



|              |                                                                             |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液の歯内療法への応用の探索                                                 |
| Author(s)    | 島岡, 毅                                                                       |
| Citation     | 大阪大学, 2024, 博士論文                                                            |
| Version Type | VoR                                                                         |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/95997">https://doi.org/10.18910/95997</a> |
| rights       |                                                                             |
| Note         |                                                                             |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液の 歯内療法への応用の探索

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 (歯科保存学講座)

(指導教官：林 美加子教授)

島岡 毅

本論文の一部は、第 157 回日本歯科保存学会 2022 年度秋季学術大会, (2022 年 11 月, 岡山) および 21st ESE Biennial Congress (2023 年 9 月, Helsinki, Finland) において発表した.

# 目次

|          |   |
|----------|---|
| 緒言 ..... | 1 |
|----------|---|

|             |   |
|-------------|---|
| 材料と方法 ..... | 6 |
|-------------|---|

1. 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液 (MA-T)
2. 供試菌株及び培養条件
3. 浮遊細菌に MA-T が与える影響
4. バイオフィーム形成に MA-T が及ぼす影響
  - 1) バイオフィームの作製
  - 2) 生菌数測定
  - 3) 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察
  - 4) クリスタルバイオレット染色
5. 形成されたバイオフィームに MA-T が及ぼす影響
  - 1) バイオフィームの作製
  - 2) 生菌数測定
  - 3) CLSM 観察
  - 4) クリスタルバイオレット染色
  - 5) 微細形態学的観察
6. 感染根管に MA-T が与える影響の検索
  - 1) *in vitro* 感染根管モデルの構築
  - 2) 生菌数測定
  - 3) CLSM 観察

4) 微細形態学的観察

7. MA-T の安全性の評価

1) 細胞の培養および細胞数の測定

2) 細胞形態観察

3) ATP 量測定

8. 統計学的解析

**結果 ..... 20**

1. 浮遊細菌に MA-T が与える影響

2. バイオフィルム形成に MA-T が及ぼす影響

3. 形成されたバイオフィルムに MA-T が及ぼす影響

4. 感染根管に MA-T が与える影響の検討

5. MA-T の安全性の評価

**考察 ..... 25**

**結論 ..... 39**

**謝辞 ..... 40**

**参考文献 ..... 41**

**図表 ..... 52**

## 緒言

細菌が固体表面に付着し細胞外マトリックスに被包され複合体を形成した状態をバイオフィルムという (1). このバイオフィルムの存在は、微生物生態に関する研究において認識され (2), 医療分野だけでなく、工業界では水処理などの産業分野における微生物汚染源として (3), また材料分野においても金属腐食の原因として注目されている. さらに食品界では食品の腐敗や食中毒の要因となっており (4), バイオフィルムが様々な分野において諸問題を引き起こすことが明らかにされている.

医療分野においては、慢性感染症の 80% 以上がバイオフィルムによるものと報告されており、心内膜炎やカテーテルに代表されるデバイスの挿入後に発症する医療器具関連感染症の原因となっている (5). バイオフィルムは抗菌薬に耐性を示し、宿主の免疫反応を回避することから治療に抵抗性を示す (6). そのため、バイオフィルムを原因とする感染症は難治性に陥りやすく慢性化しやすいため、バイオフィルム感染症は超高齢社会において解決すべき重要な課題の一つとされている (7).

口腔内においては約 700 種類もの異なる細菌が存在し (8), これらの細菌はバイオフィルムを形成し、う蝕や歯周炎といった感染性疾患を引き起こすことが明らかにされている (9). 根尖性歯周炎はう蝕に関連したバイオフィルムによ

り発症するが (10), 根管治療によって根管内の細菌数を減少させることで根尖性歯周炎は治癒する (11). 従って, 根管治療の成功には根管内を無菌化することが理想的であり, 機械的清掃と化学的清掃が重要な役割を果たしている (11). しかしながら, 機械的清掃には根管の複雑な解剖学的形態から限界が存在し, 根管追従性をもつ Ni - Ti ロータリーファイルを用いても根管内の 30% 以上は触れることすらできていないと報告されている (12, 13). これを補完するためにおこなわれるのが化学的清掃, すなわち根管洗浄である. 根管洗浄は, 機械的清掃では触れることが難しい部位に対しても洗浄液を還流させることで, 感染した歯質に対して効果的な殺菌効果をもたらすことが期待される (14).

一般的に, 根管洗浄には次亜塩素酸ナトリウム水溶液およびエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液がよく用いられるが, 主に殺菌作用を期待して用いられるのは次亜塩素酸ナトリウム水溶液であり, 日常臨床における濃度として 0.5 ~ 8.25% が使用されている (15). 次亜塩素酸ナトリウム水溶液は幅広い抗菌スペクトルを持ち, ほとんどの微生物に対する殺菌効果および強力な有機質溶解作用を有している (16). しかし, 次亜塩素酸ナトリウム水溶液は化学的安定性に欠けるため, 温度や光の影響を受けて分解されやすく, 遮光下で保存する必要がある. また, 日常臨床で用いられる 5.25% に希釈した溶液の安定性は 1 週間程度であるとの報告も存在する (17). 次亜塩素酸ナトリウム水溶液は, その

化学的特性より宿主細胞に対して高い細胞傷害性をもつことも報告されており、生体内で好中球の遊走を阻害することや線維芽細胞の細胞膜を溶解することが明らかにされている (18).

次亜塩素酸ナトリウム水溶液は、生体組織と接触すると、強力な酸化作用から血管や骨組織を破壊し急速な溶血や潰瘍を引き起こす (19). そのため、根管治療時の次亜塩素酸ナトリウム水溶液の使用による偶発症が多数報告されている (20). 軽度なものではラバーダム防湿の隙間から薬剤が漏出したことによる口腔粘膜の化学的な損傷や、衣服等へ飛散した場合の脱色や損傷が挙げられる. 重篤な症例では、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を根尖孔から溢出させることで重度の組織破壊を引き起こし、上顎洞へ溢出した場合は鼻出血および全身麻酔下での治療介入を必要とする重度の顔面痛が発現したと報告されている (19). また、下顎大臼歯では下顎管への溢出により下歯槽神経が傷害され、感覚機能および運動機能の障害により永続的な後遺症を引き起こす可能性があり (21, 22), これらの偶発症のリスクを考慮し、使用に際しては安全性への特段の配慮が必要である. さらに、次亜塩素酸ナトリウム水溶液は生体だけでなく各種材料の性質にも影響し、金属を腐食して Ni - Ti ファイルの破折リスクを増加させることや (23), 象牙質を溶解し、引張強度、曲げ強度および微小硬さが減少することが報告されている (24, 25).

これらの問題に対処するため、本研究では要時生成型亜塩素酸イオン水溶液 (MA-T : Matching Transformation System™) が次亜塩素酸ナトリウム水溶液の代替となる可能性を検討することに焦点を当てた。MA-T は大久保らによって反応メカニズムが解明された、ラジカルの発生が制御できる薬剤であり (26)、主成分として亜塩素酸イオンを含み、酸 (H<sup>+</sup>) の代わりに生体安全性の高いルイス酸を添加することで、二酸化塩素ラジカル (ClO<sub>2</sub>·) の化学平衡状態を一定濃度に維持することが可能とされている (27)。細菌やウイルスなどの反応対象物が存在する状況下で二酸化塩素ラジカルが消費されると、下記の化学平衡方程式



に従って消費された量と同等の新たな二酸化塩素ラジカルが生成される (図 1) (26, 28, 29)。また二酸化塩素ラジカルは、周囲の大量の水分子や亜塩素酸イオンと衝突し、元の亜塩素酸イオンの状態に戻ることが可能であり、一連の反応において毒性が存在する二酸化塩素ガスを生成しないとされている (29)。MA-T は、不燃性、不揮発性および非腐食性であり、水溶液中で安定していることから長期保存が可能である (30) ことが評価され、コロナ禍においての飛行機内の消毒やプロスポーツでの感染対策として、既に社会実装された実績のある消毒薬である。動物を用いた安全性試験では、急性毒性試験にて 1000 ppm で生存率に影響が無いことが報告されている (29)。また、抗菌作用に関しては、微生物の呼吸鎖を選

択し抗菌性を発揮し (28), 100 ppm という低濃度でも空気中の COVID-19 を含む各種微生物に有効であり (29), 洗口剤として使用した場合, *Streptococcus mutans* をはじめとする口腔細菌を減少させることが報告されている (31). しかしながら, これらの研究は, 全て浮遊細菌に対してのみ評価されたものであり, 臨床応用を想定し口腔バイオフィルムに対する影響を調査した報告は未だ存在しない.

そこで本研究の目的は, 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液の歯内療法への応用を念頭に, 実験的に作製した口腔バイオフィルムに対する殺菌作用と生体への安全性を検討することとした.

# 材料および方法

## 1. 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液 (MA-T)

本研究に用いた MA-T は、大阪大学大学院薬学研究科 MA-T 酸化制御学共同研究講座 安達 宏昭特任教授より供与された. 1000 ppm の MA-T を最高濃度とし、滅菌蒸留水 (大塚製薬, 東京) を用いて希釈を行い各実験に供試した.

## 2. 供試菌株及び培養条件

根尖性歯周炎との関連が報告されている (32, 33), 以下に示す細菌のバイオフィルムを実験的に作製した.

単一菌株バイオフィルムとして、大阪大学大学院歯学研究科歯科保存学講座が保有する *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 株, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 23356 株, *Parvimonas micra* GIFU 7745 株を使用した. 複合菌株バイオフィルムとして、実験の参加に同意を得たボランティアより採取した歯肉縁上プラークを使用した. プラークを採取したボランティアは、全身および口腔に異常が見られず、過去 6 ヶ月以内に抗生物質等の薬剤投与を受けていない 4 名 (男性 2 名 女性 2 名) で、年齢は 26 ~ 42

(平均  $31.5 \pm 7.1$ ) 歳であった。歯肉縁上プラークを使用した研究は、大阪大学大学院歯学研究科・歯学部および歯学部附属病院倫理審査委員会により承認の上、実施された (承認番号 H 30 – E 25)。

*E. faecalis* およびヒトプラークは、brain heart infusion (BHI) 培地 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) を用い、*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. micra* は Gifu anaerobic medium (GAM) ブイヨン (日水製薬, 東京) に  $5 \mu\text{g/ml}$  ヘミン (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) および  $1 \mu\text{g/ml}$  メナジオン (富士フイルム和光純薬, 大阪) を添加し作製した培地を用い、 $37^\circ\text{C}$ 、嫌気環境調整剤 (アネロパック・ケンキ, 三菱ガス化学, 東京) を使用した嫌気条件下で培養し、実験に使用した。

### 3. 浮遊細菌に MA-T が与える影響

96 穴丸底組織培養プレート (Becton Dickinson) を用い、各種口腔細菌に対する最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) を日本化学療法学会標準法 (34–36) に従い測定した。すなわち、96 穴丸底組織培養プレートを使用し、薬剤を連続希釈した感受性測定用培地を 1 ウェルあたり  $100 \mu\text{l}$  分注したものに最終接種菌量が約  $10^6 \text{ CFU / well}$  となるよう播種し、嫌気条件下で 24 ～ 48 時間培養した後に、細菌の発育が肉眼的に認められないウェルのうち最小の薬剤濃度を MIC とした。MIC の判定後に混濁が観察されなかったウェル

より採取した培養液を寒天培地に播種し、24 ～ 48 時間培養後に寒天培地上にコロニーが形成されなかった濃度を最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration : MBC) として決定した。実験は独立して 3 回おこなった。

#### 4. バイオフィルム形成に MA-T が及ぼす影響

##### 1) バイオフィルムの作製

バイオフィルム形成の基質として、ハイドロキシアパタイト (HA) ディスク (直径 8.9 mm × 厚さ 1.6 mm; ボーンセラム®; オリンパステルモバイオマテリアル, 東京) を用いた。HA ディスクはウシ真皮 I 型コラーゲン溶液 (Cohesion, Palo Alto, CA, USA) に 8 時間浸漬し表面処理をおこなった。*E. faecalis* は  $OD_{405} = 0.05$  に (37), *P. micra*, *F. nucleatum* および *P. gingivalis* は  $OD_{600} = 0.1$  に (38), さらにプラーク懸濁液は  $OD_{405} = 0.1$  に調整した (39)。コラーゲン処理をおこなった HA ディスクを各種細菌ならびにプラーク懸濁液中で 37 °C, 嫌気条件下で 3 日間培養した。その後, MA-T の最終濃度が 100 ppm となるよう培養液に添加しさらに 4 日間 MA-T 存在下で培養を行い, HA ディスク表面に各種細菌の MA-T の作用下でバイオフィルムを作製した。形成されたバイオフィルムは, 生菌数測定, 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察およびクリスタルバイオレット染色にて評価をおこなった。

## 2) 生菌数測定

前項 1) で形成した HA ディスク上のバイオフィルムを滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、浮遊細菌と薬液を除去した。その後、HA ディスク上のバイオフィルムを 10 ml の液体培地に回収し、回収した懸濁液を連続希釈した。各希釈液を *E. faecalis* および ヒトプラークは BHI 寒天培地上で、*F. nucleatum* および *P. micra* は GAM ブイヨンに 5 µg/ml ヘミンおよび 1 µg/ml メナジオンを添加し作製した GAM 寒天培地上に播種して、48 時間嫌気培養した。培養後、プレート上のコロニーを計測し、結果を log<sub>10</sub> コロニー形成単位 (CFU) で表した。滅菌蒸留水を対照群とし、試料数は各群 n=3 とした。

## 3) CLSM 観察

形成したバイオフィルムの 3 次元観察は、Wake らの方法 (40) に準じておこなった。すなわち、HA ディスク上に形成した各種細菌のバイオフィルムを LIVE / DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、遮光した室温下で 15 分間染色後、再び滅菌蒸留水で洗浄した。試料をスライドガラス上に固定後、CLSM (LSM 700; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて観察した。各 HA ディスクから無作為に 6 つの領域を選んで画像を保存した。得られたデータは画像解析ソフト (Imaris 9.2.1; Bitplane, Schlieren,

Switzerland) を用いて 3 次元画像を構築し、生菌と死菌の割合を算出した。滅菌蒸留水を対照群とし、各群  $n=6$  とした。

#### 4) クリスタルバイオレット染色

クリスタルバイオレット染色は Maezono らの方法 (35) に準じておこなった。すなわち、バイオフィルムを形成した HA ディスクを滅菌蒸留水にて 2 回洗浄し、浮遊細菌を除去した後、付着した細菌を 0.1% クリスタルバイオレット溶液 (Sigma Aldrich) にて 20 分間染色した。滅菌蒸留水にて 2 回洗浄した後、エタノールにて抽出し、吸光度をプレートリーダー (ARVO MX-fla; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) を用いて波長 595 nm にて測定した。滅菌蒸留水を対照群として用い、試料数は各群  $n=3$  とした。

### 5. 形成されたバイオフィルムに MA-T が及ぼす影響

#### 1) バイオフィルムの作製

各種細菌 (*E. faecalis*, *P. micra*, *F. nucleatum* および *P. gingivalis*) ならびにプラーク懸濁液を用い、37 °C、嫌気条件下で 7 日間培養し、コラーゲン処理を施した HA ディスク上にバイオフィルムを形成した。HA ディスクを滅菌蒸留水で 2 回洗浄し浮遊細菌を除去後、各種薬剤を作用させた。その後、HA ディスク上

のバイオフィルムを滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、生菌数測定, CLSM 観察, クリスタルバイオレット染色, 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察にて評価を行い, 各種薬剤が形成されたバイオフィルムに与える影響について検討した.

## 2) 生菌数測定

*E. faecalis* および *P. micra* を用いて作製したバイオフィルムに対し, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (ネオクリナー「セキネ」4 倍希釈液, ネオ製薬, 東京) をそれぞれ 1 分間作用させ, *F. nucleatum* のバイオフィルムには 1, 5, 15, 30 分間作用させた. 試料数は各群  $n = 3$  とした. ヒトプラークを用いて作製したバイオフィルムは 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液をそれぞれ 1, 15, 30, 60 分間作用させ, 試料数は各群  $n = 4$  とした. 生菌数測定は 4-2) 項と同一の手順でおこない, 滅菌蒸留水を陰性対照群として用いた.

## 3) CLSM 観察

*E. faecalis*, *P. micra*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* およびヒトプラークを用いて作製したバイオフィルムに対し, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液をそれぞれ 1 分間作用させ, さらに *F. nucleatum*, *P.*

*gingivalis* およびヒトプラークを用いて作製したバイオフィルムに対しては, 30 分間作用させた際の効果についても検討した. CLSM 観察は 4-3) 項と同一の手順で行い, 各 HA ディスクから無作為に 6 つの領域を選んで観察した. 得られたデータは画像解析ソフト (Imaris 9.2.1) で 3 次元画像を構築し, 生菌と死菌の割合を算出した. 滅菌蒸留水を陰性対照群とし, 各群  $n=6$  とした.

