

市販洗口液の真菌に対する評価

中本 匡美, 玉本 光弘, 浜田 泰三

Evaluation of Antifungal Activity of Mouthrinses against *Candida albicans*

Kyoumi Nakamoto, Mitsuhiro Tamamoto and Taizo Hamada

(平成5年2月22日受付)

緒 言

義歯性口内炎の予防と治療に、義歯洗浄剤を使用した化学的デンチャー プラーク コントロールが用いられている¹⁾。他方、口腔内の清掃がプラーク コントロールにおいて、義歯の洗浄と同様、重要な役割を果している可能性も指摘されている^{2,3)}。

しかし、義歯装着者の中には口腔内の清掃に介護者が必要とする場合もあり、より簡便なプラーク コントロール補助手段が必要である。その一つとして、洗口液の利用が挙げられる。洗口液は元来、口臭の予防や除去を目的としている。しかし近年、抗菌剤等を配合したものが注目されるようになった⁴⁻¹⁰⁾。これらは殺菌やプラークの除去を行うことで、齲蝕や歯周疾患の予防効果を発揮するとされ、その効果が報告されている¹¹⁻¹⁵⁾。一方、義歯装着者に対するこれら洗口液の有効性の報告は少ない^{16,17)}。

本研究では、義歯性口内炎患者から高頻度に検出される *Candida albicans*¹⁸⁻²¹⁾ を用い、市販義歯洗口液の真菌に対する評価を行うことで、デンチャー プラーク コントロール補助手段としての有効性を検討した。

実験材料および方法

I. 材 料

1. 供試菌株

C. albicans A IFO 1385 株を実験に供した。

2. 洗口液

実験に用いた18種類の洗口液を表1に示す。これらのうち多くはエタノールを含有している。その他の抗

菌、防腐、洗浄作用を示す成分²²⁾として、D, Eは安息香酸塩, E, Fはラウリル硫酸塩, G, Hはグルコン酸クロルヘキシジン, Iは塩酸アルキルジアミノエチルグリシン, J, K, Lは塩下セチルピリジニウム, M~Rは植物由来の抽出物を含んでいる。

H, I, Jは医薬部外品であり, F, Nは菌垢除去, I, Jは殺菌作用, M, Pはむし歯予防, Hは歯肉炎, むし歯, 歯槽膿漏予防を表示している。Qは入れ歯口臭の除去を目的とした製品である。Rは外国で市販されている製品である。

II. 方 法

1. 発育阻害活性

(1) 菌液の調製

前培養液 10 ml を Sabouraud glucose broth 40 ml に接種し, 37°C 4 時間培養した。菌を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2, PBS) で洗浄後, 懸濁して調製した。

(2) 試料液の調製

洗口液はメーカー指示に従い, 原液を用いるものはそのまま, 希釈指示のあるものについては蒸留水で希釈し試料液とした。

(3) 検定

カンジダ GE 寒天平板培地 (φ90 mm, 日本製薬, 東京) に菌液 0.1 ml を播種した (1×10⁴ CFU/ml)。φ6 mm のペーパーディスク (東洋濾紙工業, 東京) を 1 分間試料液に浸漬して培地にのせ, 37°C 18 時間培養した。阻止円は 4 方向から計測し, 1 試料につき 3 回実験を行った。

2. 最大発育阻害希釈倍率 (MID)

(1) 菌液の調製

前培養液を 2 倍濃度の Sabouraud glucose broth に懸濁し, 1×10³, 1×10⁶ CFU/ml に調製した。

表1 洗口液

略	製品名 (製造会社)	活 性 成 分
A	グリーン水はみがき (ライオン, 東京)	エタノール
B	スコール (サンスター, 大阪)	エタノール
C	モンダミン (アース製薬, 兵庫)	エタノール
D	クイックス (ライオン)	安息香酸塩
E	ブラックス (ファイザー, USA)	安息香酸塩, サリチル酸塩, ラウリル硫酸塩
F	ハーブウェル (鐘紡, 東京)	ラウリル硫酸塩
G	オン・エア (資生堂, 東京)	グルコン酸クロロヘキシジン
H	ラカルト薬用洗口液 (エスエス製薬, 東京)	グルコン酸クロロヘキシジン
I	アドネス レッド (ネオ製薬, 東京)	塩酸アルキルジアミノエチルグリシン, オイゲノール
J	ガム (サンスター)	塩化セチルピリジニウム
K	セバコール (メレル・ダウ製薬, 東京)	塩化セチルピリジニウム
L	マウスジャズ (マンダム, 大阪)	塩化セチルピリジニウム
M	エイゼル水ハミガキ塩 (アイワ, 大阪)	甘草エキス, クロロフィル
N	ブラクリン (日本歯研工業, 東京)	安息香酸塩, サリチル酸塩, ヒノキチオール, ラウリル硫酸塩
O	ラボリス (Lavoris-DEP CO., USA)	塩化亜鉛, クローブ油
P	リスレリン (インターナショナル・トイレットリース, 神奈川)	安息香酸塩, オイゲノール, チモール, メントール, ユーカリ油
Q	デンタラント 567 (丹平製薬, 大阪)	アラントインクロロヒドロキシアリミニウム, 安息香酸塩, 塩化ナトリウム, ゲンノショウコエキス, α -シクロデキストリン
R	Viadent (Frank W. Honer Inc., Canada)	塩化サンギナリン

