原 著

Streptococcus mutans バイオフィルムに対する
リステリン® ナチュラルケアの浸透性と殺菌効果の評価

大 墨 竜 也^{*1}, 竹 中 彰 治^{*1}, 坂 上 雄 樹^{*1}, 若 松 里 佳^{*1}
寺 尾 豊^{*2}, 大 島 勇 人^{*3}, 興 地 隆 史^{*1}

^{*1}新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野

^{*2}新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座微生物感染症学分野

^{*3}新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座硬組織形態学分野

(主任：興地隆史教授)

(受付日：2014 年 1 月 31 日 受理日：2014 年 6 月 30 日)

Evaluation of the penetration ability and antimicrobial efficacy of
Listerine® Natural Care against *Streptococcus mutans* biofilms

Ohsumi Tatsuya^{*1}, Takenaka Shoji^{*1}, Sakaue Yuuki^{*1}, Wakamatsu Rika^{*1}
Terao Yutaka^{*2}, Ohshima Hayato^{*3} and Okiji Takashi^{*1}

^{*1}Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

^{*2}Division of Microbiology and Infectious Diseases, Department of Oral Health Science, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

^{*3}Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue, Department of Tissue Regeneration and
Reconstruction, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Chief : Prof. Okiji Takashi)

(Received : January 31, 2014 Accept : June 30, 2014)

Abstract : The aims of this study were to evaluate the penetration ability and antimicrobial efficacy of an alcohol-free mouth rinse (Listerine® Natural Care; N), newly developed to reduce the irritative property and improve the mouthfeel of Listerine®, using artificially developed *Streptococcus mutans* biofilms. As test mouth rinses, Listerine® Zero (Z), Listerine® Fresh Mint (F) and an alcohol-free chlorhexidine gluconate-containing mouth rinse (CHG) were investigated. *S. mutans* biofilms were grown on glass-based dishes for 24 h under

連絡先：竹中彰治

〒 951-8514 新潟県新潟市中央区学校町通二番町 5274 番地

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野

Shoji Takenaka

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

5274, Gakkochodori 2-bancho, Chuo-ku, Niigata 951-8514, Japan

E-mail : takenaka@dent.niigata-u.ac.jp

anaerobic conditions. The ability of the mouth rinses to penetrate these biofilms were analyzed by time-lapse monitoring of the fluorescence loss of the calcein-AM-stained biofilms by confocal laser scanning microscopy. The antimicrobial effects of the mouth rinses were evaluated by colony counting and Live/Dead staining observation. For each of the mouth rinses evaluated, a high correlation was observed between the time required to reach 50% of the initial fluorescence intensity and the biofilm thickness. The penetration velocity of N was similar to that of Z and F and significantly higher than that of CHG. For 30s exposure, the number of viable cells after exposure to N was similar to that after exposure to Z and F. Live/Dead staining observation showed that 99% of the cells were propidium iodide-positive after exposure to any of N, Z and F, being significantly higher than the percentage of propidium iodide-positive cells found after exposure to CHG. In the present study, it was concluded that the penetration ability and antimicrobial efficacy of Listerine[®] Natural Care were similar to those of Listerine[®] Zero and Listerine[®] Fresh Mint, and significantly superior to those of the chlorhexidine gluconate-containing mouth rinse.

Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 56(3) : 291-301, 2014.

Key words : alcohol-free mouthrinse, biofilm, penetration ability, confocal laser scanning microscopy

要旨 : 本研究では、リステリン[®]の刺激性や使用感の改善を意図して開発された新規アルコール非含有洗口液(リステリン[®]ナチュラルケア; N 群)の *Streptococcus mutans* 人工バイオフィルムに対する浸透性と殺菌能を既存洗口液[*Listerine[®] Zero* (Z 群), *Listerine[®] フレッシュミント* (F 群) および 0.12% グルコン酸クロロヘキシジン含有洗口液 (CHG 群)]との比較により評価した。人工バイオフィルムはガラスベースディッシュ上で 24 時間嫌気培養することにより作製した。洗口液の浸透性は calcein-AM で染色したバイオフィルムの底面の蛍光消失を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に解析することにより評価した。殺菌能は 30 秒作用後の生菌数測定およびバイオフィルム底面の Live/Dead 染色像により評価した。その結果、各洗口液とも 50% 蛍光消失時間はバイオフィルムの厚みと正の相関を示し、N 群の浸透速度は Z および F 群と同等かつ CHG 群より有意に高値であった。生菌数は N, Z および F 群は同等で共に CHG 群より有意に低値であった。また、Live/Dead 染色像は N, Z および F 群とも 99% 以上が propidium iodide (PI) 陽性細菌であり陽性率は CHG 群より有意に高かった。以上の結果から、N 群の浸透性と殺菌能は、Z 群および F 群と同等かつ CHG 群より有意に優れていることが示された。

日本歯周病学会会誌 (日歯周誌) 56(3) : 291-301, 2014

キーワード : アルコール非含有洗口液, バイオフィルム, 浸透性, 共焦点レーザー顕微鏡

緒 言

洗口液は口腔セルフケアにおける化学的コントロールを目的として用いられ、歯ブラシ等による機械的コントロールを十分行なったうえで適用することにより、プラークを量的・質的にコントロールする相乗効果が得られる¹⁻⁴⁾。1987 年に American Dental Association (ADA) の承認を受けた Listerine[®] (Johnson & Johnson, USA) は、迅速な殺菌効果に加えて、長期使用後にも口腔細菌叢を変化させず、日和見病原体の増加や耐性菌の出現も認められないことが報告されている⁵⁻⁷⁾。さらに 6ヶ月間の比較臨床試験においても、優れたプラーク付着抑制効果ならびに歯肉炎予防効果が得られることが証明されている⁸⁻¹⁰⁾。

