クリスタルバイオレットとトリパンプルーの存在下における *Streptococcus mutans* に対する He-Ne レーザーの殺菌効果

西 方 純 一

日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座

(指導：村井正大教授)

(平成4年12月18日受付)

Bactericidal Effect of the He-Ne Laser Irradiation Mediated by Crystal Violet and Trypan Blue on *Streptococcus mutans*

Jun-ichi NISHIKATA

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry

1-8-13, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

(Director : Prof. Seidai MURAI)

An investigation was conducted to determine the bactericidal effects of He-Ne laser irradiation on *Streptococcus mutans* PS 14 (*S. mutans*). Our previous study had shown that bactericidal effects on *S. mutans* were produced only in the presence of dyes which were contained in Mitis Salivarius (MS) agar medium.

In this study, these dyes (crystal violet and trypan blue) were added respectively to Brain Heart Infusion (BHI) agar medium, soft agar and hard agar at various concentrations. A He-Ne laser (Acusoft, Osada Electric Co., Tokyo, Japan) was used, and operated at a power output of 10 mW. Bactericidal effects were determined by the formation of a growth inhibition zone on the agar plates. The laser irradiation was done 0.5 cm distant from the surface of a 15 ml BHI agar plate containing the above dyes. The *S. mutans* strain was cultured overnight in BHI broth. After irradiation, 2.5 ml

of soft agar containing 0.5 ml of the above bacterial suspension was poured on the agar plates, and then the plates were incubated aerobically at 37°C for 24 h.

As growth inhibition was not observed under the above conditions, the bactericidal effect did not remain for only a short time after laser irradiation. In the other experiment coupled with BHI agar, soft agar and hard agar (each of which contained crystal violet or trypan blue), the bactericidal effects were clearly observed under all of the experimental conditions when crystal violet was used, but not in the presence of trypan blue.

These results suggest that the bactericidal effect of He-Ne laser irradiation might be related to excitation of the crystal violet molecule, and that the photodynamic effect of the dye kills the *S. mutans* cells.

Key words : He-Ne laser, Bactericidal effect, *Streptococcus mutans*, Crystal violet, Trypan blue

要旨 : He-Ne レーザー照射による *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に対する殺菌効果を解明する目的で、Mitis Salivarius 寒天培地に含まれる色素である、クリスタルバイオレット (CV) およびトリパンプルー (TB) に着目し、実験を行った。これらの色素を Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地に添加し、また、この培地に重層する *S. mutans* の培養液を混釈した soft agar (菌層) ならびに、この菌層上にさらに重層する hard agar を設定し、レーザー照射 (30, 60, 90 秒間ならびに 2, 5, 10 分間) による、これら色素の殺菌効果への関

与について検討した。その結果、レーザー照射後に菌層を重層しても殺菌効果は認められず、また、TB存在下でも殺菌効果は全く認められなかった。ただし、CVが存在する場合は殺菌効果を認めた。したがって、He-Neレーザー照射によって、CV分子が励起され、このCV分子が*S. mutans*に対して殺菌効果を発現したものと考えられた。

索引用語：He-Neレーザー，殺菌効果，*Streptococcus mutans*，クリスタルバイオレット，トリパンブルー

緒 言

近年、医学および歯学の分野で脚光をあびているレーザーの、生体に対する作用¹⁻³⁾や歯周領域におけるレーザーの応用⁴⁻⁶⁾などの検討が進められている。

このレーザーの作用のひとつに微生物に対する殺菌効果がある。この殺菌効果は高出力レーザー⁷⁻⁹⁾においては、その熱作用が注目されているが、軟組織に対して安全性が高く口腔領域において使用頻度の高い低出力レーザーについては、僅かに*Streptococcus mutans* (以後、*S. mutans* と略す) について、ある条件下に殺菌効果のあることを認めている報告¹⁰⁻¹²⁾があるものの、その効果の条件などの詳細については明らかではない。

そこで著者は、この低出力レーザーの殺菌効果に着目し、このレーザーを将来、口腔領域の微生物に対して応用するための基礎研究として、う蝕原性菌であり、歯垢微生物でもある*S. mutans*を用いて、レーザーの照射時期、殺菌効果を有する色素の特定、および有効濃度など殺菌効果を発揮させる条件を知るための項目について検討した。

材料および方法

1. He-Neレーザー

使用したHe-Neレーザーは、オサダアキューソフト (長田電気工業社製、東京；以後、レーザーと略す) で、プローブ先端部の平均出力が10 mW、波長は632.8 nmの赤色可視光線を連続照射可能な装置である。

