原 著 論 文

義歯洗浄剤の真菌に対する評価 第2報

玉本 光弘 中本 匡美 浜田 泰三 亀高 茂*

Evaluation of Denture Cleansers against *Candida albicans*, Part II

Mitsuhiro Tamamoto, Kyoumi Nakamoto, Taizo Hamada and Shigeru Kametaka*

Abstract : *Candida albicans* is known to cause denture stomatitis. In this study, the effects of four kinds of commercial denture cleansers (DC A, B, C and D) on *C. albicans* were evaluated under the various conditions. Yeast-lytic enzymes were contained only in DC A. Proteases were contained in DC A, B and C, and alkaline-oxidants were contained in DC B, C and D.

Candida-lytic activity was demonstrated only in DC A from the results of the reduction of optical density of yeast suspension, the microscopical observation and the degradation of β -1, 3-glucan.

Strong fungicidal effects were found in DC B and C. The fungicidal effect in DC D was slightly lower than that in DC B and C, and the effect in DC A, which contained no oxidants, was the lowest. However, it was found that a small amount of *Candida* cells was alive, even in the solution of DC B, C and A when the residual cleansers were removed and then inoculated on the culture plate.

Resin plates adhering *Candida* cells were soaked in the cleansers, and then the remaining cells were counted under the microscope. The removal of the adhering cells by DC A, B and C were significantly greater than that by the control. But DC D did not show any significant differences from the control and the other cleansers.

DC A exhibited the highest protease activity at pH 7. At the own pH of cleansers, however, DC C exhibited higher activity than DC A. The protease activity in DC B was lower than that in DC A and C. DC D exhibited no protease activity, but it generated the largest quantity of hydrogen peroxide. No hydrogen peroxide was generated from DC A.

Key words : *Candida albicans*, denture cleanser, denture plaque

I. 緒 言

1970年代以降、義歯に付着するデンチャープラークの微生物学的な研究が盛んに行われ、デンチャープラーク

中の *Candida albicans* と義歯性口内炎の関係が明らかとなってきた^{1~4)}。これら微生物学的な知見が集積されてくるにつれ、従来は単に義歯の汚れを落すための“洗剤”としてしか認識されていなかった義歯洗浄剤が、義歯性口内炎の予防あるいは治療を補助する手段として注

広島大学歯学部歯科補綴学第二講座（主任：浜田泰三教授）
* ロート製薬株式会社第四製品部
Department of Prosthetic Dentistry, Hiroshima University

School of Dentistry (Chief: Prof. Taizo Hamada)
* New Product Division, Rohto Pharmaceutical Co., Ltd.
平成3年5月17日受付

目されるようになり、義歯洗浄剤の使用習慣と *Candida* の分離頻度との関係に関する研究⁵⁾ や各種義歯洗浄剤による *in vitro* の殺菌力と義歯からの *Candida* の除去効果に関する研究⁶⁾ などが行われるようになった。

これに伴って、市販義歯洗浄剤は汚れの分解除去と殺菌に有効な酸化剤と界面活性剤を有効成分として配合したものから、これらに加えて義歯から真菌を除去するのに有効な酵素を含有したものへと変化し、現在わが国では酵素配合の義歯洗浄剤が主流となっている。

現在の義歯洗浄剤に用いられている酵素は、蛋白質分解酵素と真菌溶解酵素であるが、蛋白質分解酵素は義歯床と真菌との間に存在するペリクルや菌体表面の付着に関与する蛋白質成分を分解することにより真菌を除去し⁷⁻⁹⁾、真菌溶解酵素は直接的に真菌を溶菌することにより除去する⁸⁻¹⁰⁾と考えられている。

前報¹¹⁾では、市販義歯洗浄剤5種類について *Candida albicans* に対する溶菌、殺菌およびレジン片からの除去効果をそれぞれ単一の条件下で検討した結果を報告した。本研究では、測定方法の改良をはかるとともに、さらに多面的な評価を行った。また、真菌の除菌および殺菌効果に大きな影響を及ぼすと考えられる蛋白質分解活性および酸化力についても併せて検討した。