一方で、リステリン[®]は主に溶剤として配合されるエタノールが他の洗口液と比較して高濃度であること

から、放射線治療者やアルコール禁忌の患者には使用が禁止されている。また、12 歳以下の子供、アルコール依存症患者、アルコール代謝遺伝子欠乏者、口腔乾燥症患者、あるいは口腔粘膜に炎症が見られる場合などでは、アルコールの為害作用のリスクを勘案し、使用を控えるとの指針が示されている¹¹⁻¹³⁾。さらに、含有アルコール成分による洗口液の味¹⁴⁾や粘膜への刺激¹⁵⁾が、洗口液の使用感に悪影響を与え¹⁶⁾、洗口時間の短縮や使用の中断につながることから、本来の洗口液の予防効果が得られなくなる懸念も考えられる。

そのため北米では、刺激を軽減し使用感を向上する目的で有効成分および濃度は同一でノンアルコールタイプとなった Listerine[®] ZeroTM (Johnson & Johnson, New Brunswick, USA) が 2010 年より発売されているが、国内においても 2013 年 9 月にアルコールを含まないリステリン[®] ナチュラルケア (ジョンソン・エンド・ジョンソン社, 東京) が発売された。リステリン[®]

表1 本実験で用いた洗口液の成分

	リステリン® ナチュラルケア	Listerine® Zero™	リステリン® フレッシュミント	Chlorhexidine Gluconate Oral Rinse USP
製造者 (Lot No.)	ジョンソン・エンド・ ジョンソン (Lot No. 3051516)	Johnson & Johnson (Lot No. 0292C)	ジョンソン・エンド・ジ ョンソン (Lot No. 2072135)	Sunstar (Lot No. U066LY)
薬用成分	1,8-シネオール, ℓ -メントール, サリチル酸メチル, チモール			グルコン酸クロルヘキシジン (0.12%)
アルコール成分	含まない	含まない	含む	含まない
その他の成分	安息香酸, 安息香酸ナトリウム, サッカリンナトリウム, ソルビトール, 水			ポリオキシエチレン硬化 ヒマシ油 40,
	プロピレングリコール, ポロキサマー, ラウリル硫酸ナトリウム, スクラロース		プロパノール, ポリオキ シエチレンポリオキシ	アセスルファムカリウム, プロピレングリコール,
	緑茶エキス, 香料, 着色料	香料, 着色料	プロピレングリコール, エタノール, 香料, 着色 料	グリセリン, 水, 香料, 着色料

ナチュラルケアの薬用成分およびその濃度は Listerine® Zero™ と同一であるが、香料および着色料の変更に加え、清涼剤として緑茶エキスが追加されている。緑茶に含まれるカテキン類を中心とした単量体ポリフェノールは、ミュータンスレンサ球菌に対する抗菌作用^{17,18)}やデンタルプラーク中の酸産生抑制効果^{19,20)}、*Porphyromonas gingivalis* の上皮細胞への付着抑制効果を有すること²¹⁾が報告されており、更なる殺菌効果の増強が期待できる。

そこで本研究では、リステリン®ナチュラルケアの *S. mutans* 人工バイオフィルムに対する浸透・殺菌効果について、従来のリステリン®, Listerine® Zero™ およびグルコン酸クロルヘキシジン含有洗口液との差異を比較、検討した。

材料と方法

1. バイオフィルム形成

対数増殖期の *S. mutans* ATCC 25175 株 (OD₆₀₀ = 0.05) をガラスベースディッシュ (AGC テクノグラス, 静岡) を用い 0.5% スクロース含有 BHI 液体培地中で 24 時間嫌気培養することによりバイオフィルムを形成させた。24 時間後、緩衝液 (5.0 g/l NaCl, 2.5 g/l Na₂HPO₄, pH 7.4) にて 3 回洗浄後、Calcein-AM (CAM: 10 µg/ml, Life Technologies, USA) を 2 時間作用させ生菌を染色した²²⁾。2 時間後、緩衝液にて 3 回

洗浄したのち共焦点レーザー顕微鏡 (FV-300, オリンパス, 東京) のステージに固定した。

2. 洗口液

今回使用した洗口液は、Listerine® Zero™ (Z 群)、リステリン®ナチュラルケア (N 群)、リステリン®フレッシュミント (F 群: ジョンソン・エンド・ジョンソン, 東京) およびアルコール非含有グルコン酸クロルヘキシジン含有洗口液 (CHG 群: 0.12 % Chlorhexidine Gluconate Oral Rinse USP, Sunstar Americas Inc., USA) の四種類で、緩衝液 (C 群: 5.0 g/l NaCl, 2.5 g/l Na₂HPO₄, pH 7.4) をネガティブコントロールとした (表 1)。

3. 共焦点レーザー顕微鏡を用いたタイムラプス解析

各試料 (各群とも n=7) について、無作為に測定面を一カ所選定後、共焦点レーザー顕微鏡 (対物レンズ x60, 励起波長 488 nm, 蛍光波長 510-530 nm) を用いて 0.45 µm 間隔で XYZ 連続断層像を撮影した。その後、焦点をバイオフィルム底面に固定して各洗口液 (3 ml) をディッシュ側壁に沿わせながら滴下し、滴下直後から 15 秒間隔で 5 分間共焦点画像を撮影した。

解析は採取した共焦点画像から最もバイオフィルムの厚みがある部位と無作為に選択した二領域 (計三領域, 25 µm 四方) について、バイオフィルムの厚みおよび時間経過に伴う蛍光量の減少率を Metamorph ソ

