

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

村上 正洋

論文題目

口腔疾患に関連する細菌に対するオゾン水の殺菌
および洗浄効果

I. 緒言

オゾンガスを水に溶存させて生成されるオゾン水は、強力な殺菌活性を示す。水中のオゾン分子は、細菌の構造物や核酸を酸化することによって微生物を殺菌することができる。しかし、オゾン水の口腔細菌に対する殺菌および洗浄効果における基礎的なエビデンスが不足しているため、歯科治療でのオゾン水の使用は必ずしも一般的ではない。

これまでの研究において、種々の口腔細菌における浮遊性細菌に対する殺菌効果についての報告は多く認められるが、バイオフィーム細菌に対するオゾン水の影響については十分な検討がなされていない。そこで本研究では、口腔感染症に関わる細菌について、浮遊細菌およびバイオフィーム細菌におけるオゾン水の殺菌効果を検討した。

II. 対象および方法

1. 菌株と培養条件

本実験では *S. aureus*、*P. aeruginosa*、*S. mutans* および *P. gingivalis* を使用した。*S. mutans* は、ショ糖含有培地にて培養すると水不溶性グルカンを分泌することにより強固なバイオフィームを形成することが知られていることから、バイオフィーム形成実験においては、ショ糖含有培地にて培養した。*P. gingivalis* は、異なる遺伝子型の FimA 線毛を保有する 2 種の菌株である ATCC 33277 (I 型) および HG405 (II 型) を使用した。すべての菌株を寒天プレート上で維持し、液体培地にて培養後、細菌の増

殖曲線における静止期に達した菌液を各実験で使用した。

2. オゾン水の調製

オゾン水は、水道水から誘電体バリア放電オゾン発生器 (E-25-S、水星ファクトリーコーポレーション、尼崎、日本) により生成し、5 ppm (約 0.1 mM) の濃度になるよう調製した。オゾンは水中で急速に失活するため、オゾン水の生成後 10 秒以内にオゾン水を使用した。オゾン濃度はオゾン測定器で継続的に計測した。滅菌蒸留水と次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) をそれぞれ対照として使用した。

3. 浮遊性細菌への殺菌効果の検討

各菌の培養液から遠心により集菌し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) pH 7.4 にて 600 nm の波長 (OD600) で 0.01 または 0.1 になるように菌数を調製した。嫌気性菌である *P. gingivalis* の菌液を調製する際には、酸素の曝露による生菌数の減少を防止するために PBS に還元剤 (1 mM dithiothreitol, DTT) を添加した。調製した細菌懸濁液 0.1 ml をフィルター付き 96 ウェルフィルタープレート (0.22 μ m フィルター、Merck KGaA, Darmstadt, Germany) のウェルに滴下し、プレートの下部から吸引することにより PBS を除去した。細菌およびウェルを洗浄するために、0.1 ml の PBS (*P. gingivalis* の場合は 1 mM DTT を含む PBS) をプレートに加え、吸引により除去した。次に、0.1 ml のオゾン水 (5 ppm) を各ウェルに加え、プレートを室温で 30 秒間静置した。オゾン処理を 2、3 回繰り返

す場合には、吸引によりオゾン水を除去した後、ウェルに新たなオゾン水を加えた。残存するオゾン水を不活化するために、オゾン水処理後に 0.1 ml の液体培地を加えた。最後に、フィルター上の細菌を 0.1 ml の PBS (または 1 mM DTT を含む PBS) にて懸濁し菌液を回収した。各細菌の懸濁液の希釈液を各種寒天プレートに広げ、培養後にコロニー形成単位 (Colony forming unit、CFU) を算出した。

4. バイオフィーム細菌への殺菌効果の検討

0.1 ml の細菌懸濁液を 96 ウェルポリスチレンプレート (0.4 ml ウェル、細胞培養プレート、TPP, Swiss) に移し、これを一晩静置してバイオフィーム形成を誘導した。次に、培養液をデカンテーションにより除去し、プレートをペーパータオルの上で軽く叩くことにより液体培地を完全に除去した。プレートの壁に形成されたバイオフィームを 0.1 ml の PBS または 1 mM DTT を含む PBS (*P. gingivalis* の場合) で 1 回洗浄した後、0.1 ml のオゾン水 (5 ppm) を各ウェルに加え、室温で 30 秒間静置した。オゾン水処理を 2 および 3 回繰り返す場合には、オゾン水を除去した後、0.1 ml (5 ppm) のオゾン水を各ウェルに加え、30 秒間静置した。残存したオゾン水を不活化するために、菌液を回収する前に 0.1 ml の液体培地を各ウェルに加えた。ウェルからバイオフィーム細菌を回収するために、0.1 ml の PBS (または 1 mM DTT を含む PBS) を加え、滅菌綿棒によりウェルの壁を拭き細菌を収集した。滅菌綿棒を 1 ml の PBS (または 1 mM DTT を含む PBS)

