

根管バイオフィーム・モデルにおける 歯周病原性微生物に対するオゾンの有効性

K. C. Huth¹, M. Quirling^{1,2}, S. Maier¹, K. Kamereck³, M. AlKhayer¹, E. Paschos⁴, U. Welsch⁵, T. Miethle³,
K. Brand⁶ & R. Hickel¹

¹ ミュンヘン、ルードヴィヒ-マキシミリアンズ大学修復歯科歯周療法学部；² ミュンヘン、ミュンヘン工科大学
イザール川右岸クリニック臨床化学病理生化学研究所；³ ミュンヘン、ミュンヘン工科大学医学微生物学免疫学
衛生研究所；ミュンヘン、ルードヴィヒ-マキシミリアンズ大学⁴ 矯正歯科および⁵ 解剖科；および⁶ ドイツ、ハ
ノーファー、ハノーファー医科大学臨床化学研究所

概要

Huth KC, Quirling M, Maier M, Kamereck K, AlKhayer M,
Paschos E, Welsch U, Miethle T, Brand K, Hickel R.
根管バイオフィーム・モデルにおける歯周病原性微生物に対す
るオゾンの有効性。International Endodontic Journal 2009
年 42 号 p.3-13。

目的 サスペンションおよびバイオフィーム・モデルにおける、
オゾン水 (1.25–20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) および気体オゾン (1–53 gm^{-3})
の歯内病原体に対する代替消毒薬としての抗菌効果の評価。

方法 *Enterococcus faecalis*、*Candida albicans*、
Peptostreptococcus micros および *Pseudomonas aeruginosa*
を根管内においてプランクトン・カルチャー、または単種バイ
オフィーム内で 3 週間増殖させた。カルチャーはオゾン、次亜
塩素酸ナトリウム (NaOCl; 5.25%、2.25%)、ジグルコン酸ク
ロールヘキシジン (CHX; 2%)、過酸化水素 (H_2O_2 ; 3%) および
リン酸緩衝生理食塩水に 1 分間さらし、その後残ったコロニー
形成ユニットの数を数えた。気体オゾンは、根管内の到達しに
くいエリア (設定 1) と到達しやすいエリア (設定 2) に似せ
た 2 つの実験的設定においてバイオフィームに適用された。最
高 10 分間の経時変化実験も行った。被験サンプルを比較する
ため、データは一元配置分散分析により分析した。

結果 NaOCl および CHX と同様、気体オゾンの場合は最低
1 gm^{-3} の濃度でほとんど、そしてオゾン水の場合は最低 5 μg
 mL^{-1} の濃度で完全にサスペンション中の微生物を除去した。
過酸化水素およびより低濃度のオゾン水の効果はそれと比べ
るとより低かった。オゾン水および気体オゾンのバイオフィ
ームの微生物に対し投与量依存性および歪依存性の効果を示し
た。完全な除去は高濃度気体オゾン (設定 2) または NaOCl
への 1 分間の暴露、またより低い気体濃度 (4 gm^{-3}) への最低
2.5 分の暴露により達成された。高濃度オゾン水 (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
および CHX はほぼ完全にバイオフィーム細胞を除去した一方、
 H_2O_2 の効果は比較的 low かった。

結論 高濃度気体オゾンおよびオゾン水は、サスペンション中
およびバイオフィーム・テストモデルにおける被験微生物に対
し、投与量依存性、歪依存性、および時間依存性の効果を持つ。
キーワード: 抗菌性、バイオフィーム、歯内療法学、微生物
学、オゾン、根管

提出 2007 年 4 月 18 日；受理 2008 年 7 月 1 日

連絡先：Karin Christine Huth 博士

ルードヴィヒ-マキシミリアンズ大学歯学部修復
歯科歯周療法小児歯科学部

Goethestr. 70. 80336 Munich, Germany (電話:

+49 89 5160 9411; FAX: +49 89 5160 9302;

Eメール: khuth@dent.med.uni-muenchen.de

導入

病原微生物に冒された根管、特に持続性の根尖性歯周炎を伴う
根管の治療の達成は依然として臨床上の難問である (Nair
2006 年)。歯内療法の主な目的は根管系における微生物負荷を

根絶、あるいは大幅に削減することであるが、従来はそれをケモメカニカルな器具の使用と、それに続く微生物の復活を妨げるための根管充填により行っていた (Nair 2006 年)。歯内洗浄剤は効果的な抗菌活性を持たなければならないが、根尖部および口腔粘膜組織に対する細胞毒性はほぼ皆無でなければならない。抗炎作用は、特に持続的な根尖性歯周炎の場合に有利である可能性もある。

Enterococcus faecalis および *Candida albicans* は、持続性の歯周炎の場合特に興味深い物であることが報告されている (Molander 他、1998 年; Fouad 他、2005 年)。*Peptostreptococcus* などの嫌気性細菌、または *P. species* を含むグラム陰性細菌もまた持続性の感染症と関連付けられてきた (Siqueria 2002 年)。これらの微生物は高度な耐性を持つバイオフィーム内に生育する (Pinheiro 他、2003 年) が、また根管内のサスペンション中の浮遊状態の細菌として、または力学的な根管作成後の残留物としても増殖する (Distel 他、2002 年; Nair 2006 年)。