フトウェア (IBM, USA) を用いて算出した。さらに、領域内の蛍光量が 50% 減少するまでの時間 (T50) を算出した²²⁾。

4. Live/Dead 染色法によるバイオフィーム底面の *S.mutans* の殺菌効果の比較

30 秒作用後のバイオフィーム底面の殺菌効果を観察するために、試料 (各 $n=6$) に被験洗口液を 30 秒作用させた後、Live/Dead viability Kit (Life Technologies, USA) を添付説明書に従って用い、SYTO9 および propidium iodide (PI) による蛍光二重染色を行った。次いで、各試料からそれぞれ無作為に五領域を選定し共焦点画像を採取した (SYTO9 については励起波長 488 nm, 蛍光波長 510–530 nm; PI については励起波長 543 nm, 蛍光波長 610 nm)。殺菌効果の判定は、Metamorph ソフトウェアを用いて各視野の蛍光ピクセル比を算出することにより行った²²⁾。

5. 洗口液作用後のバイオフィーム中の生菌数の算定

バイオフィーム試料 (各 $n=6$) に被験洗口液を 30 秒もしくは 5 分間作用させたのち、ただちに緩衝液にて 3 回洗浄した。5 分間超音波処理を行いバイオフィーム中の *S.mutans* を回収し、回収試料中の生菌数を寒天平板希釈法により算定した。

6. 統計学的解析

統計学的解析には、SPSS11.0 ソフトウェア (IBM, USA) を用いた。バイオフィームの厚みと T50 との関係の解析には線形回帰分析および共分散分析、Bonferroni test を用いた。生菌数の解析には、Kruskal-Wallis および Dunnett test, Steel-Dwass test を使用し、Live/Dead 染色の解析には Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass test をそれぞれ行った。

結 果

1. CAM 染色法を用いた洗口液の *S.mutans* バイオフィーム浸透効果のタイムラプス解析

24 時間培養後のバイオフィームの厚み (概算値) は、最大で 32 μm であった。今回用いた四種類の洗口液使用群では、作用直後から時間と共に厚みの薄い領域からバイオフィーム底面の蛍光が消失していく像が経時的に観察された (図 1)。N, Z 群および F 群では、すべての試料において最大 135 秒間で背景レベルまで蛍光が消失した。CHG 群の蛍光消失は、N 群, Z 群お

よび F 群と比較して緩慢であり、30 秒作用後の共焦点画像では蛍光消失はほとんど認められず、5 分作用後もすべての試料において蛍光が残存している領域が認められた (図 1 CHG)。C 群は 5 分後もすべての領域で蛍光が残存し、どの領域も T50 には到達しなかった。洗口液 30 秒作用後の平均蛍光量の減少量 (log reduction $\pm$ SD) は、それぞれ 0.22 ± 0.10 (N 群), 0.24 ± 0.08 (Z 群), 0.21 ± 0.14 (F 群) および 0.01 ± 0.01 (CHG 群) であった。また、5 分作用後の平均蛍光量の減少量 (log reduction $\pm$ SD) は、それぞれ 2.30 ± 0.22 (N 群), 2.30 ± 0.24 (Z 群), 2.30 ± 0.30 (F 群) および 0.60 ± 1.82 (CHG 群) であった。

すべての洗口液群では、バイオフィームの厚みと T50 には正の相関関係があり (図 2), 回帰式および決定係数 (R^2) はそれぞれ $y=2.149x$, $R^2=0.994$ (N 群), $y=2.123x$, $R^2=0.987$ (Z 群), $y=2.255x$, $R^2=0.923$ (F 群) および $y=10.579x$, $R^2=0.994$ (CHG 群) であった。N, Z および F 群は CHG 群と比較して有意に蛍光消失が速く ($p<0.05$), 3 群の浸透速度は CHG 群と比較して 5 倍以上速かった (表 2)。N 群, Z 群および F 群の間には、有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。

5 分作用後の位相差像において、どの実験群もガラス界面にバイオフィーム構造物が残存しており、洗口液による著明な剥離効果は観察されなかった (図 1)。

2. Live/Dead 染色法によるバイオフィーム底面の *S.mutans* の殺菌効果の比較

すべての洗口液において、30 秒作用後のバイオフィーム底面における PI 陽性率は C 群 ($5.8 \pm 5.2\%$) と比較して有意に増加した ($p<0.05$)。N 群, Z 群および F 群はすべての視野においてほとんどの細菌が PI 陽性であった (ともに $99.8 \pm 0.1\%$)。CHG 群は、SYTO9 陽性反応, PI 陽性反応の混在像 (PI 陽性率 $40.5 \pm 6.2\%$) が観察された (図 3)。N, Z および F 群は CHG 群と比較して有意に PI 陽性率が高かったが ($p<0.05$), 三群間に有意差は認められなかった ($p>0.05$)。これらの結果から算出した生菌減少数 (log reduction $\pm$ SD) はそれぞれ 0.03 ± 0.02 (C 群), 2.70 ± 0.01 (N, Z, F 群) および 0.23 ± 0.03 (CHG 群) であった。

3. 洗口液 30 秒作用後および 5 分作用後のバイオフィーム中の *S.mutans* 生菌数

30 秒作用後の生菌数は、C 群と比較し全ての群において有意に生菌数が減少し ($p<0.05$), N, Z および F 群の生菌数は CHG 群よりも有意に少なかったが (p

図1 各洗口液作用時のバイオフィーム底面のリアルタイム観察像の一例。Bar = 50 μ m

図2 バイオフィームの厚みと T50 との関係

図3 洗口液 30 秒作用後のバイオフィーム底面の Live/Dead 染色像の一例。Bar = 50 μ m

表 2 各洗口液の *S. mutans* バイオフィーム内部の浸透速度 (図 2 より算出)

洗口液	浸透速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$)
N 群	27.9
Z 群	28.3
F 群	26.6
CHG 群	5.7

図 4 各種洗口液 30 秒作用後の生菌数 ($n=6$, $\log \text{CFU} \pm \text{SD}$)。

異なる符号間で有意差あり (Kruskal-Wallis および Dunnett test, Steel-Dwass test, $p<0.05$)。

<0.05), 5.7 $\log\text{CFU}$ 以上の細菌が増殖可能であり, 生菌の減少率は最大で 1/1000 ($3\log\text{CFU}$) であった (図 4)。三群間に有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。

