水洗による露出歯根の内毒素除去効果

光 崎 潤 子 田 中 裕 子 大 竹 徹 長谷川 紘 司

昭和大学歯学部歯周治療学教室

(主任：長谷川紘司教授)

(昭和63年9月16日受付)

The Effect of Water Rinsing in Removal of Endotoxin from Exposed Root

Junko MITSUZAKI, Hiroko TANAKA, Tohru OHTAKE and Kohji HASEGAWA

Department of Periodontics, Showa University Dental School

(Chief : Prof. Kohji HASEGAWA)

Previous studies have revealed that periodontally involved exposed roots show evidence of biologic toxicity possibly due to endotoxin from subgingival micro-organisms.

Eleven periodontally involved teeth and five periodontally healthy teeth comprised the material. The teeth were rinsed in ultrasonic cleaner containing pyrogen-free water for one hour. The samples were taken from the solution after 1, 5, or 60 minutes. With the aim of removing residual endotoxin on the roots not eliminated by rinsing, each tooth was subjected to extraction of endotoxin with 45% phenol in water for 90 minutes at 65°C. After extraction of endotoxin, the root surface of the involved teeth was further planed with a hand scaler. Endotoxin was extracted from the particles removed from the

root surfaces. All samples were tested for endotoxin by limulus amoebocyte lysate assay.

The amount of endotoxin from involved teeth was $4,500 \pm 2,000$ ng per tooth and from healthy teeth it was 370 ± 120 ng per tooth. The amount of residual endotoxin on roots from involved teeth was 32 ± 20 ng per tooth and from healthy teeth it was 1.2 ± 1.1 ng per tooth. The amount of endotoxin collected from particles removed from previously rinsed involved root surfaces was 1.5 ng per tooth. The rate of removal of endotoxin by water rinsing of a tooth was $64 \pm 25\%$ in 1 minute, $85 \pm 16\%$ in 5 minutes, $99 \pm 0.6\%$ in 60 minutes.

From these findings, water rinsing of the exposed root was considered effective for removing endotoxin from the root surface.

Key words: Exposed root, Endotoxin, Water rinsing, Limulus lysate assay

要旨：水洗による露出歯根の内毒素の除去効果について検討する目的で、歯周疾患罹患歯11歯、非罹患歯5歯を抜去したままの状態で1時間、超音波洗浄を行なった。この洗浄液から、1分、5分、1時間の各時間の洗浄液中に溶出した内毒素量を定量した。また、水洗後の歯根に残留している内毒素を、温フェノール水で抽出、定量した。さらに罹患歯ではフェノール処理後、根面をルートプレーニングし、削片から内毒素を抽出し、定量した。その結果、歯根の内毒素量は、罹患歯で $4,500 \pm 2,000$ ng、非罹患歯で 370 ± 120 ng だった。罹患歯の水洗による歯根の内毒素の除去率は、1分で $64 \pm 25\%$ 、5分で $85 \pm 16\%$ 、1時間で $99 \pm 0.6\%$ だった。以上のことより、露出歯根の水洗は、短時間で、根面に付着あるいは浸透している内毒素の除去にきわめて効果的であることが示唆された。

索引用語：露出歯根，内毒素，水洗，リムルス・テスト

緒 言

歯周疾患に罹患し，歯周ポケットが形成されると，歯周ポケット内には，歯肉縁上プラークに比べ高い割合でグラム陰性菌を含む歯肉縁下プラークが形成される。

このような環境に曝された露出歯根は，生物学的為害性を示すことが知られている¹⁻⁴⁾。この生物学的為害性は，グラム陰性菌の細胞壁構造の一部である内毒素に多くを依存すると考えられている⁵⁻⁸⁾。

Aleo ら⁵⁾，Nishimine ら⁶⁾，Jones ら⁷⁾は，日常臨床で広く普及しているスクレーピング，ルートプレーニングを行なうことで，歯根に浸透あるいは付着している内毒素を除去できると報告し，露出歯根の機械的清掃の生物学的意義を明らかにした。

大竹⁹⁾は，露出歯根を水洗し，培養系に移すと，培養細胞の歯根への付着が増加することから，水洗により，生物学的為害物質，特に内毒素が露出歯根から除去できると報告し，水洗による露出歯根の処置の可能性を示唆した。

