

## アクリルレジンに付着した *Candida albicans* に対するオゾン水の殺菌効果

研究協力者 有田 正博 九州歯科大学歯科補綴学第1講座講師  
 分担研究者 西原 達次 九州歯科大学口腔微生物学講座教授

### 研究要旨

アクリルレジンに付着した *Candida albicans* に対するオゾン水の殺菌効果を検討した。その結果、オゾン水の殺菌力を効果的に発揮させるための義歯洗浄方法が明らかとなった。

現在これらの結果に基づいたオゾン水による義歯洗浄器を考案中である。

### A. 研究目的

高齢者の多くは、口腔内細菌が容易に繁殖・定着しやすい義歯の使用者であり、不衛生な義歯の装着は、口臭や義歯性口内炎ならびに口角炎などを誘発する。さらに、誤嚥性肺炎や日和見感染を引き起こす危険性も指摘されている。また、口腔乾燥を訴える義歯使用者では、唾液による自浄性や抗菌性の低下により、*Candida* 菌の検出率が高くなり、口腔カンジダ症を発症する危険性が高くなる。このようなことから、全身の抵抗性が低下した高齢者においては、口腔ケアに加え、適切な義歯洗浄を行うことが大切である。また、日常生活動作能力 (ADL) が低下している要介護高齢者や手足の不自由な高齢者に対しては、各種施設や病院において、医療従事者や介護者が主体となった義歯の洗浄を行う必要があり、そのためには、より簡便で、できるだけ短時間に確実な除菌ができる義歯の洗浄方法を確立する必要があると考えられる。

オゾン水の強力かつ幅広い抗菌性については、すでに多くの論文で報告され、義歯洗浄への応用が期待されている。我々も口腔内細菌に対するオゾン水の殺菌効果について検討し、デンチャープラークで問題となる *Candida albicans* に対してもオゾン水が強い殺菌効果を有することを明らかにした。そこで、義歯床に付着した菌、特に付着性・病原性の高いとされる *C. albicans* に対して、どのような方法でオゾン水を作用させると最もその殺菌効果が発揮できるかを検討した。

### B. 研究方法

被験菌株として *Candida albicans* ATCC18804 を用いた。培地には1%グルコースを含む液体培地 (YM Broth, Difco Lab) を用い、37℃、24時間培養して200 mlの実験用菌液を調製した。

実験用レジンプレート (15×15×30 mm) は、加熱重合型アクリルレジン (アクロン、ジーシー) を用いて作製し、全面を #180の耐水研磨紙で研磨した。2日以上水中に浸漬したのち、超音波洗浄・乾燥後、ホルマリンガスで滅菌した。今回の実験では、予備実験に繰り返し使用し、製作後6か月以上経過したプレートを、同様の方法で実験直前に再滅菌して使用した。

独自に作製した網トレー上にレジンプレートを重ならないように置き、懸濁した実験用菌液200 ml中に静かに浸漬し、37℃、2時間培養して、*C. albicans* をレジンプレートに付着させた。付着させた後のプレートは、余剰菌液のみを取ったプレート (未洗浄レジンプレート)、滅菌生食水で3回 (各1分間) 洗浄したもの (洗浄レジンプレート) に分けて、実験に使用した。

オゾン水の生成には、オゾン水生成器 (ネオ・オゾンウォータS、シルバー精工) を使用した。オゾン水の生成は実験直前に行い、使用するオゾン濃度は、0 mg/L、0.5 mg/L、2.0 mg/L、4.0 mg/Lとし、濃度測定にはシルバー精工社製ポータブルオゾン濃度計 OM-101P-20を用いた。

オゾン水による洗浄方法は、各濃度における1分間の単純浸漬、4.0 mg/L 濃度のオゾン水への 5、10、30、60分の単純浸漬、各濃度における1分間のオゾン流水による洗浄、および市販義菌用超音波洗浄器（超音波洗浄器 SW7800、周波数 40 kHz、シチズン）を用いた各濃度のオゾン水での超音波洗浄とした。各洗浄条件で、レジンプレートは3枚使用し、オゾン流水以外は、150mLで洗浄を行った。

各条件で洗浄を行った各々のプレートは滅菌生食水で1回洗浄した後、滅菌生食水（3ml~10ml）を入れた遠心チューブに入れ、超音波洗浄器（ウルトラソニッククリーナー爆洗 SUS-110、松風）を用い、周波数 24 kHz で1分間超音波洗浄を行い、プレート上に残存した全菌を除去した。各懸濁液は滅菌生食水で適正希釈率に希釈後、寒天培地（YM Agar、Difco Lab）に塗抹して、37℃で24時間培養し、コロニー数をカウントして残存菌数を算出した（CFU/plate）。

さらに、0 mg/L のオゾン水への単純浸漬、4.0 mg/L のオゾン水への単純浸漬、4.0 mg/L のオゾン流水での洗浄、4.0 mg/L のオゾン水での超音波洗浄した各々のレジンプレート表面を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した。

### C. 研究結果

図1に、未洗浄レジンプレートおよび洗浄レジンプレートに付着した *C. albicans* に対する各濃度オゾン水への1分間単純浸漬の殺菌効果を示す。未洗浄のレジンプレートに付着した *C. albicans* に対しては、いずれの濃度のオゾン水においても、0 mg/L 濃度のコントロールと比較して有意な殺菌効果は認められなかった。一方、洗浄レジンプレートの場合、0.5 mg/L および 2.0 mg/L 濃度のオゾン水では有意な殺菌効果は認められなかったが、濃度 4 mg/L 濃度のオゾン水においては有意な殺菌効果が認められた。

図2に、洗浄レジンプレートに付着した *C. albicans* に対する 4 mg/L 濃度のオゾン水の殺菌効果について、浸漬時間の影響を示す。時間依存的にオゾン水の殺菌効果が向上することが認められた。

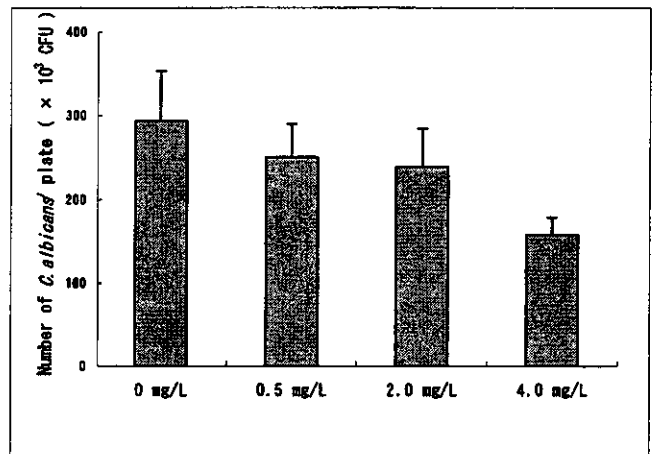
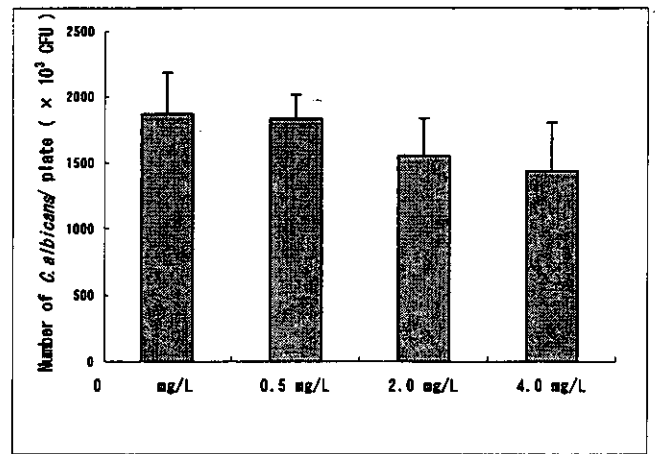


図1. 未洗浄レジンプレート（上段）および洗浄レジンプレート（下段）に付着した *C. albicans* に対する各濃度オゾン水への1分間単純浸漬による殺菌効果

