

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2017 年度 博士論文

オーラルアプライアンスのための
亜塩素酸ナトリウム配合ジェル
の抗菌効果と
持続性に関する研究

2018 年 3 月 2 日

長谷川 拓哉

Takuya Hasegawa

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔衛生学講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2017 年度 博士論文

オーラルアプライアンスのための
亜塩素酸ナトリウム配合ジェル[®]の抗菌効果と
持続性に関する研究

2018 年 3 月 2 日

長谷川 拓哉

Takuya Hasegawa

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔衛生学講座

荒川浩久教授 指導

論文内容要旨

近年、種々な歯科疾患の機能回復や治療および予防処置やスポーツ外傷予防のために、多くの種類の可撤式口腔内装置 (Oral Appliance : 以下 OA と略す) が利用されている。しかし、これら OA の衛生的管理方法には、機械的あるいは化学的清掃方法についての指針あるいはガイドラインの策定、および OA 洗浄関連製剤の開発がほとんどみられていない。そこで、安全性に優れ、かつ低濃度でも酸化作用による抗菌効果が高いことから多方面に利用されている亜塩素酸ナトリウム (以下 NaClO_2 と略す) に着目した。 NaClO_2 は、酸または水素イオンとの反応によって二酸化塩素 (以下 ClO_2 と略す) を発生し、分解時には活性酸素となり、強力な酸化力によるバイオフィーム浸透性を示すことが報告されている。 ClO_2 は常温では刺激臭のある気体であるが、熱や光に分解されやすく、水への溶解度も高いことから水溶液としても用いられている。

そこで、主剤に ClO_2 を配合し、カルボキシメチルセルロース (以下 CMC と略す) を添加したジェルを試作し、OA の除菌に用いる製剤としての抗菌効果を検討した。すなわち、本研究は口腔内細菌に対する抗菌効果、CMC 添加による抗菌効果の持続性、ならびに人工的に形成したバイオフィーム (以下 O-Bf と略す) 抗菌効果を生細胞・死細胞蛍光鑑別 (以下 Live/Dead 染色と略す) 染色にて評価し、 ClO_2 配合ジェル (以下 ClO_2 gel と略す) の OA の除菌に対する有用性を検討することを目的とした。

被験試料には 955 ppm ClO_2 を配合した CMC 添加の ClO_2 gel、955 ppm ClO_2 洗口液 (以下 ClO_2 mouth wash と略す)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) を用いた。供試菌は、口腔内細菌 (グラム陽性菌 : *S. mutans*, *A. naeslundii*, グラム陰性菌 : *P. gingivalis*, *F. nucleatum*) を用い、最小発育阻止濃度による細菌増殖抑制効果、発育コロニー数による抗菌効果、発育の有無による経時的評価としての抗菌効果の持続性、Live/Dead 染色によるバイオフィーム抗菌効果を評価した。

その結果、 ClO_2 の細菌増殖抑制効果ならびに抗菌効果を示し、特に口臭や歯周病の原因であるグラム陰性菌 *P. gingivalis* と *F. nucleatum* に対して優れた効果が認められた。また CMC を添加した ClO_2 gel は、 ClO_2 mouth wash に比べて持続的な抗菌効果と O-Bf 抗菌効果を示し、滞留性と浸透性による効果の違いが認められた。 ClO_2 によるグラム陰性菌の抗菌効果は、① LPS の含硫アミノ酸 (cysteine、methionine) に直接作用して細胞壁が溶解すること、② 薄い Peptidoglycan が酸化作用を受けること、③ Peptidoglycan 合成酵素の阻害によつ

て細胞増殖が抑制されることなどの要因が、単独もしくは複合的に影響すると考えられた。

本研究の結果、ClO₂ gel は CMC 添加により口腔内滞留性による優れた抗菌効果を示し、各種 OA の除菌に利用できることが示唆された。また歯周病や口腔インプラント周囲炎の患者への応用や、口腔保湿剤として直接の口腔内塗布応用によって口腔乾燥症患者への応用や観血処置後の術後感染の防止、口臭の予防、ICU 等での挿管患者や在宅での要介護者の口腔ケアが難しい方々への応用など、広範囲の利用が期待できるものと示唆された。

論文審査要旨

学位申請論文は、種々な歯科疾患の機能回復や治療、および予防処置やスポーツ外傷予防に利用される可撤式口腔内装置 (Oral Appliance : 以下 OA と略す) の洗浄と殺菌効果について細菌学的に検討し、その有効性を示した論文である。

これまで、OA の衛生的管理方法には、機械的あるいは化学的清掃方法についての指針あるいはガイドラインの策定、および OA 洗浄関連製剤の開発がほとんどみられていない。そこで、安全性に優れ、かつ低濃度でも酸化作用による抗菌効果が高いことから多方面に利用されている亜塩素酸ナトリウム (以下 NaClO_2 と略す) に着目した。 NaClO_2 は、酸または水素イオンとの反応によって二酸化塩素 (以下 ClO_2 と略す) を発生し、分解時には活性酸素となり、強力な酸化力によるバイオフィーム浸透性を示すことが報告されている。 ClO_2 は常温では刺激臭のある気体であるが、熱や光に分解され易く、水への溶解度も高いことから水溶液としても用いられている。そこで、主剤に ClO_2 を配合し、カルボキシメチルセルロース (以下 CMC と略す) を添加したジェルを試作し、OA の浄化に用いる製剤としての抗菌効果を検討した。すなわち、本研究は口腔内細菌に対する抗菌効果、CMC 添加による抗菌効果の持続性、ならびに人工的に形成したバイオフィーム抗菌効果を生細胞・死細胞蛍光鑑別 (以下 Live/Dead 染色と略す) 染色にて評価し、 ClO_2 配合ジェル (以下 ClO_2 gel と略す) の OA の浄化に対する有用性を検討したものであり、研究の明確性および新規性を有する歯科医療に貢献できる研究目的であると評価した。