本実験は，水洗による露出歯根の内毒素の除去効果について，水洗時間とその除去率に関して検討する目的で行なった。

材料と方法

昭和大学歯科病院保存科外来にて，歯周疾患のため要抜去と診断・抜去された単根歯 11 歯を歯周疾患罹患歯として，また，矯正治療のため便宜抜去された第一小臼歯 5 歯を歯周疾患非罹患歯として実験に用いた。

被験歯は抜去後，プラーク・血液成分等を残存させたまま，滅菌蒸留水 30 ml の入った滅菌試験管内に静置し，この試験管を 26 kHz の超音波洗浄器（Sinesonic 150：神明台工業株式会社製）内に移し，水洗した。

超音波洗浄開始後，1 分，5 分，1 時間の各時間において，それぞれの洗浄液中に溶出している内毒素量を測定する目的で，各々の洗浄液から，100 μ l を試料として採取した。

こうして，1 時間水洗を行なった被験歯を洗浄液より取り出し，水洗後の歯根に残留している内毒素量を測定する目的で，各々の被験歯を，65°C，45% フェノール・

図1 実験方法

水 10 ml で 90 分間処理し，内毒素の抽出を行ない，水層より 100 μ l を試料として採取した。また，歯周疾患罹患歯では，歯石や露出セメント質内に浸透し，歯根表面の水洗および温フェノール・水処理では抽出不可能な内毒素が存在する可能性を検討するため，11 歯の露出歯根をハンスケーラーを用いて，歯石および露出セメント質を削除し，歯周疾患罹患歯 11 歯の削除片を集めて，65°C，45% フェノール・水 10 μ l 中で 90 分間処理し，水層から 100 μ l を試料として採取した。こうして得られた試料は ① 水洗 1 分後の洗浄液 ② 水洗 5 分後の洗浄液 ③ 水洗 1 時間後の洗浄液 ④ 水洗後の歯根をフェノール・水処理したもの ⑤ 水洗，フェノール・水処理後の歯周疾患罹患歯 11 歯の歯根の削除片をさらにフェノール・水処理したもの の計 5 種類の試料であった。

各試料を，至適濃度に希釈後（1/100～1/20,000）各試料 1 ml 中に含まれる内毒素量を，Limulus Lysate Assay キット（L.L.A.）〔トキシ カラーシステム（生化学工業社製）〕にて定量した（図1）。各処理によって得られた内毒素量は以下の計算式によって算定した。

[各試料 1 ml 中に含まれる内毒素量]×[洗浄液の量またはフェノール水の水層の量]×希釈倍数

表 1 歯周疾患罹患歯の内毒素量 (ng)

歯 種	1 時間の水洗で 溶出した内毒素量	残留内毒素量	総内毒素量 (※)
$\frac{4}{4}$	5,000	41	5,041
$\frac{3}{4}$	4,300	44	4,344
$\frac{2}{4}$	7,400	37	7,437
$\frac{1}{4}$	1,800	13	1,813
$\frac{4}{4}$	5,400	53	5,453
$\frac{1}{4}$	3,600	48	3,648
$\frac{1}{4}$	6,800	28	6,828
$\frac{2}{4}$	7,000	4	7,004
$\frac{1}{4}$	2,600	16	2,616
$\frac{2}{4}$	1,900	8	1,908
$\frac{4}{4}$	2,800	68	2,868
平均値±標準偏差	4,400±2,000	33±20	4,500±2,000

※総内毒素量 = 1 時間の水洗で溶出した内毒素量 + 残留内毒素量

表 2 歯周疾患非罹患歯の内毒素 (ng)

歯 種	1 時間の水洗で 溶出した内毒素量	残留内毒素量	総内毒素量 (※)
$\frac{4}{4}$	420	0.9	420.9
$\frac{4}{4}$	560	0.5	560.5
$\frac{4}{4}$	340	0.3	340.3
$\frac{4}{4}$	340	3.4	343.4
$\frac{4}{4}$	190	1.3	191.3
平均値±標準偏差	370±120	1.2±1.1	371.2±120.3

※総内毒素量 = 1 時間の水洗で溶出した内毒素量 + 残留内毒素量

結 果

1. 1 時間の水洗により溶出した内毒素量 (1 歯あたり)

(1) 歯周疾患罹患歯 (表 1)

4,400±2,000 ng

(2) 歯周疾患非罹患歯 (表 2)

370±120 ng

2. 残留内毒素量 (1 歯あたり)

1 時間の水洗では除去できずに歯根面に残留していた
残留内毒素量は

(1) 歯周疾患罹患歯 (表 1)

