

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463009

研究課題名(和文)カンジダ抑制作用を有するTea tree oilの義歯用歯磨剤への応用と開発

研究課題名(英文)Development of new denture dentifrice with Tea tree oil

研究代表者

山下 利佳 (YAMASHITA, Rika)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：50336179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Candida albicansに対して抗菌効果を有する植物精油の義歯用歯磨剤への応用について検討した。ティートゥリーオイル(TO)とレモングラス(LE)を使用し、床用レジンに付着したバイオフィルムに対する除去効果について調べた結果、1.0%TO、0.5%LEおよび1.0%LEの義歯清掃への利用は、C. albicans バイオフィルムの除去に有効であることが示唆された。また、これらの精油溶液を用いて磨耗試験を行った結果、水のみでのブラッシングよりも、精油を使用した方が表面粗さは小さかった。以上より、精油は義歯清掃に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Essential oils are known for their antifungal activities and efficacy in the treatment of oral candidiasis. This study evaluated whether the essential oils could be used to denture cleaning. Tea tree oil (1.0%) and lemon grass (0.5%, 1.0%) produced significantly higher results than water in the effect of removing biofilms adhering to denture base resin. The surface roughness of specimens after brushing with these essential oils was significantly lower than that of those after brushing with water. It was suggested that these essential oils would be desirable and useful to use for denture cleaning.

研究分野：医歯薬学，歯学，補綴・理工系歯学，有床義歯補綴学

キーワード：精油 Candida albicans ティートゥリーオイル レモングラス 磨耗試験

1. 研究開始当初の背景

義歯に付着した汚れ、いわゆるデンチャープラークの中には、カンジダアルピカンスなどの微生物が含まれている。カンジダは義歯性口内炎、誤嚥性肺炎および義歯材料の劣化などの原因と成り得る。義歯の洗浄には、義歯ブラシによるブラッシング、義歯洗浄剤への浸漬、超音波洗浄などがあるが、義歯に付着した汚れはこれらの清掃法を併用しても落ちないことも多い。また不適切なブラッシングにより生じる義歯表面の傷は、細菌の温床と成り得る。

一方、植物精油は、*Candida albicans* 等の微生物に対して、抗菌効果を示すことが多く報告されており¹⁾、中でもティートゥリーオイルとレモングラスには高い抗菌効果があることが報告されている。また、オイル成分を含有した義歯用歯磨剤では傷がつきにくいことが、我々の過去の研究で示唆されている。よって、植物精油を義歯洗浄剤に応用すれば、抗菌作用を持ち、かつ義歯表面に傷をつけにくい義歯用歯磨剤を開発できると考えられる。

2. 研究の目的

(1)植物精油の*C.albicans* に対する抑制効果の報告は多いが、レジン表面に付着した*C.albicans* に対する抑制効果についての報告は少ない。そこで、植物精油の抗菌効果と床用レジンに付着したバイオフィルムに対する除去効果について検討する。

(2)植物精油を用いて床用レジンの摩耗試験を行い、精油を義歯用歯磨剤に使用した場合に、義歯材料に影響を及ぼさないかについて検討する。

3. 研究の方法

(1)精油の*C.albicans* に対する最小発育濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) の測定

被験微生物には *C.albicans* (ATCC18804) $1.0 \times 10^{6-7}$ cells/ml を使用した。植物精油にはティートゥリーオイル (TO), レモングラス東インド型 (LE), レモングラス西インド型 (LW) (いずれも生活の木) を使用し、溶媒 (DMSO) と 1 : 1 になるように調整した (精油濃度 50%)。TSB 培地 (Tryptic Soy Broth, Bacto, Difco Laboratories) に精油溶液を加え、NCCLS 法に準拠して倍々希釈を行い、精油濃度は 1%~0.03125% の 6 段階とした。各濃度溶液に前培養した菌液を入れ、37 の好気条件下で 2 日間培養後、液体培地を目視で確認し、溶液が濁っている濃度より 1 つ高い濃度を MIC とした (n=16)。MBC はコロニー形成法で測定した。MIC (n=16) とさらに 1 つ高い濃度 (n=16) をサブロー寒天培地に塗布し、37 の好気条件下で 2 日間培養後、

