

〔原著〕 松本歯学 15 : 273~280, 1989

key words : 歯内療法剤 - カルビタール - 抗菌活性 - 口腔細菌

口腔細菌に対する改良カルビタールの抗菌活性

中村 武, 志村隆二, 柴田幸永, 藤村節夫

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

Antibacterial Activity of Modified Calvital Against Oral Microorganisms

TAKESHI NAKAMURA, RYUJI SHIMURA,
YUKINAGA SHIBATA and SETSUO FUJIMURA

*Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. T. Nakamura)*

Summary

Antimicrobial activities of original and modified Calvital were examined, with the disk and agar diffusion methods and by comparisons of minimum inhibitory concentrations, using 10 predominant oral bacterial strains, saliva, and dental plaque as materials.

Both types of Calvital were found to inhibit all 10 bacterial strains tested in the disk and agar diffusion methods, without appreciable difference between them in terms of antimicrobial activity. Both types showed their strongest activity against anaerobic gram negative rods. They also inhibited most of the bacteria grown from saliva and dental plaque. The mode of action of both Calvital types was considered to be bactericidal, and the susceptible bacteria were killed within 15 min after exposure to either agent.

Generally, both types of Calvital may be valuable as an endodontic agent, judging from these bacteriological characteristics, due to their anticipated bactericidal effect on the treated regions.

緒 言

カルビタールは、水酸化カルシウム・ヨードホルムを主成分とする直接歯髄覆罩剤、生活歯髄切断糊剤、根管充填剤である。水酸化カルシウム配合の歯内療法剤としての本剤の創製は古い¹⁾。本剤は、創製以来多くの臨床病理学的研究²⁻⁷⁾を基盤

として、その組成・配合の改良も加えられ、種々の薬理作用⁸⁻¹⁰⁾に加えてX線造影性¹¹⁾や抗菌活性⁹⁾などの薬効を具備した有用な歯内療法剤として、広く歯科医療に貢献してきた。しかし、近年、医療薬剤の再評価と相まって本カルビタールも若干の配合組成の改良が行われた。すなわち、改良カルビタールは、従来のカルビタールの配合成分

中からグアノフラシンを削除し、代替として、すでに歯内療法上その効果が確認されている、グアヤコールを配合したものである。この改良カルビタールは、すでに臨床病理学的検討によって、臨床的にも、また臨床病理学的にも、現行カルビタールに優るとも劣らない治療効果を有することが示されている¹²⁾。

本研究は、口腔細菌に対する改良処方カルビタールの抗菌活性について現行処方カルビタールと比較検討したものである。

方 法

1) 被検カルビタール

各カルビタールの組成は表1に示した。改良処方(ロット番号, 010714)と現行処方(ロット番号, EE01)をそれぞれ用法にしたがって、粉末と液状成分を2:1の割合で滅菌乳鉢内で混合・練和しペースタ状として、抗菌性試験に用いた。

2) 供試指示菌

口腔細菌中で主要な表2に示した10菌種(菌株)と、種々の口腔常在菌種を含む唾液および歯垢を供試した。

供試菌株中、*Bacteroides* 菌株は、血液平板(menadione 0.5 µg/ml, hemine 5 µg/ml 含有)、その他の菌株は、0.2% Yeast Extract 加 BHI 平板を用い、1~3日の前培養菌を用いた。なお、

表1：カルビタールの組成

| | |
|-----------|--------|
| ○改良処方 | |
| (粉末成分) | |
| 水酸化カルシウム | 78.6% |
| ヨードホルム | 20.0% |
| スルファチアゾール | 1.4% |
| (液状成分) | |
| Tカイン | 0.5% |
| グアヤコール | 0.5% |
| 精製水、その他 | 99.0% |
| ○現行処方 | |
| (粉末成分) | |
| 水酸化カルシウム | 78.5% |
| ヨードホルム | 20.0% |
| グアノフラシン | 0.1% |
| スルファチアゾール | 1.4% |
| (液状成分) | |
| Tカイン | 0.5% |
| グアノフラシン | 0.02% |
| 精製水、その他 | 99.48% |

