

## 原 著

*Enterococcus faecalis* が形成するバイオフィームに対する  
中性電解機能水パーフェクトペリオ®の抗菌効果に関する基礎的研究

中村 裕子 杉山 僚 小此木 雄 関根 慧 牛込 瑛子  
高橋 慶壮\* 小谷 依子 中村 幸生

明海大学歯学部機能保存回復学講座歯内療法学分野

\*奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯周病学分野

A basic study of the antibacterial effects of electrolysis neutral water  
Perfect Perio® on *Enterococcus faecalis*-derived biofilm

NAKAMURA Yuko, SUGIYAMA Ryo, OKONOGI Yu, SEKINE Kei, USHIGOME Eiko,  
TAKAHASHI Keiso\*, KOTANI Yoriko and NAKAMURA Yukio

Division of Endodontics, Restorative and Biomaterials Sciences, Meikai University School of Dentistry

\*Department of Conservative Dentistry, Division of Periodontics, Ohu University School of Dentistry

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the antimicrobial effects of electrolyzed neutral water (Perfect Perio®) (PPW) on *Enterococcus faecalis* formed biofilm. This PPW contained hypochlorous acid concentrations at 600–700 ppm in pH 7.5. The effects of PPW were compared with those of NaClO and sterilized water (DW). Biofilms of *E. faecalis* were induced on tissue-culture plates. An overnight culture of *E. faecalis* grown in brain-heart-infusion broth was seeded (initial concentration of  $10^{7-8}$  cells/mL) with trypticase soy broth (with 0.25% glucose), which was incubated under aerobic conditions for 48h to allow biofilm formation. After incubation, the biofilms were irrigated with PBS and treated as irrigants. The remaining biofilms were stained with crystal violet to gratify the amounts of biofilm, which were determined using a microplate reader. Morphological changes of *E. faecalis* biofilm by NaClO, PPW or DW were investigated by SEM.

NaClO can disaggregate and remove biofilm at all times, and treatment with PPW can cause a high degree of biofilm disaggregation. SEM analysis showed that 5% NaClO eliminated the bacteria completely, PPW was capable of disrupting and removing the biofilm, but not eliminating the bacteria.

According to the results, PPW showed the highest eliminatory effect on the *E. faecalis*-derived biofilm.

**Key words :** biofilm, electrolyzed neutral water, antimicrobial effect

(日歯内療誌 31(1) : 29~35, 2010)

## 緒 言

水に微量の食塩を添加して電気分解することにより、陽極からは酸性、陰極からはアルカリ性の電解水が得られる。この電解水を殺菌剤・消毒剤として使用

するという試みは、MRSAなどの抗生物質耐性菌の出現が問題となり始めた1980年代頃より行われている<sup>1,2)</sup>。陽極から分離される強酸性の電解機能水は、広い抗菌スペクトルをもつ殺菌効果があり<sup>3)</sup>、しかも、薬剤耐性の原因となることもなく、生体組織に対する刺激性も少ないことから<sup>4)</sup>、消毒剤として医療分野での応用が期待されてきた。電解水の殺菌メカニズムは、溶液中の塩素( $\text{Cl}_2$ )、一酸化塩素( $\text{ClO}^-$ )、次亜塩

素酸(HClO)などの塩素イオンにあると考えられ<sup>5)</sup>,そのなかで最も強力な殺菌作用を示すのはHClOとされている。しかし,初期に開発された酸性電解水<sup>6)</sup>は,有効塩素濃度20ppmから40ppmであり,その殺菌効果の主体をなすHClOが不安定<sup>7,8)</sup>であったため,長期間の殺菌力を保持することが困難であった。また,歯科領域においては,水素イオン濃度がpH2.7以下であったため,歯質に対する脱灰作用などの影響<sup>9)</sup>が懸念されていた。これらの問題を解決するため,電解質として添加する薬剤を検討し,長時間の安定性,緩衝能をもたせた電解機能水が研究されるようになってきた<sup>10,11)</sup>。