コロニーの発育が認められなかった濃度を MBC とした。

(2)植物精油による *C.albicans* バイオフィルムの除去効果の判定

(1)の結果、LE と LW の MIC および MBC は同じであったため、本実験には TO と LE を使用した。(1)で得られた結果に基づき、TO: 1.0%, 0.5%, LE: 1.0%, 0.5%, 0.25%, 0.125% を使用した。義歯床用レジンには、加熱重合型レジン (アクロン, ジーシー) を用い、メーカー指示に従い重合後、直径 6 mm 厚さ 1.5 mm、重さ 0.24 g の試料片を製作し、試料表面はシリコンポイント (ビッグシリコンポイント HP R2, 松風) で研磨した (n=150)。前培養として、Yeast Nitrogen Base (YNB) broth + 50mM glucose 培地に、サブロー寒天培地から 1 コロニーの *C.albicans* を加え、37 で一晚震盪培養した。集菌後、PBS 5ml で 2 回洗浄し、YNB broth + 100mM glucose で、最終菌液濃度が 1.0×10^7 cells/ml となるように調整した。*C.albicans* バイオフィルムの形成は、Wander ら²⁾の方法に準じて行った。24 well plates の各 well に試料片と前培養液 1.0ml を加え、好気条件下で 90 分震盪培養した (37, 75rpm)。各 well を吸引し、PBS 1.0ml で 2 回洗浄後、YNB broth + 100mM glucose 2.0ml 加え、好気条件下で、24 時間おきに培地交換しながら 3 日間震盪培養し (37, 75rpm)、バイオフィルムを形成させた。その後、試料片を取り出し、蒸留水および各精油溶液に、それぞれ 1 分、3 分、5 分間、計 15 群に分けて浸漬した。浸漬後、試料片を新しいプレートへ移し、各 well に REDOX Indicator (Alamar blue®, Trek Diagnostic Systems) 添加 RPMI 1640 培地を 2.0ml 注入し、24 時間培養した。培養中 6 時間おきに、培地の上澄みを採取して、吸光度を測定した (Multiskan™ FC, Thermo SCIENTIFIC)。これを 10 回行った。除去効果の判定は、測定時間における各群のアラマーブルー値について、一元配置分散分析と Tukey 法による多重比較により行った (p < 0.05)。

(3)植物精油が義歯床用レジンに及ぼす影響についての検討

試料片には、(1)と同様、加熱重合型レジン (アクロン, ジーシー) を使用し、メーカー指定の粉液比にて、片面 (被験面) をガラス練板に接触させた鏡面をもつ 25 × 15 × 2 mm の形態に仕上げた後 (n=20)、超深度形状測定顕微鏡 (VK-8550, KEYENCE) で、1 試料につき 5 領域の表面粗さを測定した。義歯用ブラシ (エラック義歯ブラシらくらくスタイルライオン) と (2) で除去効果が得られた濃度の精油 (1.0% TO, 1.0% LE, 0.5% LE), およ

びコントロールとしての水を用いて、荷重 200 g、速度 2 往復 / 秒、動作幅 20 mm、摩耗回数 10,000 ストロークで、各精油濃度につき 5 試料の磨耗試験を行った（ラビングテスター IMC-151B 型、井元製作所）。試験後、試験前と同様に 1 試料につき 5 領域の表面粗さ測定を行い、表面性状をデジタルマイクロスコープ（VHX-5000、KEYENCE）で観察した。統計には、一元配置分散分析と Tukey 法による多重比較を用いた（ $p < 0.05$ ）。

4. 研究成果

(1) 精油の *C. albicans* に対する最小発育濃度（MIC）と最小殺菌濃度（MBC）の測定

TO, LE および LW の MIC と MBC の結果を表 1 に示す。ティートゥリーオイル（TO）よりもレモングラス（LE, LW）の方が、MIC, MBC とともに低く、*C. albicans* に対し低濃度での抗菌効果が認められた。また、LE と LW では同様の結果が得られたため、以降の実験には、TO と LE を使用することとした。

