

原 著

## 銀系無機抗菌剤添加ティッシュコンディショナーの 抗菌効果に及ぼすヒト唾液の影響

石 井 美 江

### The Influences of Human Saliva on Antimicrobial Effects of Tissue Conditioners Containing Silver-zeolite as an Inorganic Antimicrobial Agent

Mie Ishii

(平成13年1月17日受付)

#### 緒 言

ティッシュコンディショナーは、義歯床下粘膜の歪みや病変を改善させる粘膜調整のほか、機能印象、即時義歯および顎補綴栓塞子の暫間裏装などで頻用される義歯治療に極めて重要な材料である<sup>1-2)</sup>。しかしながら、ティッシュコンディショナーは、成分の溶出や口腔内微生物などにより早期に物性や表面性状が劣化し、微生物のリザーバーとなることが指摘されている<sup>3-6)</sup>。このことから、ティッシュコンディショナーは義歯性口内炎や高齢者の死因で高い割合を占めている誤嚥性肺炎などの新たな感染源となりうる事が懸念され<sup>7-9)</sup>、実際、誤嚥性肺炎の発症に口腔衛生状態や口腔内微生物が密接に関与していること<sup>10)</sup>、免疫力の低下した高齢者は全身疾患に罹患する危険性が高いこと<sup>11-13)</sup>などが報告されている。一方、ティッシュコンディショナーは、比較的長期間使用されるとの臨床的現実も存在し、さらに、同材料を用いた義歯の調整時に付着している微生物を飛散させ、診療室や技工室の環境汚染を惹起させる問題点もある。これらのティッシュコンディショナーの問題を解決するため、同材料に抗菌性を持たせることが期待されている。

ティッシュコンディショナーに抗菌剤、中でも抗真菌剤を添加し、真菌の発育を抑制し、また義歯性口内炎を治療するために使用した報告はいくつかなされている<sup>14-16)</sup>。しかしながら、これらの研究ではすべて有

機系抗菌剤を用いているため、早期に抗菌性が喪失しており、ティッシュコンディショナーの根本的な問題解決には至っていない。

最近、抗菌性を有する金属イオンを担持させた無機系抗菌剤が開発され、中でも銀イオンをゼオライトに担持させた銀ゼオライトは、有機系およびその他の無機系抗菌剤と比較して持続的な抗菌性、生物学的安全性などの利点を有し、食品、繊維および医療の各分野で幅広く用いられている<sup>17-21)</sup>。この銀ゼオライトに着目して、Matsuuraら<sup>22)</sup>は市販ティッシュコンディショナーへ応用を試み、人工唾液に浸漬した条件において優れた抗菌性を認めている。さらに、Ueshigeら<sup>23)</sup>は、同銀ゼオライトを添加した市販ティッシュコンディショナーの動的粘弾性特性について検討し、ティッシュコンディショナーの組成を考慮することで、銀ゼオライト添加により生じる不利益を最小限に抑え込み、抗菌性を確保することができると報告している。しかしながら、ティッシュコンディショナーは口腔内で常に唾液に曝され、この唾液中には、銀イオンと反応しやすい蛋白や塩化物イオンなどが含まれているため、臨床応用を考えた場合、同環境下で銀ゼオライト添加ティッシュコンディショナーの抗菌性を維持できるか否かを解明する必要がある。

本研究では、銀ゼオライト添加ティッシュコンディショナーの臨床応用への道を開くべく、同ティッシュコンディショナーの抗菌効果にヒト唾液が及ぼす影響を、主として微生物学的立場から検討した。

#### 材料ならびに方法

##### I. 抗 菌 剤

銀系無機抗菌剤として、銀ゼオライト（ゼオミック®

広島大学歯学部口腔機能修復学講座（歯科補綴学第一講座）（主任：赤川安正教授）本論文の要旨は、平成11年12月18日の第83回広島大学歯学会例会および平成12年4月7日の第78回General Session and Exhibition of IADR (Washington D.C.) において発表した。

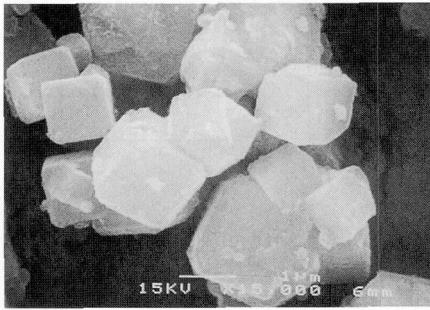


図1 銀ゼオライトの走査型電子顕微鏡写真(倍率×15,000)。

表1 銀ゼオライト(ゼオミック® AJ10N)の物性<sup>31)</sup>

構造式	$\text{MX}_{2/n}\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{YSiO}_2 \cdot \text{ZH}_2\text{O}$ M: 銀、ナトリウムなどのイオン X, Y, Z: 各成分のモル比
性状	白色粉末
細孔径	0.4 nm
真比重	2.1
比表面積	600 m <sup>2</sup> /g
かさ密度	0.4 g/cm <sup>3</sup>
pH	7~9
平均粒径	0.6~2.5 μm
比熱	0.26 cal/g
耐熱性	550°C
耐酸性	pH3
耐アルカリ性	pH13

AJ10N, 品川燃料社製)を選択した。銀ゼオライトの走査型電子顕微鏡写真を図1に、また、その物性は表1に示した。

## II. 対象菌株

対象菌株として、*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* および *Streptococcus constellatus* の標準菌株5菌を選択した(表2)。

表2 対象菌株

<i>Candida albicans</i>	IFO 1385
<i>Staphylococcus aureus</i>	FDA 209P
methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	NCTC10443
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KM 338
<i>Streptococcus constellatus</i>	GIFU 8332

## III. 試料の作製

表3に示す組成により、ティッシュコンディショナーを新しく試作した。すなわち、銀ゼオライトをティッシュコンディショナーの粉末重量に対してそれぞれ1, 2%添加したものをTC-1, TC-2, 添加していないものをTC-0とし、それらを試作ティッシュコンディショナーとした。これらの各材料を粉液比1.17で混和、ガラス板を用いて厚さ2mmに圧接後、直径14mmの円板状に成形、これを実験試料とし、コントロールには、ポリスチレン製プラスチックプレートを用いた。すべての試料は、エチレンオキシドガスにて滅菌後、実験に供した。

表3 本研究で用いたティッシュコンディショナーの組成

粉末	ポリエチルメタクリレート	平均分子量: 250,000
		平均粒径: 34~44 μm
液	ジブチルフタレート	
	エタノール量 14%	
抗菌剤	銀ゼオライト(添加量 0, 1, 2%)	

## IV. 試料の浸漬

試料をヒト唾液、人工唾液または蒸留水に37°Cで浸漬した。ヒト唾液は、薬物を服用していない健常ボランティア3名(男性1名, 女性2名, 平均年齢27.3歳)より得た。すなわち、ボランティアの安静時全唾液を午後3時~6時の時間帯にて採取し、孔径6.0 μmの濾紙にて濾過後、0.8および0.22 μmのミリポアフィルターで濾過滅菌した。人工唾液は、ヒト唾液のイオン組成<sup>24)</sup>とほぼ同等となるよう、表4に示すとおりに調製した。試料の浸漬期間は、1, 7および28日間とした。

表4 ヒト唾液および人工唾液のイオン組成

無機イオン	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>
ヒト唾液	13	20	1.5	0.4	5.0	5.0	15
人工唾液	13	20	1.5	0.5	7.0	7.0	16

ヒト唾液のイオン組成<sup>24)</sup>とほぼ同等量になるように調整した人工唾液を作製し、唾液中の無機成分の影響を検討した。

## V. 抗菌性試験

### 1. 浸漬後試料の抗菌性の判定

各対象菌株を0.15 M NaClを含む10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4, PBS)にて懸濁し、菌濃度を10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> cells/mlに調整した。これら各菌液100 μlを各試料上