#### 4) クリスタルバイオレット染色

*E. faecalis* および *P. micra* のバイオフィルムに対しては, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液をそれぞれ 1 分間作用させ, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* およびヒトプラークを用いて作製したバイオフィルムは, 前述の薬剤をそれぞれ 1 および 30 分間作用させた. クリスタルバイオレット染色は 4-4) 項と同一の手順で行い, 滅菌蒸留水を陰性対照群とし, 試料数は各群  $n=3$  とした.

#### 5) 微細形態学的観察

微細形態学的観察は, Asahi らの方法 (41) に準じておこなった. *E. faecalis* および *P. micra* のバイオフィルムに対しては 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液をそれぞれ 1 分間作用させ, *F.*

*nucleatum*, *P. gingivalis* およびヒトプラークを用いて作製したバイオフィルムに対しては, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液をそれぞれ 30 分間作用させた. HA ディスク上のバイオフィルムは 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) (ナカライテスク, 京都) にて洗浄後, ハーフカルフノスキー溶液 (2% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク)・2.5% グルタルアルデヒド (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)) (pH 7.4) にて 30 分間浸漬固定し, 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液を用いて 3 回洗浄した. 続いて, 上昇エタノール系列 (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) で脱水, t - ブチルアルコール (富士フイルム和光純薬) で置換, 凍結乾燥装置 (JFD - 310; 日本電子, 東京) を用いて乾燥し, プラズママルチコーター (PMC - 5000; メイワフォーシス, 大阪) にて白金蒸着を施した. 調整した試料は, SEM (JSM - 5310LV; 日本電子) 下の観察に供し, 滅菌蒸留水を陰性対照群として用いた.

## 6. 感染根管に MA-T が与える影響の検討

### 1) *in vitro* 感染根管モデルの構築

*in vitro* 感染根管モデルの構築は Li らの方法 (42) に準じておこなった (図

2). すなわち, バイオフィルム形成の基質として, ウシ歯 (大阪南港臓器, 大阪)

を使用し、歯冠を取り除いた後に歯根の長さを 12 mm に調整し、根管拡大を 120 号 K ファイル (MANI, 栃木) を用いておこなった。根管拡大後、2.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 3 ml と 30 G 洗浄針 (Shanghai international holding, Shanghai, China) を用いて根管洗浄をおこなった。さらに 3% EDTA (スメアクリン; 日本歯科産業, 山口) と超音波装置 (UT - 306; シャープ, 東京) を用いて超音波処理を 1 分間行いスミヤー層の除去をおこなった。その後、十分量の滅菌蒸留水にて薬液を除去した。外部からの細菌感染を防止するため、歯根の外側にマニキュアを用いてコーティングし、オートクレーブ (LBS - 245; TOMY, 東京) にて滅菌した。約  $10^7$  CFU に調整した *E. faecalis* 培養液中にウシ歯を浸漬し、嫌気条件下で 3 日毎に BHI 培地を交換しながら 4 週間培養し、ウシ歯の根管内に *E. faecalis* を感染させた。感染状態の確認は、Kuremoto らの方法 (43) に準じて Taylor の Brown - Brenn 染色にておこなった。すなわち、象牙質ブロックを 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液および 10% グルタルアルデヒドで固定し、カルキトックス (富士フイルム和光純薬) にて 3 日間脱灰した。脱灰終了後、上昇アルコール系列で脱水し、パラフィン包埋をおこない、回転式ミクロトーム (RM 2155; Leica, Wetzlar, Germany) にて厚さ 8  $\mu$ m の連続切片を作製した。クリスタルバイオレット溶液を 2 分間反応させ、2% グラムヨウ素溶液 (富士フイルム和光純薬) で 1 分間染色し、水洗、乾燥後、

切片をエーテル・アセトン液 (富士フイルム和光純薬) に浸漬して脱色した。次いで、塩基性フクシン溶液 (bioMérieux, Marcy, France) を 3 分間反応させ、水洗後、アセトン・ピクリン酸溶液 (富士フイルム和光純薬) で処理し、キシレンで透徹を行い、封入した。象牙細管内の感染の状態は光学顕微鏡 (BZ - X700; KEYENCE, 大阪) にて観察した。

## 2) 生菌数測定

感染根管モデルを作製後、100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用い、Li らの報告 (42) に準じ、1, 5, 15 分の根管洗浄を実施した。すなわち、30 G 洗浄針を用い、流量 3 ml / 分に設定し、洗浄液の総量は、1 分間洗浄群は 3 ml, 5 分洗浄群は 15 ml, 15 分間洗浄群は 45 ml 使用した。その後、根管内を 3 ml の滅菌蒸留水で洗浄し、80 号滅菌ペーパーポイント (VDW, Munich, Germany) を用いて根管内の細菌を採取し、10 ml の BHI 培地に回収し、ペーパーポイント群とした。また、ペーパーポイントを用いて根管内の細菌を採取した後、滅菌蒸留水を根管内に満たし、60 号 H ファイル (MANI) を用いて全周ファイリングをおこなった。その後、マイクロピペット (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて削片を含む滅菌蒸留水 200  $\mu$ l を 800  $\mu$ l の滅菌蒸留水に回収し全周ファイリング群とした。連続希釈後、

各希釈液を BHI 寒天培地上で、48 時間嫌気培養した。培養後、プレート上のコロニーを計測し、結果を  $\log_{10}$  CFU で表した。滅菌蒸留水を陰性対照群とし、試料数は各群  $n=3$  とした。

### 3) CLSM 観察

100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて、それぞれ 1 および 15 分間根管洗浄をおこなった。その後、カミソリ刃（フェザー、岐阜）と槌を用い、歯根中央部分の歯軸方向に長径 4 mm の象牙質ブロックを作製し、さらに垂直方向に分割することで、観察試料を作製した（図 2f, g）。得られた象牙質試料を滅菌蒸留水で洗浄し、LIVE / DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit を使用して遮光した室温下で 15 分間染色後、倒立型 CLSM (LAX R with NSPARC; Nikon, 東京) を用いて横断面を無作為に 3 つの領域を選んで観察した。得られたデータは画像解析ソフト (Imaris 9.2.1) で 3 次元画像を構築し、生菌と死菌の割合を算出した。滅菌蒸留水を陰性対照群とし、各群  $n=3$  とした。

#### 4) 微細形態学的観察

100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用い、それぞれ 1 および 15 分間根管洗浄をおこなった後に前項 3) と同様に歯根を分割した。さらに SEM 観察は 5-5) 項と同一の手順で試料を作製し、SEM を用いて微細形態学的観察に供した。滅菌蒸留水を陰性対照群とした。

### 7. MA-T の安全性の評価

#### 1) 細胞の培養および細胞数の測定

MA-T が宿主細胞に与える影響は、細胞形態観察および ATP 量測定にて評価した。ラット骨芽細胞 (UMR - 106; フナコシ, 大阪) およびヒト歯根膜線維芽細胞 (hPLFCs, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) を用いて、MA-T が宿主細胞に与える影響について評価した。細胞培養は 10% ウシ胎仔血清 (FBS, Thermo Fisher Scientific), 1% ペニシリン - ストレプトマイシン溶液 (富士フイルム和光純薬) を添加した 1.0 g / l グルコース含有 Minimum Essential Medium  $\alpha$  ( $\alpha$  - MEM, ナカライテスク) を増殖用培地として用い、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 気相にて培養をおこなった。培地の交換は 3 日毎におこなった。

細胞培養ディッシュ (IWAKI, 東京) にてセミコンフルエントまで培養後、Dulbecco's phosphate - buffered saline (D - PBS, 富士フイルム和光純薬) で洗浄し、

Trypsin / EDTA 溶液 (TrypLE Select; Thermo Fisher Scientific) を 3 分間作用させ細胞を回収した。その後、遠心分離 (1200 rpm, 5 分間) を行い、上清を除去して得られた細胞を 1 ml の  $\alpha$  - MEM 培地に懸濁し、細胞数を測定した。細胞数の測定は自動細胞数測定器 (Countess 3 FL; Thermo Fisher Scientific) を用いておこなった。

## 2) 細胞形態観察

6 穴組織培養プレート (IWAKI) に  $1.0 \times 10^4$  cells / well ずつ細胞を播種し、5 日間、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 気相下で培養をおこなった。細胞培養液を除去後、D - PBS にて洗浄をおこない、100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いてそれぞれ 1, 5, 10 分間作用させた。その後、D - PBS にて洗浄し、 $\alpha$  - MEM 培地 3 ml を添加した。培養倒立型顕微鏡 (TS100; Nikon) を用い、40 倍で細胞形態を観察した。陰性対照群として滅菌蒸留水を使用し、実験は独立して 3 回おこなった。

## 3) ATP 量測定

蛍光・発光測定用 96 穴組織培養プレート (Corning, Corning, NY, USA) に  $1.0 \times 10^4$  cells / well ずつ細胞を播種し、24 時間、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 気相下で培養をお

こなった. 培養液を除去後, D - PBS にて洗浄をおこない, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm MA-T および 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いてそれぞれ 1, 5, 10 分間作用させた. D - PBS で洗浄し, 滅菌蒸留水 100  $\mu$ l および ATP 測定試薬 (Cell Titer - Glo; Promega, Madison, WI, USA) 100  $\mu$ l を添加し, 室温・遮光下で 15 分間反応させた. その後, 生細胞より放出された ATP をマルチプレートリーダー (GloMax<sup>®</sup> Explorer Multimode Microplate Reader; Promega) を用いて測定した. 滅菌蒸留水を陰性対照群とし, 試料数は各群  $n = 3$  とした.

## 8. 統計学的解析

統計学的解析には IBM SPSS Statistics ソフトウェア (IBM, Chicago, IL, USA) を使用した. Shapiro - Wilk test を用いて得られたデータが正規分布していることを確認し, 2 群間の比較は Student's  $t$  - test, 多群間の比較は One - way ANOVA および Tukey's HSD post hoc test を用いて統計解析をおこなった ( $\alpha = 0.05$ ).

# 結果

## 1. 浮遊細菌に MA-T が与える影響

供試した各種細菌に対する MA-T の MIC および MBC を表 1 に示した. MA-T の各種細菌に対する MIC と MBC はそれぞれ 3.9 ~ 15.6 ppm, 3.9 ~ 31.3 ppm であり, いずれの細菌種においても, 比較的近似した MIC および MBC 値を認めた.

## 2. バイオフィーム形成に MA-T が及ぼす影響

MA-T は生菌数測定において, バイオフィーム形成時の細菌の増殖を抑制した ( $p < 0.01$ ) (図 3a). CLSM 観察では, 供試した各菌株において対照群の生菌率は 90% 以上を示した. MA-T 添加群では 3 次元画像においてバイオフィーム中の死菌が増加し, 20% 以下まで生菌率が減少した ( $p < 0.01$ ) (図 3b, 4). クリスタルバイオレット染色によりバイオフィーム総量を定量すると, MA-T はバイオフィーム量を有意に抑制し, 細菌種に関わらずバイオフィームの形成を抑制した ( $p < 0.05$ ) (図 3c).

### 3. 形成されたバイオフィルムに MA-T が及ぼす影響

MA-T は実験に用いたすべての濃度において, *E. faecalis* および *P. micra* バイオフィルムに対し, 1 分間作用させることで陰性対照群と比べ生菌数を有意に減少させた ( $p < 0.05$ ) (図 5a). MA-T の濃度が上昇するとより強力な殺菌効果を示し, 1000 ppm MA-T は次亜塩素酸ナトリウム水溶液と同等の殺菌効果を示した (図 5a). *F. nucleatum* に対しても, MA-T はすべての濃度において, 5 分以上作用させることで生菌数を有意に減少させた ( $p < 0.05$ ) (図 5b). 歯肉縁上プラークより作製した複合菌株バイオフィルムでは, 15 分以上作用させることで, すべての濃度の MA-T によりバイオフィルム細菌の生菌数の有意な減少を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 5c). CLSM 観察では, 供試した各菌株において対照群は大部分が生菌で構成されていた. 一方, 各種濃度の MA-T を 1 分間作用させた群のバイオフィルムは, ヒトプラークと *F. nucleatum* 以外は, 死菌が有意に増加し, 生菌数測定と同様に濃度を上昇させることによって死菌率の増加を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 6a, b). 各種濃度の MA-T による 1 分間の作用により効果が認められなかったヒトプラークおよび MA-T による影響が少なかった *P. gingivalis* および *F. nucleatum* は, 30 分間 MA-T を作用させることにより 1 分間作用時と比べ, それぞれ生菌率が 60% 以上減少し, すべての濃度の MA-T でバイオフィルム内の死菌が有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (図 7a, b). 次亜塩素酸ナ

トリウム水溶液を作用させた群では, *E. faecalis*, *P. micra* および *P. gingivalis* において, バイオフィルムが溶解されて観察が困難となり, *F. nucleatum* およびヒトプラークでは, バイオフィルム細菌を殺菌した (図 6).

クリスタルバイオレット染色によるバイオフィルム総量の定量および SEM による微細形態学的観察の結果, バイオフィルム総量は, MA-T はいずれの濃度においても対照群と有意な差は認めず, さらに, バイオフィルムのマトリックス構造や菌体に形態学的変化は認めなかった. (図 8, 9) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液ではバイオフィルム量が減少し, CLSM 観察と同様にバイオフィルムが溶解し, 表出した HA 粒子のみが観察され, SEM での形態観察をおこなうことが困難であった (図 8, 9).

#### 4. 感染根管に MA-T が与える影響の検討

ウシ歯と *E. faecalis* を用いて感染根管モデルを作製し (図 2), 象牙細管内の感染の状態を Brown - Brenn 染色にて観察した結果, *E. faecalis* が象牙細管内に最大で 470  $\mu\text{m}$  まで侵入することが確認された (図 10). 感染根管モデルに対し根管洗浄を行った結果, ペーパーポイント群においては, 実験に用いたすべての濃度の MA-T で1 分間以上根管洗浄をおこなうことで, 陰性対照群と比較し根管内の細菌を有意に減少させた ( $p < 0.05$ ) (図 11). また, 全周ファイリング群

では, MA-T 500 ppm を用いて 5 分間根管洗浄をおこなうことで, 対照群と比較して根管内の細菌を有意に減少させた. ( $p < 0.05$ ) (図 11b). 1000 ppm MA-T を用いて 15 分間根管洗浄をおこなうことにより, ペーパーポイント群および全周ファイリング群のいずれにおいても根管内の細菌が検出されなくなり, 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に匹敵する根管内細菌の減少を認めた (図 11).

また, CLSM 観察においては 1 分間根管洗浄をおこなっても根管内の細菌は減少しなかったが, 生菌数測定と同様に 15 分間根管洗浄をおこなうことで対照群と比較し, 全濃度の MA-T で根管内細菌を有意に減少させた ( $p < 0.05$ ) (図 12, 13). 次亜塩素酸ナトリウム水溶液では, 1 分間の根管洗浄により対照群と比較して有意な根管内細菌の減少を認め, 95% 以上が死菌であった ( $p < 0.05$ ) (図 12, 13).

SEM を用いた微細形態学的観察では, MA-T はいずれの濃度においても 15 分間洗浄することで, 対照群と比較し, 根管壁に付着しているバイオフィルムが減少していた (図 14). 一方, 次亜塩素酸ナトリウム水溶液では 15 分間の洗浄により, 象牙細管開口部の開大および象牙質の脆弱化といった根管象牙質の過脱灰を認めた (図 14).