II. 材料および方法

1. 材料

1) 義歯洗浄剤

今回研究に用いた義歯洗浄剤は下記に示す3製品4種類である。

(1) ピカ®酵素タイプ錠(ロート製薬, 大阪, Lot B 241, 以下A)

(2) ライオデント®錠(ライオン, 東京 Lot 82521, 以下B)

(3) ポリデント®錠(小林ブロッコ, 大阪, Lot L 920, 以下C)

(4) ピカ®酸化剤タイプ顆粒(ロート製薬, 大阪, Lot B 241, 以下D)

Aには真菌溶解酵素と蛋白質分解酵素が配合されているが、殺菌剤および酸化剤は配合されていない。B、Cには蛋白質分解酵素と酸化剤が配合されている。また、Dには酸化剤が配合されているが、酵素は配合されていない。

2) 供試菌株

前報¹¹⁾と同様 *Candida albicans* A IFO 1385 株を用

いた。

2. 方法

1) 真菌の溶菌効果

前報¹¹⁾で報告した真菌懸濁液の濁度変化を指標とした溶菌効果の測定にあたって、濁度に影響を及ぼすと考えられる諸因子の影響を可及的に排除するため、試験条件の改良をはかった。また、試料AおよびCについては、暗視野顕微鏡下に菌数を計数することによって溶菌効果を肉眼的にも評価した。

(1) 菌懸濁液の調製

供試菌 Sabouraud glucose broth による over night culture 1 ml を同 broth 10 ml を入れたL字型試験管に加え、濁度により増殖をモニターしながら、37°Cでバランス振とう(モノシン II A, 大洋科学, 埼玉)により培養した。約4時間の培養により、560 nmにおける濁度が2.2に達したことを確認した後、リン酸緩衝生理食塩水(pH 7.2, 以下PBSという)を用いて遠心洗浄した。

濁度の測定は前報¹¹⁾と異なる分光光度計(UV-260, 島津製作所, 京都)にて光路長 10 mm の石英セルを用いて行ったが、この測定系で濁度1.2となるようにPBSに懸濁した。このときの菌濃度は 5×10^6 CFU/ml であった。

(2) 試料溶液の調製

義歯洗浄剤各1錠もしくは1包に60, 125 および200 ml の滅菌蒸留水を添加して溶解し、濃度を3種類とした。この液を遠心分離(15,000 rpm, 20 min)し、濁度測定に影響を及ぼす不溶物を除去した上清を試料溶液とした。

(3) 濁度による溶菌効果の測定

菌懸濁液と試料溶液1:1をL字型試験管に加えて混合し、直ちに560 nmにおける濁度を測定した。したがって、測定時の最終試料濃度は、1錠(包)/120 ml(高濃度)、250 ml(標準濃度)および400 ml(低濃度)である。なお、菌液と試料液の混合は、濁度に影響を及ぼす気泡が混入しないよう注意を払って行い、37°Cでバランス式振とうを行いながら、30分間隔で120分後まで経時的に濁度(560 nm)を測定した。また、菌の凝集による影響を知るため、120分目の濁度測定の後、超音波細胞破碎器(大岳製作所, 東京)により、10秒間超音波処理した後の濁度も併せて測定した。

なお、対照には試料溶液の代わりに滅菌蒸留水を用いた。

(4) 検鏡による溶菌効果の測定

120 分間の経時的な濁度測定が終了した菌懸濁液の 1 滴を血球計測板にとり、暗視野顕微鏡下 (Optiphot, OFX-II, ニコン, 東京) で写真撮影して菌数を計数することにより、溶菌されずに残存している単位体積当たりの菌数を求めた。

2) β -1, 3-グルカンの分解活性

β -1, 3-グルカンに義歯洗浄剤を作用させ、生成する還元末端を Nelson-Somogyi 法^{12,13)}によって、glucose 等量として測定した。

(1) 基質懸濁液

基質の β -1, 3-グルカンとして、カードラン (和光純薬) の 25 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) による 0.5% 懸濁液を用いた。