Bacteroides 菌株、*P. acnes*、*A. viscosus* および *Streptococcus* 菌株は Anaerobic glove box で嫌氣的、*S. aureus* および *B. matruchotii* は好氣的に培養した。

3) 抗菌活性の測定法

抗菌活性は、デスク法、寒天内拡散法¹³⁾および化学療法基準¹⁴⁾に準じて最小発育阻止濃度(MIC)によって調べた。すなわち、デスク法は直径6mmの滅菌濾紙にペースタ状カルビタールの15mgを含有したデスクを各指示菌(10⁶⁻⁷個)含有平板上に置き、好気ないし嫌氣的に培養後、阻止帯(円)の直径を測定した。なお、*Bacteroides* 菌株はGAM平板、その他の菌株は、0.2% Yeast Extract 加 BHI 平板の各2平板を用いた阻止帯の平均値から抗菌活性を比較した。また、成人の唾液および歯垢細菌に対する活性は、指示菌に準じて調べた。なお、培地によってはカルビタールとの白濁帯が生じ、阻止帯の判定が困難な例では、これら平板に1N-塩酸液を添加し、白濁帯を消失させて判定した。

寒天内拡散法は、カルビタール(ペースタ状)を滅菌した0.1M phosphate buffer (pH 7.0)で懸濁液(50mg/ml)を調整し、これを原液としてその倍数希釈液の各0.2mlを、指示菌含有平板に作製した直径8mmのwellに入れ培養後、各濃度液による阻止帯(円)の発現の有無および阻止帯の直径を測定した。

カルビタールの各指示菌種(菌株)に対する最小発育阻止濃度(MIC)は、*Bacteroides* 菌株が GAM broth、その他は0.2% Yeast Extract 加 BHI broth を用いて化学療法基準に準じて判定した。なお、カルビタール含有 broth は懸濁状のた

表2：供試指示菌

| |
|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P |
| <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 9759 |
| <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556 |
| <i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt |
| <i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 15987 |
| <i>Bacterionema matruchotii</i> ATCC 14266 |
| <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919 |
| <i>Bacteroides heparinolyticus</i> ATCC 35895 |
| <i>Bacteroides intermedius</i> ATCC 25611 |
| <i>Bacteroides gingivalis</i> ATCC 33277 |
| Saliva |
| Dental plaque |

め発育の有無は各1～3日培養後、その一定量(0.05 ml)を各平板培地に移植し判定した。

4) 発育阻止作用

カルビタールの発育阻止作用は、静菌的か殺菌的かについて、*S. aureus*(209P)および*B. matruchoitii*(ATCC14266)を供試して、その生菌数の測定から判定した。すなわち、カルビタール懸濁液(25 mg/ml, 0.1M phosphate buffer pH7.0)に指示菌数の 10^8 /mlを添加し、37°Cで作用させ、経時的にその生菌数の測定を行い判定した。

結果および考察

デスク法による両カルビタールの各指示菌に対する抗菌活性は、表3および図1に示した。供試10菌種、唾液および歯垢細菌(群)に対しいずれも直径10～38 mmの完全な発育阻止帯(円)を発現した。両カルビタールは、供試指示菌種中グラム陽性球菌の*S. aureus*および*S. mutans*では阻止円の直径が10～12 mmと最も小さく、ついで*S. sanguis*および*S. salivarius*のそれは16～17 mmを示した(図1. A, B)。グラム陽性桿菌の*B. matruchoitii*、*P. acnes*および*A. viscosus*では20～25 mmの阻止円を発現し(図1. C, D)、嫌気性グラム陰性桿菌である*Bacteroides*の3菌種では、25～38 mmと阻止円が大きく(図1. E, F)、とくに*B. gingivalis*では最大を示した。また、両カルビタールは、種々の細菌種を含む唾液および歯垢平板でも11～12 mmの完全な発育阻止帯

(円)を発現した(図1. G, H)。

一方、改良処方カルビタールと現行処方カルビタールの抗菌活性を、本デスク法による阻止円の平均直径値から比較すると、*S. sanguis*および*B. gingivalis*の2平板で、改良処方カルビタールが現行処方のそれよりやや大きい(1～2 mm)阻止帯を示したが、その他の10指示菌平板においては両カルビタール間に差異が認められなかった。この成績から、改良処方カルビタールは現行処方カルビタールと同等の抗菌活性を有することを示唆した。また、本デスク法において、カルビタールは、指示菌によって阻止円の大きさが異なる事実は、指示菌の世代時間の差異もあり断定はできないが、口腔細菌種に対するカルビタールの感受性に依存するものとみられた。