研究方法の概略は以下の通りである。被験試料には 955 ppm ClO_2 を配合した CMC 添加の ClO_2 gel、955 ppm ClO_2 洗口液 (以下 ClO_2 mouth wash と略す)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) を使用し、齲蝕及び歯周病に関わる口腔内細菌 (グラム陽性菌 : *S. mutans*, *A. naeslundii*, グラム陰性菌 : *P. gingivalis*, *F. nucleatum*) 4 菌種を用いて、最小発育阻止濃度による細菌増殖抑制効果、発育コロニー数による抗菌効果、発育の有無による経時的評価としての抗菌効果の持続性、Live/Dead 染色によるオーラルバイオフィーム (以下 O-Bf と略す) 抗菌効果に対する研究方法の組み立ては論理的であり、適切な解析手法により実験が行われている。

結果として、 ClO_2 の細菌増殖抑制効果ならびに抗菌効果を示し、特に口臭や歯周病の原因であるグラム陰性菌 *P. gingivalis* と *F. nucleatum* に対して優れた効果が認められた。また、CMC を添加した ClO_2 gel は、 ClO_2 mouth wash に比べ

て持続的な抗菌効果と O-Bf 抗菌効果を示し、滞留性と浸透性による効果の違いが認められた。以上の結果は、適切な方法により導き出された明快な結果である。本研究の結果から、ClO₂ gel は CMC 添加により口腔内滞留性による優れた抗菌効果を有し、各種 OA の浄化に利用できることが示された。また、歯周病や口腔インプラント周囲炎の患者への応用や口腔保湿剤として口腔内塗布応用によって口腔乾燥症患者への応用や観血処置後の術後感染の防止、口臭の予防など広範囲の利用が期待できる可能性があり、本研究の発展性が期待できる。

本審査委員会は、論文内容および関連事項に関して、口頭試問を行ったところ十分な回答が得られたことを確認した。さらに、本論文によって得られた新しい知見は、今後の口腔ケアへの貢献が期待でき、歯科医療の発展につながるとの結論に至った。そこで、本審査委員会は、申請者が博士（歯学）の学位に十分に値するものと認めた。

2018年3月2日

主査： 浜田 信城 教授

副査： 三辺 正人 教授

副査： 有坂 博史 教授

目次

緒言	1
実験材料および方法	3
結果	7
考察	10
結論	15
謝辞	16
文献	17
表 1	23
図 1	24
図 2	25
表 2	26
図 3	27

緒 言

近年、種々な歯科疾患の機能回復や治療、および予防処置やスポーツ外傷予防のために、多くの種類の可撤式口腔内装置（Oral Appliance：以下 OA と略す）が利用されている¹⁾。咬合機能回復のための補綴物である有床義歯をはじめ、顎関節症やブラキシズム対応のためのオクルーザルスプリントやナイトガード、閉塞性睡眠時無呼吸症候群の治療のための OA、矯正装置や保定装置、サージカルスプリントやガイドプレート、口腔内細菌除菌療法（デンタルドラッグデリバリーシステム）あるいはフッ化物歯面塗布や漂白等を含めたメディケーション応用のための各個トレー（Drug Retainer：以下 DR と略す）、スポーツ外傷予防のためのマウスガード（以下 MG と略す）等が、その用途・目的によって、異なる設計、製作方法・使用方法で用いられてきている。しかしながら、これら OA の衛生的管理方法については、義歯に対する流水下でのブラッシングによる機械的清掃や、義歯洗浄剤による化学的清掃剤使用の推奨はあるが²⁻⁴⁾、その他の OA に関する機械的あるいは化学的清掃方法に関する指針や手技、および OA 洗浄関連製剤の開発はほとんどみられていない。

そこで、安全性に優れ、かつ低濃度でも酸化作用による抗菌効果が高いことから多方面に利用されている亜塩素酸ナトリウム（以下 NaClO₂ と略す）に着目した⁵⁾。NaClO₂ に潜在する酸化力は、バイオフィルムへの浸透性をある程度有

することが知られていることから^{6,7)}、OA の除菌に有用性が高い可能性がある。

NaClO₂ は、酸または水素イオンとの反応によって二酸化塩素（以下 ClO₂ と略す）を発生し、分解時には活性酸素の状態にあつて強力な酸化作用を有する。

ClO₂ の分子量は 67.46 で、常温では刺激臭のある気体であるが、熱や光に分解され易く、水への溶解度（0.8 g/ml : 20℃）も高いことから水溶液としても用いられている。わが国では食品添加物として小麦粉の漂白やプール水等の消毒に、また一部の果実類・生野菜類、カズノコや卵殻の洗浄、食肉と食肉製品の洗浄加工助剤（殺菌料）に用いられている^{8,9)}。一方、諸外国では、米国食品医薬品局（FDA）が果実類・野菜類・家禽肉の殺菌料として認可しており、安全性と有効性が認められている^{10,11)}。

そこで、ClO₂ を主剤とし、カルボキシメチルセルロース（以下 CMC と略す）を添加したジェルを試作し、OA の除菌に用いる製剤としての抗菌作用を検討した。本研究は、口腔内細菌に対する抗菌効果、CMC 添加による抗菌効果の持続性、ならびに人工的に形成したバイオフィルム抗菌効果を生細胞・死細胞蛍光鑑別（Live / Dead）染色にて評価し、ClO₂ 配合ジェルの OA の除菌に対する有用性を検討することを目的とした。

実験材料および方法

1. 試料の調整

本研究に用いた被験試料は、955 ppm ClO₂ 配合の CMC 添加ジェル（以下 ClO₂ gel と略す）である。ポジティブコントロールの試料には、「口腔化粧品」として販売される 955 ppm ClO₂ 洗口液（株式会社 パインメディカル社製 ClO₂ fresh[®]、東京、以下 ClO₂ mouth wash と略す）で、主成分 NaClO₂（Bio-Cide International Inc、OK、USA）に、蒸留水、グリセリン、ペパーミント油が配合される。その成分に CMC を添加し、PEG-6、メチルパラベンにて調整して ClO₂ gel を試作した。なお、コントロールとしてダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ロンザジャパン株式会社製、東京、以下 DPBS と略す）を用いた。

