

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2014年度 博士論文

ポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する  
過酸化尿素の殺菌効果の検討

**Antimicrobial Effect of Carbamide Peroxide  
on Polymicrobial Biofilm Model**

2015年3月6日

長谷川 晴彦

Haruhiko Hasegawa

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

う蝕制御修復学講座

向井義晴准教授 指導

## 論文内容要旨

ホームブリーチングは通常ブラッシング後に使用するが歯頸部や隣接面にプラークが残存している場合が度々見受けられる。過酸化尿素を主成分とするホームブリーチング剤がブラッシング後の残存したプラークに対して殺菌性を発揮するのであれば、歯の漂白効果だけでなく、齲蝕や歯周病予防効果にも期待できる。

口腔内のデンタルプラークはバイオフィルムの形態で歯面に付着している。バイオフィルムは約 1000 種類の異なった菌種による複雑な生態系と菌体外多糖 (extracellular polysaccharide : EPS) によって構成されており、浮遊している細菌と比べて抗菌剤に対して、高く約 250 倍の抵抗性があるとされている。

これまでバイオフィルムを実験するためにいくつかの *in vitro* や *in situ* のバイオフィルムモデルが開発されてきた。しかし、これらのモデルはデンタルプラークの多菌性の複雑さを再現することができるが、1) 操作が複雑である、2) 培養期間が長期である、3) 細菌の付着が困難である、などの欠点がある。我々は神奈川歯科大学大学院歯学研究科微生物感染学講座の協力のもと、Exterkate ら (Caries Res 2010) の方法を参考に、これらの欠点を克服したポリマイクロバイオフィルムモデルを確立した。このモデルは他のモデルと比較して、1) 口腔内に存在する多種の細菌からなるバイオフィルム作製が可能である、2) 一つの装置内で異なった固相 (基質) が使用でき、複数の独立したバイオフィルムの作製や処理時間、処理濃度の調節が可能である、3) 強固な付着を得ることができ、バイオフィルムが剥離しにくい、などの特徴を有している。

今回、我々はこのバイオフィルムモデルを用いて、初期に付着した 24 時間培養後と薬剤への抵抗性が強くなった 72 時間後のバイオフィルムに対する過酸化尿素の抗菌効果を検討した。

市販のホームブリーチング剤である HiLite Shade Up ならびに Opalescence Regular を 20 倍希釈したものと齲蝕予防で使用される 0.2% クロロヘキシジンは 24 時間培養後と 72 時間培養後のバイオフィルムに対して同等の殺菌効果を示したという結果が得られた。また、0.5, 2.5, 5, 10% に調整した各濃度の過酸化尿素水溶液を用いて濃度依存性を調べた結果、強い負の相関が得られ、24 時間培養後のバイオフィルムに対して 5% および 10% 過酸化尿素水溶液、72 時間培養後のバイオフィルムに対して 10% 過酸化尿素水溶液で処理した時には細菌の発育が得られなかった。処理後、Live/Dead 染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察した結果、同様に濃度が高くなるにつれて死菌が多く確認された。

以上の結果から、ホームブリーチング剤は漂白効果のみならず、齲蝕予防にも効果が期待できることが示唆された。

## 論文審査要旨

学位申請論文である「ポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する過酸化尿素の差殺菌効果」は多菌種から構成されるバイオフィルムモデルを使用して、ホームブリーチング剤ならびにその成分である過酸化尿素の殺菌効果を濃度別に検討し、漂白のみならず齲蝕や歯周病予防の可能性に言及した研究論文である。

審美意識の高まりから漂白を希望する患者が増えているが、ホームブリーチング剤は家庭で使用するためプラークの残存した歯面に適用されることも少なくない。ホームブリーチング剤がバイオフィルム中の細菌を効果的に殺菌できれば、漂白と齲蝕・歯周病予防を兼ね備えた方法であると謳うことができるが、口腔内に存在する多数の細菌から構成されるバイオフィルムに対してホームブリーチング剤の殺菌性を検討した研究はなかった。本論文では口腔内類似のバイオフィルムを用いて効果を検討した新規性の高い論文と思われる。

研究方法の概略は以下の通りである。溶液として過酸化尿素希釈液、市販のホームブリーチング剤である **HiLite Shade Up** ならびに **Opalescence Regular** を 20 倍希釈したものおよび比較として 0.2% グルコン酸クロルヘキシジンを用いた。24 時間および 72 時間培養したヒト唾液を添加したバイオフィルムに対して各溶液を一定時間作用させ、生菌数測定と殺菌状態の形態学的観察を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。バイオフィルムは多数の細菌の集合体であり浮遊細菌に比較し薬剤耐性も高い。口腔内に類似したバイオフィルムに対する影響を比較的簡便なモデルを用いて検討した本研究は臨床での有用性を見極める上でも極めて意義深いと考えられた。

結果として、20 倍に希釈されたホームブリーチング剤は、24 時間培養後と 72 時間培養後のバイオフィルムに対して 0.2% グルコン酸クロルヘキシジン洗口液と同等の殺菌効果を示すということは確認された。また、0.5, 2.5, 5, 10% に調整した各濃度の過酸化尿素水溶液を用いて濃度依存性を調べた結果、強い負の相関も得られている。共焦点レーザー顕微鏡にて観察した結果は、濃度が高くなるにつれて死菌が多く確認されていた。以上の結果は、形成されたバイオフィルムに対してホームブリーチング剤の殺菌効果を明確に示しており、ホームブリーチング剤がホワイトニングと齲蝕・歯周病予防効果を兼ね備えた材料であることを示唆した興味深い研究論文であると評価した。

本審査委員会は申請者に対して、論文内容に関する説明と主査、副査による研究結果の解釈、本研究の臨床的意義、今後の展望等の質問に対して十分に満足できる回答が得られたことから申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

本審査委員会は申請者が博士（歯学）の位に十分値するもと認めた。

2015年3月6日

主査：三辺 正人 教授

副査：槻木 恵一 教授

副査：二瓶 智太郎 准教授

## 目 次

緒 言	1
実験材料および方法	3
結 果	8
考 察	10
結 論	14
謝 辞	15
文 献	16
付図説明	23
表および図	
表 1	26
表 2	27
図 1	28
図 2	29
図 3	30
図 4	31
図 5	32
図 6	33