(2) 試料液の調製

1で活性が認められた洗口液を蒸留水で系列2倍希釈し、試料液とした。

(3) 検定

菌液 1.5 ml に試料液 1.5 ml を加え 37°C 18時間培養を行った。培養後、滅菌蒸留水で希釈を行い、分光光度計 (スペクトロニック 21DV, BAUSH & LOMB 社, USA) を用い、波長 560 nm で濁度 (OD) を測定した。control には滅菌蒸留水を用い、blank は各試料液と、真菌を含まない2倍濃度の Sabouraud glucose broth を等量加えたものを用いた。

3. 殺菌作用

(1) 菌液の調製

Bernstein ら²³⁾ の変法を用い以下の実験を行った。前培養液 10 ml を Sabouraud glucose broth 40 ml に接種し、37°C 4時間培養した。菌を PBS で洗浄後、懸濁して 1×10^6 CFU/ml に調製した。

(2) 検定

菌液 1 ml に1で活性が認められた洗口液 1 ml を加え、30秒、5分、15分間 vortex をかけた。各時間ごとに試料液 0.1 ml を採り、任意に希釈してカンジダ GE 寒天培地に接種、37°C 48時間培養を行った。control には蒸留水を用いた。

結 果

I. 発育阻害活性

結果を表2に示す。B, D, G, J, K, L, O, P, Rの9種類で阻止円が形成された。阻止円はOが最も大きく、次いでB, Rが大きかった。

表2 発育阻害活性

A	-	G	+	M	-
B	++	H	-	N	-
C	-	I	-	O	+++
D	+	J	+	P	+
E	-	K	+	Q	-
F	-	L	+	R	++

+++; ϕ 13 mm への阻止円を形成

++; ϕ 9~12 mm の阻止円を形成

+; ϕ ~8 mm の阻止円を形成

-; 阻止円を形成しない

II. MID

結果を表3に示す。以下に示す式に従い、control を100%として各希釈濃度の濁度を百分率で表した。

表3 各希釈濃度における濁度比率

	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶
B	—	—	—	—	16.8	32.8	42.2
D	—	—	—	—	—	20.0	39.0
G	—	—	—	—	—	7.3	33.4
J	—	—	—	—	—	—	—
K	—	—	—	—	—	—	—
L	—	—	—	—	—	—	52.7
O	—	—	—	—	—	24.4	50.9
P	—	—	—	—	22.4	44.4	60.3
R	—	—	—	—	6.9	36.9	47.2

接種菌濃度；1×10³ CFU/ml (%)

	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶
B	—	—	—	45.1	71.0	81.1	81.4
D	—	—	—	—	44.4	68.8	83.1
G	—	—	—	—	54.7	90.4	97.8
J	—	—	—	—	—	—	3.8
K	—	—	—	—	—	—	—
L	—	—	—	—	—	51.5	75.9
O	—	—	—	53.1	92.0	92.9	92.0
P	—	—	—	30.9	67.7	84.8	93.1
R	—	—	—	—	81.0	94.4	95.9

接種菌濃度；1×10⁶ CFU/ml (%)

—；blank と濁度の相違を認めない

$$\% = \frac{\text{OD of sample} - \text{OD of blank}}{\text{OD of control} - \text{OD of blank}} \times 100$$

接種菌液濃度が1×10³ CFU/mlの時、MIDはLが2⁵、D、G、Oが2⁴、B、P、Rが2³であった。接種菌液濃度が1×10⁶ CFU/mlの時、MIDはJが2⁵、Lが2⁴、D、G、Rが2³、B、O、Pが2²であった。Jの接種菌液の濃度が1×10³ CFU/mlの場合とKはどちらの場合においても2⁶倍希釈で菌を発育させなかった。