(2) 試料溶液

各義歯洗浄剤を蒸留水で溶解し、0.1 g/ml に調製した。

(3) β -1, 3-グルカンの分解活性の測定

基質懸濁液 (0.5% カードラン) 3 部に試料溶液 1 部を加え、37°C で振とうしながら反応させ、経時的 (0, 30, 60, 90, 120 分目) に反応液 1 ml をサンプリングした。この反応液に Nelson-Somogyi^{12,13)} のアルカリ性銅試薬を 1 ml 加え、沸騰水浴上で 10 分間加熱し、急冷後ヒ素モリブデン酸塩試薬 3 ml を加えた後、蒸留水を加えて 6 ml にメスアップした。この溶液を濾過し、濾液の吸光度 (500 nm) を測定した。

(4) glucose 検量線

蒸留水および glucose 溶液 (40, 80, 120, 160 μ g/ml) 1 ml についても Nelson-Somogyi 法によって吸光度を測定し、glucose の検量線を作成して glucose 等量として表した。

3) 殺菌効果

(1) 菌懸濁液の調製

溶菌効果と同様の方法にて培養、洗浄した菌を PBS にて濁度が 2.5 となるよう懸濁した。

(2) 殺菌効果の測定

殺菌効果は 2 つの方法により検討した。1 つは前報¹¹⁾と同様に、菌液-試料液の 1:1 混合液を 37°C でインキュベートし、経時的にサンプリングして 10 倍系列で希釈して、カンジダ GE 寒天培地 (日水製薬, 東京) に接種し、出現した colony 数より菌数を算出した。この方法では、寒天平板上で試料が共存する。

第 2 の方法では、サンプリングした混合液を滅菌 PBS にて遠心洗浄して試料を除去し、同量の PBS に再懸濁

したものについて同様に操作して colony 数を求めた。

4) レジン片からの除菌効果

(1) 菌液、レジン片の調製およびレジン片への菌の付着

前報¹¹⁾と同様、0.5 M galactose 加 Yeast Nitrogen Base (Difco, USA) にて培養した *Candida* を海田らの方法¹⁴⁾により、レジン片¹⁰⁾に付着させた。

(2) 除菌効果の測定

菌付着レジン片を PBS で洗浄し、前報と同様、1 錠 (包)/200 ml の試料溶液 50 ml 中に 37°C で 60 分間浸漬して除菌効果を検討した。

残存菌数の測定は、1 試料当たり 4 枚のレジン片を用いて任意の 10 視野を写真撮影し、菌数を計数して単位面積当たりの付着残存菌数を求めた。

対照として試料溶液の代わりに滅菌蒸留水に浸漬したものについて同様に計数した。

5) 蛋白質分解活性

カゼインを基準として、反応の pH を 7 に調整した場合と各義歯洗浄剤の pH に調整した場合の蛋白質分解活性を測定した。

(1) 試料溶液および基質溶液の調製

試料溶液として、各義歯洗浄剤を 1 錠/150 ml の濃度で蒸留水に溶解したものと、pH 7 に調整したものを調製した。

基質溶液は、乳性カゼイン (メルク, USA) を 6 mg/ml の濃度で、60 mM のリン酸緩衝液 (pH 7 および各義歯洗浄剤溶液の pH) に溶解した。

(2) 蛋白質分解活性の測定

基質溶液 5 ml に試料溶液 1 ml を加え、37°C で 10 分間反応させた後、7.2% トリクロル酢酸溶液 5 ml を加えて、未反応のカゼインを沈澱させて濾過した。濾液 2 ml に 0.55 M 炭酸ナトリウム溶液 5 ml と 3 倍希釈した蛋白測定用フェノール試薬 (和光純薬) 1 ml を加えて 30 分間静置した後、660 nm における吸光度を測定した。

ブランクとして、各試料溶液とカゼイン溶液を反応させずにトリクロル酢酸溶液を加え、同様に操作したときの吸光度を測定して補正した。

(3) チロジン検量線

チロジン標準品 (局方標準品, 国立衛生試験所配布) をよく乾燥し、0.2 N 塩酸を用いて 10, 20, 30, 40 μ g/ml の濃度で溶解した溶液 2 ml を同様の操作を用いて吸光度を測定し、チロジン検量線を作成した。酵素活性は 1 分間に反応液 1 ml 中に生成するペプチド量に相当するチロジン量 (μ g) を 1 unit とし、unit/錠として表し