歯科臨床において,消毒剤としての応用を考えた場合,バイオフィームに対する効果を明らかにしなければならない。すなわち,歯科領域においてもバイオフィーム感染症の概念が提唱され,齲蝕・歯周病および歯内疾患は,バイオフィーム感染症であると定義されるようになってきたからである<sup>12~14)</sup>。特に歯内療法領域では,難治性を示す根尖性歯周炎の症例において,根尖部に形成されたバイオフィームの関与が報告されている<sup>15,16)</sup>。そのため根管治療における根管洗浄剤や,外科的歯内療法の際に使用する根尖孔の内外を洗浄する洗浄剤にも,バイオフィーム除去効果およびバイオフィーム内細菌に対する抗菌効果が求められるようになった。現在,根管治療の化学的清掃剤として広く使用されている次亜塩素酸ナトリウム溶液(NaClO)は,バイオフィーム形成菌に対しても有効な殺菌力をもつことが知られている。しかし,口腔粘膜への漏洩や皮膚への付着による傷害への不安は,かねてから懸念されており<sup>17)</sup>,これに代わる根管洗浄剤の登場が望まれていた。

高濃度次亜塩素酸電解機能水(パーフェクトペリオ®;PPW,野口歯科医学研究所)は,有効塩素濃度600~700ppmと高濃度を示し,また水素イオン濃度は,組織に対する傷害性を考慮して中性に近いpH7.5を維持している。さらに,1カ月以上の長期安定した保存が可能である。

今回,PPWの根管洗浄剤としての可能性を明らかにする目的で,難治性の根尖性歯周炎の原因菌の一つであり,バイオフィーム形成細菌としても知られている<sup>18~20)</sup>*Enterococcus faecalis* 740(以下*E. faecalis*)を用いて,バイオフィーム除去効果および抗菌効果について検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 電解機能水

PPWは,パーフェクトペリオ精製装置により,実

験直前に精製して用いた。この電解機能水の性質をpH測定器(I SEET pH Meter KS701®,日本ベンダーネット)および残留塩素測定器(AQUAB SIBATA®,柴田化学)にて検査した結果,pH:7.2,残留塩素濃度:650ppmであった。また,比較対象として5%次亜塩素酸ナトリウム溶液(以下NaClO)と蒸留水(以下DW)をそれぞれ実験に用いた。

### 2. バイオフィーム試料の作製

供試菌には*E. faecalis* 740菌株(岡山大学大学院歯薬学総合研究科泌尿器病態学 狩山玲子博士より供与)を用いた。*E. faecalis*によるバイオフィーム形成は,Tamuraら<sup>21)</sup>の方法に準じて行った。すなわち,4°Cで保存した状態の*E. faecalis*菌液1mLをBrain heart infusion broth(BHI)の液体培地50mL中で37°C・24時間培養した。培養後の菌液を遠心分離し,得られた菌体をリン酸緩衝液(Phosphate-buffered saline without calcium and magnesium:PBS(-),日本製薬)50mLにて2回洗浄し,さらに脱イオン水にて懸濁させ,分光光度計(Graphicord UV240;島津製作所)にて毎回Optical Density 0.5(600nm)( $1.0 \times 10^7$  colony-forming unit(CFU)・mL)になるように調整した。得られた菌液(60μL)をTryptic soy broth(TSB)+0.25% glucose(140μL)にて96穴マイクロウェルプレート(Becton Dickinson,USA)上で37°C,好気条件下にて48時間培養した。培養後,上層の培養液を吸引し,脱イオン水にて2回洗浄を繰り返した。その後,プレートを乾燥させ,サフラニン染色液(0.25% safranin and 0.5% ethanol in H<sub>2</sub>O;武藤化学)にて15分間染色した。さらに染色された試料の吸光度を吸光度計(Mulutiskan JX,大日本製薬)を用いて450nmの波長にて測定し,1.0以上の値が得られることを確認した。この方法で得られた試料をバイオフィーム形成の試料とし,以下の実験はこの条件下で作製した試料を用いて行った。

### 3. 有効塩素濃度の変化によるバイオフィーム除去効果

各種溶液における有効塩素濃度の差によるバイオフィーム除去効果の変化を検討するため,以下の方法で実験を行った。すなわち,96穴の各ウェルにバイオフィーム試料を形成させ,PBSにて2回洗浄後,有効塩素濃度を600~20ppmの8段階に設定したPPW,NaClOおよびDWをそれぞれ200μLずつ添加して2分間作用させた。その後脱イオン水にて2回洗浄し,乾燥した後にサフラニン染色液にて染色した。残存したバイオフィーム試料を吸光度にて測定し,有効塩素濃度によるバイオフィーム除去効果を検討した(n=

5). 以下, 染色および吸光度の測定はすべて同様に行った.