次亜塩素酸ナトリウム (最高濃度 5.25%) は最も一般的に用いられている根管洗浄剤であり、 H_2O_2 (3%) の代用として用いられてきた (Takeda 他、1999 年)。ジグルコン酸クロルヘキシジン (2%) もまた力学的な壊死組織除去術との組み合わせで用いることが推奨されている (Siqueria 他、1998 年; Gomes 他、2001 年; Basrani, Lemonie 2005 年)。しかしながら、持続性で難治な根尖性歯周炎に対する従来の治療法の成功率はたった 50% から 70% の範囲であり (Weiger 他、2001 年)、結果的に最高濃度 3% の NaOCl は高病原性の歯内微生物に対し限られた有効性しかもたないことが報告され、また 2% CHX の効果も不規則である (Siqueria 他、1998 年; Gomes 他、2001 年)。さらに、NaOCl および H_2O_2 が口腔組織に接触した場合、出血、浮腫、そして皮膚潰瘍などの副作用が生じることが報告されている (Pashley 他、1985 年; Öncüç 他、2003 年; Gernhardt 他、2004 年)。口腔組織に対する深刻な程度の細胞毒性もまた *in vitro* で見出されている (Hyslop 他、1988 年; Nagayoshi 他、2004 年; Huth 他、2006 年)。クロルヘキシジン (2%) は粘膜剥離、傷の治癒障害、および歯の着色の原因となる可能性があり (Bassetti, Kallenberger, 1980 年; Cline, Layman, 1992 年)、また上皮細胞に対する高度な細胞毒性の可能性が証明されている (Huth 他、2006 年)。従って、高度な抗菌性能を持ち、副作用のより少ない歯内消毒剤が貴重であると考えられる。

オゾン は薬物耐性を促進することなく高度な抗菌力を持つことが報告されているため、現在歯科学において代替消毒剤の

可能性として検討されている (Restaino 他、1995 年; Paraskeva, Graham, 2002 年)。濃度 $\sim 4\text{gm}^{-3}$ の気体オゾンはすでに臨床的に歯内治療に用いられている。しかし、その歯内病原体に対する有効性の研究結果は一貫性に欠けており、また最適な適用時間と濃度に関する情報はほとんど存在しない (Nagayoshi 他、2004 年; Arita 他、2005 年; Bezrukova 他、2005 年; Hems 他、2005 年)。根尖部および口腔組織に対する比較的低い毒性が歯内洗浄剤に求められている (Nair, 2006 年) ことと関連し、現在歯内治療に用いられている気体オゾン濃度 (4gm^{-3}) は NaOCl (2.5%) と比べわずかに毒性が低いことが示されて入り、またオゾン水 (最高濃度 $20\mu\text{mL}^{-1}$) の場合は、*in vitro* では口腔組織に対する毒性を実質的に全く示さなかった (Filippi, 2002 年; Ebensberger 他、2002 年; Nagayoshi 他、2004 年; Huth 他、2006 年)。本研究の目的は、人間の根管に成長するサスペンションおよびバイオフィーム内の特定の歯内病原体に対する気体オゾンおよびオゾン水の抗菌効果を追究することであった。

材料および方法

微生物

フリーズドライした微生物: *E. faecalis* (ATCC 14506; LGC Promochem, ドイツ Wesel)、*C. albicans* (ATCC MYA-273)、*P. micros* (ATCC 33270) および *P. aeruginosa* (ATCC 15442) をブレインハートインフュージョン (BHI) 培地にサスペンドし、シェドラー寒天培地プレート (ビタミン K1 および羊の血液; BD Diagnostic Systems, ドイツ Heidelberg) にて再培養した。

被験物

抗菌効果において確立された歯内洗浄剤と競える可能性のある濃度の有無を評価するため、気体オゾンおよびオゾン水について可能な限り広い濃度範囲にわたり用量反応性実験を行った。基本的に \log_2 スケールに従い、濃度範囲は実験環境および器具により制限された。濃度範囲が 1gm^{-3} (利用可能な気体オゾン測定機器で測定可能な最低値) から 53gm^{-3} (実験装置およびオゾン発生装置の限界による、達成可能な最高濃度) の範囲の濃度の気体オゾン (Ozonosan photonic, Hänsler 博士、ドイツ Iffezheim) を自家製のガラスチェンバー内にて、同時

濃度測定 (GM-6000-NZI ; 1 Anseros, ドイツ Tübingen) を行いながら被験微生物に適用した。濃度測定機器の分析方法は、気体オゾンの最大吸収波長である 253.7nm での紫外線吸収を基本としている (Bocci, 2002 年)。オゾン水は、オゾン発生装置を用い、再蒸留水を気体オゾンで処理 ($75 \mu\text{g mL}^{-1}$, 15 分) して作成した。その結果水中のオゾン濃度が $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (飽和点) が得られたことを確認し (Palintest 1000 Ozone Meter, Palintest Ltd. 英国 Gateshead)、これを $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ に希釈した。オゾン濃度の測定は、無色の指示薬 (ジメチル-p-フェニレンジアミン) がオゾンにより酸化されてピンク色の化合物を生成することを利用し、オゾンを含まない標準試料と比較して行った (製造者の情報によると、光度計の動作波長は 505nm)。新たに調製した NaOCl (5.25%, 2.25%)、CHX (2%)、 H_2O_2 (3%) の水溶液とリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を対照として、オゾンをこれらと比較した。オゾンは吸熱性の、高度に不安定な酸素化合物である (Sehested 他, 1991 年; Hoigne, 1998 年; Stübinger 他, 2006 年) ため、気体もオゾン処理した差異蒸留水も実験のたびに新たに調製した。オゾンの生成や処理においては、耐オゾン性の器具のみを用いた (例えば、オゾン消費しないガラス、耐オゾン性の配管材料)。

