

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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、口腔内に装着され、歯の破折などの外傷だけでなく、脳震盪の予防にも役立つことが報告されている。多くのスポーツ団体が安全対策としてスポーツマウスガードを装着することを義務付けているため、スポーツマウスガードを装着するアスリートの数は年々増加している。エチレンビニルアセテート (EVA) は、スポーツマウスガードの製作に使用される主要な材料である。う蝕や歯周炎などの口腔疾患は、口腔内の細菌感染によって引き起こされる。バイオフィーム細菌は、ペプチドや糖類からなる細胞外マトリックスの網目を通して、生体内の固体物質表面に強固に結合する。う蝕原因菌である *Streptococcus mutans* や口腔常在菌である *Streptococcus oralis* は、グラム陽性の通性嫌気性球菌で、歯面に強固なバイオフィームを形成する。グラム陽性通性嫌気性球菌である *Staphylococcus aureus* は日和見病原体として知られている。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) などの多剤耐性株は、それらに対する有効な薬剤がないため、現在世界中で重大な医療問題となっている。*S. aureus* は口腔内では必ずしも検出されないが、歯科治療処置における消毒や抗生物質処理後も生存するため、口腔粘膜に難治性の炎症を引き起こす。スポーツマウスガードは、競技中に長時間口腔内に装着されるため、上記の口腔内細菌に汚染される。口腔内細菌に汚染された不衛生なスポーツマウスガードは、悪臭、歯周病およびう蝕の原因となる。また、*S. oralis* は、スポーツマウスガードを 5 分間装着しただけで生着し、その後 14 日間装着を行わなかったとしても、スポーツマウスガード上に生存し続ける。したがって、細菌汚染をなくすためには、スポーツマウスガードを清潔に保つこと、つまり日常的な清掃が重要である。しかし、各種スポーツマウスガードの最適な洗浄方法は明らかになっていない。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。機械的な洗浄方法には、柔らかいブラシを使った方法がある。しかし、ブラッシングによって EVA シートの表面に微細な傷がつき、細菌汚染につながる可能性がある。さらに、スポーツマウスガードには義歯と同様に洗浄が困難な形態部分があり、ブラシを用いた物理的な洗浄方法には限界がある。一方で、化学的な洗浄方法について、Glass らは、洗浄剤による毎日の洗浄でスポーツマウスガードの微生物汚染を低減できることを報告している。また、Tanabe らは、EVA 上で培養した *Streptococcus sobrinus* がスプレータイプの洗浄剤を噴霧した 60 秒後に 99% 以上死滅したことを報告している。しかし、日本において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方法の標準化された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に関する研究を行うこととした。さらに適切な洗浄方法のガイドラインを作成するための一助になることを目的として、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。*in vitro* の研究では、通法により作製した EVA シート上に各種口腔内微生物のバイオフィームを形成させ、コロニー形成単位 (CFU/mL) を測定することにより、試験体の洗浄効果を評価するとともに、洗浄後の EVA シートの表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。また、*in vivo* の研究では、実験用スポーツマウスガードを装着し、洗浄度および CFU の測定を行った。

## 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 100mm 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 EVA シートを剥がし、直径 5mm の金属製穴あけパンチで切り出し、直径 5mm、厚さ 1mm の EVA シートを試験体とした。試験体はエチレンオキシドガスで滅菌した。

#### 2) 細菌株および培養条件

*S. mutans* NCTC10449、*S. oralis* ATCC9811、*S. 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%N<sub>2</sub>、10%H<sub>2</sub>、10%CO<sub>2</sub>)、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%ショ糖を含む BHI 液体培地に浸漬し、培地中の 3 種類の細菌を接種し、24 時間培養してバイオフィルムを形成させた。バイオフィルムを形成した 24 枚の EVA シートを、高さ 14cm、250mL 入りのビーカー 4 個 6 枚ずつに均等に移した。各ビーカー内の EVA シート 6 枚を 40° C の滅菌蒸留水 150mL (CTRL) 群、超音波洗浄 (UW) 群、タブレット型マウスガード洗浄剤 (MC) 群、250ppm 次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) 群の 4 群で処理した。CTRL 群は、滅菌蒸留水に 10 分間浸漬した。UW 群は、EVA シートを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、27kHz で 10 分間処理した。MC 群では、EVA ディスクを洗浄剤とともに 40° C の滅菌蒸留水に 10 分間浸漬して、消毒した。ポジティブコントロールとして NaClO 群では、250ppm NaClO 150mL に 40° C で 10 分間浸漬して消毒した。なお、水温はスポーツマウスガード用洗浄剤のプロトコールに従い、全ての群において 40° C に統一した。本研究において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。塩化セチルピリジニウムは洗浄剤として広く用いられており、生体への為害作用も少ないことが報告されている。滅菌蒸留水で洗浄後、1mL の Phosphate-Buffered Saline (PBS) を含む 15mL 試験管内で 20 秒間ボルテックスした。その後、試験管内のディスクを超音波洗浄器で 10 分間処理し、ディスクに付着している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%N<sub>2</sub>、10%H<sub>2</sub>、10%CO<sub>2</sub>) にて 24 時間培養し、最後に生菌数を計数した。菌懸濁液の連続希釈液を寒天プレートにまき、培養後の CFU を計数した。