☒ 7	34
☒ 8	35
☒ 9	36

## 緒 言

近年、審美意識の高まりにより歯の漂白を希望する患者が増加している。歯の漂白には診療所で行うオフィスブリーチングや自宅で行うホームブリーチングがある。オフィスブリーチングは診療所で行うため、専門家による PMTC 後プラークを完全に除去した状態で歯の漂白を行うことが可能である。一方、ホームブリーチングは通常自宅にてブラッシング後に行うため、歯頸部や隣接面等にプラークが残存している場合が度々見受けられる<sup>1)</sup>。したがって、そのような部位にホームブリーチング剤が抗菌効果を発揮する可能性があれば、歯の漂白の期間に齲蝕予防も期待できる。

ホームブリーチング剤の主成分である過酸化尿素は本来、歯周病治療などに使用されてきた<sup>2,3)</sup>。過酸化尿素は熱などにより過酸化水素と尿素に分解される。10%過酸化尿素からは 3.35%の過酸化水素が分離され<sup>4)</sup>、この濃度は高濃度の過酸化水素のような組織障害がなく、毒性や副作用を起こさないとされている<sup>5,6)</sup>。

近年、鈴木らは過酸化尿素が齲蝕病原菌 (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus naeslundii*) に対して殺菌的に作用し、スクロース依存性不溶性グルカン合成活性を顕著に阻害し抗齲

蝕作用を有していることを報告した<sup>7)</sup>。しかしながら、バイオフィルム環境下における過酸化尿素の蝕抑制効果を検討した研究はまだ少ない。

蝕発生メカニズムは、蝕原因菌が歯の表面に固着・堆積し、バイオフィルム内に酸が蓄積されるにより、エナメル質が脱灰されて誘発されるとされている<sup>8-11)</sup>。バイオフィルムは基質に取り囲まれ、細胞が界面や表面に個々に、またはお互いに接着するような微生物の集落と定義されており<sup>12)</sup>、約 1,000 種類の異なった菌種による複雑な生態系と菌体外多糖 (extracellular polysaccharide) によって構成されている<sup>13)</sup>。バイオフィルム中の細菌は浮遊している細菌と比べて抗菌剤に対してより抵抗があり<sup>14, 15)</sup>、口腔内バイオフィルムのクロルヘキシジンに対する抵抗力は浮遊した細菌と比較して最大 250 倍と報告されている<sup>16)</sup>。

バイオフィルムの研究においては、いくつかの *in vitro* や *in situ* のモデルが開発されている<sup>17-20)</sup>。これらのモデルはデンタルプラークの多菌性の複雑さを再現することができるが、操作が煩雑なこと、培養期間が長期にわたること、固相 (基質) への細菌の付着が困難なこと等の多くの問題点がある。近年、Exterkate らにより新しい多



菌種入りバイオフィルム（ポリマイクロバイアルバイオフィルム（PM バイオフィルム））モデルが開発された<sup>21, 22)</sup>。このモデルは他のモデルと比較して、1) 口腔内に存在する多種の細菌からなるバイオフィルム作製が可能である、2) 一つの装置内で異なった固相（基質）が使用でき、複数の独立したバイオフィルム反応系の作製および処理時間や処理濃度の調節も可能である、3) 強固な付着を得ることができ、バイオフィルムが剥離しにくい、などの特徴を有している。近年、このモデルを使用した抗菌剤や抗菌材料の殺菌効果や抗菌活性について報告がされている<sup>23-25)</sup>。

そこで、本実験はこのモデルを使用して作製した PM バイオフィルムに対するホームブリーチング剤と過酸化尿素水溶液の殺菌効果を検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 薬液の調整

表 1 に使用した各試薬を示した。試験群として、過酸化尿素水溶液は粉末（Sigma-Aldrich, St. Louise, Missouri, USA）を滅菌脱イオン水（DW）にて 10, 5, 2.5 および 0.5 %の濃度に調製した 10CP, 5CP,

2.5CP, 0.5CP, 市販のホームホワイトニング剤である HiLite Shade Up (Shofu Inc., Kyoto) と Opalescence Regular (Ultradent Products Inc., South Jordan, Oregon, USA) (表 2) を滅菌 DW にて 20 倍まで希釈した 0.5HS, 0.5OR, また, 対照群として, CORSODYL (0.2%グルコン酸クロルヘキシジン配合洗口剤, GlaxoSmithKline, Middlesex, United Kingdom, 0.2CHX) と 0.2%フッ化ナトリウム溶液 (0.2NaF) を, 陰性対照群として滅菌 DW (Cont) を用いた.

## 2. 唾液の採取

唾液の採取については神奈川歯科大学倫理委員会の承認 (承認番号 206) を得て行った. 齲蝕および歯周病を持っておらず, 抗生物質や含嗽剤を使用していない健康な一成人刺激唾液を採取した. 唾液提供者は採取する前の 24 時間前からブラッシングを, 2 時間前から飲食を控えた. 次いで Parafilm M Barrier Film (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA) を咀嚼することにより刺激唾液を採取した. 採取した唾液を壊死組織片除去のために, 滅菌したガラスウール (NRK GRW-10, Nippon Rikagaku Kikai CO. LTD., Tokyo) にて濾過した後, 滅菌された 70%グリセリンにて 2 倍に希釈して, 実験に使用するまで-80 °C にて保管した.