2. 供試菌株および培地

本研究に使用した供試菌株は、神奈川歯科大学口腔科学講座微生物感染学分野供与によるグラム陽性菌 *Streptococcus mutans* Ingbritt 株 (*S. mutans*)、*Actinomyces naeslundii* ATCC 15987 株 (*A. naeslundii*)、グラム陰性菌 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株 (*P. gingivalis*)、*Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株 (*F. nucleatum*) の 4 菌種を供試した。

また使用した培地は 5 µg/ml ヘミン、0.2 µg/ml ビタミン K₁ および 0.5% イーストエキストラクトを添加したブレインハートインフュージョン（Becton,

Dickinson and Company、NJ、USA：以下 BHI と略す）液体培地を用い、37℃にて 18 時間にわたって嫌気条件下（CO₂：10%、H₂：10%、N₂：80%）で培養した。

3. ClO₂ の細菌増殖抑制効果（最小発育阻止濃度による評価）

48 穴マイクロプレート（SUGITOMO BAKELITE CO. LTD 社製 MULTI WELL PLATE[®]、東京）を用い、各被験試料 1.0 ml と BHI 液体培地 1.0 ml を加えて 2 倍希釈液に調整し、各供試菌液 10 μl（5.0×10⁹ CFU/ml）を添加後、37℃にて 24 時間嫌気培養した。

嫌気培養後、菌懸濁液の濁度を目視で確認し、発育が認められない最大希釈倍率を最小発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration：以下 MIC と略す）として評価した。

4. ClO₂ の抗菌効果（発育コロニー数による評価）

各被験試料 1.0 ml に供試菌液 10 μl（5.0×10⁹ CFU/ml）を作用させ、5 分後、15 分後および 30 分後に菌懸濁液 100 μl を採取した。その後、BHI 液体培地を用いて 10 倍階段希釈を行ない、BHI 血液寒天培地に 100 μl 塗抹し、37℃、5 日間嫌気培養後の発育コロニー数を測定し抗菌効果を評価した。

5. ClO₂ 抗菌効果の持続性（発育の有無による経時的評価）

ClO₂ gel または ClO₂ mouth wash 1.0 ml を 2 倍濃度の BHI 液体培地 1.0 ml

を混濁させた後、一定流量 (2.5 ml/min) に調整した新鮮 BHI 液体培地をフラスコに流入し、等量を排出させた。その後、経時的にフラスコ内の溶液 1.0 ml を採取して、供試菌を 10 μ l 播種し、48 時間培養後の供試菌の発育有無の状況を評価した。

6. ClO₂ のバイオフィルム抗菌効果 (蛍光二重染色による Live / Dead 染色の評価)

直径 12 mm、厚さ 0.15 mm の滅菌した円形カバーガラス (IND, LTD 社製 MATSUNAMI GLASS、東京) へ供試菌液を含む BHI 液体培地中に静置後、18 時間嫌気培養させて人工バイオフィルムを形成した。浮遊細菌を除去後、各被験試料を 37°C、嫌気条件下で 30 分間作用させた。各被験試料を洗浄後、Live / Dead Viability Kit (Life Technologies 社製、USA) をメーカー指示に従って行い、SYTO9 および Propidium Iodide (PI) による蛍光二重染色 (Live / Dead 染色法) を行った。各実験群でカバーガラス上に残留した人工バイオフィルムは蛍光顕微鏡 (キーエンス社製 BZ-X700、大阪) にて観察した。Live / Dead 染色法で生細胞を緑色蛍光色素 (蛍光波長 518 nm)、死細胞を赤色蛍光色素 (蛍光波長 618 nm) で識別した。

7. 統計処理

各供試菌に対する抗菌効果を比較するにあたり、それぞれの平均値、標準偏

差を算出した ($n=3$)。統計学的処理は、一元配置分散分析後に Turkey 法にて多重比較を行った。有意水準は 5% とした。

結 果

1. ClO₂ の細菌増殖抑制効果（最小発育阻止濃度による評価：MIC）

ClO₂ mouth wash および ClO₂ gel の *S. mutans*、*A. naeslundii*、*P. gingivalis*、*F. nucleatum* における MIC を表 1 に示す。ClO₂ mouth wash の *S. mutans* および *A. naeslundii* ではともに 477.5 ppm で、*P. gingivalis* および *F. nucleatum* ではともに 238.8 ppm であった。一方、ClO₂ gel のグラム陽性菌 *S. mutans* および *A. naeslundii* ではともに 318.3 ppm で、グラム陰性菌 *P. gingivalis* では 14.9 ppm、*F. nucleatum* では 119.4 ppm であった。

ClO₂ gel はグラム陰性菌である *P. gingivalis* や *F. nucleatum* に対して明らかな発育抑制を示した。また、すべての供試菌において、ClO₂ mouth wash に比較して ClO₂ gel は増殖抑制効果が認められ、とくにグラム陰性菌で効果が顕著であった。（表 1）

2. ClO₂ の抗菌効果（発育コロニー数による評価）

グラム陽性菌の *S. mutans* では、ClO₂ mouth wash は抗菌効果が認められずに PBS と同程度であったが、ClO₂ gel は 5、15、30 分後の発育コロニー数が有意に低く、抗菌効果が認められた（ $P < 0.01$ ）。*A. naeslundii*、*P. gingivalis*、*F. nucleatum* では、ClO₂ gel、ClO₂ mouth wash とともに抗菌効果を示した。菌種によって抗菌効果に違いは認められたものの、グラム陽性菌の一種とグラム陰性

