

初期う蝕予防のための洗口法への竹炭浸漬液の利用に関する基礎的実験的検討

- 竹炭浸漬液のヒトう蝕誘発細菌への抗菌効果（2） -

那 須 恵 子 ・ 藤 原 愛 子

Preliminary examination about availability of bamboo charcoal soak liquid as mouthwash for early stage dental caries prevention

Keiko Nasu and Aiko Fujihara

目的

う蝕は特に、乳歯や永久歯萌出期の不十分なエナメル質形成期に、細菌の栄養源であるショ糖等の糖質を摂取する事により多く発生することが知られている¹⁾。近年、幼若永久歯へのフッ素取り込みによるフルオロアパタイト形成がう蝕予防効果を有することが明らかとなり²⁾、初期う蝕予防対策のため、フッ化物塗布あるいはフッ素洗口法等の公衆衛生的普及活動が行われているが、フッ素は薬物であるため、その取り扱いには管理上の注意が必要である³⁾。また、歯科保健指導の進展により、12歳児のDMFT指数（一人平均虫歯数）は1975年をピークに減少傾向にあるが⁴⁾、う蝕の軽症化による初期う蝕者の占める割合は増加する傾向にあり⁵⁾、家庭でも手軽にできる予防法の開発が期待される。

本研究では竹炭浸漬液が種々のミネラルを含むアルカリ水であることに着目し、竹炭浸漬液及びその他竹抽出液の簡便で、安全な洗口液としての可能性を検討することを目的とする。本年度は抗菌効果の定性・定量的確認試験を実施した。

方法

[実験材料及び供試菌]

竹炭浸漬液：竹炭 100g を蒸留水へ浸漬して数分間煮沸後、その溶液を捨て、蒸留水洗浄し、新たに蒸留水 300ml を加え、1日冷蔵保管、原液とする。フィルタ - 除菌後、試料原液とした。

その他竹炭及び竹抽出液： 竹炭粒子、竹炭粉末、生竹粉碎物等の6種類の竹抽出液

を調整した。各試料を滅菌水で加熱抽出あるいは滅菌水で混合してから、その溶液をろ紙でろ過、フィルタ - 除菌し、試料液 No.1 ~ No.6 及び竹酢液のフィルタ - 除菌した溶液 2 種類 (No.7、8) を用意した。

対照液として、レモン果汁 (ろ紙でろ過、フィルタ - 除菌し供試液とした)、バシトラスン (8 単位及び 16 単位) 溶液を用意した。

供試菌：日本大学松戸歯学部感染・免疫学講座より分譲された *Streptococcus mutans* (以下 JC2 株とする) および *Streptococcus sobrinus* (以下 6715 株とする) を用いた。

前培養： Brain Heart Infusion 液体培地 (以下 BHI 液体培地) 2ml へ、試験菌を各 1 白金耳 (10 µl ディスポール-プ使用) 接種し、37 °C、16 時間培養した。

供試菌液：前培養菌液を BHI 液体培地で 1000 倍希釈した。

[実験方法]

実験 1. 各種試料液の JC2 株及び 6715 株への生育抑制効果の観察 (試験管希釈法)

各種試料液の濃度が 50, 25, 12.5, 6.3, 3, 2, 1, 0.5, 0.25% 濃度になるように BHI 液体培地で希釈した希釈列を作成し、試料液と同量の菌液を添加、37 °C で 20 時間培養した。

- ・試験管 No.1 (試料原液 2.5ml + 菌液 2.5ml)
- ・試験管 No.2 ~ No.9 (試料液希釈列：予め BHI 2.5ml を各試験管へ入れ、試料原液 2.5ml を No.2 へ入れ、よく混合し、順次各試験管総量が 2.5ml になるように段階希釈する) へ菌液 2.5ml を入れる。
- ・試験管 No.10 (BHI 2.5ml + 菌液 2.5ml)

さらに、菌の生育がみられなかった試験管の前後の試験管より培養液各 1ml を BHI 寒天培地 10ml へ混釈培養し、37 °C、48 時間培養後、細菌数を観察した。