### 3. PM バイオフィルムの作製

バイオフィルムの形成は, Exterkate らが考案した “high-throughput active attachment model (図 1)” を使用した<sup>21,22)</sup>. 24 ウェルプレート (Greiner Bio-One Japan, Tokyo) の各ウェルに, 50 倍希釈した唾液を添加させた buffered McBain 2005 培養液 (2.5 g/l mucin, 2.0 g/l Bacto peptone, 2.0 g/l Trypticase peptone, 1.0 g/l yeast extract, 0.35 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l CaCl<sub>2</sub>, 0.001 g/l hemin, and 0.0002 g/l vitamin K1 , 0.2 % sucrose, 50 mmol/l PIPES を含有し pH 7.0 に調製<sup>26)</sup>) を 1.5 ml 注入, 特注で作製したステンレス製の 24 ウェルプレートの上蓋内面に取り付けた固定クランプにカバーガラス (直径 12 mm, 厚さ 0.15 mm, Menzel, Braunschweig, Germany) を懸架し, 10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>, 80 % N<sub>2</sub> の嫌気条件下, 37 °C で 10 時間培養後, 唾液を含まない新鮮培養液入りの 24 ウェルプレートに交換して, カバーガラス上にバイオフィルムを形成した (図 2). 培養時間は合計 24 時間および 72 時間とし, 培養液の交換は好気条件下で 10 時間, 14 時間のサイクルで行った (図 3).

### 4. 抗菌剤処理

培養終了後, バイオフィルムが付着したカバーガラスを固定して

いるステンレス製の 24 ウェルプレートの上蓋を、各薬液を 1.6 ml 注入した 24 ウェルプレートに移し、カバーガラス上に形成されたバイオフィルムを浸漬処理した。Cont (DW)、およびすべての CP, 0.5HS および 0.5OR の処理は嫌気条件下で 30 分間、また 0.2CHX および 0.2NaF の処理は 5 分間とした。処理時間は製品指示書ならびに臨床での使用方法を参考に決定したが、HS および OR の使用時間は最短に設定した。

#### 5. 生菌数の測定 (CFU/ml)

抗菌剤処理後、ウェルプレートの上蓋を cysteine peptone water (CPW) を 2.0 ml 注入したウェルプレートに移して、上蓋を上下に 10 回振盪した。その後、CPW を交換して同様の操作を合計 3 回行うことにより、試料に付着した薬液とバイオフィルム表面に付着した浮遊菌を取り除いた。

洗浄後、バイオフィルムが付着したカバーガラスを慎重に取り外し、CPW を 2 ml 注入したプラスチック容器中に浸漬、90 秒間の超音波処理 (Transsonic T780, Elma electric GmbH, Stuttgart, Germany) と 30 秒間のボルテックス (VTX-3500, LMS, Tokyo) を行うことにより、試料に付着したバイオフィルムを剥離・分散させた。その後、

バイオフィルムを分散させた懸濁液を CPW にて  $10^6$  倍まで段階希釈し、血液寒天培地上に播種後、4 日間の嫌気培養を行った（各群  $n = 10$ ）。培養後、培地上に形成されたコロニー数を数え、生菌数（CFU/ml）を算定した。

## 6. 統計分析

統計分析は専用の統計ソフト（IBM SPSS ver. 21.0, IBM, Tokyo）にて行った。各薬液の殺菌効果の検討は有意水準 5 % で one-way ANOVA および Games-Howell 検定にて行った。また、細菌数と CP 濃度の関係性を有意水準 1 % で Spearman の順位相関係数にて評価した。

## 7. 共焦点レーザー顕微鏡観察（CLSM 観察）

72 時間培養後のバイオフィルムを Cont, 0.5CP, 10CP にて処理後、生理食塩水にて洗浄し、SYTO 9 と propidium iodide（LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L-13152, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA）にて 30 分間染色を行った。染色されたバイオフィルムが付着しているカバーガラスをスライドガラス上に乗せ、60 % グリセロールと 18×18 mm のカバーガラス（Matsunami Glass Ind., Ltd, Osaka）にてバイオフィルムが破壊しないように慎重に封入した。ス

ライドグラスを共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon E800, Nikon, Tokyo) にセッティングした後, 各バイオフィルムを表層, 中間層, 深層に分けて, 過酸化尿素の濃度による生菌と死菌の状態を観察した (図 4). 観察した CLSM 画像は専用のソフトウェア (Simple PCI, Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka) にて処理を行った.

## 結 果

### 1. 24 時間培養バイオフィルムに対するホームブリーチング剤の殺菌効果

図 5 に 24 時間培養のバイオフィルムに対するホームブリーチング剤とその他抗菌剤の処理後の生菌数を示した. 生菌数を比較した結果, Cont ( $8.48 \times 10^7 \pm 1.91 \times 10^7$  CFU/ml) と 0.2NaF ( $9.66 \times 10^7 \pm 9.48 \times 10^6$  CFU/ml) の間に有意な差が見られなかったが, ホームブリーチング剤である 0.5HS ( $2.20 \times 10^5 \pm 9.27 \times 10^4$  CFU/ml) と 0.5OR ( $3.04 \times 10^5 \pm 1.06 \times 10^5$  CFU/ml) はそれぞれ Cont に対して 99.7 %, 99.6 % の減少を示した. また, ホームブリーチング剤は Cont や 0.2NaF より有意な生菌数の減少が確認され, Cont に対して 99.6 % の減少を示した 0.2CHX ( $3.28 \times 10^5 \pm 1.50 \times 10^5$  CFU/ml) と同程度の殺菌効果が認めら

れた.

## 2. 24 時間培養バイオフィルムに対する CP の濃度依存的な殺菌効果

CP 間の生菌数の比較では濃度依存的な殺菌効果を示し (0.5CP ;  $1.61 \times 10^6 \pm 9.06 \times 10^5$  CFU/ml, 2.5CP ;  $6.14 \times 10^3 \pm 6.77 \times 10^3$  CFU/ml, 5CP ; 0 CFU/ml, 10CP ; 0 CFU/ml), 細菌数と CP の濃度の関係性は強い負の相関 ( $r = -0.962$ ,  $p < 0.01$ ) を示した (図 6). また 5CP および 10CP においては血液寒天培地上に細菌の発育が見られなかった.

