

オゾンジェルによる齲蝕予防に関する基礎的研究

日本大学松戸歯学部

保存修復学講座

研究講座員 小泉 直也

(指導：池見宅司教授)

【要 旨】

医療分野で頻用されているオゾン^①は、OH ラジカルを生じさせ、その酸化分解作用により高い殺菌力を持つといわれ、しかも耐性菌を生じさせないという特徴を有している。歯科医療においても、殺菌・消炎・止血への効果が着目されることから、オゾン水を用いた義歯あるいは歯周ポケット、根管治療時の洗浄・殺菌液としての可能性などが検討されており、更なる新しい用途の開発が期待されている物質である。しかしながら、オゾン水はオゾンの半減期が短いため、殺菌作用の持続時間が短く、その適用範囲が限定されるという問題点がある。そこで、殺菌力を長期間維持し、さらに適用範囲を拡大することを目的としたオゾンジェルが開発されている。そこで、本研究は、このオゾンジェルの齶蝕予防効果を検討する目的で、齶蝕主要原因菌に対する抗菌効果を中心に実験を行った。その結果、以下の結論を得た。

1. オゾンジェルの *Streptococcus mutans* に対する最小発育阻止濃度は 250 µg/ml であった。
2. オゾンジェルの *Streptococcus sobrinus* に対する最小発育阻止濃度は 250 µg/ml であった。
3. オゾンジェルの *Actinomyces viscosus* に対する最小発育阻止濃度は 125 µg/ml であった。
4. オゾンジェルの抗菌作用は殺菌的であり時間および濃度に依存していた。
5. オゾンジェルはタンパク質の存在によりその抗菌効果が減弱した。
6. オゾンジェルは人工歯垢および唾液被覆人工歯垢で、その抗菌効果が減弱した。

以上のことよりオゾンジェルは、齲蝕原因菌に対して顕著な殺菌作用が認められたものの、唾液中のタンパク質でその抗菌活性が低下することおよび、バイオフィルム内に浸透して殺菌することが難しいことから、Professional Mechanical Tooth Cleaning を行い、唾液が付着する前に Dental Drug Delivery System を施術することでさらなる齲蝕予防効果は期待できると判断された。

【緒 言】

齲蝕は、世界的に最も頻度の高い口腔疾患の1つであり、*Streptococcus mutans* (以下 *S. mutans*)が主要原因菌であるということが多くの疫学研究から明らかにされている^{1,2)}。その発症メカニズムは、歯面に強固に付着・増殖した齲蝕原因菌が産生した酸により、エナメル質が脱灰されることにより起こるとされている³⁻⁵⁾。一方、*Actinomyces* 属菌は、*Streptococcus* 属菌とともにヒト歯垢において優勢な菌属であり⁶⁻¹³⁾、齲蝕や歯周病に深く関与することが報告されている^{14,15)}。

オゾンは、殺菌作用が強力で瞬時に発現し^{16,17)}、環境汚染の心配もなく¹⁷⁻²⁰⁾、還元されると酸素になるため安全面でも優れている²¹⁾ことから、院内感染予防対策や手指消毒ならびに洗眼消毒として幅広く使用されている^{19,20,22-26)}。歯科領域においては、オゾン水を用いた義歯の殺菌・消毒や歯周ポケット、根管治療時の洗浄液としての可能性などが検討^{27,28)}されている。しかしながら、オゾン水は不快なオゾン臭を有し、半減期が約40分程度と非常に短いため¹⁷⁾、殺菌効果の持続性がないことが最大の欠点である。

近年、オゾンナノバブル水が開発され、この殺菌効果の持続性はある程度解決されたものの、口腔における嚆嗽剤としての可能性は低いことが指摘されている。最近、芝と塩田²⁹⁾は、グリセリンにオゾンを接触させることによりオゾン化したジェルを作製した。このオゾンジェルは、①殺菌力が瞬時かつ強力で抗菌スペクトルが広い；②オゾンを高濃度に閉じ込める；③約6ヶ月間の持続性の抗菌力を持つ；④耐性菌を作らない；⑤オゾン臭を有しない、というような特徴を有する。

そこで本研究は、口腔における保持力、徐放性に着目し、このオゾンジェルの齲蝕主要

原因菌に対する抗菌作用を中心に齲蝕予防効果を検討した。

【材料および方法】

1. オゾンジェル

オゾンジェルは、特殊な発生技術を用いてグリセリン中にオゾン溶解させたジェルで、グリセリン溶液にオゾンを含むガスを気液接触させる方法で生成した濃度 1,000 µg/ml のものを株式会社ブイエムシーから供与され、生成後 3 ヶ月以内の -20°C 保存のものを解凍し直ちに使用した。

2. 使用菌株、培地および培養法

日本大学松戸歯学部口腔微生物学講座保存の *S. mutans* PS-14 株、*S. mutans* JC2 株、*Streptococcus sobrinus* (以下 *S. sobrinus*) 6715 株ならびに *Actinomyces viscosus* (以下 *A. viscosus*) ATCC 19246 株を本研究に供した。

培地は、基本的には Bact™ Brain Heart Infusion (BHI、Becton Dickinson 社製) およびその寒天培地、ならびに Difco™ Mitis Salivarius Agar (MS、BD 社製) を用いた。

供試菌液は前培養後、BHI で 37°C、一昼夜ロウソク培養したものを用いた。殺菌作用の検討においては BHI 培養菌を遠沈 (3,000 x g, 15min.) により集菌し、phosphate buffered saline (PBS、ニッスイ社製) で 3 回洗浄後、同緩衝液で菌懸濁液を調製し実験に供した。

3. 抗菌性試験

1) 最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)の検討

オゾンジェルの *S. mutans*、*S. sobrinus* ならびに *A. viscosus* に対する最小発育阻止濃度は液体培地希釈法にて判定した。すなわち、2 倍濃度 BHI で 2 倍段階希釈した 500、

250、125、62.5、31.3 $\mu\text{g/ml}$ 濃度のオゾンジェル液体培地に BHI 培養菌液（約 1.0×10^6 colony forming unit, CFU/ml）を 10 μl 接種し、37°C、24 時間ロウソク培養後に発育の有無を目視にて判定し、混濁を認めないオゾンジェルの最小含有濃度を *S. mutans*、*S. sobrinus* ならびに *A. viscosus* に対する MIC とした。