一方、唾液および歯垢平板でいずれもその阻止円の小さな(11～12 mm)発現所見は、*Streptococci*や*Staphylococci*の指示菌平板での阻止円所見と近似する。このことは、唾液や歯垢細菌中の*Streptococci*や*Staphylococci*の分布¹⁹⁾状況に起因し、これら菌種の唾液や歯垢で優勢な菌叢内容を反映していると考えられる。

改良処方カルビタールは、現行処方カルビタールと同じく種々の口腔細菌種を含む唾液や歯垢平板上で、阻止円が小さいにせよ完全な発育阻止帯を発現する事実は、注目に値する。すなわち、両カルビタールは、口腔細菌種に対し幅広い抗菌性を有することを示唆する。

表3：カルビタールの現行処方と改良処方の抗菌活性(デスク法)

| 細菌種 | カルビタールの種類 | カルビタール(デスク)* | |
|---|-----------|--------------|------|
| | | 現行処方 | 改良処方 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P | | 10 | 10 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 9759 | | 17 | 17 |
| <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556 | | 16 | 17 |
| <i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt | | 12 | 12 |
| <i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 15987 | | 25 | 25 |
| <i>Bacterionema matruchotii</i> ATCC 14266 | | 20 | 20 |
| <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919 | | 23 | 23 |
| <i>Bacteroides heparinolyticus</i> ATCC 35895 | | 28 | 28 |
| <i>Bacteroides intermedius</i> ATCC 25611 | | 25 | 25 |
| <i>Bacteroides gingivalis</i> ATCC 33277 | | 36 | 38 |
| Saliva | | 11 | 11 |
| Dental plaque | | 12 | 12 |

