

セルフメディケーションのための  
ナノバブル含有アセスによる歯周病治療薬促進効果の検討

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター  
幹細胞再生医療研究部 室長

いおはら こういちろう  
庵原 耕一郎

# セルフメディケーションのためのナノバブル含有アセスによる 歯周病治療促進効果の検討

国立長寿医療研究センター研究所 幹細胞再生医療研究部 庵原 耕一郎

(〒 474-8511 愛知県大府市森岡町 7-430 電話番号 0562-46-2311)

## 要旨

ナノバブルにアセス薬効成分を添加したナノバブル含有アセス(液およびゲル)を作製した。う蝕および歯周病治療薬としての効果をまず *in vitro* で *Streptococcus mutans* および *Porphyromonas gingivalis* を用いて、細菌数測定や走査電子顕微鏡にて検討した。また、*in vivo* において、ナノバブル含有アセスによる歯周病への効果を、歯周ポケットの細菌数の変化で細菌学的に検討した。この結果、*in vitro* において、ナノバブル含有アセスは *P. Gingivalis* の細菌数をより減少させることができた。また、イヌにおいて歯周ポケット内細菌をより効果的に減少することができた。これらの結果により、ナノバブル含有アセスによる歯周病に対するセルフメディケーションを促進できる可能性が示唆された。

## 1、調査研究目的

口腔ケアはう蝕や歯周病の予防による歯の健康維持のみならず、口腔内細菌や毒素による誤嚥性肺炎、認知症、心筋梗塞、脳梗塞等の防止など、全身に及ぶ様々な感染症の予防に重要と考えられている。その一方、口腔清掃指導は、歯ブラシでの物理的歯垢除去のみを主としている。しかし実際、高齢者や介護者が長時間、物理的ブラッシングを行うことは難しい。年齢とともに、歯周ポケットが深くなり、通常のブラッシングやうがいでは除去できない歯垢・バイオフィームが堆積し、強固で慢性的な細菌の棲み処から全身へ細菌や毒素が排出され、全身各組織で慢性炎症を引き起こす原因となりうる。高齢者では頻繁にプロフェッショナルケアを受けることは難しくなるため、自発的なセルフケアをより促進させ、歯垢・バイオフィームを堆積させない簡便な方法の新規開発が必須と考えられる。そのような問題点に対し、当研究では、マイナス電荷を有するナノバブルにアセスの薬効成分を含有させ、歯周組織ポケットの深部まで薬効成分を到達させることができる歯周病薬を作製し、すでに歯周病治療に用いられているアセスのより効果的な使用法を検討する。

## 2、調査研究方法

### 2-1 ナノバブル含有アセス（液）の *in vitro* バイオフィルムに対する効果

う蝕の主要原因菌である *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) および歯周炎の原因菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) をブレインハートインヒュージョンブイオン (BHI) (関東化学) 培地および変法 GAM ブイオン (ニッスイ) 培地にて培養し、菌液を  $1 \times 10^8$  CFU/ml に調製した。

#### 2-1-1. ナノバブル含有アセス（液）による *Streptococcus mutans* の菌垢・バイオフィルム除去

1. 48 well 細胞培養プレート各 well に BHI Broth + 5% スークロースを 1ml 添加した後、同 well に 50  $\mu$ l の *Streptococcus mutans* 培養液を加えた。
2. ハイドロキシアパタイト (HA) disc (HA48-3, Funakosi) を浸漬し、48 時間培養し、菌垢・バイオフィルムを形成させた。
3. ナノバブルの洗浄効果を検討  
ナノバブル水、アセス液 (ナノバブル水 15 倍希釈)、アセス液 (蒸留水 15 倍希釈)、蒸留水をそれぞれ 5 分間作用させた。
4. 2% グルタルアルデヒドにて 12 時間固定した。
5. 30、50、70、90、100% エタノールにて脱水した。
6. 白金 10kV にて蒸着 (導電膜蒸着 (スパッターコーティング) MSP-20-UM, 真空デバイス) した。
7. 走査電子顕微鏡 (VE9800, KEYENCE) にて観察した。未作用のものと走査電顕観察により比較した。