5 分作用後の N, Z および F 群の生菌数は, 30 秒作用後より 1.5 $\log\text{CFU}$ 以上減少したが, 4 $\log\text{CFU}$ 程度の細菌が生存しており, すべてを殺菌することはできなかった (図 5)。CHG 群の生菌数は 30 秒作用後と同程度であり, 作用時間延長による殺菌効果は認められなかった。N, Z および F 群は CHG 群より有意に生菌数が減少したが ($p<0.05$), 三群間に有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。

考 察

殺菌成分を含む洗口液は, ブラッシングやフロッシングをはじめとする機械的プラークコントロールが行なわれた状態で補完的に作用させることにより, プラーク付着抑制効果および歯肉炎予防効果があると報告されている⁸⁻¹⁰⁾。洗口液に求められる要件として即

$\log\text{CFU}$

図 5 各種洗口液 5 分作用後の生菌数 ($n=6$, $\log \text{CFU} \pm \text{SD}$)。

異なる符号間で有意差あり (Kruskal-Wallis および Dunnett test, Steel-Dwass test, $p<0.05$)。

効性, 安全性, 良好な使用感, 安価であること, 歯周初期病変に有効であること, 器具が届きにくい部分のプラーク中の細菌を殺菌できること等が挙げられている⁵⁾。さらに洗口液の主要な意義が健全な歯周組織の維持であることから, 継続使用の可否も重要な要因となる¹⁶⁾。

リステリン®ナチュラルケアは, 従来型リステリン®と比較して有機化合物, 界面活性剤, 添加剤等の種類や配合量は変更されているが, 薬用成分およびその濃度は同じである。ノンアルコールタイプとなったことで, 口腔粘膜への刺激が軽減され使用感が向上するとともに, 適応の拡大が図られた可能性が推察される。さらに, 欧米で既に発売されているノンアルコールタイプ Listerine® ZeroTMと薬用成分, 濃度は同じであるが緑茶エキ스가配合されたことによって更なる殺菌効果も期待できる。本研究では, リステリン®ナチュラルケアと従来型リステリン®, Listerine® ZeroTMおよびグルコン酸クロルヘキシジン含有洗口液のバイオフィームに対する浸透・殺菌効果を比較する目的で, *in vitro* *S. mutans* バイオフィームを用いて CAM 染色タイムラプス解析, Live/Dead 染色法および生菌数測定により評価した。

CAM 染色法は, 抗菌成分のバイオフィーム深層部への到達を細菌の膜傷害を指標として評価するものである。すなわち, 抗菌成分により菌が膜傷害を受けると calcein の蛍光が流出する原理を応用し, 洗口液の浸透速度を T50 から換算する^{22,23)}。その結果, バイオフィーム内部への浸透速度は N, Z および F 群で同等であり, CHG 群と比較して約 5 倍速くバイオフィ

ルム内部に浸透した(図2, 表2)。このことから、リステリン®ナチュラルケアの *in vitro* *S. mutans* バイオフィーム内部への浸透および膜傷害効果は従来型リステリン®と同等でありアルコールに依存しないことが示唆された。リステリン®ナチュラルケアは溶剤としてアルコールを使わない代わりに薬用成分を溶かすために添加剤を追加している(表1)。そのため、これら添加剤がアルコールと同等の薬物輸送効果をもたらしている可能性も考えられるが、リステリン®ナチュラルケアと従来型リステリン®を製品として比較した場合には、同等の効果が期待できると思われる。また今回、Listerine® Zero™と比較して有意な差は認められなかった。緑茶エキスの組成および濃度はメーカーから公表されておらず詳細は不明であるが、*S. mutans* ATCC 25175 株に対するカテキンの MIC として報告されている $1.9 \text{ g/l}^{18)}$ より低い濃度が配合されている可能性が考えられる。

Live/Dead 染色法は蛍光プローブを用いた細菌の生死判別法として頻用される染色法である。今回 30 秒作用後のバイオフィーム底面の殺菌効果を観察したところ、N 群、Z 群および F 群はすべての視野においてほとんどすべての細菌が PI 陽性であった(図3)。CHG 群は、SYTO9, PI 陽性細菌の混在像であったことから、リステリン®はアルコールの有無に関係なくグルコン酸クロロヘキシジン含有洗口液と比較して短時間でバイオフィーム深層部の細菌に膜傷害効果を与えうることが示唆された。

さらに、30 秒および 5 分作用後の生菌数測定においても、N, Z および F 群の生菌数は CHG 群よりも有意に少なく、三群間に有意差は認められなかった(図4)。この結果からもアルコール配合による殺菌成分のバイオフィーム内部への浸透促進効果は認められなかった。今回用いた三種類の殺菌効果判定のいずれにおいても N, Z および F 群間に有意な差が無かったことから、*S. mutans* バイオフィームへのリステリン®ナチュラルケアの浸透・殺菌効果は従来品と同等であることが明らかとなった。

一方で、CHG 群と比較して浸透・殺菌効果が高かった N, Z および F 群においても 30 秒の作用では 5.5 logCFU 以上の *S. mutans* が生育可能であった。このことは、洗口液の単回使用では厚みを持ったバイオフィーム中の細菌を死滅できないことを示唆している。さらに、すべての洗口液において、5 分作用後も 4 logCFU 以上の細菌が生存していた。このことは、厚みを持ったバイオフィームに対して洗口液の作用時間の延長あるいは複数回使用してもバイオフィーム深層部の細菌には効果が及びにくいことを示唆している。