実験 2. 各種試料液の JC2 株及び 6715 株に対する生育抑制試験 (穿孔平板法)

基層培地及び種層培地の作成

MS 寒天培地を用いて、以下のようにそれぞれ分注、固化させた平板を作成し、

基層培地：MS 培地 (10ml)

種層培地：MS 培地 (10ml) + 1000 倍希釈した培養菌液 (1ml)

ステンレスカップ (10H × 外径 8 mm 内径 6mm : システムサイエンス社製カップ ZC-DC) を用いて平板穿孔を行い、1 平板あたり 3 ~ 4 個の孔を設置した。

試料添加

1 平板のそれぞれの孔へ同一試料液を 50 μ l ずつ入れ、アネロパック微好気を用いて 37 $^{\circ}$ C、24 時間培養した。No.1 ~ No.8 及び対照の試料液はすべて同様の操作で培養し、阻止帯の巾を計測した。

実験 3. 各試料液の供試時の pH を測定した (堀場 B-212 型 twinpH 計使用)。

結果及び考察

実験 1 :

希釈列のうち、6715 株 (*S. sobrinus*) において、試料液 No.3, 6, 7 では菌の生育抑制効果がみられた。JC-2 株 (*S. mutans*) においても No.6, 7 では 6715 株と同様の生育抑制効果がみられ、No.3 では 6715 株よりも低い生育抑制効果がみられた。

試料液No.	6715株 ¹⁾	JC-2株 ¹⁾
1	-----	-----
2	-	-
3	+ (~ 12.5%)	+ (~ 25%)
4	-	-
5	-	-
6	+ (50%)	+ (50%)
7	+ (~ 6.3%)	+ (~ 6.3%)
8	-	-
レモン果汁	+ (~ 6.3%)	+ (~ 12.5%)
バシトラシン	+ (8U)	+ (8U)

(+:抑制有り, ±:やや抑制, -:抑制なし, -----:試験なし) %:抑制がみられた試料液濃度

¹⁾ 6715 株 : *Streptococcus sobrinus*, JC-2 株 : *Streptococcus mutans*。

実験 2 及び 3 :

6715 株及び JC-2 株ともに比較的酸性域の試料によって生育を抑制される傾向がみられた。

試料液No.	6715株 ¹⁾	JC-2株 ¹⁾	pH
--------	---------------------	---------------------	----

1	-	-	9.0
2	-	-	9.0
3	-	-	9.5
4	±	±	4.5
5	+ (6.92)	±	4.7
6	+ (2.19)	+	4.0
7	+ (3.48)	+ (4.1)	3.1
8	-	-	9.0
レモン果汁	+ (5.21)	+ (4.5)	2.3
バシトラシン ²⁾	+ (1.77)	+ (2.5)	6.7

(+:抑制有り, ±:やや抑制傾向, -:抑制なし、()内は阻止帯の巾; mm)

¹⁾6715 株 : Streptococcus sobrinus, JC-2 株 : Streptococcus mutans。

²⁾16U

試験管希釈法において、完全な抑制効果がみられたものは先の表に示すとおりであるが、ほとんどの竹試料液において、希釈段階に応じた濃度勾配が観察された。また、試料液 No.3 及び対照液のレモン果汁における 6715 株と JC-2 株に対する生育抑制効果について若干、菌による濃度差がみられた。

また、穿孔平板法においても、菌による試料液に対する反応に差がみられた。今後、これらの菌による特徴についてさらに検討していく予定である。

[参考文献]

- 1) 早川太郎他, 口腔生化学, 医歯薬出版, p.224-225, p.106-107, 2003
- 2) 浜田茂幸編, 口腔微生物学・免疫学, 医歯薬出版, p.254-276, 2000
- 3) 大嶋隆 編, う蝕予防のための食品科学, 医歯薬出版, p.22-26, 1996
- 4) 厚生省健康政策局歯科保健課監修, 歯科保健指導関係資料, 口腔保健協会, 2000
- 5) Charles O.E., et.al., Potential use of tea extract as a Complementary mouthwash:Comparative evaluation of two commercial samples. The journal of alternative and Complementary medicine, Vol.7(5), p.523-527, 2001