サスペンション中の微生物に対するオゾンの効果の試験

微生物は一晚かけて増殖させ (37°C 、BHI10mL)、遠心分離器にかけ、PBS にマクファーランド混濁度 $1[3 \times 10^8 \text{ コロニー形成単位/mL}]$ となるようにサスペンドし、1:3 の割合で希釈した。作用剤 1mL に 10 マイクロリットルを 1 分間かけてサスペンドし、続いて直ちに、先だっで行われた実験での評価に従って適切な希釈を行った。それから $10 \mu\text{L}$ を寒天プレートに載せ好氣的に培養した (48 時間、 37°C)。絶対的建機細菌である *P. micros* については、全ての実験段階を嫌氣的ワークベンチ (Bactron, 1 Sheldon Manufacturing Inc., 米国オレゴン州 Cornelius ; N_2 85%, H_2 5%, CO_2 10%, 37°C) 内で完了した。ここでもまた、倍希釈した特定の微生物サスペンション $10 \mu\text{L}$ を寒天プレートに載せて気体オゾンにさらし、他方では参照プレートを空気にさらした (1 分間)。寒天プレートでの培養 (48 時間、 37°C) の後、CFU/mL-1 (コロニー形成単位/mL) の数を測定した。

人間の根管内に増殖するバイオフィーム中の微生物に対するオゾンの効果の試験

抜いたばかりの単根永久歯 (歯根の長さ 18 - 19mm) の歯冠をセメント質とエナメル質の接合点レベルから取り除いた。この歯の実験への利用については、説明の上で患者から合意を得た。その根管はサイズ ISO 40 (K-files ; Dentsply Maillefer, スイス Ballaigues) で、根尖域はサイズ 30 (ProFile®.04 ; Dentsply Maillefer) でファイリングを行い、各ファイルサイズによるファイリングの後に間欠的に根管洗浄 (3mL の 5.25%NaOCl) (Takeda 他, 1999 年 ; Zender 他, 2003 年) を行った。最後に、根管を 10%EDTA で (5min, 10-30mL)、続いて通常の生理食塩水で洗浄 (Zehnder 他, 2003 年) してからペーパーポイントで乾かし、その歯根を殺菌した (121°C 、バー 2 本、5 分間)。

バイオフィーム成長ユニット (図 1) はプログラム可能なペリスタル型ポンプ (IPC-8 ; Ismatec, ドイツ Wertheim-Modfeld)、新しく高温蒸気滅菌した完全な人工唾液 (Pratten 他, 1998 年)、10%ショ糖水溶液 (Sigma-Aldrich, ドイツ Schellendorf)、フレキシブルなシリコンの管 (半径 1mm または 2.06mm ; Hartlmaier, ドイツ Munich)、いくつかのフラスコと準備した歯根が含まれていた。人工唾液の材料は Oxoid (ドイツ Wesel)、Sigma-Aldrich、そして BD Diagnostic System から入手した。宵越しで増殖させた *E. faecalis*、*C. albicans* または *P. aeruginosa* を用いた。後者種は、成長ユニットが大きすぎて嫌気ワークベンチに入らなかったために評価できなかった嫌気性 *P. micros* の代わりに用いられた。*P. aeruginosa* はすでに他の 3 種で行うことになってたサスペンション実験よりも重要度の高いバイオフィーム試験だけに用いた。

人工唾液はフレキシブルな管を通して継続的に 50mL の貯臓器に注ぎ込み、一日に 3 回、ショ糖水溶液をこれに補給した (30 分間、 $3 \times 33\text{mL}$) (Wilson 他, 1998 年)。最初の週は、宵越しで増殖させた (10mL の BHI にて 37°C で) 各種のカルチャーを毎日その人工唾液に加えた。貯臓器の栄養スプーを、それぞれフラスコ内に吊り下げ平衡に並べた 4 本の歯根内、つまりフレキシブルな管で $10 \mu\text{L}$ マイクロピペット (Eppendorf, ドイツ Hamburg) の先に繋げられた冠状の歯根開口部に注ぎ込んだ ($70\text{mL}/\text{日}$) (Wilson 他, 1998 年)。歯根表面の汚染を防ぐため、根尖域からフラスコの底にしたたり落ちた使用済みの唾液は、より太いフレキシブルな管 (径 2.06mm を通して廃棄用フラスコに汲み出した)。