さらに近年、バイオフィームに洗口液を作用させてもバイオフィーム構造物が付着界面に残存することが報告されている²⁴⁻²⁶⁾。殺菌されてもお付着界面に残存したバイオフィーム構造は新たなバイオフィーム形成の足がかりや歯石形成の源ともなりうると考えられる。これらのことから、洗口液によるセルフケアは蓄積したバイオフィームの上から使用しても効果は薄く、プロフェッショナルケアにより歯面のバイオフィームを除去した直後から継続して使用することでプラーク付着抑制および歯肉炎予防効果が享受できると考えられる。プロフェッショナルケア直後から形成される薄い幼弱なバイオフィーム層に対しては洗口液が浸透しやすいことから、日常のブラッシングを基本としてバイオフィームへの浸透性に優れる洗口液を用いることで効果的なセルフケアが遂行できると考えられる。

CHG 群が N 群および F 群と比較して、有意に浸透・殺菌効果が減弱した要因としては物質の電荷が考えられる。CHG は陽イオン性化合物であり、陰イオン性を示す細菌表層に吸着し細胞膜に傷害を与えるとともに歯の表面、粘膜、舌、ペリクルや唾液に吸着し口腔内への貯留性に優れ殺菌効果が持続する²⁷⁾一方で、デンタルプラークの表層に留まりやすく、深層部への浸透が遅延すると考えられる。バイオフィームへの溶質の浸透に影響を与える因子として、その分子量^{28,29)}、電荷^{30,31)}および親水性/疎水性のバランス³²⁾などが報告されている。CHG の分子量は 897.76, リステリン®の有効成分である 1,8-シネオール、 ℓ -メントール、サリチル酸メチルおよびチモールはそれぞれ 154.25, 156.27, 152.15 および 150.22 であることから、リステリン®が CHG と比較して *S. mutans* バイオフィーム内部への浸透に有利である要因のひとつとして分子量が考えられる。さらに、中性化合物であるチモールの異性体であるイソプロピルメチルフェノールを有効成分とする洗口液の *S. mutans* 人工バイオフィームに対する浸透速度は 0.12%グルコン酸クロロヘキシジン洗口液と比較して 1.18 倍速かったと報告²⁶⁾されており、チモールは CHG と比較して *S. mutans* バイオフィームへの浸透性が高い性質を有すると考えられるが、今回の実験から得られた N 群の浸透速度は CHG 群の 4.89 倍速かったことからリステリン®のバイオフィーム内部への高い浸透率はその他の薬用成分や添加剤による相乗効果によるものと推察される。口腔バイオフィームは種々の糖タンパク、脂質および核酸で構成されており、不溶性グルカンを主体としないマトリックス内部への浸透性の評価には更なる検証が必要である。

今回、洗口液の浸透性の評価として *S. mutans* 単一人工バイオフィルムを使用した。その理由は今回洗口液の評価として浸透性に着目したためであり、不溶性グルカンを主体としたバイオフィルムを形成し溶質の浸透を減弱する²⁹⁾人工モデルを使用することで浸透性能を単純比較でき複合バイオフィルムより影響を受ける因子が少なく再現性が高い。歯周病原細菌に対するリステリン®の殺菌効果の評価としていくつか報告がある。たとえば、Sliepen らは、Modified Robbin Device を用いた *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 人工バイオフィルムに対して Listerine® を 30 秒間作用させたところ生菌数は 1.2-1.77 logCFU 減少し迅速な殺菌効果を示したが、総細菌数に変化は認められず剥離効果はなかったと報告している²⁴⁾。Fine らは、軽度歯肉炎患者に通常のブラッシングに加えて Listerine® による 1 日 2 回 2 週間の洗口を追加したランダム化二重盲検クロスオーバー試験において、歯肉縁上プラーク中の *Veillonella*, *Capnocytophaga* および *Fusobacterium nucleatum* がそれぞれ 52.3, 74.1 および 81.5% 減少し、縁下プラーク中の同菌種もそれぞれ 54.1, 63.5 および 68.3% 減少したと報告している³³⁾。ただし、著者らは Listerine® による洗口による殺菌効果が歯肉縁下プラークに及んだのではなく、歯肉縁上プラークに及んだ殺菌効果が結果として歯肉縁下プラークにも影響を与え、相対的に細菌数が減少したと考察している。Cosyn らは、50 名の SPT 中の患者を対象に日常のブラッシングに加えて 1 日 2 回の Listerine® による洗口を 3 ヶ月間追加したところ、歯肉炎指数 (GI)、プラーク指数 (PI) および歯肉出血指数 (BI) はベースラインと比較して有意に改善したが、プラセボ群と比較して有意な差は認められなかったと報告している³⁴⁾。さらに、歯肉縁下プラークの *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Micromonas micros*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium genus* および *S. mutans* 数も有意な減少は認められなかったと報告している。このことから、プラークコントロールが良好な患者に対しては洗口液の使用は必ずしも必須ではないと思われる。また、ADA が洗口液の承認のために必要な製品の有効性と安全性を示すための根拠として、歯肉縁上プラーク抑制と歯肉炎予防効果についての 6 ヶ月以上の比較臨床試験を課していること³⁵⁾からも、洗口液は歯肉縁上プラークのコントロールのためのセルフケアツールあるといえる。