に静置，37°C 湿潤下にて24時間培養後，菌液を回収した。ただし，抗菌効果発現時間の測定は，菌液の回収を24時間まで1時間毎とした。回収した菌液のうち，*C. albicans*，*S. aureus*，MRSA および *P. aeruginosa* は Trypticase Soy Broth 寒天平板培地（BBL 社製，LOT #98131）に接種後，37°C 湿潤下にて24時間好気培養した。一方，*S. constellatus* は，GAM ブイヨン寒天平板培地（日本製薬社製，LOT#05422）に接種後，37°C 湿潤下にて24時間嫌気培養した。これら各菌の生菌数（colony forming unit，以下 CFU と略す）を測定，この操作を3回繰り返して平均値を算出，これを各試料の CFU とした。抗菌効果の判定は，この CFU がコントロールに対して0.1%以下の場合を抗菌効果ありとした。

## 2. ヒト唾液浸漬後試料の有機成分除去処理効果の判定

ヒト唾液由来の有機成分を除去するため，1%の Sodium dodecyl sulfate（Wako 社製，LOT#TPQ1900，以下，SDS と略す）および 300 ppm の NaClO（片山化学工業社製，LOT#U9048）の溶液を用いた。37°C ヒト唾液に7日間浸漬した各試料を，それぞれの溶液で10分間処理し，蒸留水にて洗浄後，抗菌性試験を行った。また，有機成分の一つである蛋白は，Bio-Rad Protein Assay（Bio-Rad 社製，LOT#51143A）を用いて染色し，処理効果を視覚的に確認した。さらに，義歯洗浄剤を用いた処理効果についても，酵素系（Pika，ロート製薬社製，LOT#2136X3005），アルカリ過酸化物系（Steradent，Reckitt & Colman 社製，LOT#A031066），中性過酸化物/酵素系（Polident，Block Drug 社製，LOT#F299C）の3種類の義歯洗浄剤を選択し，前述と同様の方法で検討した。

## 結 果

### I. ヒト唾液1日間浸漬後

ヒト唾液または蒸留水に1日間浸漬した場合の各菌の CFU を図2に示した。*C. albicans*，*S. aureus* および MRSA に対して TC-0，TC-1 および TC-2 は，いずれの浸漬においても CFU が0となった。*P. aeruginosa* に対して TC-0 は，いずれの浸漬においてもコントロールとほぼ同様に菌の生育を認め，一方，TC-1 と TC-2 は CFU が0となった。*S. constellatus* に対して蒸留水に浸漬した TC-1 と TC-2 が，また，ヒト唾液に浸漬した TC-2 が抗菌効果を示した。*C. albicans*，*S. aureus* および *P. aeruginosa* の CFU の経時の変化（図3）をみると *C. albicans* および *S. aureus* に対する TC-1，TC-2 の抗菌効果の発現時間は，ヒト唾液に浸漬した場合，蒸留水と比較して延長した。また，いずれの浸漬においても，TC-2，TC-1 の順に早期に CFU が0となった。*P.*

*aeruginosa* に対する TC-1 と TC-2 は，*C. albicans* および *S. aureus* に対して同様の傾向を示した。

### II. ヒト唾液7および28日間浸漬後

ヒト唾液または蒸留水に7日間浸漬した場合の各菌の CFU を図4に，28日間浸漬した場合の CFU を図5に示した。*C. albicans* および *S. aureus* に対して，TC-0，TC-1 および TC-2 は，いずれの浸漬においても抗菌性を示した。MRSA に対して，蒸留水に浸漬した TC-0，TC-1 および TC-2 はいずれも CFU が0となったが，ヒト唾液浸漬では TC-0 は抗菌効果を示さなかった。*P. aeruginosa* に対して，蒸留水に浸漬した TC-1 および TC-2 は CFU が0となったが，ヒト唾液浸漬ではコントロールとほぼ同等の CFU が確認された。*S. constellatus* に対して，蒸留水に浸漬した TC-1 と TC-2 は CFU が0となったが，ヒト唾液浸漬では TC-2 のみ抗菌効果を示した。

以上，1，7 および 28日間浸漬した場合の抗菌効果を表5にまとめた。MRSA の TC-0，*P. aeruginosa* の TC-1，TC-2 および *S. constellatus* の TC-1 がヒト唾液浸漬で抗菌効果を示さず，ヒト唾液による抗菌性への影響が認められた。

### III. ヒト唾液中の無機および有機成分の抗菌効果への影響

無機成分のみからなる人工唾液に7日間浸漬した場合の *P. aeruginosa* の CFU を図6に示した。*P. aeruginosa* に対して，TC-1 および TC-2 は蒸留水に浸漬した場合（表5）と同様抗菌効果を示し，ヒト唾液中の無機成分の影響は認められなかった。次に，ヒト唾液に7日間浸漬した試料を SDS および NaClO で処理した場合の *P. aeruginosa* の CFU を図7に示した。SDS で処理した場合，TC-1 および TC-2 のいずれにおいてもコントロールとほぼ同等の CFU が確認されたが，NaClO で処理した場合には CFU が0となった。また，Bio-Rad Protein Assay により，ティッシュコンディショナー試料上に付着した蛋白を染色した結果においても，処理前に比較して青色の発色が弱まり，蛋白の一部が除去できていたことが確認された。義歯洗浄剤で処理した場合の *P. aeruginosa* の CFU から（図8），いずれの義歯洗浄剤で処理した場合においても，TC-2 は *P. aeruginosa* に対して抗菌効果を示した。また，SDS および NaClO の場合と同様に，蛋白染色を行った結果，蛋白の一部が除去できたことを確認した。

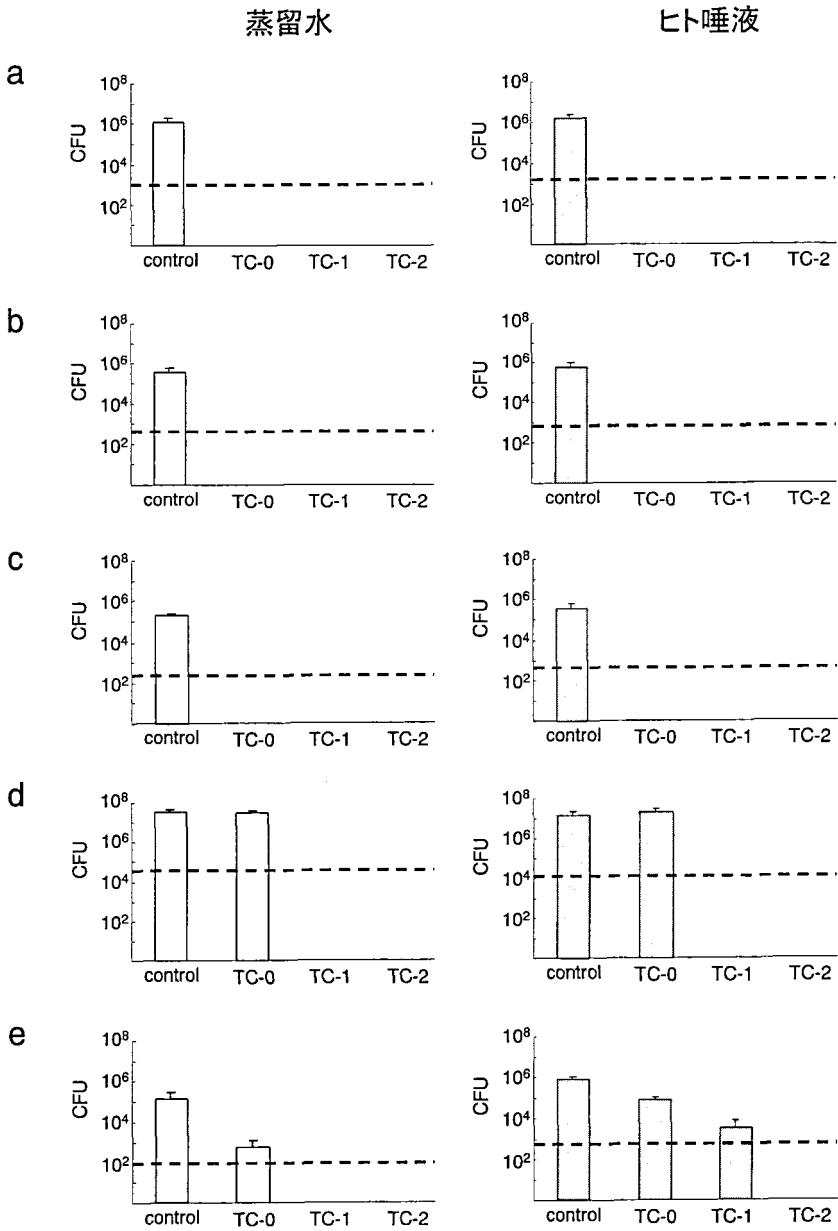


図2 蒸留水またはヒト唾液に1日間浸漬した場合の各菌のCFU。  
 a: *C. albicans* b: *S. aureus* c: MRSA d: *P. aeruginosa* e: *S. constellatus*  
 左側: 蒸留水浸漬 右側: ヒト唾液浸漬