## 3. 72 時間培養バイオフィルムに対するホームブリーチング剤の殺菌効果

図 7 に 72 時間培養のバイオフィルムに対するホームブリーチング剤とその他抗菌剤の処理後の生菌数を示した. 生菌数を比較した結果, Cont ( $1.52 \times 10^9 \pm 3.93 \times 10^8$  CFU/ml) と 0.2NaF ( $1.48 \times 10^9 \pm 2.04 \times 10^8$  CFU/ml) の間に有意な差が見られなかったが, ホームブリーチング剤である 0.5HS ( $1.60 \times 10^8 \pm 9.96 \times 10^7$  CFU/ml) と 0.5OR ( $2.34 \times 10^8 \pm 1.07 \times 10^8$  CFU/ml) はそれぞれ Cont に対して 89.5 %, 84.6 % の減少を示した. また, ホームブリーチング剤は Cont や 0.2NaF より有意な生菌数の減少が確認され, Cont に対して 88.8 % の減少を示した 0.2CHX ( $1.70 \times 10^8 \pm 2.99 \times 10^7$  CFU/ml) と同程度の殺菌効果が認めら

れた。

#### 4. 72 時間培養バイオフィルムに対する CP の濃度依存的な殺菌効果

CP 間の生菌数の比較では濃度依存的な殺菌効果を示し (0.5CP ;  $7.46 \times 10^7 \pm 2.29 \times 10^7$  CFU/ml, 2.5CP ;  $3.57 \times 10^4 \pm 4.05 \times 10^4$  CFU/ml, 5CP ;  $2.00 \times 10^1 \pm 2.31 \times 10^1$  CFU/ml, 10CP ; 0 CFU/ml), 72 時間培養バイオフィルムに対しても, 細菌数と CP の濃度の関係性は強い負の相関 ( $r = -0.969$ ,  $p < 0.01$ ) を示した (図 8). また 10CP においては血液寒天培地上に細菌の発育が見られなかった。

#### 5. CLSM 観察

72 時間培養バイオフィルムに Cont, 0.5CP および 10CP で浸漬処理後の CLSM 画像では CP の濃度が上昇するにつれて, 赤く発光した死菌が増加し, 緑に発光した生菌が減少したことが確認された (図 9).

## 考 察

本研究では濃度を薄くしたホームブリーチング剤が世界的に使用されている 0.2 % クロルヘキシジンと同程度の殺菌効果があることが多菌種バイオフィルムモデルを用いて示され, 過酸化尿素の濃度



が上がるにつれより強力な殺菌効果を示すことも確認された。

過酸化尿素の齲蝕予防効果についてはいくつか報告がある。Bentley らはホームブリーチング剤をカスタムトレーに入れて 1 日 1 時間で 6 週間使用することにより、*lactobacilli* と *mutans streptococci* 共に減少したことを報告している<sup>27)</sup>。竹中らはホームブリーチングを行うことにより、口腔内細菌が減少し、バイオフィルムを可及的に除去する PMTC の併用によって得られる口腔内細菌に対する作用やプラーク付着抑制作用があることを報告している<sup>28)</sup>。これらの研究は口腔内で行ったものであるが、バイオフィルムに対する効果を検討したものではなく、純粋なブリーチング効果を示したものではないと考えられる。今回の我々の実験は *in vitro* モデルであるが、口腔内に近いバイオフィルムを使用し、純粋に薬効成分の効果を検討した。ホームブリーチング剤はトレーに薬剤を入れて使用するが、漂白部位から離れた歯面あるいは歯間隣接面では濃度が著しく薄くなっている可能性が考えられることから本実験では 20 倍希釈したホームブリーチング剤を使用し、殺菌効果を検討した。

ホームブリーチング剤は過酸化尿素が主に使用されている。過酸化尿素は反応後、3 分の 2 が尿素に、3 分の 1 が過酸化水素に分解さ

れる。尿素には軽度の殺菌効果があり、ウレアーゼ活性によりアンモニアと二酸化炭素に分解される。さらに、カリエスフリーの個人は高いアンモニウム濃度を持っており、プラーク中の pH が上がっていると報告されている<sup>29, 30)</sup>。一方、過酸化水素は細胞内の Fe<sup>2+</sup>のような遷移金属の存在でマイクロモル濃度でのフェントン反応によってヒドロキシラジカルに分解する。歯のブリーチングは過酸化水素由来のフリーラジカルによりエナメル質色素分子中の不飽和二重結合を切断することにより漂白を進行させると考えられている<sup>31)</sup>。また、これらフリーラジカルは、細菌にも作用し<sup>32)</sup>、クロルヘキシジンなどの抗菌剤に比べ耐性菌が出現しないと言われており複数回使用可能であるため、ホームブリーチング剤による殺菌処理は非常に有効であると思われる。

今回、ホームブリーチング剤と同程度の殺菌効果を示したグルコン酸クロルヘキシジンは広域な抗菌スペクトルを持っており、*S. mutans* にも作用するため、臨床では齲蝕予防を目的としても頻繁に使用されている<sup>33, 34)</sup>。その一方で、0.2%フッ化ナトリウム水溶液は脱イオン水と同様の結果に止まった。NaF は抗細菌性を持つと報告されているが<sup>35, 36)</sup>、口腔内の成熟したデンタルプラークに対しては

0.2 %という高濃度のフッ化物でも効果が限定されているという報告もされおり<sup>37)</sup>、本研究でも追従した結果が得られた。

CLSM 画像では過酸化尿素の濃度が高くなるにつれて、死菌と思われる赤く染まった細胞が増加し、生菌と思われる緑色に染まった細胞が減少した。また、10 %過酸化尿素群では血液寒天培地上でコロニーを形成しなかったが、CLSM 画像では緑に発光した生菌と思われる細胞が確認された。これは血液寒天培地上でコロニー形成されなかった生菌の存在、あるいは細菌に対する抗菌剤の作用機序の違いによるものと思われる。また、Live/Dead 染色と呼ばれているが、正確には生菌・死菌の区別ではなく細胞膜の障害を反映しており、赤色の発光であっても時間の経過とともに障害が修復されることにより細菌が増殖する可能性も否定できず、しばしば偽陽性と判定されることが報告されている<sup>38)</sup>。