表 1. *C. albicans* に対する最小発育濃度と最小殺菌濃度

精油濃度 (%)	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
TO	MIC		16			
	MBC	11	5			
LE	MIC		7	6	3	
	MBC		9	7		
LW	MIC		6	6	4	
	MBC		8	8		

(2) 植物精油による *C. albicans* バイオフィルムの除去効果の判定

ティートゥリーオイルによる *C. albicans* バイオフィルムの除去効果の結果を図 1 に示す。TO濃度が高く、浸漬時間が長いほど、残存菌数は少ない傾向を示した。6時間培養後では、1.0%TOに 5 分間浸漬した群のみ、コントロールより有意に残存菌数が少なかった。12時間培養後では、1.0%TOに 3 分間と 5 分間浸漬した群で、コントロールより有意に残存菌数が少なかった。18時間、および 24時間培養後では、いずれの TO濃度、浸漬時間においても、残存菌数に有意差は認められなかった。

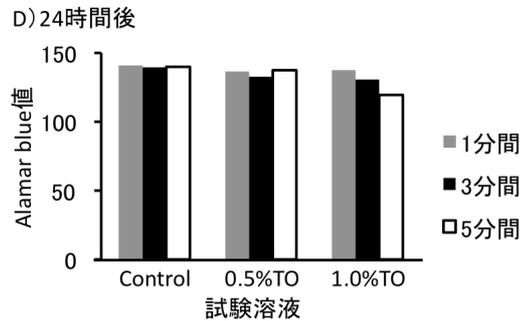
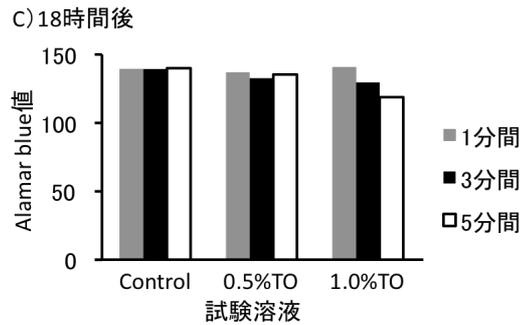
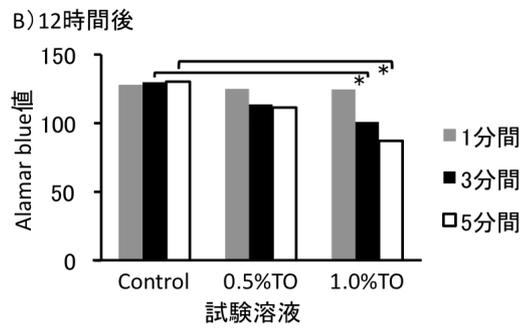
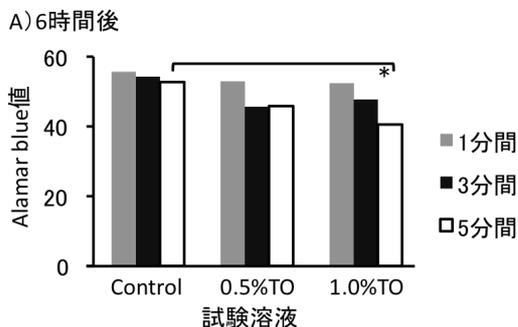
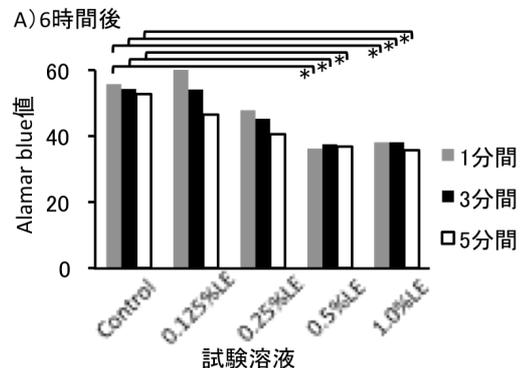