図 1 濁度法による義歯洗浄剤 A の溶菌効果

図 2 濁度法による義歯洗浄剤 B の溶菌効果

Symbol は図 1 と同じ

た。

6) 酸化力

各試料から生じた過酸化水素量を日本薬局方に記載されたオキシドールの定量法により測定した。

すなわち、各義歯洗浄剤 0.2 g を 8 ml の蒸留水に溶解し、10% 硫酸 2 ml および 1 N のヨウ化カリウム溶液 4 ml を加え、指示薬として加熱溶解した 5 mg/ml のデンプン溶液 3 ml を加え、滴定用チオ硫酸ナトリウム試液 (0.1 N, 和光純薬) を用いて滴定し、その滴定量から試料から生じた有効過酸化水素量を求め、酸化力とした。

図 3 濁度法による義歯洗浄剤 C の溶菌効果

Symbol は図 1 と同じ

表 1 検鏡法による義歯洗浄剤の溶菌効果

試料	終濃度	120 分後の残存菌数 Cells/ml	(対照比%)
対照	—	7.6×10^6	(100.0)
A	400	3.1×10^6	(40.8)
	250	2.8×10^6	(36.8)
	120	1.1×10^6	(14.5)
C	400	7.0×10^6	(92.1)
	250	6.8×10^6	(89.5)
	120	7.6×10^6	(100.0)

終濃度は 1 錠を溶解した液量 (ml)

III. 結 果

1. 溶菌効果

各試料による真菌懸濁液の濁度変化を図 1~4 に示す。値は初期濁度を 100 として百分率で表している。

A では、濃度依存的に濁度が低下し、最も高い 1 錠 / 120 ml の濃度では、120 分後に濁度が 90% 近く低下し、超音波処理後も濁度はほとんど変化はなかった (図 1)。B では、濁度の低下がわずかにみられたが濃度依存性はなかった (図 2)。また、C ではわずかな濁度低下がみられたが、濃度依存性がなく、超音波処理により濁度が上昇した (図 3)。一方、D では濃度依存的に濁度が低下し、1 包 / 120 ml の濃度では 50% 近く低下したが、超音波処理によって濁度が著しく上昇した (図 4)。

A および C を 120 分間作用させた後の暗視野顕微鏡下

の *Candida* 菌数を表1に示す。A, C の各濃度における対照に対する菌数の割合は、濁度測定法とよく一致しており、A では濃度依存的に菌数が低下したのに対し、C では対照と大差なかった。

2. β -1, 3-グルカンの分解活性

各試料の β -1, 3-グルカン分解活性を図5に示した。Aはカードラン (β -1, 3-グルカン) を分解し、経時的に還元糖を遊離させたが、CおよびDでは、活性はなかった。なお、Bは製剤中から多量の還元糖もしくは還元性物質が検出されたため、本方法では β -1, 3-グルカンの分解活性を測定することができなかった。

3. 殺菌効果

表2は、試料一菌の混合液を寒天平板に直接接種したときの colony 数の経時変化を示す。低濃度の1錠/400

ml の濃度において、B および C では30分、Dでは60分の作用で colony が検出されなくなった。A の1錠/400 ml では、検出 colony 数が経時的に低下したが、120分目において、なお 10^6 のオーダーの colony が検出された。一方、A の1錠/120 ml (高濃度) では、30分以降 colony が出現しなかった。

上記の方法では、試料が共存する菌懸濁液を直接寒天平板に接種したため、試料中の殺菌剤等が colony 形成に影響を与える可能性がある。この影響を知るため、30分以降 colony が検出されなかった B および C の1錠/400 ml と A の1錠/120 ml について、寒天平板への塗布前に遠心洗浄して試料を除去し、同量の PBS に再懸濁して colony を計数した。