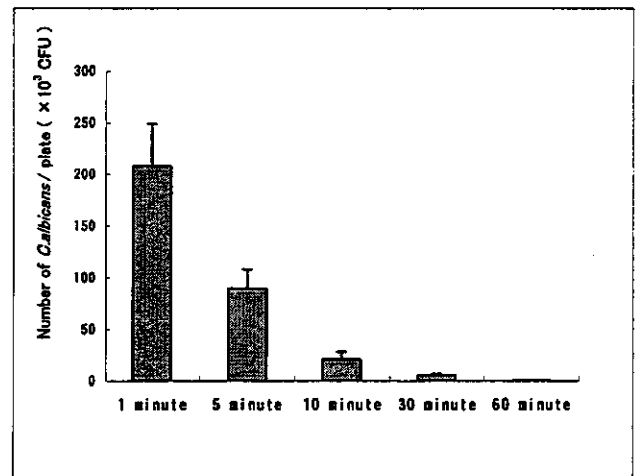


図2. 洗浄レジンプレートに付着した *C. albicans* に対する浸漬時間の違いによるオゾン水の殺菌効果

特に 60 分間の浸漬では、*C. albicans* の残存はほとんど認められなかった。

図 3 に、洗浄レジンプレートに付着した *C. albicans* に対する各濃度オゾン流水による 1 分間の殺菌効果を示す。0 mg/L のコントロールと比較して、いずれの濃度のオゾン流水においても有意な殺菌効果が認められた。特に、2.0 mg/L および 4.0 mg/L のオゾン流水の殺菌効果は極めて高く、両濃度における殺菌効果に有意な差は認められなかった。

図 4 に、未洗浄レジンプレートおよび洗浄レジンプレートに付着した *C. albicans* に対する各濃度オゾン水による超音波洗浄による殺菌効果を示す。超音波洗浄を併用した場合には、未洗浄のレジンプレートおよび洗浄レジンプレートのいずれにおいても、濃度 2.0 mg/L と 4.0 mg/L のオゾン水において、付着した *C. albicans* に対する有意な殺菌効果を示した。洗浄レジンプレートの場合においては、いずれの濃度のオゾン水による超音波洗浄においても、その殺菌効果が増強される傾向が認められた。

図 5~8 に、コントロール (0 mg/L) および 4.0 mg/L のオゾン水の作用方法を変化させて洗浄した後のレジンプレート表面の SEM 像を示す。

濃度 0 mg/L および濃度 4 mg/L のオゾン水に単純浸漬したレジンプレートには、表面の裂状痕に多数の *C. albicans* が観察された。一方、4 mg/L 濃度のオゾン流水で洗浄したレジンプレート上には、ほとんど *C. albicans* は認められなかった。また、4 mg/L 濃度のオゾン水で超音波洗浄したレジンプレートにおいても、オゾン流水での洗浄結果と同じように *C. albicans* の残存数は少なく、一部のプレートには、図 9 のようなひも状に変形した *C. albicans* が観察された。

#### D. 考察

義歯上に種々の細菌が付着し、それら菌の共凝集およびグリコカリックスといわれるような多糖類の産生により、バイオフィルムとしてのデンチャープラークが形成される。これらのデンチャープラークは義歯表面のぬめりとして観察され、水洗や機械

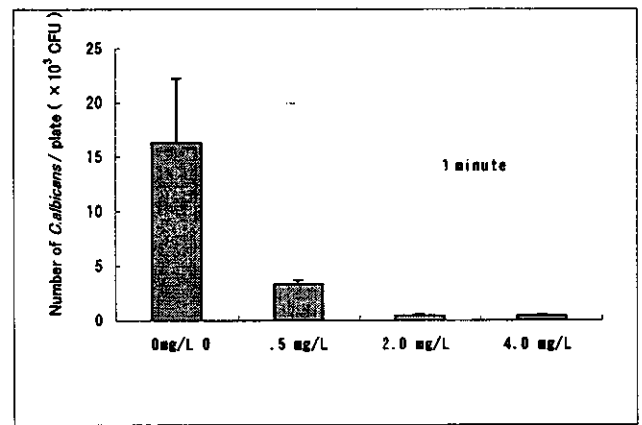


図 3. 洗浄レジンプレートに付着した *C. albicans* に対する 1 分間オゾン流水による殺菌効果

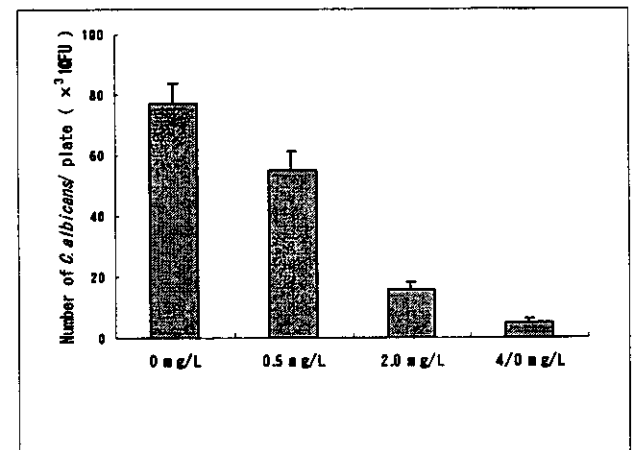
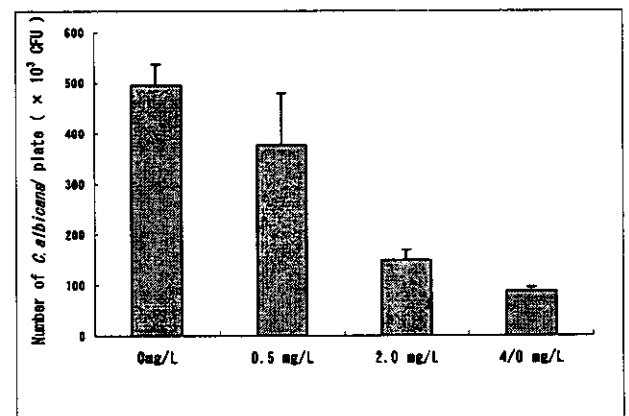


図 4. 未洗浄レジンプレート (上段) および洗浄レジンプレート (下段) に付着した *C. albicans* に対する 1 分間超音波洗浄によるオゾン水の殺菌効果

的洗浄では十分に除去はできないことが報告されている。そのような理由から、デンチャープラークを除去するためには、機械的および化学的洗浄方法の併用が推奨されているが、義歯洗浄剤の連日の使用はコスト的にも問題があり、義歯洗浄剤を溶かした水溶液の幼児や高齢者による誤嚥の危険性、さらに義歯床や金属部分への影響も報告されている。また、高齢者の要介護施設や老人ホームでは、医療従事者や介護者による義歯洗浄の必要性があり、より簡便で、できるだけ短時間の義歯洗浄方法の開発が期待されている。

また、高齢者の多くはいくつかの全身疾患を有しており、多くの薬剤を常用している高齢者も少なくない。一般に口腔乾燥症が有病高齢者に多く認められることから、常用薬剤の副作用が原因の一つであると考えられている。唾液流出量の低下や唾液成分の変化に伴って、口腔内常在菌で、カンジダ症の起因菌である *C. albicans* や薬剤耐性菌の検出率が高くなることが報告されている。口腔乾燥を訴える高齢者の多くが義歯装着患者であることから、口腔ケアとともに義歯の適切な洗浄を行うことが免疫力の低下した高齢者の健康を維持するためには必要と考えられる。

オゾン水の殺菌効果については、多くの報告がなされ、口腔内の常在菌である *Streptococcus mutans*、*Streptococcus sanguis*、*Streptococcus salivarius*、*C. albicans*、*Porphyromonas gingivalis* などの菌に対して、オゾン水を直接作用させた場合、我々が使用しているオゾン生成器で生成したオゾン水では、溶存オゾン濃度4.0mg/Lで10秒という極めて短時間のうちにほとんどの細菌を死滅できることを明らかにした。最近では、MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) に対する殺菌効果も報告されている。

そこで、アクリルレジンプレートに付着させた *C. albicans* に対して、どのような方法でオゾン水を作用させると最もその殺菌効果が発揮できるかを検討した。

*C. albicans* を付着させたレジンプレートにオゾン水を作用させる場合、付着菌数や不純物の存在な

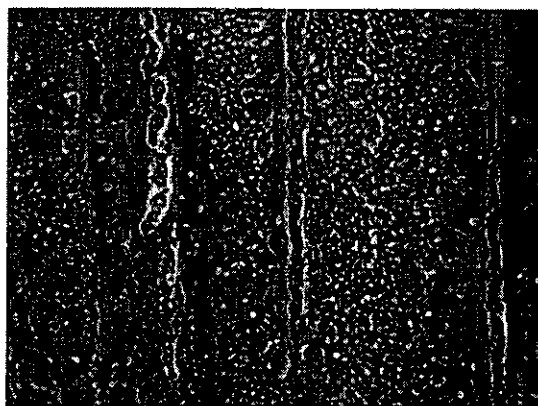


図5. 0mg/L オゾン水への単純浸漬 (1分)