2. 供試菌株

供試菌株は、本学細菌学教室保存の*S. mutans* PS 14株である。

3. 培 地

使用した培地は、Brain Heart Infusion (Difco 社製、USA；以後、BHIと略す) 寒天培地である。

4. 試 薬

使用した色素は、クリスタルバイオレット (和光純薬社製、大坂；以後、CVと略す) およびトリパンブルー (和光純薬社製、大坂；TBと略す) で、いずれも特級のものである。

5. 実験方法

- 1) 色素を含むBHI寒天培地にレーザー照射後、菌層を重層した場合の殺菌効果

CVおよびTBを添加したBHI寒天培地を調製した。その濃度としてはMitis Salivarius (以後、MSと略す) 寒天培地処方¹³⁾の濃度であるCVは0.8 mg/l、TBは75 mg/lとした。菌層は、BHI brothで24時間培養した*S. mutans*の菌液 (OD_{550nm}：約1.4) 0.5 mlをsoft agar (0.5% 寒天) 2.0 mlに混釈して調製した。

レーザー照射条件¹²⁾は、プローブ先端から被照射面までの距離を5 mmとし、レーザー光が被照射面に垂直に照射されるようにプローブを固定した。照射時間は1枚の寒天平板上で2、5および10分間の3条件とした。それぞれの被照射部のエネルギー密度は約17、42.5および85 J/cm²である。照射直後、1、3および5時間後に菌層を重層し37°C、24時間好気培養した。

- 2) CVおよびTBを単独で用いた場合の殺菌効果に及ぼす影響

CVおよびTBを前述1)と同様に基準濃度として、BHI寒天培地またはこれに重層する菌層、およびhard agar (1.5% 寒天、2 ml)にそれぞれ単独に添加し、以下に示す条件(1)~(5)で実験を行なった。

- (1) BHI寒天培地に菌層を重層した。
- (2) BHI寒天培地に菌層 (基準濃度のそれぞれの色素を含む) を重層した。
- (3) BHI寒天培地 (基準濃度のそれぞれの色素を含む) に菌層を重層した。
- (4) BHI寒天培地に菌層を重層し、さらにhard agar (基準濃度のそれぞれの色素を含む) を重層した。
- (5) BHI寒天培地にCVおよびTBを基準濃度、2倍および4倍濃度となるように調製後、菌層を重層

した。

レーザー照射は、前述 1) と同様に 1 枚の寒天平板において 3 条件とした。レーザー照射時間は (1), (2), (3) および (4) では 2, 5 および 10 分間とした。また条件 (5) では照射時間は 30, 60 および 90 秒間とし、エネルギー密度は、それぞれ約 4.3, 8.5 および 12.8 J/cm² である。レーザー照射後、直ちに 37℃, 24 時間好気培養した。なお、被験試料の数は各条件ごとに 5

表 1 CV および TB を含む BHI 寒天培地にレーザー照射後、菌層を重層する時間の差異が *S. mutans* の増殖に及ぼす影響

重層時間				
分	直後	1 時間後	3 時間後	5 時間後
2	—	—	—	—
5	—	—	—	—
10	—	—	—	—

増殖阻止帯あり : #
 増殖阻止帯あるが不明瞭 : +
 増殖阻止帯なし : —

表 2 BHI 寒天平板における CV の有無とレーザー照射時間が *S. mutans* の増殖に及ぼす影響

実験条件				
分	(1)	(2)	(3)	(4)
2	—	#	#	#
5	—	#	#	#
10	—	#	#	#

増殖阻止帯あり : #
 増殖阻止帯あるが不明瞭 : +
 増殖阻止帯なし : —

(n=5)

個とした。

3) 殺菌効果の判定

レーザー照射による殺菌効果は、培養後、寒天平板上での増殖阻止帯の有無をもって判定した。すなわち、明らかに増殖阻止帯が認められる場合を #, 増殖阻止帯は認められるが不明瞭な場合を +, 増殖阻止帯の認められい場合を — とした。

4) CV 水溶液の吸光特性の特定

CV 水溶液の吸光特性は分光光度計 (U-1100 型, 日立社製, 東京) で測定した。

成 績

1. 色素を含む BHI 寒天培地にレーザー照射後、菌層を重層した場合の殺菌効果

色素 (CV および TB) を添加した BHI 寒天培地にレーザー照射を行なった。照射終了後、すなわち、照射直後、照射 1 時間後、照射 3 時間後および照射 5 時間後に菌層を重層した寒天平板上では、いずれの照