#### 2-1-2. ナノバブル含有アセス（液）による *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム除去

1. 48 well 細胞培養プレート各 well に変法 GAM ブイオン + 5% スークロースを 1ml 添加した後、同 well に 50  $\mu$ l の *Porphyromonas gingivalis* 培養液を加えた。
2. ハイドロキシアパタイト (HA) disc (HA48-3, Funakosi) を浸漬し、5 日間培養し、バイオフィルムを形成させた。
3. ナノバブルの洗浄効果を検討  
ナノバブル水、アセス液 (ナノバブル水 15 倍希釈)、アセス液 (蒸留水 15 倍希釈)、蒸留水をそれぞれ 5 分間作用させた。
4. 2% グルタルアルデヒドにて 12 時間固定した。
5. Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits component (Invitrogen) および PrestoBlue® Cell Viability Reagent 10% 含有変法 GAM ブイオン 500  $\mu$ l 作製
6. 4 の HA disc に 5 を入れ、37°C にて 90min 培養した。

7. 実体顕微鏡 (Leica:M205FA) にて観察した。
8. 培養上清を回収、Molecular Devices:SpectraMax M5 で細菌数を計測した。
9. ハイドロキシアパタイトを 30、50、70、90、100% エタノールにて脱水した。
10. 白金 10kV にて蒸着 (導電膜蒸着 (スパッターコーティング) MSP-20-UM, 真空デバイス) した。
11. 走査電子顕微鏡 (VE9800, KEYENCE) にて観察した。未作用のものと走査電顕観察により比較した。

## 2-2 ナノバブル含有アセス *in vivo* 歯周ポケットバイオフィームへの効果

### 2-2-1. ナノバブル含有アセス (液) の効果検討

1. ビーグル犬 (中部科学資材) の処置は全て全身麻酔を行ったのち行った。具体的にはドミトール (0.8mg/10kg) , ドルミカム (1mg/10kg) , ベトルファール (2mg/10kg) を筋肉内に投与した。
2. プローベにて頬側歯周ポケットを近心、中心、遠心の3点を測定した。
3. イヌの歯のポケット深部3か所のプラークをペーパーポイントで採取し、その細菌数を測定した。具体的には、まず滅菌ペーパーポイント #20 を歯周ポケットに挿入し、ポケット内を5回近遠心方向にぬぐった。このペーパーポイントを細菌カウンタ (Panasonic : DU-AA01NP-H) にセットして計測した。
4. ナノバブル水、アセス (液) (ナノバブル水 15 倍希釈)、アセス (液) (蒸留水 15 倍希釈)、蒸留水 2ml にて歯周ポケットを洗浄後 5 分間放置した。
5. 3 と同様に細菌数を測定した。
6. 24 時間後に再度細菌数を測定した。

### 2-2-2. ナノバブル含有アセス (ゲル) の効果検討

1. ビーグル犬 (中部科学資材) の処置は全て全身麻酔を行ったのち行った。具体的にはドミトール (0.8mg/10kg) , ドルミカム (1mg/10kg) , ベトルファール (2mg/10kg) を筋肉内に投与した。
2. プローベにて頬側歯周ポケットの近心、中心、遠心3点を測定した。
3. イヌの歯のポケット深部3か所のプラークをペーパーポイントで採取し、その細菌数を測定した。具体的には、まず滅菌ペーパーポイント #20 を歯周ポケットに挿入し、ポケット内を5回近遠心方向にぬぐった。このペーパーポイントを細菌カウンタ (Panasonic : DU-AA01NP-H) にセットして計測した。
4. アセス (ゲル) (ナノバブル水希釈) 1mg/ml、アセス (ゲル) (蒸留水希釈) 1mg/ml を歯周ポケットに注入した。
5. 24 時間後に細菌数を測定した。
6. 抜歯し歯頸部の歯根膜相当部の歯の表面を走査電子顕微鏡にて観察した。

### 3、調査研究成果

#### 3-1 ナノバブル含有アセスの *in vitro* におけるバイオフィルムに対する効果

##### 3-1-1. ナノバブル含有アセス（液）による *Streptococcus mutans* の除去効果

走査電子顕微鏡観察

*Streptococcus mutans* を付着させたハイドロキシアパタイトにナノバブルを5分作用させると、大部分を除去することができた（図1）。また、アセス液5分も *Streptococcus mutans* を除去することができた。一方、ナノバブルとアセス液を混合したものは、あまり *Streptococcus mutans* を除去できなかった。

##### 3-1-2. ナノバブル含有アセス（液）による *Porphyromonas gingivalis* の除去効果

残存細菌数測定

*Porphyromonas gingivalis* を付着させたハイドロキシアパタイトにナノバブル、アセス液、ナノバブル含有アセスを5分作用させた。作用後のハイドロキシアパタイトに残存した細菌の数を PrestoBlue にて測定すると、ナノバブル含有アセスを作用させたものが最も細菌数の減少がみられた（図2）。