## 5. MA-T の安全性の評価

濃度の異なる MA-T を，ラット骨芽細胞およびヒト歯根膜細胞に作用させて形態観察した結果，いずれの濃度でも対照群と同様の形態を示し，細胞形態に変化を認めなかった．一方，次亜塩素酸ナトリウム水溶液では，細胞の溶解のために観察することができなかった (図 15, 16)．また，ATP 量測定では，MA-T を細胞に作用させた場合，いずれの濃度においても対照群と比べ ATP 量は有意に低く，次亜塩素酸ナトリウム水溶液と比べ有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ ) (図 17)．

## 考察

本研究は新規消毒薬 MA-T を歯内療法に応用するために、口腔バイオフィルムおよび *in vitro* 感染根管モデルを用いて、その抗菌効果と宿主細胞への傷害性を初めて評価したものである。その結果、MA-T は浮遊細菌に対する強力な抗菌性およびバイオフィルム形成抑制効果を認め、形成されたバイオフィルムに対してはバイオフィルムの構造を変化させず、バイオフィルム細菌に対し抗菌効果を発揮することが明らかとなった。また感染根管モデルにおいても根管内細菌の減少を認めた。さらに MA-T の宿主細胞への影響を調査したところ、次亜塩素酸ナトリウム水溶液と比較して低い細胞傷害性を持つことが明らかとなった。

一般的に、バイオフィルムの形成過程は、まず浮遊細菌が固体表面に付着し、マイクロコロニーを形成する。その後、クオラムセンシング等による菌体間相互作用を介してバイオフィルム内の細菌が増殖し、菌体外多糖を産生することでバイオフィルムが形成される (44)。このように、バイオフィルム形成過程は大きく分けて最初の浮遊細菌の状態、固体表面への付着、およびバイオフィルムの成熟の 3 つの段階に区分される。本研究において MA-T の抗バイオフィルム効果を検証するために、これらの各段階においての評価が必要であると考

え、3つの段階における MA-T の効果について検討した。まず始めに評価した MIC および MBC は、浮遊細菌の増殖を抑制するために必要な薬剤の濃度と、細菌を完全に死滅させるために必要な薬剤の濃度を示す指標である。本研究において、MA-T の浮遊細菌に対する MIC および MBC は、供試したいずれの細菌に対しても表 1 に示すように近似した値を認め、抗菌薬として高い効果を持つことが示された。MA-T は、*E. faecalis* RIMD 3116001 株に対する MIC が 5 ppm, MBC が 5 ppm, *P. gingivalis* W83 株の MIC が 20 ppm, MBC が 20 ppm と報告されており (29), 本研究においても同程度の MIC および MBC が得られた。他の消毒薬との比較に関しては、本研究と同じ細菌種を用いておこなわれた先行研究において、次亜塩素酸ナトリウム水溶液の MIC が 0.78 ～ 12.5 ppm, MBC が 0.78 ～ 12.5 ppm と報告され (36), 次亜塩素酸ナトリウム水溶液がより低い値を示し、浮遊細菌に対して MA-T と比較しより強力な殺菌効果を示すことが明らかとなっている。以上の結果より、MA-T は次亜塩素酸ナトリウム水溶液と比較し、殺菌力は劣るが、MIC および MBC が近似していることから十分な殺菌力をもつ消毒薬として十分に使用できると考えた。

また、MA-T はバイオフィルム形成を有意に抑制した (図 3)。この抑制効果は、生菌数測定、CLSM 観察およびクリスタルバイオレット染色とバイオフィルム形成に対する影響を観察するために実施したすべての実験で確認された (図 3,

4). *P. gingivalis* および *F. nucleatum* は MA-T によりバイオフィルム形成抑制効果を認めたが、本研究で供試したその他の細菌種と比較し、その抑制効果が小さかった (図 3c). この 2 菌株は供試した他の単一菌株の細菌と比較し、細菌の増殖に時間を要するため、十分なバイオフィルム形成ができず、抑制効果が小さく留まった可能性がある. 生菌数測定は、通常では培養が困難であるが、まだ生存している状態、いわゆる viable but non - culturable (VBNC) 状態の細菌が検出できないと報告されている (45). 外部からのストレスや環境条件により、VBNC 状態にある細菌は通常の増殖能力を喪失し、通常の培養法では検出が困難であるが、生命活動は維持されている. 一方、CLSM 観察は VBNC 状態の細菌を評価することが可能であり、バイオフィルムを立体的に評価する手段として有用であるとの報告がある (46). ただし、CLSM 観察による評価では生存細菌が死菌と過剰評価される可能性がある (47) ため、本研究では生菌数測定と CLSM 観察の両方をおこなうことで、お互いの評価手法の弱点を補完し、バイオフィルム中の細菌を総合的に評価した. 本研究においても生菌数測定で検出されなかった細菌が CLSM 観察で検出されており、これまでの報告と一致する結果となった. 従って、バイオフィルム細菌の状態を評価するには生菌数測定と CLSM 観察を用いて複合的に評価をおこなう必要があると考える.

形成されたバイオフィルムへの MA-T の影響については、生菌数測定および

CLSM 観察においてバイオフィルム細菌に対して殺菌効果を発揮した (図 5-7). バイオフィルムは浮遊細菌の状態と比べ、抗菌薬や消毒薬に抵抗性を示すと報告されており (48, 49), 本研究においても *F. nucleatum* では浮遊細菌に対する MA-T の MIC が 7.8 ppm であるのに対し、バイオフィルム細菌は 1000 ppm で抑制されるのが観察され、バイオフィルムを抑制するために必要な薬剤濃度は浮遊細菌に比べ 100 倍以上高く、過去の報告と同様の傾向を示すことが確認された. また, *F. nucleatum* およびヒトプラークを用いて形成したバイオフィルムは MA-T に浸漬した場合, 1 分間では効果を示さず, *F. nucleatum* では 5 分以上の浸漬で抗菌効果を認め, ヒトプラークにおいては 15 分以上の浸漬により抗菌効果を認めた (図 5b, c). 一方で, *E. faecalis* および *P. micra* は 1 分間の浸漬で抗菌効果を認め (図 5a), この細菌種による MA-T の効果の差は各菌種におけるバイオフィルム構造の違いによるものであることが考えられる. クリスタルバイオレット染色の結果より, *F. nucleatum* とプラークでは, 菌体やその他構成成分を含めたバイオフィルム総量は本研究で供試したその他の細菌種と比較し, 5 倍以上高い値を示した (図 8). *Fusobacterium* 属は 長径 3 ~ 10  $\mu\text{m}$  と菌体自体が大きいことから, その他の細菌に比べ形成されるバイオフィルム総量が多くなったと考えられる. 同様に, ヒトプラークに関しても様々な細菌種で構成されていること (50) や, 単一菌株のバイオフィルムと比べて菌体外多

糖がより多く産生されること (51) によって, MA-T の浸透に時間を要した可能性が考えられる. しかしながら, 本研究ではクリスタルバイオレット染色を用いたバイオフィルム総量の定量しかおこなっていないため, 菌体外多糖に代表されるバイオフィルムの各構成成分に及ぼす影響については今後さらなる検討が必要である.

ところで, バイオフィルム細菌の生菌数が MA-T により抑制された条件であっても, クリスタルバイオレット染色において, バイオフィルム総量の有意な減少は認められず, さらに, 微細形態学的観察 (SEM) においても細菌の形態に変化は認められなかった (図 8, 9). その理由として以下の点が考えられる. MA-T の主成分である二酸化塩素は, 菌体外多糖に影響を与えず, バイオフィルム内に浸透し, バイオフィルム細菌にのみ抗菌効果を発揮することが知られている (52, 53). また, バイオフィルム細菌に対しての殺菌メカニズムとして, タンパク質の構成要素であるチロシンやトリプトファンを特異的に標的とすると考えられている (54), これらからも, MA-T は, バイオフィルム細菌の形態に影響を与えず, 内部に存在するバイオフィルム細菌のみ殺菌作用を発揮したと考察した.

MA-T のバイオフィルム細菌への殺菌メカニズムに関しては, MA-T はグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の呼吸鎖を標的とし抗菌作用を発揮することが

報告されており (28), 本実験で供試した各種細菌およびプラークを用いて作製したバイオフィルムに対しても MA-T はバイオフィルム細菌の持つ呼吸鎖を構成するタンパク質を変性させたことで, 生命維持に必要な ATP を産生することができなくなり殺菌されたと考える。しかしながら, その他の細胞膜上および細胞内に存在するタンパク質や細胞小器官への影響は本研究では調査できておらず, MA-T のバイオフィルム細菌に対する詳細な殺菌メカニズムの解明については今後さらなる検討が必要である。

一方, 本研究に用いた 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の抗菌活性は, 既存の報告 (42) と一致しており, 1 分間の作用でバイオフィルム総量の減少と完全な殺菌効果を認めた (図 4-6, 8)。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は pH 12 と強いアルカリ性であり, 細胞を溶解するため (55), 本研究における高い殺菌効果とバイオフィルム総量の減少に寄与したと考えられる。先述の浮遊細菌への影響と同様に, 次亜塩素酸ナトリウム水溶液は, 安定性は低いものの, MA-T と比べて強力な殺菌性と抗バイオフィルム効果を持つことが示された。

本研究では, 実験的に作製した *in vitro* のバイオフィルムに加え, より臨床実態に近い感染根管に対し MA-T が及ぼす影響を検討するため, 簡便に感染根管が作製でき, また動物を用いたモデルよりその効果をより単純に検証しやすい, ウシ歯に *E. faecalis* を感染させた単一菌株感染根管モデルを採用した。ヒト歯

を用いて感染根管モデルを作製することは理想的であるが、歯根長および形態を含めたサンプルの条件を標準化することが困難であるため、本研究においてヒト歯を使用することは断念した。ウシ歯はヒト歯の象牙質と形態、物理的特性、化学組成が類似しているため (56, 57)、実験的にウシ歯を用いた感染根管モデルは歯内療法に用いる材料の評価系として頻用されている (58)。今回のウシ歯を用いた感染根管モデルでは、*E. faecalis* が象牙細管内に最大で 470  $\mu\text{m}$  まで侵入することが確認された (図 10)。先行研究では、ヒト抜去歯に *E. faecalis* を感染させた際に最大で 420  $\mu\text{m}$  の侵入を認めたと報告されており (59)、本研究と近似した結果となった。

さらに *E. faecalis* は難治性根尖性歯周炎から高頻度に検出される細菌であり、実験的にモデルを作製する際に頻用される代表的な細菌である (32, 58) ことより、本研究でも使用した。しかし、実際の臨床における根尖性歯周炎は口腔内の混合感染によって発症するため (60)、根尖性歯周炎を発症する感染根管の複雑性を完全に再現されていないことが課題として挙げられる。今後、*ex vivo* 複合菌株感染根管モデルを作製し、MA-T の効果をさらに実際の環境に近い条件で明らかにすることが必要である。

本実験において、*in vitro* 感染根管モデルの生菌数測定では、試料としてペーパーポイントと全周ファイリングから得られた削片を用いた。ペーパーポイント

を用いて根管内細菌を回収する方法は、従来臨床において根管内の感染状態を評価するための根管内細菌培養検査に用いられるとともに、根管内細菌を検出する実験方法としても用いられている (58, 61). しかし、このペーパーポイントを用いた根管内細菌の回収方法は、根管内の浮遊細菌しか回収できていない可能性や、採取する場所によって細菌数が変化することも報告されている (58, 61). そこで今回は、ペーパーポイントによる根管内細菌の釣菌に加え、根管内を全周ファイリングし、削片を回収することで得られる同一歯の象牙細管内に侵入している細菌に対する評価も併せておこなった. この実験において、ペーパーポイント群、全周ファイリング群のいずれの回収方法においても、洗浄時間を延長することにより MA-T は強力な殺菌効果を示した. しかしながら、検出される細菌量はペーパーポイント群と全周ファイリング群では差があり、ペーパーポイント群では MA-T を 1 分間作用させることによって対照群に比較し有意に細菌数が減少していることが認められたが、全周ファイリング群では有意差が認められなかった (図 11). そのため、ペーパーポイント群による細菌回収は本来根管内および象牙細管に感染している細菌を十分に評価できていない可能性があり、むしろ薬剤の効果が過大評価される可能性が示された.

さらに本研究では、ウシ歯を用いた *in vitro* 感染根管モデルにて根管内に存在する細菌に対する MA-T の効果を評価するために、生菌数測定に加えて

CLSM 観察も実施した。その結果, CLSM 観察においても生菌数測定と同様に, 洗浄時間を延長することで死菌の増加を認めたことから, MA-T は象牙細管内の細菌への殺菌効果を有し, 作用時間を長くすることでその効果がより発揮される可能性が示された (図 12, 13). 本研究の結果より, ウシ菌を用いた *in vitro* 感染根管モデルにおける根管内細菌の評価は, ペーパーポイントによる釣菌だけでは不十分であることが明らかとなり, 全周ファイリングによる根管内細菌の回収に加えて CLSM 観察にて評価をおこなうことが妥当だと考える。

また, 本研究で 各種細菌を MA-T 存在下で長時間作用させた際に強力な抗バイオフィルム効果を認めたことから, MA-T はバイオフィルムに対し, 時間依存的に作用する可能性を示した。この結果より, MA-T が根管洗浄剤だけでなく, 将来的には根管貼薬剤としても有用である可能性が示唆された。実際の根管貼薬を想定し, 数日から 1 ヶ月といった長期間に渡り MA-T を作用させた際の影響については本研究では評価していないため, 今後さらなる検討が必要である。

今回の *E. faecalis* を用いた感染根管モデルにおける根管内細菌の生菌数測定および CLSM 観察において, MA-T は根管内細菌を抑制した (図 11-13). しかし SEM 観察の結果より, MA-T の根管洗浄後も根管壁にバイオフィルム様構造物が残存していた (図 14). 根尖性歯周炎は, 根管内の細菌数を一定数減少さ

せることによって治癒することが知られており (62), 根管内の細菌が減少するほど治癒につながると考えられる. ラットを用いて実験的に惹起した根尖性歯周炎においても, 感染根管治療をおこなった際に根管内の細菌数を 75% 以上減少させることにより根尖病変は治癒傾向を示すことが報告されている (63). そのため, 実際の臨床での感染根管治療において, 根管内の細菌を減少させることは治癒に必須であり, 根管内細菌を完全に駆逐することが理想的である. 一方で, 初期の速やかな生体の治癒を促進するためには, 根管内の細菌量を一定程度まで減少させることも, 臨床的には意義がある (62).

本研究では, 100 ppm の MA-T を用いて 15 分間根管洗浄することにより 75 % 以上の根管内細菌の減少を認め, 治癒に向かうとされている根管内細菌の減少を達成することができた. 15 分間という作用時間は, 単純なシリンジ洗浄の時間としては長い, 機械的清掃および根管拡大時に根管内に MA-T を満たすことで, その作用時間を確保できると考える. 根管拡大時の作業時間は 30 分であるという報告 (14, 64) から, 100 ppm の MA-T を 15 分間使用することは臨床的に可能であると考えられる. MA-T を 1 分間作用させた際に *in vitro* バイオフィルムに比べてウシ歯を用いた *in vitro* 感染根管モデルでの生菌率が高かったが (図 6, 13), これはバイオフィルムの形成期間が感染根管モデルではより長く, さらに, バイオフィルムを形成させる基質が *in vitro* モデル

では細管構造を持たない HA ディスクを用いているのに対し, *in vitro* モデルでは象牙細管を持つウシ歯を使用したため, これらの差が影響したと考える. 今後, MA-T を根管洗浄剤として評価する場合, より正当にその効果を判定するには, *ex vivo* 感染根管モデルにて複合菌種のバイオフィルムを用いて評価をおこなうことが必要であると考え.

今回の研究結果より, 根管内の細菌は MA-T により抑制されたが, そのバイオフィルムは残存していた (図 11-14). これまでに, 根管の機械的清掃時に器具で触れられない部位に細菌が残存することが報告されており (14), 残存した細菌は再増殖を引き起こす可能性があるため (65), 根管壁に付着する細菌は除去することが望ましい. 実際の根管治療では, 様々な根管洗浄方法が応用され, 効率よくバイオフィルムならびにスミヤー層を除去することが試みられている. 近年, 歯の保存および歯根破折の予防を目的とした最小限の侵襲による歯内療法である *minimally invasive endodontics* (MIE) の考えが提唱されている (66, 67). MIE は歯質の保存を念頭に入れ, 髄腔開拡および機械的拡大を最小限におこなうため, 根管内に感染源が残存する可能性が従来の拡大方法より高くなる (68). この欠点を補うため, 感染源を効率的に除去するための新規根管洗浄方法の一例として, レーザーを用いた根管洗浄に関する研究が多数報告されている (69-71). ただし, レーザーによる根管洗浄は, 洗浄剤が根尖孔外へ溢出する危険性

があるため (72), 生体安全性を兼ね備えた根管洗浄剤の使用が必須となる. 今回, MA-T と Er : YAG レーザーを併用し, ウシ歯感染根管モデルを用いて根管洗浄をおこなった結果, 根管壁に付着したバイオフィルムをレーザー未併用の 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液と同等に除去できた (データ示さず). このため, 本研究において MA-T を用いた洗浄で残存したバイオフィルムに対しては, レーザーあるいは超音波の併用や, 光照射による薬液の活性化 (73) など, 他の方法と組み合わせることで, MA-T によるバイオフィルムの除去をシリンジ洗浄の単独使用よりさらに短時間かつ効率的におこなうことができると考えている. 今後, MA-T と他の洗浄方法を併用した際の最適な使用条件について検討する予定である.