図 1. TOによるバイオフィルム除去効果

レモングラスによる *C. albicans* バイオフィルムの除去効果の結果を図 2 に示す。TOと同様に、LE濃度が高く、浸漬時間が長いほど、残存菌数は少ない傾向を示した。6時間および 12時間培養後では、0.5%LEと 1.0%LEに浸漬した群は、いずれの浸漬時間においても、コントロールより有意に残存菌数が少なかった。0.5%LEに 5 分間、1.0%LEに 3 分間または 5 分間浸漬した群では、18時間および 24時間培養後でも、有意に残存菌数が少なかった。



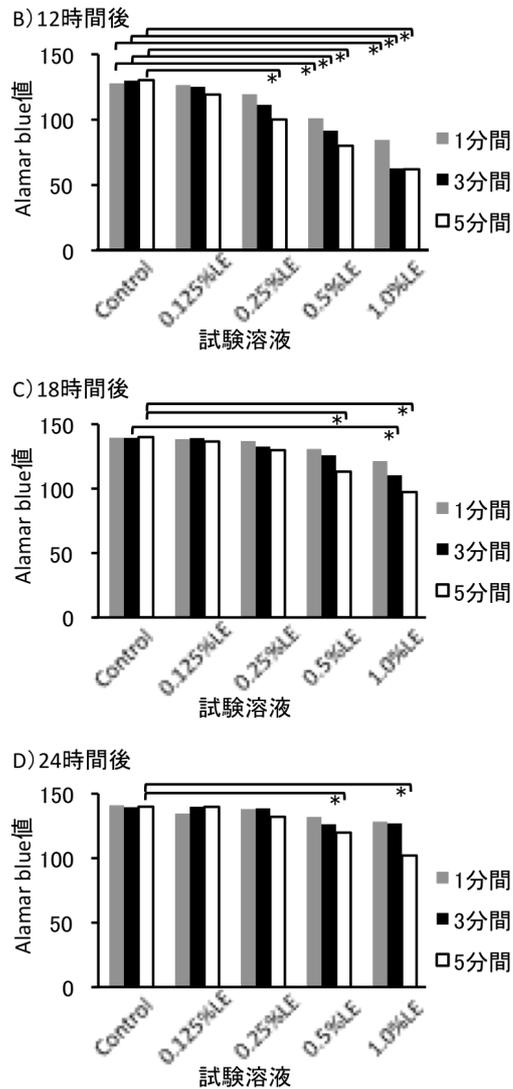


図2. LEによるバイオフィルム除去効果

通常、義歯は食後や就寝前に清掃される場合が多いことから、6時間後と12時間後に残存菌数が有意に少なかった1.0%TO, 0.5%LEおよび1.0%LEの義歯清掃への利用は、*C. albicans* バイオフィルムの除去に有効であることが示唆された。

(3) 植物精油が義歯床用レジンに及ぼす影響についての検討

1.0%TO, 0.5%LE, および1.0%LEで摩耗試験を行った後のデジタルマイクロスコープ像を図3に示す。コントロール（水）よりも精油を使用した場合の方が、摩耗痕が少ない傾向にあった。

摩耗試験前後で表面粗さを比較した結果（図4）、摩耗試験後は表面粗さが大きくなる傾向を示したが、1.0%TOでは摩耗試験前後で有意差がなかった。0.5%LEと1.0%LEでは試験後に表面粗さが有意に大きくなったが、最も値が大きかったコントロール（水）では、こ