その結果、B および C の1錠/400 ml では、30分の作用で 10^2 オーダーに低下した後は、ほぼ一定となった。一方、A の1錠/120 ml でも同様であったが、30分後以降も徐々に colony 数が低下する傾向にあった (表3)。

図4 濁度法による義菌洗浄剤Dの溶菌効果
Symbol は図1と同じ

図5 各洗浄剤の β -1,3-グルカン分解活性
●: 義菌洗浄剤A, ■: 義菌洗浄剤C, ▲: 義菌洗浄剤D

表2 試料作用後に直接接種した際の *Candida albicans* の colony 数推移

試料	終濃度	作用時間 (分)				
		0	30	60	90	120
対照	—	8.1×10^7	3.5×10^7	5.2×10^7	5.3×10^7	4.8×10^7
A	400	ND	1.5×10^7	7.8×10^6	5.0×10^6	2.6×10^6
A	250	ND	1.1×10^6	6.8×10^4	7.6×10^4	5.8×10^4
A	120	ND	0	0	0	0
B	400	ND	0	0	0	0
C	400	ND	0	0	0	0
D	400	ND	8.0×10^4	0	0	0

終濃度は1錠 (包) を溶解した液量 (ml) 数値の単位は CFU/ml
ND: 測定を行わなかった。0: colony が検出されなかった

表 3 試料作用後、遠心洗浄して接種した際の *Candida albicans* の colony 数の推移

試料	終濃度	作用時間 (分)				
		0	30	60	90	120
A	120	4.0×10^7	9.8×10^2	4.6×10^2	2.4×10^2	8.0×10^1
B	400	4.0×10^7	2.4×10^2	4.0×10^2	3.8×10^2	2.8×10^2
C	400	4.0×10^7	2.6×10^2	4.2×10^2	2.8×10^2	2.4×10^2

終濃度は 1 錠を溶解した液量 (ml) 数値の単位は CFU/ml

表 4 レジン片に付着残存した *Candida albicans* 細胞数

試料 ¹⁾	残存菌数 ²⁾ cells/mm ²	対照比 (%)	統計解析 ³⁾
対照	11325.5±2704.0	(100.0)	
A	88.5± 49.6	(0.8)	
B	577.8± 692.9	(5.1)	
C	63.7± 58.7	(0.6)	
D	4148.6±2859.8	(36.6)	

¹⁾ 各試料とも 1 錠 (包)/200 ml の濃度で浸漬した。対照は蒸留水に浸漬²⁾ Mean±SD³⁾ Dunn 型の多重比較を用いた non-paired t-test により解析した (* : p<0.005)

4. レジン片からの除菌効果

表 4 にレジン片を各洗浄剤で洗浄したときに残存した単位面積当たりの菌数と対照に対する比を示す。

A, C によって良好に菌が除去され, B においても対照との間に有意差が認められたが, D では除去率が低かった。

5. 蛋白質分解活性および酸化力

義歯洗浄剤の pH に調整した場合における 1 錠当たりの蛋白質分解力は, C, A, B の順で D は活性を示さなかった (表 5)。

1 錠当たりの酸化力 (過酸化水素発生量) は, D が最も強く, C, B の順で A は過酸化水素を発生しなかった (表 6)。

IV. 考 察

前回われわれは, 義歯性口内炎に深く関わっていることが知られている *Candida albicans* に対する市販義歯洗浄剤の効果を同一条件で比較検討した¹¹⁾。今回, さらに種々の条件検討を行い, 測定方法を改良するとともに義歯洗浄剤の真菌に対する溶菌, 殺菌および除菌効果をさらに多面的に検討した。また, 上記の効果を影響を及ぼす蛋白質分解活性および酸化力についても検討した。

表 5 各種義歯洗浄剤の蛋白質分解活性

pH の調整	試料	反応 pH	蛋白質分解活性 ¹⁾ (unit/錠)
pH 7 に調整	A	7.0	2,286± 50.5
	B	7.0	508±106.1
	C	7.0	1,447± 33.9
	D	7.0	60± 39.1
試料の pH に調整	A	6.3	1,470± 55.8
	B	6.3	978± 43.2
	C	6.8	1,933± 87.8
	D	11.4	-11± 9.1