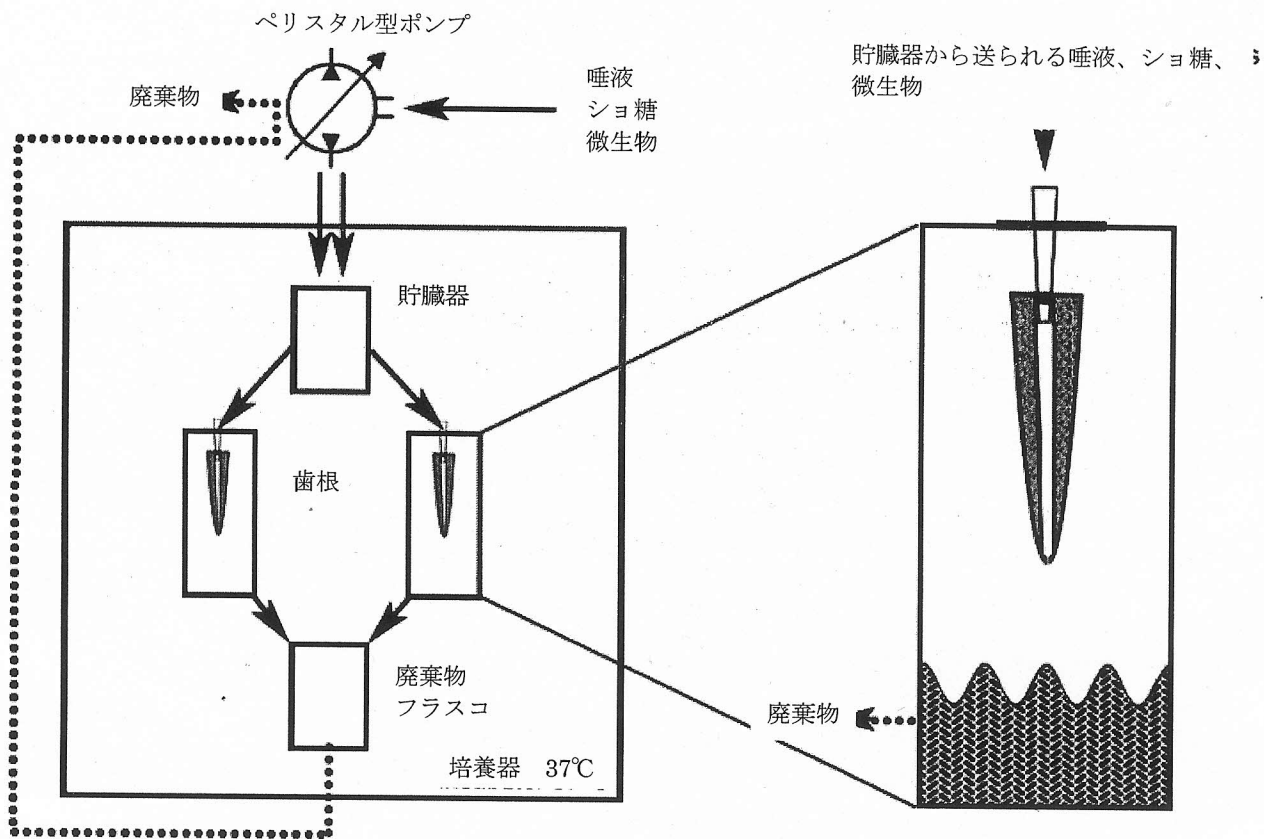


図1 根管中の単種バイオフィーム用の成長ユニット。歯内病原体の単種バイオフィームは、摘出し準備された単根永久歯の根管内部にて3週間にわたり増殖させた。これらの増殖のため、ペリスタル型ポンプを用い、ショ糖と微生物をそれぞれ貯蔵器から補給し予め温めた人工唾液を、根管から廃棄用フラスコまで好気性37°Cの条件にて720mL/日の速度で送り込んだ。図の右手は、フラスコ中に吊り下げられた歯根の模範例の拡大図である。

3週間の後歯根を取り出して厚さ5mmの輪切りにし、根尖部分は廃棄した。

個々の試験条件ごとに、輪切りの歯根一つを注意深くフラスコに移し1mLの試薬を加えた(個別に4試験を行った)。気体オゾンへの暴露に関して、2つの設定で実験を行った：設定1 歯根の輪切りをガラスのビーズ状に平坦に置いた(到達困難な根管域を模して)；設定2 根管の輪切りを気流が根管を通り抜けられるよう立てた状態で置いた(到達しやすい根管域を模して)。1分後、試薬を除去するか、または根管をガスボックスから取り出し、直ちに1mLのPBSを加え根管を攪拌機に1分間かけた(Wilson 他、1998年)。作用を停止させるための化学薬品は一切用いなかったため、1分間の接触時間を超えてある程度の反応が進んだ可能性があったかもしれない。しかし、試薬の大部分は1分後直ちに除去し、PBSを加えて適切な希釈を行った。その後、寒天プレート上に100 μ Lを載せ培養を行い(48時間、37°C)、プレートごとのCFU(コロニー形成

ユニット)を数えた。さらに設定2では、気体オゾン(4gm \cdot 3)をより長い時間間隔で適用した(2.5分、5分、および10分)。CFUの数から、それぞれの対照資料に対するパーセンテージを計算した(平均値 \pm SD；n=3-4)。

個々の試験において一つの歯根の輪切りについて、走査型電子顕微鏡(JSM-35 CF；Jeol、ドイツ Eching と SmartSEM；Zeiss、ドイツ Oberkochen)を用い、根管内部バイオフィームの存在や根管表面の微生物汚染の可能性を調べた。

統計的方法

作用剤の数が多かったため、実験はいくつもの段階を経て行った。段階ごとに個別の対照試料を用いた。作用剤の抗菌活動を比較するため、数えたCFU数は計算してそれぞれの対照試料に対するパーセンテージで表した(平均値 \pm SD；n=3-4)。

全ての実験について、個々の試験の CFU の絶対数、パーセンテージ、および平均値とその標準偏差を添付の補足情報に掲載した。データは、個々の試料を比較するため Tamhane *post hoc* テストを用い、一元配置分散分析により分析した（両側検定、 α レベル 0.05）（spss software 12 ; SPSS Inc.、米国イリノイ州シカゴ）。