表 3 BHI 寒天平板における TB の有無とレーザー照射時間が *S. mutans* の増殖に及ぼす影響

実験条件				
分	(1)	(2)	(3)	(4)
2	—	—	—	—
5	—	—	—	—
10	—	—	—	—

増殖阻止帯あり : #
 増殖阻止帯あるが不明瞭 : +
 増殖阻止帯なし : —

(n=5)

表 4 BHI 寒天平板における各種色素濃度およびレーザー照射時間が *S. mutans* の増殖に及ぼす影響 (実験条件 5)

色素：		CV			TB		
秒	基準濃度 1 倍	2 倍	4 倍	基準濃度 1 倍	2 倍	4 倍	
30	—	+	⦿	—	—	—	
60	—	⦿	⦿	—	—	—	
90	—	⦿	⦿	—	—	—	

増殖阻止帯あり : #
 増殖阻止帯あるが不明瞭 : +
 増殖阻止帯なし : —

(n=5)

図 1 CV 水溶液の吸光特性

射時間 (2, 5 および 10 分間) においても増殖阻止帯を認めなかった (表 1)。

2. CV および TB の存在下の *S. mutans* に対する殺菌効果に及ぼす He-Ne レーザーの影響

レーザー照射による *S. mutans* に対する殺菌効果は, CV の添加のない条件 (1) では増殖阻止帯を認めず, BHI 寒天培地中もしくは菌層あるいは hard agar 中に CV が存在する条件 (2), (3) および (4) では, 全てにおいて増殖阻止帯が認められた (表 2)。一方, TB 単独添加では条件 (2), (3) および (4) のいずれの場合でも増殖阻止帯を認めなかった (表 3)。

また, CV が 2 倍濃度では, 30 秒間の短時間のレーザー照射でも, 殺菌作用が認められた。しかしながら, TB では 4 倍の高濃度で, かつ 90 秒間のレーザー照射によっても殺菌効果は全く認められなかった (表 4)。

3. CV 水溶液の吸光特性

CV 水溶液の吸光特性を測定した結果, 590 nm に特徴的な吸収極大を認めた (図 1)。

考 察

本研究で用いた He-Ne レーザーは気体レーザーの一種で, 波長 632.8 nm, 出力 10 mW のものである。一般に, このレーザー照射によって主に疼痛抑制作用¹³⁻¹⁶⁾, 創傷治癒の促進¹⁷⁻¹⁹⁾などが期待できることに意見の一致をみるが, 殺菌効果については十分に解明されていない。僅かに岩瀬ら^{10,11)}が, プラーク構成細菌である *S. mutans* に対するレーザー照射による

殺菌効果について検討しているのみである。その結果によると, *S. mutans* に対する殺菌効果を認め, この殺菌作用は高出力レーザー照射によって発生する熱作用によるものとは異なり, これはそのレーザー波長に依存し, 660 nm 以下の場合に殺菌効果が発現するとしている²⁰⁾。

また著者ら¹²⁾は, このレーザーの殺菌効果に関する研究として *S. mutans* に対しては, MS 寒天培地に添加されている色素がこのレーザー光になんらかの反応を示し, 殺菌効果を発現するものと推測し, BHI 寒天培地, 菌層ならびに hard agar にこれらの色素を添加した実験を行なった。すなわち, CV および TB の双方を MS 寒天培地処方と同濃度となるように調製し, これを基準濃度として, BHI 寒天培地およびこれに重層する菌層に添加し, レーザー照射を行なったが, レーザーによる *S. mutans* への直接照射のみでは殺菌効果を認めなかった。しかしながら, BHI 寒天培地およびこれに重層する菌層にこれらの色素を添加した場合のいずれにおいても 2 分間照射で, また, その色素濃度が基準濃度 1/16 の低濃度であっても 10 分間の照射でそれぞれ殺菌効果を認め報告している。

すなわち, *S. mutans* 細胞と色素が共存ないし接触している場合には, レーザー照射による殺菌効果が認められている。これらのことから, 色素 (CV および TB) が光増感剤として働き, レーザー光を吸収して励起状態となり, *S. mutans* に対して殺菌効果を発現すると推測している。

しかし, これらの研究では殺菌効果を得るためのレーザー照射時期, 殺菌効果を有する色素の特定およびその有効濃度など, 本レーザーの殺菌効果を発揮させる条件の細目を知ることはできない。

そこで著者は, 口腔領域で広く用いられている He-Ne レーザーの殺菌効果について, さらに検討する研究の一環として *S. mutans* を用い, これらの色素による殺菌効果の細目について検討を試みた。