菌に抗菌効果が認められた。

また ClO₂ mouth wash に比較して、ClO₂ gel の方は 5、15、30 分後の発育コロニー数が有意に低く、抗菌効果を示した (P<0.05)。 *S. mutans* では ClO₂ gel は 5 分後に 37.0%、15 分後に 40.8%、30 分後に 46.6% の抗菌効果が認められたが、ClO₂ mouth wash は 30 分後においても PBS と同様に効果は認められなかった。 *A. naeslundii* では、ClO₂ gel は 5 分後に 94.3%、15 分後に 97.1%、30 分後に 97.8% の抗菌効果を認めたが、ClO₂ mouth wash は 5 分後に 43.8%、15 分後に 57.6%、30 分後に 69.1% と抗菌効果は低値であった。 *P. gingivalis* では、ClO₂ gel は 5 分後以降で発育を認めなかったが、ClO₂ mouth wash は 5 分後に 83.8%、15 分後に 90.4%、30 分後に 94.6% の抗菌効果が認められた。さらに *F. nucleatum* では、ClO₂ gel は 5 分後に 87.1%、15 分後に 94.4%、30 分後に 98.4% の抗菌効果が認められ、ClO₂ mouth wash は 5 分後に 62.1%、15 分後に 74.2%、30 分後に 89.6% の抗菌効果であった。 *F. nucleatum* ではジェルと溶液の差異はなかったものの、他の 3 種の供試菌ではジェルの抗菌効果が優れていた。(図 1、図 2)

3. ClO₂ の持続的抗菌効果 (発育の有無による経時的評価)

S. mutans、*A. naeslundii*、*P. gingivalis*、*F. nucleatum* において、ClO₂ gel、ClO₂ mouth wash による発育抑制の持続時間はそれぞれ、30 分と 0 分、30 分と 10 分、

60 分と 30 分、60 分と 30 分であった。グラム陽性菌よりグラム陰性菌に対して効果の持続性が認められ、CMC 添加による ClO₂ gel は無添加の ClO₂ mouth wash に比較し、抗菌効果の持続性が認められた (表 2)。ClO₂ gel は歯周病原細菌である *P. gingivalis* や *F. nucleatum* に対して顕著に発育抑制を示し、とくにグラム陰性菌の増殖抑制効果が明らかに高かった。(表 2)

4. ClO₂ のバイオフィルム抗菌効果 (蛍光二重染色による Live / Dead 染色の評価)

Live / Dead 染色法では生細胞は緑色蛍光色素により、また死細胞が赤色蛍光色素によって、それぞれ緑色または赤色の呈色を示す。ClO₂ gel のバイオフィルム抗菌効果は、*P. gingivalis* では赤色のみであり確実な死滅を示した。*F. nucleatum*、*A. naeslundii* では赤色と緑色が混在していた。なお、*S. mutans* ではほぼ緑色であった。ClO₂ mouth wash のバイオフィルム抗菌効果は、*P. gingivalis*、*A. naeslundii*、*S. mutans* で僅かに赤色がみられる程度であったが、*F. nucleatum* はほぼ緑色であった。ClO₂ gel は ClO₂ mouth wash と比較して明らかな効果を示した。またグラム陽性菌とグラム陰性菌を比較するとグラム陰性菌への効果は大きかった。(図 3)

考 察

平成 28 年厚生労働省歯科疾患実態調査によると、歯周病や齲蝕に起因すると考えられる永久歯の喪失歯数は減少傾向が認められる¹²⁾。それにより、他の歯科疾患予防へのアプローチが今後の課題となる。例えば、歯冠あるいは歯根破折の予防には、ブラキシズムやアブフラクション等での咬合性外傷予防のための OA、またスポーツ外傷予防のための MG など、OA 装着者の増加が見込まれる。これら一次予防手段以外に、二次予防としての治療では口腔内細菌除菌療法や漂白等に用いられる DR の利用者増加も推測される。さらに三次予防として、すでに喪失した永久歯補綴のための義歯装着は、機能・審美回復に加え、転倒リスク抑制の報告¹³⁾や要介護状態になるリスクの抑制¹⁴⁾、認知症発症リスクの抑制等が報告¹⁵⁾され、我が国の超高齢者社会での健康寿命延伸のためにも利用が期待されている。したがって、OA 装着者は今後増加するものと考えられることから、OA の除菌によるメンテナンスを検討しなくてはならず、今までの機械的清掃法とともに、化学的清掃製剤による OA の保管管理の点でも考慮しなくてはならない。とくに、熱可塑性シート材を用いる MG や DR 等の OA 管理では、ブラッシング等の機械的清掃によって表面に細かな損傷を生じることから流水による水洗が一般的であり、装着時に清潔で爽快な使用感を求めるには、生体への安全性に優れて抗菌効果の高い化学的清掃製剤の開発が望まれる。

本研究結果より、MIC では ClO₂ mouth wash は 2¹~2²、CMC 添加の ClO₂ gel は 2²~2⁶ と ClO₂ mouth wash よりも高く、グラム陰性菌で有意な増殖抑制効果を示した。両製剤ともに、配合された ClO₂ の抗菌効果が明らかであり、CMC 添加によって ClO₂ の停留性が顕著に示されたといえる。また供試したグラム陰性菌の *P. gingivalis*、*F. nucleatum* は、ともに歯周病の発症と口臭発生に関与する偏性嫌気性菌であることから、ClO₂ の抗菌効果はこれらを抑制する可能性を示唆している。とくに ClO₂ の口臭抑制効果は、今回ポジティブコントロールとして用いた ClO₂ mouth wash に関する研究^{16~18)}、また他に開発された洗口製剤の報告^{19~21)}もあり、諸外国でもセルフケア製剤として利用されている。ClO₂ は強力な酸化作用を有し、口臭原因物質を産生する嫌気性菌の周囲に活性酸素を供給することによって口臭予防効果を発揮するものと期待されている^{16~23)}。さらに、ClO₂ は口臭原因物質の揮発性硫黄化合物 (volatile sulphur compounds : 以下 VSCs と略す) の含硫アミノ酸 (cysteine、methionine) の分解作用を有しているとの報告もある²³⁾。

また、供試 4 菌種に対する ClO₂ の抗菌効果を発育コロニー数で見ると、グラム陽性菌では有意に ClO₂ gel の抗菌効果が優れていたものの、グラム陰性菌では CMC の有無による違いは認められず、ほぼ同程度の抗菌効果を示した。やはり、両製剤ともに ClO₂ による作用直後からの抗菌効果が明らかで、*S. mutans*