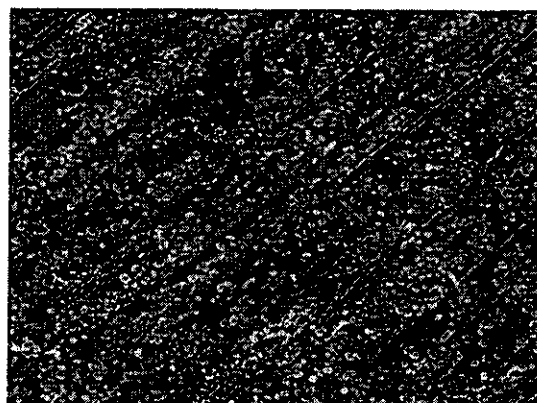


図6. 4 mg/L オゾン水への単純浸漬 (1分)

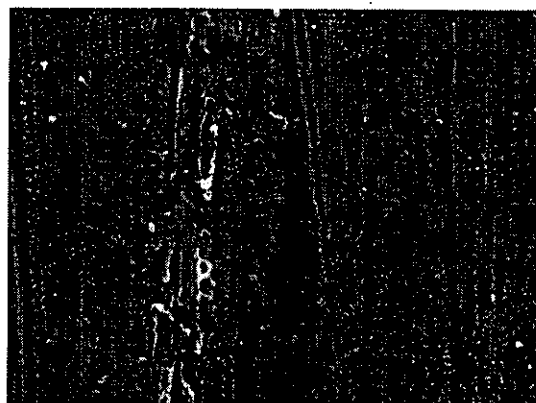


図7. 4 mg/L オゾン流水での洗浄 (1分)

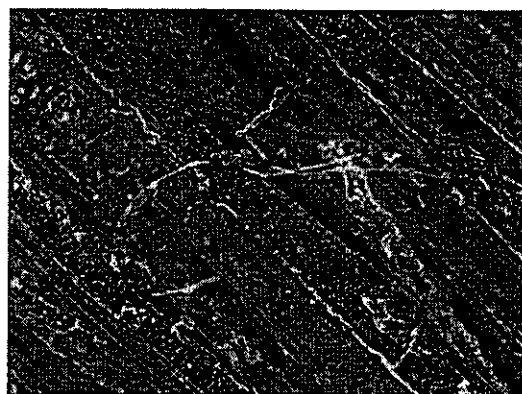


図8. 4 mg/L オゾン水での超音波洗浄 (1分)

ど付着状態によって、オゾン水の殺菌効果に有意な差がでることがわかった。すなわち、*C. albicans*を付着させたレジンプレートを洗浄せずにオゾン水を作用させた場合、溶存オゾン濃度が4 mg/Lであっても殺菌効果はほとんど認められず、オゾン水作用前のレジンプレートを洗浄することで、付着菌以外の成分の除去や付着菌数の低下により、オゾン水の殺菌効果が向上することがわかった。

患者が使用している義歯には多くの有機物が付着していたり、様々な口腔常在菌がデンチャープラークとして共生しているため、義歯の汚れの程度によっては、オゾン水の殺菌効果が全く発揮されない可能性が高くなると考えられる。本研究の結果から、作用前に義歯をよく洗浄することが確実な殺菌効果を発揮させるために必要であることが示唆された。

短時間単純浸漬、長時間単純浸漬、超音波洗浄、流水での洗浄などオゾン水の作用方法の違いによって、同一濃度のオゾン水であっても殺菌効果に差が生じることがわかった。このことは、アクリルレジンプレートの付着した*C. albicans*に対する溶存オゾンの反応効率がオゾン水を作用させる方法によって変化し、オゾン水の殺菌効果に影響を及ぼしていると考えられる。

すなわち、短時間単純浸漬の場合には、溶存オゾンがレジンプレート表面に付着した表層の*C. albicans*に対して作用するものの、深層部の*C. albicans*には浸透していかずに、殺菌力が抑制されてしまう。しかし、浸漬時間を長くすることで、徐々に深層菌への殺菌効果が発揮される。このことはオゾン水を直接*C. albicans*に作用させた場合に極めて高い瞬時殺菌力示した結果とは異なるものである。オゾン水またはオゾンガスを*C. albicans*に直接作用させた場合の殺菌効果に関する他の研究では、その殺菌効果は30秒から2分間で発揮され、その後平衡状態に達すると報告されている。これらの研究結果は、一定量の細菌に対して十分な量または十分な濃度のオゾンに反応させた結果であり、オゾンのモル数と菌数がその結果を左右する可能性が高い。したがって、複数の菌や多数の菌が付着した義歯床

を洗浄する場合においては、溶存オゾンをいかに効率よく義歯床に積層付着した菌に作用させるか、作用させるオゾン水のオゾン濃度と作用時間が重要である。

一方、オゾン流水による洗浄においては、低濃度のオゾン流水であっても高い殺菌効果が認められた。これは、積層付着した*C. albicans*を死滅させるのに必要なオゾンを連続的かつ効率よく作用した結果を反映している。溶存オゾンの濃度を高くすると殺菌力は向上するが、オゾンの曝起による生体への危険性が危惧される。オゾン水の供給を持続的に行えば、たとえ低濃度オゾン水であっても、十分な殺菌効果を発揮することができることがわかった。

超音波洗浄を併用した場合には、短時間であっても、濃度依存性に、殺菌効果は有意に増強し、付着菌の量や不純物の存在の影響も受けにくいことが明らかとなった。これは、超音波による振動効果により、浅深層の*C. albicans*に対しての溶存オゾンの反応効率が高くなり、殺菌力が向上したものと推察される。オゾン流水の殺菌効果および超音波洗浄器を用いた場合の結果は、SEM像からも裏付けられた。

## E. 結論

アクリルレジンに付着した*C. albicans*に対するオゾン水の殺菌効果を検討した。オゾン水の*C. albicans*に対する殺菌力を効果的に発揮させるためには、オゾン水を作用させる前の義歯の洗浄が有効であること、さらにオゾン水の作用方法を検討することで効率的な殺菌効果を期待できるが明らかとなった。本研究結果に基づき、現在オゾン水による義歯洗浄装置を考案中である。

口腔乾燥症の発症機序に関する生理学的研究  
 -唾液腺摘出マウスのヒアルロン酸嗜好について

研究協力者 稲永 清敏 九州歯科大学生理学講座  
 伊藤加代子 新潟大学医歯学総合研究所  
 分担研究者 西原 達次 九州歯科大学微生物学講座  
 主任研究者 柿木 保明 国立療養所南福岡病院歯科

研究要旨

三大唾液腺摘出 (DSAL) により、擬似的に口腔乾燥状態を作り出したマウスを用いて、ヒアルロン酸 (HA) 溶液に対する嗜好性の変化をみることを目的として実験を行った。二瓶選択法による HA 溶液と水の一日の摂取量を DSAL 群と SHAM (偽手術) 群で比較した。DSAL 群は、SHAM 群に比べて一日の総飲水量は有意に多かった。0.01, 0.03, 0.1% と HA の濃度が増加するにつれて、HA の摂取量が増加した。しかし、この実験で用いられた HA 溶液には、低濃度の PBS に溶解されていたので、PBS の影響を除外するために、超純水に溶かした HA 溶液と水の一日の摂取量を同じ二瓶選択法にて測定した。DSAL では HA の摂取量は、水に比べて有意差は認められなかったが多かった。一方、SHAM では HA の摂取量が水の摂取量に比べて有意に増加した。本実験結果より、マウスは HA を好んで飲むこと、唾液腺摘出によりさらにいっそうその嗜好性が増加することが示唆された。

A. 研究目的

ヒアルロン酸 (HA) は、1934 年ウシの目のガラス体から単離されたムコ多糖である。HA は、すべての脊椎動物に存在している。体内で最も多く HA が含まれているのは皮膚であり、保湿に役立っているといわれている。

実際 HA 溶液は、極めて特徴のある粘弾性を示し、保水力が絶大で、希薄な溶液でも粘稠なゲルを与える。柿木ら (1) は、HA スプレーを口腔内乾燥症状を呈する被験者に噴霧したところ、ほぼ全員に効果がみられたと報告している。そこで、われわれは、口腔乾燥と HA の保湿効果をさらに調べるためにマウスにおける HA 効果について実験を行った。三大唾液腺摘出により、擬似的に口腔乾燥状態を作り出したマウスを用いて、HA 溶液に対する嗜好性の変化をみることを目的として実験を行った。

B. 研究方法

本実験は九州歯科大学動物実験委員会の倫理基準および実験指針に準じて行われた。

雄性 ICR マウスをネンブタール麻酔下

(60mg/kg、腹腔内注射) にて、両側の顎下腺および舌下腺を摘出した。耳下腺は、導管を結紮後切断した (唾液腺摘出群、DSAL 群)。対象として、偽手術を行った (SHAM 群)。実験は二瓶選択法にて、一日の HA と水の摂取量を測定した。

