

令和元年6月19日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20522

研究課題名(和文) 義歯床プラークの菌叢特性と付着メカニズムの解析と除去方法の開発

研究課題名(英文) Analysis of microflora characteristics in denture base plaque and adhesion mechanism for development of removal method.

研究代表者

漆原 優 (Urushibara, Yu)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：90735680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：義歯床プラークの除去方法を開発するための基礎研究として、菌叢特性と付着メカニズムの解析を行った。義歯床プラーク細菌の菌叢解析として、T-RFLP法を行ったところ金属間で付着する菌叢が異なる可能性が示唆され、次世代シーケンサーによる遺伝子配列決定法を用いた結果、菌属レベルが異なっていることが確認された。その要因は菌の付着レセプターとなるペリクル様タンパク質も異なる可能性が考えられたので、純チタンとCo-Cr、義歯床用レジンを用いて付着唾液タンパク質の比較を行った。その結果、共通なものと特有なものが見つかった。このことから材料ごとに付着する唾液タンパク質が選択されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

可綴性義歯の使用はプラークの付着が避けられず、義歯使用率の高い高齢者には誤嚥性肺炎などを避けるためにもデンチャープラークコントロールが非常に重要である。現在、義歯の清掃は化学的洗浄と機械的洗浄に依存しているが、義歯に対するプラークの付着自体を抑制することで義歯管理は飛躍的に簡便となり、要介護者を含め全身疾患への予防につながる。本研究は、各材料における付着メカニズムおよび菌叢特性の一端を見つけることができたので、デンチャープラークの付着防止および除去法を開発するための基礎的情報として有用であると思われる。

研究成果の概要(英文)：As a basic research to develop a method for removing denture base plaques, we analyzed microflora characteristics and adhesion mechanism. From the result of a comprehensive bacterial flora analysis of denture base plaque bacteria, T-RFLP method suggested that the flora attached might be different among metals. Then using gene sequencing method with next generation sequencer, it was confirmed that the genus level was different. It is thought that the factors may differ from pellicle-like proteins, which are receptors to which bacteria attach, so we compared salivary proteins attached using pure titanium, Co-Cr, and denture base resin. As a result, common and unique proteins were detected. This suggests that saliva proteins adhering to each material are selected.

研究分野：有床義歯補綴学

キーワード：有床義歯補綴学 義歯ケア 菌叢 デンチャープラーク

1. 研究開始当初の背景

2011年度歯科疾患実態調査によると我が国における65歳以上の高齢者の義歯の使用率は約96.9%であることが報告されている。免疫低下に伴う日和見感染を生じやすい高齢者における義歯装着者が多い中で、特に要介護者の適切な義歯の管理は非常に重要な課題である。可撤性義歯の使用はプラークの付着が避けられない。義歯床用レジンは多孔性であり、特に義歯床基底面は唾液による自浄作用が働きにくいいため、デンチャープラークが付着しやすい。デンチャープラークは歯面プラークと同様に常在微生物から構成されているが、高頻度に *Candida albicans* を主体とした *Candida* 属が検出される。*Candida* 属の真菌は口腔に常在性がありながら、宿主の全身状態の低下によりカンジダ症を引き起こす潜在的病原性を発揮する代表的な日和見感染病原体であり、我々は一連の疫学調査を行い、高齢、義歯の装着、唾液分泌低下などの条件が揃うと口腔常在微生物叢内の均衡関係が破綻し、*Candida* が顕著に増加することを報告している(下表, J.Wang, T.Ohshima, N.Maeda, et al. The carriage of *Candida* species on the dorsal surface of the tongue: the correlation with dental, periodontal and prosthetic status in elderly subjects. Gerodontology 23(3) 157-163 2006.)。 *C. albicans* による粘膜の炎症、誤嚥性肺炎、腸管感染などの全身への影響を予防するためにも、デンチャープラークコントロールが重要である。

Prosthetic status	No. of Subjects	No. of <i>Candida</i> positive (%) <sup>1)</sup>
No prosthesis	40	11 (27.5)
Only bridge(s)	89	54 (60.7)
Partial denture(s) & bridge(s)	163	128 (78.5)
Full denture	74	58 (78.4)

<sup>1)</sup>p<0.001, chi2

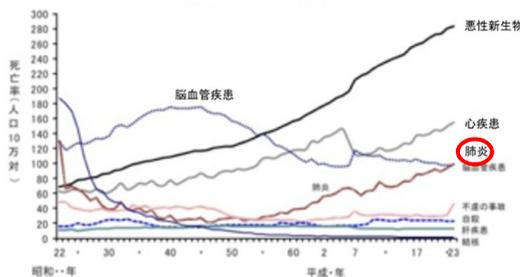
一方、義歯フレームワーク用金属としてチタンが臨床応用されて久しい。従来の歯科用合金より生体親和性が高く、アレルギー反応の少ない、より安全な材料を使用した補綴装置を口腔内に装着することを重視

