

原著 (研究)**洗口液の *P. gingivalis* と *C. albicans* に対する
増殖抑制効果の検討**

佐々木 溪斗

岩手医科大学歯学部補綴・インプラント学講座

(主任：近藤 尚知 教授)

(受付：2022年12月6日)

(受理：2023年1月5日)

抄 録

口腔内には、常に700種以上の微生物が存在し、加齢や免疫の低下に伴いそれらが様々な疾患に関与することが知られている。

加齢とともに口腔内の細菌叢が変化し、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を起因とした歯周病はもちろん、可撤性義歯使用者では、*Candida albicans* (*C. albicans*) による義歯性口内炎等、微生物由来の炎症性疾患が多く報告されている。

これらに対する予防法としては機械的プラークコントロールと化学的プラークコントロールが挙げられるが、化学的プラークコントロールの一つである洗口法は患者が行える代表的なホームケアであり、利用される洗口液は数多く存在する。

本研究の目的は、*P. gingivalis* と *C. albicans* に対する洗口液の有効性を検討することであった。

P. gingivalis と *C. albicans* を複数の洗口液を用いて洗口法を模した方法で洗浄し、寒天培地に播種し、*P. gingivalis* と *C. albicans* の生存率を評価した。また、レジン製ブロック上で *P. gingivalis* と *C. albicans* を培養し、レジン製ブロックを洗口液にて洗浄し、付着した菌を回収し、寒天培地に播種し、*P. gingivalis* と *C. albicans* の生存率を評価した。

洗口法を模した方法では、セチルピリジニウム塩化物 (CPC : Cetylpyridinium Chloride) 含有の洗口液が他の洗口液と比較し、*P. gingivalis* と *C. albicans* の増殖を有意に抑制した ($p < 0.05$)。他の洗口液はコントロールと比較して有意な差は認められなかった。

義歯洗浄を模した方法においても、CPC 含有の洗口液が他と比較し、*P. gingivalis* と *C. albicans* の増殖を有意に抑制した ($p < 0.05$)。また、他の洗口液はコントロールと比較して有意な差は認められなかった。

本研究の結果から、洗口液中のCPCが菌の活動を抑制することが明らかとなり、歯周炎や義歯性口内炎など、様々な口腔内微生物を原因とする疾患の予防に有効であることが示唆された。

Inhibition efficacy of mouthwash against *P. gingivalis* and *C. albicans*
Keito SASAKI

Department of Prosthodontics and Oral Implantology, School of Dentistry, Iwate Medical University
19-1, Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

緒 言

近年、日本では4mm以上のポケットを有する人口が20代で約30%、50代で約50%、60代で60%とピークに達しており、それ以降は歯の喪失により、減少している¹⁾。歯周病は非プラーク性歯周疾患を除き、歯周病原細菌によって引き起こされる感染性炎症性疾患であり、近年、生活習慣病として位置づけられ、食習慣、歯磨き習慣、喫煙、さらに糖尿病などの全身性疾患との関連性が示唆されている²⁾。

口腔内には常に700種以上の常在菌が存在しており、そのほとんどは特定されていない、しかし、加齢や免疫の低下により、常在菌の活動が優勢となり、炎症性疾患などが生じることは、すでに周知の事実である。

歯周炎は口腔内微生物が原因であり、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が関連すると考えられている。*P. gingivalis* は宿主の免疫恒常性を破壊することで、歯槽骨の吸収といった歯周炎を引き起こしている。

P. gingivalis は Red complex の一種であり、これらは歯肉プラーク中に存在する *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* の3つの細菌で構成され、慢性歯周炎患者の歯肉縁下プラークから85.75%検出されており、歯周炎の有病率と *P. gingivalis* の存在は密に関係している^{2, 3, 4)}。

P. gingivalis は、グラム陰性の偏性嫌気性細菌であり、主にタンパク質を栄養源とし、強固なタンパク質分解酵素を菌体外へと放出している。*P. gingivalis* の病原因子は、凝集、バイオフィーム形成において重要な役割を担っており、主要な病原因子では、LPSが上げられ、グラム陰性菌の細胞壁の主成分でもある。その毒性和宿主に不要な炎症を引き起こす能力でよく知られており、エンドトキシンと呼ばれるようになった²⁾。これらの毒性は強力で、*P. gingivalis* は比較的少ない数でも、宿主の免疫反応を阻害し、口腔内局所細菌間の共生を乱すことが分かっている³⁾。

歯周炎は、軽度歯周炎の段階でプラークバイオフィームを効果的に除去する口腔衛生法を行うことで、重度歯周炎への進行を予防することができ、歯周炎の治療には、毎日の口腔衛生の維持、歯肉縁上および歯肉縁下のスクレーピング、ルートプレーニング、抗生物質の投薬、外科的処置が含まれる。歯ブラシとフロスによる機械的プラークコントロールは、口腔衛生と歯周健康を維持するために最も推奨され、効果的な方法である。しかし、機械的プラークコントロールのみではプラーク除去の質としては不十分と考えられ⁵⁾、それを補うために、歯磨剤や洗口液などの化学的プラークコントロール剤が使用され、それらには歯ブラシが届きにくい口腔内の領域でプラークバイオフィームの成長を抑制するための様々な抗菌剤が配合されている⁶⁾。