本研究では、各種洗口液のバイオフィルム内部への浸透・殺菌効果の比較に三種の評価法を用いたが、それぞれから得られた結果は一致していたものの各評価

法による生菌率にばらつきが認められた。CAM 染色法による N, Z および F 群の 30 秒作用後の *S. mutans* バイオフィルム底面の平均蛍光量の減少量 (log reduction) は 0.21-0.22 logCFU であった。一方、Live/Dead 染色法では 30 秒作用後に観察視野全面が PI 陽性 (99.8%) となり生菌減少数 (log reduction) は 2.7 logCFU であった。また、寒天平板希釈法による生菌数測定では生菌減少数 (log reduction) は 2.8-3.1 logCFU であったものの 5.7 logCFU 以上の細菌が生存していた。CAM 染色法および Live/Dead 染色法はともに膜の傷害性を指標とした蛍光プローブであるが、前者は膜傷害後の蛍光流出を、後者は膜傷害後の PI 浸透による蛍光共鳴エネルギー移動を機序としている^{36,37)}。このため膜傷害の程度によって蛍光流出の程度および蛍光プローブの浸透に差が生じると考えられる。Vitkov らは、バイオフィルムが付着した歯肉上皮細胞を口腔内から採取し 0.1% グルコン酸クロルヘキシジンを 1 分もしくは 5 分作用させたのち、走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) にて細菌構造を観察したところ、1 分作用群は SEM 観察において形態変化は認められず TEM 観察においてもいくつかの細菌の細胞質に液泡様構造体が観察されたものの多くは形態学的変化を認めなかったと報告している。また、5 分作用後の TEM 観察でも細胞質内部の空胞形成や細胞膜の不可逆的損傷が見られる細菌と形態学的変化がみられない細菌が混在しており、口腔バイオフィルムへのグルコン酸クロルヘキシジンの効果は十分ではなかったと報告している³⁸⁾。

Live/Dead 染色法に代表される膜の完全性を指標とする細菌生死判別法はしばしば疑陽性と判定されることが報告されている^{39,40)}。膜傷害を受けても生存しており再度増殖可能な状態にある場合や培養環境に応じて生菌に PI が浸透することがあり、PI 陽性であっても死菌ではない可能性が示唆されている。一方、寒天平板希釈法を用いた生菌数計測も VNC 状態 (viable but non-culturable) の細菌が検出できないことのほか、膜完全性および呼吸活性を指標とする蛍光プローブを用いた生死判定との生菌率の差異が報告されており⁴¹⁾、殺菌効果の判定には数種類の判別法を併用する必要がある。

リステリン® ナチュラルケアは発売後間もないため、その臨床的効果についての報告は少ない。しかし、同一薬用成分が同一濃度で配合されたノンアルコールタイプ洗口液である Listerine Zero™ が北米で発売されており、その予防効果が報告されている。すなわち、機械的清掃を中止した状態で 1 日 2 回、2 週間洗口して効果を評価したランダム化単盲検平行群間比較臨床

試験において、Listerine® Zero™使用群はコントロール群（5%アルコール水）と比較してプラーク指数（PI）、歯肉炎指数（GI）および歯肉出血指数（BI）がそれぞれ 10.4, 23.9, 53.8%低下したと報告されている⁴²⁾。また、18 歳以上の男女 337 名を対象に、日常のブラッシングとフロッシングに加えて 5%アルコール水（コントロール）、0.05%塩化セチルピリジニウム（CPC）もしくは Listerine® Zero™による 1 日 2 回の洗口液を 6 ヶ月間行った後の PI および Modified gingival index (MGI) を測定した研究では、Listerine® Zero™群の PI はコントロール群と比較して 31.6%、CPC 群と比較して 26.9%低下し、MGI はコントロール群と比較して 24%、CPC 群と比較して 20.5%低下し、Listerine® Zero™群がもっとも抑制効果が高かったと報告されている⁴³⁾。これらの報告は、従来型リステリン®を比較対象としたものではないが、後者の報告⁴³⁾におけるプラーク付着抑制率および歯肉炎抑制率は、従来型リステリン®のこれまでの 6 ヶ月間の比較臨床試験の結果⁴⁴⁾と近似した数値となっている。

今回のリステリン®ナチュラルケアと従来型リステリン®との比較においては、*in vitro* バイオフィルムへの浸透動態および殺菌効果にアルコールが影響を及ぼすとの所見は得られなかった。一方、アルコールの殺菌効果への影響については一定の結論が得られていない。たとえば、平均年齢 35 歳の男女 97 名を対象にアルコール含有（11%エタノール）／非含有の 0.12% CHG 含有洗口液を用いた二重盲検並行群間比較臨床試験では、1 日 1 回の洗口を 28 日間行い PI および BI を調査したところ、両群間に有意差はなかったとの結果が示されている⁴⁵⁾。また、アルコール含有（5.7%エタノール）／非含有の 0.05%塩化セチルピリジニウム洗口液を用いた研究においては、う蝕・歯周病原菌 25 菌種に対する最小発育阻止濃度（MIC）は両群とも 0.05%フッ化ナトリウム洗口液と比較して低く、優れた発育阻止効果を有することが示されている。さらに、15 名のボランティアの第一大臼歯の歯面から歯肉縁上プラークを採取し、1%の洗口液を含む培地で 5-7 日間嫌気培養したところ、両群ともコントロール群（洗口液なし）と比較して 90%以上生菌数が減少し、殺菌効果に有意な差は認められなかったと報告されている⁴⁶⁾。一方、21 名のボランティアを対象にアルコール含有（7%エタノール）／非含有の 0.2%CHG 含有洗口液を用いたランダム化クロスオーバー臨床試験では、すべての機械的清掃を中止し 1 日 2 回 1 分間の洗口を 4 日間実施したところ、アルコール含有群の PI および歯肉縁上プラーク中の生菌率はコントロール群（14%エタノール水）と比較してそれぞれ 73%および

78%減少し、アルコール非含有群（それぞれ 37%、26%）より有意に高いプラーク付着抑制効果ならびに殺菌効果を示している⁴⁷⁾。また、アルコール含有（5%エタノール）／非含有の 0.12%CHG 含有洗口液の各種口腔内細菌への作用を調べた研究では、1 分間の接触ではアルコール非含有群の *Streptococcus mitis*, *Lactobacillus casei*, *Peptostreptococcus micros* の抑制率は低く、*Streptococcus mutans*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii* が耐性を示すこと、および洗口液使用 3 時間経過後の唾液中の生菌数がアルコール群と比較して有意に高かったことが報告されている⁴⁸⁾。