#### 4. 温度変化によるバイオフィーム除去効果

バイオフィーム除去効果に対する溶液の温度条件による影響を検討するため, 有効塩素濃度 600, 200, 80 ppm に調整した各溶液を 4°C, 20°C, 38°C に変化させ, PPW, 5% NaClO ならびに DW をバイオフィーム試料に対して 200  $\mu$ L, 2 分間, それぞれ作用させた. その後, 染色し, 吸光度を測定した (n=5).

#### 5. 各溶液の洗浄回数によるバイオフィーム除去効果

洗浄回数が除去効果に及ぼす影響を検討した. 実験には, 5% NaClO および精製直後の 650 ppm の PPW を用い, バイオフィームに対して洗浄を試みた. 洗浄条件は, 各溶液量: 200  $\mu$ L, 1 回の洗浄時間: 10 秒間, 洗浄回数: 1, 2, 3, 4, 5 回とした. その後, 染色し, 吸光度を測定した (n=5).

#### 6. 走査型電子顕微鏡による観察

明海大学倫理規定に準じてヒト上顎中切歯の抜去歯を実験に用いた. 試料作成のため 9 本の中切歯をそれぞれ縦方向に割断し, 根中央部から 5 mm 角程度の断片を作成し, 試料とした. 各試料を 15% EDTA と 5% NaClO 溶液および脱イオン水の順にて十分に洗浄した後, オートクレーブにて滅菌した. その後 24 穴プレート (Falcon 3047, Becton Dickinson, USA) の底面に静置し, その上にバイオフィーム試料を形成させた. 形成された試料の上の培養液を吸引し, 各種溶液 (DW, PPW, 5% NaClO) を 2 mL 添加して 1 分間反応させた. その後, PBS にて 2 回洗浄し, 各ウェル内の試料を 2.5% グルタルアルデヒドで前固定した後, 0.1 M カコジル酸で洗浄し, 室温にて乾燥後, 金蒸着処置を行ったうえで, 走査型電子顕微鏡 (6360LV, 日本電子) によって形態学的特徴を観察した.

## 結 果

#### 1. 有効塩素濃度の変化によるバイオフィーム除去効果

各溶液は, 有効塩素濃度に依存してバイオフィーム除去効果を示した. すなわち, 高濃度の HClO を有する NaClO および PPW は, DW と比較してともに高いバイオフィーム除去効果を示した. また NaClO は, PPW よりもすべての有効塩素濃度において高いバイオフィーム除去効果を示した (図 1). PPW のバイオフィーム除去効果は, 有効塩素濃度 600 ppm から 200 ppm では高い効果を示したが, 100 ppm 以下になる

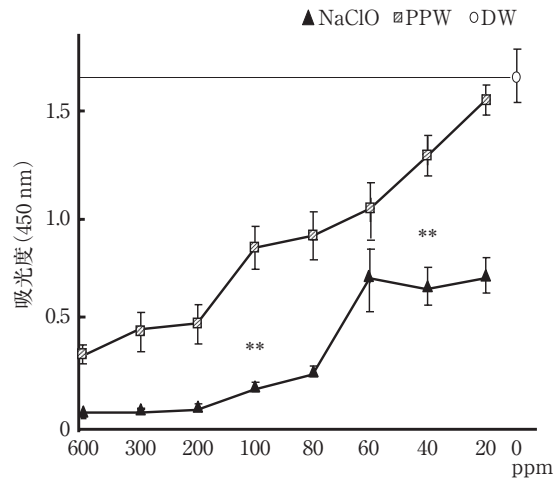


図 1 有効塩素濃度の変化によるバイオフィーム除去効果

各溶液にて 2 分間作用させた後のバイオフィーム残留量を計測. n=5, \*\*P<0.01

と徐々に低下する傾向を認めた.