近年 *in vitro* において、バイオフィルムに対する過酸化尿素の殺菌効果についての論文が発表された<sup>20)</sup>。この論文は24 ウェルプレート  
の底に形成された剥がれ易いバイオフィルムに対して5 %と10 %の過酸化尿素の効果を検討している。本実験ではトレーを装着した歯面のうちブリーチング剤が届きにくいような部位を想定して過酸化

尿素の濃度を薄く設定しており，このような低濃度であっても強固な付着を持つバイオフィルムに効果的な殺菌効果が得られたということが確認できた．

以上のことから，過酸化尿素を主成分とするホームブリーチング剤は歯の漂白作用だけでなく，バイオフィルムに対して強い殺菌効果を示したことより，審美とオーラルヘルスを兼ねた治療法であることが示された．

## 結 論

ホームブリーチング剤および過酸化尿素水溶液は漂白作用だけでなくバイオフィルムに対して殺菌効果を示した為，齲蝕および歯周病の予防に効果的であることが示唆された．

## 謝 辞

本実験の遂行にあたり，多大な御指導，ご協力を頂いた神奈川歯科大学大学院歯学研究科う蝕制御修復学講座の寺中敏夫名誉教授および教室員各位に深謝いたします．また，微生物感染学講座の浜田信城教授および神経組織発生学講座の高橋 理教授ならびに教室員各位に，心より御礼申し上げます．

## 参考文献

1. Firestone AR, Mühlemann HR. *In vivo* pH of plaque-covered and plaque-free interdental surfaces in humans following a sucrose rinse. Clin Prev Dent **7** : 24-26, 1985.
2. Reddy J, Salkkin LM. The effect of urea peroxide rinse on dental plaque and gingivitis. J Periodontol **47** : 607-610, 1976.
3. Listgarten MA, Grossberg D, Schwimer C, Vito A, Gaffar A. Effect of subgingival irrigation with tetrapotassium peroxidiphosphate on scaled and untreated periodontal pockets. J Periodontol **60** : 4-11, 1989.
4. Marshall MV, Cancro LP, Fischman SL. Hydrogen peroxide: a review of its use in dentistry. J Periodontol **66** : 786-796, 1995.
5. Haywood VB, Heymann HO. Nightguard vital bleaching. Quintessence Int **20** : 173-176, 1989.
6. Haywood VB, Leonard RH, Nelson CE, Brunson WD. Effectiveness, side effects and long-term status of night-guard vital bleaching. J Am Dent Assoc **125** : 1219-1226, 1994.
7. 鈴木英明, 鈴木義純, 岡田珠美, 神谷直孝, 森 俊幸, 藤田 光, 池見宅司. 過酸化尿素の齲蝕原因菌に対する抗菌効果. 日歯保存

- 誌 **55** : 373-380, 2012.
8. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* **44** : 331-384, 1980.
  9. Gibbons RJ, van Heute J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann Rev Microbiol* **29** : 19-44, 1975.
  10. 高橋信博. 歯垢生態系への生化学的アプローチ. *東北大歯誌* **21** : 18-32, 2002.
  11. Featherstone JDB. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J* **53** : 286-291, 2008.
  12. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49** : 711-745, 1995.
  13. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* **94** : 1-9, 2006.
  14. Tenover FC. Mechanisms of anti-microbial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* **34** **3S-10S** : discussion 64S-73S, 2006.
  15. Black CE, Costerton JW. Current concepts regarding the effect of wound microbial ecology and biofilms on wound healing. *Surg Clin*

- North Am **90** : 1147-1160, 2010.
16. Pratten J, Wilson M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrob Agents Chemother* **43** : 1595-1599, 1999.
17. Peters AC, Wimpenny JW. A constant-depth laboratory model film fermentor. *Biotechnol Bioeng* **32** : 263-270, 1988.
18. McBain AJ, Bartolo RG, Calcnich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of in vitro plaque ecosystems. *Antimicrob Agents Chemother* **47** : 3531-3538, 2003.
19. Sissons CH, Anderson SA, Wong L, Coleman MJ, White DC. Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. *Caries Res* **41** : 413-422, 2007.
20. Yao CS, Waterfield JD, Shen Y, Haapasalo M, Macentee MI. In vitro antibacterial effect of carbamide peroxide on oral biofilm. *J Oral Microbiol* **5** : 20392, 2013.
21. Exterkate RAM, Crielaard W, ten Cate JM. Different Response to



- Amine Fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res* **44** : 372-379, 2010.
- 22.Exterkate RAM, Zaura E, Buijs MJ, Koopman J, Crielaard W, ten Cate JM. The effects of propidium monoazide treatment on the measured composition of polymicrobial biofilms after treatment with chlorhexidine. *Caries Res* **48** : 291-298, 2014.
- 23.Huang X, Exterkate RAM, ten Cate JM. Factors associated with alkali production from arginine in dental biofilms. *J Dent Res* **91** : 1130-1134, 2012.
- 24.Zhang K, Melo MA, Cheng L, Weir MD, Bai Y, Xu HH. Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. *Dent Mater* **28** : 842-852, 2012.
- 25.Arthur RA, Waeiss RA, Hara AT, Lippert F, Eckert GJ, Zero DT. A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res* **47** : 318-324, 2013.
- 26.McBain AJ, Sissons C, Ledger RG, Sreenivasan PK, Devizio W,

- Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol* **98** : 624-634, 2005.
- 27.竹中章治, 福島正義, 小林幸恵, 岩久正明. ホームブリーチングの口腔内環境に与える影響について. *日本歯科評論* **726**:133-139, 2003.
- 28.Bentley CD, Leonard RH, Crawford JJ. Effect of whitening agents containing carbamide peroxide on cariogenic bacteria. *J Esthet Dent* **12**. 33-7, 2000.
- 29.Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC. Composition of pooled resting plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J Dent Res* **67** : 1468-1475. 1988;
- 30.Nascimento MM, Gordman VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol* **24** : 89-95, 2009.
- 31.Goldstein R, Garger D. Complete dental bleaching. Chicago: Quintessence : 28-31, 1995.
- 32.Ikai H, Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Iwasawa A, Sasaki K, Niwano Y, Kohno M. Photolysis of hydrogen peroxide, an effective