2) Resting cell に対する殺菌作用の検討（濃度的変化）

オゾンジェルをグリセリンで各濃度 300、200、150、100 $\mu\text{g/ml}$ に調製したものに約 1.0×10^6 CFU/ml の *S. mutans*、*S. sobrinus* ならびに *A. viscosus* 菌懸濁液 10 μl を加え、室温にて 60 分間インキュベーション後の溶液を 10 倍段階希釈法により、*S. mutans* および *S. sobrinus* は MS 平板培地、*A. viscosus* は BHI 寒天平板培地に塗抹し、37°C、48 時間ロウソク培養後、形成された集落数から生存率を算定し、オゾン無添加の対照群と比較した。

3) Resting cell に対する殺菌作用の検討（経時的変化）

200 $\mu\text{g/ml}$ に調製したオゾンジェルに約 1.0×10^6 CFU/ml の *S. mutans*、*S. sobrinus* ならびに *A. viscosus* 菌懸濁液 10 μl を加え、室温にて 0、15、30、60、120 分間インキュベーション後の溶液について 2) 同様に生存率の算定を行った。

4. 抗菌効果に対するタンパク質の影響

オゾンジェルの殺菌効果に対するタンパク質の影響を検討するため、1,000 $\mu\text{g/ml}$ のオゾンジェル 2 ml に bovine serum albumin (BSA, 10 mg/ml) と *S. mutans* 菌懸濁液（約 2.0×10^8 CFU/ml）10 μl を加え、ピペットで 1 分間十分に攪拌した。経時的にその溶液を 10 倍段階希釈し、MS 平板培地に塗抹培養後、発育した集落を算定し、生存率を求めた。

また、オゾンジェル[®]の溶媒であるグリセリンを対照溶液とした。

5. 人工歯垢および唾液被覆人工歯垢に対するオゾンジェル[®]の抗菌効果

1% Bact[™] Yeast Extract (BD 社製)および5%スクロース加 BHI 2 ml に、培養菌液 5 μ l を接種した試験管を 10 度の傾斜で一昼夜ロウソク培養した。形成された菌体・グルカンの管壁付着物を滅菌精製水 4 ml で回転させることで洗浄を 3 回行なった後、滅菌精製水を 4 ml 加え、バイブレーターで激しく 5 秒間振動させて弱付着菌体を除去することにより、強固に付着している菌体・グルカン付着物を調製し、人工歯垢とした。また、人工歯垢が浸漬するように成人のパラフィン刺激唾液の遠沈 (20,000 x g, 30min.) 上清を加え、60 分間静置後、滅菌精製水で 3 回洗浄したものを唾液被覆人工歯垢とした。これらに 1,000 μ g/ml のオゾンジェル[®] 4 ml を加え、30 分間静置後、PBS で 5 回洗浄したものに、同液 4 ml を加え、Sonicator[®] (50w、30sec、20kHz、大岳製作所製) で付着菌体を脱離・分散させ、10 倍段階希釈し、MS 平板培地に塗抹培養後、発育した集落を算定し、生存率を求めた。

【結 果】

1. オゾンジェル抗菌活性

オゾンジェルの *S. mutans*, *S. sobrinus* ならびに *A. viscosus* に対する MIC を Table 1 に示した。*S. mutans* および *S. sobrinus* に対するオゾンジェルの MIC は 250 µg/ml、また、*A. viscosus* に対しては 125 µg/ml であった。

2. オゾンジェルの殺菌作用

オゾンジェルの濃度変化における抗菌作用の結果を Fig. 1, 2, 3 に示した。*S. mutans*, *S. sobrinus* ならびに *A. viscosus* ともにオゾンジェルの濃度の増加にともない直線的に生菌数の減少が認められた。それぞれの菌体において 60 分間の処理で、オゾンジェル 100 µg/ml の生存率は、*S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. viscosus* 全ての菌において約 4% であったものが、150 µg/ml では約 1% になり、200 µg/ml では、約 0.05% まで減少し、300 µg/ml では、ほぼ 100% の殺菌率が認められた。

オゾンジェルの殺菌作用における作用時間の影響を Fig. 4, 5, 6 に示した。反応時間の増加にともない *S. mutans*, *S. sobrinus* ならびに *A. viscosus* ともにほぼ直線的に生存率の減少が認められた。オゾンジェル 200 µg/ml で処理した場合、*A. viscosus* においては時間の経過に伴い直線的に生菌数の減少が認められたものの、*S. mutans* および *S. sobrinus* においてはその殺菌効果は減弱し、120 分後においても約 10 CFU/ml の生残菌が認められた。なお、オゾンジェル 1,000 µg/ml 処理においては *S. mutans* に対して直線的に短時間で生残菌は認められなかった (Fig. 7)。

3. オゾンジェルの抗菌効果に対するタンパク質の影響

オゾンジェルの殺菌効果に対するタンパク質の影響を検討した結果を Fig. 7 に示した。

オゾンジェルに BSA 添加後の抗菌効果を検討したところ、対照であるグリセリン溶液と比較して BSA の添加はオゾンジェルの殺菌効果を明らかに抑制することが認められた。

4. 人工歯垢および唾液被覆人工歯垢に対するオゾンジェルの抗菌効果

人工歯垢および唾液被覆人工歯垢に対するオゾンジェルの抗菌効果の結果を Table 2 に示した。試験管壁に強固に付着していた *S. mutans* 菌体は、 8.60×10^7 CFU/ml であり、同量の浮遊菌体に対してオゾンジェルは 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度、30 分間処理で 100% 殺菌したが、人工歯垢および唾液被覆人工歯垢に対しては、それぞれ 63.6% および 0.3% の殺菌率であり、オゾンジェルの抗菌効果は阻害された。

【考 察】

口腔の二大疾患の一つである齲蝕は、口腔常在菌により引き起こされる内因性疾患であり³⁰⁻³³⁾、プラーク中の細菌が産生する酸により歯質を脱灰させることから発症することが明らかになっている^{1,3,4)}。また多因性疾患であることから、その罹患過程においては数多くの要因が複雑に関与しているが、主要3因子³⁴⁾として歯質、細菌および基質が知られている。

このように齲蝕は、歯面を生息場所とする齲蝕原因菌の付着から始まり、多くの因子が複雑に係わり合うことによりはじめて発症する疾患である。したがって、齲蝕予防の手段としては、フッ化物を用いた歯質の強化、機械的な口腔清掃や抗菌剤を応用した歯面の微生物の排除、糖分摂取の制限や蔗糖代替甘味料の使用による基質の変更等による方法が報告³⁵⁾されている。これらの齲蝕予防法は、齲蝕の主要因子に対する防御手段であることから、齲蝕病因論の見地からも理にかなったものである。現在、口腔の健康への関心度が高まり、これらの齲蝕予防法が行われているにもかかわらず、齲蝕罹患率は減少傾向にあるものの依然として高いことが報告されており³⁶⁾、齲蝕は口腔衛生上未だ重要な問題である。それ故に、齲蝕予防の一手段である *mutans streptococci* や *actinomyces* による歯面への付着や歯垢形成を阻害し、齲蝕原因菌をコントロールすることは重要であるものとする。