#### 2. 温度変化によるバイオフィーム除去効果

4°C, 20°C, 38°C に調整した各溶液のバイオフィーム除去効果を比較したところ, 600 ppm の場合では, 温度変化による影響はきわめて少なかった. しかし, 低濃度に調整した 200 ppm と 80 ppm においては, 各溶液ともに, 温度上昇に伴いバイオフィーム除去効果上がる傾向を示した (図 2).

#### 3. 各溶液の洗浄回数によるバイオフィーム除去効果

洗浄回数によるバイオフィーム除去効果を検討した結果, NaClO は 1 回の洗浄で, バイオフィームに対してきわめて優れた除去効果を示した. PPW は 2 回目の洗浄で NaClO の除去効果に近づく結果を示し, 3 回目以降の洗浄では, ほぼ NaClO と同じ効果が認められた (図 3).

#### 4. 走査型電子顕微鏡による観察

試料上に形成したバイオフィームに対する各溶液の除去効果を走査型電子顕微鏡により観察した結果, NaClO および PPW はともに明らかなバイオフィームの除去効果を示した. NaClO による洗浄では, 試料上にバイオフィームも *E. faecalis* の菌体もともに認められなかった. PPW では, 明らかなバイオフィーム除去効果を示したが, 試料上に細菌の残存を散見した (図 4).

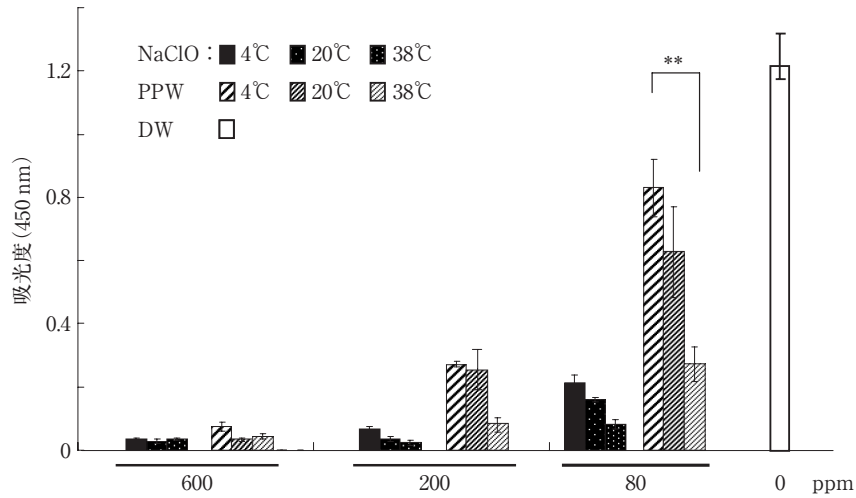


図2 温度変化によるバイオフィーム除去効果  
各溶液にて2分間作用後のバイオフィーム残留量を計測. n=5, \*\*P<0.01

## 考 察

自然界の多くの細菌は、バイオフィームの状態で生息しているため、菌に対する抗菌効果を検討する場合、バイオフィームの影響を想定する必要がある。バイオフィーム内の細菌は、浮遊状態の細菌よりも、抗菌剤に対し1,000倍以上の耐性を示すことが知られている<sup>12,22)</sup>。したがって、一般に浮遊菌に対して効果があるとされている抗菌剤であってもバイオフィームにはあまり効果を示さないものも多い。

難治性根尖性歯周炎の根尖孔周辺や深在性の歯周ポケットを有する歯根外表面には、バイオフィーム形成の存在が観察され<sup>15,23)</sup>、機械的な除去が必要とされている。しかし実際の臨床においては、通常の根管治療はもちろん、スケーリングやルートプレーニング等の処置を明視野下で行うことは難しく、細菌や汚染物質を残存させてしまう可能性もある。また、症例によっては外科的対応ができないこともあり、補助として利用する洗浄剤もバイオフィーム除去効果を有するものが望ましいと思われる。