¹⁾ カゼインを分解し, 1 分間に反応液 1 ml 中に生成するペプチドに相当するチロジン量 (μg) を 1 unit とした。試験は triplicate で行った (Mean±SD)

表 6 各種義歯洗浄剤の酸化力

試料	チオ硫酸ナトリウム 標準液の滴定消費量 (ml/g)	酸化力 (過酸化水素発生量) (mg/錠)
A	0.00±0.00	0.00±0.00
B	19.69±0.32	115.03±1.89
C	26.91±1.72	140.42±8.96
D	43.19±1.86	150.22±6.46

試験は triplicate で行った (Mean±SD)

前報では各試験とも 1 濃度条件で行ったが, 本報では総義歯, 部分義歯あるいは片顎のみの義歯の使用者が実際に義歯を洗浄する場合の水の量を考慮し, 実際の使用濃度に近い 3 点で評価した。なお, 1 錠 (包) 当たり重量は製品によって違いがあるが, 現実の使用においては製品重量の違いは考慮されないことから, 濃度単位には重量 % や g/ml を用いず, 各製品の 1 錠または 1 包を溶解した水の量で表した。

溶菌とは真菌 (あるいは細菌) の外骨格を成す細胞壁が損傷を受け, 菌の形状の維持が困難となって burst (破裂) する現象である。これに対し, 殺菌とは菌が生物学的活性を消失する (死滅する) ことであり, 菌の形状のいかんには関わりない。また, 除菌は, 菌の生死にかかわらず, また, 溶菌されるか否かを問わず, 義歯床

（レジン片）等から除去されることと定義できる。

溶菌によって菌は burst し、菌懸濁液の濁度は著しく低下する。濁度を指標に用いた溶菌の評価は、簡便な方法ではあるが、菌懸濁液の濁度は他のさまざまな因子により影響を受ける。すなわち、試料中の不溶物、界面活性剤の共存下の攪拌による気泡の混入等により、濁度は上昇する。また、菌の凝集や菌が殺菌されることによる光透過性の上昇によって濁度は低下すると考えられる。そこで、今回の検討では濁度減少に及ぼすこれらの要因を可及的に排除した。すなわち、遠心分離により試料由来の不溶物を除去して反応に供し、L 字管とバランス振とうによって気泡の混入なく均一な菌の懸濁を実現して濁度測定前の攪拌は行わなかった。また、最後の濁度測定の終了後、超音波処理によって菌の凝集を分散させた濁度についても併せて測定した。一部の試料においては、濁度測定に加えて血球計測板を用いて、暗視野顕微鏡下で形態を保持している菌数を計数することによって溶菌効果を肉眼的にも評価した。また、先にも述べたように、溶菌は細胞壁の損傷によって起こるが、*Candida* の細胞壁は β -1, 3-グルカンから構成されているので、各試料の β -1, 3-グルカン分解活性についても併せて検討した。

その結果、A は濃度依存的に菌懸濁液の濁度を減少させ（図 1）、濁度低下とほぼ平行して暗視野顕微鏡下に形態を維持している菌数を低下させた（表 1）。また、A は明確な β -1, 3-グルカンの分解活性を示した（図 5）。これらにより、A は、実際の使用濃度の範囲内において *Candida albicans* を溶菌することが明らかとなった。一方、B ではわずかな濁度の減少を認めたが濃度依存性がなかった（図 2）。C もわずかな濁度の低下が認められたが濃度依存性がなく、超音波処理によって濁度が上昇した（図 3）。また、C は検鏡によってもほとんど菌数低下が認められなかったことや（表 1）、 β -1, 3-グルカンの分解活性が全く認められなかったことから、少なくとも現実の使用濃度範囲において、B、C は真菌溶菌力を有していないことが明らかとなった。D では濃度依存的に真菌濁度を低下したが、超音波処理により濁度が著しく上昇したこと（図 4）、 β -1, 3-グルカンの分解活性が認められなかったことから、濁度減少は、主に菌が凝集したこと等によるみかけ上の変化であると考えられた。

