

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

林 裕基

論文題目

エチレンビニルアセテートで作製したスポーツマウスガードにおける口腔内細菌の洗浄効果

I. 緒言

スポーツマウスガードは、アスリートを外傷や脳震盪から守る働きがあり、主にエチレンビニルアセテート (EVA) で製作される。

スポーツマウスガードは、競技中に口腔内に装着されるため、う蝕や歯周病原菌に汚染される。このため汚染された不衛生なスポーツマウスガードは、歯周病およびう蝕の原因となる。したがって、スポーツマウスガードの日常的な洗浄が重要である。

一般的に、スポーツマウスガードの洗浄方法には、機械的洗浄方法と化学的洗浄方法の2種類がある。しかし、日本ではこれまでガイドラインで標準化された洗浄方法は筆者の知る限り存在しない。

スポーツマウスガード洗浄の標準的なガイドラインを策定するためには、複数の視点から多くの独自研究を行う必要がある。そこで、筆者は、スポーツマウスガード洗浄のガイドラインに寄与する研究を行うこととした。さらにアスリートに有益な研究とするため、市販の洗浄剤であるタブレット型マウスガード洗浄剤 (アライナーリテーナークリーナー、モリムラ、東京、日本) に着目し、*in vitro* および *in vivo* により EVA 製スポーツマウスガードに対する洗浄効果を検討した。

II. 材料および方法

1. *in vitro* による研究

1) 試験体作製

アルジネート印象材で直径 100 mm のプラスチック円盤の印象採得を行い、円盤状の石膏模型を作製した。EVA シートを加熱し、加圧形成機で石膏模型に圧着した。石膏模型から圧着したシートを剥がし、パンチで切り出し、厚さ 1mm、直径 5 mm の EVA シートを試験体とした。試験体はエチレンオキサイドガスで滅菌した。

2) 細菌株および培養条件

Streptococcus. mutans NCTC 10449、*Streptococcus. oralis* ATCC 9811、*Staphylococcus. aureus* FDA209P を使用した。いずれの菌株も BHI 液体培地に接種し、嫌気条件下 (80%N₂、10%H₂、10%CO₂)、37°C で増殖曲線の静止期に達するまで培養を行った。バイオフィーム形成の誘導には、スクロース含有培地を用いた。

3) EVA シート上のバイオフィームに対する洗浄効果の検討

24 枚の EVA シートを 5%スクロース含有 BHI 液体培地に浸漬し、培地中の細菌を接種し、24 時間培養してバイオフィームを形成した。バイオフィームを形成した 24 枚の EVA シートを、以下の 4 群に分けた。

- ・滅菌蒸留水洗浄群 (CTRL 群)
- ・超音波洗浄群 (UW 群)
- ・タブレット型マウスガードクリーナー洗浄群 (MC 群)

今回使用したマウスガードクリーナーは市販されている洗浄剤で、塩化セチルピリジニウムを主成分としている。

- ・ 250ppm 次亜塩素酸ナトリウム洗浄群 (NaClO 群)

CTRL 群は、滅菌蒸留水に 10 分間浸漬した。UW 群は、滅菌蒸留水に浸漬し、超音波洗浄機 (ULTRASONIC CLEANER UC-0205A、日本理化学器械、東京、日本) で 48W、27 kHz で 10 分間洗浄した。MC 群では、洗浄剤とともに滅菌蒸留水に 10 分間浸漬した後、洗浄した。NaClO 群では、250ppm NaClO に 10 分間浸漬した後、洗浄した。なお、水温はマウスガードクリーナーの説明書に従い、全ての群において 150mL、40°C に統一した。

4) 評価項目

①CFU による評価

滅菌蒸留水で洗浄後、超音波洗浄機とボルテックスにて処理し、ディスクに残存した細菌を試験管内に遊離させた。得られた菌懸濁液を BHI 寒天培地に接種して嫌気条件下 (80%N₂、10%H₂、10%CO₂) にてコロニー形成のために 24 時間培養した。その後 1mL あたりのコロニー数に換算し CFU を算出した評価した。

②走査型電子顕微鏡による評価

洗浄後のシート上の細菌をパラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドにより固定した。その後、エタノールによる脱水後、走査型電子顕微鏡 (JXA-iHP200F、日本電子、東京、日本) でディスク上の細菌を 5,000 倍の倍率で観察した。

2. *in vivo*による研究

1) 被験者

被験者は 10 人の健康で欠損歯がなく、顎関節症状および服薬がないボランティアとした。[男性 4 人と女性 6 人：年齢 27 ~33 (28.8 ± 2.4)]被験者によるインフォームドコンセントは、愛知学院大学歯学部倫理委員会（第 644 号）により承認された書面により得た。

2) 実験用スポーツマウスガードの装着プロトコール

通法により作製したスポーツマウスガードを 1 日 2 時間、4 日間装着した。流水で唾液を除去した後、乾燥した状態で保存容器に保管するよう指示した。また、食後の歯磨き後、1 時間以上経過した後にスポーツマウスガードを装着させた。

3) 実験用スポーツマウスガードの洗浄

洗浄方法は、マウスガードを中央から 2 つに分割しそれぞれ 2 つのパーツは異なる方法で行うこととした。右側は流水による洗浄 (CTRL)、左側はマウスガードクリーナーによる洗浄 (MC)、*in vitro* と同様に 40°C、5 分間で洗浄を行った。

