

デンチャー プラークのカンジダに関する研究  
(第1報) デンチャー プラークのカンジダ叢と義歯性口内炎との関係

玉 本 光 弘

Studies on *Candida* in Denture Plaque  
(Part 1) The Relationship between *Candida* in Denture Plaque  
and Denture Stomatitis

Mitsuhiro TAMAMOTO

広島大学歯学雑誌  
第16巻, 第2号, 242-249, 1984 (昭和59年)

別 刷

# デンチャー プラークのカンジダに関する研究

## (第1報) デンチャー プラークのカンジダ叢と義歯性口内炎との関係

玉 本 光 弘\*

### Studies on *Candida* in Denture Plaque

#### (Part 1) The Relationship between *Candida* in Denture Plaque and Denture Stomatitis

Mitsuhiro TAMAMOTO

(昭和59年9月28日受付)

#### 緒 言

有床義歯などの床下粘膜に発赤と腫脹を特徴とした炎症所見を認めることは、多くの研究者<sup>1)-6)</sup>によって報告されている。Budtz-Jørgensen<sup>7)</sup>は、義歯性口内炎と呼ばれるこのような床下粘膜の炎症を65歳以上の総義歯装着者の65%に認めたと報告している。

義歯性口内炎患者が使用している義歯では、床下粘膜の炎症部位に対応して、しばしば著明なデンチャープラークの付着を認める。このようなデンチャープラークからは、カンジダが多数検出され、カンジダが義歯性口内炎の病因の一つとして重要な役割を演じていると考えられてきた<sup>3)-6), 8)-12)</sup>。しかし、カンジダが病因であることを実証するために、カンジダとデンチャープラーク及び義歯性口内炎との関係を詳細に検討した報告は、ほとんど見られない。そこで、本研究では、義歯装着者からデンチャープラークを採取し、カンジダを分離・同定して、デンチャープラークのカンジダ叢と義歯性口内炎との関係について統計処理を用いて詳細に検討した。

#### 研究材料並びに方法

##### 1. 研究対象者

研究対象者は、本学歯学部附属病院第二補綴科に来院した義歯装着者100名とした。その内訳は、男性30名及び女性70名であり、平均年齢65歳、上顎義歯97床及び下顎義歯82床であった。デンチャープラーク採取時、一般的質問事項(年齢、性別、補綴部位及び義歯装着期間)及び臨床所見を記録した。なお、研究対象者の中には、抗生物質の投与を受けている患者はいなかった。また、義歯の調整によって容易に除去できる

機械的刺激が原因と考えられる床下粘膜の炎症は、対象から除外した。

##### 2. 臨床所見判定基準

デンチャープラーク採取時、プラーク量及び床下粘膜の炎症(義歯性口内炎)の程度を以下の基準に従って肉眼的に判定した。すなわち、プラーク量は、プラークの付着した面積及び厚さを指標としてⅢ、Ⅱ及びⅠとし、肉眼的にプラークを認めない場合をⅠとした。また、義歯性口内炎は、臨床症状として発赤が特徴的<sup>1)-6)</sup>であり、Budtz-Jørgensenらの分類<sup>11), 13)</sup>でも主として発赤(紅斑)を基準として分類されている。そこで、本研究でも発赤を指標として、義歯性口内炎の程度をⅢ、Ⅱ及びⅠとし、床下粘膜に異常を認めない場合をⅠとした。

##### 3. インプリントカルチャー

カンジダGE寒天(日水製薬KK, 東京)培地を用いて、義歯性口内炎患者の義歯粘膜面のインプリントカルチャーを作製した。同培地を37°Cで24時間培養後、カンジダのコロニー形成状態を観察した。

##### 4. カンジダの分離及び同定

義歯装着者100名の義歯粘膜面を滅菌綿棒を用いて擦り、それをカンジダGE寒天培地に塗抹した後、37°Cで24時間培養した。更に、26名については、唾液0.1mlをカンジダGE寒天培地に塗抹し、37°Cで24

\*広島大学歯学部歯科補綴学第二講座

(主任: 浜田泰三教授)

本論文の要旨は昭和58年9月第43回広島大学歯学会例会、昭和58年10月第70回日本補綴歯科学会総会において発表した。

本研究は一部文部省科学研究費(昭和58年度一般研究C-58570812)によった。

時間培養した。カンジダの分離菌数(カンジダ数)は出現したコロニー数(colony forming unit:CFU)を指標として以下のように分類した。すなわち, 卅: 501 CFU 以上, ++: 251-500 CFU, +: 1-250 CFU 及び-: 0 CFU とした。

次に, 出現したカンジダは, 1 プレート互に形態の異なる各コロニーについて特徴的な1~2コロニーをPYG 寒天培地(1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 2.0% glucose, 1.5% agar)で37°C, 24時間純培養後, カンジダ チェック<sup>14)</sup>(ヤトロン KK, 東京)を用いて主として血清学的に同定した。

### 5. 統計学的処理法

デンチャー プラーク中のカンジダ数とデンチャー プラーク量, 床下粘膜の発赤(義歯性口内炎)の程度, 年齢, 義歯装着期間, 性別, 補綴部位及び唾液中のカンジダ数との関係を統計処理を用いて検討した。なおカンジダ数, プラーク量及び発赤(義歯性口内炎)の

試料につけた順位が一致する程度を示すもので, 二つの順位間の不一致, 乱れの尺度といえる。

## 結 果

### 1. インプリント カルチャーによるカンジダの検出

義歯性口内炎患者が使用していた義歯の粘膜面及びそのインプリント カルチャーの1例を図1に示す。義歯粘膜面で肉眼的に著明なデンチャー プラークの付着を認める部位のみならず, 認めない部位からもカンジダを検出した。一方, 健康者の義歯では, 粘膜面のインプリント カルチャーからほとんどカンジダを検出しなかった。

### 2. 義歯粘膜面から分離したカンジダの同定とその分離頻度

義歯粘膜面から分離したカンジダの同定結果を図2に示す。研究対象者100名の義歯179床(上顎義歯97床, 下顎義歯82床)中151床(84.4%)からカンジダを検出した。検出したカンジダは, *Candida albicans*が69.9%

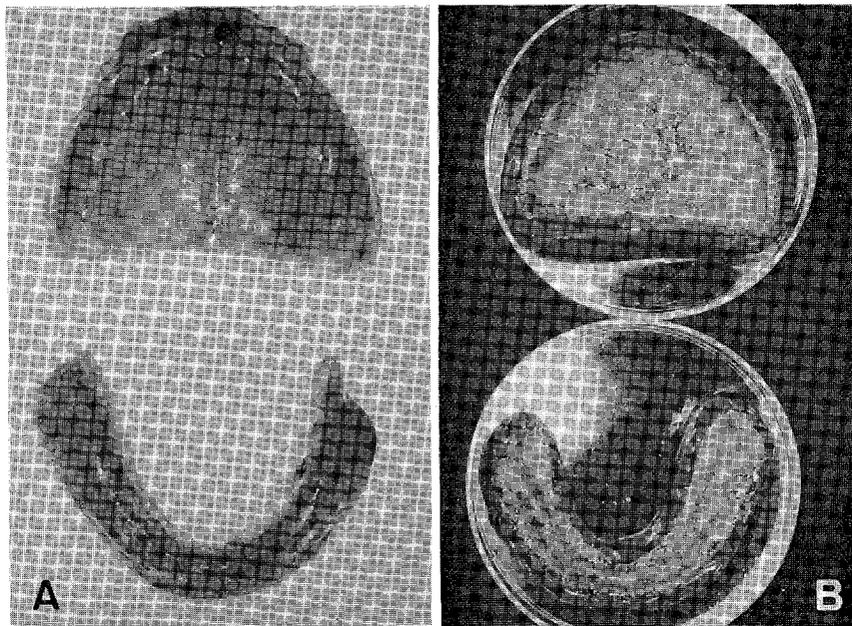


図1 義歯性口内炎患者の使用していた義歯(A)及びカンジダ GE 寒天培地による同義歯粘膜面の インプリント カルチャー(B)の1例

程度は, -から卅という順位変数であることから, parametric な統計処理法が適用できないため, non-parametric な統計処理法<sup>15)</sup>を用いた。すなわち, 独立2試料の検定には, Mann-Whitney のU-検定法を用いた。この検定法は, 試料が大きな場合には, 2試料の分布の位置の差を検定するのに, t-検定法に劣らぬ検出効率を有している。また, 相関関係については Kendall の順位相関の方法を用いた。この方法は, 2

を占め, 次いで *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. stellatoidea* の順で検出した。これらのカンジダは, 一つの義歯から1種のみを検出したものが48.6%, 2種及び3種を混在して検出したものが33.0%及び2.8%であった。また, 床下粘膜に義歯性口内炎を認めた義歯97床において, その義歯粘膜面から *C. albicans* のみを検出したものが42.3%, *C. albicans* と他の菌種を混在して検