*：直径6 mmの濾紙にカルビタール15 mg含有
数字は阻止円の直径(mm)を示す

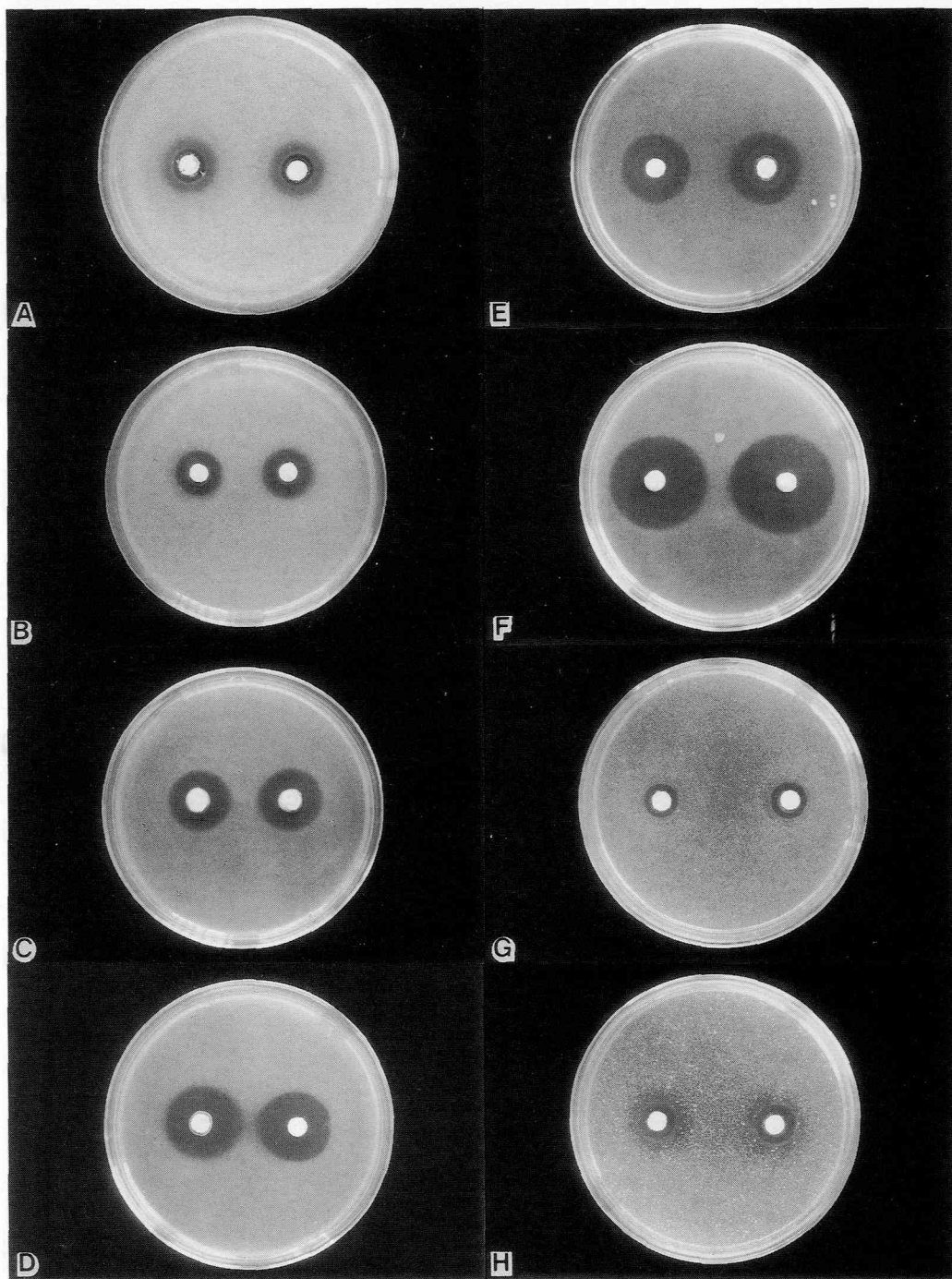


図1：カルピタールの現行処方と改良処方のデスク法による発育阻止所見
 各指示菌平板の左側は現行処方，右側は改良処方のカルピタール（各15 mg）含有デスク
 指示菌株：A: *Staphylococcus aureus* 209P, B: *Streptococcus sanguis* ATCC 10556
 C: *Bacterionema matruchotii* ATCC 14266, D: *Actinomyces viscosus*
 ATCC 15987, E: *Bacteroides intermedius* ATCC 25611, F: *Bacteroides gingivalis*
 ATCC 33277, G: Saliva, H: Dental plaque

寒天内拡散法による両カルビタールの抗菌活性の成績は、図2、表4に示した。本法は、完全な発育阻止帯を発現するカルビタールの最小濃度(IAMC)と各濃度による阻止円の大きさから、抗菌活性を比較したものである。いずれの指示菌においても両カルビタール間のIAMC値に全く差異は認められなかった。このことは、両カルビタールの抗菌活性が同等の力価と考えられる。S. aureus に対する IAMC は最も大きく (25.0 mg/ml,

図2.A), ついで S. mutans では12.5 mg/ml であった(図2.D)。A. viscosus, B. matruchotii, P. acnes に対してはいずれも6.25 mg/ml (図2.C), S. salivarius, S. sanguis, B. heparinolyticus, B. intermedius は3.12 mg/ml であった(図2.B, E)。B. gingivalis の IAMC は最も小さく0.06 mg/ml 以下を示した(図2.F)。一方、いずれの指示菌においても、カルビタール濃度に正比例して阻止円の直径が発現し、また、各濃度による阻