オゾンには強力な酸化作用を有し、この酸化力により塩素系消毒薬の約10倍という優れた殺菌効果および脱臭効果や漂白効果等を生み出すことが知られており³⁷⁾、医療分野においてもオゾンの有用性が報告³⁸⁻⁴²⁾されている。また、オゾンによる殺菌は、抗菌薬による殺菌が細菌の代謝系に作用するものとは異なるため、耐性菌を生じさせないという特徴を

有することが最大の利点である。このオゾンを経水電解法や放電法により水に溶解させたものがオゾン水であり、オゾン水の殺菌効果は人体に対し安全性が高い³⁷⁾ことから、食品分野や医療分野で多用されている。さらに、歯科領域においても殺菌効果に関する数多くの報告⁴²⁻⁴⁶⁾がみられる。しかし、その反面オゾンの半減期は非常に短く、液相中では僅か40分程度といわれており、殺菌効果に持続性がないという最大の欠点をも有している²¹⁾。

最近、芝と塩田²⁹⁾はオゾンの利点である強力な殺菌力、消臭力、漂白力、酸化力を有したまま長期間保存可能なオゾンジェルを開発した。このオゾンジェルは、グリセリン溶液にオゾンを含むガスを気液接触させることで製造したもので、グリセリン中の水酸基がオゾンにより選択的に酸化され、グリセリン中に取り込まれてできたオゾン酸化物を含有したジェルである。歯科領域においては、殺菌効果が認められている⁴⁶⁾ものの、齲蝕原因菌等に関する研究報告はみられない。そこで、本研究は、このオゾンジェルの抗菌性に着目し、齲蝕予防剤としての可能性を検討した。

オゾンジェルによる *S. mutans* および *S. sobrinus* に対する MIC は 250 µg/ml、*A. viscosus* では 125 µg/ml であったところから、この抗菌効果が殺菌的であるかどうか resting cell を用いてオゾンジェルの濃度および作用時間で検討した。その結果、Fig. 1~7 に示すように、オゾンジェルの抗菌効果は濃度および処理時間に依存しており、殺菌的であった。本実験において *S. mutans* および *S. sobrinus* がオゾンの作用時間の経過において直線的に死滅しなかったのは、オゾン濃度を MIC 以下で行ったことによるものと考えられた。すなわち、オゾン高濃度下での実験においては直線的に死滅したことからオゾンから発生した分子と細菌細胞の感受性部位との接触あるいは衝突の確立が均等と考えた時、

MIC 以下の濃度ではオゾン分子が少なかったためと推測された。

齋藤らの報告^{47,48)}は、オゾンナノバブル水は数ヶ月にわたってその効果が持続可能であり、直接的に作用するところから、低濃度、短時間で十分な殺菌効果が得られている。本研究で使用したオゾンジェルも数ヶ月その効果が安定し、さらにナノバブル水の 1,000 倍のオゾンを含む徐放性であるところから、より応用範囲が広がるものと期待できる。

一方、タンパク質存在下におけるオゾンの殺菌効果の抑制が齋藤らの報告⁴⁸⁾より影響が少なかったのは、オゾンジェルのオゾン含有量が 1,000 µg/ml と非常に高濃度なこと、および、グリセリンの粘稠性によるのではと考えられた。さらに、*in vivo*に近い実験系として人工歯垢および唾液被覆人工歯垢に対するオゾンジェルの抗菌効果について検討した結果においては、人工歯垢に対してオゾンジェルを処理したところ、わずかに生菌数が減少したものの、その抗菌効果はほとんど認められなかった。このことは、オゾンの抗菌効果はオゾンと接触した表面に限局するという報告^{37,47,48)}と一致している。また、オゾンジェルが *S. mutans* 菌体の産生するグルコシルトランスフェラーゼ等のタンパク質による阻害、あるいはグルコシルトランスフェラーゼによって合成された高分子多糖の糖衣（グルカン）中に浸透しなかったことも要因であると考えられた。さらに唾液被覆人工歯垢に対してオゾンジェルの抗菌効果がほとんど発揮されなかったことは、人工歯垢に対する抗菌効果の減弱に加え、齋藤らの報告^{47,48)}にあるように、唾液中のムチン、アミラーゼなどの様々なタンパク質阻害のため、さらに効果が失われたものと考えられた。

以上の結果から、オゾンジェルは齶蝕原因菌である *S. mutans*, *S. sobrinus* および *A. viscosus* に対して殺菌的に作用することから齶蝕抑制に有用であることが推察された。ま

た、バイオフィルムに対して効果が減弱するところから Professional Mechanical Tooth Cleaning (PMTTC) でバイオフィルムを除去し、歯面が唾液に曝露される前にオゾンジェルを填入したドラッグリテーナーを装着する Dental Drug Delivery System (3DS) を行うことにより、有用性が増すものと推測された。

【結 論】

本研究はオゾンジェルの齲蝕抑制効果を追究するため、*S. mutans*、*S. sobrinus* および *A. viscosus* に対する殺菌作用を中心に基礎的実験を行った。

その結果、以下の結論が得られた。

1. オゾンジェルの *S. mutans* に対する最小発育阻止濃度は 250 µg/ml であった。
2. オゾンジェルの *S. sobrinus* に対する最小発育阻止濃度は 250 µg/ml であった。
3. オゾンジェルの *A. viscosus* に対する最小発育阻止濃度は 125 µg/ml であった。
4. オゾンジェルの抗菌作用は *S. mutans*、*S. sobrinus* および *A. viscosus* に対して殺菌的であった。
5. オゾンジェルはタンパク質の存在によりその抗菌効果が抑制された。
6. オゾンジェルは人工歯垢および唾液被覆人工歯垢で、その抗菌効果が阻害された。

以上のことよりオゾンジェルは齲蝕原因菌に対して顕著な殺菌作用が認められることから齲蝕抑制物質としてのヒトへの応用の可能性が期待できるものと考えられた。また、バイオフィルムに対してその効果が減弱するところから、PMTCによるバイオフィルムの除去後、極力唾液の付着を防止してオゾンジェルを使用した3DSを施術することでさらなる齲蝕予防効果が期待できるものと判断された。

