クロルヘキシジンによるプラック抑制効果の電子顕微鏡学的研究

——第1報——

平澤賢治郎* 山口英芳** 松江一郎*

* 日本大学松戸歯学部保存歯周病学教室

(指導: 松江一郎教授)

** エスエス製薬(株) 中央研究所

(所長: 小高愛親)

(昭和54年12月20日受付)

The electron Microscopical study on the effect of Mouth
Rinses of Chlorhexidine on the Development
of Dental Plaque in Man.

*Kenjiro HIRASAWA **Hideyoshi YAMAGUCHI

*Ichiro MATSUE

*Department of Periodontology Nihon University School
of Dentistry at Matsudo

(Director: Professor Ichiro MATSUE)

**Central Research Laboratories, S. S. Co., Ltd., Tokyo

(Director: Yoshichika ODAKA)

This study has been done to investigate the effect of mouth rinses of chlorhexidine on the development of dental plaque in man.

Twenty patients participated in this study (from nineteen years old to twenty-six years old. Ten male and ten female). On the lingual surfaces of mandibular anterior teeth, triacetylcellulose film was tight with 4-0 silk suture.

On the experimental group, L-S solution of chlorhexidinedigluconate and Lactic Aluminium was used, and take off after 2 hours, 4 hours and 24 hours.

In control group, placebo solution was used, and take off after 2 hours, 4 hours and 24 hours. Linguo-cervical films divided into two parts (one part for the use of SEM materials and the other part for the use of TEM materials).

In a scanning electron microscopic study, the mouth rinses of chlorhexidine resulted in a relative decreased in dental plaque formation compared to the control (placebo) rinses.

I. 緒 言

歯周疾患の初期病変, すなわち, 歯肉の炎症の病因であるプラックを抑制することは, 歯周疾患の治療上重要である。またプラックの抑制効果について多くの研究が報告されている^{1,2,3)}が, 臨床的效果とその評価について

電顕的に明らかにした研究は少ない。

今回, 我々はプラックの形成抑制に有効であると報告されている^{10,11,12)}クロルヘキシジン・ジ・グルコネートを主剤とし, 乳酸アルミニウムを配合した LS. マウスウォッシュ (以下 LS と略) について Placebo (以下 PL と略) を対照にして比較検討を行なった。そして, クロルヘキシジンの口腔内でのプラックの吸着抑制効果を解

図 1

明するために、主に走査電顕さらに透過電顕を用いて検索を加えた。

II. 実験材料および方法

1. 対 象

日本大学松戸歯学部男子学生 10 人，上記大学附属歯科衛生専門学校生 10 人（19 歳～26 歳）。

2. 使用薬剤

① LS 液剤：100 g 中

- クロルヘキシジン・ジ・グルコネート 20% 溶液 0.5 g
- 乳酸アルミニウム 1.0 g
- 香料

② PL 液剤：100 g 中

- 香料

③ 方 法

上記，各研究対象者の下顎前歯部舌側の 60 部位に，図 1 のようにトリアセチルセルロース・フィルムを粗造な面を外側にして NM-3 (A) の目無針につけた 4—0 の絹糸で結紮した。

実験群：LS 液を水 100 ml に 3～5 滴，滴下した含嗽液にて，嗽いを行なわせ，そして 2 時間，4 時間，24 時間後に試料を採取した。

対照群：PL 液を水 100 ml に 3～5 滴，滴下した含嗽液にて上記実験群と同様に行なった。舌側歯頸部 1/3 のフィルム片を，図 1 に示すように，走査電顕 (SEM) 用

試料と透過電顕 (TEM) 用試料に分割した。

SEM 用試料：5% グルタルアルデヒド固定液 (pH 7.4 リン酸緩衝溶液) にて，4℃ 2 時間の後固定を行なった後 2% オスミウム酸 (pH 7.4 リン酸緩衝溶液) にて 4℃ 2 時間の後固定を行ない通常に従いアルコール列で脱水を行なった。臨界点乾燥装置 (HCP-1 型) にて乾燥を行ないイオンスパッタコーティングで金蒸着を行ない，日立走査電顕 (MSM 4 型) にて観察した。