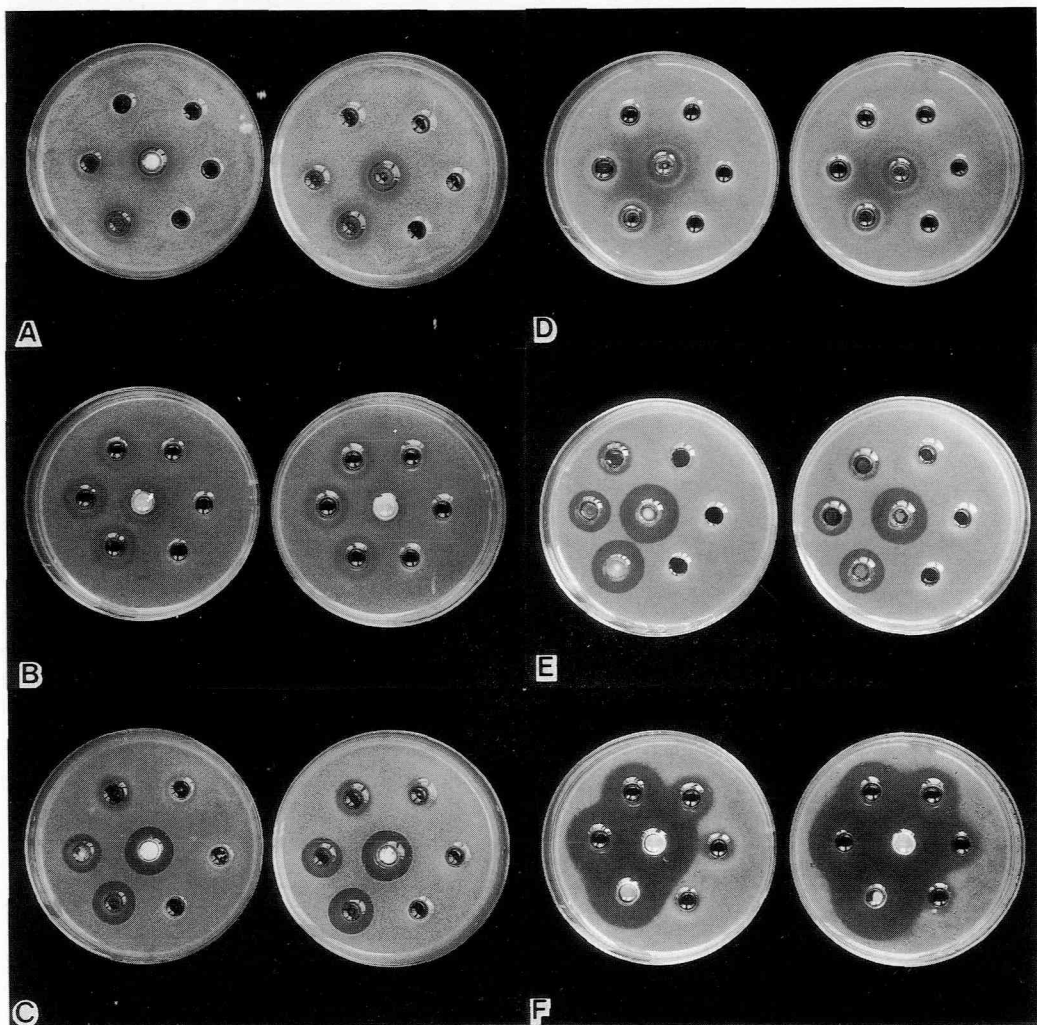


図2：カルビタールの現行処方と改良処方の拡散法による発育阻止所見

左側平板は、現行処方、右側平板は、改良処方のカルビタールで、中心のwellは最高濃度(50 mg/ml)で時計方向にその倍数希釈液(0.2 ml)注入。

指示菌株：A； *Staphylococcus aureus* 209P, B； *Streptococcus salivarius*, ATCC 9759, C； *Propionibacterium acnes* ATCC 6919, D； *Streptococcus mutans* lngbritt, E； *Bacteroides intermedius* ATCC 25611, F； *Bacteroides gingivalis* ATCC 33277

には全く差異が認められなかった。すなわち、両カルピタルのグラム陽性球菌に対するMIC値は一般に高く、*S. aureus*で12.50 mg/mlと最大を示し、ついで*S. mutans*のそれが6.10 mg/ml、*S. salivarius*および*S. sanguis*は3.10 mg/mlであつた。グラム陽性桿菌である*A. viscosus*、*B. matruchotii*および*P. acnes*の3菌種のMIC値は、いずれも1.55 mg/ml、嫌気性グラム陰性桿菌である*B. heparinolyticus*、*B. intermedius*および*B. gingivalis*のMIC値は極めて小さく、前2菌種が0.37 mg/ml、*B. gingivalis*で0.18 mg/mlと最小値を示した。各指示菌によってMIC値が異なる事実はカルピタルの口腔細菌種に対する感受性が異なることを示す。この成績から、両カルピタルの口腔細菌に対する感受性は、嫌気性グラム陰性桿菌種に極めて感受性であり、ついでグラム陽性桿菌種、グラム陽性球菌種と考えられる。また、両カルピタルの各指示菌に対するこれらMIC値は、先のデスク法や寒天内拡散法での発育阻止所見にもおおむね反映されているといえよう。

