

論文の要約

氏名：岡 村 貞之介

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：電解酸性機能水の殺菌効果の検討

根尖性歯周炎は様々な病原体によって引き起こされる慢性炎症性疾患であり、適切に根管治療を行うことにより治癒する。根管治療において、根管を洗浄することは切削片の除去、根管内の消毒、殺菌等の観点から非常に重要である。広く使用されている根管洗浄剤である次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) は非常に強力な殺菌効果を有するとされている。しかし、その一方で細胞および神経に対して毒性を有していることから NaOCl 以外の新しい安全な根管洗浄剤の開発が必要とされてきた。

電解酸性機能水（酸性 FW）は、低濃度の食塩水を電気分解することにより陽極から得られる電解水のことであり、陰極より得られる電解水はアルカリ性電解機能水（アルカリ性 FW）と呼ばれている。これまでに両 FW の殺菌効果については様々な報告があるが、培養細胞などを用いた安全性の評価については詳細な検討がない。

電解酸性機能水（酸性 FW）は、低濃度の食塩水を電気分解することにより陽極から得られる電解水のことであり、一方、陰極より得られる電解水は電解アルカリ性機能水（アルカリ性 FW）と呼ばれている。これまでに両 FW の殺菌効果については様々な報告があるが、培養細胞などを用いた生体安全性についての詳細な評価はなされていない。

そこで本研究では、齧蝕病原菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)、難治性の慢性根尖性歯周炎より多く検出される *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) と *Candida albicans* (*C. albicans*) の 4 菌種に対して、酸性 FW、アルカリ性 FW および NaOCl の殺菌効果と細胞毒性について比較、検討を行った。

S. mutans (ATCC 25175 株)、*P. gingivalis* (ATCC 33277 株)、*E. faecalis* (JCM 5803 株) の各菌液 ($1 \times 10^{4-6}$ CFU/mL) 10 μ L を 1 mL の酸性 FW、アルカリ性 FW および NaOCl (1%) と 30 秒間懸濁・攪拌した後、懸濁液を段階的に希釈し、*S. mutans*、*E. faecalis* については Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地上に、*P. gingivalis* については Gifu 寒天培地上に播種した。プレートを反転させ 37°C で 48-72 時間の培養後、コロニー形成数を計測した。NaOCl は 3 菌種に対して極めて強力な殺菌効果を示し、培地上でコロニーは検出されなかった。酸性 FW は *S. mutans*、*P. gingivalis*、*E. faecalis* の 3 菌種に対してコロニー数の有意な減少を認めた。アルカリ性 FW では *P. gingivalis* に対してのみコロニー形成が認められなかった。次に、酸性 FW と NaOCl の *C. albicans* (ATCC 18804 株) に対する殺菌効果を比較した。その結果、NaOCl では 30 秒の処理によりコロニー形成は完全に認められなくなった。これに対し、酸性 FW では 30 秒の作用時間でコロニー形成数の顕著な減少は認められず、20 分の作用時間により NaOCl と同等の殺菌効果を示した。

E. faecalis に対して、蒸留水 (DW) により段階的に希釈 (100, 90, 70, 50, 30, 10%) した酸性 FW を作用させることにより、酸性 FW が殺菌効果を発揮する有効塩素濃度 (ACC) を検討した。その結果、30% 以上の希釈液から有意なコロニー形成数の減少が認められ、有効な殺菌効果は ACC が約 10 ppm 以上で得られることが明らかとなった。また希釈された酸性 FW の pH は 2.0 から 3.0 の範囲を維持していた。同様の実験を NaOCl で行ったところ、10% 以上の希釈率でコロニー形成は認められず、強力な殺菌効果があることが確認された。さらに、ACC を 100, 80, 60, 40, 20 ppm に調整した酸性 FW を作製して同様の実験を行ったところ、20 ppm の酸性 FW では 50% 以上、40 ppm 以上の酸性 FW では 30% 以上の希釈率でコロニー数が有意に低下した。この結果から、コロニー数を有意に低下させるためには約 10 ppm 以上の ACC が必要であることが示唆された。

傷害を受けた細胞から放出される酵素に乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase : LDH) がある。ヒト子宮頸がん由来線維芽細胞株 HeLa 細胞を酸性 FW, アルカリ性 FW および NaOCl により刺激し, HeLa 細胞から放出される LDH の活性を測定することで, これらの細胞障害性の程度を検討した。HeLa 細胞 (1×10^5 cells/well) を, 酸性 FW, アルカリ性 FW, NaOCl (1%) でそれぞれ 30 秒間刺激し, 新しい培養液に交換, さらに 1 時間培養を行った。培養後の上清を回収し, LDH 活性測定キットを用いて LDH 活性を測定した。NaOCl では処理直後, 細胞は直ちに培養皿から脱落した。一方, 酸性 FW で処理した細胞では, 未処理やアルカリ性 FW で処理した細胞と比較して, LDH 活性が有意に増加していた。また DW で段階的に希釈した酸性 FW を用いて同様の実験を行ったところ, 30% 以上の希釈率から LDH 活性は濃度依存的に増加した。酸性 FW が細胞増殖能に与える影響を検討するため, 同様に処理した細胞を 4 日間の培養を行い, 経日的に細胞数を測定した。その結果, 酸性 FW 未処理群では細胞数が培養 4 日目には 1.5×10^5 cells/well に達したのに対し, 処理群では, 培養 1 日目から 4 日目まで有意な細胞増殖速度の低下を認めたものの, 細胞自体は完全に死滅することなく増殖能を維持していた。

根管洗浄時に超音波照射を行うことで殺菌効果が向上するという報告がなされていることから, 酸性 FW と超音波照射の併用による *C. albicans* に対する殺菌効果を検討した。酸性 FW または超音波照射単独での処理ではコロニー形成数の顕著な減少は認められなかったが, 両者の併用により 30 秒間の作用で NaOCl と同等の殺菌効果を得ることができた。

本研究では, 酸性 FW は, *S. mutans*, *P. gingivalis*, *E. faecalis* に対しては NaOCl と同等の殺菌効果を示した。また, その際の ACC は約 10 ppm 以上であることが示された。さらに, 酸性 FW は control やアルカリ性 FW と比較して培養後の上清中の LDH 活性が高かったが, 処理直後に細胞が脱落してしまった NaOCl と比較して, 生体に対する為害性が低いことが明らかとなった。また, 酸性 FW は超音波照射を併用することで *C. albicans* に対しても NaOCl と同等の殺菌効果を示した。

以上のことより, 酸性 FW が十分な殺菌効果を有し, またヒト細胞に対する有害な影響が少ないことから, NaOCl に替わる安全で効果的な根管洗浄剤として使用し得る可能性が示唆された。