TEM 用試料：上記 SEM 用試料と同様に固定，脱水を行なった後，EPON 812 にて包埋した。超薄切片は，酢酸ウラン-鉛の二重染色をして日立透過電顕 (HS-9 型) にて観察した。

III. 結 果

図 2 は，歯面に付着前のトリアセチルセルロースフィルムの滑沢な面と粗造な面の電顕像である。

図 3，4，5，6 は，実験群と対照群の SEM 観察結果である。

われわれは，この走査電顕での観察所見を次の基準で判定した。

- (一) は全く細菌が認められないもの。
- (±) は細菌の有無の判定困難なもの。
- (+) は細菌集落がわずかに認められるもの。
- (++) は細菌集落が画面の半分近く認められるもの。
- (+++) は細菌集落が画面全体に広がっているもの。

図 3 は，対照群 No. 8 女性の滑沢な面と粗造な面の SEM 観察結果である。滑沢な面では，2 時間後は (一)，4 時間後も (一)，24 時間後は (++) であり，粗造な面では，2 時間後は (+)，4 時間後は (++)，24 時間後は (+++) であった。

図 4 は，実験群，すなわち，クロルヘキシジン含有溶液で含嗽を行なった No 8 の女性の滑沢な面と粗造な面を SEM で観察した所見である。

滑沢な面では，2 時間後は (一)，4 時間後も (一)，24 時間後も (一) であった。粗造な面では，2 時間後は (±)，4 時間後も (±)，24 時間後は (+) であった。

対照群と比較して，実験群の LS 液で含嗽を行なった方が，細菌の付着の抑制効果があると言える。特に 24 時間後の粗造面においては，著しい差が認められた。

図 5 は，ケース No. 19 の男子学生の場合の前記と同様な SEM の観察結果である。ケース No. 8 女子と同様に，LS 液で含嗽したケースの場合にも細菌の付着抑制効果が認められた。また，No. 19 と No. 8 と比較す

図 2 The S.E.M. Appearance of triacetylcellulose film surface

ると細菌の付着性には個体差があるように思われる。

表 1, 2 は, 各ケース 1 から 20 の PL 液, および LS 液での観察結果をまとめたものである。この表からも, 実験群, すなわち, 細菌の付着抑制効果が SEM 観察所見において認められた。

考 察

プラックの形成機序に関して多くの研究があるが^{4,5,6,7,8,9)}, 一般にエナメル質表面に唾液中の糖蛋白質が吸着してできる獲得薄膜 (acquired pellicle) に, あるいは直接エナメル質面に, ある種の細菌が付着し, 歯牙表面で集落を形成する。集落は互いに癒合して菌体の層を形成する。この層は, さらに唾液成分や食物残渣などが蓄積し, それ自身では歯牙への付着性を示さないような細菌もとりに込まれて増殖し, かくしてプラックがで

き上り増大していくと考えられている。

Harold Löe 等によれば, プラックの付着量に比例して, 歯肉の炎症の程度は増加すると報告している¹³⁾。また, このプラック中の細菌は, 多くの酵素を産生し, この酵素が組織破壊をおこしたり, 感染や有害物質の伝播因子として作用する。また, これらは, 歯肉に局所的な免疫反応をおこす抗原として作用し, それにより即時型あるいは遅延型アレルギー反応をおこすと言われている^{14,15)}。このように, 細菌の存在は, 炎症性歯周疾患の発生に欠くことのできない因子であり, 細菌の付着を抑制することは, 歯周組織の健康を維持する上で重要である。これまでにプラックの付着抑制に関する多くの研究^{1,2,3)}が報告されているが, その中で抗菌剤による効果に関しては, Löe, Shiot¹¹⁾等は, クロルヘキシジンが口腔細菌を減少し, 歯牙表面での細菌の集落ないしプラック形成を抑制して歯肉炎を減少すると報告している¹⁵⁾。