MA-T の安全性については, 100 ～ 3000 ppm の MA-T を 1 ヶ月間マウスに経口投与をおこなった際に, 生存率に差がなかったことが報告されている (27). また, 臨床研究において口腔ケアジェルとして使用した場合も 100 ppm の MA-T は副作用が出現することなく使用可能であった (74). MA-T の主成分である二酸化塩素は, 摂取を含むさまざまな用途での安全性が示されており (75), 反応拡散系を用いて解析をおこなった結果, 二酸化塩素は細胞よりも細菌等のサイズの小さい生物を優先的に殺傷することが報告されており (52), 以前より欧米では水道水などに添加されている消毒薬である (76). 本研究では根管

洗浄に MA-T を用いた際に宿主細胞に与える影響を検討するために、根尖部周囲組織に存在する骨芽細胞および歯根膜細胞を用いて生体安全性について検討した。

ラット骨芽細胞およびヒト歯根膜細胞に対し濃度の異なる MA-T を作用させた場合、MA-T では、陰性対照群と比較し細胞形態に差は認められなかった。しかし、MA-T の形成されたバイオフィルムへの影響と同様に、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を作用させた際には細胞が溶解し、観察が困難であった (図 15, 16)。宿主細胞に各種薬剤を作用させ、細胞の ATP 量を測定すると MA-T は陰性対照群である蒸留水より低く、次亜塩素酸ナトリウム水溶液より高い ATP 量を認めた (図 17)。以上の結果から、MA-T は次亜塩素酸ナトリウム水溶液と比較し、細胞への影響が少なく安全に根管治療へ応用できる可能性が示された。MA-T 処理により、宿主の細胞形態に変化を認めず ATP 量に変化が起きた結果に関しては、二酸化塩素水溶液は細胞の DNA を傷害し、細胞周期に影響を与えるという報告 (77) が存在することから、MA-T は細胞の DNA を損傷させ、対照群と比較し ATP 量を減少させたと考えられる。今回実験に用いたラット骨芽細胞とヒト歯根膜細胞の MA-T に対する感受性の差に関しては、二酸化塩素は癌細胞の増殖を抑制すると報告されており (78)、癌化細胞であるマウス骨芽細胞は、MA-T の感受性が高くなった可能性が考えられる。しかしながら、詳

細なメカニズムについては現在のところ未解明であり、今後さらなる検討が必要である。

本研究より、MA-T がバイオフィルムに対する明らかな抗菌活性を持ち、生体安全性を兼ね備え、根管洗浄剤をはじめとする歯内療法に応用できる可能性が示された。一方、MA-T を用いた実際の根管治療方法については、他の洗浄方法との併用も含め、さらなる検討が必要である。

## 結論

本研究では, MA-T が口腔バイオフィルムならびに生体に及ぼす影響を検討し, 以下のような結論を得た.

- 1 MA-T は浮遊細菌に対し強力な抗菌効果を示し, バイオフィルム形成を抑制した.
- 2 MA-T は形成されたバイオフィルム中の細菌を抑制したが, バイオフィルム構造には変化が認められなかった.
- 3 MA-T は感染根管モデルを用いて検出される細菌量を減少させた.
- 4 MA-T は次亜塩素酸ナトリウム水溶液と比べ低い細胞傷害性を示した.

以上より, MA-T はバイオフィルム細菌ならびに根管内のバイオフィルムに対し抗菌効果を示し, 生体安全性も備えた新たな根管洗浄剤として臨床応用できる可能性が示された.

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を実施する機会を与えて頂き、御指導と御高閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科歯科保存学講座 林 美加子教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始変わらぬ御指導を賜りました前園葉月博士、高橋雄介博士に心から感謝致します。最後に、本研究に対し様々な御援助、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科歯科保存学講座の諸先生方に深く感謝致します。

## 参考文献

- 1 . Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49:711-745.
- 2 . Marshall KC, Stout R, Mitchell R. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J Gen Microbiol.* 68:337-348.
- 3 . Beech IB, Sunner J. 2004. Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr Opin Biotechnol.* 15:181-186.
- 4 . Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Saraiva A, Raposo A. 2021. Microbial biofilms in the food industry-a comprehensive review. *Int J Environ Res Public Health.* 18:18042014.
- 5 . Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. 2014. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 78:510-543.
- 6 . Soares A, Roussel V, Pestel-Caron M, François M, Bouffartigues C, Chevalier S, Etienne M. 2019. Understanding ciprofloxacin failure in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: persister cells survive matrix disruption. *Front Microbiol.* 10:02603.
- 7 . Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2:114-122.
- 8 . Deo PN, Deshmukh R. 2019. Oral microbiome: unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol.* 23:122-128.

- 9 . Washio J, Takahashi N. 2016. Metabolomic studies of oral biofilm, oral cancer, and beyond. *Int J Mol Sci.* 17:17060870.
- 1 0 . Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. 1965. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 20:340-349.
- 1 1 . Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M. 2000. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various Medications. *J Endod.* 26:751-755.
- 1 2 . Peters OA, Peters CI, Schönenberger K, Barbakow F. 2003. ProTaper rotary root canal preparation: effects of canal anatomy on final shape analysed by micro CT. *Int Endod J.* 36:86-92.
- 1 3 . Peters OA, Schönenberger K, Laib A. 2001. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J.* 34:221-230.
- 1 4 . Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. 2014. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 216:299-303.
- 1 5 . Boutsoukis C, Arias-Moliz MT. 2022. Present status and future directions irrigants and irrigation methods. *Int Endod J.* 55:303-321.
- 1 6 . Segu A, Bijukumar D, Trinh T, Pradhan MN, Xie Q, Cortino S, Mathew MT. 2018. Total eradication of bacterial infection in root canal treatment: an electrochemical approach. *ACS Biomater Sci Eng.* 4:2623-2632.

- 1 7 . Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. 2003. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. J Endod. 29:562-564.
- 1 8 . Heling I, Rotstein I, Dinur T, Szwec-Levine Y, Steinberg D. 2001. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions *in vitro*. J Endod. 27:278-280.
- 1 9 . Zhu WC, Gyamfi J, Niu LN, Schoeffel GJ, Liu SY, Santarcangelo F, Khan S, Tay KCY, Pashley DH, Tay FR. 2013. Anatomy of sodium hypochlorite accidents involving facial ecchymosis-A review. J Dent. 41:935-948.
- 2 0 . Shetty SR, Al-Bayati SAF, Narayanan A, Hamed MH, Abdemagyd HAE, Shetty P. 2020. Sodium hypochlorite accidents in dentistry. A systematic review of published case reports. Stomatologija. 21:17-22.
- 2 1 . Guivarc'h M, Ordioni, U, Ahmed HMA, Cohen S, Catherine JH, Bukiet F. 2017. Sodium hypochlorite accident: A systematic review. J Endod. 43:16-24.
- 2 2 . Hatton J, Walsh S, Wilson A. 2015. Management of the sodium hypochlorite accident: A rare but significant complication of root canal treatment. BMJ Case Rep. 25:207480.
- 2 3 . Hamdan ZA, Al-Zaka IM. 2022. Impact of sodium hypochlorite irrigant on fatigue resistance of different nickel-titanium instruments. Int J Health Sci (Qassim). 6:4002-4010.

- 2 4 . Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppin-Rontani RM. 2019. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. J Dent. 37:903-908.
- 2 5 . Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, Gulabivala K. 2001. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. Int Endod J. 34:113-119.
- 2 6 . Ohkubo K, Hirose K. 2018. Light-driven C-H oxygenation of methane into methanol and formic acid by molecular oxygen using a perfluorinated solvent. Angew Chem Int Ed 57:2126-2129.
- 2 7 . Noguchi T, Tachibana K, Inoue T, Sakai T, Tsujikawa K, Fujio Y, Yamagishi Y, Hamaguchi S, Kutsuna S, Kondoh M. 2022. Safety evaluation of MA-T after ingestion in mice. Toxicology. 477:153254.
- 2 8 . Shibata T, Konishi K. 2020. The respiratory chain of bacteria is a target of the disinfectant MA-T. BPB Reports. 3:174-178.
- 2 9 . Shibata T, Urakawa R, Ono C, Akeda Y, Sakai T, Hamaguchi S, Takamori K, Inoue T, Tomono K, Konishi K, Matsuura Y. 2021. Verification of MA-T safety and efficacy against pathogens including SARS-CoV-2. BPB Reports. 4:78-84.
- 3 0 . Shibata T, Urakawa R, Sakai T, Konishi K. 2023. Bactericidal effect of MA-T against *Escherichia coli* in davis minimal medium in the presence of organic materials, compared to perchlorous acid as a control. BPB Reports. 6:122-125.

- 3 1 . Urakawa R, Shibata T, Kimura T, Gojo N, Sogou M, Takamori K, Inoue T, Konishi K, Sakai T. 2023. The bactericidal effect of oral care using matching transformation system: A prospective clinical study. *Oral Sci Int.* 20:3-9.
- 3 2 . Bouillaguet S, Manoil D, Girard M, Louis J, Gaïa N, Leo S, Schrenzel J, Lazarevic V. 2018. Root microbiota in primary and secondary apical periodontitis. *Front Microbiol.* 9:02374.
- 3 3 . Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S. 2005. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 71:8738-8743.
- 3 4 . 小酒井望, 上野一恵, 五島瑳智子, 三橋進, 中山一誠, 島田馨, 玉井健三, 小栗豊子. 1979. 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy.* 27:559-561.
- 3 5 . Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Izutani N, Azakami H, Ebisu S. 2011. Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:5887-5892.
- 3 6 . 北川蘭奈. 2013. 抗菌性モノマー配合レジン系根管シーラーの開発. 大阪大学大学院歯学研究科 学位論文 (博士).
- 3 7 . Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. 2011. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod.* 37:1380-1385.
- 3 8 . Wang C, Li X, Cheng T, Sun H, Jin L. 2021. Eradication of *Porphyromonas gingivalis* persists through colloidal bismuth subcitrate synergistically combined with metronidazole. *Front Microbiol.* 20:748121.

- 3 9 . Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. 2020. Dynamics of dissolution, killing, and inhibition of dental plaque biofilm. *Front Microbiol.* 11:00964.
- 4 0 . Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Gotoh K, Miura J, Iida T, Ebisu S. 2016. Temporal dynamics of bacterial microbiota in the human oral cavity determined using an *in situ* model of dental biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2:16018.
- 4 1 . Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Suga H, Azakami H, Ebisu S. 2012. Synergistic effects of antibiotics and an N-acyl homoserine lactone analog on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol.* 112:404-411.
- 4 2 . Li Y, Wang Y, Chen X, Jiang W, Jiang X, Zeng Y, Li X, Feng Z, Luo J, Zhang L. 2020. Antimicrobial peptide GH12 as root canal irrigant inhibits biofilm and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 53:948-961.
- 4 3 . Kuremoto K, Noiri Y, Ishimoto T, Yoneda N, Yamamoto R, Maezono H, Nakano T, Hayashi M, Ebisu S. 2014. Promotion of endodontic lesions in rats by a novel extraradicular biofilm model using obturation materials. *Appl Environ Microbiol.* 80:3804-3810.
- 4 4 . Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Stoodley LH, Burmølle M, Stewart PS, Bjarnshot T. 2022. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.* 20:608-620.
- 4 5 . Kim J, Pitts B, Stewart PS, Camper A, Yoon J. 2008. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:904-908.

- 4 6 . Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. 2010. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: Comparison of viability staining and direct culture. *J Endod.* 36:1820-1823.
- 4 7 . Davey HM, Hexley P. 2011. Red but not dead ? Membranes of stressed *saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ Microbiol.* 13:163-171.
- 4 8 . Ciofu O, Moser C, Jensen P Ø, Høiby N. 2022. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 20:621-635.
- 4 9 . Hall CW, Mah TF. 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 41:276-231.
- 5 0 . Marsh PD, Zaura E. 2017. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* 44:12-22.
- 5 1 . Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. 2015. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol Spectr.* 3:2011-2014.
- 5 2 . Noszticzus Z, Wittmann M, Kullai KK, Beregvári Z, Kiss I, Rosivall, L, Szegedi J. 2013. Chlorine dioxide is a size-selective antimicrobial agent. *PLoS One.* 8:79157.
- 5 3 . Simpson GD, Miller RF, Laxton GD, Clements WR, Synan F, Macmahon JD, Vincent JP. 1993. A focus on chlorine dioxide: The “ideal” biocide. *Corrosion.* 93:8-12.

- 5 4 . Ogata N. 2007. Denaturation of protein by chlorine dioxide: Oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry*. 46:4898-4911.
- 5 5 . Stojicic, S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. 2010. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: Effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod*. 36:1558-1562.
- 5 6 . Soares LES, Campos ADF, Martin AA. 2013. Human and bovine dentin composition and its hybridization mechanism assessed by FT-Raman spectroscopy. *J Spectrosc*. 1:210671.
- 5 7 . De Dios Teruel J, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJO. 2015. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol*. 60:768-775.
- 5 8 . Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. 2019. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J*. 52:604-628.
- 5 9 . Kakoli P, Nandakumar R, Romberg E, Arola D, Fouad AF. 2009. The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. *J Endod*. 35:78-81.
- 6 0 . Siqueira JF, Rôças IN. 2022. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J*. 55:512-530.
- 6 1 . Siqueira JF, Rôças IN. 2022. A critical analysis of research methods and experimental models to study the root canal microbiome. *Int Endod J*. 55:46-71.
- 6 2 . Siqueira JF, Rôças, IN. 2008. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 34:1291-1301.

- 6 3 . Yoneda N, Noiri Y, Matsui S, Kuremoto K, Maezono H, Ishimoto T, Nakano T, Ebisu S, Hayashi M. 2017. Development of a root canal treatment model in the rat. *Sci Rep.* 7:3315.
- 6 4 . Liang YH, Jiang LM, Jiang L, Chen XB, Liu YY, Tian FC, Bao XD, Gao XJ, Versluis M, Wu MK, Sluis LVS. 2013. Radiographic healing after a root canal treatment performed in single-rooted teeth with and without ultrasonic activation of the irrigant: A randomized controlled trial. *J Endod.* 39:1218-1225.
- 6 5 . Ricucci D, Siqueira JF. 2010. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 36:1277-1288.
- 6 6 . Marvaniya J, Agarwal K, Meththa D, Parmar N, Shyamal N, Patel J. 2022. Minimal invasive endodontics: A comprehensive narrative review. *Cureus.* 14:e25984.
- 6 7 . Silva EJNL, Deus GD, Souza EM, Belladonna FB, Cavalcante DM, Carvalho MS, Versiani MA. 2022. Present status and future directions-minimal endodontic access cavities. *Int Endod J.* 55:531-587.
- 6 8 . Neelakantan P, Khan K, Hei Ng GP, Yip CY, Zhang CF, Pan Cheung GS. 2018. Does the orifice-directed dentin conservation access design debride pulp chamber and mesial root canal systems of mandibular molars similar to a traditional access design? *J Endod.* 44:274-279.
- 6 9 . Huang Q, Li Z, Lyu P, Zhou X, Fan Y. 2023. Current applications and future directions of lasers in endodontics : A narrative review. *Bioengineering.* 10:30296.

- 7 0 . Wen C, Yan L, Kong Y, Zhao J, Li Y, Jiang Q. 2021. The antibacterial efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming in root canals with different diameters or tapers. *BMC Oral Health*. 21:542.
- 7 1 . Cheng X, Tian T, Tian Y, Xiang D, Qiu J, Liu X, Yu Q. 2017. Erbium:Yttrium Aluminum garnet laser-activated sodium hypochlorite irrigation: A promising procedure for Minimally invasive endodontics. *Photomed Laser Surg*. 35:695-701.
- 7 2 . Watanabe S, Okiji T. 2022. Application of root canal irrigation using Er : YAG laser. *Japan Society for Laser Surgery and Medicine*. 43:98-112.
- 7 3 . Jia Y, Chen J, Asahara H, Asoh T, Uyama H. 2019. Polymer surface oxidation by light-activated chlorine dioxide radical for metal-plastics Adhesion. *ACS Appl Polym Mater*. 1:3452-3458.
- 7 4 . Ono-Minagi H, Gojo N, Nohno T, Inoue T, Ohuchi H, Sakai T. 2023. Evaluation of oral care using MA-T gel for high-risk patients: a pilot study. *BMC Oral Health*. 23:108.
- 7 5 . Malka SK, Park MH. 2022. Fresh produce safety and quality: Chlorine dioxide's role. *Front Plant Sci*. 12:775629.
- 7 6 . Xu MY, Lin YL, Zhang TN, Hu CY, Tang YL, Deng J, Xu B. 2022. Chlorine dioxide-based oxidation processes for water purification: A review. *J Hazard Mater*. 436:129-195.
- 7 7 . Nishikiori R, Nomura Y, Sawajiri M, Masuki K, Hirata I, Okazaki M. 2008. Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *J Dent*. 36:993-998.

- 7 8 . Yıldız SZ, Bilir C, Eskiler GG, Bilir F. 2022. The Anticancer potential of chlorine dioxide in small-cell lung cancer cells. *Cureus*. 10:e29989.