を除き、作用時間の延長に伴って発育コロニー数は減少した。とくに ClO₂ gel は、*P. gingivalis* では作用時間 30 分後までコロニー発育は認められなかった。また *A. naeslundii* では作用時間 5 分後から 30 分後まで 90%以上(範囲:94.3~97.8%)の抗菌効果を示した。菌種や製剤の剤型により ClO₂ 感受性は異なると考えられるが、ClO₂ gel の抗菌効果は ClO₂ mouth wash より優れていることが明らかであった。

次いで、両 ClO₂ 製剤の供試 4 菌種に対する抗菌効果の持続性では、グラム陽性菌に比較してグラム陰性菌で抗菌効果が高く、また ClO₂ gel の抗菌効果は ClO₂ mouth wash より優れており、グラム陰性菌に対する ClO₂ gel の抗菌効果は 60 分後まで持続していた。やはり、ClO₂ gel による停留性が顕著に示されおり、供試 4 菌種に差はあるものの、CMC 添加によって 20 分から 30 分の抗菌効果持続性の延長が期待できるといえる。以前の研究報告では、ClO₂ mouth wash によって 4 時間から 8 時間の持続効果を認めており^{18,20,24)}、ClO₂ gel ではさらなる効果時間の延伸が期待できる。

さらに、蛍光二重染色による Live / Dead 染色の評価では、ClO₂ mouth wash ではほとんど死細胞が認められないものの、ClO₂ gel では *P. gingivalis* で最も強い赤色染色を示した死細胞が認められ、*F. nucleatum*、*A. naeslundii* で混在した死細胞と生細胞が認められた。この Live / Dead 染色像から、*P. gingivalis* では人工ブ

ラーク深部まで ClO₂ gel の抗菌効果が認められ、残念ながら *F. nucleatum*、*A. naeslundii* では表層部のみの効果で深部まで波及していないものと考えられる。自然界では、固形表面上に液体が存在すればバイオフィームが形成される。ClO₂ mouth wash による口腔内外で形成される人工バイオフィームの菌叢の死滅は、認められなかった。ClO₂ mouth wash の歯肉縁上プラーク、根管洗浄、義歯洗浄に関する研究は散見されるが、未だ有益な作用を示す報告は少ないようである^{4,25,26}。一方、本研究で用いた ClO₂ gel においては *P. gingivalis*、次いで *F. nucleatum*、*A. naeslundii* の赤色に染色された死細胞の画像より、バイオフィーム細菌の死滅を期待できることが示唆された。

以上より、口腔内細菌 4 菌種から評価すると、ClO₂ はグラム陽性菌に比較してグラム陰性菌に優れた抗菌効果を示した。グラム陰性菌の細胞壁は最外層に Lipopolysaccharide があり、最内層の脂質二重層との間は薄い Peptidoglycan で構成され、グラム陽性菌では最外層に Lipopolysaccharide 類似物質の Lipoteichoic acid があり、最内層の脂質二重層との間は厚い Peptidoglycan で構成されている²⁷。よって、ClO₂ によるグラム陰性菌の抗菌効果は、①LPS の含硫アミノ酸 (cysteine、methionine) に直接作用して細胞壁が溶解すること、②薄い Peptidoglycan が酸化作用を受けること、③Peptidoglycan 合成酵素の阻害によって細胞増殖が抑制されることなどが考えられ、これらの要因が単独もしくは複

合的に影響する可能性が示唆される。

ClO₂ gel は、示された抗菌効果によって各種 OA の除菌に利用できることが示唆される。また、グルコン酸クロルヘキシジンと同程度もしくはそれ以上の抗菌効果を示す研究報告もあり^{25,26)}、歯周病や口腔インプラント周囲炎の患者への応用が期待できる^{28,29)}。さらには、CMC 添加によって口腔保湿剤としても応用でき、直接の口腔内塗布によって、観血処置後の術後感染の防止、口腔乾燥症患者への応用、ICU 等での挿管患者や在宅での要介護者の口腔ケアが難しい方々への応用、口臭の予防と広範囲の利用が期待できるといえる。

結 論

ClO₂ gel の抗菌性は ClO₂ の効果であることが明らかとなった。この抗菌効果は、とくに口腔内グラム陰性菌に作用し、口臭の原因でもある偏性嫌気性菌の歯周病原菌 *P. gingivalis* および *F. nucleatum* に対して高い効果が認められたこと、さらには CMC 添加により抗菌効果の持続性が認められたことから、ClO₂ gel は比較的長時間にわたり口腔内に留まって抗菌効果を発揮することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御鞭撻と御校閲を賜りました神奈川歯科大学口腔科学講座口腔衛生学分野 荒川浩久教授に深甚なる謝意を表します。また、御指導と御校閲をいただきました神奈川歯科大学口腔科学講座微生物感染学分野 浜田信城教授、ならびに口腔統合医療学講座 三辺正人教授、高度先進口腔医学講座学講座 有坂博史教授に厚く御礼申し上げます。

さらに本研究の遂行にあたり終始ご教示を賜りました神奈川歯科大学口腔科学講座口腔衛生学分野 教室員各位に深甚なる謝意を表します。

利益相反

本研究に関連して申告すべき利益相反はない。

文 献

1. 杉山義祥, 竹内正敏編. 臨床家のためのオーラルアプライアンス入門, 医学情報社, 東京, 6-7, 2012.
2. 一般社団法人日本老年歯科学会. ガイドライン・社会保険委員会. 診療室における義歯洗浄と歯科衛生士による義歯管理指導の指針 2013 年度版. 日本老年歯科学会ホームページ学会編集ガイドライン等: 2013.
3. 公益社団法人日本補綴歯科学会. 有床義歯補綴診療のガイドライン, 日本補綴歯科学会ホームページガイドライン等: 2009.
4. 堀 智治. 二酸化塩素の義歯洗浄成分への応用に関する基礎的研究. 広大歯誌 **45**: 7-20, 2013.
5. 高山正彦, 杉本浩子, 水谷祐子, 丹野憲二. 二酸化塩素の殺菌性. 日本防菌防黴学会誌 **23**: 401-406, 1995.
6. Herczegh A, Gyurkovics M, Agababyan H, Ghidán A, Lohinai Z. Comparing the Efficacy of Hyper-Pure Chlorine-Dioxide With Other Oral Antiseptics on Oral Pathogen Microorganisms and Biofilm in Vitro. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **60**: 359-373, 2013.
7. Herczegh A, Ghidan A, Friedreich D, Gyurkovics A, Bendő Z, Lohinai Z. Effectiveness of a High Purity Chlorine Dioxide Solution in Eliminating Intracanal

Enterococcus Faecalis Biofilm. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*
60: 63-75, 2013.