実験に用いた HA (生化学工業提供) は PBS に溶解された 0.3% HA と純水に溶解された HA を使用した。

1. PBS 溶液に溶けた HA 溶液の摂取:

0.01, 0.03, 0.1% HA 溶液と水の一日の摂取量を唾液腺摘出による影響を DSAL 群と SHAM 群で比較した。この実験期間中、餌は自由に摂食できるようにした。

2. 超純水に溶かした HA 溶液の摂取

A の実験で用いた HA 溶液の原液には、低濃度の PBS に溶解されていた。そこで、PBS の影響を除外するために、超純水に溶かした HA 溶液を用い、A と同じように水と二瓶選択法により、HA 溶液と水の一日の摂取量を測定した。

3. 統計方法

得られたデータはt検定により処理した。

### C. 研究結果

SHAM マウス 8 匹、DSAL マウス 12 匹を用いて実験を行った。

#### 1. HA 濃度の変化による HA 溶液と水の摂取量の変化

図 1 は HA 濃度を 0.01, 0.03, 0.1% と増加した時の HA 溶液と水の摂取量の変化を示している。DSAL マウスの HA と水の総飲水量は、SHAM に比べて有意に多かった。DSAL では、0.01% HA 濃度の摂取量は、水の摂取量と比べては有意差は認められないが、0.03% および 0.1% HA では、有意に HA のほうが多かった。

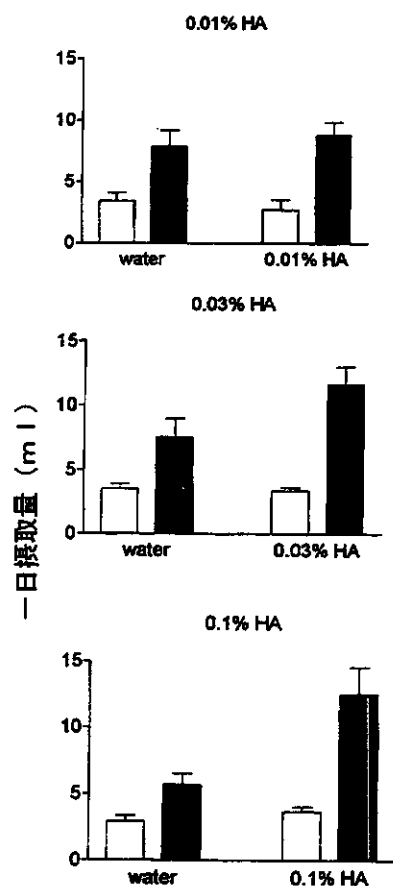


図 1. 唾液腺摘出による水・ヒアルロン酸の摂取量（一日）の変化：二瓶選択法による測定

餌を自由に摂取することのできる条件下での一日（24 時間）の水および HA の摂取量を示している。0.1% の HA 原液には、低濃度の PBS が混入していた。0.01% は 10 倍希釈、0.03% は 3.3 倍希釈を意味している。

#### 2. 超純水に溶かした HA を用いた場合の HA 水溶液と水の摂取量の変化

図 2 は、超純水に溶かした場合の一日の 0.1% HA 水溶液と水の摂取量を示している。DSAL マウスでは、水より HA 水溶液を多く摂取しているが、摂取量に有意差は認められなかった。一方、SHAM 群では、有意に HA 摂取量が増加した。

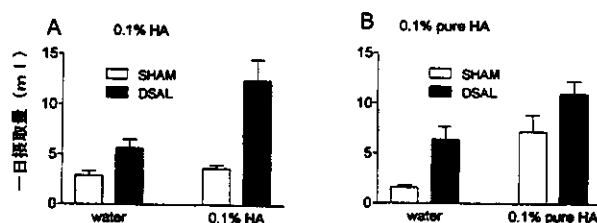


図 2. 唾液腺摘出による水・ヒアルロン酸の摂取量（一日）の変化：PBS を含まないヒアルロン酸の摂取水と HA の二瓶選択法による一日の摂取量を示す。A で用いた HA には PBS が少量混入していた。図 1 の最下段と同じグラフ。B は PBS が混入していない HA の摂取量を示している。B において、SHAM の HA 摂取量は水に比べて有意に多かった。DSAL では有意差はなかったが、HA の摂取量は水の摂取量に比べて多かった。

### D. 考察

われわれは、三大唾液腺を摘出したマウスでは、飲水量が増加するというをすでに報告している(2)。唾液腺を摘出すると、口腔内を湿潤するはずの唾液がほとんど分泌されなくなることから、口腔内の乾燥感が起こるということは容易に想像がつく。さらに、食事に伴う水の摂取も必要となり、飲水量が増加すると考えられている。

HA は口腔内の保湿性を保つ効果があることから、実験 1 の結果はわれわれが本研究を始めた目的を満足するものであった。しかし、本来の HA には少量の PBS が混在していることから、希釈しているとはいえ、PBS の効果が無視できないと考えた。つまり、唾液腺を摘出した動物では、飲水量が通常動物より、数倍増加しており、体液の恒常性を考えると、摂取された水分量と等価な水分量が排泄されることを意味している。ここで重要なのは、尿として水分が体外へ排泄されるとき多少なりとも電解質が失われるから、その損失分をなんらかの形で補わなければいけないということである。

実験 2 では、HA 液に PBS が入っていないことにより、HA 水溶液の摂取量が減少したように見

える。HA を溶かした液に PBS が入っているか否かにより、DSAL マウスの HA 溶液を飲む量が変わったが、DSAL は HA 溶液を好んで飲むことには変わりはない。現在の段階では、種々の解釈ができるが、唾液腺を摘出した群では、HA がもっている保湿性を求めて多く飲むという仮定はまだ残っていると考えられる。さらに、HA の摂取量が DSAL 群は SHAM 群より多いが、それほど大差がないように見える。このことは、マウスが HA に対する嗜好性を基本的に持っていることを示しているのかもしれない。

#### E. 結論

本実験結果は現在の段階では必ずしも、クリアな解答を得ることができなかった。唾液腺摘出動物が HA を少なくとも嫌悪感を示さず、好んで飲んでいたことは、今後 HA を用いた実験をする場合のひとつの手法として使用できると考えられる。

#### F. 引用文献

- (1) 柿木保明：口腔乾燥症の診断・評価と対応－唾液分泌低下症候群としてとらえる－。歯界展望 Vol.95-No.2, 321-332, 2000.
- (2) Hamada A, Inenaga K, Nakamura S, Terashita M, Yamashita H. Disorder of salivary secretion in inbred polydipsic mouse. *Am. J. Physiol.*, 278:R817-R823, 2000



## 唾液の測定による味覚評価を志向した味センサの改良

研究協力者 岩倉 宗弘（九州大学大学院システム情報科学研究院）

分担研究者 西原 達次（九州歯科大学口腔微生物学講座）

### 研究要旨

これまで唾液中に含有する代表的無機イオンによる味覚への影響について、脂質／高分子膜型味センサを用いて調べてきた。その結果、唾液中の重炭酸イオンの増減によって味覚に少なからぬ影響を与えていることが示唆された。将来的に、唾液の測定による味覚異常のスクリーニングに向けた知見を得る。そのために果たすべき課題である、唾液測定時の応答の安定化のための工夫（基準液の調整）やセンサセルの小型化を検討した。また、味覚強度とセンサ応答の比較を行った。今回の実験ではそれらに相関はみられなかった。今後、さらに検査方法の簡便化を検討する。

### A. 研究目的

高齢者や、身体に何らかの疾病があり適正な栄養摂取を必要とされるものにとって、味覚異常は切実な問題である。健全な味覚をもつことは、健康な肉体を維持（回復）していくために必要な機能であるばかりでなく、QOLの観点からも非常に重要かつ基本的な欲求といえる。

これまで、ヒトにおいて、食性が唾液成分に与える影響に関しては幾つかの報告<sup>(1)</sup>はあるが、唾液が味覚におよぼす影響に関する研究は、あまりなされていないのが現状である。これはヒトが被験者であるために、味覚を評価する際に、心理的・経験的な要素が絡んでくるためと考える。

我々はこれまでに食品の味をヒトに代わって評価することのできる「味センサ」の開発をすすめてきた。この味センサは電荷や親和性の異なる複数の脂質／高分子膜を受容部としており、大半の呈味物質において、味質ごとに特異的応答を示す<sup>(2)</sup>。さらにその識別能はヒトよりも敏感かつ再現性がある。これまで基本的呈味成分をはじめ、ミネラルウォーターや多くの食品を測定し、味質毎の分類に成功してきた。