根管の化学的洗浄剤として使用されているNaClOは、強いバイオフィームの除去効果を有することが知られている<sup>24,25)</sup>。しかし、同時に宿主組織に対する傷害性が強い<sup>26,27)</sup>ため、歯肉粘膜や根尖孔外への漏洩による細胞傷害の危険性が指摘されている。PPWは、NaClOと同様にHClOを殺菌の主成分としているが、NaClOのような $\text{NaClO} \rightarrow \text{Na}^+ + \text{OCl}^-$ や $\text{OCl}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{OH}^-$ の産生がないことや、水素イオン濃度が中性にきわめて近い値(pH7.5)であるため、宿主組

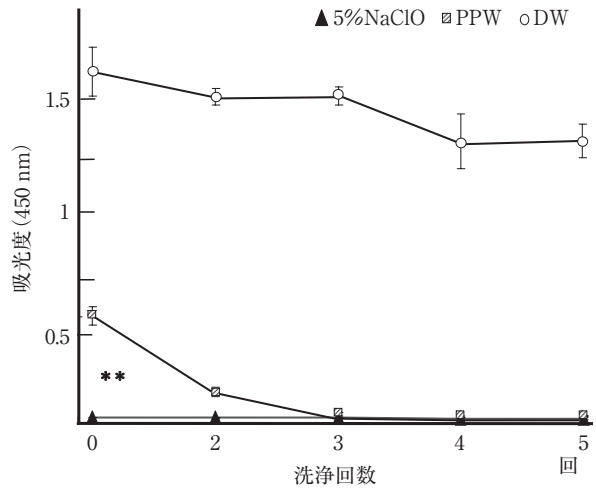


図3 各溶液の洗浄回数の変化によるバイオフィーム除去効果の検討  
各溶液にて1回:10秒間の洗浄を5回まで繰り返した. n=5, \*\*P<0.01

織に対する組織溶解性や腐食性は低いと推察される。しかし、PPWの抗菌効果やバイオフィーム除去効果に関する詳細な研究は、報告されていない。

### 1. 有効塩素濃度の変化によるバイオフィーム除去効果について

今回の実験結果から、PPWはバイオフィーム除去効果および抗菌効果を有することが示された。NaClOおよびPPWは、希釈することによりバイオフィーム除去効果が減弱したことから、両者のもつ効果はともに溶液中の有効塩素濃度に依存することが示唆され

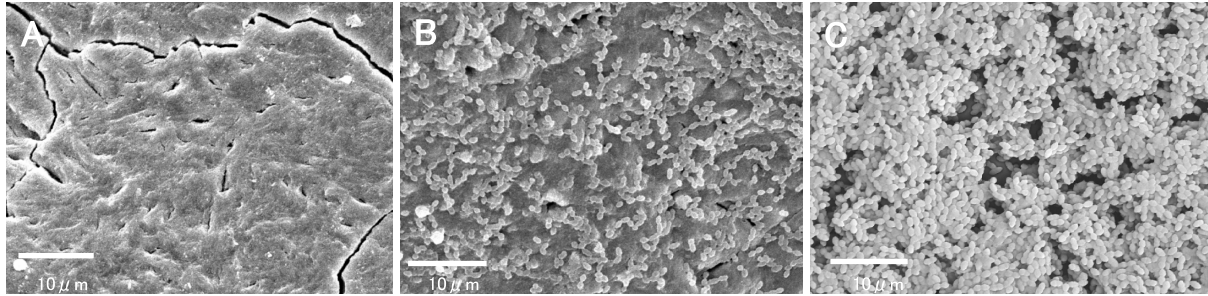


図4 各溶液の洗浄処理後の試料表面の電子顕微鏡所見 (×2,000)

