

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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<sup>1)</sup>。現在まで、食品業界<sup>2,3)</sup>では1800年代<sup>4)</sup>から、医学および歯学業界では1930年代<sup>5)</sup>からそれぞれ消毒に使用されており、最近では、生体に対するオゾン水の影響として、抗炎症作用<sup>6)</sup>や創傷治癒の促進<sup>7)</sup>などの有益な効果が報告されている。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。

歯科の二大疾患と言われる齲蝕や歯周炎などの口腔疾患は、デンタルプラークが原因となる感染症である<sup>8)</sup>。デンタルプラークを構成する細菌は、多糖類やペプチドからなる細胞外マトリックスにより構成されるバイオフィルムを形成することにより生物の固形物や粘膜の表面に強固に付着する<sup>9,10)</sup>。バイオフィルム中に生息する細菌は、浮遊性細菌と比較して、抗菌薬および消毒剤に対する耐性を大幅に増加させるため、口腔感染症を含めた様々な感染症においてしばしば治療が困難になることがある<sup>10)</sup>。

口腔には700種類を超える微生物が生息している。齲蝕原性細菌であるグラム陽性通性嫌気性球菌 *Streptococcus mutans* は、主にショ糖から水不溶性グルカンを生成することにより、歯面に粘着性のバイオフィルムを形成する<sup>11,12)</sup>。最も重要な歯周病関連細菌と目されているグラム陰性嫌気性桿菌 *Porphyromonas gingivalis* は、健全なデンタルプラーク細菌叢を病的なものに変遷させるキーストーン病原体として理解され注目されている<sup>13,14,15)</sup>。グラム陽性通性嫌気性球菌 *Staphylococcus aureus* およびグラム陰性好気性桿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は、日和見病原菌として知られており、特に、近年ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌

(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) や多剤耐性緑膿菌 (Multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP) などの多剤耐性菌が出現し、世界中で重大な医学的問題を引き起こしている<sup>16)</sup>。*S. aureus* および *P. aeruginosa* は常に口腔内において検出されるわけではないが、歯科治療での消毒処置や抗菌薬に対して耐性をもつため、口腔粘膜と根管に難治性の炎症を引き起こすことがある<sup>17,18)</sup>。

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、バイオフィル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<sup>19,20,21)</sup>。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ル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

実験で使用した菌株と培養条件をまとめた。*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ルムを形成することが知られていることから<sup>12)</sup>、バイオフィル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。ATCC 33277 は実験的にバイオフィルムを形成することが明らかとなっている<sup>22)</sup>。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<sup>23)</sup>、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

浮遊性細菌に対する殺菌効果を検討するために、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  $\mu$ 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<sup>24)</sup>。

## 4. バイオフィーム細菌への殺菌効果の検討

バイオフィーム形成実験においては、これまでの報告を参考にして種々の細菌を培養した<sup>24)</sup>。詳細には、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、これを一晚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ーム細菌への殺菌効果の検討

本実験では、バイオフィー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) にバイオフィームを形成させ、流水下でのオゾン水の殺菌効果を検討した。まず、バイオフィー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、一晚培養してバイオフィームを形成させた。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

最初に、浮遊性細菌に対するオゾン水の殺菌効果を検討した。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。しかし、オゾン水処理と蒸留水処理との間で、各処理回数における比較においては有意な差は認められなかった。

#### 2. バイオフィーム細菌への影響

次に、オゾン水のバイオフィーム細菌に対する殺菌効果を検討した。*S. aureus*、*Paeruginosa* 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。

#### 3. 流水下でのバイオフィーム細菌への影響

最後に、ポリスチレンディスク上に *S. aureus* によって形成されたバイオフィームに及ぼすオゾン水の殺菌効果を検討した。オゾン水処理は、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

本研究では、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を検討した。まずは、種々の口腔細菌における浮遊性細菌に対するオゾン水による殺菌効果を 96 穴フィルタープレート (0.22  $\mu\text{m}$  フィルター) を使用することによりウェル内に細菌を完全に保持している状態で評価した。次に、96 穴プレートのウェル内にて形成されたバイオフィーム細菌への殺菌効果を検討した。さらに、ポリスチレンディスク上に形成されたバイオフィームに対する流水下でのオゾン水の殺菌および洗浄効果を検証した。このような実験手法により、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、流水下での処理はバイオフィー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。

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。

バイオフィームは、その構成細菌によって生成される炭水化物やタンパク質などの有機化合物で構成される細胞外マトリックスによって形成される<sup>9,10)</sup>。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。オゾン水は、この研究で浮遊性細菌を効果的に排除したが、バイオフィームは排除しなかったため、水中のオゾン分子はバイオフィームの細胞外マトリックスのために細菌に到達できないと結論付けた。また、これらの結果は、少量のオゾンへの単純な短期間の曝露は細胞外マトリックスを分解できないことを示している。

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<sup>25)</sup>。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。

