に感染させ、ナノバブルおよび塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルを作用させた後、ノロウイルスの非活性化および細胞の生存率を測定した。(中西・庵原)
- 8) ブタ歯根を用いて *in vitro* 根管モデルを作製した。ナノバブル水, 50%ナノバブル水含有 8.5%EDTA 溶液, 8.5%EDTA 溶液, および 17%EDTA 製剤の 4 種類の薬剤を 5 分, 24 時間, および 72 時間根管内に作用させ、根管壁からそれぞれ 100, 300, および 500 μ m 地点でのビッカース硬さを測定した。さらに、根管壁を走査電子顕微鏡にて観察した。(庵原)
- 9) *in vitro* 根管モデルを作製し、ナノバブル水 5 分, 17%EDTA 製剤 1 分, 3%EDTA 製剤 2 分, 20%クエン酸製剤 3 分, 4.25%クエン酸製剤 5 分, および蒸留水 5 分の 6 種類の洗浄液を根管に作用させ、走査電子顕微鏡にて観察した。(庵原)
- 10) イヌ難治性感染根管モデルを作製し、ナノバブルと~~~~~を併用して根管洗浄および貼薬を行った。その後歯髓幹細胞を移植して歯髓および根尖部歯周組織が再生されるかを検討した。(庵原・中島)

(倫理面への配慮)

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 30-19) 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 2018-52) 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) ナノバブル(ナック社)、///ナノバブル(++++)、酸素ナノバブル(****) は浸透促進効果を有していた。(庵原)
- 2) ナノバブル(ナック社)、///ナノバブル(++++)、酸素ナノバブル(****) は、ハイドロキシアパタイトを用いたバイオフィルム除去モデルにおいて、細菌の除去効果がみられた。(庵原・松下)
- 3) ///ナノバブルにおいてはブタの抜去歯を用いた *in vitro* 根管無菌化モデルにおいて、///ナノバブル単体では殺菌効果がみられなかった。(庵原)
- 4) 最適なナノバブルに添加する薬剤の検討で、塩化ベンザルコニウムは 0.01% 以上で阻止円が確認でき、ナノバブル含有していた場合でも結果は同様であった。また、塩化

セチルピリジニウムは 0.012%以上、~~~~~は 1/20 希釈で阻止円が確認できた。
(庵原・松下)

- 5) 塩化ベンザルコニウムの最適適応時間は、少なくとも塩化ベンザルコニウムの濃度を 0.01%以上 3分 で適応する必要があることが明らかになった。(庵原・松下)
- 6) ハイドロキシアパタイトを用いたう蝕モデルにおいては、塩化ベンザルコニウムの濃度を 0.01%以上、塩化セチルピリジニウムは 0.012%以上、~~~~~を使用する場合には 50 倍希釈以上でナノバブルに添加して使用する必要があることが明らかになった。(庵原・松下)
- 7) ノロウィルスを用いてナノバブルのウィルスの非活性効果および塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルの非活性効果を確認したところ、ナノバブルは単体ではウィルスに対する非活性効果はなく、また塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルはウィルスに対する非活性効果はあったものの、塩化ベンザルコニウム単体での非活性効果と変わらなかった。(中西・庵原)
- 8) ナノバブルは薬剤の象牙質深部への浸透を高め EDTA の脱灰作用を促進させることが明らかとなった。(庵原)
- 9) ナノバブル水は根管治療におけるスミヤー層除去に有用であることが示された。(庵原)
- 10) イヌ難治性感染根管モデルにおいてナノバブル水と抗菌薬を併用して根管洗浄および貼薬を行ったところ、数回の根管治療で、有意に除菌できた。その後歯髄幹細胞を移植して歯髄および根尖部歯周組織が再生されることを明らかにした。(庵原・中島)

D. 考察

最適なナノバブルの検討

今回の結果により、浸透促進効果がみられたのは、ナノバブル (ナック社)、/// ナノバブル (++++)、酸素ナノバブル (****) であった。これらの、ナノバブルは、ハイドロキシアパタイトを用いたバイオフィーム除去モデルにおいて、それぞれ、細菌の除去効果がみられた。一方、/// ナノバブルにおいてはブタの抜去歯を用いた *in vitro* 根管内無菌化モデルにおいて、/// ナノバブル単体では殺菌効果がみられなかった。また、バイオフィーム除去モデルにおいても、ナノバブル (ナック社)、/// ナノバブル (++++)、酸素ナノバブル (****) を適応しても、Live/Dead 染色においては死菌がほとんどみられなかった。よって、これらのナノバブルには細菌除去効果はあっても殺菌作用はないと考えられる。よって、今後これらのナノバブルに抗菌薬を加えた、適切な含嗽剤を検討していく。

ナノバブル含有含嗽剤に最適な薬剤の検討

今回の結果より、少なくとも塩化ベンザルコニウムの濃度を 0.01%以上、塩化セチルピ

リチジウムは 0.012%以上、~~~~~を使用する場合には 50 倍希釈以上でナノバブルに添加して使用する必要があることが明らかになった。しかし、塩化ベンザルコニウムを含嗽剤として使用する効能をうたっている濃度は 0.001%以下であるため、臨床ではこの濃度では使用できない。よって、今後、非臨床研究および臨床研究に進むにあたり、塩化セチルピリチジウムもしくは~~~~~を含嗽剤に添加して使用することが、より殺菌効果を高めるため有効であると考えられる。ただ、塩化セチルピリジニウムにおいてはナノバブル（ナック社）と併用すると、浸透効果がなくなることが明らかにしてきたが、今回///ナノバブルを使用すると、浸透効果が阻害しなかったことから、塩化セチルピリジニウムを使用する場合は///ナノバブルを使用した方が良いと考えられる。