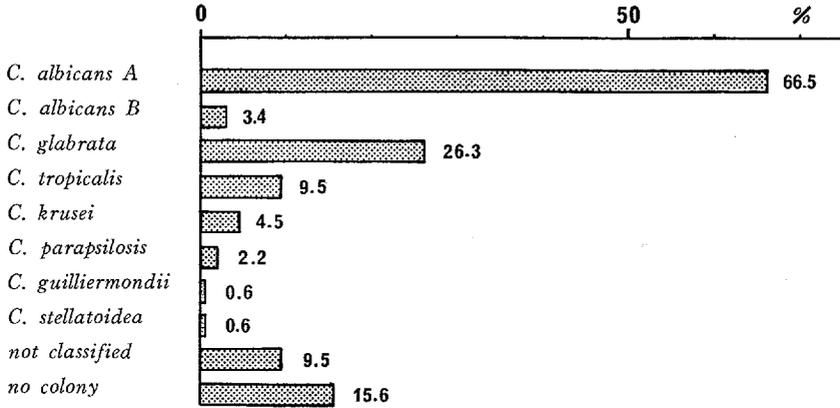


図2 義歯粘膜面から分離したカンジダの同定結果とその分離頻度  
 研究対象者100名, 被験義歯179床の結果を示す。

出したものが38.1%, *C. albicans*を検出しないで他の菌種を検出したものが15.5%, カンジダを検出できなかったものが4.1%であった。

*C. albicans* については, 更にA型及びB型に分類されるが, 179床中義歯粘膜面からA型を検出した義歯は66.5% (義歯性口内炎(+~卅): 43.0%, 義歯性口内炎(-): 23.5%), B型を検出した義歯は3.4% (義歯性口内炎(+~卅): 1.2%, 義歯性口内炎(-): 2.2%)であった。また, A型を単独で検出した義歯は36.3%, B型を単独で検出した義歯は1.1%であった。

3. 性別と義歯性口内炎の程度及びカンジダ数との関係

義歯性口内炎の程度及び義歯粘膜面のカンジダ数について性差を検討した結果を図3及び図4に示す。

義歯装着者のうち, 女性の70.0%, 男性の56.7%に義歯性口内炎を認め, 女性の罹患率が高かったにもかかわらず, 義歯性口内炎の程度及びカンジダ数には, 性別による有意差がなかった ( $p > 0.05$ )。

4. 上・下顎別と義歯性口内炎の程度及びカンジダ数との関係

義歯性口内炎の程度及び義歯粘膜面のカンジダ数について上・下顎差を検討した結果を図3及び図4に示す。

義歯性口内炎の程度及び義歯粘膜面のカンジダ数に関して, 上・下顎間に有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。す

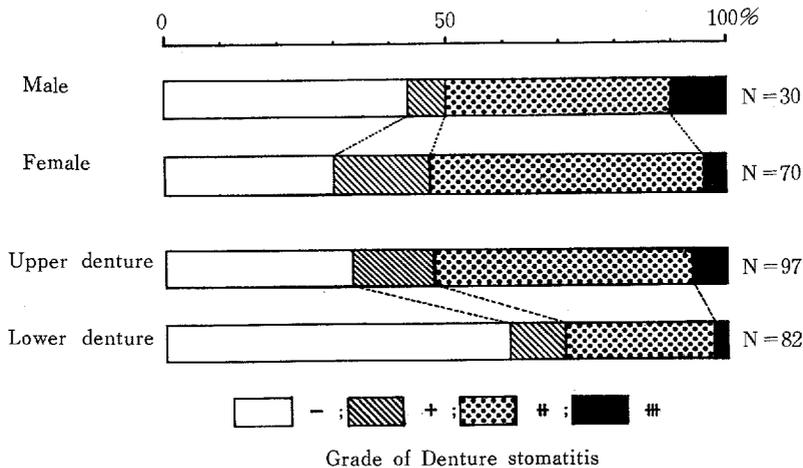


図3 性別及び上・下顎別と義歯性口内炎の程度との関係  
 Nは研究対象者数あるいは被験義歯数を示す。

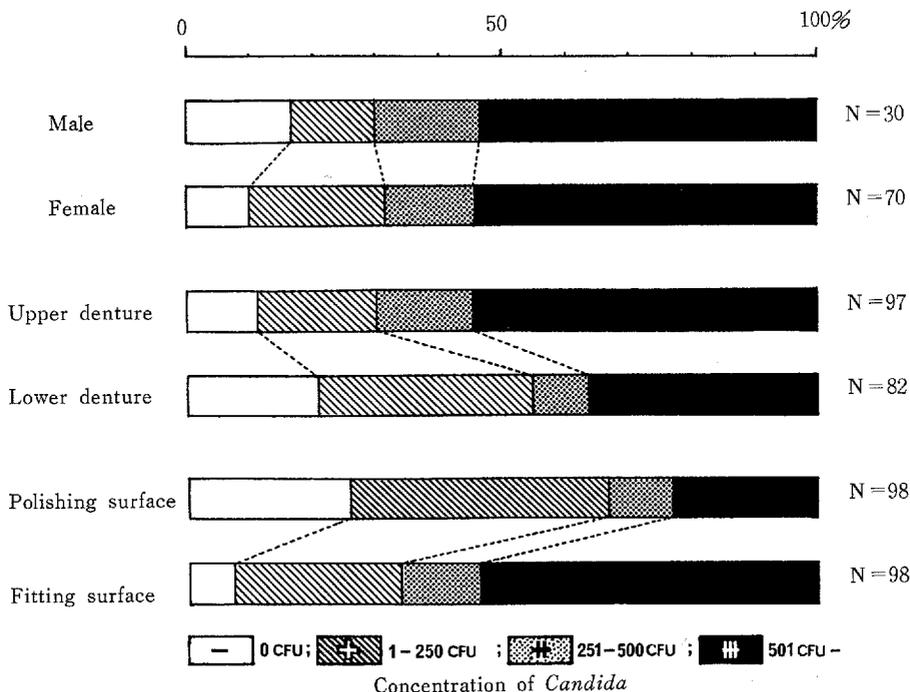


図4 性別、上・下顎別及び義歯粘膜面・研磨面の相違とカンジダ数との関係  
Nは研究対象者数あるいは被験義歯数を示す。

なわち、上顎の方が下顎に対して義歯性口内炎の程度が強く、また、カンジダ数も多かった。

5. 義歯粘膜面と研磨面の相違とカンジダ数との関係

義歯粘膜面と研磨面のカンジダ数の相違について検討した結果を図4に示す。

結果として両者に有意差を認めた(p < 0.01)。すなわち、粘膜面の方が研磨面に比べてカンジダを多く検出した。

6. デンチャー プラーク量、義歯粘膜面のカンジダ数及び義歯性口内炎の程度との関係

デンチャー プラーク量、義歯粘膜面のカンジダ数及び義歯性口内炎の程度との関係を表1、表2及び表3に示す。表中において、τは Kendall の順位相関係数を示し、その値が有意検定の結果、危険率1%以下で有意な場合を HS (highly significant), 1~5%の間で有意な場合を S (significant), 有意でない場合を NS (not significant) と表示した。表中の数字は義歯数を示している。なお以下の表も同様に表示している。

結果として、プラーク量と義歯粘膜面のカンジダ数との間(表1)、プラーク量と義歯性口内炎の程度との間(表2)及び義歯粘膜面のカンジダ数と義歯性口内炎

表1 デンチャー プラーク量と義歯粘膜面のカンジダ数との関係

		Concentration of <i>Candida</i>			
		-	+	++	+++
Denture plaque	-	27	24	6	6
	+	1	18	14	54
	++	0	4	2	21
	+++	0	0	0	2

τ=0.56 HS

数字は義歯数を示す。

表2 デンチャー プラーク量と義歯性口内炎の程度との関係

		Denture stomatitis			
		-	+	++	+++
Denture plaque	-	48	9	5	1
	+	29	10	45	3
	++	4	3	16	4
	+++	1	0	1	0

τ=0.45 HS

数字は義歯数を示す。

表3 義歯粘膜面のカンジダ数と義歯性口内炎の程度との関係

		Denture stomatitis			
		-	+	++	≡
Concentration of <i>Candida</i>	-	24	3	1	0
	+	26	5	15	0
	++	8	5	7	2
	≡	24	9	44	6

$\tau = 0.37$  HS

数字は義歯数を示す。

表4 義歯装着期間と義歯性口内炎の程度との関係

		Denture stomatitis			
		-	+	++	≡
Period of denture wearing	0-2m	8	1	3	0
	2-4m	2	2	0	0
	4-6m	5	1	4	0
	6m-1y	7	2	4	0
	1-2y	4	2	9	1
	2-5y	5	2	12	1
	5-10y	1	4	9	3
	10y-	2	0	5	1

$\tau = 0.35$  HS

数字は人数を示す。

表5 義歯装着期間と義歯粘膜面のカンジダ数との関係

		Concentration of <i>Candida</i>			
		-	+	++	≡
Period of denture wearing	0-2m	4	3	1	4
	2-4m	2	0	2	0
	4-6m	1	5	3	1
	6m-1y	2	4	2	5
	1-2y	2	3	2	9
	2-5y	1	2	1	16
	5-10y	0	1	3	13
	10y-	0	1	1	6

$\tau = 0.40$  HS

数字は人数を示す。

の程度との間(表3)に強い相関関係を認めた。

7. 義歯装着期間と義歯性口内炎の程度及び義歯粘膜面のカンジダ数との関係

義歯装着期間と義歯性口内炎の程度及び義歯粘膜面

表6 義歯装着者の年齢と義歯性口内炎の程度との関係

		Denture stomatitis			
		-	+	++	≡
Age	-50y	6	2	4	0
	51-60	10	3	8	3
	61-70	7	5	13	1
	71-80	6	4	14	1
	81-	5	0	7	1

$\tau = 0.12$  NS

数字は人数を示す。

表7 義歯装着者の年齢と義歯粘膜面のカンジダ数との関係

		Concentration of <i>Candida</i>			
		-	+	++	≡
Age	-50y	5	0	3	4
	51-60	6	4	2	12
	61-70	0	6	5	15
	71-80	1	7	4	13
	81-	0	2	1	10