洗口液の中にはアルコール含有の洗口液も開発されており、それらは、強力な殺菌作用を示しているが、アルコール含有洗口液には、長期利用により、口腔癌発生率が増加あるいは助長するとされている⁷⁾。

上記のように、歯磨剤や洗口液などの口腔ケア製品の使用は、歯周炎予防のための重要な手段であると考えられており、様々な抗菌成分や化合物が含有されているが、プラークコントロールや歯肉炎・歯周炎予防におけるその有効性は十分に立証されていない。また、人間の口腔内は経時的に変化していくもので、それは歯の喪失、補綴装置の存在だけでなく、口腔内常在菌の組成も変化する。加齢変化とともに、口腔内の喪失歯は増加し、それに伴い補綴装置装着患者も増加している¹⁾。

補綴装置装着により、新たに口腔粘膜病変のリスクが生じ、義歯性口内炎、口角炎、外傷性潰瘍、義歯刺激性過形成、口腔癌などが挙げられる。その中でも義歯性口内炎は可撤性義歯装着患者の約50%が口蓋粘膜に罹患する最も一般的な疾患である。義歯性口内炎からは *Candida* 属が多く分離され、*Candida albicans* (*C. albicans*) が41%と最も多く分離された⁸⁾。健康な人の口腔内細菌叢の25~50%を占める

Candida 属は、カテーテルや義歯に微生物バイオフィルムを形成する主な原因の1つであり、義歯装着者の口腔粘膜から回収できる微生物の80%を占めている^{8,9,10,11}。

C. albicans は口腔内常在菌であるが、免疫の低下や内分泌傷害、栄養不足などにより、病原性微生物に変化する。*Candida* 属に対する処置としては、抗真菌薬や含嗽薬、軟膏などを用いた治療が行われている。貞森らの報告によると義歯性口内炎の罹患率は、義歯を清掃しない患者が80%であるのに対し、機械的清掃を行った患者は67.7%、化学的清掃を行った患者は25.5%、機械的清掃と化学的清掃を併用した患者は11.9%であった¹²。機械的清掃法はブラッシング技術に個人差があるという欠点があるため、化学的清掃法の補助が必須であると推察され、我々はこれまで化学的清掃に注目し、検討してきた¹³。

口腔ケアで用いられる洗口液は有効成分の有無により化粧品と医薬部外品に分類される。化粧品は殺菌作用等を持つ有効成分を含まず、歯垢の除去、沈着抑制などの作用で口臭、齲蝕を予防するとされている。一方、医薬部外品は、殺菌作用や抗炎症作用を有する有効成分が含まれ、口腔環境の改善にさらに効果的であるとされている。これまで洗口液の使用により歯周病原性細菌や、義歯性口内炎の原因菌の一つである *C. albicans* が減少するとの報告がされている¹⁴。上記報告等から、殺菌成分を含有した洗口液は、歯周炎や義歯性口内炎といった、口腔内微生物の活動を抑制し、様々な疾病に対する予防策となる可能性がある。

本研究の目的は、歯周病原性細菌である *P. gingivalis* と義歯性口内炎の病原性真菌である *C. albicans* に対する洗口液の菌に対する増殖抑制効果を検討することである。

材 料・方 法

1. 使用菌株および実験用菌懸濁液の調整

1. 1) *P. gingivalis* の調整

菌株は *P. gingivalis* ATCC33277 株を用いた。

P. gingivalis は 5 μ g/ml の hemin (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) および 0.5 μ g/ml の menadione (SIGMA-ALDRICH) 含有の anaerobic bacteria culture media (ABCM 液体培地) (栄研化学, 東京, 日本) を用いて培養した。*P. gingivalis* を 37 $^{\circ}$ C, 48 時間、嫌気的条件下で前培養、遠心分離 (2400 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 分) 後、ペレットを回収し、phosphate buffered saline (PBS) (-) 溶液 (ナカライテスク, 京都, 日本) に OD₆₀₀ = 2.0 (1.0 \times 10⁹CFU/ml) となるように再懸濁し実験用菌懸濁液とした。

1. 2) *C. albicans* の調整

菌株は *C. albicans* SC5314 株を用いた。*C. albicans* は YPD 液体培地 (MP-Biomedicals, CA, USA) を用いて培養した。*C. albicans* を 37 $^{\circ}$ C, 24 時間で前培養、遠心分離 (2400 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 分) 後、ペレットを回収し、phosphate buffered saline (PBS) (-) 溶液に OD₆₀₀ = 2.0 (1.0 \times 10⁷CFU/ml) となるように再懸濁し実験用菌懸濁液とした。