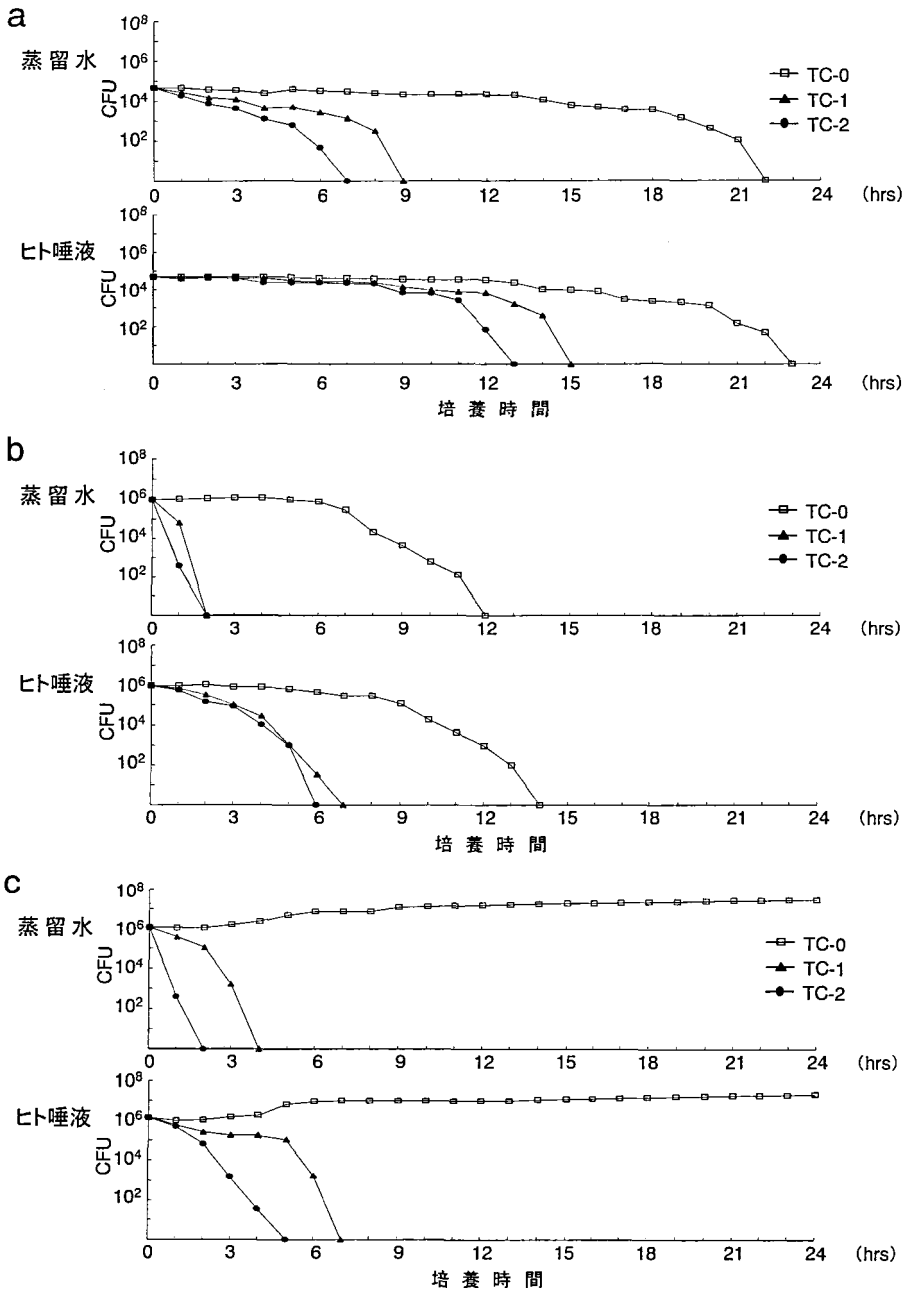


図3 蒸留水またはヒト唾液に1日間浸漬した場合の各菌のCFUの経時的変化。  
a: *C. albicans* b: *S. aureus* c: *P. aeruginosa*

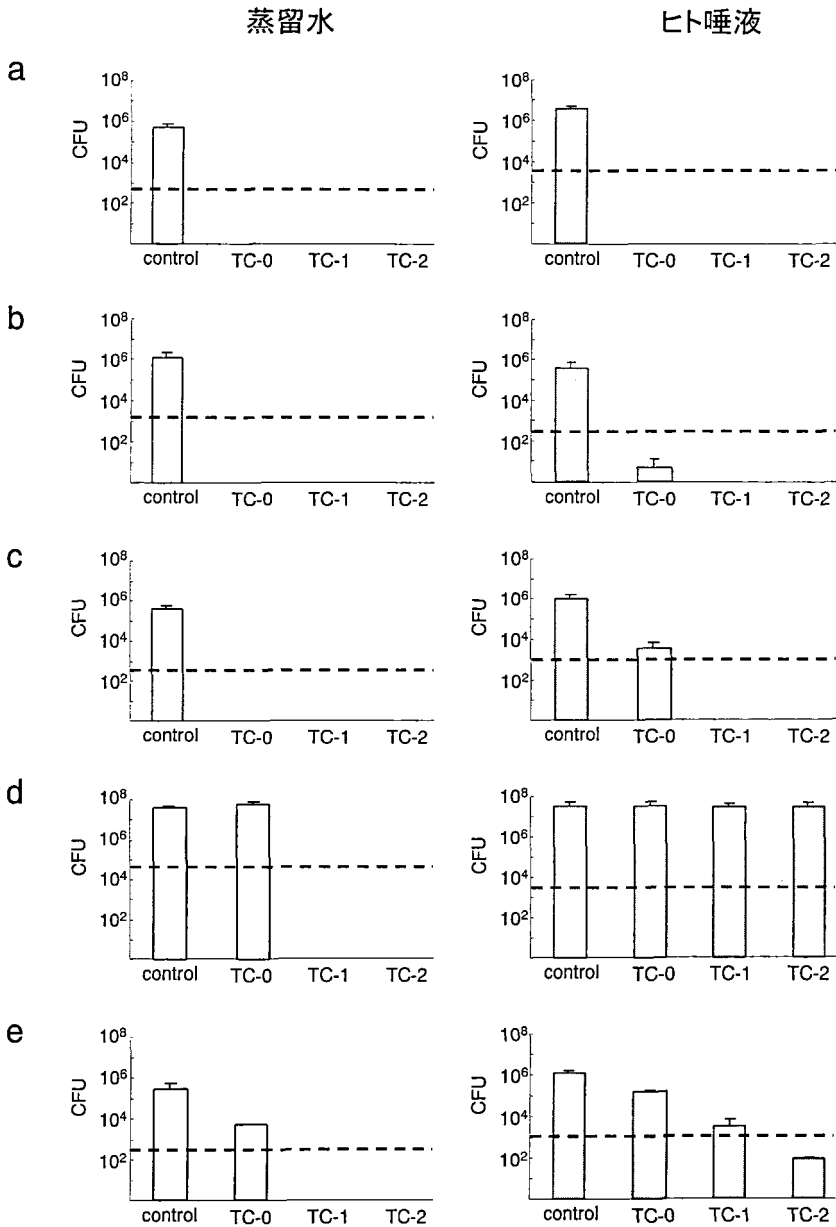


図4 蒸留水またはヒト唾液に7日間浸漬した場合の各菌のCFU。  
 a: *C. albicans* b: *S. aureus* c: MRSA d: *P. aeruginosa* e: *S. constellatus*  
 左側: 蒸留水浸漬 右側: ヒト唾液浸漬