殺菌成分を含む洗口液は、プラーク付着抑制および歯肉炎予防によるセルフケアの補完的役割を担うだけでなく、エチケット効果や舌、粘膜への殺菌効果とともに、その用法から高齢者、要介護者にも推奨・導入しやすい。セルフケアへの洗口液の導入には、歯科医師・歯科衛生士による患者の口腔内環境に合った継続可能な適切な洗口液の推奨が有効であるが、洗口液の味や刺激の強さから洗口時間の短縮や使用中止につながる懸念がある。これまで、リステリン®は他の洗口液と比較して高濃度のエタノールが含まれているため粘膜への刺激が強いことが欠点であった。加えて粘膜に炎症がある場合や口腔乾燥を訴える患者には使用を控えるなど、アルコールの為害作用のリスクを勘案する必要があった。また、リステリン®で注意すべきは誤飲時のリスクであり、海外では使用上の注意に「12 歳以下の使用を控える」と但し書きがある。5 歳の子供のエタノールの有毒量および致死量の 50 パーセントはそれぞれ 6.80 ml および 72.57 ml といわれ⁴⁹⁾、これはメーカー指示の 1 回の洗口量に含まれるエタノール量（4.32 ml）を上回っているが、誤って手に取り飲む恐れもあるため家庭での保管には注意が必要である。国内では洗口液の使用年齢に制限はなく、使用上の注意にも特別な記載はされていない。混合歯列期は殺菌効果よりも歯質強化が優先されると考えられるため、国内においても 12 歳以下の使用は控えたほうがよいと思われる。

ノンアルコールタイプとなったリステリン®ナチュラルケアは、従来型リステリン®と同等の殺菌効果を期待しながら低刺激となったことで、これまで使用を敬遠していた人やアルコール含有を理由に使用を控えていた人にも再度の推奨がしやすいと思われる。味や使用感は患者ごとに違うため継続使用可能か見極めながら、プロフェッショナルケア直後からの使用し続けてもらうことで洗口液の本来の予防効果を最大限に享受できると思われる。

本論文の要旨は第 56 回日本歯周病学会秋季学術大会 (2013 年 9 月 22 日) において発表した。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 (C) (課題番号 23592795 および 26462876) の補助を受けて行われた。

文 献

- 1) Charles CH, Sharma NC, Galustians HJ, Qaqish J, McGuire JA, Vincent JW : Comparative efficacy of an antiseptic mouthrinse and an antiplaque/antigingivitis dentifrice. A six-month clinical trial. J Am Dent Assoc, 132 : 670-675, 2001.
- 2) 村上伸也 : 歯周病 : 疾患概要と洗口剤による予防に関する最近の知見. Prog Med, 26 : 2505-2512, 2006.
- 3) Gunsolley JC : A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. J Am Dent Assoc, 137 : 1649-1657, 2006.
- 4) Biesbrock AR, Bartizek RD, Gerlach RW, Terézhalmy GT : Oral hygiene regimens, plaque control, and gingival health : a two-month clinical trial with antimicrobial agents. J Clin Dent, 18 : 101-105, 2007.
- 5) Santos A : Evidence-based control of plaque and gingivitis. J Clin Periodontol, 30 (Suppl. 5) : 13-16, 2003.
- 6) Minah GE, DePaola LG, Overholser CD, Meiller TF, Niehaus C, Lamm RA, Ross NM, Dills SS : Effects of 6 months use of an antiseptic mouthrinse on supragingival dental plaque microflora. J Clin Periodontol, 16 : 347-352, 1989.
- 7) Ross NM, Charles CH, Dills SS : Long-term effects of Listerine antiseptic on dental plaque and gingivitis. J Clin Dent, 1 : 92-95, 1989.
- 8) Stoeken JE, Paraskevas S, van der Weijden GA : The long-term effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis : a systematic review. J Periodontol, 78 : 1218-1228, 2007.
- 9) Michael LB : The rationale for daily use of an antimicrobial mouthrinse. J Am Dent Assoc, 137 : 16-21, 2006.
- 10) Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM : Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse : 6-month clinical trial. J Clin Periodontol, 31 : 878-884, 2004.
- 11) Shulman JD, Wells LM : Acute ethanol toxicity from ingesting mouthwash in children younger than 6-years of age. Pediatr Dent, 19 : 404-408, 1997.
- 12) FDI Commission : mouthrinses and dental caries. Int Dent J, 52 : 337-345, 2002.
- 13) Vlachoianis C, Winsauer H, Chrubasik S : Effectiveness and safety of a mouthwash containing essential oil ingredients. Phytother Res, 2012. DOI : 10.1002/ptr.4762.
- 14) Overholser CD Jr : Longitudinal clinical studies with antimicrobial mouthrinses. J Clin Periodontol, 15 : 517-519, 1988.
- 15) Bolanowski SJ, Gescheider GA, Sutton SV : Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses. J Periodontal Res, 30 : 192-197, 1995.
- 16) 小島千奈美, 竹中彰治, 大墨竜也, 興地隆史 : セルフケアにおける洗口液普及を目指したアンケート調査. 日歯周誌, 55 : 148-155, 2013.
- 17) Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T : Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. Agric Biol Chem 53 : 2307-2311, 1989.
- 18) 日下部修介, 田村大輔, 小竹宏朋, 作誠太郎, 本間文将, 村松泰徳, 堀田正人 : カテキン粉末緑茶の口腔内細菌に及ぼす影響. 日歯保存誌, 56 : 353-359, 2013.
- 19) Hirasawa M, Takada K, Otake S : Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. Caries Res, 40 : 265-270, 2006.
- 20) Awadalla HI, Ragab MH, Bassuoni MW, Fayed MT, Abbas MO : A pilot study of the role of green tea use on oral health. Int J Dent Hygiene, 9 : 110-116, 2011.
- 21) Sakanaka S, Aizawa M, Kim M, Yamamoto T : Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. Biosci Biotech Biochem, 60 : 745-749, 1996.
- 22) 竹中彰治, 大墨竜也, 若松里佳, 寺尾 豊, 大島勇人, 興地隆史 : アルコールフリー洗口液 Listerine Zero の *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する浸透・殺菌効果. 日歯保存誌, 56 : 105-112, 2013.
- 23) Takenaka S, Trivedi HM, Corbin A, Pitts B, Stewart PS : Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms. Appl Environ Microbiol, 74 : 1869-1875, 2008.
- 24) Sliepen I, Essche MV, Quirynen M, Teughels W : Effect of mouthrinses on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms in a hydrodynamic model. Clin Oral Investig, 14 : 241-250, 2010.
- 25) Yamaguchi M, Noiri Y, Kuboniwa M, Yamamoto R, Asahi Y, Maezono H, Hayashi M, Ebisu S : *Porphyromonas gingivalis* biofilms persist after chlorhexidine treatment. Eur J Oral Sci, 121 :