2. レジン製ブロックの作製

加熱重合型義歯床用アクリルレジン (アクロン[®]: ライブピンク, GC, 東京, 日本) を通法に従い重合し、10 \times 10 \times 5 mm のレジンブロックを作製した。義歯粘膜面調整時に一般的に使用されているカーバイトバーにて割合した際のアクリルレジンの表面粗さと同等となるように耐水ペーパー (# 400) で作製したレジンブロックの上面、下面、側面のすべてを研磨した。その後、121 $^{\circ}$ C, 15 分間高圧蒸気滅菌を行った。

3. 洗口液の有効性の検討

3. 1). 洗口法を模した菌に対する洗口液の増殖抑制効果

3. 1). (1) *P. gingivalis*

P. gingivalis の菌懸濁液を 1.0 \times 10⁷ CFU/ml の濃度で用意し、マイクロセントリフュージチューブに 100 μ l ずつ採取した。菌懸濁液を遠心分離機にて遠心分離 (2400 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 分) 後、上清を捨て、Habit pro (アース製薬, 東京,

表 1. 洗口液の殺菌有効成分

商品名	殺菌有効成分
Habit pro	セチルピリジニウム塩化物 (CPC:Cetylpyridinium Chloride)
Concool	グルコン酸クロルヘキシジン (CHX:Chlorhexidine Gluconate)
ネオステリングリーン	ベンゼトニウム塩化物 (BZC:benzethonium chloride)

日本), Concool (Weltec, 大阪, 日本), ネオステリングリーン (日本歯科薬品株式会社, 山口, 日本) 10 倍希釈, ネオステリングリーン 50 倍希釈, コントロールとして PBS 溶液を 1.5ml ずつチューブに入れ, 30 秒振盪した (表 1). 振盪後, 再度遠心分離 (2400 × g, 4°C, 10 分) を行い, 上清を捨て PBS 溶液 1ml を加えに菌懸濁液を作成した. 次に菌懸濁液から 100 μ l を ABCM 寒天培地に播種し, *P. gingivalis* を 37°C 嫌気的条件下で 48 時間培養した. 培養後はコロニーを計測し, 比較した (図 1).

離機にて遠心分離 (2400 × g, 4°C, 10 分) 後, 上清を捨て, Habit pro, Concool, ネオステリングリーン 10 倍希釈, ネオステリングリーン 50 倍希釈, コントロールとして PBS 溶液を 1.5ml ずつチューブに入れ, 30 秒振盪した. 振盪後, 再度遠心分離 (2400 × g, 4°C, 10 分) を行い, 上清を捨て PBS 溶液 1ml を加えに菌懸濁液を作成した. 次に菌懸濁液から 100 μ l を YPD 寒天培地に播種し, *C. albicans* を 37°C で 24 時間培養し, 培養後はコロニーを計測し, 比較した (図 1).

3. 2). レジン製ブロックに付着した菌に対する洗口液の増殖抑制効果

3. 2). (1) *P. gingivalis*

P. gingivalis を 1.0×10^7 CFU/ml の濃度で菌懸濁液を用意し, 準備したレジン製ブロックを 24 穴プレートに置き, 菌液を 100 μ l 滴下した. レジン製ブロックを 37°C, 嫌気的条件下にて 2 時間培養した. 培養後, PBS 溶液で付着していない菌を優しく洗浄し, Habit pro, Concool, ネオステリングリーン 10 倍希釈, ネオステリングリーン 50 倍希釈, コントロールとして PBS にて 30 秒間振盪した. 振盪後, レジン製ブロックを 1ml の PBS 溶液中で, 30 秒間ボルテックスし, レジン製ブロックに付着した菌を回収した. 回収後, *P. gingivalis* を ABCM 寒天培地に細菌懸濁液から 100 μ l 播種し, *P. gingivalis* を 37°C 嫌気的条件下で 48 時間培養した. 培養後はコロニーを計測し, 比較した (図 2).