$\tau = 0.20$  S

数字は人数を示す。

表8 唾液中のカンジダ数と義歯粘膜面のカンジダ数との関係

		Concentration of <i>Candida</i> on fitting surface of denture			
		-	+	++	≡
Concentration of <i>Candida</i> in saliva (CFU/0.1ml)	0	2	1	0	0
	1-250	1	3	1	2
	251-500	0	2	1	2
	501-	0	1	1	9

$\tau = 0.60$  HS

数字は人数を示す。

のカンジダ数との関係を表4及び表5に示す。

義歯装着期間と義歯性口内炎の程度との間(表4)及び義歯装着期間と義歯粘膜面のカンジダ数との間(表5)に、強い相関関係を認めた。すなわち、装着期間が長い患者程、義歯粘膜面からより多くのカンジダを検出し、床下粘膜により強い発赤(炎症)を認める傾向があった。

8. 年齢と義歯性口内炎の程度及び義歯粘膜面のカンジダ数との関係

年齢と義歯性口内炎の程度及び義歯粘膜面のカンジダ数との関係を表6及び表7に示す。

年齢と義歯粘膜面のカンジダ数との間に弱い相関関係を認めた(表7)。しかし、年齢と義歯性口内炎の程度との間には、相関関係を認めなかった(表6)。

### 9. 唾液中のカンジダ数と義歯粘膜面のカンジダ数との関係

唾液中のカンジダ数と義歯粘膜面のカンジダ数との関係を表8に示す。

結果として、両者の間には強い相関関係を認めた。なお、研究対象者と同年齢層の有歯顎者では、唾液からカンジダを検出しないか、検出しても少数であった。

## 考 察

義歯性口内炎患者の義歯では、その粘膜面に著明なデンチャー プラークの附着を認め、そのカンジダ用選択培地によるインプリント カルチャーからは、多数のカンジダを検出した(図1)。一方、健康者の義歯のインプリント カルチャーからは、ほとんどカンジダを検出なかった。

このようなカンジダを検出した義歯性口内炎患者の義歯では、走査型電子顕微鏡による義歯粘膜面の観察においても、カンジダと考えられる酵母状あるいは菌糸状の細胞を多数認めた。これらの結果は、プラーク中のカンジダが義歯性口内炎の病因の一つとして重要な役割を演じていることを示唆するものである。

カンジダと義歯性口内炎との関係については、種々の検討<sup>8)-11)</sup>がなされてきたが、これらの研究のほとんどが、統計処理を行っていないか、あるいは、得られた結果が順位変数であるにもかかわらず、parametricな統計処理法を用いて検討したものであった。そこで本研究では、順位変数として得られたデータに対して non-parametric な統計処理法<sup>15)</sup>を用いて検討を行った。

義歯粘膜面から検出した真菌を同定した結果(図2)、84.4%の義歯からカンジダを検出した。検出したカンジダは、*C. albicans* が69.9%と最も多く、次いで *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. stellatoidea* の順で検出した。この分布は、Olsen の報告<sup>10)</sup>に近似するものであった。しかし、本研究では、Olsen の方法とは異なりカンジダ チェックを用いて詳細に血清学的な同定を行った。カンジダ チェックによる同定法<sup>14)</sup>は、従来の形態学的並びに生化学的方法を用いて同定する場合と比べて迅速かつ正確であり、また病原性真菌の代表的菌種である *C. albicans* をA型及びB型に分類することが可

能である。このような血清学的方法を用いて義歯粘膜面のカンジダの同定を行った報告は、これまで見られない。

動物を用いた研究において、義歯性口内炎を誘発することが確認されているカンジダは、*C. albicans* A及びBのみで、A型の方がB型に比べて病原性が強いことが知られている<sup>16),17)</sup>。本研究においても、床下粘膜に義歯性口内炎を伴った義歯粘膜面から高頻度に *C. albicans* Aを検出した。これは、*C. albicans* Aの方が *C. albicans* Bに対して病原性が強いであろうと考えられる。*C. albicans*以外の菌種については、現在のところ義歯性口内炎に対する病原性は不明であるが、本研究の結果では義歯性口内炎を伴った義歯粘膜面から、*C. albicans* と他の菌種を混在して検出したものや、*C. albicans* を検出しないにもかかわらず他の菌種を検出したものも見られ、*C. albicans*以外の菌種も義歯性口内炎に関与していることが示唆された。

義歯装着者のうち女性の70.0%、男性の56.7%に義歯性口内炎を認めた。これは、Davenport<sup>8)</sup>らの報告と一致するものであったが、発赤(義歯性口内炎)の程度及び義歯粘膜面のカンジダ数には、統計学的に性差を認めなかった(図3、図4)。

上・下顎においては、統計学的に上顎の方が下顎に比べて義歯性口内炎の程度が強く、また義歯粘膜面のカンジダ数も多いことが示された(図3、図4)。これは上顎義歯の方が下顎義歯に比べて義歯の安定維持が良好であるため、唾液等による自浄作用を受けにくく、またデンチャー プラークの pH<sup>18),19)</sup>等もカンジダの生育に適した環境となっているためと考えられる。

義歯粘膜面及び研磨面では、粘膜面の方にカンジダが多いことが統計学的に示された(図4)。これは、粘膜面の方が唾液や舌等による自浄作用を受けにくくまた床面が粗造となっている<sup>6)</sup>ためと考えられる。

デンチャー プラーク量、義歯粘膜面のカンジダ数及び義歯性口内炎の程度の3者間には強い相関関係を認めた(表1、表2、表3)。すなわち、プラーク量及び義歯粘膜面のカンジダ数が義歯性口内炎の程度に影響を与えていることが示された。この結果は、義歯粘膜面に附着したデンチャー プラークは主としてカンジダによって構成されており、このプラーク中に存在するカンジダが義歯性口内炎の病因の一つとして重要な役割を演じていることを明らかにした。

義歯装着期間と義歯性口内炎の程度との間(表4)及び義歯装着期間と義歯粘膜面のカンジダ数との間(表5)には相関関係を認めた。これは、床用レジン<sup>6)</sup>の劣化により床面が粗造化し<sup>6)</sup>、カンジダが附着しや

すく、また除去されにくくなるためや、デンチャー プラークのpH<sup>(8), (9)</sup>等がカンジダの発育に適した環境となるためと考えられる。

年齢と義歯粘膜面のカンジダ数との間(表7)には相関関係を認めたにもかかわらず、年齢と義歯性口内炎の程度との間(表6)には、相関関係を認めなかった。

唾液中のカンジダ数と義歯粘膜面のカンジダ数との間(表8)には、強い相関関係を認めた。唾液中のカンジダについては、研究対象者と同年齢層の有歯顎者では、カンジダを検出しないか、検出しても少数であったことから、義歯がカンジダの口腔内でのリザーバーとなっていると考えられる。

## 結 論

有床義歯などの床下粘膜に発赤及び腫脹を特徴とした炎症所見(義歯性口内炎)を認めることは、多くの研究者によって報告されている。その病因の一つとしてデンチャー プラーク中のカンジダが重要な役割を演じているのではないかと考えられてきた。しかし、カンジダとデンチャー プラーク及び義歯性口内炎等との関係を統計処理を用いて詳細に検討した報告は、ほとんど見られない。そこで、本研究では、義歯装着者100名の義歯179床からカンジダを採取し、分離及び同定を行った後、義歯粘膜面のカンジダ数とデンチャー プラーク量、義歯性口内炎の程度、年齢、義歯装着期間、補綴部位、性別及び唾液中のカンジダ数との関係を統計処理を行って検討し、以下の結果を得た。

1. 84.4%の義歯粘膜面からカンジダを検出した。
2. 検出したカンジダは、*C. albicans* が69.9%と最も多く、次いで *C. glabrata*, *C. tropicalis* の順に検出した。
3. 同一義歯の粘膜面から1種のみを検出したものが48.6%、2種及び3種を混在して検出したものが33.0%及び2.8%であった。
4. 義歯性口内炎を認めた義歯97床において、義歯粘膜面から *C. albicans* のみを検出したものが42.3%、*C. albicans* と他の菌種を混在して検出したものが38.1%、*C. albicans* を検出しないので他の菌種を検出したものが15.5%、カンジダを検出なかったものが4.1%であった。
5. *C. albicans* はほとんどがA型で、B型は4.8% ( $\frac{B}{A+B} \times 100$ )にすぎなかった。
6. 義歯研磨面に比べ粘膜面の方からカンジダを多く検出した。
7. 上顎義歯は下顎義歯に比べて義歯性口内炎の程度が強く、義歯粘膜面のカンジダ数も多かった。

8. 義歯性口内炎の程度及び義歯粘膜面のカンジダ数には、性差を認めなかった。

9. デンチャー プラーク量、義歯粘膜面のカンジダ数及び義歯性口内炎の程度の3者間には相関関係を認めた。

10. 年齢と義歯性口内炎の程度との間には相関関係を認めなかった。

11. 義歯装着期間と義歯性口内炎の程度との間には相関関係を認めた。

12. 年齢と義歯粘膜面のカンジダ数との間及び義歯装着期間と義歯粘膜面のカンジダ数との間には、共に相関関係を認めた。

13. 唾液中のカンジダ数と義歯粘膜面のカンジダ数との間には相関関係を認めた。

以上の結果から、義歯粘膜面は *C. albicans* を主体としたカンジダのリザーバーとなっており、またデンチャー プラーク量、義歯粘膜面のカンジダ数及び義歯性口内炎の程度の3者間には相関関係を認めたことから、義歯粘膜面に付着したデンチャー プラークは主としてカンジダによって構成されており、このプラーク中に存在するカンジダが義歯性口内炎の病因の一つとして重要な役割を演じていることが示された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました本学歯科補綴学第二講座浜田泰三教授に深厚なる謝意を表しますとともに、本研究を進めるに際し、終始御指導いただき、御校閲を賜った本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授に深く感謝致します。また、御校閲を賜った本学歯科補綴学第一講座津留宏道教授に心から御礼申し上げます。更に、本研究を行うにあたり御協力いただいた歯科補綴学第二講座並びに口腔細菌学講座の諸先生に感謝致します。