- disinfection system via hydroxyl radical formation. *Antimicrob Agents Chemother* **54**. 5086-5091, 2010.
- 33.Emilson CG. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J Dent Res* **73** : 682-691, 1994.
- 34.Tamaki Y, Nomura Y, Takeuchi H, Ida H, Arakawa H, Tsurumoto A, Kumagai T, Hanada N. Study of the clinical usefulness of a dental drug system for selective reduction of *mutans streptococci* using a case series. *J Oral Sci* **48** : 111-116, 2006.
- 35.Santosh P, Jeong-Eun K, Kyung-Hee J, Kee-Wan C, Jae-Gyu J. Effect of sodium fluoride on the virulence factors and composition of *Streptococcus mutans* biofilms. *Arch Oral Biol* **56** : 643-649, 2011.
- 36.Yoshihara A, Sakuma S, Kobayashi S, Miyazaki H. Antimicrobial effect of fluoride mouthrinse on *mutans streptococci* and *lactobacilli* in saliva. *Pediat Dent* **23** : 113-117, 2001.
- 37.Watson PS, Pontefract HA, Devine DA, Shore RC, Nattress BR, Kirkham J, Robinson C. Penetration of fluoride into natural biofilms. *J Dent Res* **84** : 451-455, 2005.
- 38.大墨竜也, 竹中彰治, 坂上雄樹, 若松里佳, 寺尾 豊, 大島勇人,

興地隆史. *Streptococcus mutans* バイオフィルムに対するリステリン®ナチュラルケアの浸透性と殺菌効果の評価. 日歯周誌 **56** : 291-301, 2014

## 付図説明

表 1. 本実験で使用した薬剤と処理時間

表 2. 本実験で使用したホームブリーチング剤の成分

図 1. 本実験で使用したバイオフィルムモデル

図 2. バイオフィルムの形成法

カバーグラスを特製の蓋に固定した後、唾液と培養液を注入した 24 well プレートに装着し、嫌気培養を行った。

図 3. 実験タイムスケジュール

培養液の交換は 10 時間 14 時間のサイクルで行い、24 時間あるいは 72 時間まで培養を行った。

図 4. CLSM 観察部位

処理、染色後、カバーグラスに付着したバイオフィルムを 3  $\mu\text{m}$  毎に断層撮影した後に重ねあわせ、表層、中間層、深層の 3 層に分け

て観察した.

図 5. 24 時間培養後のバイオフィルムに対するホームブリーチング剤の殺菌効果

ホームブリーチング剤である 0.5HS と 0.5OR は Cont と 0.2NaF より有意な生菌数の減少が確認され, 0.2CHX と同程度の殺菌効果が認められた.

図 6. 24 時間培養後のバイオフィルムに対する CP の各濃度の殺菌効果

Spearman の順位相関係数は  $r = -0.962$  であり, 1%未満の有意水準で有意な負の相関がみられ, 細菌数と CP の濃度の関係性は濃度依存的に明らかな生菌数の減少が見られた.

図 7. 72 時間培養後のバイオフィルムに対するホームブリーチング剤の殺菌効果

ホームブリーチング剤である 0.5HS と 0.5OR は Cont と 0.2NaF より有意な生菌数の減少が確認され, 0.2CHX と同程度の殺菌効果が認められた.

図 8. 72 時間培養後のバイオフィルムに対する CP の各濃度の殺菌効果

Spearman の順位相関係数は  $r = -0.969$  であり, 1%未満の有意水準で有意な負の相関がみられ, 細菌数と CP の濃度の関係性は濃度依存的に明らかな生菌数の減少が見られた.

図 9. Cont, 0.5CP, 10CP にて処理した後の Live/Dead 染色された 72 時間培養後のバイオフィルムの CLSM 画像 (Bar = 100  $\mu\text{m}$ ).

各群のバイオフィルムを 3  $\mu\text{m}$  ごとに断層撮影して 3分の1を重ね合わせて取り込んだ画像.

緑に染まった部位が生菌, 赤く染まった部位が死菌を表す. 10CP では Cont と 0.5CP に比べて死菌が深部まで多くみられたことから CP は濃度依存的な殺菌作用を示すことが確認された.

表 1.

処 理 液	処理時間	略 号
DW (コントロール)	30分	Cont
0.2%NaF水溶液	5分	0.2NaF
0.2%グルコン酸クロルヘキシジン	5分	0.2CHX
HiLite Shade Up 希釈液	30分	0.5HS
Opalescence Regular 希釈液	30分	0.5OR
0.5%過酸化尿素水溶液	30分	0.5CP
2.5%過酸化尿素水溶液	30分	2.5CP
5.0%過酸化尿素水溶液	30分	5CP
10.0%過酸化尿素水溶液	30分	10CP



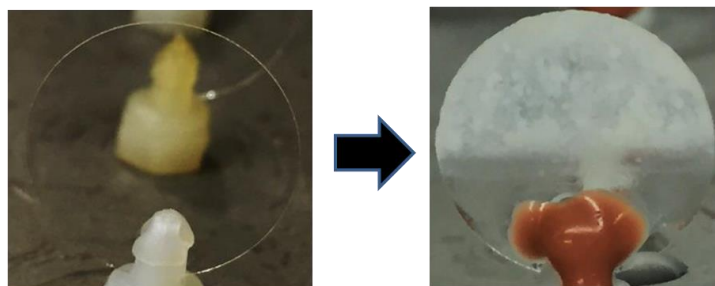
表 2.

	成分	製造会社	Lot No.
HiLite Shade Up	過酸化尿素(10%), ビニルポリマー, グリセリン, 香料, プロピレングリコール, ポリエチレングリコール	Shofu Inc.	11143065
Opalescence Regular	過酸化尿素(10%), ビニルポリマー, グリセリン, 香料, ポリエチレングリコール	Ultradent Products Inc.	B8NFS

図 1.



↑特注で作製したステンレス製の24ウェルプレートの上蓋(右図:内面)



↑左図:カバーガラスを上蓋内面に取り付けたクランプに固定した直後  
右図:培養終了後のカバーガラスに付着したバイオフィルム

図 2.