8. 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課・監視安全課. 亜塩素酸ナトリウムの使用基準について. (平成 25 年 12 月 20 日付け事務連絡) : 2013.
9. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長. 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について. (平成 17 年 9 月 16 日付け食安発第 0916001 号) : 2005.
10. Federal Register, The Daily Journal of the United States Government. Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption, A Rule by the Food and Drug Administration on 02/14/2005: 2005.
11. Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to Treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids, Question N° EFSA Q-2005-002. The European Food Safety Authority Journal **297**: 1-27, 2005.
12. 厚生労働省医政局歯科保健課歯科口腔保健推進室. 平成 28 年歯科疾患実態調査結果の概要: 2016.

13. Yamamoto T, Kondo K, Misawa J, Hirai H, Nakade M, Aida J, Kondo N, Kawachi I, Hirata Y. Dental status and incident falls among older Japanese: a prospective cohort study. *BMJ Open* 2012 **2**: 2012.
14. J. Aida, K. Kondo, H. Hirai, M. Nakade, T. Yamamoto, T. Hanibuchi, K. Osaka, A. Sheiham, G. Tsakos and R. G. Watt. Association Between Dental Status and Incident Disability in an Older Japanese Population. *Journal of the American Geriatrics Society* **60**: 338-343, 2012.
15. Yamamoto T, Kondo K, Hirai H, Nakade M, Aida J, Hirata Y. Association between self-reported dental health status and onset of dementia: AGES project 4-year prospective cohort study of older Japanese. *Psychosomatic Medicine* **74**: 241-248, 2012.
16. Aung EE, Ueno M, Zaitso T, Furukawa S, Kawaguchi Y. Effectiveness of three oral hygiene regimens on oral malodor reduction: a randomized clinical trial. *Trials* **16**: 31, 2015.
17. Shinada K, Ueno M, Konishi C, Takehara S, Yokoyama S, Zaitso T, Ohnuki M, Wright FAC, Kawaguchi Y: Effects of a mouthwash with chlorine dioxide on oral malodor and salivary bacteria: a randomized placebo-controlled 7-day trial. *Trials* **11**: 14, 2010.

18. Shinada K, Ueno M, Konishi C, Takehara S, Yokoyama S, Kawaguchi Y. A randomized double blind crossover placebo-controlled clinical trial to assess the effects of a mouthwash containing chlorine dioxide on oral malodor. *Trials* **9**: 71, 2008.
19. 竹内倫子, 玉木直文, 江崎光恵, 本田俊一, 森田 学. 二酸化塩素含有洗口剤 (Pro Fresh[®]) の長期使用による口臭抑制効果 —二重盲検法による検討—. *日口臭誌* **2**: 3-10, 2011.
20. Silwood CJL, Grootveld MC, Lynch E. A multifactorial investigation of the ability of oral health care products (OHCPs) to alleviate oral malodour. *Journal of Clinical Periodontology* **28**: 634-641, 2001.
21. 堀 智治. 二酸化塩素の義歯洗浄成分への応用に関する基礎的研究. *広歯誌* **45**: 7-20, 2013.
22. Yates R, Moran J, Addy M, Mullan PJ, Wade WG, Newcombe R. The comparative effect of acidified sodium chlorite and chlorhexidine mouthrinses on plaque regrowth and salivary bacterial counts. *Journal of Clinical Periodontology* **24**: 603–609, 1997.
23. Lynch E, Sheerin A, Claxson AWD, Atherton MD, Rhodes CJ, Silwood CJL, Naughton DP, Grootveld M. Multicomponent spectroscopic investigations of

- salivary antioxidant consumption by an oral rinse preparation containing the stable free radical species chlorine dioxide (ClO₂). *Free Radical Research* **26**: 209–234, 1997.
24. Frascella J, Gilbert RD, Fernandez P, Hendler J. Efficacy of a chlorine dioxide-containing mouthrinse in oral malodor. *The Compendium of Continuing Education in Dentistry* **21**: 241-244, 2000.
25. Herczegh A, Gyurkovics M, Agababyan H, Ghidán A, Lohinai Z. Comparing the efficacy of hyper-pure chlorine-dioxide with other oral antiseptics on oral pathogen microorganisms and biofilm in vitro. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **60**: 359-373, 2013.
26. Fráter M, Braunitzer G, Urbán E, Bereczki L, Antal M, Nagy K. In vitro efficacy of different irrigating solutions against polymicrobial human root canal bacterial biofilms. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **60**: 187-199, 2013.
27. 関口純一. 細菌細胞壁溶解・修飾酵素群の総合的研究. *生物工学会誌* **91**: 50-72, 2013.
28. Hildebrandt GH, Pape Jr HR, Syed SA, Gregory WA, Friedman M. Effect of slow-release chlorhexidine mouthguards on the levels of selected salivary bacteria. *Caries Research* **26**: 268–274, 1992.

29. Hanada N. The Dental Drug Delivery System for Prevention of Dental Caries.

Current Oral Health Reports **3**: 124–128, 2016.