本論文は、主となる参考論文「齲蝕原因菌に対するオゾンジェルの抗菌効果」日本歯科保存学雑誌, 第56巻3号(平成25年6月)発行および副となる参考論文「オゾンジェルを用いた齲蝕予防の可能性」日大口腔科学 第39巻1号(平成25年9月)発行をまとめたものである。

【文 献】

- 1) Hamada S and Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; 44: 331-384.
- 2) Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay; 1986; Microbiol Rev 1986; 50: 353-380.
- 3) Gibbons RJ, Van Heute J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann Rev Microbiol 1975; 29: 19-44.
- 4) Menaker L. 齲蝕-その基礎と臨床 (池田正, 他監訳) . 二版. 医歯薬出版 : 東京 ; 1985. 219-238.
- 5) 高橋信博. 歯垢生態系への生化学的アプローチ. 東北大歯誌 2002 ; 21 : 18-32.
- 6) Ikeda T and Sandham HJ. Prevalence of *Streptococcus mutans* on various tooth surfaces in negro children. Arch Oral Biol 1971; 16: 1237-1240.
- 7) Williams BL, Pantalone RM and Sherris JC. Subgingival microflora and periodontitis. J Periodontal Res 1976; 11: 1-18.
- 8) Holmberg K. Isolation and identification of gram-positive rods in human dental plaque. Arch Oral Biol 1976; 21: 153-160.
- 9) Beighton D and Colman G. A medium for the isolation and enumeration of oral actinomycetaceae from dental plaque. J Dent Res 1976; 55: 875-878.
- 10) Slots J. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. Scand J Dent Res 1977; 85: 247-254.

- 11) McNamara TF, Friedman BK and Kleinberg I. The microbial composition of human incisor tooth plaque. Arch Oral Biol 1979; 24: 91-95.
- 12) Keltjens HM, Schaeken MJ, van der Hoeven JS and Hendriks JC. Microflora of plaque from sound and carious root surfaces. Caries Res 1987; 21: 193-199.
- 13) Ellen RP. Establishment and distribution of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in the human oral cavity. Infect Immun 1976; 14: 1119-1124.
- 14) Irving JT, Socransky SS and Heeley JD. Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. J Periodontal Res 1974; 9: 73-80.
- 15) Syed SA, Loesche WJ, Pape HL and Grenier E. Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque. Infect Immun 1975; 11: 727-731.
- 16) 松島仁志, 塚崎弘明, 芝 燁彦, 金石あずさ, 加瀬智夏, 久保田裕子, 渡辺有美, 塩田剛太郎. オゾン水の特性と医療への応用の可能性. 口腔機水誌 2001 ; 2 : 79-80.
- 17) 赤堀幸男, 村上篤司, 星 昭二. オゾン水の殺菌効果と院内感染予防への応用. 日集中医誌 2000 ; 7 : 3-10.
- 18) 杉田円香, 市川一夫, 近藤 俊, 林 達敏. 術前洗眼消毒としてのクロロヘキシジンとオゾン水の比較検討. IOL & RS 2002 ; 16 : 312-314.
- 19) 水野克巳, 松本道祐, 水谷佳世, 阿部祥英, 堀江 弘, 大楠清文, 林 達敏. オゾン水による臍部の MRSA 殺菌効果に関する検討. 周産期医学 2001 ; 31 : 419-421.

- 20) 花崎秀敏. オゾン水の洗眼消毒効果. 眼科 1999 ; 41 : 1455-1459.
- 21) 日本オゾン協会編:オゾンハンドブック. 第1版. サンヨー書房:神奈川;2004. 67-117.
- 22) 根岸一乃, 高橋慶子, 泉香奈子, 大野建治, 平井香織, 野田 徹, 林 達敏. オゾン水による Laser in situ Keratomileusis の術前消毒とフラップ下洗浄. 日本眼科紀要 2002 ; 53 : 108-112.
- 23) 松尾美佳, 吉原いづみ, 鈴木裕子, 飯田芳子, 土井松幸. オゾン水での手洗いの検討. ICY と CCU 2001 ; 25 : 137-140.
- 24) 五十洲剛, 管 桂一, 林 達敏, 藤井真行. オゾン水を利用した手術時手洗いの検討. 麻酔 2001 ; 50 : 672-675.
- 25) 中村利彦, 板橋家頭夫, 小川雄之亮. NICU におけるオゾン水による手洗いの有用性—他剤手洗いによる手荒れとの比較検討—. 日未熟児新生児会誌 2000 ; 12 : 43-46.
- 26) 花崎秀敏. オゾン水による洗眼消毒と白内障術後経過. 眼科手術 2000;13:456-458.
- 27) Murakami H, Ito Y, Fujii Y, Hattori M, Asai A, Noguchi T, Kawai T, Hasegawa J. New denture cleaner using ozone. Influence of temperature and humidity on formation of ozone. Aich-Gakuin Dent Sci 1995; 8: 47-52.
- 28) 村上 弘, 水口三保, 加藤大輔, 横山 隆 , 伊藤 裕. オゾン洗浄による義歯の脱臭効果について—官能試験法による検討—. 老年歯学 2004 ; 19 : 3-7.
- 29) 芝 燁彦, 塩田剛太郎. オゾン溶存グリセリン溶液, オゾン溶存グリセリン固化物, オゾン溶存混合溶液, オゾン溶存グリセリン溶液の製造方法, 及びオゾン溶存グリセリン溶液の保存方法. 日本特許庁 2005 ; 特許公開 2005-232094.

- 30) Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc* 1960; 61: 9-19.
- 31) Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol* 1960; 1: 304-320.
- 32) Jordan HV, Keyes PH, Bellack S. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. *J Periodont Res* 1972; 7: 21-28.
- 33) Socransky SS, Hubersak C, Propas D. Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. *Arch Oral Biol* 1970; 15: 993-995.
- 34) Keyes PH . Present and future measures for dental caries control. *J. Am. Dent. Assoc* 1969; 79: 1395-1404.
- 35) Newbrun, E. *Cariology*, 2nd ed. The wiliams and Wilkins company: Baltimore; 1978. 308-326.
- 36) 厚生労働省医政局歯科保健課編. 平成 23 年歯科疾患実態調査報告. 口腔保健協会 : 2011.
- 37) 古畑貞彦, 西村チエ子, 澤谷ゆき江, 古山信明, 清水昌巳, 中山聖英, 宮脇憲蔵. オゾン水を用いた低温下の器具洗浄殺菌手法の検討. *医器学* 2001; 71: 284-290.
- 38) 伊藤泰郎. オゾンによる殺菌・不活化, オゾンの不思議 毒と効用のすべて. 講談社 : 東京 ; 1999. 87-95.
- 39) Scott DBM, Leshner EC. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia*

coli. J. Bacteriol 1962; 85: 567-576.