殺菌力に関しては、B、C は 1 錠/400 ml の低濃度の 30 分間の作用で colony の出現を阻害した。また、D は B、C より殺菌力が劣るが、同じ濃度で 60 分の作用により、colony の出現を阻害した（表 2）。これらの殺菌力は配合

されている酸化剤あるいは殺菌剤の作用によるものと思われるが、D は酸化力が最も強かったにもかかわらず（表 6）、B や C より殺菌力が弱かったことから、殺菌には蛋白質分解酵素や他の要因も影響することが示唆された。一方、A は 1 錠/120 ml（高濃度）では強い殺菌力を示したが、1 錠/250 ml（標準濃度）、400 ml（低濃度）では 120 分後にも colony が検出された（表 2）。A は酸化剤を含有せず（表 6）、真菌に対する殺菌力はもっぱら真菌溶解酵素の溶菌力によっているものと考えられるため、酸化剤系の洗浄剤に比べて殺菌力は弱いといえる。したがって、A の使用にあたっては濃度についても配慮する必要があると考えられた。

この実験では、試料と菌の混合液が接種されるため、試料中の酸化剤等が colony 形成に影響を及ぼす可能性がある。そこで、表 2 で作用時間が 30 分経過したのち colony 形成が認められなかったものについて菌を洗浄し、共存する試料を除去して殺菌力を測定した（表 3）。その結果、三者とも 30 分の作用によって初期の菌数は約 10^{-5} に激減したが、特に B、C では 2 時間目までほとんど菌数は低下しなかった。このことは、洗浄剤によって大部分の菌は死滅しても、少なくとも試験した濃度において 120 分間の作用では、一部の菌は生存していることを示した。

芽胞形成菌の芽胞と栄養型細胞は薬剤感受性が大きく異なることはよく知られている。また、真菌や癌細胞など比較的高等な細胞においても、芽胞と栄養型細胞ほどの違いはないものの、個々の細胞のライフサイクルのフェーズによって薬剤感受性が異なることが知られている。本検討では、薬剤感受性が高いとされる対数増殖期（酵母型）の菌を用いたにもかかわらず、一定の割合で薬剤感受性の低いフェーズの菌の存在が示唆された。実際のデンチャープラークにおいては、菌糸型を含めて多様な表現型の *Candida* が共存していることが知られており^{9,15,16)}、対数増殖期の菌に比べれば薬剤感受性の低いフェーズの菌が多く存在する可能性が高い。したがって、義歯洗浄剤の使用にあたっては、濃度、浸漬時間、使用回数にも配慮する必要があると考えられた。

デンチャープラークのモデルとして本報告においても、レジン片に付着させた *Candida* の除菌を検討した。その結果、真菌溶解酵素および蛋白質分解酵素が配合されている A、蛋白質分解酵素が配合されている B、C において高い除去効果が認められたが、酵素が配合されていない D では除去効果が低かった。蛋白質分解酵素と酸化剤が配合されている B、C を比較すると、C の方が除

菌効果が高かったが、蛋白質分解活性と酸化力は共に C が強く (表 5, 6), 除菌効果はこれらの活性の強さに依存しているものと思われた。

除菌効果の測定に用いた菌は、前報¹¹⁾および海田らの方法¹⁴⁾に準じ、galactose 加培地で培養した。McCourtie と Douglas の報告¹⁷⁾によれば、galactose を炭素源として培養した *Candida albicans* は、他の糖を炭素源として培養した菌に比べてレジンへの付着性が最も強いが、真菌溶解酵素 Zymolyase に対する溶菌感受性が最も低い。したがって、本実験系では、真菌溶解酵素を主要な有効成分とする A の除菌効果には不利な条件であったと思われるが、今回の結果では A の除菌効果は高かった。

以上、*Candida albicans* に対する各種義歯洗浄剤の効果を示したが、前報および今回の結果は、あくまでも 1 種類の菌株を用いたモデル実験であり、実際のデンチャーブラークコントロールの 1 つの側面をみていることに過ぎないことに留意しておく必要がある。