各溶液にて1分間洗浄後、PBSで2回洗浄。

A: 5% NaClOによる洗浄後。バイオフィームおよび菌体は認められない。

B: PPWによる洗浄後。バイオフィームは認められないが、菌体はまばらに認められる。

C: DWによる洗浄後。歯面は、菌体で覆われている。

た。しかし、HClO濃度を600 ppmから20 ppmまで同程度になるように調整した5% NaClO溶液と比較した結果、NaClOのバイオフィーム除去効果のほうが有意に高かった。一方、低濃度のHClOに希釈したPPWは、同濃度の他社の電解機能水と同様の結果であった(data not shown)。このことから、NaClOではHClOのみの効果だけでなく、ClO<sup>-</sup>およびOH<sup>-</sup>などが、バイオフィームの除去に対して効果的に関与している可能性が考えられた。

## 2. 各溶液の温度変化がバイオフィーム除去に及ぼす影響について

NaClOは、温度の上昇に伴って反応性が高まり、その結果、細胞傷害性や抗菌活性も影響を受ける。20℃、40℃および60℃に温度を設定させ、細胞傷害性・抗菌活性を計測した報告では、60℃のときに最も傷害性・抗菌効果ともに高く、次亜塩素酸ナトリウムの作用は温度が高いほど効果が高くなるとされている<sup>28)</sup>。また、弱酸性次亜塩素酸水溶液の抗菌効果は10℃上昇するとその殺菌力が2.5倍となることも報告されている<sup>29)</sup>。一方、電解機能水の有効塩素濃度の経時変化を測定した結果、室温よりも冷蔵による保存のほうが、塩素濃度の低下を防ぐことができ、長期にわたって有効性を維持できると報告されている<sup>10)</sup>。臨床使用時を想定した場合、塩素濃度や電解水自体に対する温度の影響を明示すべきであると考えられた。

NaClOとPPWのバイオフィーム除去効果を温度変化から検討したところ、600 ppmでは、4℃、20℃および38℃ともにバイオフィーム除去効果が高かったため、温度の変化による影響はきわめて少なかった。しかし、低濃度に調整した200 ppmと80 ppmの場合では、高い温度設定時のほうが高いバイオフィームの除去効果を示した。NaClOおよびPPWの4℃および

38℃におけるバイオフィーム除去効果を比較すると、有効塩素濃度200 ppm・80 ppmでは、ともに38℃のときのほうが4℃に設定された溶液よりも約2~3倍、バイオフィーム除去効果を示した。これは、HClOの化学反応が、温度の上昇に伴って高まったことによると思われる。この傾向は、NaClOよりPPWに、それぞれ強く認められた。これらのことからNaClOやPPWを冷蔵保存した場合、使用前に加温することにより、より効果的に使用できると考えられる。そしてこの傾向は、PPWにより強いと考えられる。

## 3. 各溶液の洗浄回数によるバイオフィーム除去効果について

NaClOの場合、わずか1回の洗浄できわめて高いバイオフィーム除去効果を示した。これに対してPPWでは2回の洗浄でNaClOに近い効果が、また3回目以降では、ほぼ同様の効果が認められた。根管洗浄の観点で考えると、臨床では感染源や象牙質削片を洗い流す目的で頻繁な洗浄を行うため、洗浄回数の増加により除去効果向上がみられた本成績は根管洗浄剤としてのPPWの有用性を示唆したものと考えられた。また、今回実験に用いられたNaClOの濃度の問題もきわめて大きい。Grossmanは5% NaClOが根管洗浄に有効であるとし、2.5~5%の有効濃度での使用を推奨している<sup>30)</sup>。しかし、近年ではNaClOの組織刺激性が問題となり、0.5~1.5%の濃度でも他の洗浄剤や超音波を併用することで、十分な洗浄効果を得ようとする報告<sup>31,32)</sup>が相次いで行われている。これらの報告において、生体組織に対する溶液濃度の影響を照らし合わせて考えるならば、組織刺激性の低いPPWによる高いバイオフィーム除去効果は根管洗浄においてきわめて有効であると考えられた。