MIC値の最も大きい(12.5 mg/ml) *S. aureus*と中等度(1.55 mg/ml)の*B. matruchotii*を供試し、両カルピタルの発育阻止作用を生菌数の測定によって調べた成績は表6に示した。*S. aureus*の生菌数は、両カルピタルともに作用15分で、 10^8 /mlレベルの生菌数が $6.4 \times 10^7 \sim 7.4 \times 10^7$ /mlと急激な減少を示し、さらに*B. matruchotii*ではいずれのカルピタルにおいても、作用15分ですでに生菌数が検出されなかった。この成績から、改良処方カルピタルは、現行処方のカルピタルと、その作用性においても差異がなく、この発育阻止作用は殺菌的で、かつ即効性と考えられた。

カルピタルは、水酸化カルシウムを含有するためアルカリ性が強い。しかし、本研究でデスク

法を除く、他の抗菌試験においては、0.1M phosphate buffer (pH7.0)に懸濁ないし希釈し、中性に調製したカルピタル液を供試した。この中性カルピタル液によっても明瞭な抗菌活性が発現する事実は、単なるアルカリ依存の抗菌性が否定される。両カルピタルの抗菌活性は、その配合成分中の抗菌物質であるスルファチアゾール、グアヤコール、グアノフラシンなどの抗菌活性^{16,17,18)}によるものとみられるが、カルピタルの即効性の殺菌的作用は、グアヤコールないしグアノフラシンに起因すると考えられる。

結 論

主要な口腔細菌の10菌種(菌株)と唾液および歯垢(細菌群)を供試して、改良処方および現行処方のカルピタルの抗菌活性を、デスク法および寒天内拡散法によって調べ、さらに各指示菌種に対する最小発育阻止濃度(MIC)を比較検討して次の結果を得た。

改良処方のカルピタルは現行処方のカルピタルと同様に、デスク法および寒天内拡散法において供試10菌種に対して完全な発育阻止帯(円)を発現し、両カルピタル間の阻止円の大きさに殆ど差異はみられなかった。両カルピタルは、とくに嫌気性グラム陰性桿菌種に対して大きな発育阻止帯を示した。また、両カルピタルは唾液および歯垢(細菌群)平板上でも、小さいながらも完全な阻止帯(円)を発現し、本剤は口腔細菌種に幅広い抗菌性を有していた。

改良処方カルピタルの供試10菌種(菌群)に対する最小発育阻止濃度(MIC)は、現行処方カルピタルのそれと同値を示し、両者間には全く差異が認められなかった。両カルピタルは、いずれも嫌気性グラム陰性桿菌種に対してMIC値が最も小さく(0.37~0.18 mg/ml)極めて感受性

表6：カルピタルの現行処方と改良処方の抗菌作用

| 供試菌 カルピタルの種類 作用時間(min.) | <i>Staphylococcus aureus</i> (209P) | | <i>Bacterionema matruchotii</i> (ATCC 14266) | |
|-------------------------------|--|-------------------|---|-------------------|
| | 現 行 | 改 良 | 現 行 | 改 良 |
| 0 | 4.8×10^8 | 4.8×10^8 | 9.6×10^8 | 9.6×10^8 |
| 15 | 6.4×10^7 | 7.4×10^7 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |

各カルピタルの濃度は、20 mg/ml、0.1 M phosphate buffer (pH7.0) 数字は、生菌数/mlを示す。

であり、ついでグラム陽性桿菌種 (1.55 mg/ml)、グラム陽性球菌種 (12.50~3.10 mg/ml) であった。これら MIC 値を反映して、デスク法および寒天内拡散法において各指示菌の発育阻止帯 (円) が発現していた。また、生菌数の測定から、両カルビタールの発育阻止作用はいずれも殺菌的で即効性とと考えられた。