#### 4) 走査型電子顕微鏡による観察

4 群各 1 枚のディスクを滅菌蒸留水で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドと 2%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液に 24 時間浸漬して細菌を固定した。その後、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の濃度のエタノールで順次脱水した。その後、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) 被験者と条件

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作製と装着プロトコール

アルジネート印象材を用いた既成トレーで歯列の印象を採得し、石膏模型を作製した。その上に厚さ 3mm の EVA シートを加熱し、加圧形成機で圧着した。1 日 2 時間、4 日間スポーツマウスガードを装着した。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するよう指導した。

3) 実験用スポーツマウスガードの洗浄効果の検討 使用したスポーツマウスガードの洗浄効果は、アデノシン三リン酸 (ATP)、アデノシン一リン酸 (AMP) を拭き取り、清潔の度合い (清浄度) を評価する検査キット (ルシパックペン、キッコーマンバイオケミファ、東京、日本) と従来の細菌数 (CFU/mL) による 2 つの方法で評価した。詳細には、実験用スポーツマウスガードを中央から 2 つのパーツに分割した。2 つのパーツはそれぞれ異なる方法で処理された。右側は流水のみによる洗浄 (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。このように、本研究では同一の口腔内で左右側 (右側を CTRL と左側を MC) を比較するスプリットマウスデザインを用いた。

### 4) 清浄度の評価

清浄度の評価は、CTRL 群と MC 群の測定部位をそれぞれ右側小臼歯とその反対側とした。その後、EVA 表面を検査キット付属の滅菌綿棒で拭き、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、東京、日本) で測定した。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。

### 5) 微生物数の評価

微生物数の評価は、各検体を滅菌蒸留水で洗浄した後、30mL の PBS 中で 10 分間超音波洗浄し、20 秒間ボルテックスして検体に付着している微生物を遊離させた。得られた菌懸濁液を、総菌数は BHI 寒天培地 (嫌気条件下)、レンサ球菌は Mitis-Salivarius 寒天培地 (嫌気条件下)、Candida

は Sabouraud 寒天培地(好気条件下)で接種・培養し、最後に CFU を算出した。

### 3. 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-WhitneyUtest にて分析を行った。IBMPSSstatisticsversion26.0 を用いて行い、結果は P 値が $<0.05$  のとき統計的に有意であるとした。

## III. 結果

### 1. *in vitro*による研究

1) EVA シート上のバイオフィルムに対する洗浄効果はじめに、EVA シート上の *S. mutans*, *S. oralis*, および *S. aureus* のバイオフィルム細菌に対する洗浄効果を検討した。NaClO 処理では、すべての菌において検出限界以下であった(CFU/mL)。 *S. oralis* は UW 処理と CTRL を比較すると UW 処理において有意に CFU が減少した。MC 処理と NaClO 処理では、*S. oralis*, *S. mutans*, および *S. aureus* の菌数は CTRL と比較して、有意に減少した。

### 2) 走査型電子顕微鏡による観察

口腔内細菌バイオフィルムの EVA シートへの洗浄効果を SEM で観察した。CTRL では、すべての菌種でバイオフィルムの形成が認められた。 *S. oralis* はまばらなバイオフィルムの形成であったが、*S. mutans* および *S. aureus* では高密度のバイオフィルムを形成し、EVA 表面に認められる溝にも菌体が確認された。EVA 上のバイオフィルムは、UW、MC、および NaClO の処理で、すべての菌が減少傾向を示した。 *S. oralis* は EVA シートおよび NaClO 条件で完全に消失したように見えたが、*S. mutans* と *S. aureus* は EVA シート上にわずかに残存し、NaClO 条件下では完全に消失した。3つのバイオフィルム形成菌の減少率は、NaClO、MC、UW の順に多かった。

### 2. *in vivo*による研究

#### 1) 清浄度の評価

各個人の MC 群の結果は、CTRL 群と比較して、10 名中 9 名で ATP+AMP 値が減少した。一方で、被験者 D から得られたスポーツマウスガードは、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程度を見ると、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) 微生物数の評価