に浸し、ボルテックスで激しく攪拌し細菌を懸濁した。細菌懸濁液の希釈液を寒天プレートに広げ、培養後に CFU を算出した。

5. 流水下でのバイオフィルム細菌への殺菌効果の検討

本実験では、バイオフィルム研究にて汎用されている *S. aureus* FDA209P を使用し、ポリスチレンディスク (直径 5 mm、厚さ 1 mm) にバイオフィルムを形成させ、流水下でのオゾン水の殺菌効果を検討した。まず、バイオフィルムをディスク上で形成させるために、ディスクを 5% スクロース含有 BHI 液体培地に浸し、培地中に *S. aureus* を接種し、一晩培養してバイオフィルムを形成させた。そして、そのディスクをガラス製の 14 cm、250 ml のシャーレに移し、滅菌蒸留水、5 ppm のオゾン水、5 あるいは 200 ppm の NaOCl を室温で 12 分間流水下 (150~350 ml/min) にて処理した。最後に、ディスクを滅菌蒸留水で洗浄してオゾン水を除去し、1 ml の PBS を含む 15 ml の試験管に入れ、ディスクを 10 秒間のボルテックスにより処理し、さらに超音波洗浄器 (Branson 220、YAMATO、東京、日本) により 5 分間処理し、ディスクに付着した細菌を剥がした。得られた細菌懸濁液を PBS により希釈し、寒天プレートに広げ、培養後に CFU を算出した。

6. 統計解析

データは平均±標準偏差 (SD) として表した。一元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey の多重比較検定は、IBM SPSS 統計バージョン 26.0 を使用して行い、 $P < 0.01$ を有意差ありとした。

Ⅲ. 結果

1. 浮遊性細菌への影響

陰性対象として供した滅菌蒸留水による処理では、1、2、及び3回処理において、*S. aureus*、*P. aeruginosa* および *S. mutans* の細菌数に変化は認められなかった。一方、オゾン水処理では1回の処理により *S. aureus*、*P. aeruginosa* および *S. mutans* の細菌数が統計学的に有意に減少した。さらに、これらの細菌数は2回目の処理後によりさらに減少し、3回目の処理後に検出限界以下まで減少した。グラム陰性嫌気性桿菌である *P. gingivalis* ATCC 33277 および HG405 では、陰性対象の蒸留水処理を行った場合においても生菌数の有意な減少が認められた。これらの菌株においてオゾン水処理回数の間での比較を行った結果、統計的に有意な減少が認められた。

バイオフィルム細菌への影響

S. aureus、*P. aeruginosa* および *S. mutans* の生菌数が、オゾン水および滅菌蒸留水にて3回処理した場合においても、統計学的に有意な減少は認められなかった。一方、*P. gingivalis* の2株においては、滅菌蒸留水およびオゾン水による処理の後に生菌数のわずかな減少を示した。本実験では、ウェルに滅菌蒸留水およびオゾン水を加える際に流水の影響を受けるため、全ての細菌において減少傾向を示した。

2. 流水下でのバイオフィルム細菌への影響

S. aureus に対する流水下でのオゾン水処理では、未処理グループと比較

して生菌数が有意に減少し、5 ppm の NaOCl による処理に匹敵する殺菌効果が認められた。一方、200 ppm の NaOCl で処理では、生菌数が検出限界以下にまで減少した。

IV. 考察

浮遊性細菌へのオゾン水の殺菌効果の検討では、*S. aureus*、*P. aeruginosa* および *S. mutans* は、少量 (0.1 ml) でも 30 秒という短時間の処理により著しく減少した。これらの結果は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して強力な殺菌効果を有することを示している。*P. gingivalis* の 2 つの菌株については、他の 3 つの菌種と比較して細菌数の減少が比較的少なかったが、それでも対照と比較して統計的に有意な差が認められた。嫌気性菌は酸素に晒されると増殖能が低下するため、洗浄液に含まれる酸素を中和するために還元剤である DTT を添加した緩衝液を使用して *P. gingivalis* の菌株を調製した。このような処理をしても *P. gingivalis* の生菌数は、滅菌蒸留水で処理することによっても減少した。これらの結果は、実験手技の中での酸素曝露が *P. gingivalis* の生存率を低下させている可能性があることを示している。また、還元剤の作用はオゾンの酸化作用と対抗することから、オゾン水を加える前に施す還元剤処理がオゾンの酸化作用を打ち消す可能性が考えられる。しかし、本研究においては、嫌気性菌へのオゾン水処理により生菌数の減少をもたらしたことは注目すべき点である。

オゾン分子は、少量かつ短時間の処理で細胞外マトリックスを分解できなかったため、これらの条件でバイオフィーム形成細菌の数が減少することとはなかった。*P. gingivalis* のバイオフィームは、オゾン水だけでなく滅菌蒸留水に対してもわずかな感受性を示した。これらの結果は、本菌が実験中に酸素に晒された影響を受けたことを示している。

バイオフィームに対して少量のオゾン水処理に効果が認められなかったことから、流水条件下でオゾン水処理を行った。その結果、対照の滅菌蒸留水と比較して生菌数が大幅に減少し、さらに、この効果は同じ濃度である 5 ppm の NaOCl と同等であった。NaOCl は歯科治療で 200 ppm 以上で使用できるが、生体には有害でありその用途には制限がある。5 ppm のオゾン水は、NaOCl などの他の消毒剤に敏感な患者の代替消毒剤になる可能性が考えられる。

この研究では、バイオフィームをオゾン水で 1 分間攪拌しながら処理していることから、嫌気性菌への酸素曝露および攪拌がオゾン水の影響を増大させることを示唆している。今後の展望として、今回開発された一連のオゾン水の殺菌および洗浄効果の検討方法を用いることにより、齲蝕や歯周炎等の様々な口腔感染症に関連する細菌への影響を再検討する必要がある。

V. まとめ

本研究では、オゾン水は浮遊性細菌に対して十分な殺菌効果があること、バイオフィーム細菌に対しては効果が限定的であること、流水下での処理

(論文内容の要旨)

No. 8

愛知学院大学

はバイオフィルム細菌に対して効果を発揮することが明らかとなった。この新しく考案された実験手法によって得られた結果は、オゾン水の歯科治療への応用について議論される際に、有用な基礎的根拠となると考えている。