33±20 ng

(2) 歯周疾患非罹患歯 (表 2)

1.2±1.1 ng

であった。

3. 総内毒素量 (1 歯あたり)

水洗 1 時間目に歯根から洗浄液へ溶出した内毒素量
と、水洗により除去できずに歯根に残留していた残留内
毒素量の和を総内毒素量とすると、

(1) 歯周疾患罹患歯 (表 1)

4,500±2,000 ng

(2) 歯周疾患非罹患歯 (表 2)

370±120 ng

であった。

歯周疾患罹患歯と非罹患歯の総内毒素量を比較する
と、罹患歯は非罹患歯の 10 倍以上の値を示した。

4. 露出歯根の削除片の内毒素量

歯周疾患罹患歯を 1 時間水洗し、さらにフェノール・
水処理した後の露出セメント質と歯石の削除片から抽出
した内毒素量は、11 歯の総量で 16 ng、1 歯あたり 1.5

図2 歯周疾患罹患歯の水洗により溶出した内毒素量 (ng)

表3 歯周疾患罹患歯の水洗による内毒素の除去率 (平均値±標準偏差)

時間 (分)	内毒素の除去率 (%)
1	63.5±26.5
5	84.7±16.2
60	99.2±0.6

$$\text{内毒素の除去率 (\%)} = \frac{\text{各時間における水洗で溶出した内毒素量}}{\text{総内毒素量}} \times 100$$

ng であった。

5. 水洗による内毒素の除去効果

水洗による溶出した内毒素量を、1分、5分、1時間の時間ごとにみると、歯周疾患罹患歯の歯根の内毒素のほとんどが、短時間の水洗で溶出した (図2)。

また、歯周疾患罹患歯の1分、5分、1時間の各時間における水洗で溶出した内毒素量の総内毒素に対する割合を算出し、これを各時間における内毒素の除去率とした。水洗による内毒素の除去効果を時間による除去率でみると、

1分間で 約64±25%

5分間で 約85±16%

1時間で 約99±0.6% であった (表3, 図3)。

考 察

本実験において、1時間の水洗によって除去された内

図3 歯周疾患罹患歯の水洗による内毒素の除去率 (平均値±標準偏差)

毒素量と、残留内毒素量の和を総内毒素量とすると、歯周疾患罹患歯では、1歯あたり4,500±2,000 ngと幅があった。露出歯根の内毒素量を定量している報告はいくつかあるが、結果は様々である^{10,11)}。

Cheetham¹¹⁾は歯根面に付着している総内毒素量の差は、慢性炎症である歯周炎にみられる各部位ごとの病態の差によるものが原因であると述べている。

これに対して、歯周疾患非罹患歯の総内毒素量は1歯あたり370±120 ngであり、これは、他の研究者の報告よりも大きな値であった。

Wilsonら¹⁰⁾は、埋伏智歯を抜去し、かるく水洗した後に歯根を削除して削片の内毒素量を定量した。その内毒素量は一歯あたり約3 ngであったと報告している。

これに対し、本実験では、矯正治療のために便宜抜去された第一小臼歯を用い、抜去後根面は一切処置をせず、そのまま定量した。このように、非罹患歯の総内毒素量の他の研究者との差は、被験歯の選択の違いや、抜去の際の汚染などに起因していると考えられる。

Mooreら¹²⁾は、歯周疾患罹患歯の露出歯根を、1分間かるく水洗し、「ゆるく付着した物質」から抽出した内毒素量は、1歯あたり平均4,110±350 ng (内毒素量全体の39%)、さらに、1分間エンジンにつけた硬毛ブラシでこすって除去できた物質から抽出した内毒素量は、1歯あたり平均6,440±267 ng (内毒素量全体の60%)、これらの処置後にさらに歯根に残留していた内毒素量は、1歯あたり平均81±3.2 ng (内毒素量全体の1%)であったと報告した。

本実験では1時間の水洗で1歯あたり4,400±2,000 ngの内毒素が抽出され、水洗後の歯根に残留していた残留内毒素量は1歯あたり33±20 ngであった。水洗に

より除去された内毒素量と残留内毒素量の和を総内毒素量とすると、総内毒素量に対する水洗による内毒素の除去率は、1分間で $64 \pm 25\%$ 、5分間で $85 \pm 16\%$ 、1時間で $99 \pm 0.6\%$ だった。