一方、唾液はその成分に呈味性があり、それらの成分変化による味覚異常があるとも考えられる。また、味覚異常の指標となる何らかの変化が

唾液応答に現れる可能性もある。そこで将来、唾液（の味）を測定・評価し、唾液のセンサ応答から各自の味覚状態を知る手法の開発が望まれる。そのための知見を得ることを目的とする。

実際に唾液を測定する場合、高齢者や口腔乾燥症の患者からの唾液サンプルの採取は困難である。さらに、単に味覚異常といっても、その原因と症状は様々であり、統計的考察を行うには大量の患者数と多種の臨床データが必要となる。現有の測定システムはバッチ式のセンサ測定方式であり、被験者から供給されるわずかな測定サンプルを測定するには感度や保存性の面で問題となる。そこで、当面は測定システムの確立を目指し、健常者から採取した唾液を測定サンプルとするとともに、合わせて濾紙ディスク法による味覚検査を行う。それと並行して小型フローセルタイプのセンサシステムの作製をおこなう。具体的には、現在の測定システムで必要なサンプル量は約100mlであるが、実用的な採取量を鑑みて、数百 $\mu$ l程度の測定量が適当と考える。

### B. 研究方法

今回の研究では、唾液と味覚状態の測定にかかわる知見を得るために、以下の3つの実験をおこなった。

### B-1 唾液測定用基準液の調整

味センサの測定では、既定の基準液を測定したときの絶対電位と、各サンプルの測定電位との相対値を応答電位として採用する。これによりセンサのオフセット変化量をキャンセルするとともに、センサの安定性を保つことができる。測定中のセンサ膜の経時変化を抑え、各サンプル間の違いを際立たせるためには、採用する基準液が測定するサンプルに近い組成で、同様のセンサ応答であることが望ましい。唾液中に含まれる代表的無機イオンのみでは味センサの応答に相違があることから、味センサで用いている脂質／高分子膜の特性を鑑みながら、唾液測定用基準液の調整を試みた。

B-2 濾紙ディスク味覚検査法<sup>(3)</sup>と味センサ応答  
三和化学研究所社製の濾紙ディスク味覚検査セット「テイストディスク」を用いて、6名の被験者の味覚強度を調べた。さらに同一被験者の唾液を味センサで測定し、相関をみた。味覚検査の味物質と強度を表-1に示す

表-1 濾紙ディスク味覚検査の味物質と濃度

	1	2	3	4
甘味(ショ糖)	0.3%	2.5%	10%	20%
塩味(食塩)	0.3%	1.25%	5%	10%
酸味(酒石酸)	0.02%	0.2%	2%	4%
苦味(塩酸キニーネ)	0.001%	0.02%	0.1%	0.5%

### B-3 小型センサセルの試作

現在の味センサでは、測定に1検体当たり100mlのサンプルを必要とする。一人の被験者から、これだけの唾液を採取するのは事実上困難なため、実験 B-1, B-2 では唾液を純水で希釈したものをを用いた。希釈倍率については3名の被験者から採取した唾液を各々2倍, 4倍, 5倍, 10倍, 20倍に希釈したものを測定し、3者が識別可能であった10倍希釈を採用した。当然、pH緩衝能といった情報量が減少するので、できれば希釈しない原唾液を測定するのが望ましい。そこで、数百μlのサンプル量で測定可能なフロータイプのセンサセルを試作した。さらに応答特性の確認のため、これまでに測定実績のある呈味成分(酸味:塩酸・クエン酸, 塩味:塩化ナトリウム・塩化カリウム, 甘味:グリシン・アラニン, 苦味:キニー

ネ塩酸塩・Lトリプトファン, うま味:グルタミン酸ナトリウム・イノシン酸)を測定した。

## C. 研究結果

上記研究方法に対する結果を以下に述べる。

### C-1 唾液測定用基準液

これまでの研究で用いてきた基準液(50mM KCl)と4名の被験者から採取した唾液の応答を図-1に示す。また、今回調整した唾液測定用基準液を用いたときの唾液応答を図-2に示す。

唾液測定用基準液を採用することで、応答電位は小さくなったものの、個人間の僅かな差異を捉えることが可能となった。

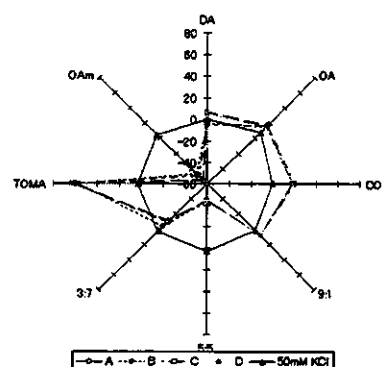


図-1 味センサの唾液応答  
(基準液: 50mM KCl 溶液)

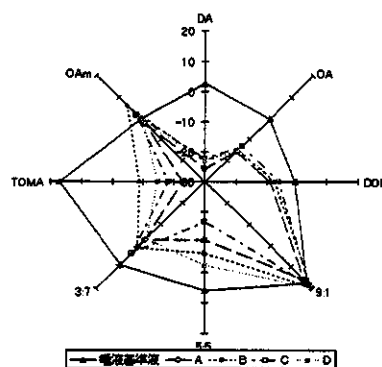


図-2 味センサの唾液応答  
(基準液: 調整液)

### C-2 濾紙ディスク式味覚検査法

被験者間で特徴ある結果が得られた。このうち2名について同様の検査を繰り返したが、ほぼ同様な結果がえられ、この結果にはある程度の再現性があることがわかった。

味センサの測定結果を主成分分析にかけた結果と味覚検査結果を比較したところ、有意の相関はみられなかった。しかしながら、唾液 pH や重炭酸イオンの変化は少なからず味覚に影響を与えていると考えられるため、今後、個別に感度を

上げた測定を行う必要があると考える。さらに今回は被験者数が6名と少ないため、より多くの被験者で検討し、統計的解析を行わなければならない。

表-2 濾紙ディスクによる味覚検査結果

○:正答 △:何かわからないが味がする,または誤答 ×:無味

試料	1	2	3	4	5
精白糖	×	×	○	-	-
NaCl	×	×	○	-	-
精石炭	×	×	○	-	-
精キニーネ	×	×	△	○	-

試料	1	2	3	4	5
精白糖	×	×	×	×	○
NaCl	×	×	○	-	-
精石炭	×	×	×	△	△
精キニーネ	△	△	○	-	-

試料	1	2	3	4	5
精白糖	×	×	×	△	△
NaCl	×	×	△	△	○
精石炭	×	×	△	△	○

### C-3 小型センサセルの試作

試作したセンサセルの外観を図-3に示す。セル容量は120μlとなり、これまでのバッチ式測定システムに比べて、サンプル量の大幅な少量化となる。さらに空気との接触を最小限に抑えることが可能となり、測定の安定化が期待できる。

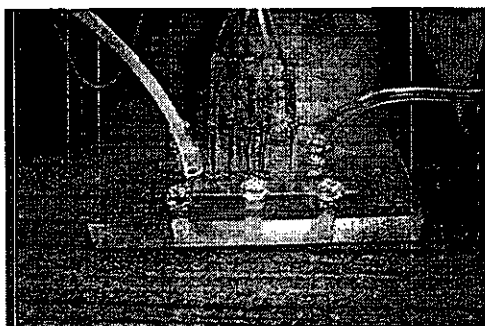


図-3 フローセンサセル (試作)

酸味物質、塩味物質、うま味物質の測定結果を各々、図-4, 5, 6に示す。結果、これまでと同等の識別能が得られた。

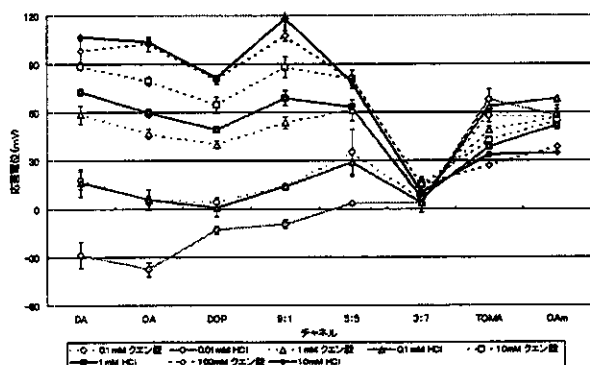


図-4 味センサ応答 (酸味)