強酸性電解水の殺菌効果は、1%の蛋白質の存在に

より消失するとされ、その抗菌効果の主体をなす次亜塩素酸 (HClO) の効果は、血液などの有機質の存在下において著しく減弱される<sup>33)</sup>との報告がある。今回の結果は、洗浄・吸引を繰り返すことで、バイオフィルム表層の蛋白質や多糖類、細菌細胞と反応し、殺菌能力を失った電解水が、剥離されたバイオフィルムとともに取り除かれ、新たに添加された新鮮な電解水がバイオフィルムの表面で反応することにより、効率的に洗浄・除去されたためであったと推察される。臨床で応用する際を想定すると、長時間浸漬させて作用させるよりも、洗浄と吸引を繰り返し、新鮮な洗浄液を反応させることで、バイオフィルム除去および抗菌効果を高めることができることが示唆された。

#### 4. 走査型電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡による観察から、PPW による洗浄により試料上のバイオフィルムは、有意に除去された。しかし、わずかに残存した菌体は正常な形態を保ったままあるように観察された (図 4B)。バイオフィルムは除去されても残存した細菌が生存した状態で残っている可能性もある。バイオフィルムおよび根管内洗浄後の生存した細菌に関する報告<sup>34,35)</sup>では、洗浄後の生存菌体の量だけでなく、細胞増殖能力にも依存されることが懸念されるため、できうる限りゼロに近づける必要がある。PPW による洗浄後もバイオフィルムを除去することによる間接的な殺菌能力と菌自体に対する直接的な殺菌能力については、さらなる検討の必要があると示唆された。これらのことから、臨床応用を想定した場合、浮遊菌が生菌の状態で病変部に残り残されることがないように、十分に繰り返し洗浄し、洗浄液とともに細菌や汚染物質を確実に吸引することが望ましい。

PPW は、高いバイオフィルム除去効果を有し、根管治療における洗浄剤として有効であることが示唆された。しかし、実際に臨床応用する際、歯質・硬組織に対する影響および宿主組織に対する傷害性に関して、より詳細に検討し用法・用途を確立する必要があると思われる。

## 結 論

中性電解機能水 PPW は、*E. faecalis* の形成するバイオフィルムに対する除去効果を有することが認められた。その効果は有効塩素濃度に依存していた。また、バイオフィルム除去に対する効果は、加温することにより増強され、さらに繰り返し洗浄することで、漸増することが示唆された。

**謝辞**：本実験を遂行するに際して、多大なるご協力を頂いた明海大学電子顕微鏡センター 国井士郎技師に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Bakhir VM, Kirpichnikov PA, Liakumovich AG : On the nature of electrochemical activation of media, Reports of the USSR Academy of sciences, 286 : 663-666, 1986.
- 2) Bakhir VM, Spector LE, Zadorozhny YG et al. : A device for electrochemical treatment of liquids, USSR Certificate of Authoship, 17 : 19316, 1989.
- 3) 甲田雅一, 佐藤喜春, 原口義座ほか : 機能水 (弱酸性水) の消毒効果, 薬理と治療, 23:75-79, 1995.
- 4) Selkon JB, Babb JR, Morris R : Evaluation of the antimicrobial activity of a new super-oxidized water, Sterilox, for the disinfection of endoscopes, J Hosp Infect, 41 : 59-70, 1999.
- 5) 森 義雄, 小松繁樹, 畑 好昭 : 強酸性電解水溶液の生体毒性—経口投与によるラットの亜急性毒性試験と口腔軟組織への影響, 歯学, 84:619-625, 1997.
- 6) 岩沢篤郎, 中村良子, 中村国衛 : アクア酸化水の殺菌効果に対する検討, 薬理と臨床, 3:1555-1562, 1993.
- 7) 荻原和孝, 鈴木安里, 加藤千穂美ほか : 歯周病原菌に対するアクア酸化水の殺菌効果, 顎咬合誌, 6 : 19-27, 1995.
- 8) 葛城啓彰, 鈴木安里, 長曾一成ほか : 強酸性電解水の細胞毒性について, 歯科基礎医誌, 38:57-64, 1996.
- 9) 牧 寿次, 小松繁樹, 畑 好昭 : 強酸性電解水溶液がラット白歯に及ぼす影響, 歯学, 85:129-139, 1997.
- 10) 安部 敏, 平田正嗣, 奥田禮一ほか : 歯科臨床次の一手 歯科の最新テクノロジー 試作無隔膜電解槽を用いた機能水の生成とその応用 とくに保存性と殺菌機能について, Dental Diamond, 29 : 72-75, 2004.
- 11) 葛城啓彰, 齊藤和子 : 新しく開発された電解酸化水の各種細菌に対する殺菌効果の検討, 歯学, 86 : 72-78, 1998.
- 12) Wilson M : Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents, J Med Microbiol, 44 : 79-87, 1996.
- 13) Ramachandran Nair PN : Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions, J Endod, 13 : 29-39, 1987.