結果

サスペンション中の微生物に対するオゾンの効果

まず、オゾン水および気体オゾンの細菌カルチャー中の特定の歯内病原体に対する効果を評価した（補足情報を参照 表 A-C）。オゾン水は最低 $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ までの濃度で用いられた場合 *E. faecalis* および *C. albicans* を除去したが、それより低い濃度（ 2.5 および $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ）ではこれらを大幅に削減したものの完全には除去しなかった（図 2a、b）。*P. micros* の場合、最低 $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ までの濃度で完全に根絶したが、 $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ではそれほどの効果は見られなかった（図 2c）。それに比べ、NaOCl および CHX はこの被験微生物を完全に除去したが、 H_2O_2 は、これらを削減はしたものの完全に除去はしなかった。最低濃度 1gm^{-3} の気体オゾンに 1 分間さらした場合、被験種はほぼ完全に除去され、その平均削減率は 99% であった（図 2a-c、補足情報 表 A-C）。*E. faecalis* に対する有効性は、異なる作用剤間の差異は統計的には見られなかった（ANOVA、 $P>0.05$ ）。*C. albicans* に関しては、 H_2O_2 および低濃度のオゾン水（ 2.5 および $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ）の効果性は他のどの作用剤と比べても著しくより低かった（ $P<0.05$ ）。また *P. micros* については、低濃度オゾン水（ $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ）は他の消毒剤よりも効果が低かった（ $P<0.05$ ）。

解剖学的バイオフィーム・モデルの確立

本実験装置（図 1）にて、3 週間にわたり歯根の根管に解剖学的に正しい形態で *E. faebicans*、*C. albicans*、および *P. aeruginosa* の単種バイオフィームを増殖させた。歯根は気体または作用剤にさらす前に輪切り状に分割した。それぞれの菌種について、個々の試験ごとに一片の試料を SEM で観察することによりバイオフィームの生成を調べた。歯根表面も調べたが、

細菌汚染もバイオフィーム形成も見られなかった（参照図なし）。増殖装置は嫌気性チェンバには大きすぎたため、嫌気性 *P. micros* の代用物として *P. aeruginosa* を用いた。

バイオフィーム内の微生物に対するオゾンの効果

E. faecalis、*C. albicans*、および *P. aeruginosa* の単種バイオフィームに対する抗菌作用をテストした（補足情報 表 D-F を参照）。オゾン水の 1 分間の適用は微生物に対して用量依存性の効果を示し、最高オゾン濃度 $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ では、2% CHX の場合に近い 96% を超える平均 CFU 削減率を示した（図 3a-c、補足情報 表 D-F）。次亜塩素酸ナトリウム（2.5%）は完全に微生物を除去したが、他方 H_2O_2 の効果はそれと比べると低かった。この一連の実験においては、歯根片をガスボックスに平坦に置いて気体オゾンを適用したが（設定 1）、それにより気体オゾンの様々な種に対する用量依存性の効果が見出された（図 3a-c）。*E. faecalis* および *C. albicans* は本実験条件で達成可能な最高濃度（ 53gm^{-1} ）の気体オゾンにより（図 3a、b）、また *P. aeruginosa* は最高および 2 番目に高い濃度でほぼ完全に除去された（図 3c）。統計的には、消毒剤の *E. faecalis* および *C. albicans* に対する有効性における重大な差異は見られなかった（ANOVA、 $P>0.05$ ）。*P. aeruginosa* に対しては、 4gm^{-3} の気体オゾンは NaOCl、CHX および最低 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ までの濃度のオゾン水よりも効果は甚だしく低く、また $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ のオゾン水の効果は 2% CHX よりも低かった（ANOVA、 $P<0.05$ ）。このことは、重大な差異の見られない比較的低濃度の気体オゾンおよびオゾン水と比べ、標準偏差が非常に小さいことが主な原因となっている。

異なる設定で接触時間がより長いバイオフィームの気体オゾンへの暴露

次の実験では設定を変え、*E. faecalis* に汚染された歯根片の断面がガスボックスの気体注入口に面するように立てて配置し、気体が根管断面に対して水平ではなく根管の中を通り抜けるようにした（設定 2）。二つの濃度、つまり高気体濃度（ 32gm^{-3} ）と、現在歯科医術に用いられているより低い濃度（ 4gm^{-3} ）を選んだ。