この1時間の水洗による内毒素の除去率は、Mooreらの行なった根面清掃によって除去された内毒素の割合とほぼ一致している。

Nyman¹³⁾は、歯肉炎を惹起させたイヌを用い、歯肉弁を剥離した後、スケーリングとダイヤモンド・バーによる完全な露出セメント質の除去を行なった部位と、ラバーカップとペーストで研磨した部位の両者の治癒を組織学的に比較し、その治癒状態はほとんど同じだったと報告した。

以上のことより、歯石および露出セメント質を削除しなくても、1時間の水洗により、露出歯根の内毒素のほとんどが除去でき、さらに水洗後の歯根が周囲の歯周組織に生物学的に受け入れられる状態になり得ることが示唆された。

Nakib¹⁴⁾は、歯周疾患罹患歯と健全歯を内毒素溶液に浸漬し、その切片を抗原抗体法にて調べた結果、セメント質深部への浸透はみられなかったと報告した。Hughes¹⁵⁾は、歯周疾患罹患歯の露出セメント質の内毒素の分布状態を免疫学的に調べたところ、表層に局限していたと報告した。

このように近年、内毒素の露出セメント質への浸透性に関する研究では、その深部への浸透性を疑問視している報告が多い¹⁶⁻¹⁸⁾。今回、水洗で99%の内毒素が除去でき、さらにフェノール処理後の歯石および露出セメント質の削除片に残留していた内毒素は、僅か1.5 ngであった。この結果は、これらの報告を支持していると考えられる。

露出歯根面の処理法には、従来から行なわれてきたルートプレーニングによる露出セメント質の全層削除が原則として必要であるとされてきた^{6,7)}。それに対し、西村らは、一度削除してしまったセメント質は二度と再生をしないため¹⁹⁾、露出セメント質の削除は一層のみにとどめるべきであると主張している²⁰⁾。大島²¹⁾は、歯周疾患罹患歯根面の線維芽細胞増殖抑制物質はセメント質の表層0~20 μm の部分に局在していると報告している。このように近年、露出歯根面の取り扱いについて、従来のセメント質全層削除に異義が唱えられている。加えて、Nyman¹³⁾によって、露出セメント質の機械的削除を行なわなくとも、露出歯根を生物学的に周囲組織に受け入れられる状態にすることが可能であるという報告がなさ

れている。

他方、歯周疾患の病因として大きな役割をはたす歯肉縁下プラークを直接コントロールする方法として、direct irrigationが注目されてきているが、その評価は、ポケット内の非付着性プラーク除去の範囲にとどまっている²²⁾。

今回の実験結果から、露出歯根の水洗処理は、比較的短時間で、露出歯根に付着あるいは浸透している内毒素の除去にきわめて効果的であり、このことから、direct irrigationにおける根面に対する水洗効果が期待できる。

しかし、本実験の結果は、試験管内という閉鎖系の環境下で得たものであり、口腔内に開放されている歯周ポケット内においてどの程度の有効性が得られるかという点については、今後の問題が残されている。

結 論

水洗による露出歯根の内毒素の除去効果について、水洗時間とその除去率について検討する目的で、Limulus Lysate Assayを用いて実験を行った。

1. 歯周疾患罹患歯11歯を1時間水洗して除去された内毒素量は1歯あたり $4,400 \pm 2,000$ ng だった。
2. 1時間の水洗後に歯周疾患罹患歯の露出歯根に残留していた残留内毒素量は1歯あたり 33 ± 20 ng だった。
3. 歯周疾患罹患歯11歯の総内毒素量は1歯あたり $4,500 \pm 2,000$ ng だった。歯周疾患非罹患歯5歯の総内毒素量は1歯あたり 370 ± 120 ng だった。
4. 歯周疾患罹患歯を1時間水洗し、フェノール処理した後、歯根面をルートプレーニングして得た削片から抽出された内毒素量は、1歯あたり1.5 ng だった。
5. 歯周疾患罹患歯の水洗による内毒素の除去率は、1分間で $64 \pm 25\%$ 、5分間で $85 \pm 16\%$ 、1時間で $99 \pm 0.6\%$ だった。

以上のことより、露出歯根の水洗は、比較的短時間で歯根に付着あるいは浸透している内毒素の除去にきわめて効果的であることが示された。

文 献

- 1) Hatfield, C.G. and Baumhammers, A.: Cytotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth. Archs oral Biol., 55: 465-468, 1971.