Live/Dead 染色

*Porphyromonas gingivalis* を付着させたハイドロキシアパタイトにナノバブル、アセス液、ナノバブル含有アセスを5分作用させた。作用後のハイドロキシアパタイトに残存した細菌の数を Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits にて染色すると、ナノバブル含有アセス（液）を作用させたものが死菌を示す蛍光発色が特に強くみられた（図3）。

走査電子顕微鏡観察

*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルムはナノバブル5分である程度除去された（図4）。また、アセス液5分も *Porphyromonas gingivalis* をより除去することができた。さらにナノバブルとアセス液を混合したものは、ほとんどの *Porphyromonas gingivalis* を除去することができた。

#### 3-2 イヌにおけるナノバブル含有アセス（液）およびアセス（ゲル）の歯周病原菌に対する効果

##### 3-2-1 ナノバブル含有アセス（液）のイヌにおける歯周病原菌に対する効果

ビーグル犬の歯周ポケット内の細菌数を測定したのち、ナノバブル水、およびアセス液を通常通り蒸留水もしくはナノバブル水にて希釈したもので歯周ポケットを洗浄した。24時間後、再度細菌数を測定したところ、洗浄前の細菌数とほぼ変わらなかった（図5）。

### 3-2-2 ナノバブル含有アセス(ゲル)のイヌにおける歯周病原菌に対する効果

ビーグル犬の歯周ポケット内の細菌数を測定したのち、アセスを蒸留水もしくはナノバブル水にて1mg/mlに希釈したものを歯周ポケット内に注入した。24時間後、再度測定したところ、アセス(ゲル)およびナノバブル含有アセス(ゲル)ともに細菌数が大幅に減少した(図6)。さらに、アセス(ゲル)およびナノバブル含有アセス(ゲル)を比較すると、ナノバブル含有アセスの方が有意に細菌数の減少が見られた。

## 4、考察

私共はこれまで、ナノバブルは歯の象牙細管内深く薬剤を浸透させる効果を有していることを明らかにしてきた。また、*in vivo*の感染根管モデルにおいて、歯の象牙細管内に深く侵入した細菌を超音波ナノバブル薬剤導入法により短時間で根管内細菌を検出限界以下に死滅させることができることを示した(1,2)。さらに、超音波を当てて破滅させてジェット流を発生させることにより効果を発揮するナノバブルではなく、超音波がなくとも薬剤浸透効果を有する、よりシンプルで安全なナノバブルを用い、同様に根管内無菌化できることを示した(3)。今回、このナノバブルおよびアセスの歯周病治療への応用を検討したところ、まず*in vitro*において、歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に対してナノバブル含有アセス液の効果が見られた。また、*in vivo* イヌ歯周病モデルにおいてアセス(液)、およびナノバブル含有アセス(液)による歯周ポケット洗浄においては効果が見られなかったものの、アセス(ゲル)およびナノバブル含有アセス(ゲル)の歯周ポケット注入においては細菌数の減少効果が見られた。また、アセス(ゲル)とナノバブル含有アセス(ゲル)を比較するとナノバブルを含有させた方がより細菌数の減少がみられた。アセス(液)による洗浄において効果が認められなかった原因として、鴨井ら(4)によるとアセスAによる歯周ポケット洗浄効果は2週目まではみられず、4週目以降に有意差が認められているため、今回の実験においても長期間の観察をしてナノバブルによるアセス(液)の効果促進を観察する必要があると考えられる。一方アセスをナノバブルによりゲル状にして歯周ポケットに適応すると細菌減少効果があったことから、ナノバブルはアセスの効果を促進できると考えられた。この研究を非臨床研究および臨床研究へと続けていくことで、通常の塗布やうがいでは届きにくい、中高齢者の複雑な形態の歯や修復物の間や縁下の歯周ポケット、インプラント周囲組織までも薬効成分が到達でき歯周病のセルフケアが可能となる。また近年、歯周病は糖尿病と密接な関係があることが判明している。*Porphyromonas gingivalis*などの歯周病原菌が血管内に入ると心臓や大動脈、静脈などで血栓ができやすくなり、心臓病や脳梗塞のリスクが高まる。本研究により、歯周病による抜歯や口腔内細菌による全身的感染症を防止する中高齢者の効率的なセルフメディケーションが開発できる可能性が示唆された。

## 5、まとめ

*in vitro* および *in vivo* において、ナノバブルによるアセスの歯周病への効果促進効果がみられた。今後、アセス(液)においてはより長期的な観察を行い、アセス(ゲル)においては最適な濃度を検討していく必要がある。今後、この研究を続けていくことで最終的に臨床研究を行い、ナノバブル含有アセスによる中高齢者の効率的な歯周病治療のセルフメディケーションが開発できると考えられる。