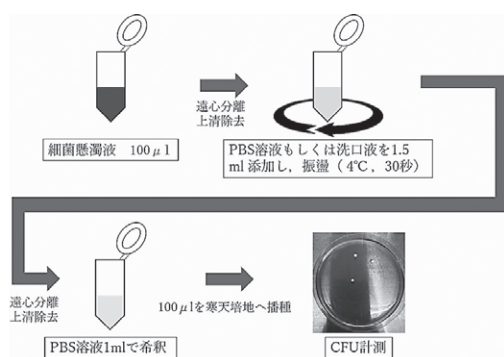


図 1. 菌に対する洗口液の有効性の検討方法

3. 1). (2) *C. albicans*

C. albicans を 1.0×10^7 CFU/ml の濃度で菌懸濁液を用意し, マイクロセントリフューズチューブに 100 μ l 採取した. 菌懸濁液を遠心分

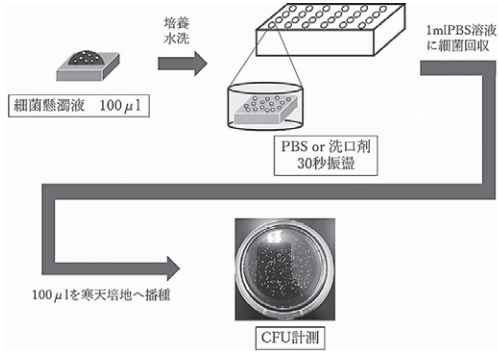


図 2. レジン製ブロックに付着した菌に対する増殖抑制効果の検討方法

3. 2). (2) *C. albicans*

C. albicans を 1.0×10^7 CFU/ml の濃度で菌懸濁液を用意し、準備したレジン製ブロックを 24 穴プレートに置き、菌液を 100µl 滴下した。レジン製ブロックを 37℃、嫌気的条件下にて 2 時間培養した。培養後、PBS 溶液で付着していない菌を優しく洗浄し、Habit pro, Concool, ネオステリングリーン 10 倍希釈、ネオステリングリーン 50 倍希釈、コントロールとして PBS にて 30 秒間振盪した。振盪後、レジン製ブロックを 1 ml の PBS 溶液中で、30 秒間ボルテックスし、レジン製ブロックに付着した菌を回収した。回収後、*C. albicans* を YPD 寒天培地に菌懸濁液から 100µl 播種し、*C. albicans* を 37℃ で 24 時間培養した。培養後はコロニーを計測し、比較した (図 2)。

4. 統計分析

菌数の有意差を比較するために、一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、Tukey HSD ポストホックテストにより統計的に有意な差異を評価した。すべての検定において、有意水準は 5% に設定した。

結 果

1. *P. gingivalis* への洗口液の有効性

1. 1). 洗口法を模した洗口液の有効性

洗口法を模した洗口液の有効性の検討では、

Habit pro (Mean: Habit pro 0.0 CFU/ml, Concool 120.5 CFU/ml, Nx50 138.2 CFU/ml, Nx10 119.8 CFU/ml, PBS 149.3 CFU/ml) が他の洗口液と比較して、有意な差を認めた ($*p < 0.05$)。また、他の洗口液の間には有意な差は認められなかった (図 3, 4)。

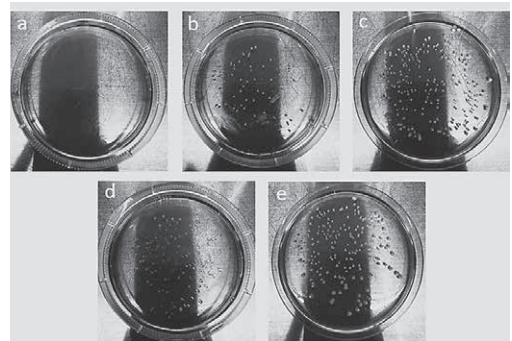


図 3. *P. gingivalis* 培養後の寒天培地 (洗口法) (a) Habit pro, (b) Concool, (c) ネオステリングリーン 10 倍希釈, (d) ネオステリングリーン 50 倍希釈, (e) PBS 溶液。Habit pro にて洗浄を行ったものは菌の発育が抑制されていた。

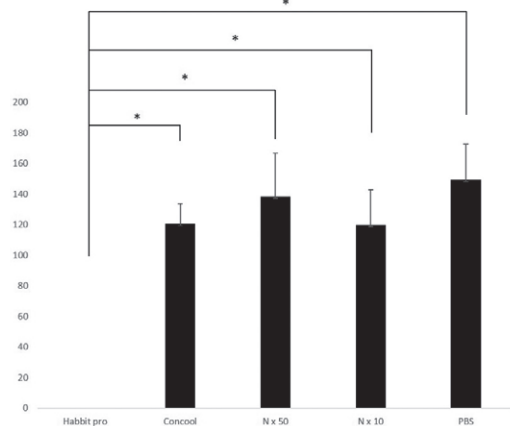


図 4. *P. gingivalis* 洗口法 48 時間培養後細菌数の比較 (洗口法)

Habit pro が他の洗口液と比較し、有意な差を認めた ($*p < 0.05$)。 (Habit pro, Concool, ネオステリングリーン 50 倍希釈 (N × 50), ネオステリングリーン 10 倍希釈 (N × 10), PBS 溶液)

1. 2). レジン製ブロックに付着した細菌に対する洗口液の有効性

レジン製ブロックに付着した細菌に対する洗口液の有効性の検討では, Habit pro (Mean: Habit pro 0.0 CFU/ml, Concool 407.0 CFU/ml, Nx50 408.0 CFU/ml, Nx10 394.3 CFU/ml, PBS 444.3 CFU/ml) が他の洗口液と比較