- 2) Morris, M.L. : The subcutaneous implantation of periodontally diseased roots. *J. Periodontol.*, 43 : 737-747, 1972.
- 3) Morris, M.L. : An inhibitory principle in the matrix of periodontally diseased roots. *J. Periodontol.*, 46 : 33-39, 1975.
- 4) Aleo, J.J., DeRenzis, F.A., Farber, P.A. and Varboncoeur, A.P. : The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. *J. Periodontol.*, 45 : 672-675, 1974.
- 5) Aleo, J.J., DeRenzis, F.A. and Farber, P.A. : In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J. Periodontol.*, 46 : 639-645, 1975.
- 6) Nishimine, D. and O'Lealy, T.J. : Hand instrumentation versus ultrasonics in the removal of endotoxins from root surfaces. *J. Periodontol.*, 50 : 345-349, 1979.
- 7) Jones, W.A. and O'Lealy, T.J. : The effectiveness of in vivo root planing in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth. *J. Periodontol.*, 49 : 337-342, 1978.
- 8) Daly, C.G., Seymour, G.J. and Kieser, J.B. : Bacterial endotoxin : a role in chronic inflammatory periodontal disease ? *J. Oral Pathol.*, 9 : 1-15, 1980.
- 9) 大竹 徹 : 露出セメント質の生物学的為害性に関する研究. *日歯周誌*, 28 : 992-1003, 1986.
- 10) Wilson, M., Moore, J. and Kieser, J.B. : Identity of limulus amoebocyte lysate-active root surface materials from periodontally involved teeth. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 743-747, 1986.
- 11) Cheetham, W.A., Wilson, M. and Kieser, J.B. : Root surface debridement-an in vitro assessment. *J. Clin. Periodontol.*, 15 : 288-292, 1988.
- 12) Moore, J., Wilson, M. and Kieser, J.B. : The distribution of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in relation to periodontally involved root surfaces. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 748-751, 1986.
- 13) Nyman, S., Sarhed, G., Ericsson, I., Gottlow, J. and Karring, T. : Role of "diseased" root cementum in healing following treatment of periodontal disease. *J. Periodontol. Res.*, 21 : 496-503, 1986.
- 14) Nakib, N.M., Bissada, N.F., Simmelink, J.W. and Goldstine, S.N. : Endotoxin penetration into root cementum of periodontally healthy and diseased human teeth. *J. Periodontol.*, 53 : 368-378, 1982.
- 15) Hughes, F.J., Auger, D.W. and Smales, F.C. : Investigation of the distribution of cementum-associated lipopolysaccharides in periodontal disease by scanning electron microscope immunohistochemistry. *J. Periodontol. Res.*, 23 : 100-106, 1988.
- 16) Eide, B., Lie, T. and Selvig, K.A. : Surface coatings on dental cementum incident to periodontal disease I. A scanning electron microscopic study. *J. Clin. Periodontol.*, 10 : 157-171, 1983.
- 17) Eide, B., Lie, T. and Selvig, K.A. : Surface coatings on dental cementum incident to periodontal disease II. Scanning electron microscopic confirmation of amineralized cuticle. *J. Clin. Periodontol.*, 11 : 565-575, 1984.
- 18) 須田玲子, 茂手木義男, 宮下 元, 長谷川紘司, 立川哲彦, 山本綾子 : セメント質への物質の浸透性に関する実験 (II) (講演要旨). *日歯周誌*, 28 : 411-412, 1986.
- 19) 西村和晃, 高田耕平, 野口吉広, 野口秀夫, 永石真幸, 林 正純, 仲 秀典, 白井義英, 山岡 昭 : 歯肉剝離搔爬手術後の新付着に関する研究 (第4報) —術後の結合組織付着部に対するX線定量分析によるセメント質沈着の可能性について—. *日歯周誌*, 27 : 416-423, 1985.
- 20) 西村和晃, 高田耕平, 野口吉広, 永石真幸, 林正純, 白井義英, 山田 実, 山口十紀夫, 山岡昭 : 歯肉剝離搔爬手術後の新付着に関する研究 (第7報) —汚染セメント質に関する電子顕微鏡的観察—. *日歯周誌*, 27 : 846-855, 1985.
- 21) 大島光宏 : 細胞培養法を用いたスケーリング・ルートプレーニングの効果に関する研究. *日歯周誌*, 29 : 65-75, 1987.
- 22) Greenstein, G. : Effects of subgingival irrigation on periodontal states. *J. Periodontol.*, 58 : 827-836, 1987.