表 1 MA-Tの最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC)

| 細菌株                                        | MIC      | MBC      |
|--------------------------------------------|----------|----------|
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212    | 3.9 ppm  | 3.9 ppm  |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 23726  | 7.8 ppm  | 7.8 ppm  |
| <i>Parvinomas micra</i> GIFU 7745          | 15.6 ppm | 31.3 ppm |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 | 15.6 ppm | 31.3 ppm |

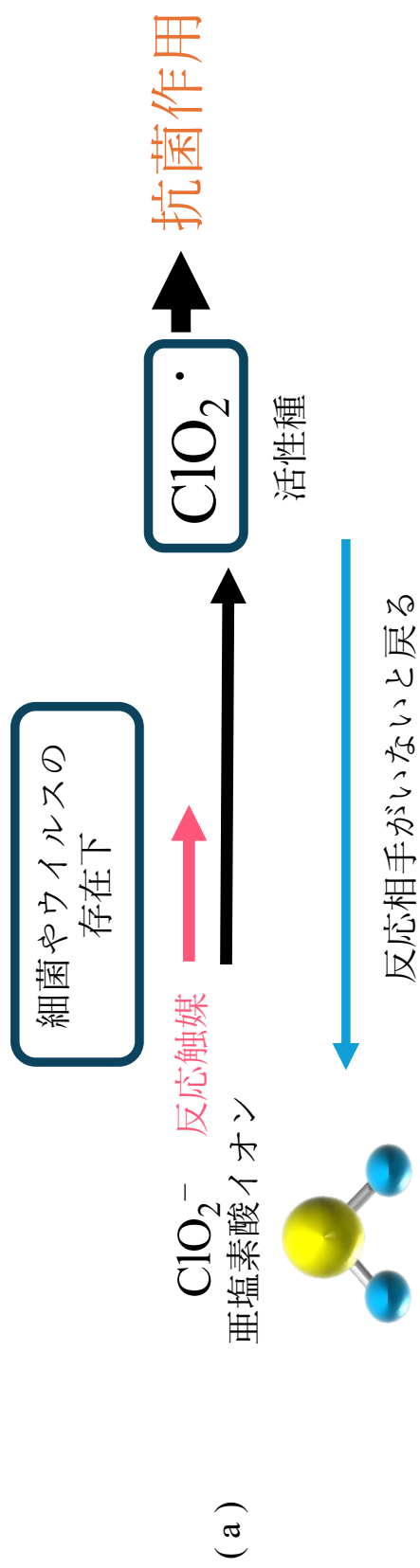


図 1 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液 (MA-T)

(a) 反応模式図 (b) 反応式

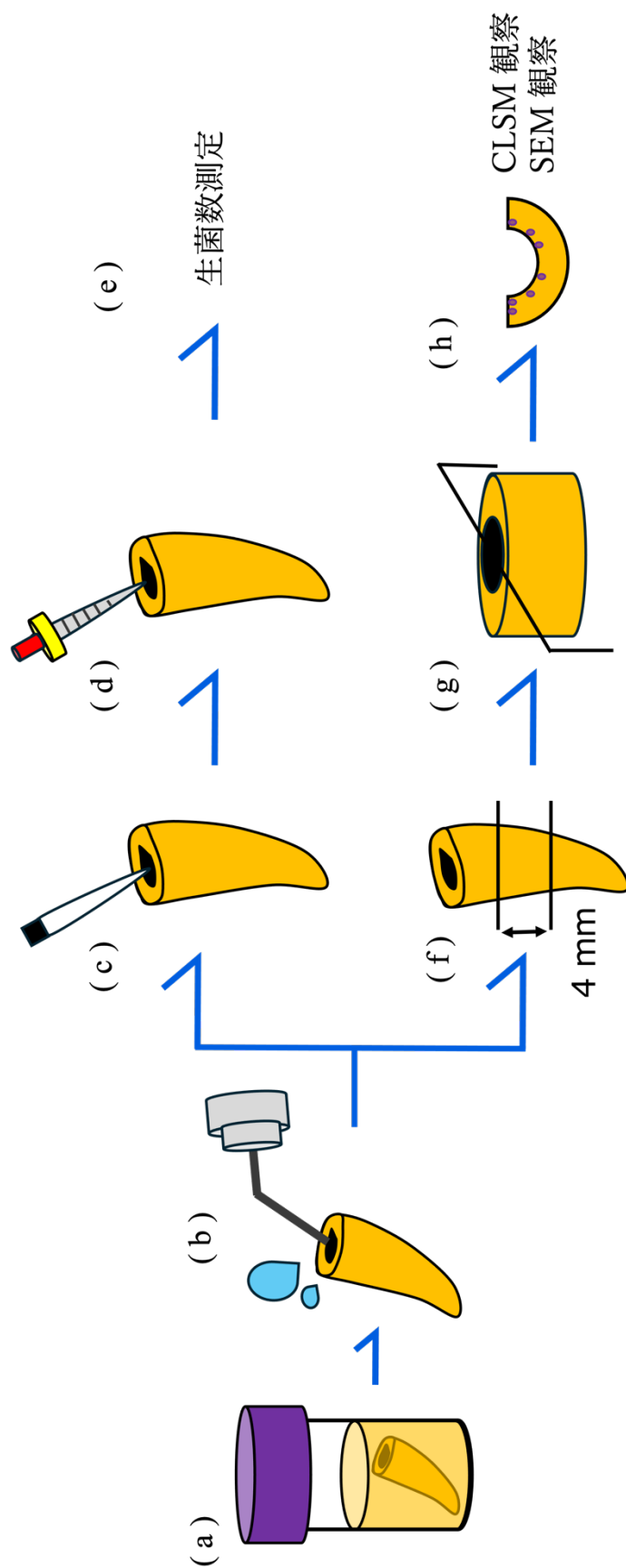


図2 *in vitro* 感染モデルを用いた実験プロトコール

(a) 滅菌した牛歯を約  $10^7$  CFU に調整した *E. faecalis* 培養液に 4 週間浸漬し感染根管を作製. (b) 100, 500, 1000 ppm MA-T あるいは 2.5% NaOCl にて 1, 5, 15 分根管洗浄. (c) ペーパーポイントにて根管内細菌を回収. (d) 滅菌精製水を根管内に満たし全周フアイリング. (e) 回収した削片とペーパーポイントから生菌数測定. (f) 根管洗浄後, 歯根中央部分の歯軸方向に長径 4 mm の象牙質ブロックを作製. (g) 垂直方向に分割. (h) 根管象牙質表面を CLSM および SEM 観察.

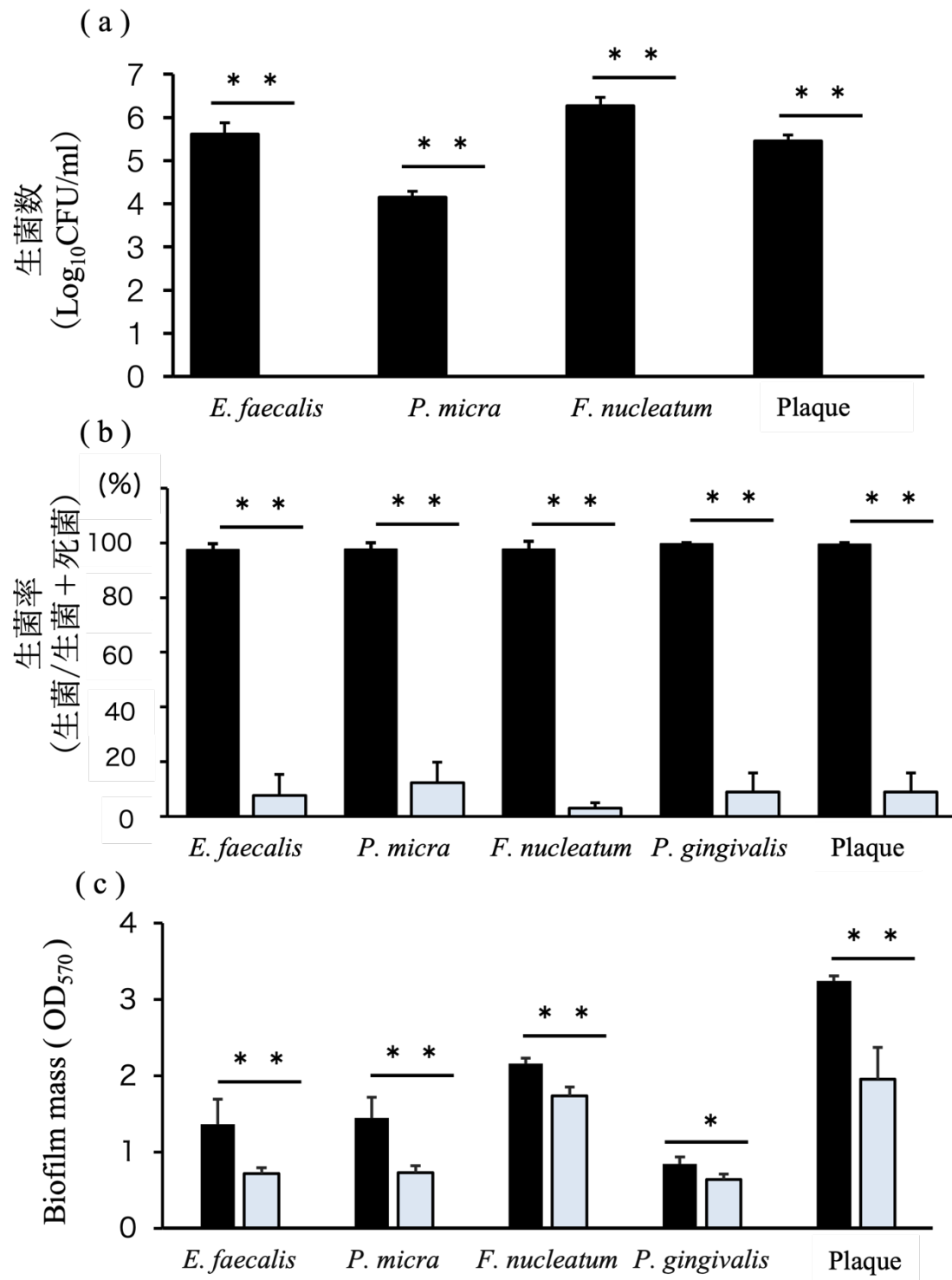


図3 バイオフィルム形成に MA-T が及ぼす影響

(a) 生菌数測定 (各群  $n = 3$ ), (b) CLSM 観察 (各群  $n = 6$ ), (c) クリスタルバイオレット染色 (各群  $n = 3$ ). Student's  $t$ -test, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

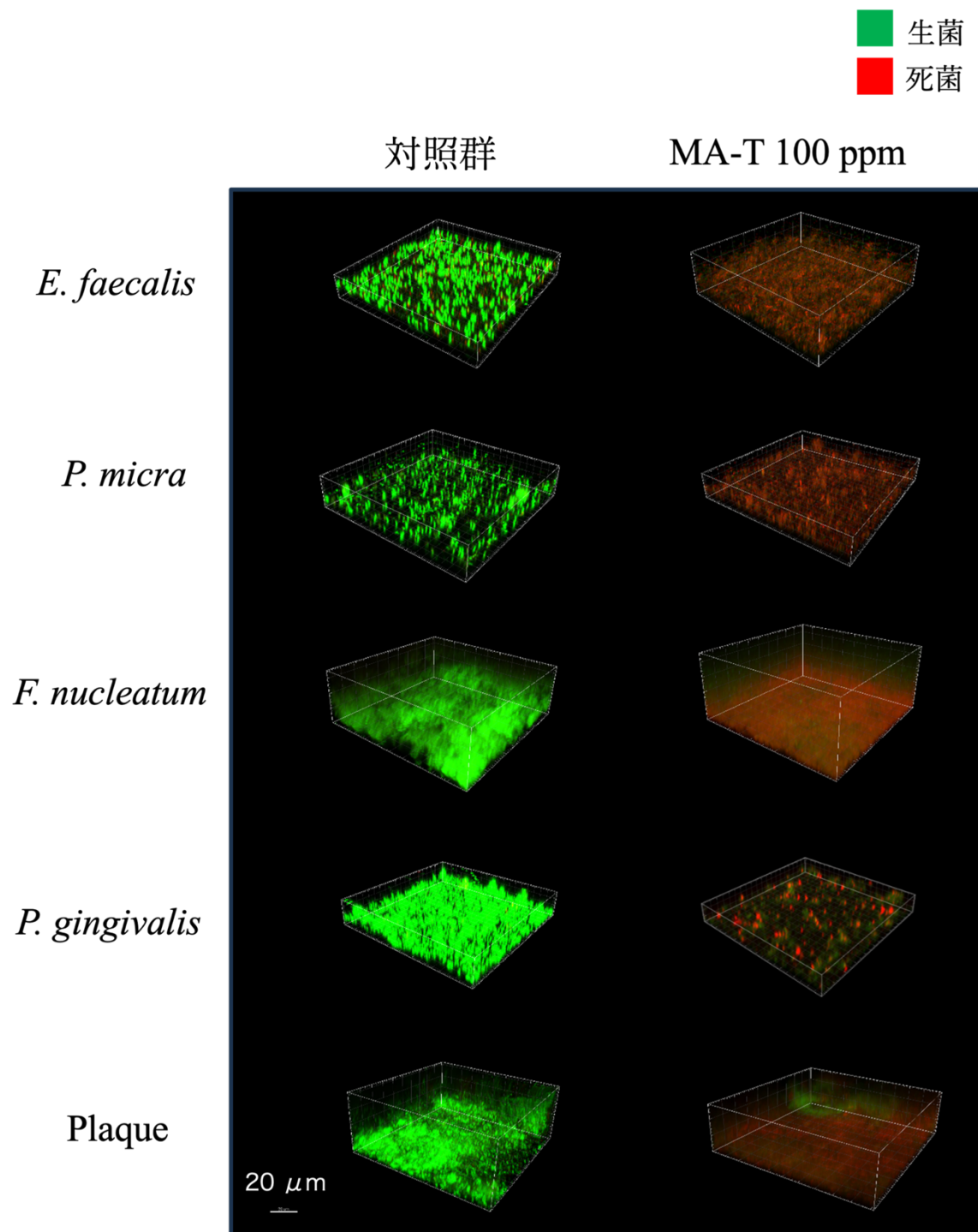


図 4 バイオフィーム形成に MA-T が及ぼす影響 (CLSM 像)

MA-T 存在下で各種細菌およびプラークを用いてバイオフィームを培養し, CLSM にて観察した. MA-T 添加により, 死菌の増加を認める.

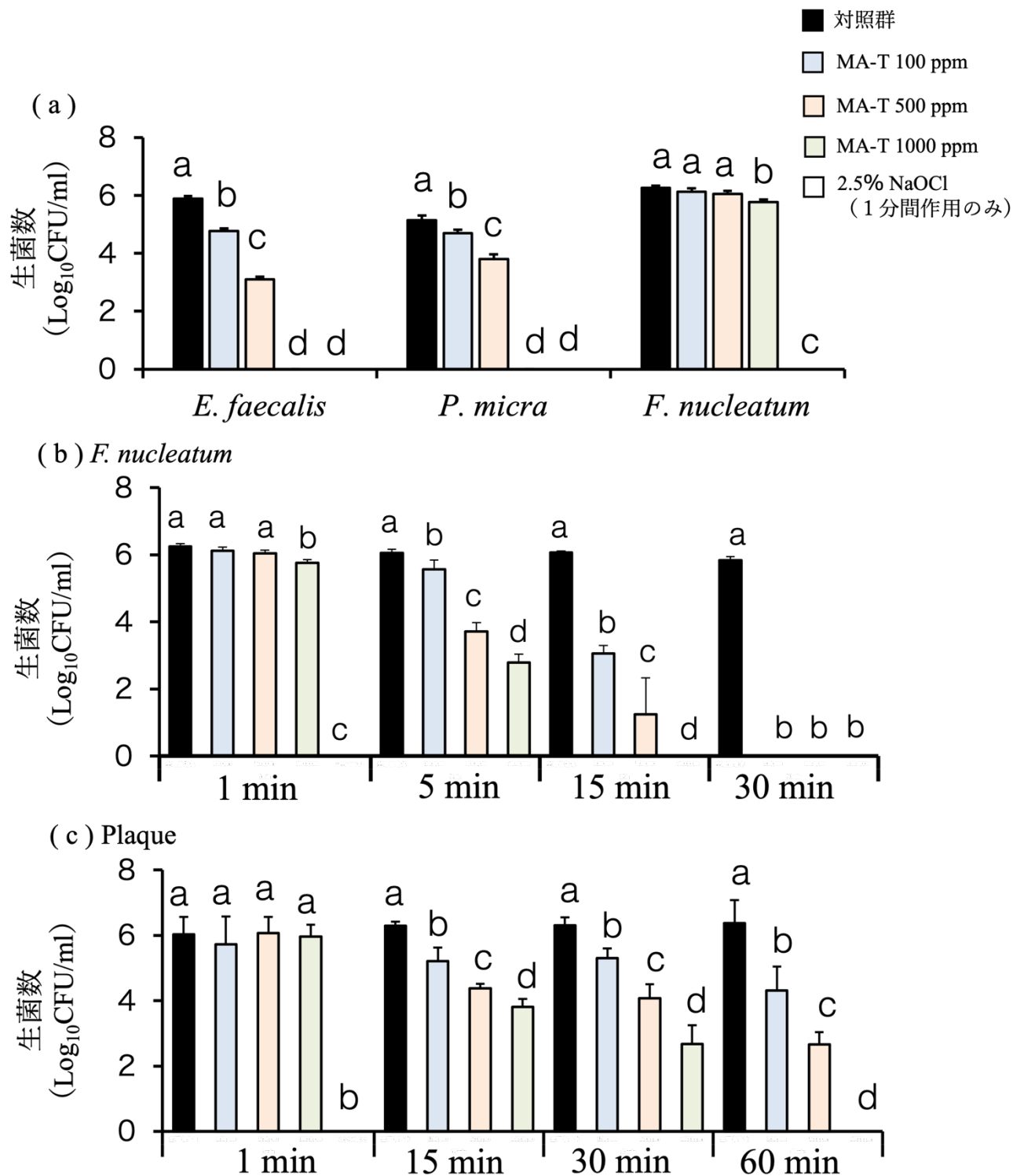


図5 形成されたバイオフィルムにMA-Tが及ぼす影響：生菌数測定

(a) 1分間作用時 (各群 n = 3), (b) 作用時間を延長した場合の *F. nucleatum* への影響 (各群 n = 3), (c) ヒトプラークを用いて作製したバイオフィルムへの影響 (各群 n = 4). One-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test,  $P < 0.05$ . 各菌株および各作用時間において異なる文字間で有意差あり.