- 40) Goldstein BD, Lodi C, Collinson C and Bachum OJ. Ozone and lipid peroxidation. Arch Environ Health 1969; 18: 631-635.
- 41) 神力就子. MRSA 院内感染に対するオゾン殺菌法の有効性 オゾンによる殺菌機構と褥瘡性潰瘍に対する治療の実際. Mebio 1993; 10: 138-143.
- 42) 辻上 弘. オゾン水の歯周病原細菌に対する殺菌効果および細胞傷害性に関する研究. 日歯周誌 2002; 44: 46-54
- 43) 村上 弘, 水口三保, 服部正巳, 池戸泉美, 河合達志. オゾン水を利用した義歯洗浄器のメチシリン耐性ブドウ球菌 (MRSA) とウィルスに対する殺菌効果. 日本医療・環境オゾン研究会会報 2002 ; 32 : 2-5.
- 44) 水口三保, 村上 弘, 服部正巳, 鬼頭 喬, 伊藤 裕, 河合 達志, 浅井 昭博, 野口 俊英. オゾンを利用した義歯洗浄法に関する研究 -オゾンバブル法による *Candida albicans* の殺菌効果について-. 老年歯学 ; 2002 ; 17 : 156-161.
- 45) 新實一仁, 金石あずさ, 芝 燁彦, 塚崎弘明, 岩佐文則, 平田智秀. オゾンジェルの殺菌効果について. 昭歯誌 2004 ; 24 : 103-109.
- 46) 加藤友規, 堀場直樹, 松本 亨, 中村 洋. オゾンジェルの歯内治療領域への応用 -殺菌効果および細胞傷害性の検討-. 日歯内療誌 2012 ; 33 : 20-28.
- 47) 齋藤真規, 續橋治, 川島義章, 尾関由倫, 高田和子. オゾンナノバブル水の含嗽剤としての可能性 -第1報 抗菌作用に対する物理・化学的因子の影響-. 日大口腔科学 2009; 35: 103-108.

- 48) 齋藤真規, 續橋治, 石田聡, 高田孝一, 高田和子. オゾンナノバブル水の含嗽剤としての可能性 -第2報 付着菌体と人工歯垢形成菌体に対する抗菌効果-. 日大口腔科学 2009; 35: 114-118.

Basic Study on Caries Prevention with ozone gel

Koizumi Naoya

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
(Director: Prof. Ikemi Takuji)

Abstract

Ozone, which is frequently used in medical fields, generates OH radical, of which an oxidative dissolution can provide highly effective biocidal properties with the further benefit of not allowing the emergence of ozone resistant bacteria.

In medical treatment performed through dentistry, because its effects of sterilization, anti-inflammation, and hemostasis are also emphasized, the possibilities of ozone water's use to wash and sterilize dentures or periodontal pockets and as a cleaning liquid to treat root canal sites have been examined.

Furthermore, its other new usages are expected to be developed.

However, the application scope of ozone is limited. Because of its short half-life.

Then, ozone gel is developed to keep its biocidal properties for a long time and to widen the scope of its application. To assess its antimicrobial activity, we performed experiments for possibility of ozone for prevention of dental caries *in vitro*.

As a result, the following conclusions were drawn:

1. The minimum inhibitory concentration against *S. mutans* was revealed to be 250

µg/ml.

2. The minimum inhibitory concentration against *S. sobrinus* was revealed to be 250

µg/ml.

3. The minimum inhibitory concentration against *A. viscosus* was revealed to be 125

µg/ml.

4. The antibacterial activities were found to be a bactericidal effect against resting cells of *S. mutants*, *S. sobrinus* and *A. viscosus*.

5. Ozone gel inhibited the antibacterial effect by the existence of protein.

6. Ozone gel inhibited the antibacterial effect by the saliva and artificial plaque.

From the above, ozone gel was found to have prominent bactericidal effect against cariogenic bacteria. Furthermore, protein, saliva and artificial plaque inhibited the antibacterial effect of ozone gel. These results suggested that the caries prevention is possible by professional mechanical tooth cleaning and damp proofing of saliva prior to treatment of dental drug delivery system.

図および表

Table 1

MIC of ozone gel to *S.mutans*, *S.sobrinus* and *A.viscosus*

Bacteria	MIC ($\mu\text{g/ ml}$)
<i>S. mutans</i>	250
<i>S. sobrinus</i>	250
<i>A. viscosus</i>	125