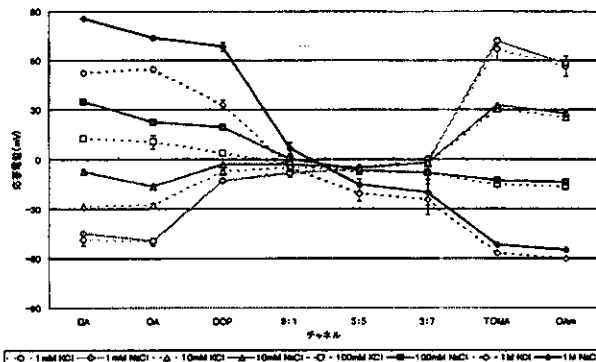


図-5 味センサ応答 (塩味)

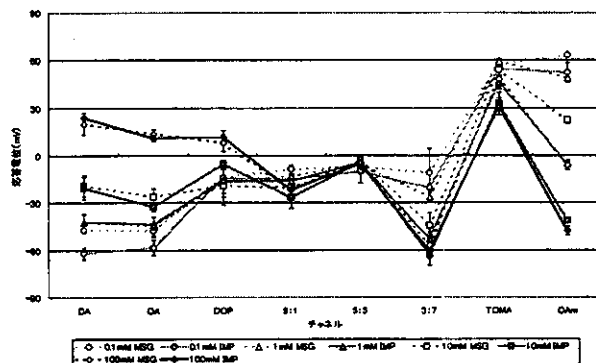


図-6 味センサ応答 (うまみ)

### D. 考察

6名の被験者から採取した唾液のpHと酸味に対する感覚および味センサ応答についても比較したが、相関はみられなかった。このことから、味覚受容機構が複雑な相互作用によることが伺われる。

ちなみに今回のサンプルは研究室に所属する20代の男女6名をランダムに選出した。測定点は右側鼓索神経の1点のみとした。このうち2名は5段階目でも味を識別できなかった。彼等は特に味覚異常を自覚してはおらず、今回の実験ではじめて他者と異なる感覚であることに気づいた。彼等は全口腔法での味覚試験でも、他者と異なる感覚を示しており、測定方法による誤差ではないことを示した。以上のことは、若年層においても非常に多くの味覚異常者が潜在的にいることを示しており、何らかの総合的な施策が必要であると考えられる。

また、今回使用した濾紙ディスクによる味覚検査法は、それ以前の電気刺激法と異なり、基本味の味質ごとに官能的な評価が可能である点が優れている。しかしながら、濾紙の入れ替えによる

刺激や測定ポイントのずれなどによる誤差も発生することや、濾紙の入れ替えなどで測定時間がかかるため被験者への負担が大きいなど、改良の余地がある。現在、より簡便で正確な味覚検査方法を検討中である。

#### **E. 結論**

- ・味センサでヒトの唾液を評価するための測定に有効となる基準液の調整ができた。
- ・味センサでヒトの唾液を測定し、味覚との相関をみた。今回の実験では相関がみられなかった。多数のサンプルで統計的解析が必要である。
- ・微量なサンプルでも測定可能なフロータイプのセンサセルを試作した。

#### **F. 研究発表**

磯元, 岩倉, 都甲: 電気学会全国大会ケミカルセンサ研究会, 2003.3 (発表予定)

#### **参考文献**

- (1) 日本味と匂学会誌(特集 味覚と食性), (1999)
- (2) 都甲 潔 編著: 感性バイオセンサ, 朝倉書店 (2001)
- (3) 富田 寛著: 味覚障害とダイエット, 講談社

## 口腔内血流分布画像化システムの開発

研究協力者	坂井 明順	九州歯科大学予防歯科学講座
	藤居 仁	九州工業大学情報工学部
分担研究担者	西原 達次	九州歯科大学口腔微生物学講座

## 研究要旨

昨年度、レーザー散乱現象を利用した血流画像化法 (LSFG) を応用して、口腔内の血流分布を画像化するシステムを試作した。今回はヒトに対していくつかの基本的な実験を行い、試作機に更なる改良を加えた。現在、今回の結果を踏まえて新たな装置の開発を行っているところである。

## A. 研究目的

舌に分布する主な動脈としては、外頰動脈の分枝である舌動脈、舌根部には顔面動脈の扁桃枝および上咽頭動脈の扁桃枝がある。静脈としては、舌深静脈、舌背静脈、舌下静脈がある。このような血管が縦横に走る舌では、血液の流れの違いが、色はもちろん形、温度、舌苔といった様々な性質に寄与していると考えられている。

舌は口腔内で味覚、嚥下、発音などの機能に深く関わっているが、これらの働きを行ううえで、唾液の果たす役割は大きい。しかし、これまでの研究で、舌あるいは口腔粘膜の血流と口腔乾燥との関連は調べられていない。そこで、我々は昨年度レーザー散乱現象を利用した血流画像化法 (LSFG) を用いて、口腔内の血流分布を画像化するシステムの試作機の開発を行った。今回の実験ではその測定器を安定利用するための様々な要因に関する調査を行った。

## B. 研究方法

図 1 (a) は今回試作した舌血流画像化装置の外観であり、血流測定用ヘッドと制御ユニットからなる。ヘッド上面にある三角形の突起部を口に含み、舌表面の血流分布をディスプレイ上にカラーマップとして表示することができる。測定ヘッドは半導体レーザー、結像光学系、イメージセンサ、制御基板、回転ミラーなどで構成されている。制御基板は PC からの命令を受け取り、舌表面上に投影されたレーザースポットを走査し、信号を解析して PC に結果を送信している。測定後直ちに舌血流の二次元

マップが PC の画面上に表示される。

また、図 1 (b) は測定風景であり、測定ヘッドを加えるような形で測定する。今回の実験では、被験者に種々の条件での舌血流変化を調べた

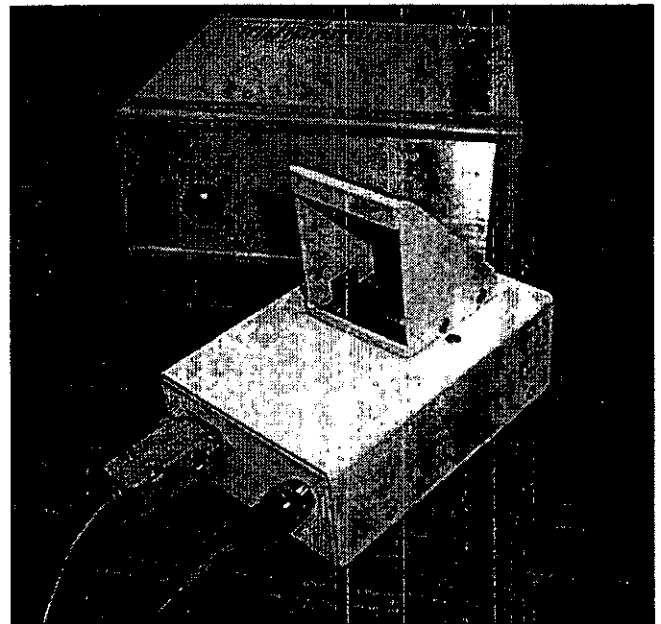


図 1 (a)



図1 (b)

### C. 研究結果

まず精神的ストレスを掛けたときの舌血流変化を観察した。2人の女性被験者について、一方が好きで他方が嫌いな食べ物を1)話題にし、2)見せ、3)匂いを嗅がせ、4)最後に味わった時点までの血流の経時変化を調べた。図2で示すように、ネギを嫌いな被験者の舌血流が、刺激が近づくに従って次第に低下していく興味深い結果が得られた。

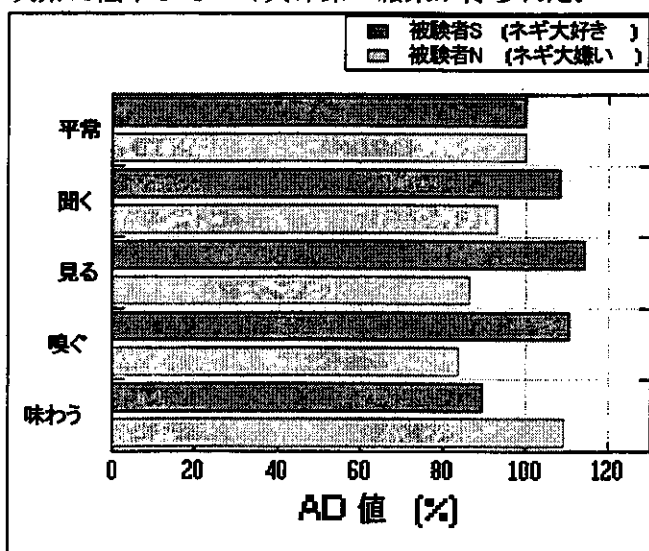


図2

次に血管収縮性のあるエピネフリン添加浸潤麻酔を舌背のある1箇所に入射し、その前後での血流の経時変化を血流マップで調べた。今回は、舌尖から舌根方向に10mm、舌縁方向に8mmの位置に0.225mlを注入した(図3)。