MC 処理の有無に関わらず、全ての被験者から総細菌数およびレンサ球菌数が約  $1 \times 10^4$  CFU/mL 検出され、10 名中 7 名から *Candida* が検出された。各個人に対する MC 処理の結果は、総菌数、レンサ球菌数、*Candida* 数の微生物数において、全ての被験者で有意に減少した。ただし、被験者 D、E、および H については、MC 処理後に  $10^3$  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、および *Candida* 数の減少程度は、CTRL 群に比べ有意に減少した。

## IV. 考察

*in vitro*において、EVA シート上に形成された口腔内細菌のバイオフィルムに対するマウスガードクリーナーの洗浄効果を、CFU および SEM 分析を用いて検討した。その結果、MC の洗浄効果は UW よりも大きいことが明らかとなった。また、口腔内での使用を想定した実験用マウスガードにおいて、MC 処理はレンサ球菌や *Candida* などの口腔内微生物叢の洗浄に十分な効果を発揮した。これらの結果から、口腔内の微生物が付着した EVA 製スポーツマウスガードの洗浄には、流水や UW による洗浄では不十分であり、MC による洗浄の実施の必要性が示唆された。NaClO は、様々な濃度で義歯の洗浄・消毒剤として広く普及している。また、幅広い抗菌スペクトルを有することも特徴である。しかし、濃度や浸漬時間が異なると、材料の物理的・機械的特性が低下したり、感受性の高い人にアレルギー反応を引き起こす可能性があることが報告されている。低濃度と短い浸漬期間の組み合わせがなく、微生物のバイオフィルムを減らせることを評価する臨床研究が必要である。また、今回用いた洗浄剤は、殺菌作用が良好で、生体材料やアレルギー反応への影響が無視できるため、有望なマウスガード洗浄剤であると考えている。*in vivo*において、使用した実験用マウスガードに対する MC の洗浄効果を、コロニー数の測定と清浄度の 2つの方法で評価した。コロニー数および清浄度ともに被験者によって多少の差はあるものの、どちらの方法においても MC 群では CTRL 群に比べ有意に減少率が低かった。コロニー数と清浄度の 2つの

測定法ともに有意差が得られた。コロニー数による評価は時間や手間がかかる煩雑な方法である。しかしながら清浄度の評価は簡便かつ迅速な方法である。したがって、アスリートのスポーツマウスガード清潔の程度の評価は、清浄度の測定方法で十分であることが示唆された。実験用スポーツマウスガードのコロニー数の評価では、CTRL 群で *Candida* が検出された 7 名のうち、被験者 D、E、および H では MC 処理後も  $10^3 \sim 10^4$  CFU/mL の *Candida* が残存した。この高い *Candida* 残存率は、これらの被験者の清潔度に影響していると考えられる。*Candida* は、義歯装着患者において日和見感染症や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。スポーツ選手の口腔内で *Candida* が検出された場合、より強力な殺菌剤など他の薬剤を選択する必要性がある。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。*S. mutans* がスクロース含有培地で培養すると不溶性のグルカンを分泌して強固なバイオフィルムを形成することはよく知られており、我々はこの現象が *S. aureus* FDA209P でも起こることを報告した。スクロースを添加し、EVA シート上に強固なバイオフィルムを形成させた場合、CTRL では *S. mutans* と *S. aureus* がそれぞれ  $10^5$ 、 $10^6$  CFU/mL 以上検出された。また、CTRL 群、MC 群、および UW 群のコロニー数に有意差を認めた。UW 群では約  $10^4 \sim 10^5$  個、MC 群では約  $10^3 \sim 10^4$  個の CFU/mL が残存し、EVA シートの洗浄効果が不十分であることが示唆された。しかし、未処理の実験用マウスガードでは、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 処理で十分であることが示唆された。義歯においてはメンテナンスを長期間行わない場合、高濃度の汚染につながることを報告されている。さらに、Ribeiro らは、週 3 回、1 日 1 時間、15 日間使用したマウスガードの汚染度を評価した。その結果、スポーツマウスガードは使用後に汚染されており、グルコン酸クロルヘキシジン (0.12%) のスプレーで効果的に汚染を低減できると報告している。スポーツマウスガードと同様の装置である歯科矯正用スプリントについては、装置に付着する *S. mutans*、*S. aureus*、および *Candida* などの口腔内細菌に対して、多くの種類の市販消毒剤が有効であることが明らかにされている。近年では、抗菌性を有する歯科用のコーティング剤としてグラフィンが注目されている。これらの材料の検討は、今後の研究課題とする。

#### V. 結論

本研究では、スポーツマウスガードの洗浄方法の違いによる洗浄効果について検討した。その結果、MC による清掃は UW による清掃よりも効果的であることが示唆された。このことから、MC のような簡単で経済的な方法は、アスリートの口腔衛生を促進するのに適していると考えられる。また、本研究では装着期間が短かったため、今後は、より長い期間スポーツマウスガードを装着し、実際のアスリートでの使用を想定した実験が必要である。