MIC : Minimum inhibitory concentration

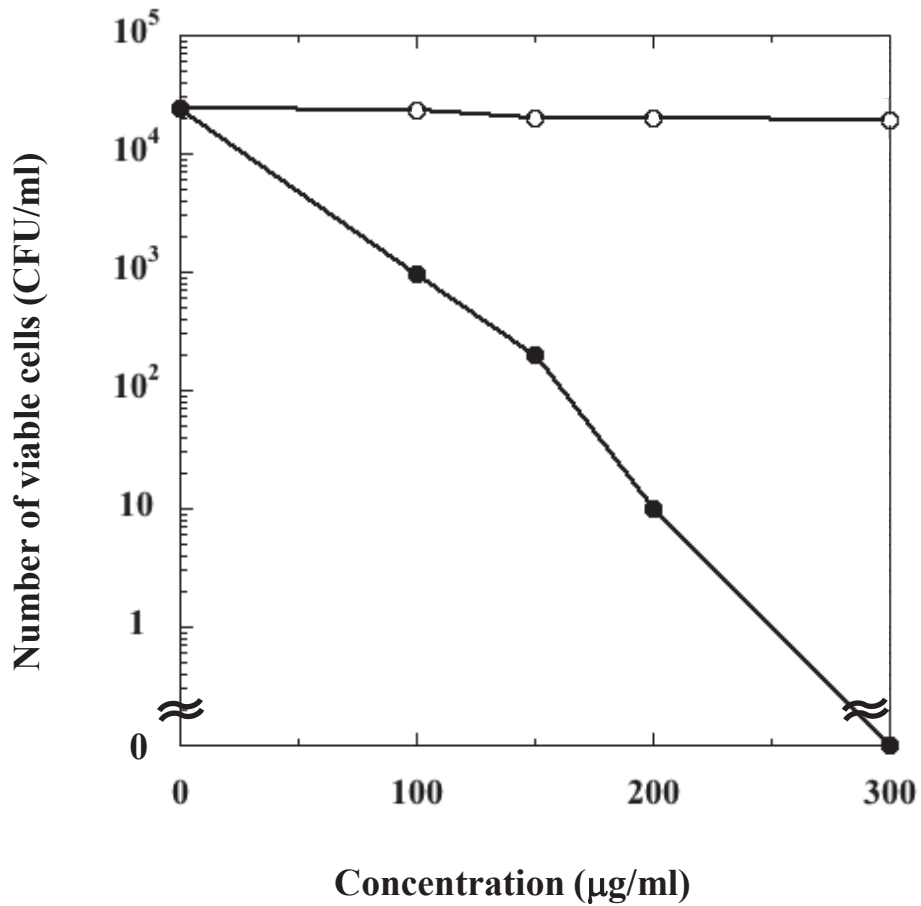


Fig. 1 Antibacterial effect of ozone on *S. mutans* resting cells .
 Cells were treated with various concentrations for 60 min.
 ● : With ozone, ○ : Without ozone

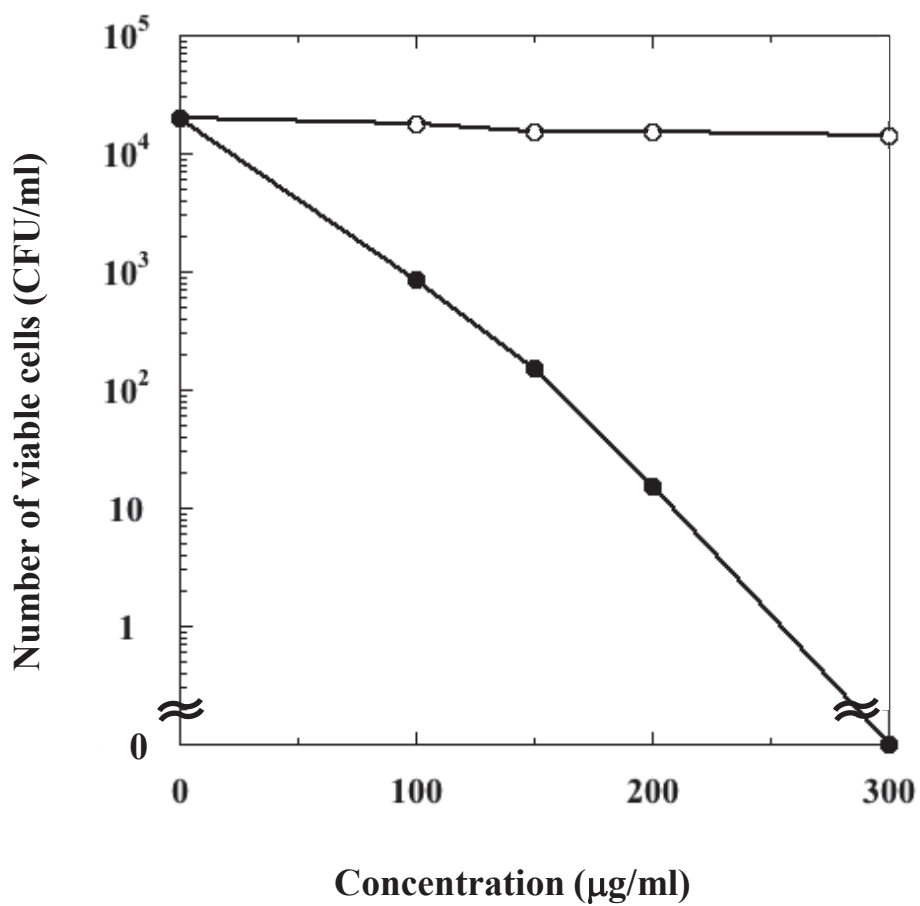


Fig. 2 Antibacterial effect of ozone on *S. sobrinus* resting cells .
Cells were treated with various concentrations for 60 min.
● : With ozone, ○ : Without ozone

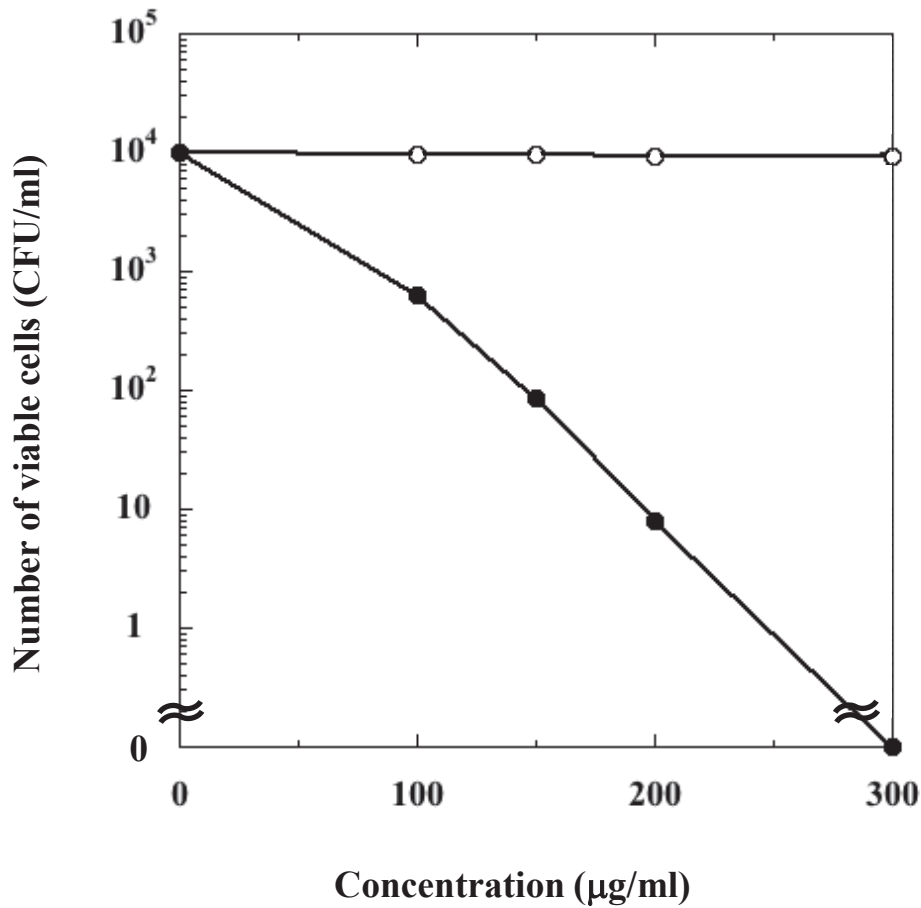


Fig. 3 Antibacterial effect of ozone on *A. viscosus* resting cells .
Cells were treated with various concentrations for 60 min.
● : With ozone, ○ : Without ozone

