

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

富野 雅史

論文題目

塩化セチルピリジニウムを添加した
ガッタパーチャの抗菌性評価

I. 緒言

根管治療において、術後の微生物感染を抑えるために、無菌的に根管充填材を充填する必要がある。通常、根管を拡大形成後に化学的消毒を行うが、根管内は微細で複雑な構造をしているため、除菌が不十分となることがある。また、無菌的処置が出来た場合でも、しばしばコロナルリーケージやマイクロリーケージにより感染症を引き起こす。

塩化セチルピリジニウム (cetylpyridinium chloride ; CPC) はカチオン性の界面活性作用を有する抗菌剤であり、ラットに対する LD50 は経口投与で 200 mg/kg と、毒性は低い。現在は含嗽剤、歯磨剤、トローチなど、口腔衛生をはじめとして、広く医療に応用されている。CPC の抗菌機序はよく分かっていないが、微生物の細胞膜を傷害することによるものと考えられている。本研究では、低温軟化型ガッタパーチャに各種濃度の CPC を添加し、感染根管内に高頻度で検出されるグラム陽性菌、グラム陰性菌、および真菌に対する抗菌効果を評価した。

II. 材料および方法

1. 供試菌および培養条件

本実験では、感染根管に検出される代表的な微生物を用いた。各供試菌を後期対数増殖期から初期定常期まで培養し、新鮮培地で 600 nm における光学濃度 (OD 600) を 0.01 または 0.1 に調整した。

2. CPC 添加ガッタパーチャの調整

本実験では、低温軟化型ガッタパーチャであるタックエンドガター (Tactendo Gutta ; TG) を基材として使用した。TG の組成は酸化亜鉛 (85 w/w %)、ワックスおよび、ガッタパーチャであり、また、最適軟化温度は約 70°C である。抗菌剤は CPC を使用し、添加する濃度は重量比で 0.05%、0.2%、および 0.8% とした。

3. 抗菌試験

抗菌試験は Colony Forming Unit (CFU) で評価した。各種細菌および真菌は、液体培地で後期対数増殖期まで培養した。培養終了後直ちに菌液の OD を調整し、試料上にそれぞれ 0.5 ml ずつ播種した。24 時間培養後、菌液を好気性菌および通性嫌気性菌は生理食塩水で、嫌気性菌はジチオスレイトール添加生理食塩水で 10^3 倍、 10^6 倍に希釈し、それぞれ 50 μ l を寒天培地に塗抹した。培養後、出現したコロニーを計数した (n=5、検出限界 : 20 CFU/ml)。また、CPC を添加していない試料をコントロールとした。

4. 抗菌性の持続性試験

抗菌効果の持続性は、CPC 添加 TG に微生物を繰り返し接種させることにより検討した。前述した培養条件で *Streptococcus mutans* を試料上に播種し 24 時間培養した。その後、全量の培養液を取り除き、続いて新しい培養液を同試料上に播種した。この過程を 6 回繰り返し、それぞれの生菌数を計測した。

5. 最小発育阻止濃度の測定

最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) は、寒天希釈法にて行った。所定時間培養後、増殖の有無を判定した。

6. 統計処理

抗菌試験は5回繰り返し、平均値±標準偏差で示した。一次元配置分散分析後、群間の比較をステューデント-ニューマン-コイルス法で行い、危険率 0.05 以下 ($P<0.05$) の場合に有意差があると判定した。

III. 結果

1. 培養条件の決定

本実験に先立って、CPC 添加 TG の抗菌性評価をするための培養条件を検討した。試料上に菌液を 0.5 ml ずつ播種し、24 時間培養した。TG に添加する CPC 濃度を決定する際に *S. mutans* を用いたが、0.05% 添加した際に生菌数が減少することが確認できた。一方、1%以上の CPC を添加した際には時折 TG に変色が見られることがあったため、添加する CPC 濃度は 1%以下とし、最終的に 0.05%、0.2%、および 0.8%とした。

2. CPC 添加 TG の抗菌性評価 (CFU)

各種細菌と真菌を CPC 添加 TG または、CPC 未添加 TG 上で 24 時間培養後、それぞれの CFU を評価した。また、TG 未添加で培養したものについても評価した。

E. faecalis は TG のみで有意な生菌数の減少がみられた。さらに、CPC に対する感受性も高く、0.05%の添加で CFU は検出限界以下となった。連鎖球菌である *S. gordonii* と *S. mutans* は似た傾向を示し、TG のみでも生菌数は減少し、0.2%以上ではそれぞれ検出限界以下となった。*P. gingivalis* は TG のみでも多少減少したが、0.05% CPC の添加でほぼ検出限界以下となった。

A. naeslundii と *S. aureus* は 0.05% CPC の添加では TG および CPC による影響は認められなかったが、*S. aureus* は 0.2%で検出限界以下となり、*A. naeslundii* については 0.2%で生菌数は顕著に減少し、さらに、0.8%で検出限界以下となった。*P. aeruginosa* は CPC に対する感受性が特に低く、0.2%の添加までは殆ど抗菌性を示さなかった。しかし、0.8%の添加で生菌数の有意な減少がみられた。一方、真菌である *C. albicans* は 0.2%以上の添加で検出限界以下となった。