## 文 献

- 1) Newton, A.V. (1962): Denture sore mouth, a possible aetiology. *Brit. dent. J.*, 112, 357-360.
- 2) Cawson, R.A. (1963): Denture sore mouth and angular cheilitis. *Brit. dent. J.*, 115, 441-449.
- 3) Davenport, J.C. and Hamada, T. (1979): Denture stomatitis - A literature review with case reports. *Hiroshima J. Med. Sci.*, 28, 209-220.
- 4) Renner, R.P., Lee, M., Andors, L. and McNamara, T.F. (1979): The role of *C. albicans* in denture stomatitis. *Oral Surg.*, 47, 323-328.
- 5) Budtz-Jørgensen, E. (1981): Oral mucosal lesions associated with the wearing of remov-

- able dentures. *J. Oral Pathol.*, 10, 65-80.
- 6) 浜田泰三 (1983): デンチャー プラーク コントロール. 永末書店, 京都, 1-31, 昭和58.
- 7) Budtz-Jørgensen, E., Stenderup, A. and Grabowski, M. (1975): An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 3, 115-119.
- 8) Davenport, J.C. (1970): The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Brit. dent. J.*, 129, 151-156.
- 9) Budtz-Jørgensen, E. and Bertram, U. (1970): Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odont. Scand.*, 28, 71-92.
- 10) Olsen, I. (1974): Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odont. Scand.*, 32, 329-333.
- 11) Budtz-Jørgensen, E. (1974): The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 82, 151-190.
- 12) 浜田泰三 (1981): デンチャー プラーク コントロール. 日本歯科評論 466, 87-103, 昭和56.
- 13) Budtz-Jørgensen, E. (1978): Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *JADA*, 96, 474-479.
- 14) 土屋 毅, 深沢義村 (1958): *Candida* 属の血清学的分類—診断用血清の作り方とその同定手技—. 臨床病理, 特集 7, 1-9, 昭和33.
- 15) 石居 進 (1975): 生物統計学入門. 培風館, 東京, 109-116, 141-150, 昭和50.
- 16) Shakir, B.S., Martin, M.V. and Smith, C.J. (1981): Induced palatal candidosis in the Wistar rat. *Arch. oral Biol.*, 26, 787-793.
- 17) Shakir, B.S., Martin, M.V. and Smith, C.J. (1983): Relative effectiveness of various yeasts, *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata*, for inducing palatal infection in the Wistar rat. *Arch. oral Biol.*, 28, 1069-1071.
- 18) Olsen, I. and Birkeland, J.M. (1975): Assessment of denture plaque pH in subjects with and without denture stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 83, 370-374.
- 19) Samaranayake, L.P., Weetman, D.A., Geddes, D.A.M. and MacFarlane, T.W. (1983): Carboxylic acids and pH of denture plaque in patients with denture stomatitis. *J. Oral Pathol.*, 12, 84-89.

デンチャー プ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

玉 本 光 弘

Studies on *Candida* in Denture Plaque

(Part 2) Removal of *Candida* adhered to Denture  
Acrylic Resin by Yeast Lytic Enzyme

Mitsuhiro TAMAMOTO

広島大学歯学雑誌

第16巻, 第2号, 250-259, 1984 (昭和59年)

別 刷

## デンチャー プ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

玉 本 光 弘\*

Studies on *Candida* in Denture Plaque(Part 2) Removal of *Candida* adhered to Denture  
Acrylic Resin by Yeast Lytic Enzyme

Mitsuhiro TAMAMOTO

(昭和59年9月28日受付)

## 緒 言

義歯の汚れを除去する目的で、種々の義歯洗浄剤が市販されている。これらの義歯洗浄剤は、主に過酸化物質タイプで、それらは床用レジンを劣化しにくい反面デンチャー プラークの除去効果が劣っている<sup>1)~5)</sup>。一方、前者に比べてデンチャー プラークの除去効果が優れている次亜塩素酸塩タイプの義歯洗浄剤も一部市販されている。このタイプの義歯洗浄剤は、床用レジンを劣化させる欠点がある<sup>6)~8)</sup>。そこで、床用レジンを劣化させることなく、しかもデンチャー プラークの除去効果が優れた義歯洗浄剤の開発が望まれている。このような条件を満たすものとして、酵素タイプの義歯洗浄剤が注目されている。しかしながら、従来の酵素タイプの義歯洗浄剤は、デンタル プラークや食物残渣を除去するような酵素を配合したもので、デンチャー プラーク中のカンジダの除去に主眼を置いたものではなかった<sup>9)~10)</sup>。第1報<sup>11)</sup>において報告したように、デンチャー プラーク中のカンジダは、義歯性口内炎の病因の一つとして重要な役割を演じており、デンチャー プラーク中のカンジダを除去することは、義歯性口内炎の治療及び予防に有効であると考えられる。そこで本研究では、まず種々の酵素を用いてレジンプレートに付着したカンジダの除去効果を検討した。次いで、用いた酵素の中でカンジダの除去効果に優れた真菌細胞壁溶解酵素及び蛋白質分解酵素を配合した試作義歯洗浄剤の臨床応用を検討した。

## 実 験 材 料

## 1. レジンプレート

板ガラスを石膏に埋没して作製した鋳型にバイオレ

ジン#3 (液1.5ml, 粉3.0g : 松風 KK, 京都) を填入して通法に従って加熱重合し、厚さ約 0.5mm のレジンプレートを作製した。このレジンプレートをアクリルカッターを用いて10×10mm の小片に切断し、2日間流水で水洗後、このプレートのガラス境面を以下の実験に用いた。

## 2. 使用菌株

第1報<sup>11)</sup>において義歯粘膜面からは、*Candida albicans* が最も高頻度に検出されることを明らかにしたので、各種酵素によるレジンプレートに付着したカンジダの除去効果の実験は、*Candida albicans* A IFO 1385を用いて検討した。なお、Zymolyase によるカンジダの溶菌効果の実験には、*C. albicans* A IFO 1385, *C. glabrata* IFO 0622, *C. krusei* IFO 1395, *C. tropicalis* IFO 1400, *C. parapsilosis* IFO 1396 及び *C. guilliermondii* IFO0566 を用いた。

## 3. 酵 素

amylase として  $\alpha$ -Amylase (和光純薬工業 KK, 大阪), Diasmen SSx3 (大和化成 KK, 大阪) 及び Biotamylase A3000 (長瀬産業 KK, 大阪), dextranase として Dextranase crude powder (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) 及び Dextranase Amano I (天野製薬 KK, 名古屋), 真菌細胞壁溶解酵素として Zymolyase 60000 (生化学工業 KK, 東京) 及び Kitalase (クミアイ化学工業 KK, 東京), chitinase

\*広島大学歯学部歯科補綴学第二講座

(主任: 浜田泰三教授)

本論文の要旨は昭和58年12月第44回広島大学歯学会例会上において発表した。

本研究は一部文部省科学研究費(昭和58年度一般研究 C-58570812) によった。

は Sigma Chemical Co. 製, glucosidase は  $\beta$ -Glucosidase (Sigma Chemical Co.), 細菌細胞壁溶解酵素は N-acetylmuramidase M-1 (生化学工業 KK), 並びに蛋白質分解酵素としては, Trypsin (E. Merck, Darmstadt, West Germany), Papain (E. Merck), Pronase P (科研化学 KK, 東京), Promen (大和化成 KK), Prozym 6 (天野製薬 KK), Bioprase AL-15 (長瀬産業 KK), Bioprase SP-4 (長瀬産業 KK), Esperase 4.0M (Novo Industry) 及び Alcalase 2.0T (Novo Industry) を使用した。

#### 4. 試作義歯洗浄剤

試作義歯洗浄剤は, ロート製薬 KK 研究所より提供された。本義歯洗浄剤は, 酵素として Zymolyase を 2.5%, Alcalase を 2.5% 含有する錠剤 (2 g) であり水 150ml に溶解して使用した。

#### 5. 研究対象者

国立療養所に入院中の脳卒中後遺症患者の中で義歯性口内炎を認めた 20 名を対象として, 試作義歯洗浄剤の洗浄効果を検討した。研究対象者の内訳は, 男性 4 名及び女性 16 名, 平均年齢 74.4 歳であった。なお, これらの研究対象者は抗生物質の投薬処置を受けていなかった。

### 実験方法

#### 1. 培養条件

被験菌株を PYG 培地 (1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 2.0% glucose) で 37°C, 24 時間培養した前培養菌液 10ml を PYG 培地 40ml に加え, 37°C で対数増殖期中期まで振盪培養した。この培養菌液を 2000 × g で 5 分間遠心して, カンジダを集めた。集菌したカンジダは, 0.15M NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2, PBS) で 3 回洗浄後, 再び PBS に浮遊させて以下の実験に使用した。なおカンジダ浮遊菌液のカンジダ細胞濃度は分光光度計を用いてその濁度から算出した。