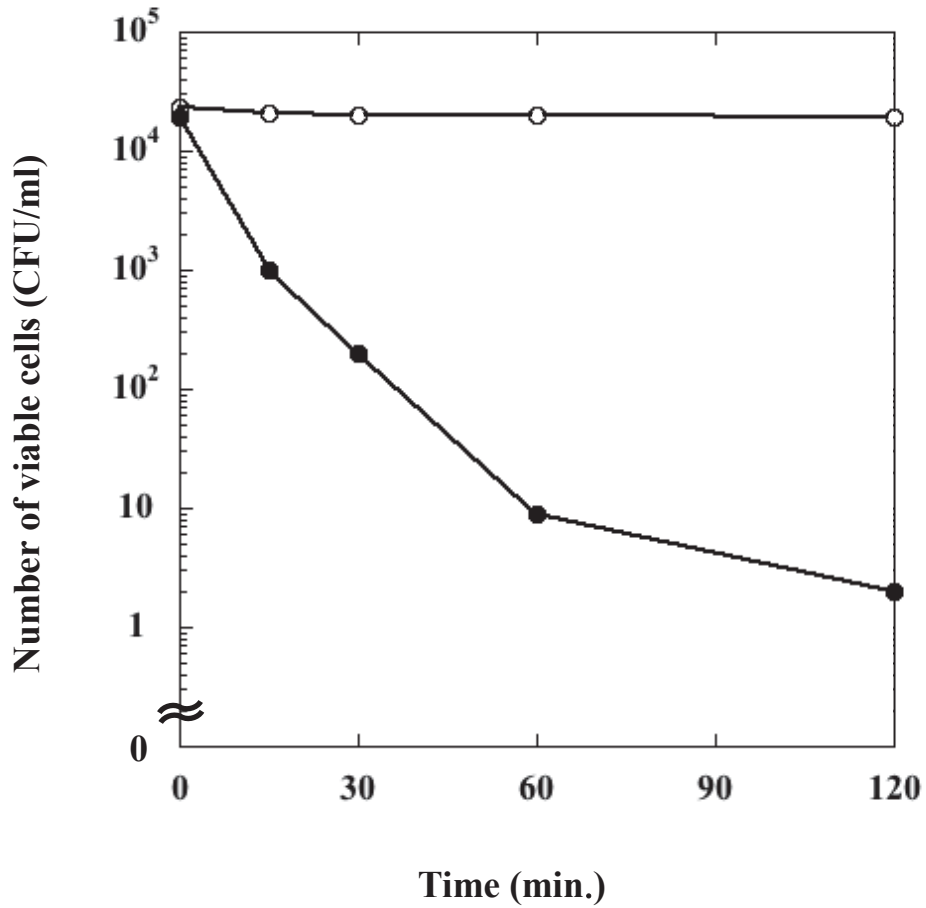


Fig. 4 Antibacterial effect of ozone on *S. mutans* resting cells . Cells were treated with 200 µg/ml ozone gel for various incubation time. ● : With ozone, ○ : Without ozone

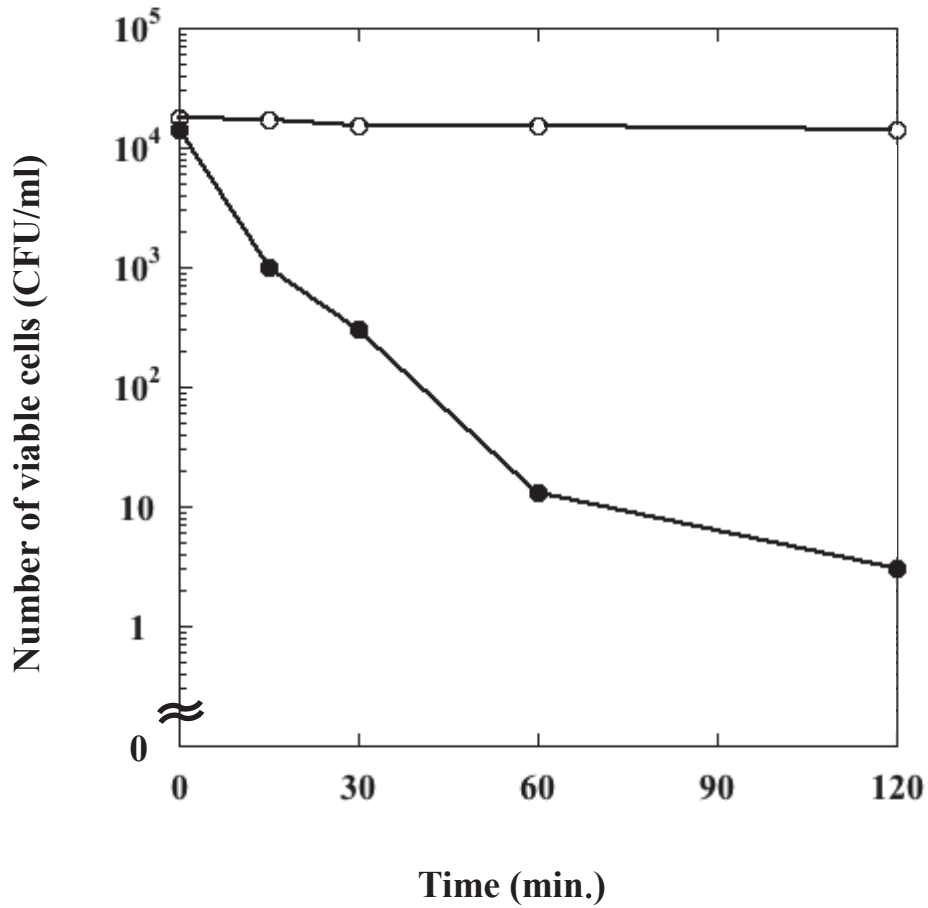


Fig. 5 Antibacterial effect of ozone on *S. sobrinus* resting cells . Cells were treated with 200 µg/ml ozone gel for various incubation time. ● : With ozone, ○ : Without ozone