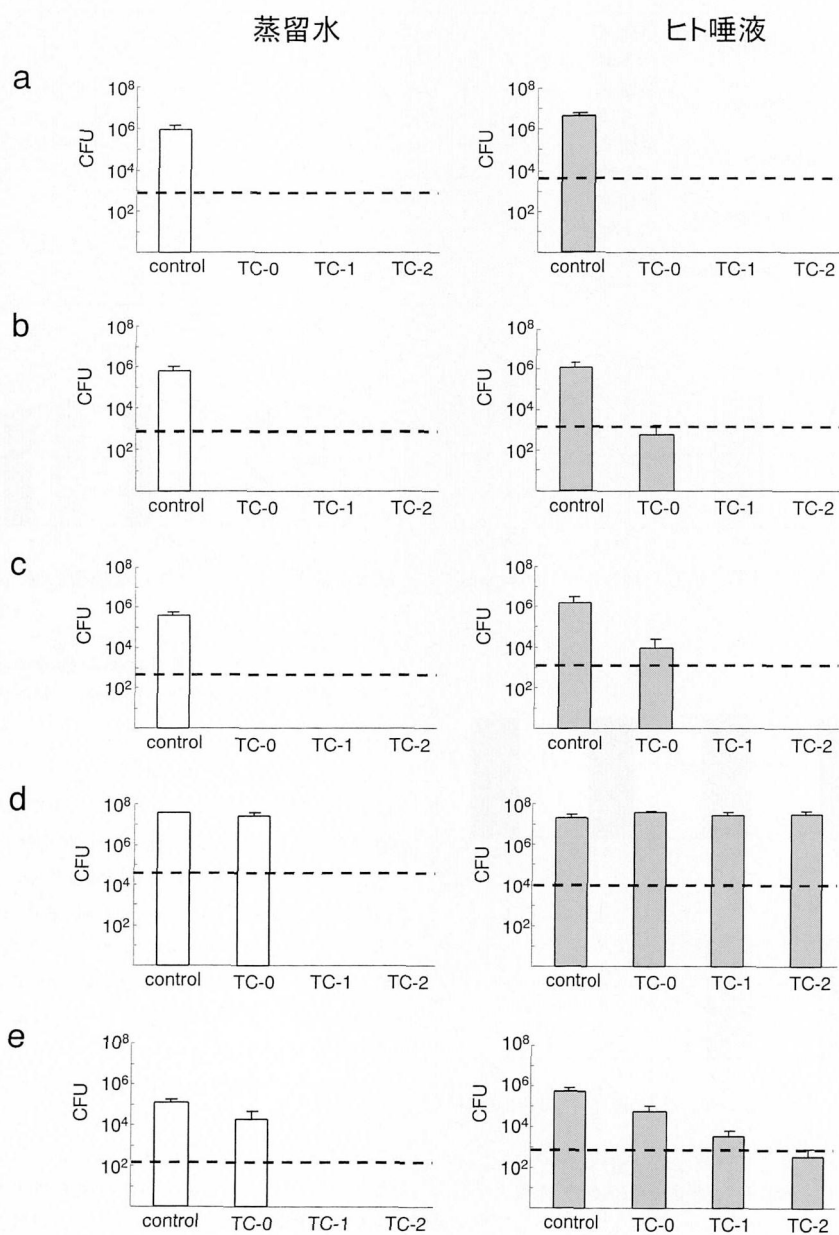


図5 蒸留水またはヒト唾液に28日間浸漬した場合の各菌のCFU。  
 a: *C. albicans* b: *S. aureus* c: MRSA d: *P. aeruginosa* e: *S. constellatus*  
 左側: 蒸留水浸漬 右側: ヒト唾液浸漬

表5 蒸留水またはヒト唾液に1, 7, 28日間浸漬した場合のティッシュコンディショナーの抗菌効果

菌種		TC-0			TC-1			TC-2		
		1	7	28	1	7	28	1	7	28 (日)
<i>C. albicans</i>	蒸留水	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ヒト唾液	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	蒸留水	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ヒト唾液	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MRSA	蒸留水	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ヒト唾液	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	蒸留水	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	ヒト唾液	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>S. constellatus</i>	蒸留水	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	ヒト唾液	-	-	-	-	-	-	+	+	+

(抗菌効果あり：+, なし：-)

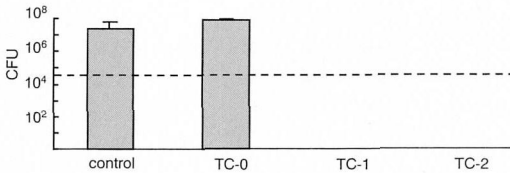


図6 人工唾液に7日間浸漬した場合の *P. aeruginosa* のCFU.

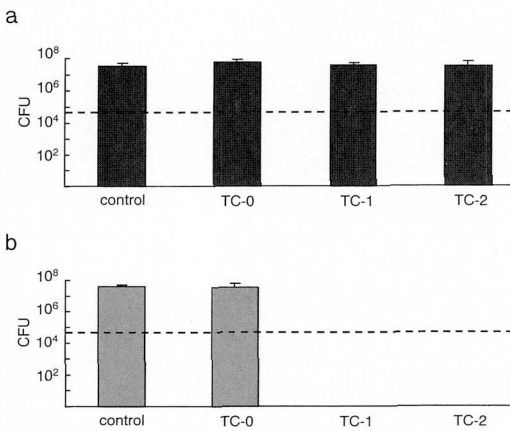


図7 NaClO または SDS で処理した場合の *P. aeruginosa* のCFU.

a: ヒト唾液に7日間浸漬+SDS 処理  
b: ヒト唾液に7日間浸漬+NaClO 処理

## 考 察

### I. 抗菌剤について

ティッシュコンディショナーへの抗菌剤の応用として、真菌の発育抑制および義歯性口内炎の治療を目的とした有機系抗菌剤であるナイスタチン、アンホテリシンB、ケトコナゾールなどを使用した研究がいくつ

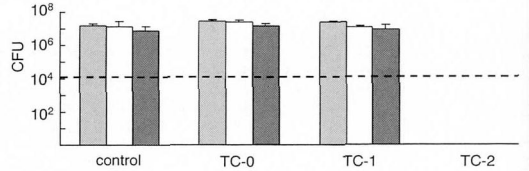


図8 義歯洗浄剤で処理した場合の *P. aeruginosa* のCFU.