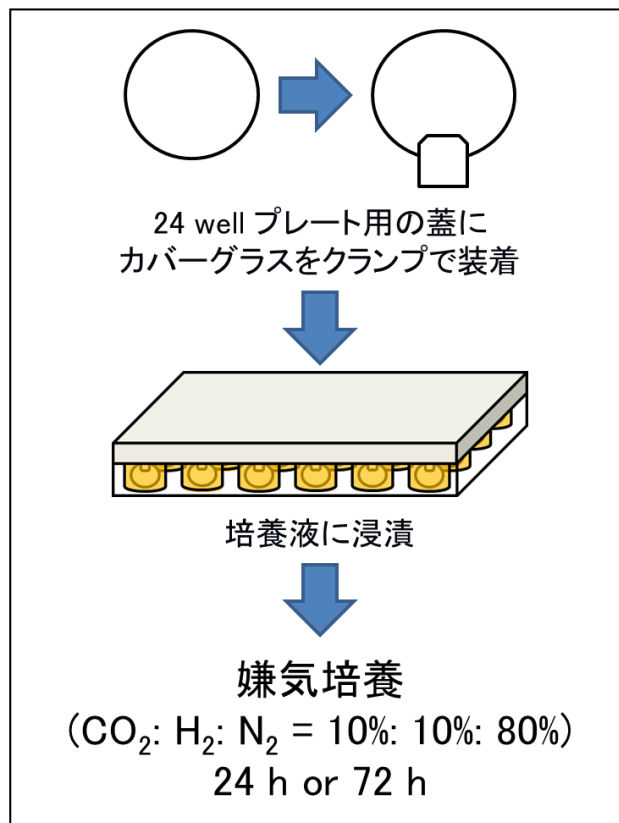


図 3.

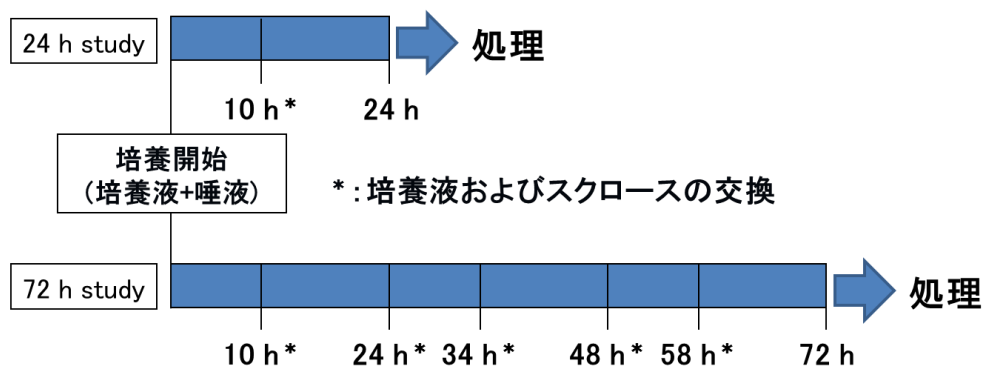


図 4.

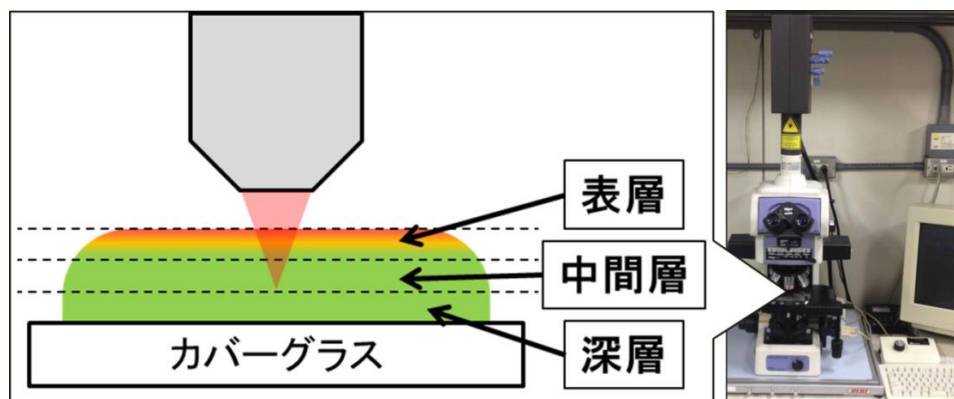


図 5.

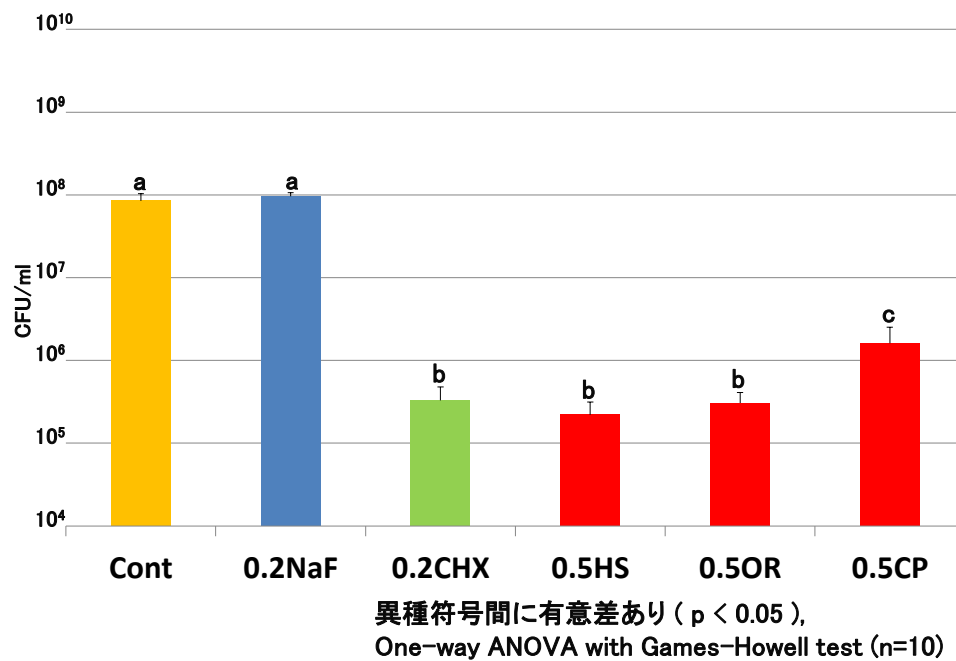


図 6.