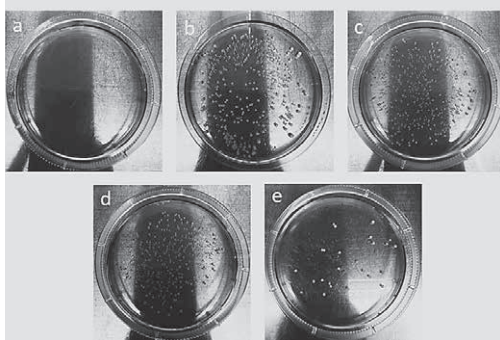


図 5. *P. gingivalis* 培養後の寒天培地 (レジン上付着細菌)

(a) Habit pro, (b) Concool, (c) ネオステリングリーン 10 倍希釈, (d) ネオステリングリーン 50 倍希釈, (e) PBS 溶液

Habit pro にて洗浄を行ったものは菌の発育が抑制されていた。

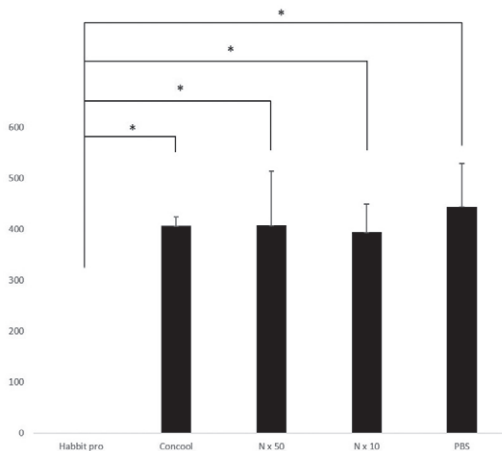


図 6. *P. gingivalis* 洗口法 48 時間培養後細菌数の比較 (レジン上付着細菌)

Habit pro が他の洗口液と比較し, 有意な差を認めた ($p < 0.05$). (Habit pro, Concool, ネオステリングリーン 50 倍希釈 (N × 50), ネオステリングリーン 10 倍希釈 (N × 10), PBS 溶液)

して, 統計的に有意な差を認めた ($p < 0.05$). また, 他の洗口液の間には有意な差は認められなかった (図 5, 6).

2. *C. albicans* への洗口液の有効性

2. 1). 洗口法を模した洗口液の有効性

洗口法を模した洗口液の有効性の検討では, Habit pro (Mean: Habit pro 0.0 CFU/ml,

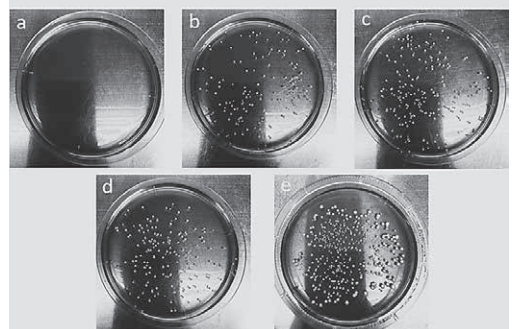


図 7. *C. albicans* 培養後の寒天培地 (洗口法)

(a) Habit pro, (b) Concool, (c) ネオステリングリーン 10 倍希釈, (d) ネオステリングリーン 50 倍希釈, (e) PBS 溶液.

Habit pro にて洗浄を行ったものは菌の発育が抑制されていた。

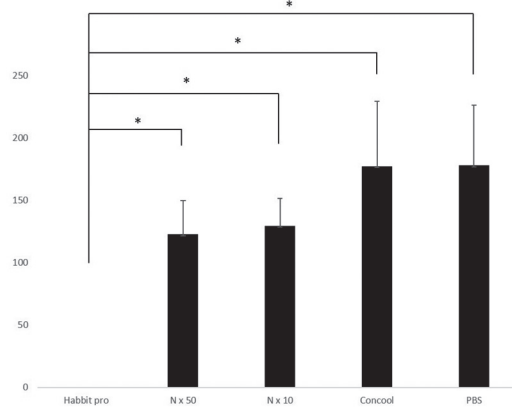


図 8. *C. albicans* 洗口法 24 時間培養後菌数の比較 (洗口法)

Habit pro が他の洗口液と比較し, 有意な差を認めた ($p < 0.05$). (Habit pro, Concool, ネオステリングリーン 50 倍希釈 (N × 50), ネオステリングリーン 10 倍希釈 (N × 10), PBS 溶液)

Concool 177.5 CFU/ml, Nx50 122.7 CFU/ml, Nx10 129.5 CFU/ml, PBS 178.0 CFU/ml) が他の洗口液と比較して、有意な差を認めた ($p < 0.05$)。また、他の洗口液の間には有意な差は認められなかった (図 7, 8)。