図 3 Placebo case No 8 (Female)

図 4 Chlorhexidine Digluconate Case No 8 (Female)

图 5 Placebo case No 19 (Male)

图 6 Chlorhexidine Digluconate case No 19 (Male)

表 1 Placebo Group

case No	age	sex	smooth surface			rough surface		
			2 hr.	4 hr.	24 hr.	2 hr.	4 hr.	24 hr.
1	20	female	—	±	≡	+	+	≡
2	19	"	—	—	≡	±	+	≡
3	20	"	—	+	≡	+	+	≡
4	20	"	—	—	+	—	≡	≡
5	19	"	—	—	—	—	±	≡
6	19	"	—	—	+	±	+	≡
7	19	"	—	±	≡	+	≡	≡
8	19	"	—	—	≡	+	≡	≡
9	20	"	—	—	≡	±	≡	≡
10	20	"	—	—	±	±	+	≡
11	23	male	—	—	+	+	+	≡
12	23	"	—	+	≡	±	≡	≡
13	23	"	—	±	≡	±	≡	≡
14	22	"	—	±	≡	±	+	≡
15	24	"	—	—	≡	—	+	≡
16	26	"	—	+	≡	+	≡	≡
17	22	"	—	—	+	—	≡	≡
18	24	"	+	≡	≡	+	≡	≡
19	24	"	+	≡	≡	+	≡	≡
20	24	"	±	+	≡	+	+	≡

表 2 Chlorhexidine Digluconate

	age	sex	smooth surface			rough surface		
			2 hr.	4 hr.	24 hr.	2 hr.	4 hr.	24 hr.
1	20	female	—	—	—	—	±	±
2	19	"	—	±	±	—	±	+
3	20	"	—	—	—	—	±	+
4	20	"	—	—	±	±	±	+
5	19	"	—	—	—	—	+	+
6	19	"	—	—	—	—	±	+
7	19	"	—	—	—	—	—	±
8	19	"	—	—	—	±	±	+
9	20	"	—	—	—	±	±	+
10	20	"	—	—	—	—	±	±
11	23	male	—	—	—	—	—	±
12	23	"	—	—	—	—	—	+
13	23	"	—	—	—	±	±	+
14	22	"	—	—	—	—	—	—
15	24	"	—	—	—	—	—	—
16	26	"	—	—	—	—	—	+
17	22	"	—	—	—	—	—	±
18	24	"	—	—	—	—	—	±
19	24	"	—	—	—	—	±	±
20	24	"	—	—	—	—	±	±

図 7 Chlorhexidine digluconate case (24hr, female)

本研究において、我々はクロルヘキシジン・ジ・グルコネートに乳酸アルミニウムを配合した含嗽液でのプラックの抑制効果を形態学的方法を用いて明らかにするべく走査電顕の所見を検討した結果、LS で含嗽を行なった場合、トリアセチルセルロースフィルム片への細菌の付着抑制効果が証明された。これに対して、PL で含嗽を行なった場合、細菌性プラックの沈着が観察され、Jensen, S.B. Løe, H. 等の報告と同様に沈着した細菌は、球菌が殆んどであった (図 3~8a, b)。また、P. Berthold 等の同様な実験によれば、細菌の集落化が始まるのは、6 時間から 12 時間であり、24 時間後では、細菌集落は癒合し、部分的にペリクルがわずかに見られる程度であったと報告されている¹⁶⁾が、我々の実験では対照群においては、2 時間で細菌の沈着は殆んど認められず、4 時間でかなり認められるようになり、個体差も大きい、24 時間では、観察視野を被うようになり、個体差は、殆んど認められず同一の形状を示した。また、実験群では、これに対して 24 時間でも細菌の沈着はわずかに認められる程度であった。さらに我々は、透過電顕での研究を行なっているが、その観察所見 (図 7, 8-a, b) のように、このトリアセチルセルロースの粗造面は歯根面と同じで、まず獲得薄膜が形成され、その上に細菌の沈着が認められた。また、粗造面と滑沢面への細菌の付着性の相違は、フィルム面の形状¹⁷⁾というよりも粗造面を歯面の外側に、滑沢な面を内側にしていることによると考えられる。このように、クロルヘキシジンの効果は、滑沢な面まで達していることが認められた。