表1 亜塩素酸ナトリウム製剤の口腔内細菌増殖抑制効果(MIC)

		MIC (ppm)		
		PBS	ClO ₂ mouth wash	ClO ₂ gel
Gram (+)	<i>S. mutans</i> (Ingbritt)	ClO ₂ 無配合:効果なし	477.5 (2 ¹ , 2 ¹ , 2 ¹)	238.8 (2 ² , 2 ² , 2 ²)
		ClO ₂ 無配合:効果なし	477.5 (2 ¹ , 2 ¹ , 2 ¹)	238.8 (2 ² , 2 ² , 2 ²)
Gram (-)	<i>P. gingivalis</i> (ATCC 33277)	ClO ₂ 無配合:効果なし	238.8 (2 ² , 2 ² , 2 ²)	14.9 (2 ⁶ , 2 ⁶ , 2 ⁶)
Gram (-)	<i>F. nucleatum</i> (ATCC 25586)	ClO ₂ 無配合:効果なし	238.8 (2 ² , 2 ² , 2 ²)	119.4 (2 ³ , 2 ³ , 2 ³)

下段()内は有効最大希釈倍数: n=3

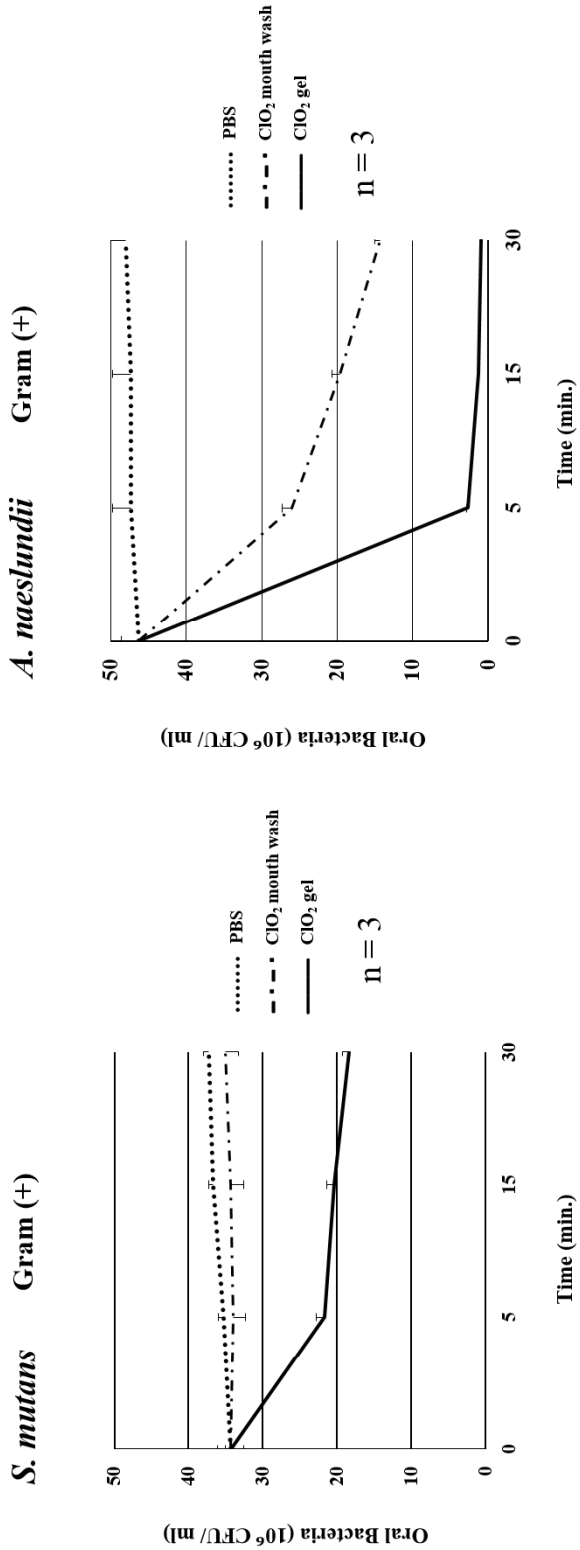


図1 亜塩素酸ナトリウム製剤の口腔内細菌(グラム陽性菌)に対する抗菌効果

ClO₂ gelは、ClO₂ mouth washに比べ、グラム陽性菌の抗菌効果が有意に高かった (P<0.01).