#### 2. レジンプレートへの *C. albicans* の付着

5 枚のレジンプレートをプラスチックシャーレ (60 × 15mm) に両面テープで固定し, 種々の濃度の *C. albicans* A IFO1385 浮遊菌液 7ml に浸漬し, 37°C あるいは 4°C で一定時間静置後, PBS で十分洗浄した。このようにしてカンジダが付着したプレートは, 35% ホルムアルデヒド及び 99% メタノールで固定後, 1% クリスタル紫で染色した。染色したプレートは乾燥後任意の 10 視野を選んで直接倍率 300 倍の光学顕微鏡を用いて観察し, 付着細胞数を計測後, 1 視野 (1.1 mm<sup>2</sup>) 当たりの平均付着細胞数を算出した。

#### 3. 各種酵素によるレジンプレートに付着した *C.*

#### *albicans* の除去

レジンプレート 25 枚をプラスチックシャーレ (90 × 15mm) に両面テープで固定し, 被験菌液 45ml に浸漬して 37°C で 1 時間静置し, レジンプレートにカンジダが付着させた。次いで, これらのプレートを PBS で洗浄して未付着の細胞を取り除いた。このようにしてカンジダが付着したレジンプレート 5 枚を 1 組として, 1 組ごとに 0.01M PBS 存在下の各酵素液 (100 µg/ml) で 37°C, 10 分間処理した。酵素処理したレジンプレートは, PBS で十分洗浄した後, 実験方法 2 と同様の方法で固定及び染色を行い, 光学顕微鏡を用いてレジンプレートに残存している細胞数を計測した。対照として PBS 処理のレジンプレートについても同様に残存細胞数を計測した。

各酵素によるカンジダのレジンプレートからの除去効果は, 対照 (PBS 処理) の残存細胞数に対する酵素処理による除去細胞数の割合として表示した。

#### 4. Zymolyase によるカンジダの溶解

真菌の細胞壁の主成分である  $\beta$ -1,3-glucan に作用する Zymolyase は,  $\beta$ -1,3-glucanase 活性を有し, 真菌を溶解する<sup>12)</sup>とされている。従って, カンジダ属の真菌に対しても溶菌効果が期待されるため, Zymolyase によるカンジダ属の真菌に対する溶菌効果を検討した。

実験方法 1 に記した方法で培養し, 集菌した種々のカンジダを 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に  $3.0 \times 10^7$  cells/ml となるように浮遊させ, この菌液 5ml に種々の濃度の Zymolyase 5ml を加え, 溶菌を濁度 (O.D. 660nm) の変化を指標として経時的に測定した。

次いで, 菌糸型の細胞に対する Zymolyase の溶菌効果を検討するため, *C. albicans* A IFO1385 を Sabouraud 斜面培地 (1.0% peptone, 0.5% yeast extract, 2.0% glucose, 1.5% agar) で 37°C, 16 時間前培養し, 培養されたカンジダを精製水で洗浄・集菌した。この集菌したカンジダを 10ml GYG 培地<sup>13)</sup> (1.0% glucose, 0.1% yeast extract, 1.0% glycine) で 37°C, 90 分振盪培養し酵母型を菌糸型に変え, 上記と同様の方法で溶菌効果を調べた。

#### 5. デンチャー プラークに対する Zymolyase の作用

肉眼的にデンチャー プラークが存在する義歯粘膜面を約 5 × 5 mm に切り取り, 一方を PBS に, 他方を 0.01M PBS 存在下の Zymolyase 溶液 (1 mg/ml) に 37°C で 1 時間浸漬した。これらの試料は PBS で洗浄後, 2.5% グルタルアルデヒドで固定し, 通法に従って乾燥及び金蒸着を行い, 走査型電子顕微鏡を用いてデンチャー プラークの除去効果を比較観察した。

## 6. 試作義歯洗浄剤の臨床応用

実験材料の4に記入した真菌細胞壁溶解酵素及び蛋白質分解酵素を配合した試作義歯洗浄剤を、国立療養所入院中の義歯性口内炎を認めた患者20名に7日間就寝中使用させ、洗浄効果を第1報<sup>11)</sup>に示した基準に従って検討した。

### 結 果

#### 1. レジンプレートへの *C. albicans* の付着条件

デンチャー プラーク中に最も高頻度に検出される *C. albicans* を用いて、*in vitro* でレジンプレートへのカンジダの付着に影響する種々の付着条件について検討した。

*C. albicans* の細胞濃度とレジンプレートへの付着細胞数との関係を図1に示す。

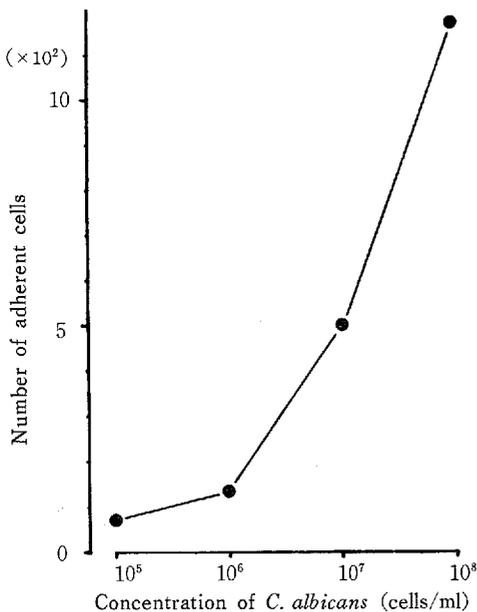


図1 *C. albicans* 細胞濃度とレジンプレートへの付着細胞数との関係

$10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  及び  $10^8$  cells/ml 濃度の *C. albicans* A IFO1385 を用い、0.01 M PBS 存在下で37°C, 1時間付着させ、それぞれの付着細胞数を測定した。

細胞濃度が増加するに従って、レジンプレートへの付着細胞数も増加した。

レジンプレートに対する細胞の接触時間と、レジンプレートへの付着細胞数との関係を図2に示す。

接触時間が増加すると付着細胞数も増加し1時間を越えるとその付着細胞数は急激に増加した。

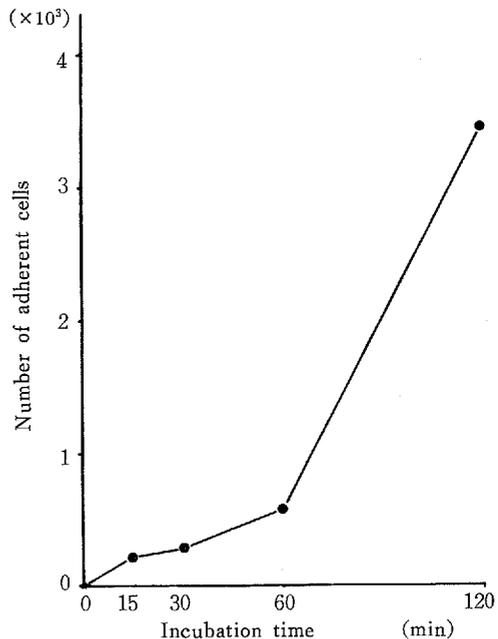


図2 レジンプレートへの *C. albicans* の付着の経時的変化

実験方法2に記載した方法で、 $10^7$  cells/ml 濃度の *C. albicans* A IFO1385 を37°C でレジンプレートに種々の時間付着させ、それぞれの付着細胞数を測定した。

表1 *C. albicans* のレジンプレートへの付着に対する加熱処理並びに付着温度の影響

	Adherence (% of control)
control	100
heat-treated	11.1
37°C (control)	100
4°C	9.2

実験条件は、 $10^7$  cells/ml 濃度の *C. albicans* A IFO1385 浮遊菌液を用い、1時間の付着で行った。

加熱処理細胞のレジンプレートへの付着及び付着温度の付着への影響についての結果を表1に示す。

60°Cで30分間の加熱処理菌では、未処理菌に比較して、レジンプレートへの付着が約1/10に抑制された。また、付着温度が4°Cでは、37°Cに比較して、レジンプレートへの付着が約1/10に抑制された。

以上のように、*C. albicans* のレジンプレートへの付着は、細胞濃度、接触時間及び温度に依存し、加熱処理菌ではその付着が抑制された。

これらの結果に基づいて、以下の実験では生菌を用

表2 各種酵素によるレジンプレートに付着した *C. albicans* の除去効果

Enzymes	% removed cells	Enzymes	% removed cells
Amylase ( $\alpha$ -1,4-glucanase)		Bacteriolytic enzyme	
$\alpha$ -Amylase	0	N-acetylmuramidase M-1	0
Diasmen SSx3	0	Proteolytic enzyme	
Biotamylase A3000	0	Trypsin	0
Dextranase ( $\alpha$ -1,6-glucanase)		Papain	91.8 $\pm$ 0.5
Dextranase crude powder	0	Pronase P	99.8 $\pm$ 0.1
Dextranase Amano I	0	Promen	72.7 $\pm$ 3.6
Yeast lytic enzyme( $\beta$ -1,3-glucanase)		Prozym 6	84.1 $\pm$ 5.8
Zymolyase 60000	99.8 $\pm$ 0.1	Biopraxe AL-15	72.7 $\pm$ 5.9
Kitalase	79.9 $\pm$ 6.0	Biopraxe SP-4	71.0 $\pm$ 7.9
Chitinase ( $\beta$ -1,4-polyacetylglucosaminidase)	0	Esperase 4.0M	93.3 $\pm$ 2.5
Glucosidase		Alcalase 2.0T	96.6 $\pm$ 1.5
$\beta$ -Glucosidase	0		

い、細胞濃度については個々の細胞が分離してレジンプレートに付着し、付着細胞数の計測が容易であるように  $3.0 \times 10^7$  cells/ml (O.D.=1.0) とし、付着温度  $37^\circ\text{C}$ 、接触時間1時間とした。