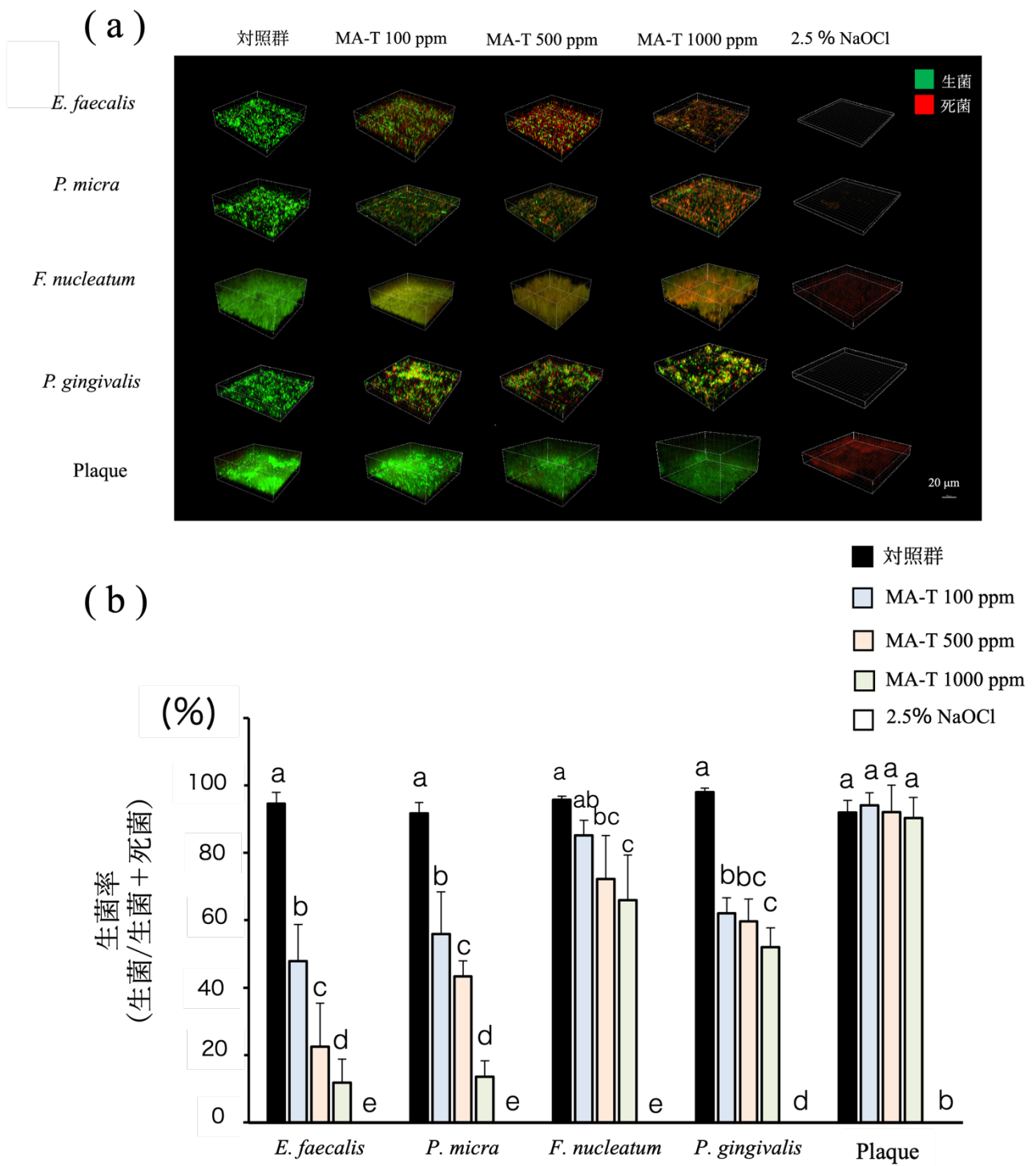


図 6 形成されたバイオフィルムに MA-T が及ぼす影響：MA-T 1 分間処理後の CLSM 観察

(a) CLSM 画像, (b) 生菌率 (各群  $n = 6$ ). One-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test,  $P < 0.05$ . 各菌株において異なる文字間で有意差あり.

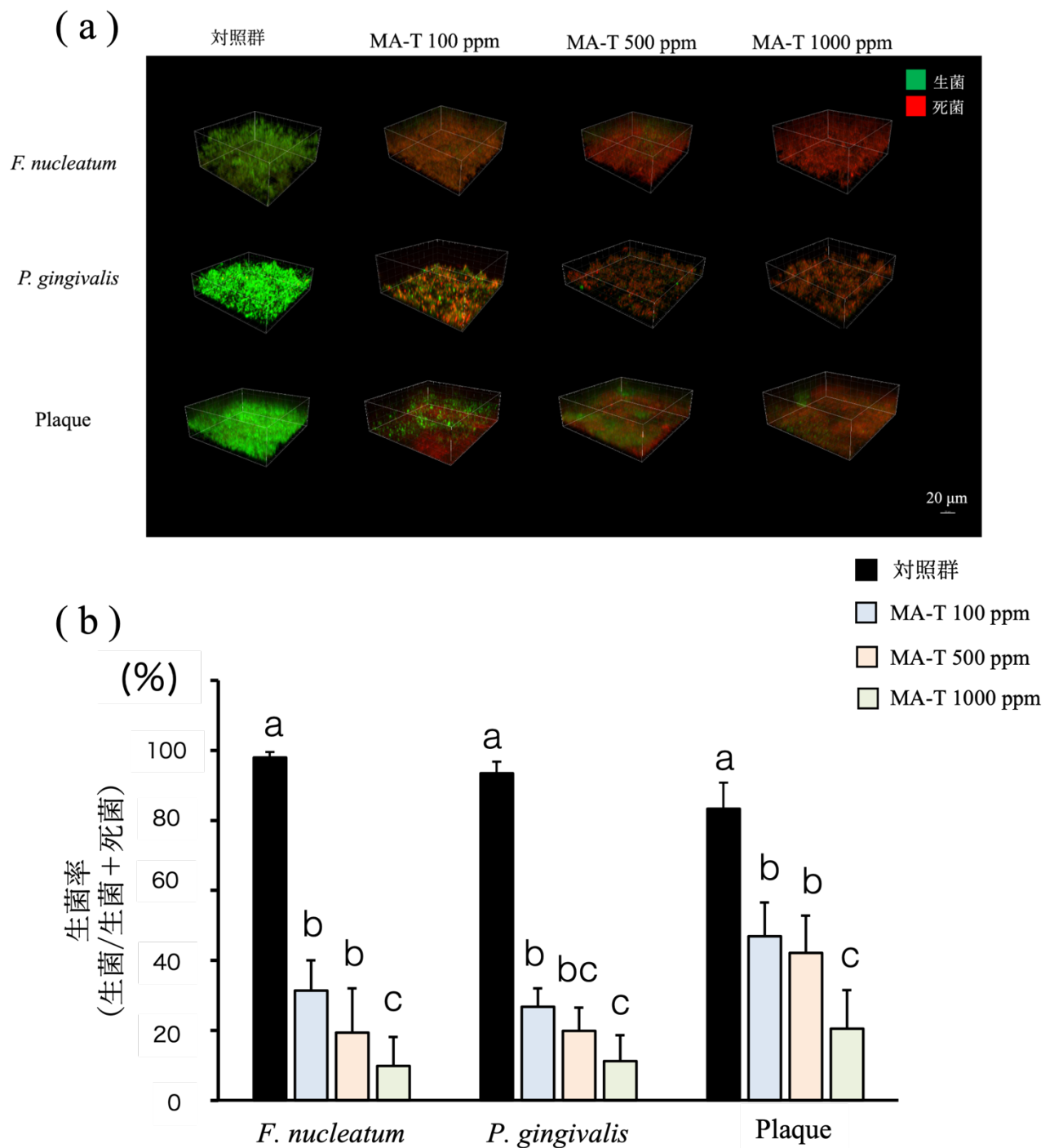


図7 形成されたバイオフィルムに MA-T が及ぼす影響：MA-T 30 分間処理後の CLSM 観察

(a) CLSM 画像, (b) 生菌率 (各群 n = 6). One-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test,  $P < 0.05$ . 各菌株において異なる文字間で有意差あり.

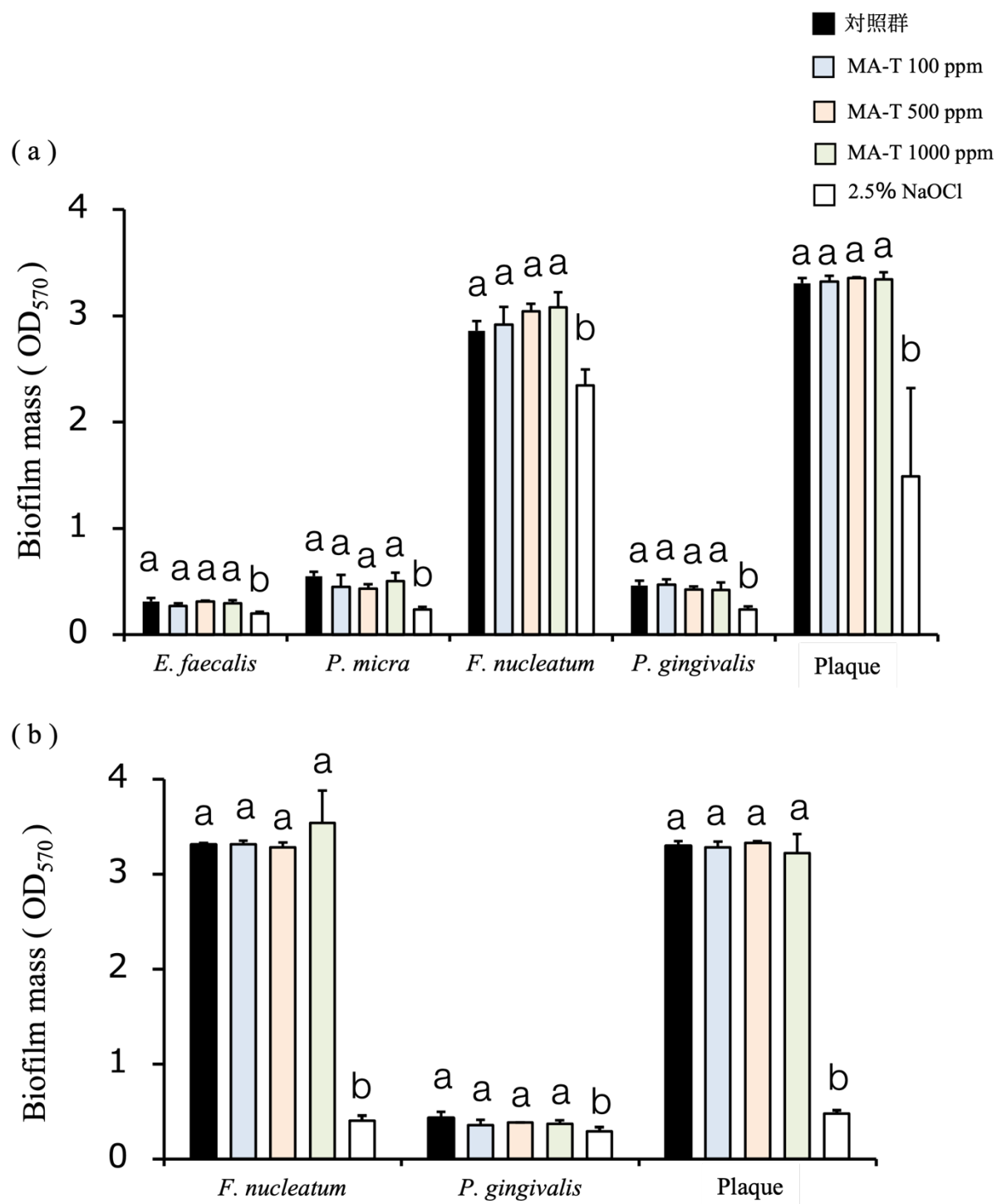


図 8 形成されたバイオフィルムに MA-T が及ぼす影響：クリスタルバイオレット染色によるバイオフィルム総量の定量

(a) 1 分間作用時 (各群  $n = 3$ ), (b) 30 分間作用時 (各群  $n = 3$ ). One-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test,  $P < 0.05$ . 各菌株において異なる文字間で有意差あり.

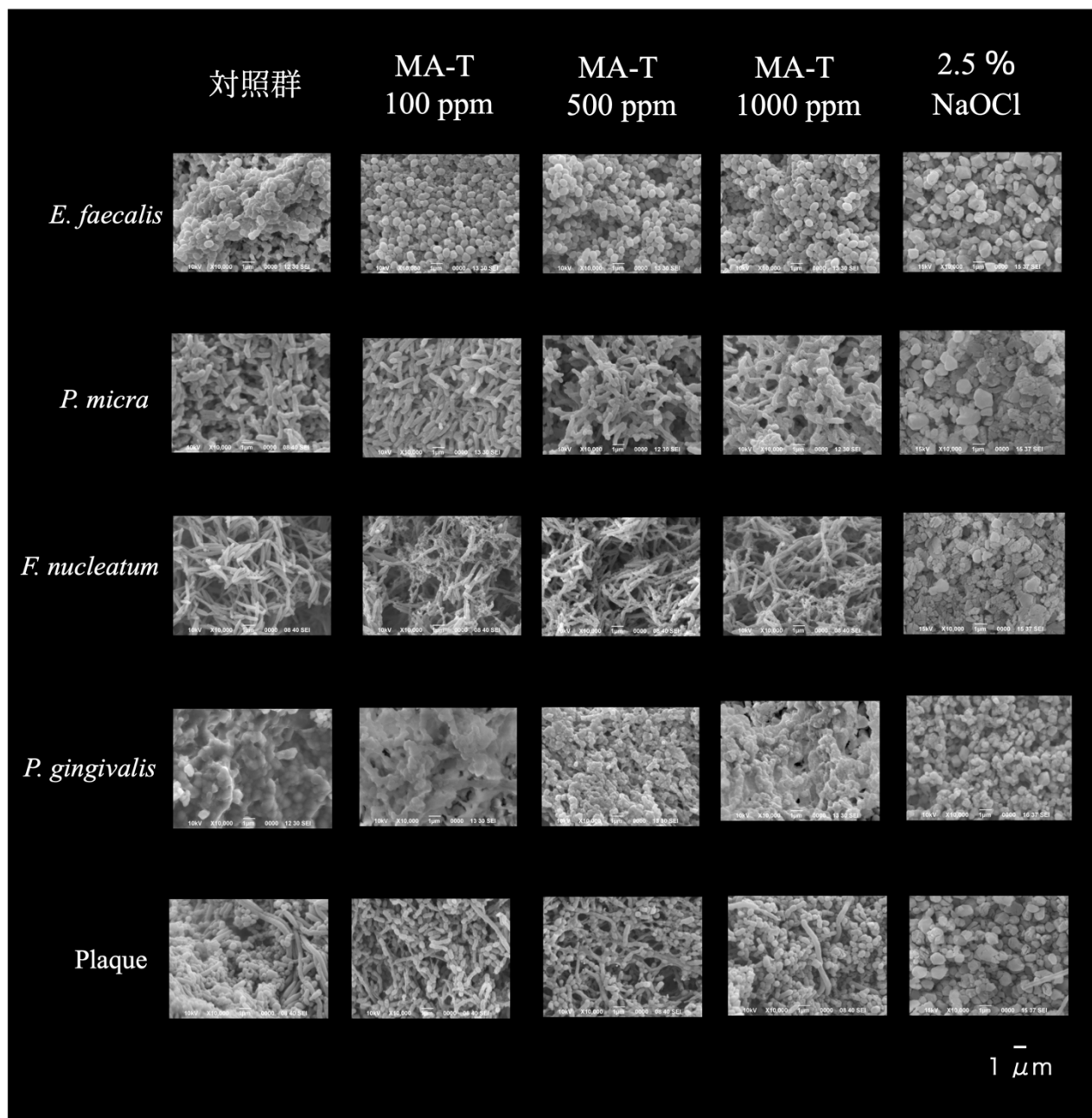


図 9 形成されたバイオフィルムに MA-T が及ぼす影響：微細形態学的観察  
( $\times 10,000$ )