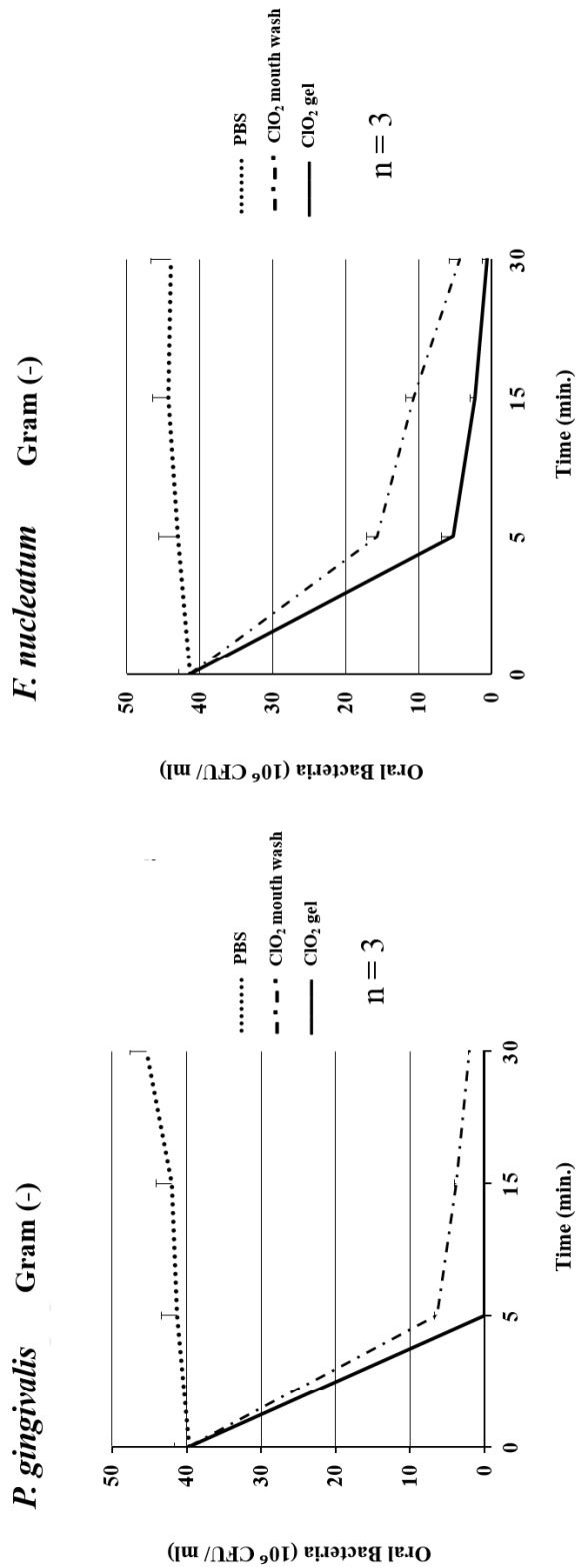


図2 亜塩素酸ナトリウム製剤の口腔内細菌(グラム陰性菌)に対する抗菌効果

ClO₂ gelは、ClO₂ mouth washに比べ、グラム陰性菌の抗菌効果が有意に高かった (P<0.05).

表2 亜塩素酸ナトリウム製剤の口腔内細菌に対する抗菌効果の持続性

min.	<i>S. mutans</i> Gram (+)		<i>A. naeslundii</i> Gram (+)		<i>P. gingivalis</i> Gram (-)		<i>F. nucleatum</i> Gram (-)	
	ClO ₂ mouth wash	ClO ₂ gel	ClO ₂ mouth wash	ClO ₂ gel	ClO ₂ mouth wash	ClO ₂ gel	ClO ₂ mouth wash	ClO ₂ gel
0	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-
30	+	-	+	-	-	-	-	-
60	+	+	+	+	+	-	+	-
120	+	+	+	+	+	+	+	+
180	+	+	+	+	+	+	+	+

—: 発育を認めなかった

+: 発育を認めた

n = 3

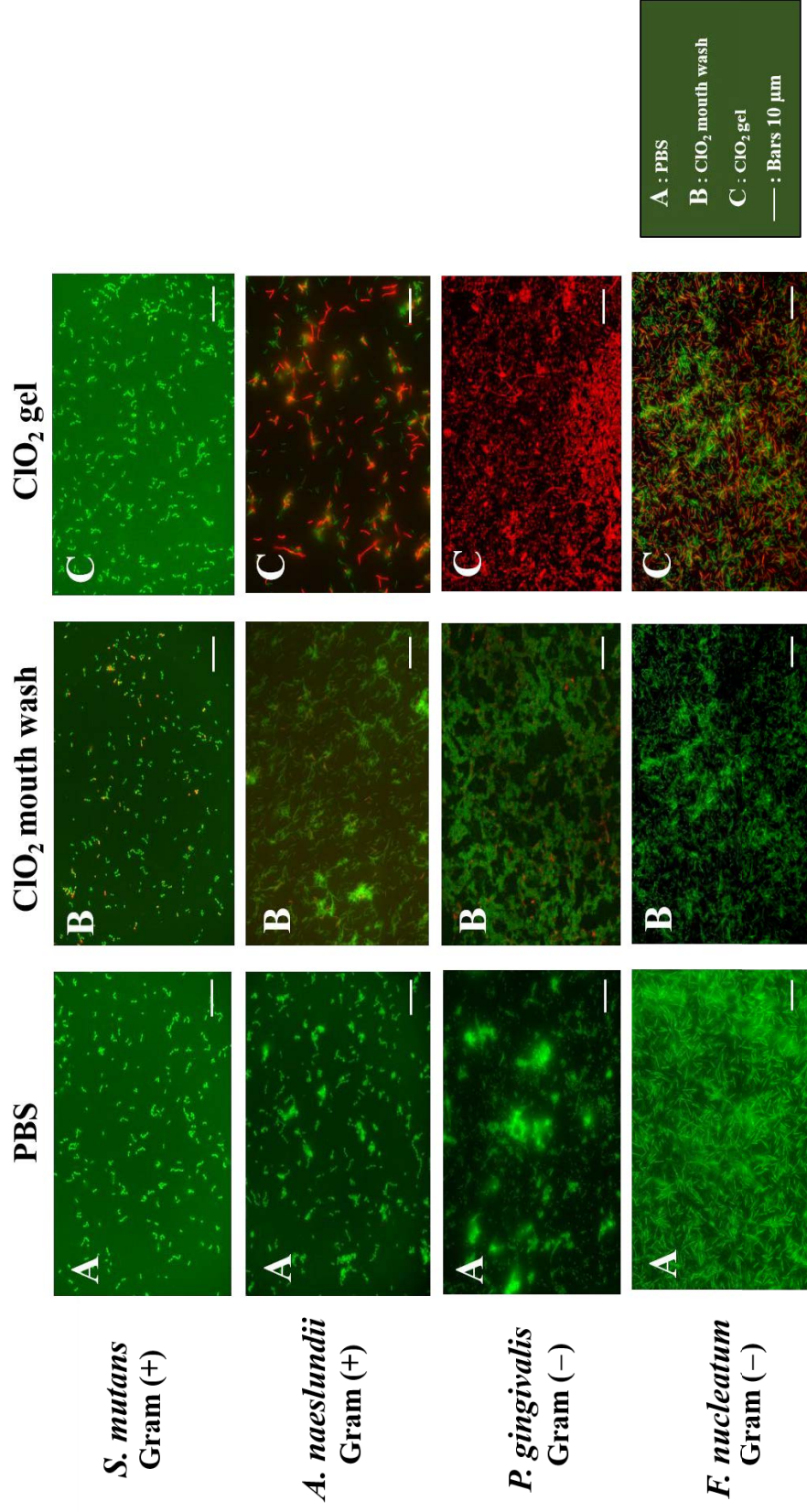


図3 亜塩素酸ナトリウム製剤のバイオフィルム抗菌効果 (Live/Dead 染色像)