3. CPC 添加 TG の抗菌性の持続性試験

S. mutans を用いて CPC 添加 TG の抗菌性の持続性を検討した。生菌数を 6 回繰り返して計測した結果、プレート上に直接播種した場合 (TG 未添加) にはおよそ 10^8 CFU/ml を示したのに対し、TG 単独では 10^4 CFU/ml 以下となり、さらに、各種濃度の CPC 添加 TG 上では、4 回目の 0.05% CPC 添加 TG が 90 CFU/ml を示した意外は全て検出限界以下となった。

4. MIC

E. faecalis、*S. mutans*、および *S. gordonii* の MIC は $0.98 \mu\text{g/ml}$ と最も低か

った。*S. aureus*、*A. naeslundii*、*P. gingivalis*、および *C. albicans* の CPC に対する感受性は比較的高く、ともに 10 $\mu\text{g/ml}$ 未満であった。一方、*P. aeruginosa* の MIC は 5000 $\mu\text{g/ml}$ であり、最も高かった。

IV. 考 察

根管充填は感染根管処置後、あるいは抜髄後の最終処置として行う。本研究で使用した低温軟化型ガッタパーチャであるタックエンドガターは 70°C で軟化し、また、45°C まで流動性が維持されるため、複雑な形状をした根管形態に対する根管充填であっても操作時間が十分に確保できる。

本研究では、根管充填後も無菌状態を持続可能にすることを想定して、有機系抗菌剤である CPC を TG 中に添加し、感染根管内に存在する口腔内細菌および真菌に対する抗菌性を評価した。CPC はグラム陽性菌に対する強い殺菌作用があり、また真菌に対しても殺菌作用を有するとされている。結果から、特に *E. faecalis*、*S. gordonii*、および *S. mutans* に対しては TG 単独でも抗菌効果が認められた。これは TG には酸化亜鉛が約 85wt% 含有されており、その抗菌性によるものと考えられる。使用した微生物の多くは、酸化亜鉛に対し感受性が高く、その MIC は 0.01%~0.1% であった。一方、*E. faecalis*、*P. aeruginosa*、および *C. albicans* の酸化亜鉛に対する MIC は 1% よりも高かった。*E. faecalis* は酸化亜鉛に対して抵抗性を示したにもかかわらず TG に対する感受性が高かったのは、*E. faecalis* は TG に含まれるなん

らかの抗菌性物質に対する感受性が高いためと考えられる。

TG に CPC を添加することによって、使用した全ての微生物に対する抗菌効果は濃度依存的に向上した。さらに、同試料の抗菌効果の持続性を評価する実験では、培養液の交換を 6 回繰り返したが、その間抗菌効果は持続していたことが確認できた。このことから、CPC は TG から継続的に溶出していると考えられる。しかし、0.8% の CPC を添加した TG を、24 時間微生物を含まない培養液に浸漬した際の CPC の溶出量を液体クロマトグラフィ (LC) を用いて測定したが、CPC は検出されなかった。LC による CPC の検出限界は 1 $\mu\text{g/ml}$ であったので、CPC の溶出量は 1 $\mu\text{g/ml}$ 未満であったと考えられる。 *S. aureus*、*A. naeslundii*、*P. gingivalis*、および *C. albicans* に対する CPC の MIC は 1 $\mu\text{g/ml}$ よりも高く、また、これらの微生物の生菌数は TG 単独では顕著な生菌数の減少は認められなかった。これらのことを考慮すると、本研究で使用した微生物は 0.8% CPC 添加 TG 上でも増殖可能であると予測される。しかし、生菌数は顕著に減少しており、これは CPC と TG に含まれるなんらかの抗菌物質の協同的な抗菌効果によるものと考えられる。一方、*P. aeruginosa* は抗生物質や消毒薬などに対して強い抵抗性を示すことが知られている。本研究においても、CPC (MIC=5000 $\mu\text{g/ml}$) および酸化亜鉛 (MIC>1 $\mu\text{g/ml}$) に対し高い抵抗性を示し、さらに、CPC 添加 TG による抗菌試験においても最も強い抵抗性を示した。しかし、0.8% CPC 添加 TG では、CPC と TG との協同作用により、有意な生菌数の減少

がみられ、CPC 添加の有効性が認められる。このことから、CPC 添加 TG は、*P. aeruginosa* の根管感染にも有効である可能性がある。

V. 結 論

低温軟化型ガッタパーチャであるタックエンドガターに 0.05%以上の塩化セチルピリジニウムを添加することによって抗菌性が認められ、特に、0.8%の添加では全ての菌に対して抗菌性が示されることが分かった。これらの結果から、塩化セチルピリジニウムをタックエンドガターへ添加することによって、根管治療をより成功に導く可能性が示唆された。