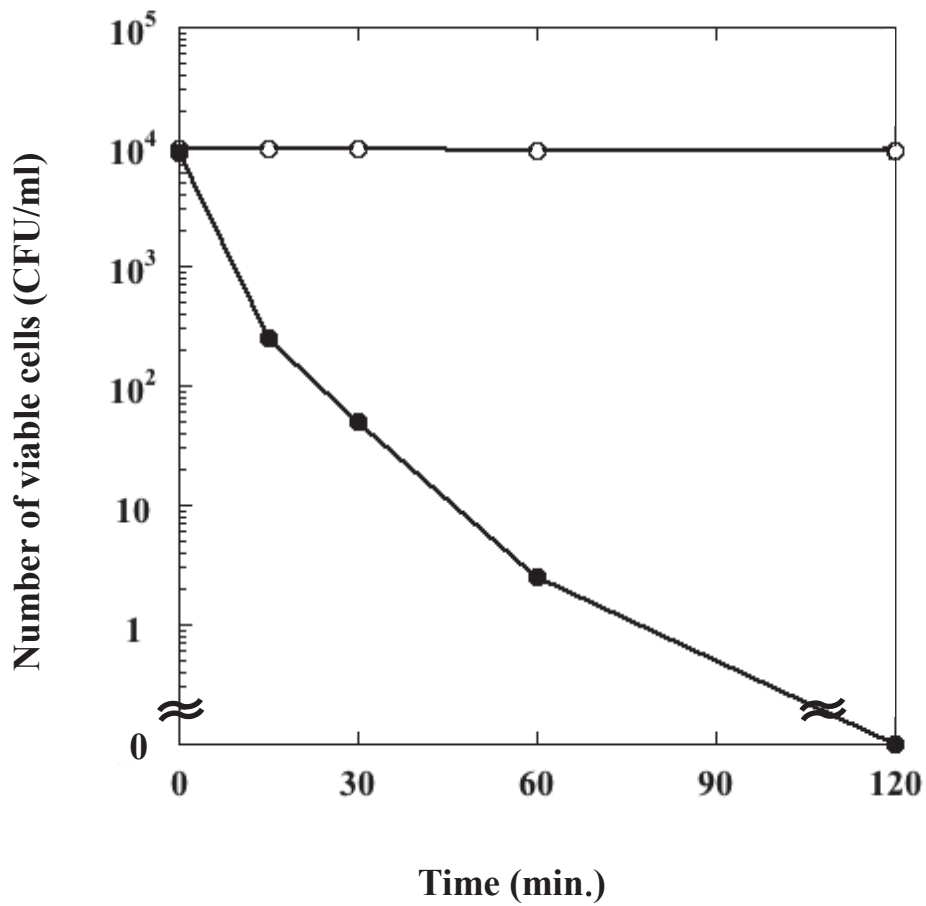


Fig. 6 Antibacterial effect of ozone on *A. viscosus* resting cells . Cells were treated with $200 \mu\text{g/ml}$ ozone gel for various incubation time. ● : With ozone, ○ : Without ozone

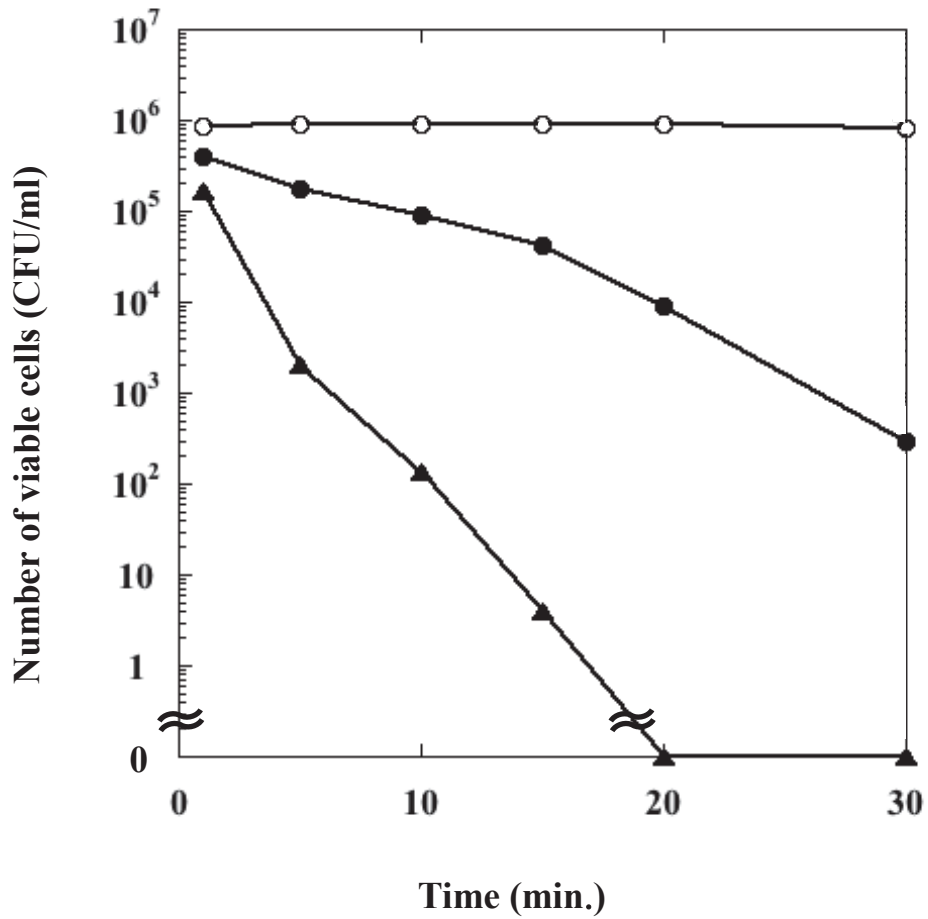


Fig. 7 Influence of BSA to antibacterial effect of ozone on *S. mutans* resting cells .

○ : glycerin, ● : ozone gel with BSA, ▲ : ozone gel

Table 2

The antibacterial effect of ozone gel on artificial plaque and saliva coated artificial plaque.

	CFU/ml (x 10⁷)	Survival ratio (%)
A	8.60 ± 0.66*	100.0
B	3.13 ± 2.35	36.4
C	8.57 ± 0.56	99.7
D	0	0

A : artificial plaque treated with PBS.

B : artificial plaque with ozone gel.

C : saliva coated artificial plaque with ozone gel.

D : planktonic cells with ozone gel.

*** , mean ± SD**