その結果, レーザー照射時期については, この殺菌効果はレーザー照射時にもみ発揮されるもので, 照射後まで効果が継続するものではないことが判明した。

次に, MS 寒天培地に含まれる色素である CV と TB のどちらに殺菌効果が依存するのかわかる目的で, これらの色素をそれぞれ単独で BHI 寒天培地, 菌層ならびに hard agar に添加し実験を行なった。その結果, CV が存在する条件下でのみ殺菌効果を認めた。しかし, TB については, その濃度を 4 倍とした

場合でも殺菌効果は全く認められなかった。したがって、殺菌効果は双方の色素の相互作用によるのではなく、CV存在下でレーザー照射を行なった時にのみ殺菌作用が発現することが判明した。

このCVは明青紫色の塩基性染料の一種で、古くから絹、食品などの染色や化粧品に配合され使用されている。またCVはある種の寄生虫、真菌および細菌の増殖抑制に効果のあることが報告されている²¹⁻²⁶⁾。

その殺菌効果を生ずる理由としてDocampoら²⁷⁾は電子スピン共鳴(ESR)装置を用い、CVに可視光線照射(タングステンランプ、500 W)を10分間行くと、CV分子が不対電子をもった炭素中心フリーラジカルを形成することを認めており、このフリーラジカルが有効ではないかと考えている。

著者らは他の研究¹²⁾でMS寒天培地の吸光特性は590 nm付近に吸収極大のあることを認めており、さらに、本論文でもCVは590 nm付近において吸収極大を認めていることから、著者は波長632.8 nmのHe-Neレーザー光はCV分子に吸収され、励起状態となったCV分子が*S. mutans*に作用し殺菌効果を発現したものと考察した。

そこでCVについてHe-Neレーザー照射時の有効濃度について検討した。その結果、*S. mutans*に対して有効であった濃度は0.8 mg/l(2分間照射時)であった。このCVの生体応用の観点から考察するために、CVの生体に対する安全性の面から数種の実験動物に対する経口投与によるLD₅₀を見ると、いずれも約100 mg/kg以上であった。今回、用いたCVの濃度は0.8 mg/lから3.2 mg/lと極めて低濃度であり、この濃度では歯周組織や口腔粘膜に障害的に働くとは考えにくい。

以上のことから、CV存在下の*S. mutans*に対するHe-Neレーザーの殺菌効果は、本レーザーによるCVの励起状態が重要な関連を有することが判明し、以後、本レーザーとCVとの併用による口腔領域の病原微生物に対する療法確立の可能性が示された。

結 論

クリスタルバイオレットおよびトリパンブルー存在下において*S. mutans*に対するHe-Neレーザーの殺菌効果について検討し、以下の結論を得た。

1. 殺菌効果はクリスタルバイオレットが*S. mutans*に接して存在し、かつ、レーザー照射時のみに

発現した。

2. 殺菌効果はクリスタルバイオレットの濃度と照射時間に依存し、クリスタルバイオレットを1.6 mg/l濃度以上に調製した場合、30秒間のレーザー照射から殺菌効果を認めた。

3. レーザー照射の*S. mutans*に対する殺菌効果の発現には、色素であるクリスタルバイオレットの存在が不可欠であったが、トリパンブルーについては、全く殺菌効果は認められなかった。

4. クリスタルバイオレット水溶液の吸光特性を測定した結果、590 nmに特徴的な吸収極大を認めた。

これらの殺菌メカニズムはHe-Neレーザーによって励起されたクリスタルバイオレット分子が関与しているものと考えられた。

文 献

- 1) 渥美和彦：レーザー医学の過去、現在および未来、渥美和彦、レーザーの臨床、メディカル・プランニング、札幌、1981、22-45.
- 2) 米川元樹、西坂 剛：レーザー光の生体作用、とくに生体光化学反応の基礎、渥美和彦、レーザーの臨床、メディカル・プランニング、札幌、1981、49-55.
- 3) 会沢勝夫、西宮克明、酒井治正：光線力学的レーザーによる経時的細胞変化、早田義博、レーザー腫瘍治療マニュアル、サイエンスフォーラム、東京、1986、28-33.
- 4) 庄司 茂：保存・歯周病科領域におけるレーザーの応用、森岡俊夫、レーザー歯学、医歯薬出版、東京、1986、117-37.
- 5) 石川 烈、浦口良治、大嶋清秀：歯周組織への応用、森岡俊夫、松本光吉、レーザーの歯科への臨床応用とその基礎、クインテッセンス、東京、1988、109-120.
- 6) 森岡俊夫、堀江純司：盲嚢搔爬、森岡俊夫、松本光吉、レーザー臨床(上)、日本医療文化センター、東京、1989、101-103.
- 7) Klein, E., Fine, S., Ambrus, J., Cohen, E., Neter, E., Ambrus, C., Bardos, T. and Lyman, R.: Interaction of laser radiation with biologic systems. III. Studies on biologic systems *in vitro*. Fed. Proc., 24, Suppl. 14: 104-110, 1965.
- 8) 鈴木和夫、古賀ともゑ、森岡俊夫：紫外エキシマーレーザーによる殺菌効果に関する研究. 日本レーザー医学会誌, 3: 625-630, 1982.
- 9) 菱本久美郎、桑原節子、川那辺純一、松本 洋：炭酸ガスレーザー光照射による殺菌効果の生物物理学的研究. 日本レーザー医学会誌, 3: 201-206, 1982.
- 10) 岩瀬達雄、奈良美夫、森岡俊夫：He-Ne低出力レーザーの*S. mutans*に対する殺菌効果一特に照射時間との関係一. 口腔衛生会誌, 36: 448-449,