■ 酵素系の Pika  
□ アルカリ過酸化物系の Steradent  
■ 中性過酸化物/酵素系の Polident

か報告されている<sup>14-16</sup>)。しかしながら、これらの効果は主に真菌に対するものであり、さらに、抗菌効果が短期間で喪失する<sup>14</sup>)、副作用として肝毒性<sup>15</sup>)や腎毒性<sup>25</sup>)を有しているといった欠点も指摘されている。また、義歯性口内炎を引き起こすといわれる *Streptococcus sanguis* や *Lactobacillus acidophilus*<sup>26,27</sup>)、さらに、高齢者で発生頻度が高い *Staphylococcus aureus* や *Pseudomonas aeruginosa*<sup>28</sup>) などの誤嚥性肺炎の起因菌に対する効果は全く期待できない。

一般的に、有機系抗菌剤は、持続性や耐熱性などの化学的安定性が低く、生物学的安全性およびその分解物や揮発物質などの類縁物質についても完全に安全であるとはいえない<sup>18</sup>)。一方、無機系抗菌剤は、生物学的安全性や物理的安定性、さらに、耐熱性など有機系抗菌剤にはない特徴を有しており、プラスチック製品、繊維製品、医療器具などに広く応用されている<sup>17-21</sup>)。本研究で用いた無機系抗菌剤である銀ゼオライトは、金属イオンの中でも強い抗菌力を示す銀イオンを、結晶性アルミノ珪酸塩として知られる合成A型ゼオライト骨格内部 (Si/Al=2) にイオン交換にて担持させたものである<sup>18,29</sup>)。銀イオンは、酸化還元電位が高く、反



応性に富んでいるため長期間安定に保つことが難しいが<sup>30)</sup>、ゼオライトではこのような反応性の高い銀イオンを安定した状態で保持することが可能である<sup>18,31,32)</sup>。また、空気中においては、銀イオンの分解、気散、蒸発などは全くなく、抗菌力は半永久的に持続するといわれている。一方、溶液中では、液中のイオンの存在により銀ゼオライト固相中の平衡関係が崩れ、固相-液相間の銀イオン交換反応が生じる。しかしながら実際には、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、鉄イオンなどの金属イオンが存在する水道水中でさえ銀ゼオライト中の銀イオンは数~数十 ppb 程度しか溶出しておらず、これらの量は銀ゼオライト中に含まれている銀イオンの  $10^{-6}$ ~ $10^{-7}$  の比率でしかない。これらのことから、抗菌性は長期間持続するとされている<sup>31)</sup>。

銀イオンの抗菌メカニズムについては、以下の二つの説が有力とされている<sup>33-40)</sup>。その一つは、銀イオン説であり、銀イオンが直接微生物の細胞膜に到達して内部に取り込まれ、タンパク質構造の維持、酸化還元電位の調節、酵素活性等の役割を持つ SH 基と反応して、蛋白の構造破壊や酵素活性阻害を引き起こし、結果として抗菌性を示すとする考えである<sup>33-36)</sup>。他の考えは、銀イオンの触媒作用により活性酸素を発生させ、この活性酸素が微生物に作用し抗菌性を示すとする活性酸素説である<sup>37-40)</sup>。本研究において、銀ゼオライトの抗菌効果は、好気条件でも嫌気条件でも同様に観察されたことから、この抗菌効果は前者の説に依るとみなされよう。

現在、ゼオライトは慢性毒性試験をはじめとする数々の試験より、その安全性は確認されており、食品添加物、家畜の飼料等にも利用されている<sup>41,42)</sup>。一方、銀は、古くから食器、医薬品、歯科材料、口腔清涼剤に使用され、発癌性や変異原性に関係しているといった報告もない<sup>43)</sup>。このような安全性の高い銀とゼオライトを組み合わせた銀ゼオライトにおいても、経口経皮急性毒性試験や慢性毒性試験といった多くの試験により、高い安全性が確認できている<sup>18)</sup>。以上のことより、銀ゼオライトは抗菌効果の永続性、さらには物性および生物学的安全性などが、従来使用されている有機系抗菌剤やその他の無機系抗菌剤と比較して優れていると認識できる。そこで、口腔粘膜組織に長期間、広い面積で接触するティッシュコンディショナーに応用した場合においても、生体に悪影響を及ぼすことがなく十分にその効果が発揮できると考えた。しかしながら、生体安全性の確認されている銀ゼオライトをティッシュコンディショナーに添加し、実際に口腔内で応用する場合、口腔内常在菌叢や口腔粘膜などに与える影響は評価しておかなければならないだろう。

## II. 研究方法について

### 1. 試作ティッシュコンディショナーと銀ゼオライト添加量について

銀ゼオライト添加によりティッシュコンディショナーの本来の物性を損なうことがないように、Ueshige ら<sup>23)</sup>の結果を基に、新しいティッシュコンディショナーを試作した。また、銀ゼオライトの添加量については、最大を2%とした。これは、Matsuura ら<sup>22)</sup>の行った抗菌性試験で、2%添加ティッシュコンディショナーが人工唾液に28日間浸漬後においても優れた抗菌性を示したこと、さらに、プラスチック材料への銀ゼオライト添加量の多くが0~2%であること<sup>44)</sup>などに依っている。

### 2. ヒト唾液について

ヒト唾液の組成や分泌量は、安静時と刺激時で異なるといわれている<sup>24)</sup>。本実験では、安静時唾液を使用した。ティッシュコンディショナーを口腔内で用いた際、一日のうち咀嚼に要する時間は平均54分であること<sup>45)</sup>を考慮し、刺激唾液ではなく安静時唾液が適切であると考えた。また、唾液の組成や分泌量は、加齢と共にわずかながら減少するとの報告<sup>46,47)</sup>や、加齢により影響されないとする相反する結果が報告されている<sup>47)</sup>。一般的に、高齢者は成年者と比較して全身疾患に罹患し薬物を服用する機会が多いことから、唾液分泌量が減少し、口腔乾燥状態を有している可能性が高い<sup>45)</sup>。したがって、本研究では、唾液の組成に影響を与える薬物の使用や喫煙の経験がなく、全身疾患に罹患していない、健康な成年者3名の唾液を用いた。また、ヒト唾液の組成には個体差が認められる<sup>24)</sup>が、蛋白量、pH および分泌速度が安静時唾液の平均的な値<sup>24)</sup>とほぼ同程度であるボランティアを選択し、採取する時間帯も一定にし、できるだけ条件を同一にするよう考慮した。

### 3. 試料の浸漬について

試料の浸漬条件は、37°C ヒト唾液および蒸留水の2条件とした。義歯は口腔内に装着されて常に唾液に曝されており、また、口腔外では、乾燥による義歯の変形を防ぐため水中保管が常であるからである。ティッシュコンディショナーは、溶液に浸漬することによって成分の溶出が早期に起こり、物性や表面性状が劣化することが指摘されている。これを、ヒト唾液に浸漬した場合、ヒト唾液中の蛋白、脂質、糖質をはじめとした様々な有機成分とナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、塩化物イオンなどの無機成分<sup>24)</sup>が、銀ゼオライトからの銀イオンの溶出傾向を変化させる可能性が考えられる。さらに、銀イオンは蛋白や塩化物イオンなどと反応し

やすいことから、抗菌効果が阻害される可能性も懸念された。したがって、ヒト唾液中の無機成分のみからなる人工唾液浸漬後、ならびに有機成分の除去処理後の抗菌効果についても検討した。

ティッシュコンディショナーの使用期間は、その目的により異なるものの、およそ2～7日間といわれ、材料の物性からみて長くとも14日間が限度である<sup>6)</sup>。しかしながら、実際の臨床現場においては、術者がティッシュコンディショナーの交換を怠る、義歯に裏装されたティッシュコンディショナーの快適さのために患者が来院しないなどの理由から、比較的長期間使用されることも多い。さらに、飲食物の影響により、口腔内の温度差およびpHが変動し、早期に劣化してしまう可能性も示されている<sup>48,49)</sup>。そのため、1日あるいは7日間の浸漬期間では口腔内の過酷な状況を再現するには短く、Matsuuraら<sup>22)</sup> および Ueshigeら<sup>23)</sup> は、28日間の浸漬期間を設けている。そこで本研究でも、1, 7および28日の3期間の浸漬を設定した。