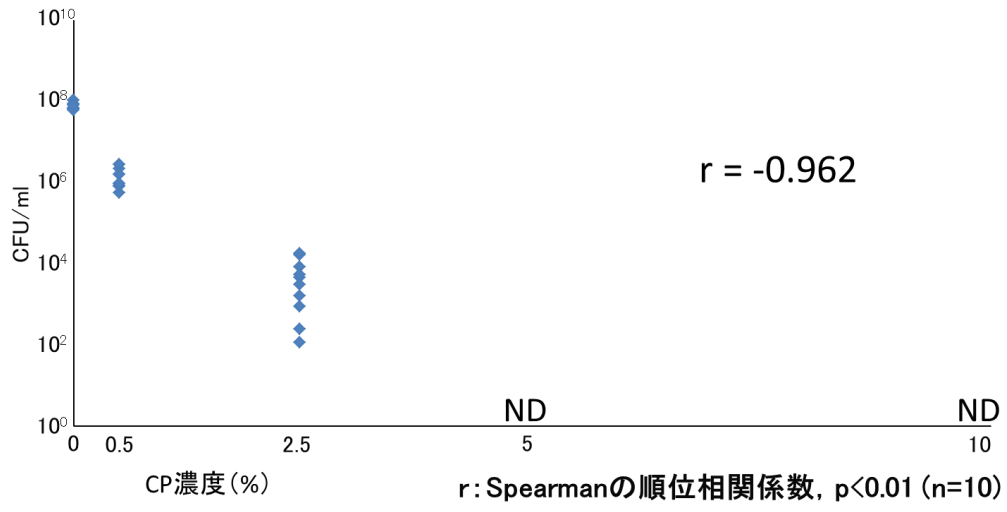


図 7.

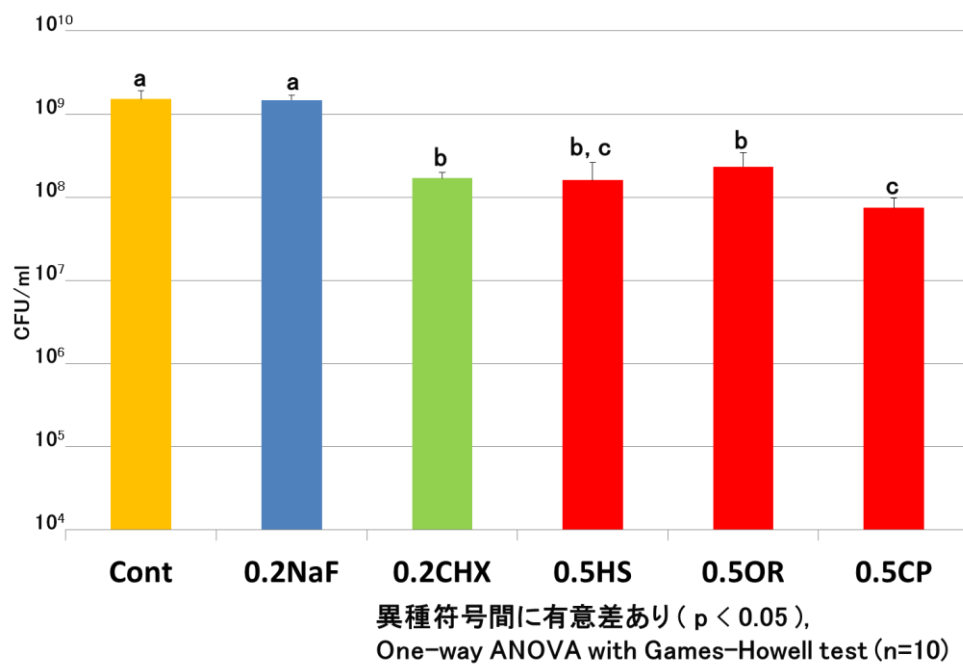




図 8.

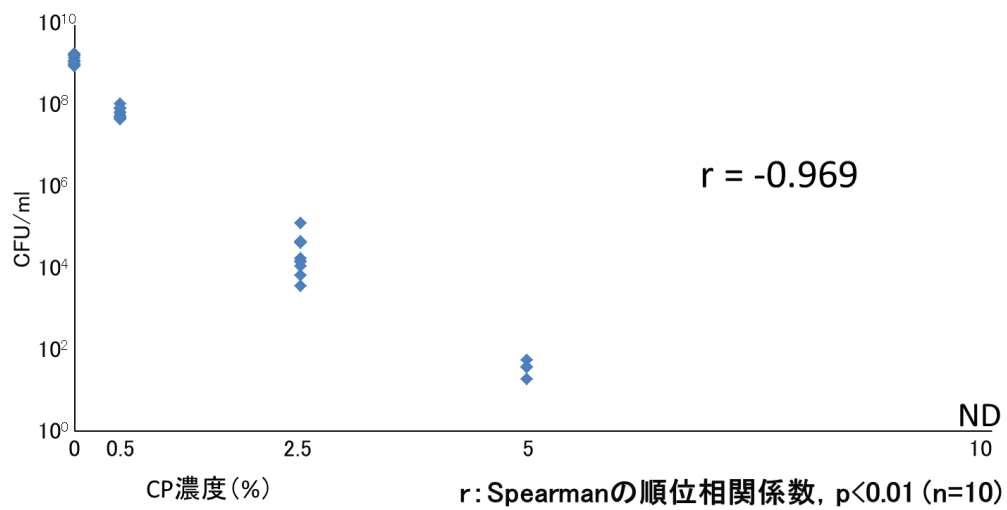


図 9.