2. 2). レジン製ブロックに付着した菌に対する洗口液の有効性

レジン製ブロックに付着した菌に対する洗口

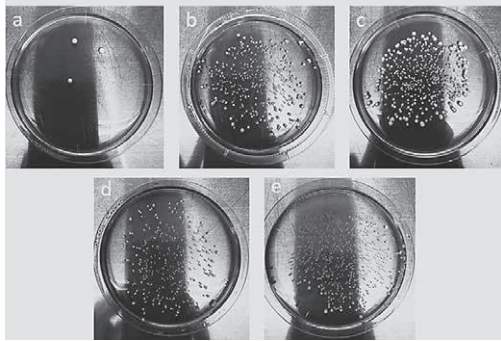


図9. *C. albicans* 培養後の寒天培地(レジン上付着菌)
(a) Habit pro, (b) Concool, (c) ネオステリンググリーン 10 倍希釈, (d) ネオステリンググリーン 50 倍希釈, (e) PBS 溶液
Habit pro にて洗浄を行ったものは菌の発育が抑制されていた。

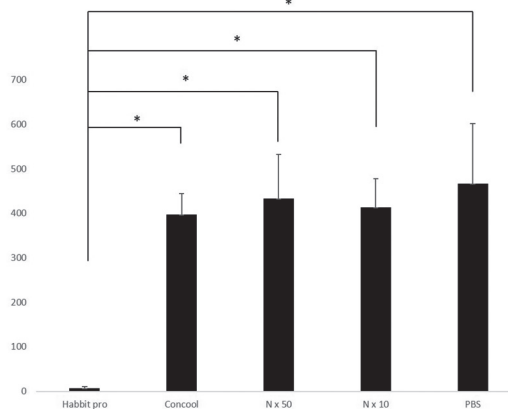


図10. *C. albicans* 洗口法24時間培養後菌数の比較(レジン上付着菌)
Habit pro が他の洗口液と比較し、有意な差を認めた ($p < 0.05$)。 (Habit pro, Concool, ネオステリンググリーン 50 倍希釈 (N × 50), ネオステリンググリーン 10 倍希釈 (N × 10), PBS 溶液)

液の有効性の検討では, Habit pro (Mean: Habit pro 6.3 CFU/ml, Concool 397.3 CFU/ml, Nx50 433.3 CFU/ml, Nx10 413.0 CFU/ml, PBS 466.7 CFU/ml) が他の洗口液と比較して、有意に差を認めた ($p < 0.05$)。また、他の洗口液の間では有意な差は認められなかった (図 9, 10)。

考 察

化学的プラークコントロールには、洗口法、歯周ポケット内洗浄、歯周ポケット内投与、内服薬の経口投与といった方法が挙げられるが、患者個人が行うホームケアとしては、洗口法のみである¹⁵⁾。今回の実験で用いた方法は、洗口法を模したものであった。

今回用いた洗口液の殺菌有効成分として、Habit pro はセチルピリジニウム塩化物 (CPC : Cetylpyridinium Chloride), Concool はグルコン酸クロルヘキシジン (CHX : Chlorhexidine Gluconate), ネオステリンググリーンはベンゼトニウム塩化物 (BZC : Benzethonium Chloride) が含有されている。

Habit pro は、洗口法を模した方法においても、レジン製ブロックに付着した菌に対しても有意に他の洗口液よりも強い増殖抑制効果作用を示した。このことから、セチルピリジニウム塩化物は、歯周病原性細菌である *P. gingivalis*, 義歯性口内炎の病原菌である *C. albicans* に対する予防および治療に用いることが可能であることを示した。一方、他に用いた Concool, ネオステリンググリーンは、コントロールである PBS 溶液と比較しても増殖抑制効果の差が無く、強い殺菌作用は示されなかった。これは、我々の研究チームのこれまでの研究結果や他の研究と類似の結果となった¹⁶⁾。

CHX は歯垢除去や歯肉炎の予防として用いられるゴールドスタンダードであり、外科手術前の消毒として広く用いられている。CHX はグラム陽性菌, グラム陰性菌, 酵母, ウイルスに対して有効な広域殺菌成分であり、用量依存的に作用し、高濃度 (0.12 ~ 0.20) では殺菌作用、

低濃度 (0.02 ~ 0.06) では、静菌作用を示す。今回用いたコンクール推奨されている適正濃度は 0.0001 ~ 0.0006% であり、本実験でも同様の濃度で行ったが、この濃度では殺菌作用・静菌作用共に効果が低いことが明らかとなった。一方、Maliha ら¹⁷⁾ が、高濃度の CHX では、低濃度の CHX よりも有意に菌垢抑制効果があることを報告していることから、本実験で用いた濃度では、増殖抑制効果は期待できないと考えられる。しかし、低濃度の CHX は長期使用により、細菌の増殖抑制効果を発揮すると考えられており、3 週間後の Gingival Index は低濃度、高濃度で有意差は認められなかったため¹⁶⁾、本研究のような短時間での使用では効果を示さなかった可能性もある。