#### 4. 対象菌株について

高齢者における呼吸器感染症は、成壮年者と比較して発生頻度が著しく高く、予後不良で死亡率も高い点が特徴的である<sup>28)</sup>。この呼吸器感染症で死亡する人の9割以上が65歳以上の高齢者で、この中に誤嚥が多く認められている<sup>50)</sup>。誤嚥性肺炎の発症には、口腔内細菌が大きな役割を果たしており、この予防には口腔細菌数や咽頭細菌数を減少させることが必要で、歯および義歯の清掃ケアが必須であるといわれている<sup>10)</sup>。誤嚥性肺炎の起原菌には、*Streptococcus milleri* group, *Bacteroides oralis*, *Prophyromonas gingivalis*, *C. albicans* などの口腔内常在菌および *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa* などの院内感染の起原菌が挙げられる<sup>10,51)</sup>。また、高齢者では義歯性口内炎の発症率が高く、これらの発症にはデンチャープラークが深く関わりを持つことが明らかにされており<sup>9,52)</sup>、実際、ティッシュコンディショナーから *Candida* が高頻度に検出されている<sup>53)</sup>。また、義歯の粘膜面から採取されたデンチャープラークから *Streptococci*, *Candida*, *Staphylococci* の検出率が極めて高いことが報告されていることから<sup>13,54)</sup>、ティッシュコンディショナーから採取されるデンチャープラークにおいても同様の微生物が検出される可能性は高い。また、木田<sup>28)</sup> は誤嚥性肺炎の起原菌の頻度は、*S. aureus* および *P. aeruginosa* とともに約30.3%と報告している。さらに、近年、口腔内常在菌である *S. milleri* group, なかでも *S. constellatus* が呼吸器感染症の起原菌として注目されている<sup>55)</sup>。これらの理由から、本研究では対象菌株として、*C. albicans*, *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa* および *S. milleri* group に属する

*S. constellatus* を選択した。

#### 5. 抗菌効果の判定について

ティッシュコンディショナーの抗菌性を示す指標として、簡便な阻止帯測定法が用いられる<sup>56)</sup>。しかしながら、この方法には以下の3つの問題を挙げることができる。第1は、詳細な生菌数が不明なため、抗菌効果を定量的に示すことができず、阻止帯の大きさは抗菌作用の強弱を表しているにすぎないことである。第2に、寒天を使用するため、抗菌効果を有する材料でも寒天に浸透しなければ阻止帯が形成されないといった欠点を有する。すなわち、この系は固相上のものであり、実際の口腔環境は唾液という液相上での現象であることを考えると、得られた結果がそのまま *in vivo* に反映されるとは考え難い。第3の問題は、微生物が栄養面に恵まれる培地上で培養される点にある。微生物は栄養条件のよい環境下であれば活発に増殖し、抗菌物質もよく取り込むため、抗菌物質に対し感受性を示すとされる<sup>57,58)</sup>。しかし、唾液中には、リゾチーム、ペルオキシターゼ、ラクトフェリンなどの抗菌因子が含まれていることやヒト唾液中に存在する栄養面などを考慮すると、口腔内は細菌が増殖していくにはきわめて厳しい条件となっている<sup>59)</sup>。すなわち、口腔内に存在する微生物は増殖期よりはむしろ静止期の状態であると推測され、この方法から得られる抗菌効果は、実際の口腔内のものより大きくなるきらいがある。本研究では、実際に菌数を定量化し、評価することができるCFUを測定することにより、抗菌効果を判定した。本研究では菌はPBS中に懸濁した状態であり、静止期の微生物に対する抗菌効果を測定したこととなり、口腔内微生物の状態を再現していると考えられる。現時点において、歯科材料の抗菌効果の判定基準は確立されていないため、本研究では、抗生物質のminimum bactericidal concentration (MBC) の概念を採用し<sup>60,61)</sup>、コントロールに対して0.1%を抗菌効果の判定基準とし、0.1%以下となった場合を「抗菌効果あり」とした。

#### Ⅲ. 研究結果について

ヒト唾液に1日間浸漬したTC-0においても、*C. albicans*, *S. aureus* および MRSA に対して抗菌効果を示したことから、特に、*C. albicans* および *S. aureus* については菌液の回収を1時間毎とし、抗菌効果の発現時間について検討した。いずれの浸漬においても、銀ゼオライトの添加により、早期に抗菌効果が発現しており、銀ゼオライトの添加が抗菌効果の発現に大きく関与していることが確認できた。しかしながら、TC-0は作用時間が長ければ抗菌効果が認められており、このことは、ティッシュコンディショナーから溶出する

エタノールや可塑剤であるジブチルフタレートが抗菌物質として作用していることによるものであろう<sup>62)</sup>。一方、ヒト唾液浸漬では、蒸留水浸漬に比較して *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* の3菌いずれに対しても、抗菌効果の発現時間が延長しており、ヒト唾液が銀イオンや試料から溶出する成分の微生物への到達に影響している可能性が示された。

ヒト唾液に7および28日間浸漬した場合、*P. aeruginosa* においてTC-1, TC-2の抗菌効果が認められなかった。そこで、*P. aeruginosa* において、2, 3, 4, 5, 6日間ヒト唾液に浸漬した場合の抗菌効果についても検討したところ、経時的に抗菌効果が減弱するものの、6日間ヒト唾液に浸漬した場合TC-2では抗菌効果を示した。それゆえ、7日間以上の浸漬で抗菌効果が発揮されなくなった理由としては、ヒト唾液中に銀イオンが溶出し、抗菌効果に必要な銀イオンの絶対量が減少した可能性が考えられた。蒸留水またはヒト唾液で処理した試料からPBS中に溶出した銀濃度を、原子吸光度計で測定したところ、それぞれ250 ppb, 255 ppbと同程度であったことから、銀イオンの溶出阻害や銀イオンの枯渇によるものとは考えられない。その他として、ヒト唾液中の無機成分に着目し、銀イオンと反応して塩化銀を形成する塩化物イオンの影響を懸念した。そこで、ヒト唾液の無機成分とほぼ同等量に調整した人工唾液を使用して検討したところ、蒸留水に浸漬した場合と同様、TC-1, TC-2に抗菌効果が認められたので、無機成分の関与は否定できた。この事実は、銀ゼオライトをポリエステル繊維に2%添加した生地を、塩素系漂白を含めたりネン洗濯に150回かけても、抗菌効果が保持されたとの内田らの報告ともよく一致する<sup>32)</sup>。次に、唾液中の有機成分の影響を考え、SDS および NaClO を使用して試料上に付着した有機成分の除去を試みたところ、SDS では効果が認められなかったものの、NaClO では抗菌効果が回復した。これらの結果は、唾液中の有機成分が抗菌効果の阻害に関与している可能性を示唆している。NaClO と陰イオン性界面活性剤である SDS との効果の違いは、前者が蛋白を溶解するのに対して、後者は蛋白を可溶化させるのみであり<sup>63)</sup>、両者の作用の差異により抗菌効果の発現に影響したものと思われる。実際、ティッシュコンディショナー上に付着した有機成分の一つである蛋白を染色したところ、SDS と比較して NaClO で処理した場合、付着した蛋白がより多く除去されたことが視覚的に確認できた。蛋白、なかでも、糖蛋白であるムチンは、細菌の細胞表面に付着し凝集などに影響すること<sup>45)</sup> や高分子唾液ムチンである MG1 は *P. aeruginosa* の pili と特異的に結合しやすい<sup>64)</sup> との報告があり、抗

菌効果の阻害に影響している可能性は高い。また、*P. aeruginosa* のバイオフィームは菌体外にグリコカリックスを産生して形成され、有機成分を内部に取り込むことで強固になると考えられている<sup>65,66)</sup>。銀ゼオライト添加量を5%, 10%と増加した場合の *P. aeruginosa* に対する抗菌効果を検討したところ、銀ゼオライト10%添加において抗菌効果を認めた。したがって、本研究では、ムチンを含む有機成分が *P. aeruginosa* の形成するバイオフィームに関与し、抗生物質と同様銀イオンに対して抵抗を示し、通常の銀イオン濃度では抗菌効果が発揮されなかったと思われる。

ヒト唾液に浸漬した場合、*S. constellatus* に対してTC-0, TC-1は抗菌効果を示さなかった。van der Hoevenら<sup>67)</sup>は、*S. constellatus* がムチン存在下において生存能力が高いことを報告しており、この点が抗菌効果の発現に影響した可能性も推察される。