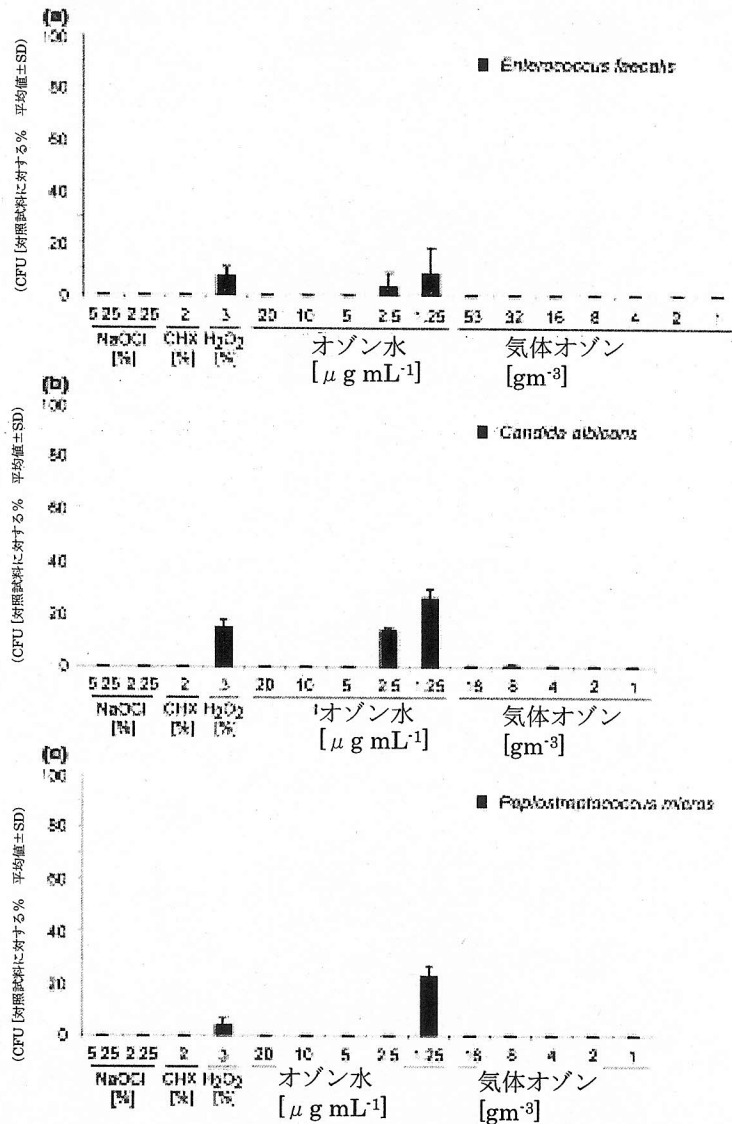


図2 サスペンション内の菌内病原体に対するオゾンの抗菌効果。 サスペンションにした微生物を、様々な濃度のオゾン水、または気体オゾンに、または確立された菌内洗浄剤 (NaOCl、CHX、および H₂O₂) に1分間さらした。PBSに1分間接触させた後のCFU数を100%対照試料として定義した(点線)。洗浄剤、またはオゾンにさらした後に残ったCFUを数え、対照試料に対するパーセンテージを計算した (n=3-4、平均値±SD) (補足情報 表1-3を参照)。(a)は *E. faecalis*、(b)は *C. albicans*、(c)は *P. micros* に対する抗菌作用を示している。

これら二つの設定の結果を比べると、この新しい設定に1分間置いたところ、気体オゾンの濃度が高い場合、存在する細胞全てが完全に除去されたが、以前の設定では細胞が減少しただけであった(図4a)。低濃度の気体オゾン(1分間)はこれまで以上に細胞数を減少させたが、撲滅はしなかった。従って最終段階として、この濃度におけるより長い暴露時間(2.5分、5分、および10分)の細菌性バイオフィームへの効果をテストした。4gm⁻³の気体オゾンに2.5以上接触した場合は、微生物