4) 評価項目

①ATP+AMP 測定による清浄度の評価

清浄度は、CTRL 群を右側小白歯部、MC 群を左側小白歯部で評価した。詳細には、右側及び左側小白歯部の EVA 表面を検査キット付属の滅菌綿棒で

拭い、ATP+AMP 検査装置 (ルミテスターPD-30、キッコーマンバイオケミフ
ァ) で ATP+AMP 値を測定した。得られた測定値に対する減少率を以下の式
で算出した。減少率 = (CTRL 群の値 - MC 群の値) / CTRL 群の値 × 100 (%)。
減少率をもって清浄度とした。

②CFU による評価

CFU の評価は、各検体を滅菌蒸留水で洗浄し、超音波洗浄機とボルテック
スにて処理した後、検体に付着している細菌を遊離させた菌懸濁液作製し
た。得られた菌懸濁液を、BHI 寒天培地 (嫌気条件下)、Mitis-Salivarius
寒天培地 (嫌気条件下)、Sabouraud 寒天培地 (好気条件下) で接種に接種
した。それぞれの培地で懸濁液中の全ての菌、レンサ球菌および *candida*
を培養した。その後、1 mL あたりのコロニー数に換算し CFU を評価した。

4. 統計学的分析

正規性が認められたものは一元配置分散分析 (ANOVA) および Tukey の多
重比較検定にて分析を行い、正規性が認められなかったものは
Mann-Whitney U test にて分析を行った。統計分析は IBM SPSS statistics
version 26.0 を用いて行い、有意水準は 0.05 とした。

Ⅲ. 結果

1. *in vitro* による研究

1) CFU による評価

*S. oralis*はCTRL群において約 1×10^6 CFU/mL 検出された。UW群は約 1×10^4 CFU/mL 検出され、CTRL群と比較して有意にCFUが減少した。MC群およびNaClO群においてはCTRL群と比較して有意に減少し、検出限界以下となった。

*S. mutans*はCTRL群において約 1×10^6 CFU/mL 以上検出された。UW群は約 1×10^5 CFU/mL 検出され、CTRLと比較して菌数の減少傾向が認められた。MC群は約 1×10^3 CFU/mL もの菌数を検出し、CTRL群と比較して有意にCFUが減少した。なお、NaClO群においてCFUは検出限界以下となった。

*S. aureus*はCTRL群において約 1×10^5 CFU/mL 以上検出された。UW群では約 1×10^4 CFU/mL 検出され、菌数の減少傾向が認められた。MC群は約 1×10^3 CFU/mL もの菌数を検出し、CTRL群と比較して有意にCFUが減少した。NaClO群においてCFUは検出限界以下となり、有意な菌数の減少を認めた。

2) 走査型電子顕微鏡による評価

次に、EVAシートへの洗浄効果もSEMで観察した。CTRL群では、すべての菌種でバイオフィルムの形成が見られた。*S. oralis*はまばらなバイオフィルムの形成であったが、*S. mutans*と*S. aureus*は高密度のバイオフィルムを形成した。3つのバイオフィルムの減少程度は、NaClO、MC、UWの順であった。

2. *in vivo* による研究

1) ATP+AMP測定による清浄度の評価

各個人の MC 群の結果では、CTRL 群と比較して、10 名中 9 名で ATP+AMP 値が有意に減少した。一方で、被験者 D から得られたマウスガードでは、MC 処理の効果は見られなかった。ATP+AMP 値の被験者ごとの減少率を見ると、被験者 D 以外の被験者では 63.5~99.7%の減少が見られた。

2) CFU の評価

MC 処理の有無に関わらず、全ての被験者から総菌数およびレンサ球菌数が約 1×10^4 CFU/mL 検出され、7 名から *Candida* が検出された。各個人に対する MC 処理の結果では、総菌数、レンサ球菌数、*Candida* 群の微生物数は、全ての被験者で有意に減少した。ただし、被験者 D、E、H では、MC 処理後に 1×10^3 CFU/mL 以上の *Candida* が残存していた。MC 群の総菌数、レンサ球菌数、*Candida* 数は、CTRL 群に比べ有意に減少した。

IV. 考察

in vitro においては、口腔内細菌が付着した EVA 製スポーツマウスガードの洗浄は、CTRL 群では *S. mutans* と *S. aureus* がそれぞれ $10^5 \sim 10^6$ 個 CFU/mL 以上検出され、UW 群では約 $10^4 \sim 10^5$ 個が残存した。また、全ての菌において MC 群と NaClO 群では有意に減少した。EVA シートの洗浄は流水や UW による洗浄では不十分であり、MC による洗浄が必要であることが示唆された。

in vivo においては、MC 群では CTRL 群に比べ有意に減少率が低く、CFU と ATP+AMP 検査の 2 つの測定法ともに清潔の度合いを評価する方法として有効であることが確認された。コロニー数による評価は煩雑な方法であるが、

ATP+AMP 検査の評価は迅速に結果を得ることができる。したがって、スポーツマウスガード清潔の程度は、迅速に評価できる ATP+AMP 検査で十分であることが示唆された。

CTRL 群の実験用スポーツマウスガードでは、総菌数およびレンサ球菌数が約 10^6 CFU/mL であったのに対し、MC 処理では検出限界以下であった。これらの結果から、短期間装着するスポーツマウスガードでは、MC 処理で充分であることが示唆された。また、CTRL 群で *Candida* が検出された 7 名のうち、被験者 D、E、H では MC 処理後も $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL の *Candida* が残存した。

Candida は、口腔カンジダ症を引き起こす常在真菌である。真菌は一般細菌に比べ、一般的に様々な消毒薬に対して耐性がある。今後は、MC を含む各種消毒剤の *Candida* 属に対する洗浄効果を明らかにする。

V. 結論

本研究から、MC による洗浄は UW による洗浄よりも効果的であることが示唆された。