また、図表には示さないが、菌糸型の方が酵母型に比べて数倍の付着能を示した。

## 2. 各種酵素によるレジンプレートに付着した *C. albicans* の除去効果

結果を表2に示す。

用いた酵素の中で amylase, dextranase, chitinase 及び細菌細胞壁溶解酵素 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) などでは *C. albicans* の除去効果を全く認めなかった。また、表2に示していないが、酵素濃度を  $1\text{mg}/\text{ml}$  としてもその除去効果を認めなかった。

一方、真菌細胞壁溶解酵素及び Trypsin を除く蛋白質分解酵素は、*C. albicans* の除去に対して強い効果を示した。特に、真菌細胞壁溶解酵素の一つである Zymolyase は、溶菌を起こさない濃度でも強い除去効果を示した。

## 3. Zymolyase による種々のカンジダの溶菌効果

試験管内での Zymolyase による *C. albicans* A IFO 1385 に対する溶菌効果を経時的に検討した結果を図3に示す。

酵素濃度の増加とともに、その溶菌効果が強くなりまた、溶菌速度も速くなった。しかし、溶菌効果を示す濁度の変化は、あるレベルまで低下すると、それ以上減少することはなかった。

図4は、*C. albicans* 以外の種々のカンジダに対する Zymolyase の溶菌効果を検討した結果である。

菌種により Zymolyase に対する溶菌の感受性に差を認めたが、実験に用いたカンジダの全ての菌種が溶

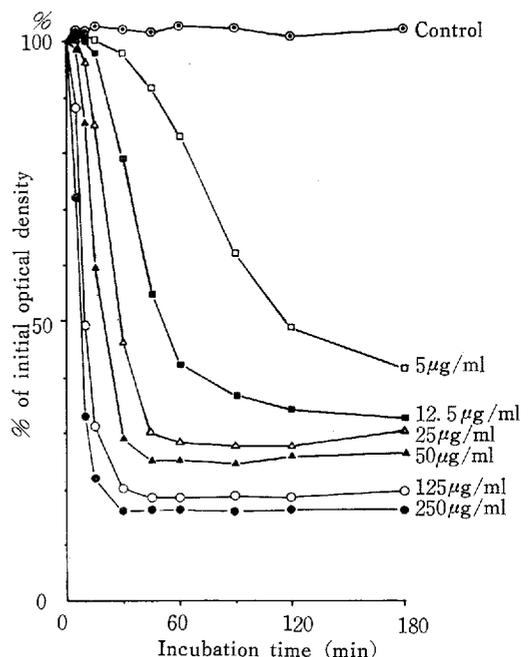


図3 Zymolyase による *C. albicans* A IFO 1385 の溶菌効果

実験方法に記載した方法で、種々の濃度の Zymolyase による溶菌を経時的に測定した。コントロールは、Zymolyase 未添加の PBS のみの処理結果である。

菌することがわかった。

また、図には示さないが、*C. albicans* A IFO1385 の菌糸型に対する Zymolyase の溶菌効果を光学顕微鏡で観察したところ、酵母型と同様に菌糸型に対しても Zymolyase は溶菌効果があることを確認した。

## 4. デンチャー プラークに対する Zymolyase の効果

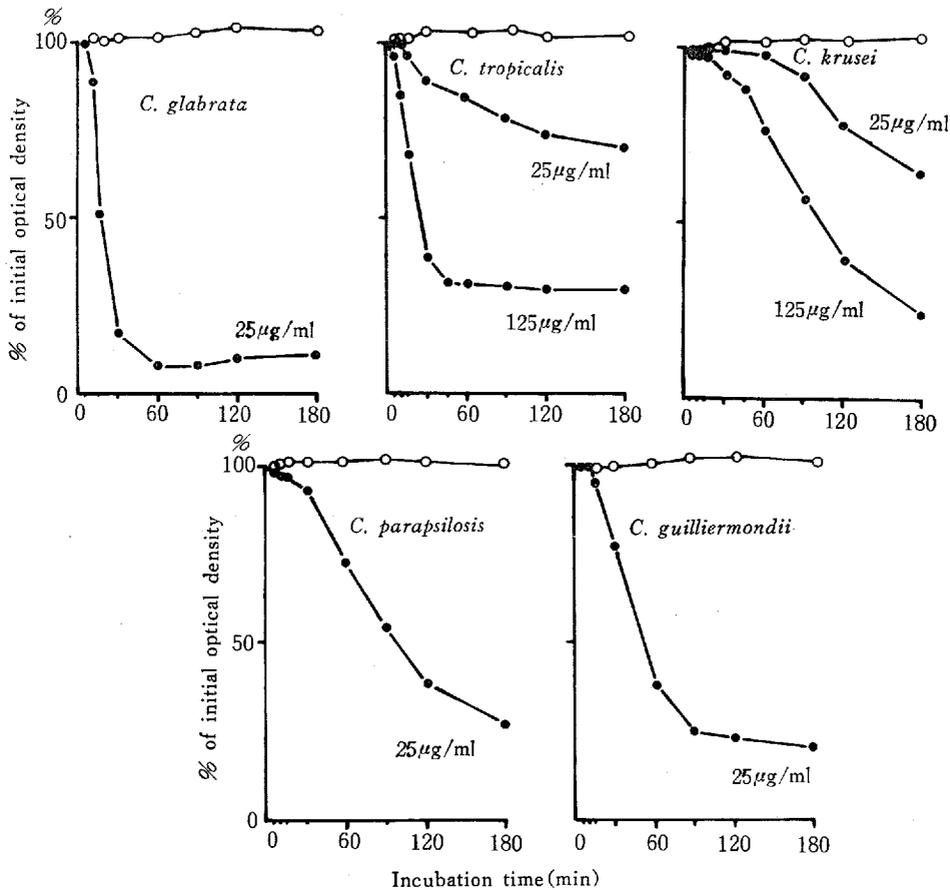


図4 種々のカンジダに対する Zymolyase の溶菌効果  
 図3と同様の方法で Zymolyase による溶菌を経時的に観察した。○は Zymolyase 未添加のPBSのみの処理結果を、●は Zymolyase 処理の結果を示す。

実際に患者の口腔内でデンチャー プラークの付着した義歯を用いて、Zymolyase による真菌の除去効果を観察した結果を図5に示す。

酵素未処理の義歯粘膜面には、図5 Aに示すように酵母型及び菌糸型の真菌細胞を多数認めた。しかし、1mg/ml 濃度の Zymolyase で1時間処理すると図5 Bに示すようにどの視野においても真菌細胞が完全に消失し、デンチャー ペリクル様の付着物のみを認めた。

#### 5. 試作義歯洗浄剤の臨床効果

7日間就寝中、試作義歯洗浄剤を使用した患者の効果の1例を図6～8に示す。

7日間使用後は、肉眼的にもデンチャー プラークが除去され(図6 B)、また、真菌を義歯粘膜面から検出なくなり(図7 B)、更に、口腔内所見も発赤及び腫脹が軽減した(図8 B)。

20人の試作義歯洗浄剤の使用結果をグラフにまとめたものが図9である。

義歯洗浄剤使用前に比べて、7日間の使用後ではデンチャー プラーク及び義歯粘膜面の真菌も減少し、義歯性口内炎症状も軽減傾向を示した。

#### 考 察

第1報<sup>11)</sup>で報告したように、患者使用の義歯粘膜面からはカンジダを高頻度に多数検出し、カンジダが義歯性口内炎の病因の一つとして重要な役割を演じていることが明らかになった。

カンジダを義歯から検出する原因としては、義歯床下が唾液などによる自浄作用を受けにくく、その部位のpHが酸性となっている<sup>14)</sup>など、カンジダの生育に適した環境となっているためであろうと言われている。更に、カンジダ自体が床用レジンに付着しやすいのではないかも考えられる。そこで、*in vitro* でレジンプレートへの *C. albicans* の付着に影響する条件について検討した。その結果、床用レジンへの *C. albicans* の付着は、細胞濃度と接触時間及び温度に依

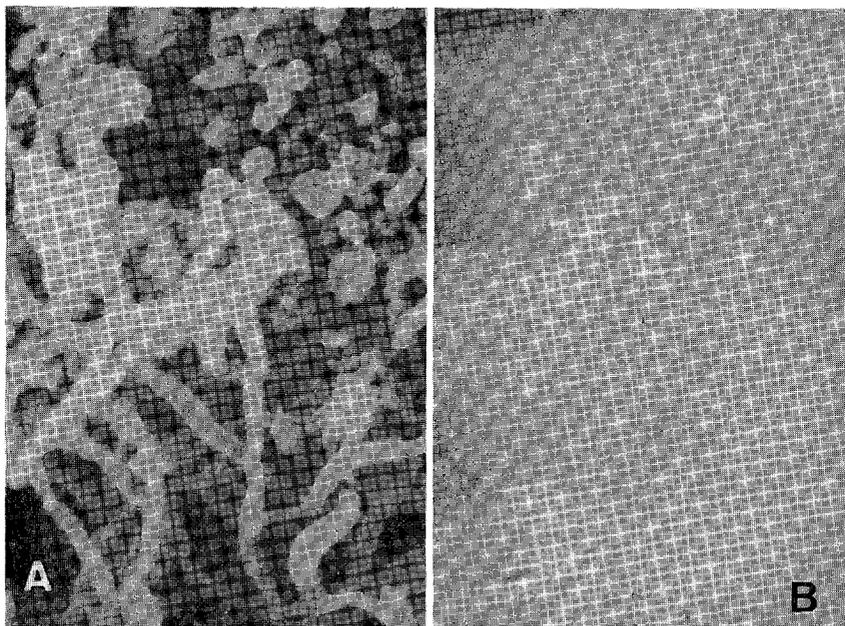


図5 デンチャー プラークに対する Zymolyase の除去効果  
Aは Zymolyase 未処理, Bは Zymolyase 処理の義歯粘膜面の走査型電子顕微鏡像。  
直接倍率, 1000倍。