は完全に除去された(図4b)が、1分後の細胞数との差は大して大きくなかった ($P>0.05$) (補足情報 表G参照)。

議論

本実験では最低濃度 1gm⁻³ までの気体オゾンは大幅に、そして最低濃度 5μg mL⁻¹ までのオゾン水は完全に被験細菌性病原体を除去した。

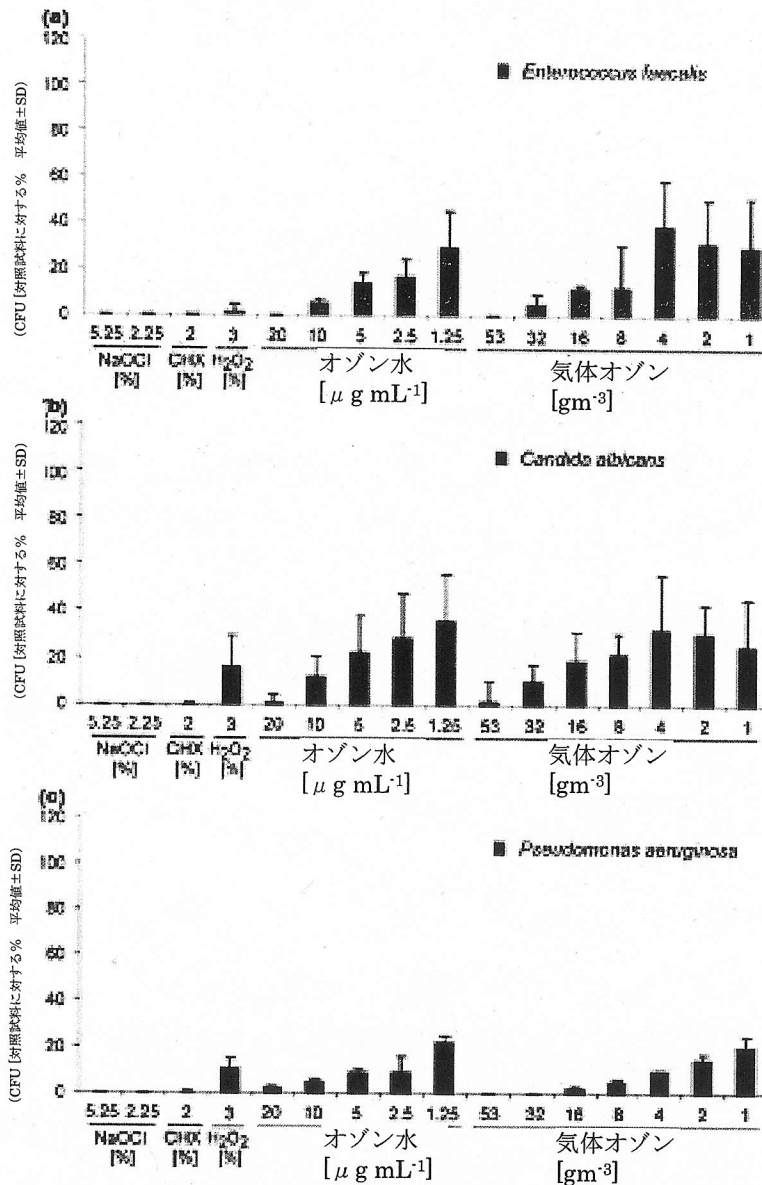


図3 根管モデルにおける、単種バイオフィームに関連した歯内病原体に対するオゾンの抗菌効果。摘出した単根歯の根管内部に単種のバイオフィームを3週間培養。次に、歯根を輪切り状に切り、様々な濃度のオゾン水または気体オゾン、または確立された歯内洗浄剤 (NaOCl, CHX, H₂O₂)、または対照試料として PBS に1分間さらした。バイオフィームを摘出しサスペンションにした後、PBS 対照試料 (100%、点線) (n=4、平均値±SD) にさらした後残留した CFU を数え、CFU 数のパーセンテージを計算した (補足情報表 4-6 を参照)。(a) *E. faecalis*、(b) *C. albicans*、(c) *P. aeruginosa* のバイオフィームに対する抗菌効果。

気体オゾンおよびオゾン水は、バイオフィーム中の微生物に対し用量依存性かつ歪依存性の有効性を持つことが示された。本事件で用いられた方法での微生物の完全な除去は、*E. faecalis* の場合 32 gm^{-3} の気体オゾンに1分間、またはより低い濃度 (4 gm^{-3}) でより長く (≥ 2.5 min) 接触させることにより達成

された (設定 2)。最高濃度 (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、1分) のオゾン水は *E. faecalis*、*C. albicans* および *P. aeruginosa* のバイオフィームをほぼ撲滅した。

これら御実験で用いられた根管モデルでは、根管内にバイオフィームを増殖させた。

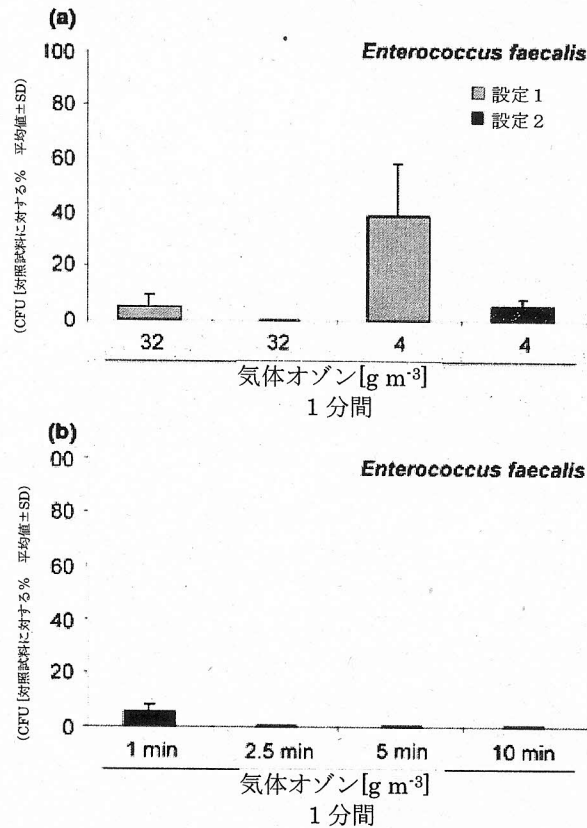


図4 二つの実験設定において *E. faecalis* バイオフィルムに適用された気体オゾンの抗菌効果と、暴露時間の延長の効果。バイオフィルムを図3に述べられたとおりに培養した。設定1では、輪切り状の歯根片をガスボックス内のガラスビーズ上に平坦に載せた(図3中の実験を参照)。設定2では、輪切り状の歯根片を、気体が根管内を通り抜けるよう、断面が気体注入口の前に来るように立てて配置した。(a) 設定1(グレーの棒)と設定2(黒の棒)における、*E. faecalis* バイオフィルムに対する濃度 32g m^{-3} と 4g m^{-3} の気体オゾンの抗菌効果を比較して示した。PBSを対照試料として用いた。残留したCFUを数え、100%と定義したPBS対照試料に対するパーセンテージを計算した(点線)($n=3$ 、平均値 \pm SD)。(b) 設定2における気体オゾン (4g m^{-3}) に1分間、およびさらに延長した時間(2.5分、5分、および10分)さらした場合の抗菌効果を示した(補足情報表7を参照)。

代替消毒剤としてのオゾンの有効性を測定するため、作用剤を1分間加え、オゾン従来歯内洗浄剤(NaOCl、CHX、および H_2O_2)と比較した。オゾンの用量反応性実験と、さらに歯科医術で現在用いられている気体オゾン濃度 (4g m^{-3}) の継時変化実験は、将来の臨床研究設計の基礎として、テスト・モデル内における微生物を完全に除去できる用量-時間-濃度を見出すことを目的とした。現在の研究の不正確さとして、作用剤の作用を阻止する化学薬品を一切用いなかったことが挙げられる。従って、たとえばその持続性(Khademi他、2006年)で知られているCHXとの接触時間は、臨床状況と同様に長引いていた可能性がある。

過去には歯内病原体に対するオゾンの有効性に関し、部分的に今回の結果と一致しない研究結果が報告されている:あるグループは象牙質上で6日間にわたって培養した *E. faecalis* に対してオゾン水 ($4\mu\text{g mL}^{-1}$ 、10分間)をテストしている