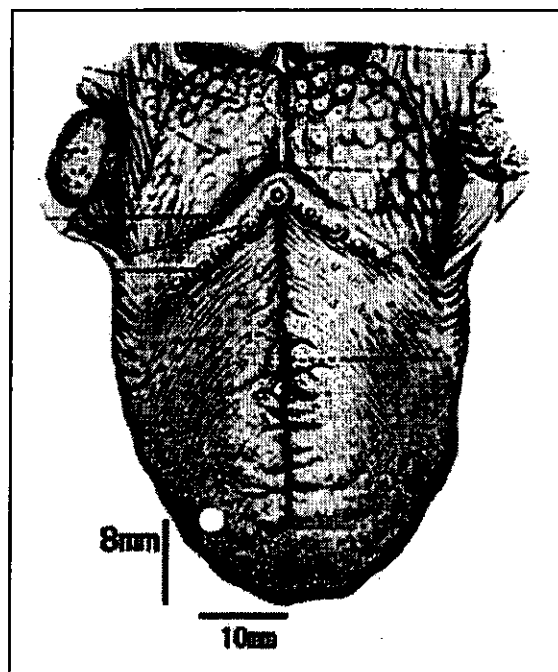


図3

図4(a)は浸潤麻酔注入前の血流マップであり、やはり舌縁に比べて明らかに舌背の正中の方が血流量が多いことが示されている。

図4(b)は右側に注入した1分後、図4(c)が5分後そして図4(d)が15分後の図である。

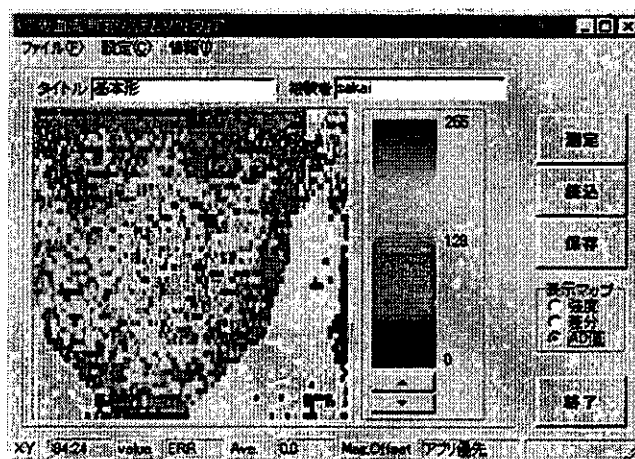


図4 (a)

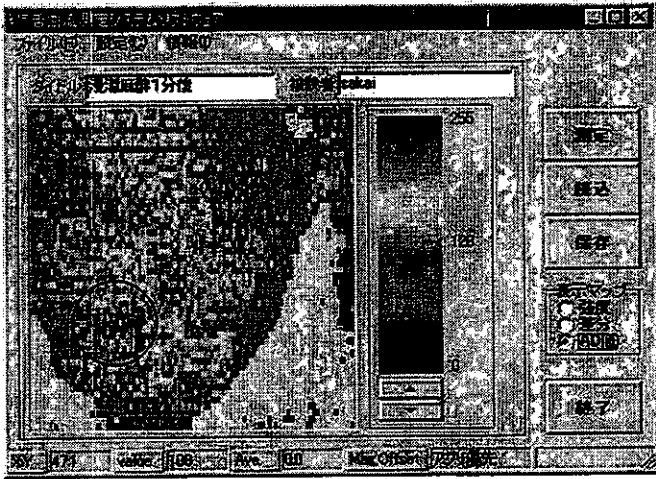


図4 (b)

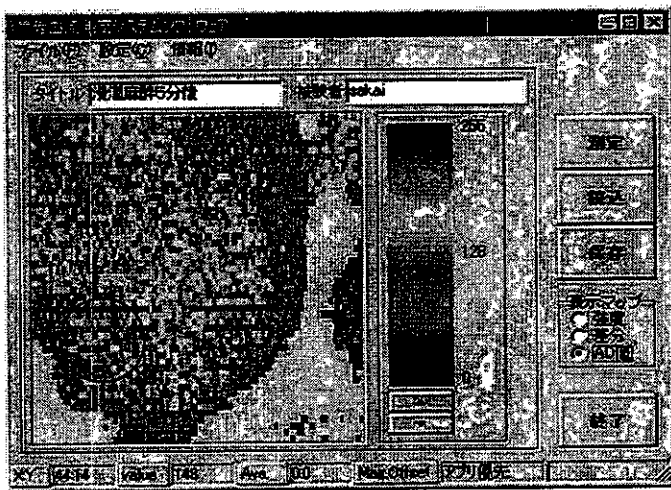


図4 (c)

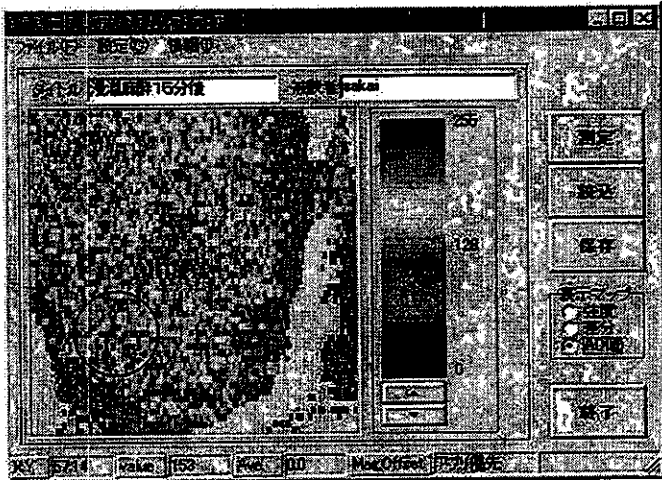


図4 (d)

丸で囲んだ部分が注入点であるが、部位特異的、経時的变化を確認することはできなかった。

#### D. 結論

今回の実験で、本システムは全体的な血流量の変化はとらえられるものの、部分的な血流量の変化に対しては満足のいく結果を得ることができなかった。また、現在の大きな開口を舌を突出させる計測方法では筋の緊張による血流の変化も考慮に入れる必要が出てくる。今回の結果を踏まえて九州歯科大学と九州工業大学の共同で、開口量が少ない状態で視野を拡大することができる測定用プローブの開発と、より精度のいい光学系を備えた装置の設計を行っている。

#### 参考文献

- 〔1〕 藤居仁、小西直樹：レーザースペックルを利用した血流分布の可視化、応用物理, 66, no5, 476-480, 1997
- 〔2〕 柿木保明、西原達次：歯科医師・歯科衛生士のための舌診入門、日本歯科評論別冊 2001

資料



# 口腔の乾燥度に関する調査票

ACode[ ]- No.[ ]

問診表 (本調査は厚生労働省研究事業で実施されます。枠内のご記入をお願い致します)

お名前 (イニシャル可)	※	01 [ ] 歳	02 (1男・2女)	01 [ ]
				02 [ ]
1. 身長 [ ] cm	03	04	体重 [ ] kg	※ご記入ください
				03 [ ]
				04 [ ]
2. 歩行状態 (○印)	0. 自力歩行可、	1. 杖が必要、	2. 車イスが必要、	3. 移動困難
				05 [ ]
3. 生活の場所 (○印)	0. 自宅、	1. 施設、	2. 病院(入院中)、	3. その他
				06 [ ]
4. 全身状態 (今現在治療中の疾患があれば、数字記号に○、軽度の場合は△)				
0特になし、A気管支喘息、Bアレルギー性鼻炎、C花粉症、Dアトピー性皮膚炎				07 [ ]
1高血圧、2糖尿病、3消化器疾患、4呼吸器疾患、5心疾患、6心不全、7肝臓疾患				08 [ ]
8血液疾患、9パーキンソン病、10腎疾患、11尿路疾患、12心身症、13精神疾患、				09 [ ]
14悪性腫瘍、15他(具体的に )				10 [ ]
5. 口の状態に○印をつけてください。 ※入れ歯：取り外しできる義歯(ブリッジは除く)				
1) 歯の状態：0:全部自分の歯、1:部分入れ歯あり、2:総入れ歯がある				11 [ ]
2) 咬み合せ：0:噛める、1:やや噛みにくい、2:噛みにくい、3:噛めない、4:食べない				12 [ ]
6. 口腔乾燥感(自覚症状)の該当するものに、○印を付けてください				
1) 口の中が乾く、カラカラする。	0ない、	1時々・少し、	2ある	13 [ ]
2) 水をよく飲む、いつも持参している	0ない、	1時々・少し、	2ある	14 [ ]
3) 夜間に起きて水を飲む	0ない、	1時々・少し、	2ある	15 [ ]
4) クラッカーなど乾いた食品が咬みにくい	0ない、	1時々・少し、	2ある	16 [ ]
5) 食物が飲み込みにくい	0ない、	1時々・少し、	2ある	17 [ ]
6) 口の中がネバネバする、話しにくい	0ない、	1時々・少し、	2ある	18 [ ]
7) 味がおかしい	0ない、	1時々・少し、	2ある	19 [ ]
8) 口で息をする(寝るときも含む)	0ない、	1時々・少し、	2ある	20 [ ]
9) 口臭が気になるといわれる	0ない、	1時々・少し、	2ある	21 [ ]
10) 目が乾きやすい	0ない、	1時々・少し、	2ある	22 [ ]
11) 汗をかきやすい	0ない、	1時々・少し、	2ある	23 [ ]
12) 義歯で傷が付きやすい	0ない、	1時々・少し、	2ある	24 [ ]
7. 現在、薬の服用などがありますか？(最近1週間、主なもの5つ以内に○)				25 [ ]
0.特になし、1.抗高血圧剤、2.抗ヒスタミン剤、3.精神安定剤、4.抗うつ剤、				26 [ ]
5.抗パーキンソン剤、6.利尿剤、7.β遮断剤(心臓の薬、胃潰瘍の薬など)				27 [ ]
8.アルコール(ほぼ毎日) 9.睡眠薬 A.漢方薬 ※市販薬も含まれます※				28 [ ]
B.抗アレルギー剤、C.他・不明→記号など( )				29 [ ]
				30 [ ]