- 1986.
- 11) Iwase, T., Oho, T., Nara, Y. and Morioka, T.: Bactericidal effect of low energy laser in near infrared area. J. Dent. Res., 66: 923, 1987.
- 12) 西方純一, 平野泰之, 伊藤公一, 高田 治, 成川勝一, 村井正大: He-Ne レーザーの *Streptococcus mutans* に対する殺菌効果ならびにその殺菌メカニズムの検討. 日歯周誌, 34: 410-415, 1992.
- 13) 若林 始, 立花 均, 友成 宏, 古川篤治, 富永明彦, 松本光吉: Soft Laser 照射による歯髄の痛み知覚閾値の変動に関する研究. 日歯保誌, 29: 226-231, 1986.
- 14) 松本光吉, 中村 玄, 友成 宏: He-Ne レーザーによる象牙質知覚過敏の処置に関する研究. 日歯保誌, 29: 312-317, 1986.
- 15) 神谷一有, 山下久明, 伴 佳道, 五味明良, 千田彰, 原 学郎, 山口正孝, 成田幸恵, 長谷川二郎: He-Ne レーザー治療器 "Soft Laser 632" の二重盲検法による治療効果の判定. 日歯保誌, 29: 232-242, 1986.
- 16) 岩瀬達雄, 堀 信頭, 森岡俊夫: 象牙質知覚過敏における He-Ne レーザーの疼痛緩和機序に関する基礎的研究. 日本レーザー医学会誌, 9: 209-212, 1988.
- 17) Trelles, M.A. and Mayayo, E.: Bone fracture consolidates faster with low-power laser. Lasers in surgery and medicine, 7: 36-45, 1987.
- 18) 長澤明範, 加藤一一, 高岡邦夫: 骨形成因子からみたレーザーの骨修復促進効果の実験的検討, 日本レーザー医学会誌, 9: 165-168, 1988.
- 19) 神谷一有, 近藤昌彦, 千田 彰, 藤田雄敏, 亀山洋一郎: He-Ne レーザーの照射効果に関する研究 第1報 ラット口腔粘膜創傷治療に及ぼす効果. 日本レーザー歯学研究会誌, 2: 64, 1991.
- 20) 森岡俊夫, 岩瀬達雄: 低出力レーザーと殺菌効果, 森岡俊夫, 松本光吉, レーザーの歯科への臨床応用とその基礎, クインテッセンス, 東京, 1988, 197-201.
- 21) Russell, D.G.: The effect of gentian violet on protozoa and on tissues growing *in vitro*, with especial reference to the nucleus. J. Exp. Med., 20: 545-553, 1914.
- 22) Stearn, E.W. and Stearn, A.E.: Conditions and reactions defining dye bacteriostasis. J. Bacteriol., 11: 345-357, 1928.
- 23) Ingraham, M.A.: the bacteriostatic action of gentian violet and its dependence on the oxidation-reduction potential. J. Bacteriol., 26: 573-598, 1933.
- 24) Adams, E.: The antibacterial action of crystal violet: J. Pharm. Pharmac., 19: 821-826, 1967.
- 25) Hall, C.L. and Hamilton, P.B.: Interactions during inhibition of growth of *Aspergillus parasiticus* by gentian violet. Poultry Sci., 60: 2226-2231, 1981.
- 26) Docampo, R. and Moreno, S.N.J.: Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American trypanosomiasis (Chagas' disease). Rev. Biochem. Toxicol., 7: 159-204, 1985.
- 27) Docampo, R., Moreno, S.N.J., Muniz, R.P.A., Cruz, F.S. and Mason, R.P.: Light-enhanced free radical formation and trypanocidal action of gentian violet (crystal violet). Science, 220: 1292-1295, 1983.

連絡先:

日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座

〒101 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13