*E. faecalis*, *P. micra* : 1 分間作用 *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, Plaque : 30 分間作用

1 週間培養し形成したバイオフィルムに MA-T を作用させ、SEM にて観察した。対照群と比べバイオフィルムの形態学的変化は認めなかった。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は、バイオフィルムが溶解し、HA 粒子の表出を認めた。

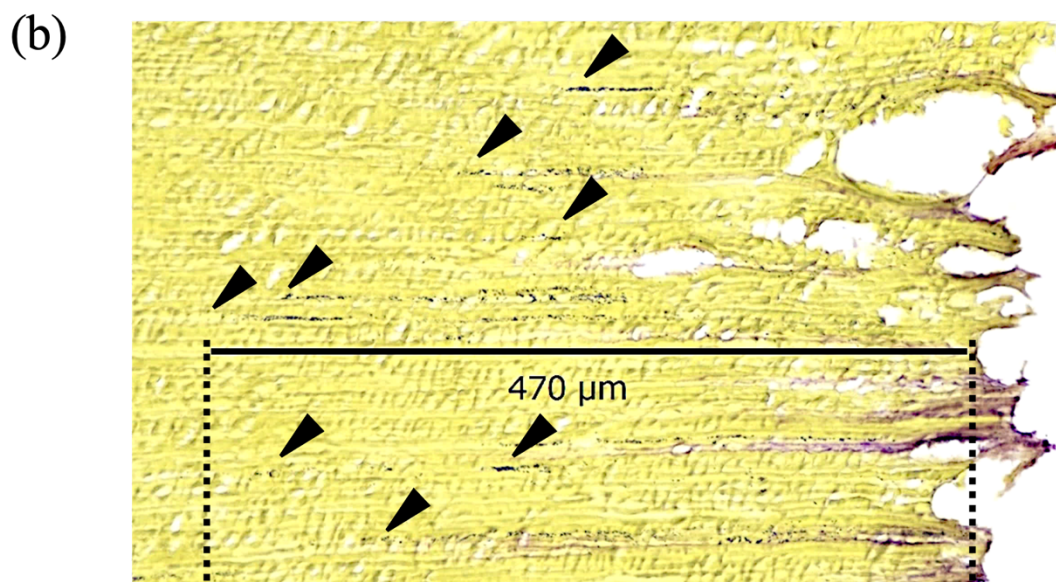
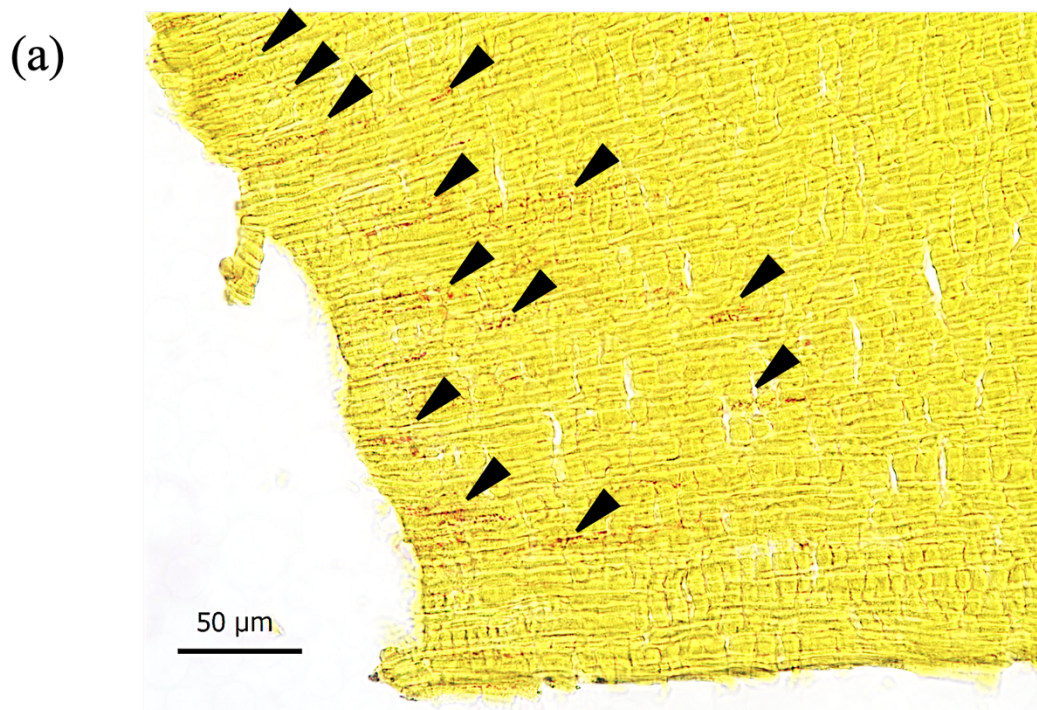


図10 *in vitro* 感染根管モデル構築のための組織学的評価  
 (a) 弱拡大, (b) 強拡大. (矢尻) 象牙細管内の *E. faecalis*.  
*E. faecalis* は最大で 470  $\mu\text{m}$  象牙細管内に侵入していた.

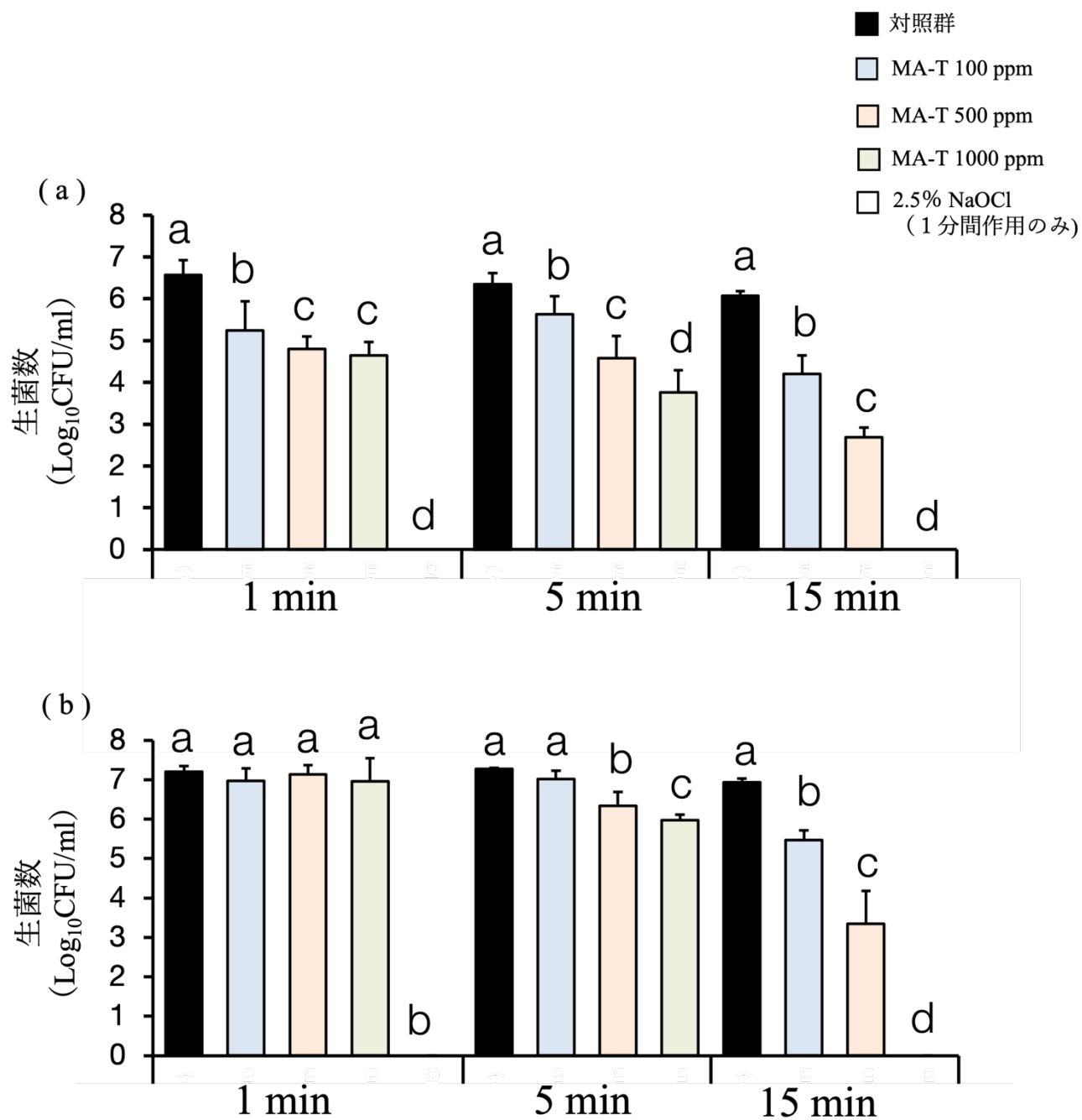


図 11 感染根管モデルでの MA-T による根管洗浄後の生菌数

(a) ペーパーポイント群 (各群  $n = 3$ ), (b) 全周ファイリング群 (各群  $n = 3$ ). One-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test,  $P < 0.05$ . 各菌株において異なる文字間で有意差あり.

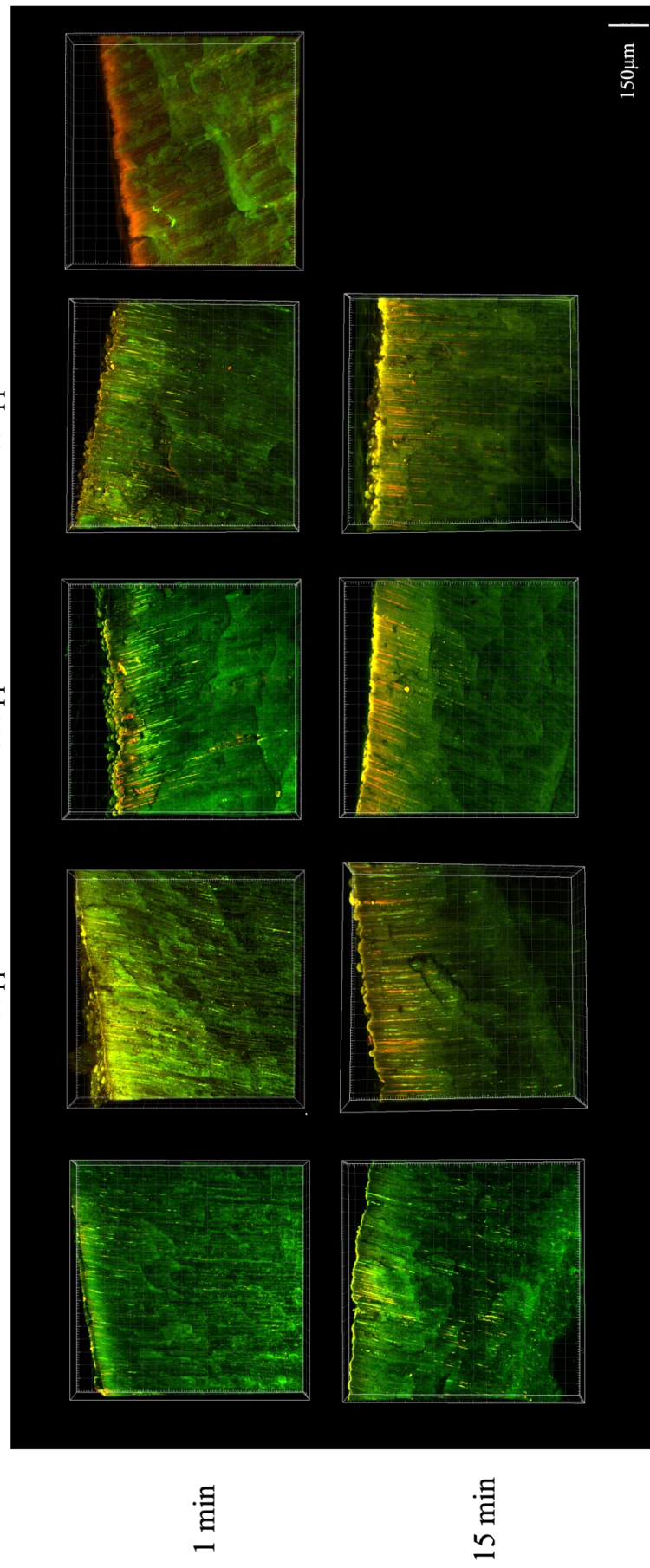


図 12 感染根管モデルでの MA-T による根管洗浄後の CLSM 像  
 濃度の異なる MA-T を用いて根管洗浄を行った。観察試料を作製後, LIVE/DEAD® 染色を行い CLSM にて観察した。  
 対照群と比較し根管洗浄時間を延長することにより死菌の増加を認めた。

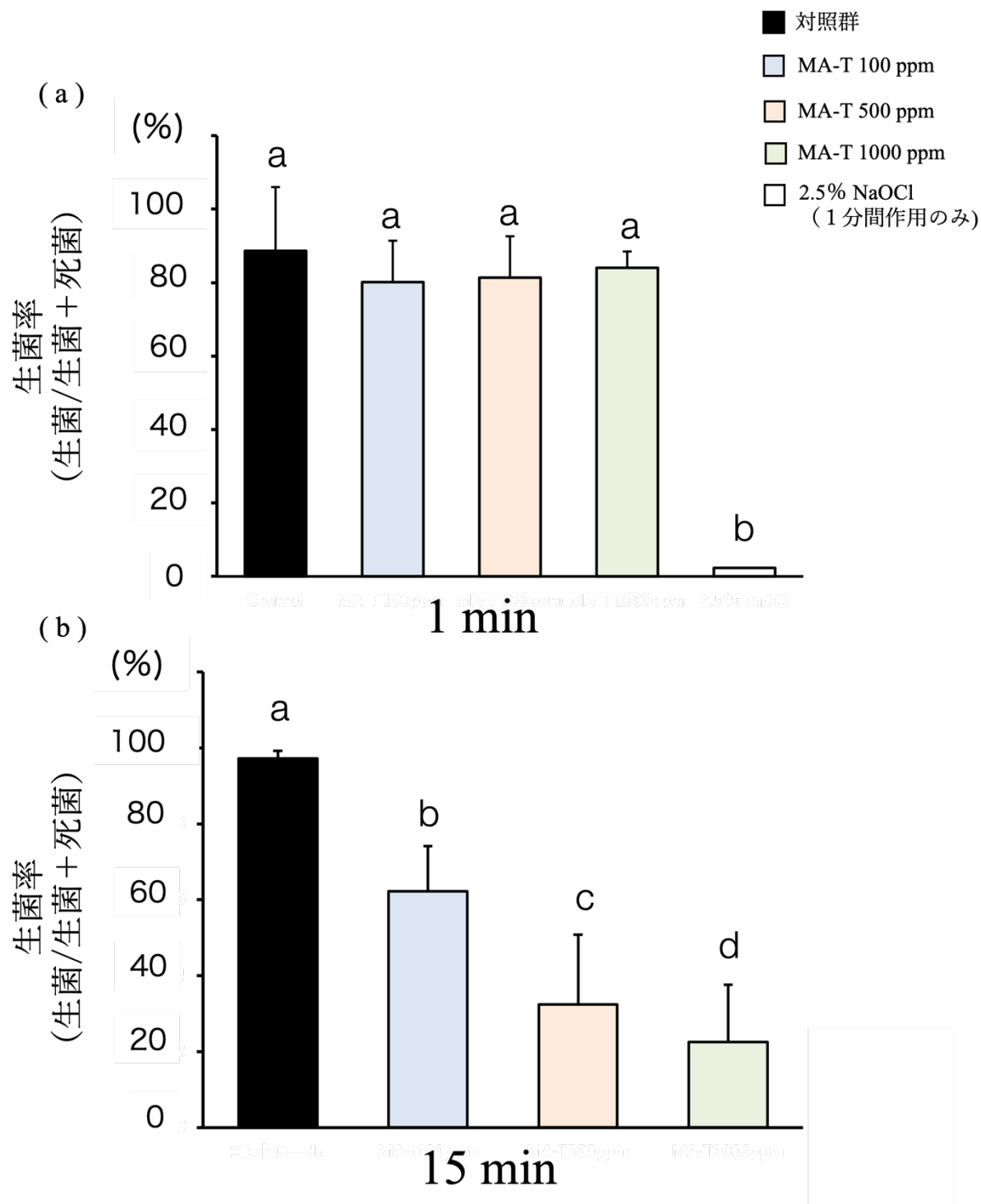


図 13 感染根管モデルでの MA-T による根管洗浄後の生菌率

(a) 1 分間 (各群  $n = 3$ ), (b) 15 分間 (各群  $n = 3$ ). One-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test,  $P < 0.05$ . 各菌株において異なる文字間で有意差あり.