れら2つよりもさらに有為に高い値を示した。

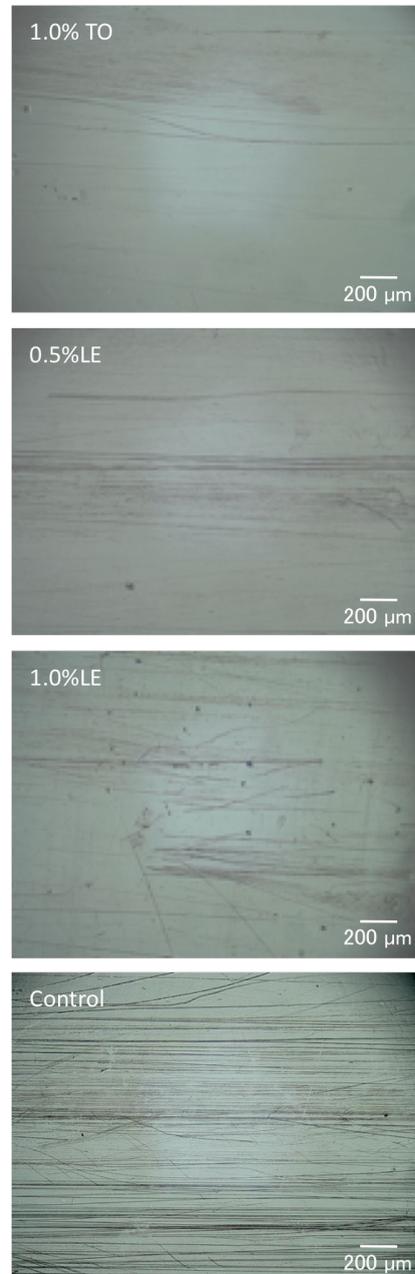


図3. 摩耗試験後のデジタルマイクロスコープ画像

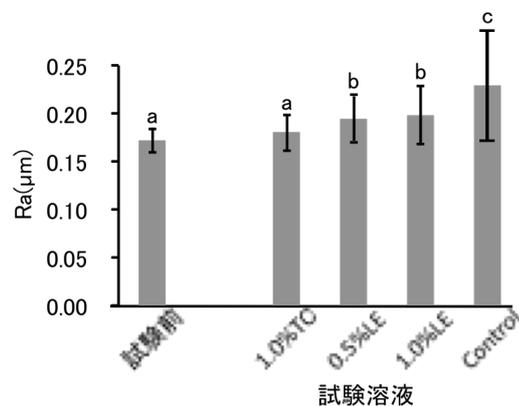


図4. 摩耗試験前後の表面粗さ

(4)以上より, 1.0%TO, 0.5%LEおよび1.0%LEの義歯清掃への使用は, *C. albicans* バイオフィルムの除去に有効であり, かつ, 水のみでのブラッシングよりも, 義歯表面に傷を付けにくいことが示唆された。

<引用文献>

植物精油の口腔微生物に対する抗菌性およびバイオフィルム形成抑制効果の検討. 角田衣理加ら. 歯科薬物療法 28(1), 1-10, 2009-04-01

Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. da Silva WJ *et al*, J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Jul;94(1):149-56.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

小関優作, 田中利佳, 村田比呂司, 植物精油による*C. albicans*の除去効果とレジン表面への影響, 補綴若手研究会, 2016.2.27, KKR 鎌倉わかみや(神奈川県・鎌倉市)

小関優作, 田中利佳, 佐藤 薪, 大島朋子, 前田伸子, 村田比呂司, 植物精油のレジンに付着した*Candida albicans*への影響について, 第8回日本義歯ケア学会学術大会, 2016.1.24, 東北大学大学院歯学研究科(宮城県・仙台市)

小関優作, 田中利佳, 佐藤 薪, 大島朋子, 前田伸子, 浪越建男, 村田比呂司, レジンに付着した*Candida albicans*に対する植物精油の除去効果について, 日本補綴歯科学会九州支部学術大会, 2015.8.22, 九州歯科大学講堂(福岡県・北九州市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 利佳 (YAMASHITA, Rika)
長崎大学・病院(歯学系)・助教
研究者番号: 50336179

(2)研究分担者

黒木 唯文 (KUROGI, Tadafumi)
長崎大学・病院(歯学系)・助教
研究者番号: 70404225

江越 貴文 (EGOSHI, Takafumi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教
研究者番号: 70706150

(3)研究協力者

小関 優作 (KOSEKI, Yusaku)