- 14) Costerton W, Veeh R, Shirtliff M et al. : The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections, *J Clin Invest*, 112 : 1466-1477, 2003.
- 15) Noiri Y, Ehara A, Kawahara T et al. : Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis, *J Endod*, 28 : 679-683, 2002.
- 16) Tronstad L, Barnett F, Cervone F : Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment, *Endod Dent Traumatol*, 6 : 73-77, 1990.
- 17) Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D et al. : Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants, *J Endod*, 21 : 513-515, 1995.
- 18) Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH : Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*, *Int Endod J*, 41 : 873-882, 2008.
- 19) Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A et al. : Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment, *Int Endod J*, 36 : 500-508, 2003.
- 20) Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM et al. : The antimicrobial effect of MTAD : an *in vitro* investigation, *J Endod*, 29 : 400-403, 2003.
- 21) Tamura S, Yonezawa H, Motegi M et al. : Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*, *Oral Microbiol Immunol*, 24 : 152-161, 2009.
- 22) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP : Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections, *Science*, 284 : 1318-1322, 1999.
- 23) Hujoel PP, White BA, García RI et al. : The dentogingival epithelial surface area revisited, *J Periodontal Res*, 36 : 48-55, 2001.
- 24) Giardino L, Ambu E, Savoldi E et al. : Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite MTAD and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm, *J Endod*, 33 : 852-855, 2007.
- 25) Seal GJ, Ng YL, Spratt D et al. : An *in vitro* comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals, *Int Endod J*, 35 : 268-274, 2002.
- 26) 吉村 久, 清原 尚, 吉澤 徹ほか : 塩素による角膜傷害—走査型電子顕微鏡的観察, *日本眼科紀要*, 37 : 1141-1148, 1986.
- 27) Serper A, Ozbek M, Calt S : Accidental sodium hypochlorite-induced skin injury during endodontic treatment, *J Endod*, 30 : 180-181, 2004.
- 28) Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M et al. : The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability pulp dissolution capacity and antimicrobial efficacy, *J Endod*, 31 : 669-671, 2005.
- 29) 石井信之, 浜田信城, 渡辺清子 : 弱酸性次亜塩素酸水溶液 (カンファ水) の歯内療法領域への応用に関する基礎的研究, *日歯内療誌*, 29 : 26-29, 2008.
- 30) Grossman LI : Polyantibiotic treatment of pulpless teeth, *J Am Dent Assoc*, 43 : 265-278, 1951.
- 31) Gu XH, Mao CY, Kern M : Effect of different irrigation on smear layer removal after post space preparation, *J Endod*, 35 : 583-586, 2009.
- 32) Malkhassian G, Manzur AJ, Legner M et al. : Antibacterial efficacy of MTAD final rinse and two percent chlorhexidine gel medication in teeth with apical periodontitis : a randomized double-blinded clinical trial, *J Endod*, 35 : 1483-1490, 2009.
- 33) 浅井昭士郎, 山村正次, 野田充宏ほか : 酸化電位水による殺菌効果と変異原性の検討, *歯科基礎医誌*, 37 : 152-161, 1995.
- 34) Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN et al. : Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms, *J Endod*, 32 : 527-531, 2006.
- 35) Williamson AE, Cardon JW, Drake DR : Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*, *J Endod*, 35 : 95-97, 2009.

---

著者連絡先 : 中村裕子

明海大学歯学部機能保存回復学講座歯内療法学分野

〒 350-0283 坂戸市けやき台 1-1

TEL : 049-285-5511

FAX : 049-287-8073

E-mail : yukon@dent.meikai.ac.jp