(Nagayoshi他、2004年)。(*E. faecalis* の) 大幅な減少は見られたが、今回の結果とも一致する2.5%NaOClに見られる完全な除去は観察されていない。さらにこの研究で報告されている試験では、最高濃度のオゾン水 ($20\mu\text{g mL}^{-1}$) により生成後3週間のバイオフィルム内の微生物が撲滅したこと、また濃度 32g m^{-3} の気体オゾンに1分間さらすことにより、またはより低い濃度 (4g m^{-3}) に最低2.5分さらす(設定2)ことにより完全に除去されたことが見出されている。さらに、このバイオフィルムの実験では2%CHXにより *E. faecalis* がほぼ撲滅されたが、他方 H_2O_2 は一貫して効率がより低かったことを報告している。ある別の研究ではオゾン水を用いた *E. faecalis* バイオフィルム(48時間にわたり膜状に培養された)の大幅な削減は見られていないが、プランクトン性細菌は著しく減少したことを見出している(Hems他、2005年)。

上述の研究 (Nagayoshi 他、2004 年)、および高濃度のオゾン水への暴露により CFU が減少したことを示した現在の実験とこれらの相異なる結果の理由は、もう一つの研究 (Hems 他、2005 年) では相当低い濃度のオゾン水が用いられたことかもしれない。というのも、気泡状の気体オゾンをつた 4 分間バイオフィームを含む水の中に送っただけなのである。現在の研究においては、オゾン水の最高濃度 ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) の達成にはオゾン処理に 15 分かかっている (データの提示は無し)。別の最近の研究では、*E. faecalis* バイオフィームを根管にて 60 日間わたり培養し、オゾン水、気体オゾン、2.5%NaOCl、または 2%CHX を 20 分間適用している (Estrela 他、2007 年)。現在の結果とは異なり、いずれの洗浄剤にも抗菌効果が見出されなかった。

主に義歯の清浄を目的とした *C. albicans* に対するオゾンの効果が報告されている (Kurakami 他、1996 年 ; Oizumi 他、1998 年)。より最近では、120 日間樹脂プレート上で培養された *C. albicans* が、超音波処理有り、または無しでオゾン水 (2 または $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、1 分間) を利用することによりほとんど除去されている (Arita 他、2005 年)。この研究では 120 分を短いバイオフィーム形成時間としているため、この研究は現在のサスペンション実験と比較したほうが良いかもしれない。この実験では *C. albicans* の $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ のオゾン水による平均 86% の除去、 $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ のオゾンによる完全な除去、そして最低 1gm^{-3} までの濃度の気体オゾンによる 99% の除去が達成されている。現在のバイオフィーム実験では、*C. albicans* が NaOCl (5.25%) によって完全に除去され、また 53gm^{-3} の気体オゾン (設定 1)、 $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ オゾン水と 2%CHX による除去は 96% を上回ることが見出されている。

嫌気性細菌 *P. micros* に対するオゾンの効果は、これまで評価されたことが無かった。被験最小濃度 (1gm^{-3} 、設定 1) 中の気体オゾン、およびオゾン水 ($\geq 2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) はサスペンドした微生物を完全に除去した。バイオフィーム実験は *P. micros* については行われなかった。培養ユニットを嫌気性状態に保つことができなかつたからである。

歯科用ユニットの水の *P. aeruginosa* に対する剤としてのオゾンの利用が報告されている。しかし、完全な除去に必要な所要時間と濃度に関する情報は無い (Filippi、1995 年 ; Al Shorman 他、2003 年)。現在のバイオフィーム実験では、完全な撲滅は気体ガス濃度 32gm^{-3} (設定 1) および NaOCl (2.25%、1 分間) で達成されている。高濃度のオゾン水 ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、1 分間) と 2%CHX は存在する微生物をほとんど除去した。

結論

高濃度の気体オゾンおよびオゾン水は、サスペンションおよびバイオフィーム・テストモデル中の被験微生物に対して、用量、歪、そして時間依存性の効果を持つ。しかしながら、NaOCl が全てのタイプの微生物を完全に除去した唯一の方法であった。

謝辞

著者は E. Thielke および C. Köhler に対し、その技術的なプロジェクト・サポートに感謝の意を表したい。本研究はミュンヘン大学医学部 (FöFoLe 登録番号 401)、学部積立および KaVo 社により資金提供された。

補足情報

追加の補足情報は本記事のインターネット版で閲覧可能 :

表 S1 サスペンションおよびバイオフィーム内の被験微生物に対するオゾンおよび確立された歯内洗浄剤 (1 分間) の抗菌効果。3~4 件の個別の試験 ($n=3-4$) におけるコロニー形成ユニット (CFU abs 樹脂上) の絶対数を表示。CFU はまた括弧内にそれぞれの対照試料に対する%と、図 2、3 および 4 に対応する個々の試験の平均値と標準偏差を括弧内に表示。NaOCl、次亜塩素酸ナトリウム ; CHX、ジグルコン酸クロロヘキシジン ; H_2O_2 、過酸化水素 ; O_3 、オゾン。サスペンション中の *E. faecalis* (A)、*C. albicans* (B)、および *P. micros* (C)、バイオフィーム中の *E. faecalis* (D)、*C. albicans* (E)、および *P. aeruginosa* (F) に対する抗菌効果を示す。表 G には、二つの設定に置いて *E. faecalis* バイオフィームに適用された、 32g/m^3 と 4g/m^3 の濃度のオゾンの抗菌効果、および設定 2 (1 分、2.5 分、5 分、10 分) において暴露時間を延長した場合の効果を示す。

注意事項 : Wiley-Blackwell は著者が提供するいかなる補足情報の内容、または機能性に対しても責任を持たない。(資料が無い場合を除き) 質問は全て、相当するその記事の著者に問い合わせる事。