塩化ベンザルコニウム含有ナノバブル水のノロウィルスへの殺菌効果の検討

今回の結果より、ナノバブルは単体ではノロウィルスに対する非活性効果はなく、また塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルはノロウィルスに対する非活性効果はあったものの、塩化ベンザルコニウム単体での非活性効果と変わらなかった。

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

ナノバブル水の薬剤導入作用により EDTA を象牙質深部まで浸透させ、脱灰作用を促進し閉塞根管を拡大できる可能性が示唆された。ナノバブル水含有 EDTA は根管処置に要するチェアタイムならびに治療期間を大きく短縮できる。また、穿通することにより症状が緩解でき、抜歯を回避し歯の保存に貢献できる可能性が期待できる。

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

ナノバブル水は、他の化学的洗浄液と比べて、象牙質壁を軟化させずにスミヤー層を除去することができる点において有利であると考えられる。今後、臨床にナノバブル水を応用するにあたって、温度や保存容器などナノバブル水の保管方法や、持続効果についてより詳細に研究を進めていく予定である。

~~~~~含有ナノバブル水を用いた無菌化後の難治性感染根管歯における歯髄再生

~~~~~含有ナノバブルにより根管内の除菌および感染制御ができ、歯髄組織再生をより確実なものにすることができることが示唆された。

E. 結論

- 1) 含嗽剤として有用なナノバブルはナノバブル（ナック社）、///ナノバブル（++++）、酸素ナノバブル（****）であった。
- 2) 塩化セチルピリチジウムもしくは~~~~~を含嗽剤に添加して使用することに

より、より殺菌効果が高められた。

- 3) ナノバブルは単体ではノロウイルスに対する非活性効果はなく、また塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルはノロウイルスに対する非活性効果はあったものの、塩化ベンザルコニウム単体での非活性効果と変わらなかった。
- 4) ナノバブル水は薬剤の象牙質深部への浸透を高め EDTA の脱灰作用を促進させた。
- 5) ナノバブル水は根管治療におけるスミヤー層除去に有用である。
- 6) ~~~~~含有ナノバブルにより根管内の除菌および感染制御ができ、歯髄組織再生をより確実なものにすることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（原著、総説）

- 1) Iohara K, Utsunomiya S, Kohara S, Nakashima M. Allogeneic transplantation of mobilized dental pulp stem cells with the mismatched dog leucocyte antigen type is safe and efficacious for total pulp regeneration. *Stem Cell Res Therapy*. 9:116, 2018.
- 2) 中島 美砂子、庵原 耕一郎 「一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. 18(1):34-39, 2019.
- 3) Nakashima M, Iohara K, Bottino MC, Fouad A, Nör JE, Huang GTJ. Animal models for stem cell-based pulp regeneration: Foundation for human clinical applications. *Tissue Engineering, Part B*: 2019 (in press) Jan 9. doi: 10.1089/ten.TEB.2018.0194.
- 4) 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. 日本歯科保存学会雑誌. 第 62 巻第 3 号 2019 (in press)
- 5) 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. 日本歯科保存学会雑誌. 第 62 巻第 3 号 2019 (in press)

2. 学会発表

- 1) 中島美砂子、庵原耕一郎: 「CCR3 拮抗剤を併用した歯髄幹細胞治療法による高齢イヌにおける歯髄再生促進」第 148 回日本歯科保存学会春季学術大会 横浜 2018 年 6 月 14 日
- 2) Nakashima M., Iohara K.: 「Pulp regeneration is enhanced by trypsin in the aged teeth. 」 96th General Session and Exhibition of International Association for Dental Research (IADR)/IADR Pan European Regional Congress. London, England. July 26, 2018.
- 3) 庵原耕一郎、中島美砂子: 「ナノバブルの辺縁性歯周炎治療への応用」 第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会 京都 2018 年 11 月 1 日

3. その他

(1) シンポジウム、特別講演

1) Koichiro Iohara, Misako Nakashima.

Symposium: Root canal irrigation and medicaments for pulp regenerative therapy.

Potential utility of nanobubbles for pulp regeneration and root canal treatment.

96th General Session and Exhibition of International Association for Dental Research (IADR)/IADR Pan European Regional Congress. July 26, 2018. London, England.

(2) 受賞

庵原耕一郎、中島美砂子

Trypsin 前処理による高齢の歯髄再生促進治療法の開発

第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会 カボデンタル優秀ポスター賞 2018 年 6 月 15 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

名称：非細胞性歯組織再生促進キット

出願日：2017 年 9 月 29 日

出願番号：特願 2017-190744

国際出願日：2018 年 9 月 21 日

国際出願番号：PCT/JP2018/034948

出願人：国立長寿医療研究センター

2) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

名称：非細胞性根管充填材及び非細胞性歯組織再生促進キット

出願日：2019 年 3 月 28 日

出願番号：特願 2019-062054

出願人：国立長寿医療研究センター

2. 特許取得

1) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

名称：間葉系幹細胞を含んでなる根管充填材、及びこれを用いた歯組織再生方法

出願日：2011 年 2 月 28 日

出願番号：特願 2011-042862

国際出願日：2012 年 1 月 31 日

出願番号：PCT/JP2012/052155 (WO2012/117793 A1)

米国出願番号：13/985,111

特許取得日：2018年5月8日（米国）

特許登録番号：9962237

3. 実用新案登録

なし

4. その他

なし