V. 結 論

種々の条件検討を行い、各種義歯洗浄剤の *Candida albicans* に対する効果を再度検討した結果、下記の結論を得た。

1. 溶菌効果は、真菌溶解酵素と蛋白質分解酵素を配合している A のみで明確な活性が認められた。
2. 殺菌効果は、酸化剤と蛋白質分解酵素を配合している B, C が最も強く、ついで酸化剤のみ配合している D, 酸化剤を配合していない A の順であった。しかし、高い殺菌力を示した試料においても、試料共存の影響を除いて平板に接種すると、120 分間の作用では生菌が認められた。
3. レジン片からの除菌効果は A, C が強く、B も高い効果が認められたが、酵素が配合されていない D では、若干低かった。
4. カゼインを基質とした蛋白質分解活性は A, C が強く、B がこれに次ぎ、D は活性を示さなかった。また、酸化力、すなわち過酸化水素の発生量は D が最も多く、C, B がこれに次ぎ、A は全く過酸化水素を発生しなかった。

文 献

- 1) Davenport, J.C. : The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis, Br Dent J, 129 : 151~156, 1970.
- 2) Olsen, I. : Denture stomatitis, Occurrence and distribution of fungi, Acta Odontol Scand, 32 : 329~333, 1974.
- 3) Olsen, I. and Bondevik, O. : Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in Wistar rat, Scand J Dent Res, 86 : 392~398, 1978.
- 4) Renner, R.P., Andors, L. and McNamara, T.F. : The role of *C. albicans* in denture stomatitis, Oral Surg, 47 : 323~328, 1979.
- 5) Schou, L., Wight, C. and Cumming, C. : Oral hygiene habits, denture plaque, presence of yeasts and stomatitis in institutionalised elderly in Lothian, Scotland, Community Dent Oral Epidemiol, 15 : 85~89, 1986.
- 6) Moore, T.C., Smith, D.E. and Kenny, G.E. : Sanitation of dentures by several denture hygiene methods, J Prosthet Dent, 52 : 158~163, 1984.
- 7) Connor, J.N.E., Schoenfeld, C.M. and Taylor, R.L. : An evaluation of an enzyme denture cleanser, J Prosthet Dent, 37 : 147~157, 1977.
- 8) Tamamoto, M., Hamada, T., Miyake, Y. et al : Ability of enzymes to remove *Candida*, J Prosthet Dent, 53 : 214~216, 1985.
- 9) 杉中秀壽 : デンチャーブラークの微生物学的検討, 別冊 The Quintessence デンチャーブラークコントロール, 29~35, クインテッセンス出版, 東京, 1985.
- 10) 玉本光弘 : デンチャーブラークのカンジダに関する研究 (第 2 報) 真菌細胞壁溶解酵素による床用レジンに付着したカンジダの除去, 広歯歯誌, 16 : 250~259, 1984.
- 11) 中本匡美, 玉本光弘, 浜田泰三 : 義歯洗浄剤の真菌に対する評価, 補綴誌, 34 : 892~895, 1990.
- 12) Nelson, N. : A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose, J Biol Chem, 153 : 375~380, 1944.
- 13) Somogyi, M. : Notes on sugar determination, J Biol Chem, 195 : 19~23, 1952.
- 14) 海田博文, 羽生哲也, 上西秀則ほか : *Candida albicans* のアクリルレジンへの付着に関する研究, 補綴誌, 31 : 940~944, 1987.
- 15) 森居研治, 三輪条二, 奥野善彦ほか : アクリル系柔軟性レジン裏装材の粘膜面に発生した汚れの細菌学的検索, 補綴誌, 22 : 679~683, 1966.
- 16) 中村長隆, 尾上孝利, 梅本俊夫ほか : 義歯床粘膜面に付着した denture plaque 中の真菌生息に及ぼす諸因子の検討, 補綴誌, 27 : 863~869, 1983.
- 17) McCourtie, J. and Douglas, L.J. : Relationship between cell surface comparison of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources, Infect Immun, 32 : 1234~1241, 1981.