Ⅲ. 殺菌作用

結果を表4に示す。controlを100%とし、各時間ごとの生菌数を百分率で表した。全ての試験液で、経時的に生菌数が減少した。このうちPは最も真菌生存率が低く、30秒間接触でcolonyを形成しなかった。各時間において最も生存率の高かったOでも、接触時間15分で生菌率は半減した。

考 察

口腔衛生製品として、口臭の予防や除去を目的とした洗口液がある。近年、齲蝕や歯周疾患予防を目的と

表4 真菌生存率

	30 sec	5 min	15 min
B	32.9	0.2	—
D	0.1	0.1>	—
G	4.7	0.1>	—
J	19.7	0.1>	—
K	0.4	—	—
L	0.1>	—	—
O	78.9	58.7	53.1
P	—	—	—
R	64.8	53.1	24.4

—；colony が形成されない (%)

する洗口液が目目され、その効果が報告されている。これを利用することによってデンチャー プラークコントロールを補助し、義歯性口内炎の予防と治療の一助とすることを目的として、*C. albicans* に対する18種類の市販洗口液の評価を行った。

その結果、発育阻害活性試験においてB、D、G、J、K、L、O、P、Rの9種類の洗口液が活性を示した。このうちD以外はエタノールを含有しており、その他の成分として、Dは安息香酸塩、Gはグルコン酸クロルヘキシジン、J、K、Lは塩化セチルピリジニウム、Oはクローブ油、Pはチモール、ユーカリ油、Rは塩化サンギナリンを含有している。これら活性を示した洗口液について、MIDと殺菌作用の測定を行った。

洗口液の発育阻害活性は、単独成分によるものではなく、含有される成分の相互作用であることから、最小発育阻害濃度ではなく、最大発育阻害希釈倍率(MID)の測定を行った。この実験において、塩化セチルピリジニウムを含有する洗口液J、K、Lが強い活性を示した。次いで、低濃度菌液では安息香酸塩含有洗口液Dや、グルコン酸クロルヘキシジン含有洗口液G、精油成分含有洗口液Oが、高濃度菌液ではこの他に塩化サンギナリン含有洗口液Rが高倍率希釈液で菌の発育を抑えた。

次に、洗口時間内における殺菌作用の指標として、短時間接触に対する真菌生存率を測定した。殺菌作用は、精油成分含有洗口液Pが最も強く、接触時間30秒でcolonyを形成しなかった。次いでD、G、K、Lが強い活性を示した。RとOの殺菌作用は他の洗口液に比較して強くはなかったが、Oでの真菌生存率は接触時間15分で半減した。RやOも日常、継続的に使用することにより、効果を充分発揮すると考えられる。

以上の結果から、唾液によって洗口液が希釈されることに対しては塩化セチルピリジニウム含有洗口液

が、また、洗口時間内における殺菌作用は精油成分含有洗口液が有効である可能性が示唆された。

これらの結果において、類似した成分を含有する洗口液の間で、活性に程度の差異や有無が認められたのは、それぞれの成分の含有濃度や構成比によると考えられる。洗口液には、*in vitro* で上皮細胞に長時間接触させると細胞毒性を示すという報告²⁴⁾があるが、臨床上の使用においては問題ないと考えられている。義歯性口内炎患者への応用についても、症状が改善されたという報告^{16,17)}がなされており、洗口液の有効性が示唆される。

結 論

義歯性口内炎の治療や予防におけるデンチャー ブラーク コントロール補助手段としての市販洗口液の有効性の検討を *Candida albicans* を用いて行い、その結果以下の知見を得た。

1. 18種類の市販洗口液に対する発育阻害活性試験の結果、B, D, G, J, K, L, O, P, Rの9種類の洗口液が活性を示した。この9種類の洗口液について、以下のMID測定と殺菌作用の検討を行った。
2. MID測定の結果、塩化セチルピリジニウムを含有する洗口液が強い活性を示した。ついで低濃度菌液ではD, G, Oが、高濃度菌液ではD, G, Rが各々 2^4 , 2^3 倍希釈で真菌の発育を抑制した。
3. 殺菌作用は、精油成分含有洗口液Pが最も強く、接触時間30秒でcolonyを形成しなかった。生存率の最も高かったOにおいても、真菌の生存率は接触時間15分で半減した。