## 6、調査研究発表(口頭又は誌上発表)

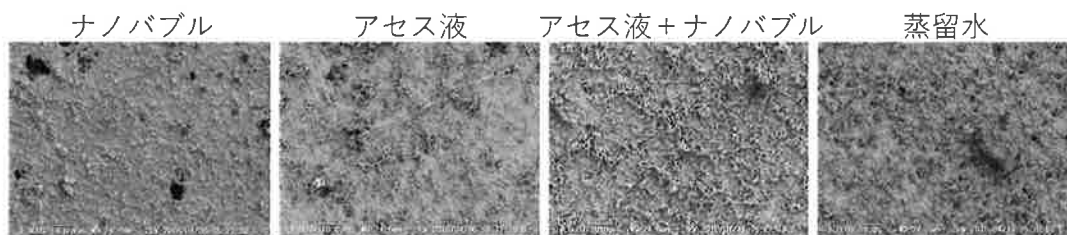
Iohara K., Nakashima M. Potential utility of nanobubble for pulp regeneration and root canal treatment. The 96th General Session of the IADR. July 26, 2018(発表予定)

## 7、引用文献

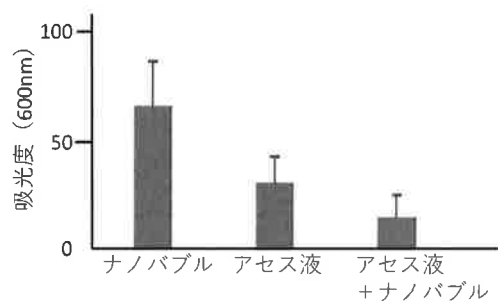
1. 江場久哲、庵原耕一郎、立花克郎、鈴木一吉、堀場直樹、中村洋、中島美砂子：超音波とナノバブルを用いた薬剤導入による新しい根管内無菌化法の開発 日本歯科保存学雑誌 .54(6):432-440,2011.
2. 藤田将典、庵原耕一郎、堀場直樹、立花克郎、中村洋、中島美砂子：感染根管菌におけるナノバブルと超音波を用いた根管内無菌化と歯髄再生 日本歯科保存学雑誌 .57(2): 170-179, 2014
3. Fujita M., Iohara K., Horiba N., Nakata K., Nakashima M.: [Pulp regeneration after complete disinfection of root canal system by enhanced delivery of medicaments using nanobubbles in a canine periapical disease model] International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016. Nagoya, June 27-28, 2016.
4. 鴨井 久一, 岩崎 直弥, 伊藤 弘, 仲谷 寛, 村井 正大, 吉沼 直人, 藤岡 均, 赤間 尚子, 池田 克己, 渡辺 幸男, 市村 光, 大塚 秀春, 野口 俊英, 福田 光男, 天埜 克彦, 河原 傳, 山岡 昭, 上田 雅俊, 高津 兆雄, 中垣 直毅: アセス<sup>®</sup>による歯周ポケット内洗浄が臨床症状および細菌叢におよぼす効果について(第2報) 日本歯周病学会会誌 . 36 (1): 242-253, 1994

表、図及び写真

【図1】走査電子顕微鏡による *Streptococcus mutans* 除去能の検討



【図2】PrestoBlue による残存 *Porphyromonas gingivalis* 数の計測



【図3】Live/Dead 染色による残存 *Porphyromonas gingivalis* 状態観察

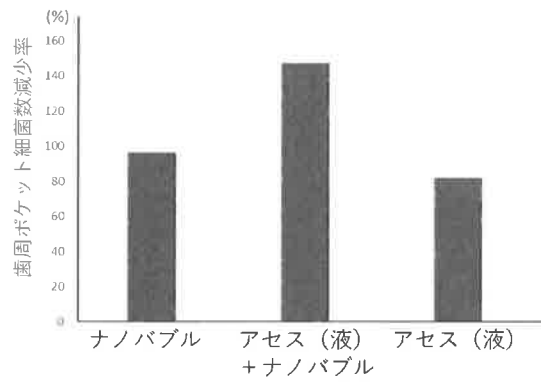


【図4】走査電子顕微鏡による *Porphyromonas gingivalis* 除去能の検討





【図5】 イヌ歯周病モデルにおけるナノバブル含有アセス（液）の効果



【図6】 イヌ歯周病モデルにおけるナノバブル含有アセス（ゲル）の効果