以上の結果、改良処方カルビタールは、口腔細菌種に対し現行処方カルビタールと同等の抗菌活性を有し、また、その抗菌スペクトラムも広く、その作用が殺菌的で、かつ即効性であることから、本剤は細菌学的にも歯内療法剤として臨床応用の価値が大きいものと判定された。

文 献

- 1) 関根永滋, 渡辺 豊 (1943) 水酸化カルシウムを以てする生活歯髄切断法の臨床病理学的研究補遺. 歯科学報, 48: 184-204.
- 2) 関根永滋, 西條征男, 森本 優, 山下又次郎, 久保初一 (1951) ホモスルファミン加水酸化カルシウムを以てする生活歯髄切断法に関する臨床病理学的研究. 歯科学報, 51: 301-308.
- 3) 関根永滋, 西條征男, 駒橋 武, 森本 優, 山下又次郎, 久保初一 (1953) グアノフラシン加水酸化カルシウムを以てする生活歯髄切断法に関する臨床病理学的研究. 歯科学報, 53: 661-674, 715-724.
- 4) 西條征男 (1957, 1958) 種々なる抗菌物質加水酸化カルシウム糊剤を以てする生活歯髄切断法に関する臨床病理学的研究. 歯科学報, 57: 357-363, 399-403, 479-485, 525-531, 58: 20-28, 61-66, 150-156, 187-192, 249-256, 295-299, 378-383.
- 5) 関根永滋, 西條征男, 石川達也, 今西孝博, 浅井康宏, 成田むつ (1963) カルビタールを以てする生活歯髄切断法に関する臨床病理学的研究. 歯科学報, 63: 463-473.
- 6) 関根永滋, 今西孝博 (1965) 乳歯に対する生活歯髄切断法に関する研究. 日保歯誌, 7: 194-203.
- 7) 西條征男, 浅井康宏, 山岸昭平, 熱田憲也, 石川達也, 関根永滋 (1966) クロロフィリン加水酸化カルシウムを以てする生活歯髄切断法に関する臨床病理学的研究. 歯科学報, 66: 575-584.
- 8) 北川宗信 (1969) 改良カルビタールを以てする麻酔抜髄即時根管充填に関する臨床病理学的研究. 歯科学報, 69: 88-135.
- 9) 丸島 勝 (1958) 水酸化カルシウム貼付による歯髄の創傷治癒機転について. 口腔病学会誌, 25: 149-160.
- 10) 春山良夫 (1975) 水酸化カルシウム製剤による歯髄創面の治癒効果の比較に関する臨床病理学的研究. 歯科学報, 73: 331-406.
- 11) 長谷川正康, 大御雅文, 大泉 栄 (1969) 改良“カルビタール”による根管充填の臨床成績並びにX線成績. 歯科学報, 69: 1143-1152.
- 12) 浅井康宏, 伊藤彰人, 近藤祥弘, 名川達也, 成田むつ, 松井恭平, 町田幸夫, 薬師寺 仁, 衣松勅生 (1981) カルビタール (改良処方) による歯髄創傷の治癒効果に関する臨床病理学的検討. 日保歯誌, 24: 271-281.
- 13) Nakamura, T., Fujimura, S., Obata, N., Yamazaki, N. and Kanakawa, N. (1978) Bacteriocin (Acnecin) activity of oral *Propionibacterium acnes*. Bull. Tokyo Dent. Coll. 19: 235-244.
- 14) 日本化学療法学会 (1981) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. Chemotherapy, 29: 76-79.
- 15) Gibbons, R. J., and Van Houte, J. (1973) On the formation of dental plaque. J. Periodontol. 44: 347-360.
- 16) 山口英世 (1984) 今日の抗生物質. pp. 528-533. 南山堂, 東京.
- 17) 北里研究所検査部 (1976) グアヤコールの細菌阻止濃度. ネオ製薬工業 K.K., 社内文献, 16-18.
- 18) 中村 武 (1989) カルビタール原料, 旧 GF および新 GF の抗菌活性. ネオ製薬工業 K.K., 社内文献, 1-4.