文 献

- 1) 浜田泰三：デンチャー ブラーク コントロール。永末書店，東京，1983。
- 2) Gilmore, E.L. and Bhaskar, S.N.: Effect of tongue brushing on bacteria and plaque formed *in vitro*. *J. Periodontol.* **43**, 418-422, 1972.
- 3) Jacobson, S.E., Crawford, J.J. and McFall, Jr., W.R.: Oral physiotherapy of the tongue and palate: relationship to plaque control. *J. Am. Dent. Assoc.* **87**, 134-139, 1973.
- 4) Ciancio, S.G., Mather, M.L. and Bunnell, H.L.: Clinical evaluation of a quaternary ammonium-containing mouthrinse. *J. Periodontol.* **46**, 397-401, 1975.
- 5) Fine, D.H., Letizia, J. and Mandel, I.D.: The effect of rinsing with Listerine antiseptic on the properties of developing dental plaque. *J. Clin. Periodontol.* **12**, 660-666, 1985.
- 6) Gordon, J.M., Lamster, I.B. and Seiger, M.C.: Efficacy of Listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* **12**, 697-704, 1985.
- 7) Emling, R.C. and Yankell, S.L.: First clinical studies of a new prebrushing mouthrinses. *Compend. Contin. Educ. Dent.* **6**, 636-645, 1985.
- 8) Afseth, J. and Roella, G.: Clinical experiments with a mouthrinse containing sanguinarine chloride. *Caries Res.* **21**, 285-288, 1987.
- 9) Wade, W.G. and Addy, M.: In vitro activity of a chlorhexidine-containing mouthwash against subgingival bacteria. *J. Periodontol.* **60**, 521-525, 1989.
- 10) Minah, G.E., DePaloa, L.G., Overholser, C.D., Meiller, T.F., Niehaus, C., Lamm, R.A., Ross, N.M. and Dills, S.S.: Effects of 6 months use of an antiseptic mouthrinse on supragingival dental plaque microflora. *J. Clin. Periodontol.* **16**, 347-352, 1989.
- 11) Bonesvoll, P. and Gjermo, P.: A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Archs oral Biol.* **23**, 289-294, 1978.
- 12) Yankell, S.L., Moreno, O.M., Saffir, A.J., Lowary, R.L. and Gold, W.: Effects of chlorhexidine and four antimicrobial compounds on plaque, gingivitis, and staining in beagle dogs. *J. Dent. Res.* **61**, 1089-1093, 1982.
- 13) Southard, G.L., Grozink, W.J., Boulware, R.T., Throne, E.E., Walborn, D.R. and Yankell, S.L.: Sanguinarine a new antiplaque agent: retention and plaque specificity. *J. Am. Dent. Assoc.* **108**, 338-341, 1984.
- 14) Dzik, J.L. and Socransky, S.S.: Comparative in vitro activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrob. Agents Chem.* **27**, 663-665, 1985.
- 15) Patters, M.R., Nalbandian, J., Nichols, F.C., Niekrashe, C.E., Kennedy, J.E., Kiel, R.A. and Trummel, C.L.: Effects of octenidine mouthrinse on plaque formation and gingivitis in humans. *J. Periodont.* **Res. **21**, 154-162, 1986.**
- 16) DePaloa, L.G., Minah, G.E., Leuplod, R.J., Faraoe, K.L. and Elias, S.A.: The effect of antiseptic mouthrinses on oral microbial flora and denture stomatitis. *Clin. Prev. Dent.* **8**, 3-8, 1986.
- 17) Lal, K., Santarpia, R.P., Pollock, J.J. and Rennerm, R.P.: Assessment of antimicrobial treatment of denture stomatitis using an in vitro replica model system: therapeutic efficacy of an oral rinse. *J. Prosthet. Dent.* **67**, 72-77, 1992.
- 18) Olsen, I.: Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol. Scand.* **32**,

- 329-333, 1974.
- 19) Budtz-Jørgensen, E.: The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.* **82**, 151-190, 1974.
- 20) Bergendal, T., Holmberg, K. and Nord, C.-E.: Yeast colonization in the oral cavity and feces in patients with denture stomatitis. *Acta Odontol. Scand.* **37**, 37-45, 1979.
- 21) Budtz-Jørgensen, E., Theilade, E. and Theilade, J.: Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.* **91**, 134-142, 1983.
- 22) Windholz, M. editor.: The merck index, ed. 10, MERCK & Co., Inc., New Jersey, 1983.
- 23) Bernstein, D., Schiff, G., Echler, G., Prince, A., Feller, M. and Briner, W.: *In vitro* virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J. Dent. Res.* **69**, 874-876, 1990.
- 24) Barczynski, J.L., Fletcher, R.D., Segal, A.H., Conway, J.C.: Viadent®, ethanol and pH effects upon gingival epithelial-like cells, *in vitro*. *J. Periodontol.* **58**, 622-627, 1987.