銀ゼオライト添加ティッシュコンディショナーを臨床応用した場合、本研究の結果と同様、有機成分がティッシュコンディショナー上に付着し、抗菌効果を阻害する可能性がある。そこで、この有機成分を除去する方法として、養歯の化学的清掃を試みた。ここでは、有効成分が異なる酵素系、アルカリ過酸化物系、中性化酸化物/酵素系の3種の養歯洗浄剤<sup>68)</sup>を選択し、Pika, Steradent, Polidentを用いたが、これらの詳細な成分については公表されておらず、実際、どの成分が有機成分の除去に寄与したかは明らかでない。しかしながら、蛋白の染色を行った場合、これら養歯洗浄剤で処理した試料では、処理していない試料と比較して付着した蛋白の一部が除去されていることが視覚的に確認されたことから、養歯洗浄剤に含まれている次亜塩素酸や界面活性剤等の効果により、ティッシュコンディショナー上の有機成分が除去され、特に、TC-2において抗菌効果が認められたものと考えられた。したがって、本材料を臨床応用する際には、6日に1度の頻度で養歯洗浄剤を併用し、原因である有機成分を除去すれば、銀ゼオライトの添加量は2%で抗菌効果が十分発揮されるとみなされる。この方法により、養歯洗浄剤によるティッシュコンディショナーの劣化も最小限に抑えることができるとと思われる。

## 総 括

抗菌性ティッシュコンディショナーの臨床応用への可能性を明らかにすることを目的として、銀ゼオライト添加ティッシュコンディショナーの抗菌効果にヒト唾液が及ぼす影響について、微生物学的立場から検討し、以下の結果を得た。

1. ヒト唾液に1日間浸漬した場合、TC-2はすべて

の菌に対して抗菌効果を示した。

2. 銀ゼオライト添加量と抗菌効果の発現時間をみたところ、蒸留水に比較してヒト唾液浸漬では、抗菌効果の発現時間が延長した。また、*C. albicans*, *S. aureus* および *P. aeruginosa* の3菌のCFUは、TC-2, TC-1の順に早期に減少した。

3. ヒト唾液に7および28日間浸漬した場合、TC-2は*C. albicans*, *S. aureus*, MRSA および *S. constellatus* に対して抗菌効果を示したものの、*P. aeruginosa* に対しては抗菌効果が認められなかった。

4. 無機成分のみからなる人工唾液に7日間浸漬した結果より、ヒト唾液中の無機成分の関与は認められなかった。

5. ティッシュコンディショナー上に付着した有機成分の除去を試みた結果、抗菌効果が示されたことから、唾液中の有機成分の関与が示唆された。

以上の結果から、ヒト唾液により処理した銀ゼオライト添加ティッシュコンディショナーの抗菌効果は、菌種により異なることが明らかとなり、その原因としてティッシュコンディショナーに付着する唾液中の有機成分が関与している可能性が示唆された。以上のことから、新しい抗菌性ティッシュコンディショナーの臨床応用への有益な知見を得ることができた。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学口腔機能修復学講座（歯科補綴学第一講座）赤川安正教授に衷心より感謝の意を表します。

御教示、御校閲を賜りました本学口腔機能修復学講座（歯科補綴学第二講座）濱田泰三教授、ならびに本学応用口腔医学講座（口腔細菌学講座）菅井基行教授に深謝致します。

また、研究遂行上および本論文作成上、御助言と御鞭撻を賜りました本学口腔機能修復学講座（歯科補綴学第一講座）阿部泰彦助手、田中秀司先生ならびに上重守克先生に厚く御礼申し上げますとともに、本研究を行うにあたり、多大の御支援を頂きました佐藤裕二助教授をはじめとして教室員各位、特に研究遂行に御助力頂きました竹内真帆先生に感謝致します。

最後に、本実験に御協力頂きました品川燃料株式会社および株式会社松風に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 佐藤隆志：ティッシュコンディショニングの意義とその一般的適用法。歯界展望 65, 275-288, 1985.
- 2) 皆木省吾, 佐藤隆志：粘膜調整法の意義と適応症。歯科ジャーナル 32, 41-45, 1990.
- 3) Allison, R.T. and Douglas, W.H.: Microcolonization of the denture-fitting surface by *Candida albicans*. *J. Dent.* 1, 198-201, 1973.
- 4) 津留宏道, 長澤 亨, 大川周治, 守谷直史：粘膜調整と義歯床下粘膜組織の変化—病変とティッシュコンディショナーの治療効果—。歯科ジャーナル 32, 47-53, 1990.
- 5) 浜田泰三, 玉本光弘：粘膜調整材の微生物学的検討—ティッシュコンディショナー粘膜面に発生した汚れの微生物学的検討—。歯科ジャーナル 32, 80-86, 1990.
- 6) 田中久敏, 平井東英, 吉田鐘一, 熊谷啓二：粘膜調整材（アクリル系軟性裏装剤）の物性の変化による臨床使用上の注意点。歯科ジャーナル 32, 54-62, 1990.
- 7) Gates, W.D., Goldschmidt, M. and Kramer, D.: Microbial contamination in four commercially available denture adhesives. *J. Prosthet. Dent.* 71, 154-158, 1994.
- 8) Truhlar, M.R., Shay, K. and Sohnle, P.: Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. *J. Prosthet. Dent.* 71, 517-524, 1994.
- 9) Nikawa, H., Hamada, T. and Yamamoto, T.: Denture plaque-past and recent concerns. *J. Dent.* 26, 299-304, 1998.
- 10) 三宅洋一郎：誤嚥性肺炎の発症における口腔細菌の役割と細菌学的にみた口腔ケアの意義。DENTAL OUTLOOK 91, 1298-1303, 1998.
- 11) Wilkieson, C., Samaranayake, L.P., MacFarlane, T.W., Lamey, P.J. and MacKenzie, D.: Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *J. Oral Pathol. and Med.* 20, 13-16, 1991.
- 12) Marsh, P.D., Percival, R.S. and Challacombe, S.J.: The influence of denture-wearing and age on the oral microflora. *J. Dent. Res.* 71, 1374-1381, 1992.
- 13) 柏原稔也, 市川哲雄, 川本苗子, 蟹谷英生, 堀内政信, 弘田克彦, 三宅洋一郎, 松本直之：老人病院入院患者の口腔状態とデンチャーブランクの細菌構成について。補綴誌 40, 448-453, 1996.
- 14) Thomas, C. and Nutt, G.: The *in vitro* fungicidal properties of Visco-gel, alone and combined with nystatin and amphotericin B. *J. Oral Rehabil.* 5, 167-172, 1978.
- 15) Quinn, D.M.: The effectiveness, *in vitro*, of miconazole and keteconazole combined with tissue conditioners in inhibiting the growth of *Candida albicans*. *J. Oral Rehabil.* 12, 177-182, 1985.
- 16) Chow, C.K., Matear, D.W. and Lawrence, H.P.: Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. *Gerodontology* 16, 110-