ネオステリングリーンは、日本では口腔内や中咽頭領域の消毒に最も広く使用されている消毒薬の一つであり、口腔内の消毒には 50 倍希釈 (0.004%)、抜歯創の消毒には 10 倍希釈 (0.02%) の濃度で用いられる。有効成分である BZC は、芽胞のない細菌や真菌に抗菌力を有し、グラム陽性菌には低濃度で効果があるといわれている。しかし、本実験ではネオステリングリーン 10 倍希釈、50 倍希釈どちらの濃度においても *P. gingivalis* と *C. albicans* の増殖抑制効果は認められず、また、10 倍希釈と 50 倍希釈の間にも差は認められなかった。これは他の研究においても類似の結果が出ている¹⁵⁾。BZC は濃度を高くすることで、消毒効果は強くなるとされているが、高濃度になると、歯肉線維芽細胞の細胞膜を破壊し、細胞の増殖を抑制するため、殺菌作用を目的とし高濃度にするには適切ではない¹⁸⁾。

CPC は幅広い抗菌活性を有するカチオン性の第四級アンモニウム化合物であり、これまでも口腔衛生用品として、広く用いられてきた¹⁹⁾。本実験では、CPC 含有の Habit pro のみが高い増殖抑制効果を示しており、他の研究でも、CPC 含有洗口液が、*C. albicans* の付着、発育を阻害したことを示している。CPC は脂質二重層を破壊することで殺菌作用を示すため、それ

らを有する細菌と真菌に対して増殖抑制効果を示したと考えられる。

これまで、口腔内に生物に対する、洗口液の有効性を調べる研究では、アルコール含有洗口液が強い殺菌作用を持つとされていたが、Habit pro により、アルコール非含有でも高い増殖抑制効果をもたらすことが証明された¹⁴⁾。また、CPC は CHX と併用することにより、CHX の副作用を軽減し^{19, 20, 21)} より高い抗菌性を示すと証明されているため²²⁾、今回、CHX 単体では効果が得られなかったが、併用した場合も検討する必要がある。しかし、本研究の結果のみでは、CPC が殺菌作用を示したか、レジン製ブロックから菌を剥離し、洗浄したことで菌数が減少したかは証明できていないため、さらに検討が必要である。

本研究は、洗口法を模した方法、義歯洗浄を模した方法を採用している。上述の結果から、ホームケアの一環として Habit pro による洗口は、口腔衛生環境の改善に有効であることが示唆された。本実験では、短期間・短時間の浸漬、振盪だったため、長時間・長期間での効果も検討すべきである。

結 論

CPC 含有の洗口液 Habit pro が *P. gingivalis* と *C. albicans* に対して増殖抑制効果を示し、ネオステリングリーン、Concool は濃度に関係なく、PBS と差を認めなかった。Habit pro に含まれる CPC が菌に対して有効であることを示し、歯周炎や義歯性口内炎など、様々な口腔内微生物に起因する疾患の予防に適していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇切丁寧なご指導と多大なるご協力を賜りました微生物学講座分子微生物学分野石河太知教授および村上智彦先生はじめ医局の先生方には、温かいご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