走査電顕観察所見の場合、あくまでも表面からの観察による検索であるので、トリアセチルセルロースの膜上に形成されるプラックの沈着量 (ペリクルの厚さ、その上に形成されるであろう細菌層の厚さ、さらに細菌数) について透過電顕を用いて検索を加えている。

図 8-a Placebo case (24 hr, female)

Magnification

×34000

図 8-b Placebo case (24 hr, female)

結 論

1. クロルヘキシジン・ジ・グルコネート複合、含嗽溶液のプラックの形成抑制効果について、口腔内に装着したトリアセチルセルロースフィルム上に形成された細菌性プラックの状態を電顕的に評価した結果、対照のプラシボに比較して効果ありと言える。

2. このトリアセチルセルロースフィルムは歯根面に形成される歯垢についての研究、とくに走査電顕、透過電顕的研究には有用である。

文 献

- 1) Goldman, H.M.: The effect of single and multiple tooth brushing in the cleansing of the normal and periodontally involved dentition; Oral Surg., 9: 203, 1956.
- 2) Lindhe, J. and Wecen, P.: The effects on the gingivae of chewing fibrous foods; J. Periodont. Res., 4: 193, 1969.

- 3) Lang, N.P. Cumming, B.R. and Le H. : Tooth brushing frequency as it relates to plaque development and gingival health ; J. Periodont., 44 : 396, 1973.
 - 4) Socransky, S.S. : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease ; J. dent. Res., 49 : 203. 1970.
 - 5) Keys, P.H. : Research in dental caries ; J. Am. dent. Ass., 76 : 1357~1373, 1968.
 - 6) Gibbons, R.J. and J. Van Houte : On the formation of dental plaques ; J. Periodont., 44 : 347, 1973.
 - 7) Jenkins, G.N. : The mode of formation of dental plaque ; Caries Res., 2 : 130, 1968.
 - 8) Dawes, C. : The nature of dental plaque films, and calcareous deposits ; Ann. N. Acad. Sci., 153 : 102, 1968.
 - 9) Egelberg, J.A. : A review of the development of dental plaque ; Dental plaque., 9, 1970.
 - 10) Davies, R.M. Brgrlum Jensen, S, Rindom Schitt, C. ; The effect of topical application of chlorhexidine on the bacterial colonization of the teeth and gingiva ; J. Periodont. Res. 5 : 96, 1970.
 - 11) Le, H. and Schitt. C.R. : The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man ; J. Periodont. Res., 5 : 79, 1970.
 - 12) Cancro, L.P. Paulovich, Povlovich, D.B. Klein, K and Picozzi, A : Effects of a chlorhexidine gluconate mouth rinse on dental plaque and calculus ; J. Periodont., 43 : 687, 1972.
 - 13) Le, H. Theilade, E. and Jensen, S.B. : Experimental gingivitis in man ; J. Periodont., 36 : 177, 1965.
 - 14) Healy, J.C. Daley, F.H. and Sweet, M.H. : Medical aspects of periodontoclasia and gingivitis ; J. Lab. and Clin. Med., 21 : 698, 1936.
 - 15) Le, H. and C.R. Schitt : The effect of suppression of the oral Microflora upon the development of dental plaque and gingivitis ; Dental plaque., 247, 1970.
 - 16) Berthold, P. : Formation of salivary coating and dental plaque on two different supporting materials ; J. Periodont., 8 : 397, 1979.
 - 17) Berthold, C.H. Berthold, P. and Sder, P.. : The growth of dental plaque on different materials ; Swed. Dent. J., 64 : 863, 1971.
-