- 162-168, 2013.
- 26) Wakamatsu R, Takenaka S, Ohsumi T, Terao Y, Ohshima H, Okiji T : Penetration kinetics of four mouthrinses into *Streptococcus mutans* biofilms analyzed by direct time-lapse visualization. Clin Oral Investig, 18 : 625-634, 2014.
- 27) Jones CG : Chlorhexidine : is it still the gold standard? Periodontology 2000, 15 : 55-62, 1997.
- 28) Thurnheer T, Gmur R, Shapiro S, Guggenheim B : Mass transport of macromolecules within an in vitro model supragingival plaque. Appl Environ Microbiol, 69 : 1702-1709, 2003.
- 29) Zhang Z, Nadezhina E, Wilkinson KJ : Quantifying diffusion in a biofilm of *Streptococcus mutans*. Antimicrob Agents Chemother, 55:1075-1081, 2011.
- 30) Marcotte L, Therien-Aubin H, Sandt C, Barbeau J, Lafleur M : Solute size effects on the diffusion in biofilms of *Streptococcus mutans*. Biofouling, 20 : 189-201, 2004.
- 31) Peulen TO, Wilkinson KJ : Diffusion of nanoparticles in a biofilm. Environ Sci Technol, 45 : 3367-3373, 2011.
- 32) Robinson C : Mass transfer of therapeutics through natural human plaque biofilms : a model for therapeutic delivery to pathological bacterial biofilms. Arch Oral Biology, 56 : 829-836, 2011.
- 33) Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Goldsmith D, Charles CH, Lisante TA, Lynch MC : Effect of an essential oil-containing antimicrobial mouthrinse on specific plaque bacteria in vivo. J Clin Periodontol, 34 : 652-657, 2007.
- 34) Cosyn J, Prince K, Miremadi R, Decat E, Vaneechoutte M, Bruyn HD : A double-blinded randomized placebo-controlled study on the clinical and microbial effects of an essential oil mouth rinse used by patients in supportive periodontal care. Int J Dent hygiene, 11 : 53-61, 2013.
- 35) American Dental Association : Council on dental therapeutics : Guidelines for acceptance of chemotherapeutics products for the control of supragingival dental plaque and gingivitis. JADA 112 : 529-532, 1986.
- 36) Stocks SM : Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. Cytometry A, 61 : 189-195, 2004.
- 37) Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T : Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. Appl Environ Microbiol 73 : 3283-3290, 2007.
- 38) Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Hrrmann M, Fuchs K, Klappacher M, Hannig M : Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. Microsc Res Tech, 68 : 85-89, 2005.
- 39) Biggerstaff JP, Le Puil M, Weidow BL, Prater J, Glass K, Radosevich M, White DC : New methodology for viability testing in environmental samples. Mol Cell Probes, 20 : 141-146, 2006.
- 40) Davey HM, Hexley P : Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. Environ Microbiol, 13 : 163-171, 2011.
- 41) Kim J, Pitts B, Stewart PS, Camper A, Yoon J : Comparison of the antimicrobial effects of chloride, silver ion, and tobramycin on biofilm. Antimicrob Agents Chemother, 52 : 1446-1453, 2008.
- 42) Charles CA, Amini P, Gallob J, Shang H, McGuire JA, Costa R : Antiplatelet and antigingivitis efficacy of an alcohol-free essential-oil containing mouthrinse : a 2-week clinical trial. Am J Dent, 25:195-198, 2012.
- 43) Cortelli SC, Cortelli JR, Shang H, McGuire JA, Charles CA : Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse : a 6-month randomized clinical trial. Am J Dent, 26 : 149-155, 2013.
- 44) Barnett ML : The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. J Am Dent Assoc, 137 : 16S-21S, 2006.
- 45) Leyes Borrajo JL, Garcia VL, Lopez CG, Rodriguez-Nuñez I, Garcia FM, Gallas TM : Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol : a clinical study. J Periodontol, 73 : 317-321, 2002.
- 46) Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ : Antimicrobial efficacy of 0.05 % cetylpyridinium chloride mouthrinses. Lett Appl Microbiol, 56 : 14-20, 2013.
- 47) Arweiler NB, Boehnke N, Sculean A, Hellwig E, Ausschil TM : Differences in efficacy of two commercial 0.2% chlorhexidine mouthrinse solutions : a 4-day plaque re-growth study. J Clin Periodontol, 33 : 334-339, 2006.
- 48) Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M : Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12 % chlorhexidine mouthrinse formulations : an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. J Clin Periodontol, 30 : 307-314, 2003.
- 49) Massey CC, Shulman JD : Acute ethanol toxicity from ingesting mouthwash in children younger than age 6, 1989-2003. Pediatr Dent, 28 : 405-409, 2006.