ご協力ありがとうございました。

※これより下は、検査担当者が使用

検査票	①臨床診断基準	区分	31 [ ]	<0:症状なし、1:粘性あり、2:白い泡状、3:舌上乾燥>
	②湿潤度検査紙	舌上	32 [ ]/10秒	舌上
				33 [ ]/30秒
		舌下	34 [ ]/10秒	
	③口腔水分計	舌上	35 [ ]%	頬右
				36 [ ]%
		頬左	37 [ ]%	
	④ワッテ法		38 [ ]g/30s	⑤サクソン
				39 [ ]g/2分
				⑥曳糸性
				40 [ ]

/T14-1

# 口腔乾燥の臨床検査

No. [            ]

○必須、△可能な場合、※オプション

## 1. 臨床分類基準

※検査担当者（医師、歯科医師など）による臨床分類です。

0：正常（0度）：口腔乾燥や唾液の粘性亢進はない

1：軽度（1度）：唾液が粘性亢進、やや唾液が少ない。唾液が糸を引く

○31

2：中程度（2度）：唾液が極めて少ない。細かい泡がみられる

3：重度（3度）：唾液が舌粘膜上にみられない

※唾液の泡は、粘性亢進や口腔乾燥の傾向がある。

細かい泡＝おおよそ1ミリ以下の泡あるいは白くみえる泡

粘性亢進は、糸引き状態で判定する。1～2ミリ以上の泡の場合は1度と判定する。

## 2. 唾液湿潤検査紙(SWT: Saliva Wet Tester) ミリ数

「エルサリボ」（販売元：ライオン歯科衛生研究所）を使用する。

1) [10秒法]標準法 ※色がかすかに付く場合は、±

舌上10秒  
○32

測定用具を舌尖から10mmの舌背部に垂直に立てて、10秒間接触させて保持し、その後取り外して、明るい光源下で湿潤した部分の幅を測定する。

<0/±：乾燥、0～1：唾液低下、1～3：境界、3～：正常>

舌上30秒  
△33

2) [30秒法] 10秒法に続いて、すぐに20秒続けて測定する。

<0/±：乾燥、0～2：唾液低下、2～5：境界、5～：正常>

3) [舌下部] 舌下小丘部に貯留している唾液量を計測する

※舌が検査紙に触れないようにする

<0/±：乾燥、0～2：唾液低下、2～5：境界、5～：正常>

舌下10秒  
△34

## 3. 口腔水分計（モイステッカー・ムーカス）：%

「モイステッカー・フォー・ムーカス」（販売元：ライフ）を使用する。

測定法：水分計のセンサ部をセンサカバーで覆い、測定部に当ててスイッチを押す  
約200グラムで、垂直方向に当ててセンサ面全面で計測すること。

1) 舌尖から10mmの舌背部

舌上  
○35

2) 右口角から10mmの頬粘膜部（不可能な場合は左側のみ）

右頬  
○36

3) 左口角から10mmの頬粘膜部

左頬  
○37

<～25：乾燥、25～27：やや乾燥、27～29：境界、29～：正常>

----- <オプション検査> -----

## 4. 安静時唾液量測定（ワッテ法） グラム数

「ワッテ」と「電子はかり（0.01g表示）」、「密閉袋」を使用する。

測定法：1. ワッテを密閉ポリ袋に入れて全体の重量を計測しておく

ワッテ  
※38

2. 密閉袋からワッテを取り出して、舌下部（舌下小丘部）に置く。

3. 口を閉じて、顔をやや下に向けて、30秒間維持する。

4. ワッテを取り出して袋に入れ、電子はかりで、増加した重量を計測する。

<～0.05乾燥、0.05～0.10：やや乾燥、0.1～0.15：境界、0.15～正常>

## 5. サクソントスト グラム数

「ガーゼ」と「電子はかり（0.01g表示）」、「容器」を使用する。

サクソン  
※39

測定法：1. 容器と乾燥ガーゼの重量を、あらかじめ計測する

2. 口から唾液を吐き出す。

3. 測定用ガーゼ（10cm×10cm程度）を口に入れて、2分間咀嚼してもらう

4. 測定ガーゼと唾液を容器に吐き出して、増えた重量を計測する。

<～2グラム：乾燥、2gを越えたもの：正常>

## 6. 唾液の曳糸性検査 ミリ数

「ネバメーター」と「測定キット（専用の採取器）」を使用する。

曳糸性  
※40

測定法：1. 唾液を、専用の採取器で採取する。

2. 採取した唾液を、測定器に入れる。

3. 自動測定ボタンを押す（平均値が表示されます）。

<健常者でおおよそ：2～5ミリ>

## 研究成果の刊行

研究成果の刊行に関する一覧表

(雑誌)

No	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌	巻号	ページ	出版年
1	柿木保明	口腔乾燥症－唾液分泌低下のメカニズムと臨床的対応－	歯界展望	100-1	262	2002.
2	岸本悦央	口腔乾燥症の原因	歯界展望	100-1	27-32	2002
3	稲永清敏	加齢による体液恒常性の変化と口腔乾燥症のかかわり	歯界展望	100-1	33-38	2002
4	大鶴 洋	唾液腺疾患と口腔乾燥	歯界展望	100-1	39-42	2002
5	有田正博 西原達次	唾液と口腔細菌叢 －口腔乾燥症との関連－	歯界展望	100-1	43-46	2002
6	柿木保明	口腔乾燥症の診断・治療・ケア	歯界展望	100-2	366-376	2002
7	内山 茂	口腔乾燥症に臨床的対応	歯界展望	100-2	377-391	2002
8	小林直樹	摂食・嚥下障害患者における口腔乾燥と口腔ケア－病院歯科での取り組み－	歯界展望	100-2	392-397	2002
9	安細敏弘 栗野秀慈	安静時唾液と口臭の関係	歯界展望	100-2	398-400	2002
10	寺岡加代	口腔乾燥と全身に関する最近の研究から	歯界展望	100-2	401-403	2002
11	小関健由 郷原賢次郎	曳糸性測定器	歯界展望	100-2	404	2002
12	渋谷耕司	唾液湿潤度検査紙	歯界展望	100-2	405	2002
13	柿木保明	水分計	歯界展望	100-2	406-407	2002
14	柿木保明	絹水・オーラルウェット	歯界展望	100-2	408-409	2002
15	柿木保明	唾液分泌低下と口腔乾燥 －口腔乾燥とは－	デンタル ハイジーン	22-7	602-606	2002
16	岸本悦央	唾液分泌低下と口腔乾燥 －口腔乾燥の原因と頻度－	デンタル ハイジーン	22-7	607-610	2002
17	柿木保明 －	唾液分泌低下と口腔乾燥 －口腔乾燥の診断と検査－	デンタル ハイジーン	22-7	611-613	2002
18	柿木保明	唾液分泌低下と口腔乾燥 口腔乾燥症の患者さんへの対応	デンタル ハイジーン	22-7	614-617	2002
19	柿木保明	口腔水分計モイスチャーチェッカーを活用した患者へのアプローチ法	Dental Products News	139	1-3	2003