- 118, 1999.
- 17) Uchida, T., Maru, N. and Furuhashi, M.: Antibacterial zeolite balloon catheter and its potential for urinary tract infection control. *Acta Urologica Japonica* **38**, 973-978, 1992.
  - 18) 内田眞志：抗菌性ゼオライトとその応用。化学工業, 736-742, 1995.
  - 19) Nikawa, H., Yamamoto, T., Hamada, T., Rahardjo, M.B., Murata, H. and Nakanoda, S.: Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *J. Oral Rehabil.* **24**, 350-357, 1997.
  - 20) 上重守克, 阿部泰彦, 赤川安正：無機系抗菌剤の歯科材料への応用。日本歯科評論 **694**, 201-203, 2000.
  - 21) Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M. and Uchida, M.: Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent. Mater.* **16**, 452-455, 2000.
  - 22) Matsuura, T., Abe, Y., Sato, Y., Okamoto, K., Ueshige, M. and Akagawa, Y.: Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. *J. Dent.* **25**, 373-377, 1997.
  - 23) Ueshige, M., Abe, Y., Sato, Y., Tsuga, K., Akagawa, Y. and Ishii, M.: Dynamic viscoelastic properties of antimicrobial tissue conditioners containing silver-zeolite. *J. Dent.* **27**, 517-522, 1999.
  - 24) 坂田三弥, 中村嘉男：基礎歯科生理学。医歯薬出版, 東京, 311-329, 1991.
  - 25) 真木正博, 三浦 亮：メイラー医薬品の副作用大辞典。12版。西村書店, 東京, 699-715, 1998.
  - 26) Budtz-Jørgensen, E., Theilade, E., Theilade, J. and Zander, H.A.: Method for studying the development, structure and microflora of denture plaque. *Scand. J. Dent. Res.* **89**, 149-156, 1981.
  - 27) Koopmans, A.S.F., Kippuw, N. and de Graaff, J.: Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. *J. Dent. Res.* **67**, 1246-1250, 1988.
  - 28) 木田厚瑞：高齢者の呼吸器疾患—嚥下性肺炎の病態について—。老年歯学 **10**, 3-10, 1995.
  - 29) 環境庁大気保全局企画課監修：石綿・ゼオライトのすべて。財団法人日本環境衛生センター, 川崎, 477-489, 1987.
  - 30) 高橋ハビエル：無機系抗菌剤使用「抗菌フィルム」の現況とその効果。ジャパンフードサイエンス **36**, 735-742, 1997.
  - 31) 山本達雄, 内田眞志, 栗原靖夫：金属イオンを含むゼオライトの殺菌作用について。防菌防黴誌 **19**, 425-431, 1991.
  - 32) 大谷朝男：多様化する無機系抗菌剤と高度利用技術。アイシーピー, 東京, 1-20, 107-129, 1997.
  - 33) Schreurs, W.J.A. and Rosenberg, H.: Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **152**, 7-13, 1982.
  - 34) Kaur, P. and Vadehra, D.V.: Mechanism of resistance to silver ions in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 165-167, 1986.
  - 35) Russel, A.D. and Hugo, W.B.: Antimicrobial activity and action of silver. *Prog. Med. Chem.* **31**, 351-370, 1994.
  - 36) Clement, J.L. and Jallet, P.S.: Antibacterial silver. *Metal Based Drugs* **1**, 467-482, 1994.
  - 37) 富岡敏一, 富田勝巳, 岡 弘章, 宮地寿明, 西野敦：錯体銀塩の抗菌作用。防菌防黴誌 **21**, 543-548, 1993.
  - 38) Kourai, H., Manabe, Y. and Yamada, T.: Mode of bactericidal action of zirconium phosphate ceramics containing silver ions in the crystal structure. *J. Antibact. Antifung. Agents.* **22**, 595-601, 1994.
  - 39) 檜山圭一郎, 森安信彦, 大森輝二, 宮川 修, 情野芳夫, 後藤義昭：銀および亜鉛ゼオライトの抗菌力とこれらを練り込んだポリエチレンフィルムの抗菌作用。防菌防黴誌 **23**, 197-203, 1995.
  - 40) 田中 敦：無機系抗菌剤実用講座8・硅酸アルミン酸マグネシウム系抗菌剤。防菌防黴誌 **24**, 813-819, 1996.
  - 41) 和賀井文作：子豚に対するゼオライト添加飼料の効果(2)。畜産の研究 **40**, 1260-1264, 1986.
  - 42) 内田眞志：無機系抗菌剤実用講座6・銀ゼオライト。防菌防黴誌 **24**, 735-742, 1996.
  - 43) 石谷孝佑：抗菌性包装材の開発と利用。食品工業における科学・技術の進歩 **4**, 41-54, 1991.
  - 44) 栗原靖夫：無機系抗菌剤実用講座18・無機系抗菌剤の実用例①プラスチックへの利用。防菌防黴誌 **25**, 735-740, 1997.
  - 45) 河野正司：唾液一歯と口腔の健康。医歯薬出版, 東京, 31-46, 107-116, 1997
  - 46) Denny, P.C., Denny, P.A., Klauser, D.K., Hong, S.H., Navazesh, M. and Tabak, L.A.: Age-related changes in mucins from human whole saliva. *J. Dent. Res.* **70**, 1320-1327, 1991.
  - 47) Vissink, A., Spijkervet, F.K. and Amerongen, A.V.: Aging and saliva, a review of the literature. *Spec. Care Dentist.* **16**, 95-103, 1996.
  - 48) Graham, B.S., Jones, D.W., Thomson, J.P. and Johnson, J.A.: Clinical compliance of two resilient denture liners. *J. Oral Rehabil.* **17**, 157-163, 1990.
  - 49) Jepson, N.J.A., McCabe, J.F. and Storer, R.: Age changes in the viscoelasticity of a temporary soft lining material. *J. Dent.* **21**, 244-247, 1993.
  - 50) 佐々木英忠：寝たきり老人の肺炎予防。歯界展望 **80**, 135-145, 1992.
  - 51) 吉田耕一郎, 二木芳人：肺カンジダ症。臨床と微生物 **27**, 155-158, 2000.
  - 52) Markovic, D., Puskar, T. and Tesic, D.: Denture cleaning techniques in the elderly affecting the occurrence of denture-induced stomatitis. *Med.*

- Pregl.* **52**, 57–61, 1999.
- 53) Makila, E. and Hopsu-Havu, V.K.: Mycotic growth and soft denture lining materials. *Acta Odontol. Scand.* **35**, 197–205, 1977.
- 54) Tawara, Y., Honma, K. and Naito, Y.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* on denture surfaces. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* **37**, 119–128, 1996.
- 55) 山根誠久, 永田邦昭, 宮川静代, 戸坂雅一: “*Streptococcus milleri*” 群に属する臨床分離株の比較同定試験. *臨床と微生物* **22**, 715–723, 1995
- 56) 山田嘉昭: 粘膜調整剤の劣化に関する実験的研究. *補綴誌* **35**, 1015–1027, 1991.
- 57) Brown, M.R. and Williams, P.: Influence of substrate limitation and growth phase on sensitivity to antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **15**, 7–14, 1985.
- 58) Eng, R.H., Padberg, F.T., Smith, S.M., Tan, E.N. and Cherubin, C.E.: Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 824–828, 1991.
- 59) 奥田克爾: デンタルブランク細菌. 2版. 医歯薬出版, 東京, 1–26, 1999.
- 60) Bruns, W., Keppeler, H. and Baucks, R.: Suppression of intrinsic resistance to penicillins in *Staphylococcus aureus* by polydocalanol, a dodecyl polyethyleneoxid ether. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 632–639, 1985.
- 61) Gristina, A.G., Jennings, R.A., Naylor, P.T., Myrvik, Q.N. and Webb, L.X.: Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 813–816, 1989.
- 62) Nikawa, H., Yamamoto, T. and Hamada, T.: Effect of components of resilient denture-lining materials on the growth, acid production and colonization of *Candida albicans*. *J. Oral Rehabil.* **22**, 817–824, 1995.
- 63) 堀尾武一: 蛋白質・酵素の基礎実験法. 2版. 南江堂, 東京, 65, 1994.
- 64) Reddy, M.S.: Binding between *Pseudomonas aeruginosa* adhesins and human salivary, tracheobronchial and nasopharyngeal mucins. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **40**, 403–408, 1996.
- 65) 渡辺豊彦: 共焦点レーザー走査顕微鏡による緑膿菌バイオフィルムの観察. *感染症学雑誌* **69**, 114–122, 1994.
- 66) Ishida, H., Ishida, Y., Kurosaka, Y., Otani, T., Sato, K. and Kobayashi, H.: *In vitro* and *in vivo* activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1641–1645, 1998.
- 67) van der Hoeven, J.S., van den Kieboom C.W. and Camp, P.J.: Utilization of mucin by oral *Streptococcus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **57**, 165–172, 1990.
- 68) Nikawa, H., Iwanaga, H., Hamada, T. and Yuhta, S.: Effects of denture cleansers on direct soft denture lining materials. *J. Prosthet. Dent.* **72**, 657–662, 1994.