Huth らは、*P. gingivalis* を含む口腔細菌のバイオフィームおよび浮遊性の状態の細菌に対するオゾン水の殺菌効果を調べた結果、オゾン水が浮遊性細菌よりも弱い作用ではあるがバイオフィームに対して殺菌効果を示すことを報告した<sup>21)</sup>。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。Hems らは、口腔感染症を引き起こす可能性のある *Enterococcus faecalis* のバイオフィームに対するオゾン水の殺菌効果を示した<sup>20)</sup>。しかし、この報告では緩衝液中に存在するバイオフィームに対して、オゾンガスを直接吹き込むことによって処理していることから、本手法はオゾン水の影響を評価するための適切な方法ではない。また、他の研究において、オゾン水はヒトの歯牙から採取したデンタルプラーク細菌に殺菌効果を示すことが報告されているが<sup>19)</sup>、この報告では検体毎の細菌数が一定に調製されていないため検体間での比較が難しいと考えられる。上述のように、これまで行われてきたオゾン水の殺菌効果の検討が適切に行われてきたとは言い難い。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、齶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。

本研究では、流れるオゾン水を継続的に適用することで口腔を消毒および洗浄できることを示している。ただし、プラークがすでに発生している場合は、スクレーピングなどの機械的処理によって除去した上で、オゾン水を効果的にする必要がある。さらに、家庭用の小型オゾン水発生器が現在利用可能であることを考えると、オゾン水は毎日の歯のクリーニングに役立つ可能性がある。今後は、歯科用洗浄剤へのオゾン水の日常使用に関する調査が研究課題である。

## 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、流水下での処理はバイオフィー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。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました愛知学院大学歯学部高齢者・在宅歯科医療学講座・村上弘教授、愛知学院大学歯学部微生物学講座・長谷川義明教授、北海道医療大学歯学部微生物学講座・永野恵司教授に深甚なる謝意を表します。さらに、ご指導、ご助言を賜りました高齢者・在宅歯科医療学講座、微生物学講座の諸兄に心からお礼申し上げます。

## 文献

- 1) Greene AK, Few BK, Serafini JC: A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. J Dairy Sci, 76:3617-3620, 1993

- 2) Moore G, Griffith C, Peters A: Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *J Food Prot*, 63:1100-1106, 2000
- 3) Elvis AM, Ekta JS: Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med*, 2:66-70, 2011
- 4) Kim JG, Yousef AE, Dave S: Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J Food Prot*, 62:1071-1087, 1999
- 5) Tiwari S, Avinash A, Katiyar S, Iyer AA, Jain S: Dental applications of ozone therapy: A review of literature. *Saudi Dent J*, 8:105-111, 2017
- 6) Azuma K, Mori T, Kawamoto K, Kuroda K, Tsuka T, Imagawa T *et al*: Anti-inflammatory effects of ozonated water in an experimental mouse model. *Biomed Rep*, 2:671-674, 2014
- 7) Valacchi G, Sticozzi C, Zanardi I, Belmonte G, Cervellati F, Bocci V *et al*: Ozone mediators effect on "*in vitro*" scratch wound closure. *Free Radic Res*, 50:1022-1031, 2016
- 8) Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S: Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 14:563-575, 2016
- 9) Hoiby N: A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathog Dis*, 70:205-211, 2014
- 10) Vestby LK, Gronseth T, Simm R, Nesse LL: Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics (Basel)*, 9:59, 2020
- 11) Hamada S, Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*, 44:331-384, 1980
- 12) Koo H, Falsetta ML, Klein MI: The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*, 92:1065-1073, 2013
- 13) Haffajee AD, Socransky SS: Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5:78-111, 1994
- 14) Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA: The keystone-pathogen hypothesis. *Nat*

Rev Microbiol, 10:717-725, 2012

- 15) Lamont RJ, Hajishengallis G: Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. Trends Mol Med, 21:172-183, 2015
- 16) Organization WH: Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. In.: World Health Organization; 2017: 1-7
- 17) Smith AJ, Jackson MS, Bagg J: The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. J Med Microbiol, 50:940-946, 2001
- 18) Eduardo FP, Bezinelli LM, Gobbi MF, Santos VM, Maluf FC, Correa L: Severe oral infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* effectively treated with methylene blue-mediated photodynamic inactivation. Photodiagnosis Photodyn Ther, 26:284-286, 2019
- 19) Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T: Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. Oral Microbiol Immunol, 19:240-246, 2004
- 20) Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA: An *in vitro* evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J, 38:22-29, 2005
- 21) Huth KC, Quirling M, Lenzke S, Paschos E, Kamereck K, Brand K *et al*: Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. Eur J Oral Sci, 119:204-210, 2011
- 22) Nagano K, Abiko Y, Yoshida Y, Yoshimura F: Genetic and antigenic analyses of *Porphyromonas gingivalis* FimA fimbriae. Mol Oral Microbiol, 28:392-403, 2013
- 23) Hirahara Y, Iwata K, Nakamuro K: Effect of Citric Acid on Prolonging the Half-life of Dissolved Ozone in Water. Food Saf (Tokyo), 7:90-94, 2019.
- 24) Tomino M, Nagano K, Hayashi T, Kuroki K, Kawai T: Antimicrobial efficacy of gutta-percha supplemented with cetylpyridinium chloride. J Oral Sci, 58:277-282, 2016
- 25) Mohammadi Z, Shalavi S, Moeintaghavi A, Jafarzadeh H: A review over benefits

(学位論文の内容を要約したもの)

No. .... 8 .....

愛知学院大学

and drawbacks of combining sodium hypochlorite with other endodontic materials. Open

Dent J, 11:661-669, 2017