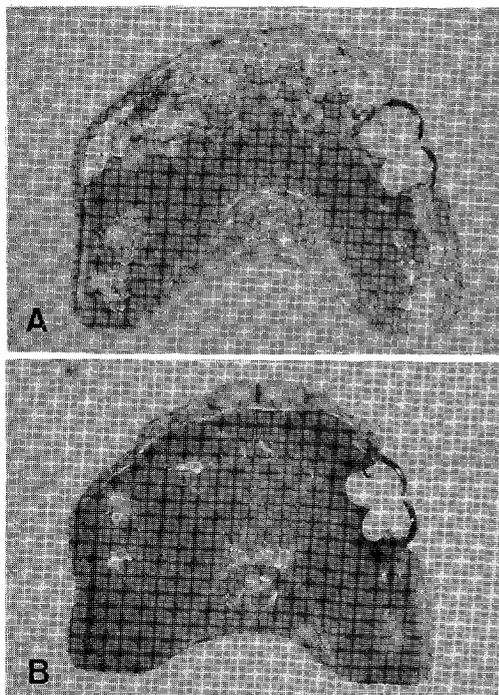


図6 試作義歯洗浄剤によるデンチャー プラークの除去効果  
Aは使用前, Bは7日間使用後の義歯粘膜面を示す。

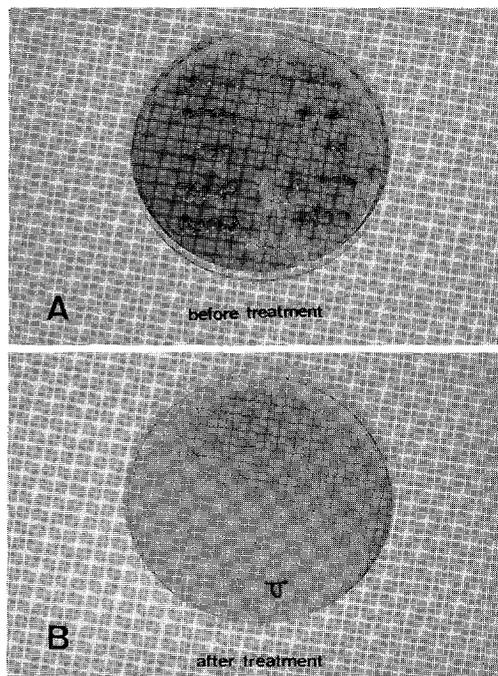


図7 試作義歯洗浄剤による義歯粘膜面の除菌効果  
Aは使用前, Bは7日間使用後のカンジダの除去効果を示した。その方法は、滅菌綿棒で義歯粘膜面を約5cm 擦り, カンジダ GE 寒天培地に約2cm 幅で10箇所塗抹し, 37°C で24時間培養した。

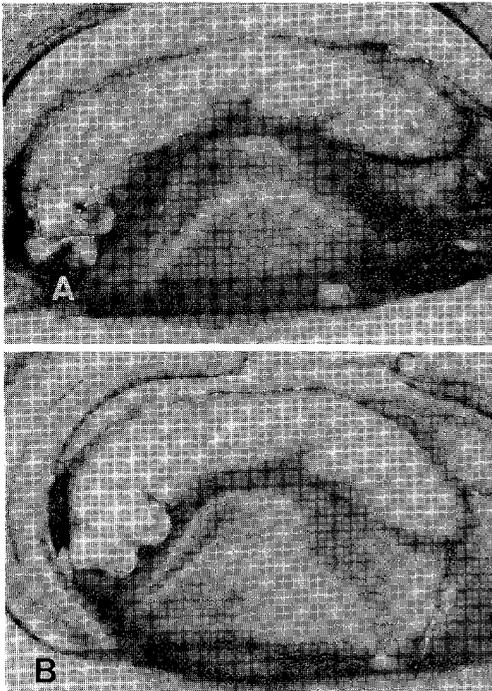


図8 試作義歯洗浄剤による臨床効果  
Aは使用前，Bは7日間使用後の口腔内所見を示す。

存し，加熱処理菌ではその付着が抑制された（表1，図1，図2）。これらの結果から，*C. albicans*の床用レジンへの付着機構を詳細に説明することは困難であるが，菌を加熱処理することによってその付着が抑制されることから，歯体表面の易熱性物質が付着に関与していることが考えられる。

各種酵素によるレジンプレートに付着した *C. albicans* の除去効果を検討したところ，用いた酵素のうち，*amylase*，*dextranase*，*chitinase* 及び細菌細胞壁溶解酵素などの処理では，*C. albicans*の除去効果を全く認めなかった。一方，真菌細胞壁溶解酵素及び *Trypsin* を除く蛋白質分解酵素では，*C. albicans* の除去に対して強い効果を示した。特に，真菌細胞壁溶解酵素の一つである  $\beta$ -1,3-*glucanase* 活性を有する *Zymolyase* は，溶菌を起こさない濃度でも強い除去効果を示した（表2）。これらの結果は，カンジダの細胞表面に存在する  $\beta$ -1,3-*glucan* 及び蛋白質が床用レジンへの付着に関与していることを示唆している。

床用レジンへのカンジダの付着機構に関する報告は少なく，以下の報告がある程度である。Samaranayake ら<sup>15),16)</sup>及び McCourtie ら<sup>17)</sup>は，*C. albicans*のレジンへの付着に多糖類が関与していると報告している。Budtz-Jørgensen ら<sup>7)-9)</sup>は，*mutanase* ( $\alpha$ -1,3-

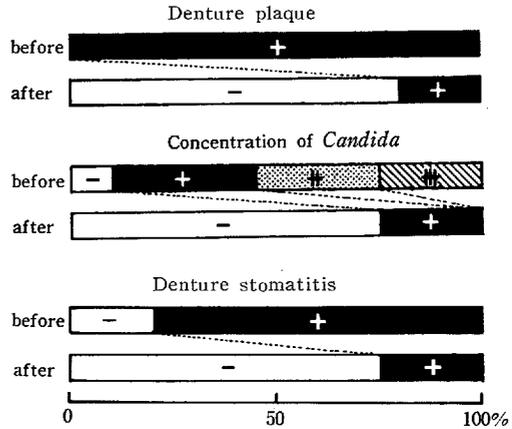


図9 試作義歯洗浄剤の使用によるデンチャー プラーク及び真菌の除去効果並びに臨床所見患者20名において試作義歯洗浄剤の使用前と7日間使用後とで義歯粘膜面のプラーク量，真菌数及び口腔内所見を第1報<sup>11)</sup>に示した基準に従って比較した。

*glucan glucanohydrolase*) 及び *protease* を含んだ酵素タイプの義歯洗浄剤が，市販の過酸化タイプ義歯洗浄剤に比べて，デンチャー プラークの除去効果が優れていたと報告している。Connor ら<sup>6)</sup>も，糖蛋白質やムコ蛋白質及びムコ多糖に作用する酵素を含んだ義歯洗浄剤が，市販の過酸化タイプ義歯洗浄剤に比べて有効であったと報告している。これらの報告は本研究で得た結果を支持するものである。しかし，本研究では  $\beta$ -1,3-*glucanase* 以外の多糖分解酵素は，カンジダの除去効果を全く示さなかった。このことから，他の研究者の報告している酵素タイプの義歯洗浄剤の効果は，主として蛋白質分解酵素の作用によるものと考えられる。

本研究において，真菌細胞壁溶解酵素及び *Trypsin* を除く蛋白質分解酵素がレジンプレートに付着したカンジダの除去に対して強い効果を示した。しかし，蛋白質分解酵素はカンジダに対して全く殺菌作用を示さず，その酵素活性が消失すると除去されたカンジダが再び床用レジンに付着することが考えられる。事実，Depaola ら<sup>18)</sup>は義歯保管容器から *C. albicans* などのデンチャー プラーク中に存在する病原微生物を検出し，保管容器から義歯への病原微生物の再付着の可能性を報告している。

一方，*Zymolyase* は真菌の菌体構造を維持している細胞壁の *glucan* 層を加水分解し，真菌細胞を溶菌する。そのため，いったん除去されたカンジダが再付着することがないと考えられる。このような *Zymolyase* の特性は義歯洗浄剤として有益である。

そこで，*Zymolyase* が *C. albicans* に対してどの程

度の溶菌効果を示すか検討した。その結果、*C. albicans* は Zymolyase の 5  $\mu\text{g/ml}$  濃度でも著明に溶菌されることが示された (図3)。しかし、溶菌効果を示す濁度の変化は、あるレベルまで低下するとそれ以上減少しなかった。これは、真菌の細胞壁の glucan 層には Zymolyase が作用しない  $\beta$ -1,6-glucan が存在するほか、細胞壁には mannan 層や chitin などが含まれるため、壁成分が完全に溶解消失しないためと考えられる。また、菌種により Zymolyase に対する感受性に差があったが、*C. albicans* 以外の実験に用いた全てのカンジダに対しても、Zymolyase は著明な溶菌効果を示した (図4)。