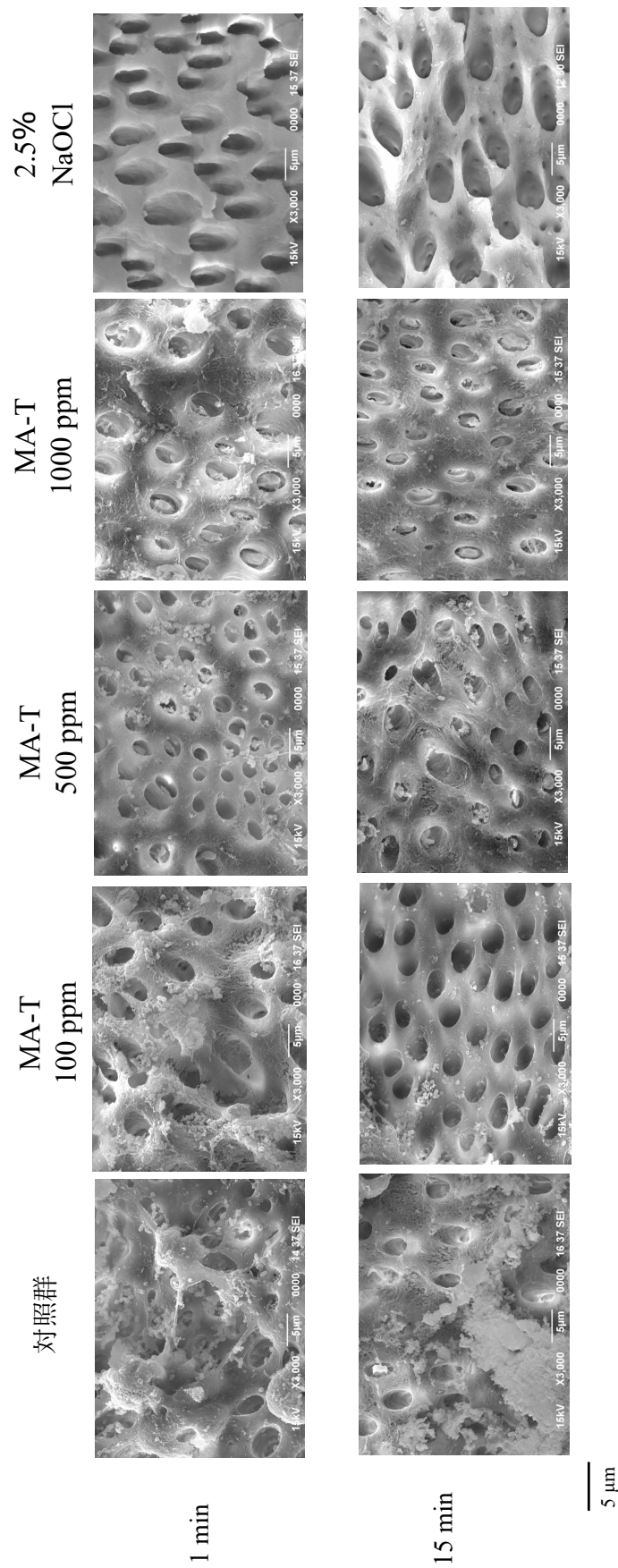


図 14 感染根管モデルでの MA-T による根管洗浄後の SEM による微細形態学的評価 (×3,000)

MA-T を用いた根管洗浄では対照群群と比較し、根管壁に付着しているバイオフィルムの減少を認めた. 次亜塩素酸ナトリウム水溶液では根管象牙質の過脱灰を認めた.

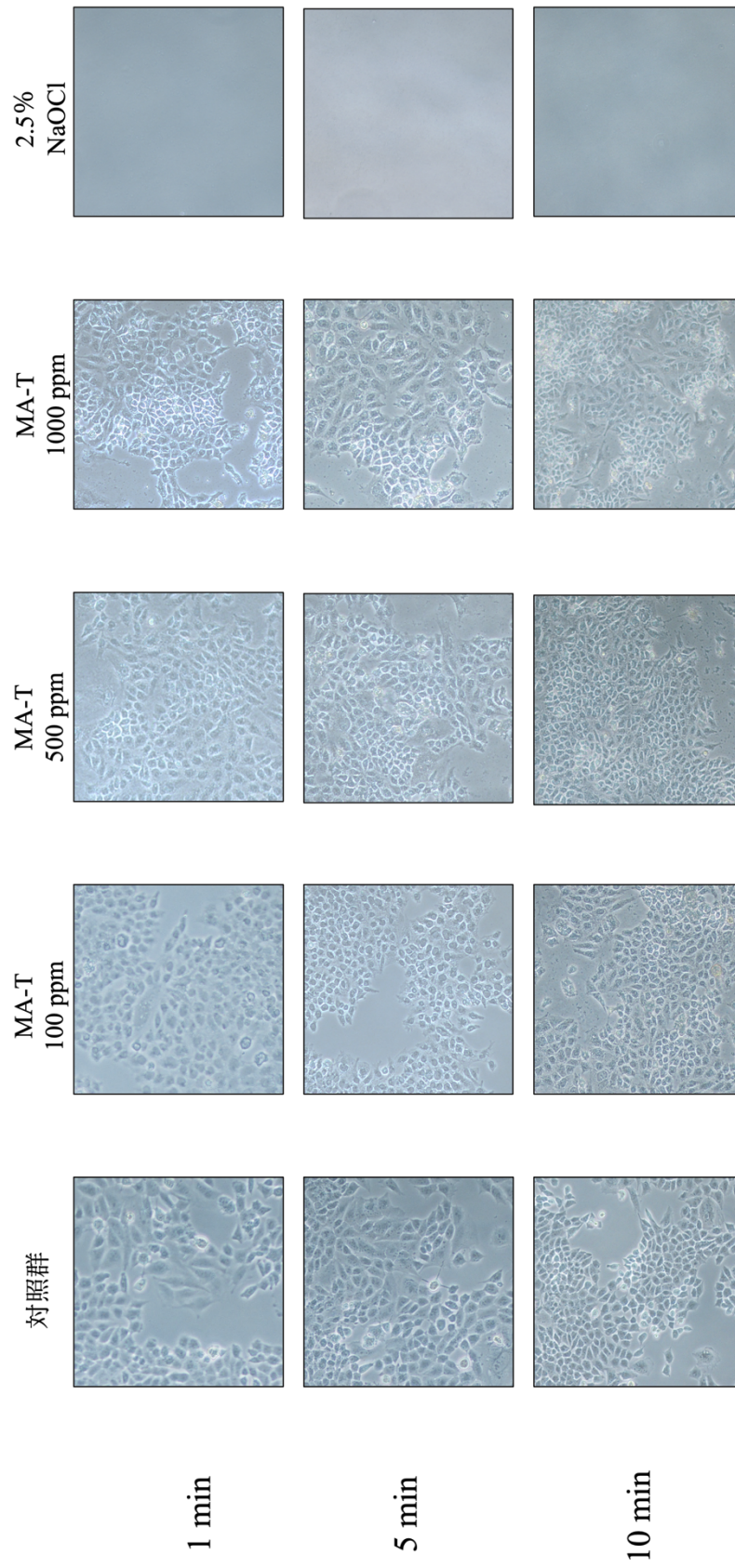


図 15 MA-T 処理によるラット骨芽細胞の形態変化 (× 40)

培養倒立型顕微鏡を用いて細胞形態を観察した。MA-T 群は陰性対照群と比較し形態変化は認められなかったが、2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液群は細胞を観察することが困難であった。

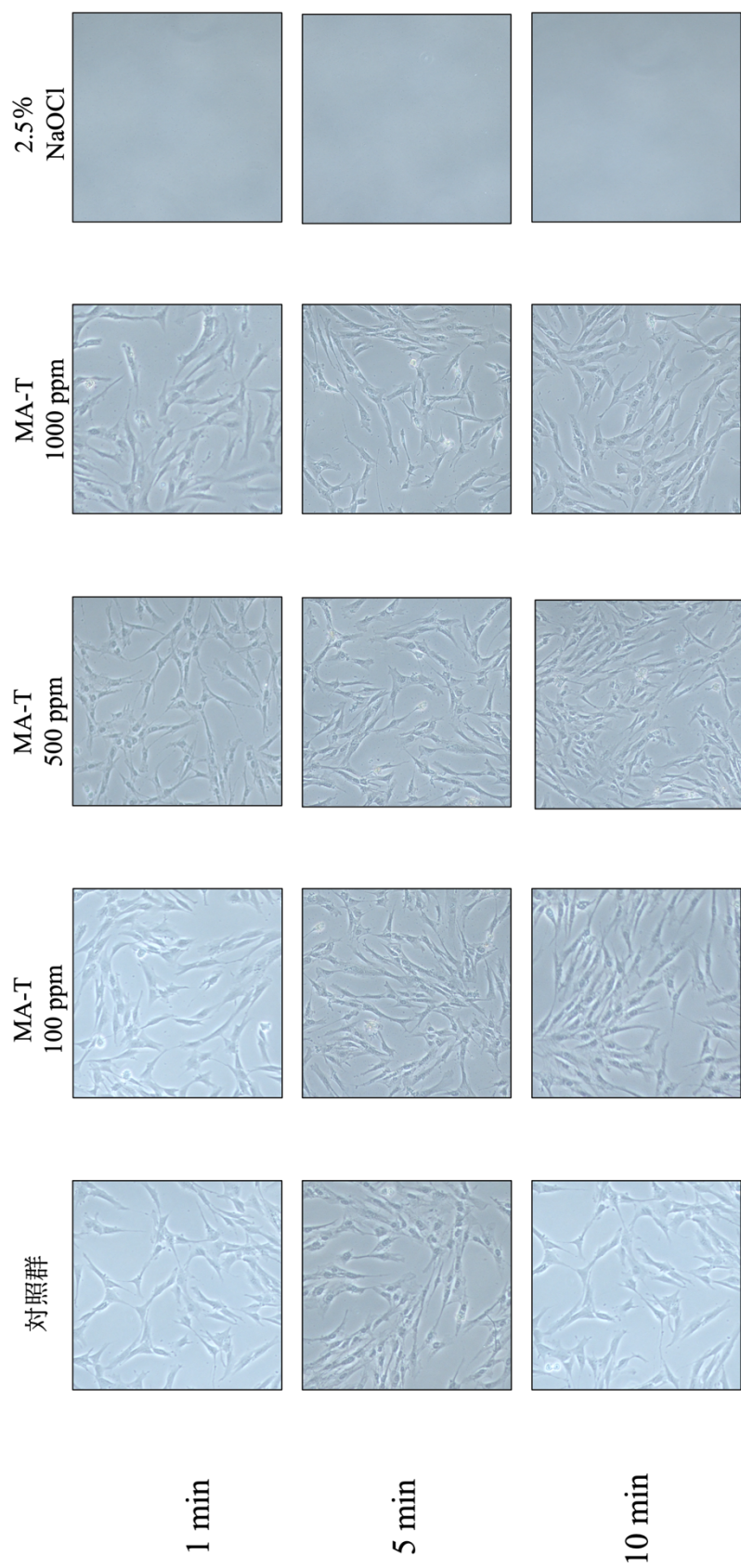


図 16 MA-T 処理によるヒト歯根膜細胞の形態変化 (× 40)

培養倒立型顕微鏡を用いて細胞形態を観察した。MA-T 群は陰性対照群と比較し形態変化は認められなかったが、2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液群は細胞を観察することが困難であった。

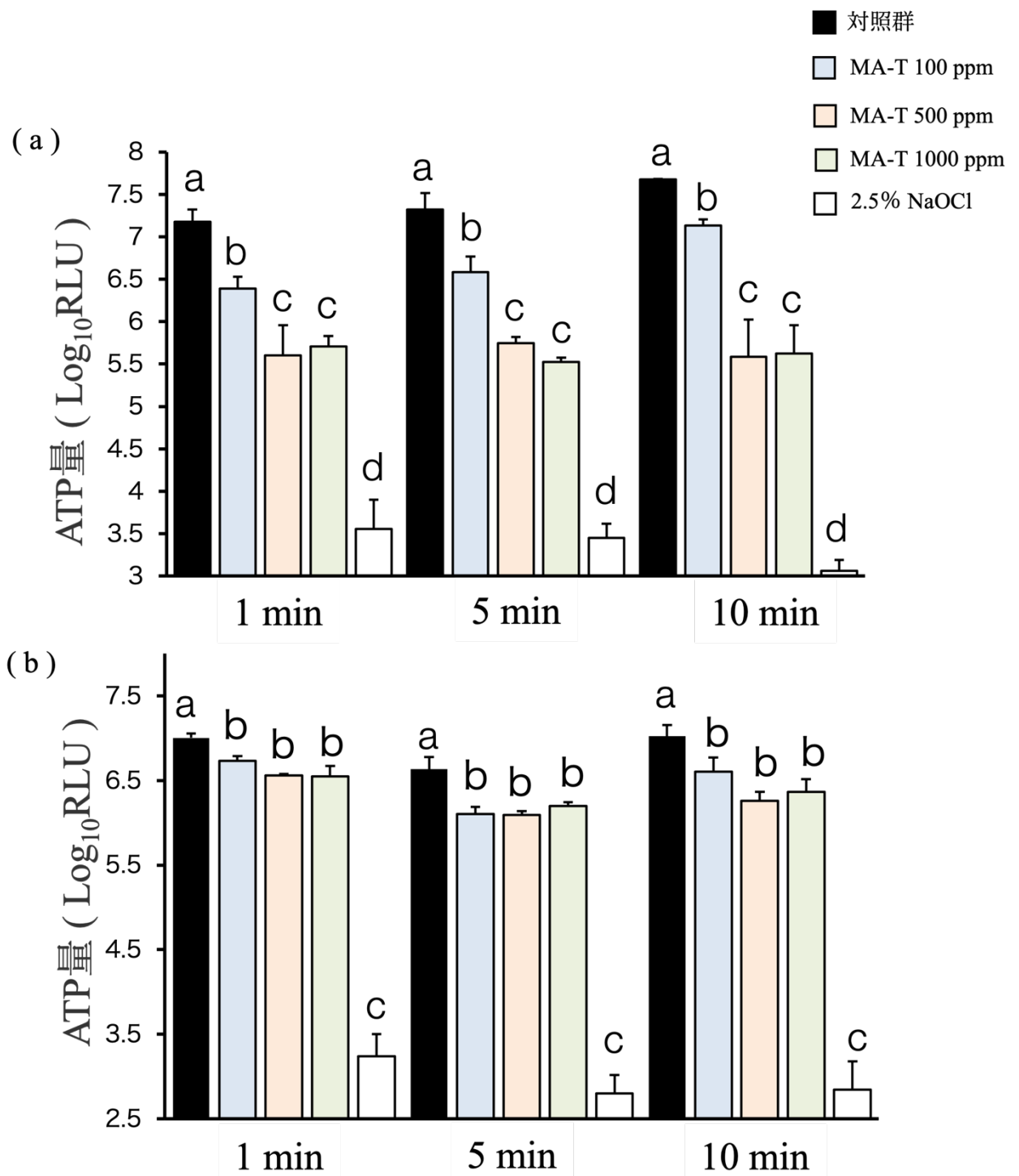


図 17 MA-T のラット骨芽細胞およびヒト歯根膜細胞に与える影響

: ATP 量測定

(a) ラット骨芽細胞 (各群  $n=3$ ), (b) ヒト歯根膜細胞 (各群  $n=3$ ). One-way ANOVA with Tukey's HSD post hoc test,  $P < 0.05$ . 各菌株において異なる文字間で有意差あり.