利益相反

本研究において、公表すべき利益相反の事実はない。

参考文献

- 1) 厚生労働省. “平成 28 年歯科疾患実態調査” 厚生労働省, <https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/62-28-02.pdf>, (参照 2022-11-28)
- 2) Weizhe X., Wei Z., Huizhi W. and Shuang L.: Roles of Porphyromonas gingivalis and its Virulence factors in periodontitis. Adv Protein Chem Struct Biol., 120: 45–84, 2020, doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.12.001.
- 3) Meenakshi, R., Harsh, M. T., Dandan, C., Praveen, G. and Lin, C.: Recent Development of Active Ingredients in Mouthwashes and Toothpastes for Periodontal Diseases. Molecules., 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26072001>
- 4) Kah, Y H., Keang, P. S. and Kok, G. C.: Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. Microbiol., 7: 53, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00053
- 5) Sugano, N.: Biological plaque control: novel therapeutic approach to periodontal disease. Journal of Oral Science., 54: 1-5, 2012.
- 6) Ahmad, H. A., Mahsa, R., Mohammadreza, T., Nasrin, K. V., Reza, A., Mansoor, M., Azadeh, E. and Azarnoosh A.: Comparison of Antimicrobial Effects of Three Different Mouthwashes. Iran J Public Health., 44: 997-1003, 2015.
- 7) McCullough, J. and Farah, CS.: The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. Australian Dental Journal. 53: 302–305, 2008. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00070.x
- 8) Kamiar, Z., Neda, N. H., Naeem, R., Keyvan, P., Bitar, T., Mahroo, V., Farzaneh, S. and Mehrdad, V.: Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. Medical Mycology., 49: 208–211, 2011.
- 9) Clarissa, J. N. and Alexander, D. J.: Candida albicans Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol., 69: 71–92, 2015. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.
- 10) Nicole, O. P., Léa, L., Gordon, R., Julian, R. N., Jonathan, P. R.: Candida albicans Biofilms and Polymicrobial Interactions. Crit Rev Microbiol., 47: 91–111, 2021, doi: 10.1080/1040841X.2020.1843400.
- 11) Megha, G. and Clarissa, J. N.: Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect., 18: 310–321, 2016, doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002.
- 12) 貞森紳丞, 小谷博夫, 二川浩樹, 浜田泰三: 義歯性口内炎の臨床的研究. 補綴誌, 34: 202-207, 1990.
- 13) 村上智彦: 義歯安定剤が P. gingivalis に与える影響. 岩手医大誌, 43: 12-23, 2018.
- 14) 白井やよい, 鈴木奈央, 鎌田政善, 清浦有祐: 洗口液の Candida albicans に対する殺菌効果. 老年歯学, 19: 284-288, 2005.
- 15) 特定非営利法人歯周病学会: 歯周治療のガイドライン 2022, 医歯薬出版, 東京, 40-47, 2022.
- 16) Yuki, I., Junichiro, H., Takashi, S., Sota, S., Taeko, M., Takeki, F., Yasuyuki, S., Kosuke, O., Eri, T., Takeshi, K., Makoto, A., Toshihide, N., Yoshihiro, S., Akio, M. and Mitsuo, F.: Assessment of oral malodor and tonsillar microbiota after gargling with benzethonium chloride. Journal of Oral Science., 58: 83-91, 2016.
- 17) Maliha, H., Ayse, G. B., Odd, C K., Anne, M. A., Leiv, S. and Hans, R. P.: Comparing the effect of 0.06 and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model_ a parallel group, double masked randomized clinical trial. BMC Oral Health., 17: 118 2017, doi: 10.1186/s12903-017-0400-7
- 18) Yuji, N., Ujjal, K. B., Ryo N., Masahiko, S., Takeshi, M. and Masayuki, O.: Effects of high-dose major components in oral disinfectants on the cell cycle and apoptosis in primary human gingival fibroblasts in vitro. Dental Materials Journal., 29: 75–83, 2010.
- 19) Fabrizio, G., Debora, P., Francesca, R., Marta, M., Denise, C., Italo, N., Livia, O., Gianna, M. N.: Therapeutic efficacy of chlorhexidine - based mouthwashes and its adverse events: Performance - related evaluation of mouthwashes added with Anti - Discoloration System and cetylpyridinium chloride. Int J Dent Hygiene., 17:229–236, 2019. doi: 10.1111/idh.12371
- 20) Winkel, E. G., Roldan, S., Van Winkelhoff, A. J., Herrera, D. and Sanz, M.: Clinical effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc-lactate on oral halitosis. J Clin Periodontol., 30: 300–306, 2003.
- 21) Alberto, P., Juan, B., Ignacio, S., Elena, F., Bettina, A., Mariano, S. and David, H.: Clinical effects of the adjunctive use of a 0.03% chlorhexidine and 0.05% cetylpyridinium chloride mouth rinse in the management of peri-implant diseases: A randomized clinical trial. J Clin Periodontol., 46: 342–353, 2019. doi: 10.1111/jcpe.13088
- 22) Xiaojun, M., David, L. A., Wolfgang, B., Karl-Anton, H., Tim, M., Elmar, H., Ali, A. and Fabian, C.: Cetylpyridinium Chloride: Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance. Antimicrob Agents Chemother., 64: e00576-20, 2020. <https://doi.org/10.1128/AAC.00576-20>.

Inhibition efficacy of mouthwash against *P. gingivalis* and *C. albicans*

Keito SASAKI

Department of Prosthodontics and Oral Implantology, School of Dentistry, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Hisatomo KONDO)

[Received : December 6 2022 : Accepted : January 5 2023]

Abstract

Oral Microorganisms produce various inflammatory diseases such as periodontal disease, caused by *Porphyromonas gingivalis*, and denture stomatitis, caused by *Candida albicans*, due to aging or weakened immunity. Although mouthwash has been currently used for chemical plaque control, the effect of mouthwashes is still controversial. The purpose of this study was to evaluate the efficacy of mouthwashes against *P. gingivalis* and *C. albicans*.

P. gingivalis and *C. albicans* were rinsed with several kinds of mouthwashes, and proliferation was evaluated. Microorganisms were cultured on resin blocks, the blocks were washed with several types of mouthwash, and adherent microorganisms were collected to evaluate viability.

Under the mouthwash mimic condition, a mouthwash containing cetylpyridinium chloride (CPC) significantly inhibited the growth of both types of microorganisms compared to other mouthwashes ($p < 0.05$).

Under the denture cleaning situation, a CPC-containing mouthwash significantly inhibited the growth of *P. gingivalis* and *C. albicans* compared to other mouthwashes ($p < 0.05$).

These results suggest that mouthwashes containing cetylpyridinium chloride should be effective in preventing various diseases caused by oral microorganisms, such as periodontitis and denture stomatitis.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans*, Mouthwash, Cetylpyridinium chloride