以上の溶菌効果は、全て酵母型のカンジダに対するものであった。*C. albicans* や一部の *C. tropicalis* では酵母型及び菌糸型の二相性を示す<sup>19)-23)</sup>と報告されている。事実、デンチャー プラークを走査型電子顕微鏡で観察すると、菌糸型の細胞を多数認めた (図5)。また、菌糸型の方が酵母型に比べて数倍の付着能を示すことを観察した。更に、菌糸型の方が病原性が強く<sup>20)</sup>、細胞壁の化学組成も異なる<sup>22),23)</sup>という報告がある。そこで、菌糸型のカンジダに対する Zymolyase の溶菌効果を光学顕微鏡で観察したところ、酵母型と同様に菌糸型に対しても Zymolyase は溶菌効果を示すことがわかった。

次に、実際に口腔内でデンチャー プラークの付着した義歯を用いて Zymolyase の除去効果を走査型電子顕微鏡で観察したところ、Zymolyase によって酵母型及び菌糸型の真菌が完全に消失し、デンチャー ベリクル様の付着物のみを認めた (図5)。*in vivo* で義歯に付着した菌糸型を含んだ真菌に対しても Zymolyase は除去効果があることが明らかになった。

以上のように、真菌細胞壁溶解酵素及び蛋白質分解酵素は、レジンプレートに付着したカンジダを極めて有効に除去することがわかった。特に、真菌細胞壁溶解酵素の一つである Zymolyase は、実験に用いた全てのカンジダに対して溶菌効果を示し、除去されたカンジダが床用レジンに再付着しないと考えられる。この特性は義歯洗浄剤として有益である。

そこで、これらの酵素を配合した試作義歯洗浄剤の臨床効果を検討する目的で、義歯性口内炎患者20名に7日間就寝中義歯洗浄剤を使用させたところ、7日間使用後では肉眼的にもデンチャー プラークが除去され (図6)、義歯粘膜面の真菌数も減少し (図7)、更に、義歯性口内炎症状の軽減傾向を認めた (図8)。この結果は、本試作義歯洗浄剤の有効性を示すとともに、カンジダが義歯性口内炎の病因の一つであることを支持した。

義歯性口内炎の治療に関しては、抗真菌剤を用いた研究<sup>24)-26)</sup>があり、ある程度の治療効果を得たと報告している。しかし、投薬を中止すると早期に再発することが多く<sup>27)-29)</sup>、長期に連用する必要がある。抗真菌剤は、副作用も強く、長期の連用は好ましくないものと考えられる。一方、真菌細胞壁溶解酵素及び蛋白質分解酵素を配合した本試作義歯洗浄剤は、デンチャー プラークの除去効果に優れた、カンジダを溶菌することから床用レジンへのカンジダの再付着の阻止が期待されるため、義歯性口内炎の予防と治療にとって有効であると考えられる。

## 結 論

デンチャー プラーク中のカンジダを除去することは義歯性口内炎の予防と治療にとって有効な手段と考えられる。そこで、種々の酵素を用いてレジンプレートに付着したカンジダの除去効果を検討し、以下の結果を得た。

1. 真菌細胞壁溶解酵素及び Trypsin を除く蛋白質分解酵素は、*C. albicans* の除去効果を認めた。しかし、amylase, dextranase, chitinase や細菌細胞壁溶解酵素などでは、*C. albicans* の除去効果を全く認めなかった。

2. 真菌細胞壁溶解酵素の一つである Zymolyase は溶菌を起こさない濃度でもカンジダに対して著明な除去効果を発揮した。

3. Zymolyase は実験に用いた全てのカンジダに対して優れた溶菌効果を示した。また、付着性の強い菌糸型の細胞をも溶菌した。

4. Zymolyase 及び蛋白質分解酵素 (Alcalase) を配合した試作義歯洗浄剤の効果を検討した結果、義歯に付着したプラークを取り除き、床下粘膜の炎症の軽減に有効であった。

以上の結果から、義歯性口内炎の起炎菌として重要な役割を果している *C. albicans* を主体としたカンジダに対して、床用レジンからの除去効果に優れた Zymolyase 及び蛋白質分解酵素を配合した義歯洗浄剤を使用することは、義歯性口内炎の予防と治療にとって有効であることが示された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました本学歯科補綴学第二講座浜田泰三教授に深厚なる謝意を表しますとともに、本研究を進めるに際し、終始御指導いただき、御校閲を賜った本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授に深く感謝致します。また、御校閲を賜った本学歯科補綴学第一講座津留宏道教授に

心から御礼申し上げます。更に、本研究を行うにあたり御協力いただいた歯科補綴学第二講座並びに口腔細菌学講座の諸先生に感謝致します。

## 文 献

- 1) Budtz-Jørgensen, E. (1979): Materials and methods for cleansing dentures. *J. Prosthet. Dent.*, **42**, 619-623.
- 2) Nicholson, R.J., Stark, M.M. and Scott, H.E. (1968): Calculus and stain removal from acrylic resin dentures. *J. Prosthet. Dent.*, **20**, 326-329.
- 3) MacCallum, M., Stafford, G.D., MacCulloch, W. T. and Combe, E.C. (1968): Which cleanser? A report on a survey of denture cleaning routines and the development of a new denture cleanser. *Dent. Pract. Dent. Rec.*, **19**, 83-89.
- 4) 浜田泰三 (1983): デンチャー プラーク コントロール. 永末書店, 京都, 52-72, 昭和58.
- 5) 浜田泰三 (1981): デンチャー プラーク コントロール. 日本歯科評論 **466**, 87-103, 昭和56.
- 6) Connor, J.N.E., Schoenfeld, C.M. and Taylor, R.L. (1977): An evaluation of an enzyme denture cleanser. *J. Prosthet. Dent.*, **37**, 147-157.
- 7) Budtz-Jørgensen, E. (1977): Prevention of denture plaque formation by an enzyme denture cleanser. *J. Biol. Buccale.*, **5**, 239-244.
- 8) Budtz-Jørgensen, E. and Kelstrup, J. (1977): Enzymes as denture cleansers. *Scand. J. Dent. Res.*, **85**, 209-215.
- 9) Budtz-Jørgensen, E. (1978): A 3-months' study of enzymes as denture cleansers. *J. oral Rehab.*, **5**, 35-39.
- 10) Budtz-Jørgensen, E., Kelstrup, J. and Poulsen, S. (1983): Reduction of formation of denture plaque by a protease (Alcalase®). *Acta Odont. Scand.*, **41**, 93-98.
- 11) 玉本光弘 (1984): デンチャー プラークのカンジダに関する研究. (第1報) デンチャー プラークのカンジダ叢と義歯性口内炎との関係. 広歯誌 **16**, 242-249, 昭和59.
- 12) Kitamura, K., Kaneko, T. and Yamamoto, Y. (1971): Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 402-404.
- 13) Evans, E.G.V., Odds, F.C., Richardson, M.D. and Holland, K.T. (1974): The effect of growth medium on filament production in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, **12**, 112-119.
- 14) Olsen, I. and Birkeland, J.M. (1975): Assessment of denture plaque pH in subjects with and without denture stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.*, **83**, 370-374.
- 15) Samaranayake, L.P. and MacFarlane, T.W. (1980): An *in-vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch. oral Biol.*, **25**, 603-609.
- 16) Samaranayake, L.P., McCourtie, J. and MacFarlane, T.W. (1980): Factors affecting the *in-vitro* adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch. oral Biol.*, **25**, 611-615.
- 17) McCourtie, J. and Douglas, L.J. (1981): Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect. Immun.*, **32**, 1234-1241.
- 18) DePaola, L. G. and Minah, G.E. (1983): Isolation of pathogenic microorganisms from dentures and denture-soaking containers of myelosuppressed cancer patients. *J. Prosthet. Dent.* **49**, 20-24.
- 19) 清水亮司 (1969): *Candida albicans* の germ tube-like filament に関する研究. 1. *In vitro* における germ tube-like filament 形成に関する実験. 九州歯会誌 **23**, 507-528, 昭和44.
- 20) Shakir, B.S., Martin, M.V. and Smith, C.J. (1983): Relative effectiveness of various yeasts, *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata*, for inducing palatal infection in the Wistar rat. *Arch. oral Biol.*, **28**, 1069-1071.
- 21) Shepherd, M.G. and Sullivan, P.A. (1984): The control of morphogenesis in *Candida albicans*. *J. Dent. Res.* **63**, 435-440.
- 22) Chattaway, F.W. and Holmes, M.R. (1968): Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. gen. Microbiol.*, **51**, 367-376.
- 23) 山口英世, 岩田和夫 (1972): 真菌細胞の二形成と壁の構造. 蛋白質核酸酵素 **17**, 588-603, 昭和47.
- 24) Olsen, I. (1975): Denture stomatitis. Effects of chlorhexidine and amphotericin B on the mycotic flora. *Acta Odont. Scand.*, **33**, 41-46.
- 25) Olsen, I. (1975): Denture stomatitis. The clin-

- ical effects of chlorhexidine and amphotericin B. *Acta Odont. Scand.*, 33, 47-52.
- 26) Bergendal, T. and Isacsson, G. (1980): Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 88, 446-454.
- 27) Bergendal, T. (1982): Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1-year follow-up study. *Scand. J. Dent. Res.*, 90, 227-238.
- 28) Budtz-Jørgensen, E. and Bertram, U. (1970): Denture stomatitis. II. The effect of antifungal and prosthetic treatment. *Acta Odont. Scand.*, 28, 283-304.
- 29) Budtz-Jørgensen, E., Theilade, E. and Theilade, J. (1983): Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 91, 134-142.