し、鶴見大学歯学部有床義歯補綴学講座では基礎的研究も継続してきた。チタン床義歯の特徴としてコバルトクロム (Co-Cr) 床白金加金 (PGA) 床と比較して軽量で、Co-Cr 床と同等の適合性を有している。また、チタンはビーム吸収率が高く、熱伝導性が低いことからレーザー溶接に適した金属といわれている。これまで金属床義歯のフレームワークが破折した場合には、再製作を余儀なくされていたが、レーザー溶接技術が飛躍的に向上した現在では、フレームワーク修理にレーザー溶接は第一選択となっている。このように、レーザーの活用により義歯の破折修理や義歯のリフォームが行われるようになったことは、チタン床義歯の適用範囲を拡大するの考えられる。現在では予後不安な支台歯があっても、すぐにチタン床義歯を装着し、支台歯が脱後リフォームすることにより使用し続けるとも可能となった。ところが、このようなメリットに反しチタン床義歯にデンチャープラークが付着しやすいとの臨床報告も散見する(図1)。しかしながら、これらのレジン床義歯や金属義歯床における細菌定着性や定量的評価を行った報告はなく、義歯床用材料に付着する菌叢の特性は解析されていない。



図1: チタン床に付着するデンチャープラーク

国民の平均余命が延びた我が国では要介護者の増加も相まって疾病構造が変化し、易感染宿主数の増加に伴い日和見感染症の代表であるカンジダ症の発症頻度の上昇が全身の健康を障害するきっかけになるとして注目されている(歯科口腔介護のための微生物学; 歯科口腔介護、医歯薬出版、第2版、2005)。このような高齢化社会において、圧倒的多数である義歯装着者の義歯衛生管理はきわめて重要である。しかし口腔内での可撤性義歯の使用はプラークの付着が避けられず、デンチャープラークは局所炎症性疾患および呼吸器・消化器での全身疾患を引き起こすリスクファクターとなっている。2011年の日本人口動態統計によると死因の年次推移は肺炎が上昇傾向にあり、脳血管疾患を上回り(左図)、肺炎を原因とした死亡者の97%が65歳以上である。口腔ケアが誤嚥性肺炎の発症を少なくしていることは周知されつつあり、デンチャープラークが誤嚥性肺炎の原因の1つとも言われている。医療施設や高齢者介護施設ではデンチャープラークコントロールがいかに重要であるか理解されつつあるものの、これに対する手段は洗浄・清掃に依存しているが、義歯に対するプラークの



付着自体を抑制することで義歯管理は格段に簡便・確実となると思われ、口腔内の病変および全身疾患への予防に繋がる。しかしデンチャープラークの菌叢特性や付着メカニズムが不明であるため有効な予防法が確定していない。そこでまずデンチャープラークの菌叢を網羅的に解析し、付着メカニズムを解明することが必要である。菌叢の網羅的解析は近年シークエンサーおよび次世代シークエンサーとパイオインフォマティクスを駆使したメタゲノム解析法の発達により、培養に拘束されずに可能となりつつある。メタゲノム解析は、環境サンプルから直接回収されたゲノム DNA を解析することにより、従来の方法で困難であった難培養菌のゲノム情報の

付着自体を抑制することで義歯管理は格段に簡便・確実となると思われ、口腔内の病変および全身疾患への予防に繋がる。しかしデンチャープラークの菌叢特性や付着メカニズムが不明であるため有効な予防法が確定していない。そこでまずデンチャープラークの菌叢を網羅的に解析し、付着メカニズムを解明することが必要である。菌叢の網羅的解析は近年シークエンサーおよび次世代シークエンサーとパイオインフォマティクスを駆使したメタゲノム解析法の発達により、培養に拘束されずに可能となりつつある。メタゲノム解析は、環境サンプルから直接回収されたゲノム DNA を解析することにより、従来の方法で困難であった難培養菌のゲノム情報の

取得を期待できるほか、菌叢の遺伝子組成や機能の解明を期待できる新しい手法として、環境中や腸管内の菌叢解析法として注目されている。しかし口腔内菌叢の解析はまだ少ない。一方、歯面に対するプラーク付着は直接細菌が付着するのではなくペリクル様タンパク質を介することが知られているが、デンチャープラークの付着様式は解っておらず、デンチャーに付着するペリクル様タンパク質の付着機構やその組成などの実体はおろか、存在さえもほとんど知られていない。

本研究では菌叢の詳細な解析により、予防法を確立させ、多くの義歯装着者の QOL を向上させることを目指し、その成果は学術的のみならず、臨床的にも極めて重要なものであり、医療費削減につながるものと考えている。

## 2. 研究の目的

現在、義歯清掃は化学的洗浄と機械的清掃に依存しているが、義歯に対するプラークの付着自体を抑制することで義歯管理は飛躍的に簡便となり、要介護者も含めて全身疾患への予防に繋がる。しかしデンチャープラークの菌叢特性や付着メカニズムが不明であるため有効な予防法が確定していない。本研究はレジン床と金属床におけるプラーク付着メカニズムおよび菌叢特性を解析し、付着抑制法を開発し、適切な義歯の管理法を検証することに有用な情報となることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) デンチャープラーク細菌のメタゲノム解析法による網羅的菌叢解析

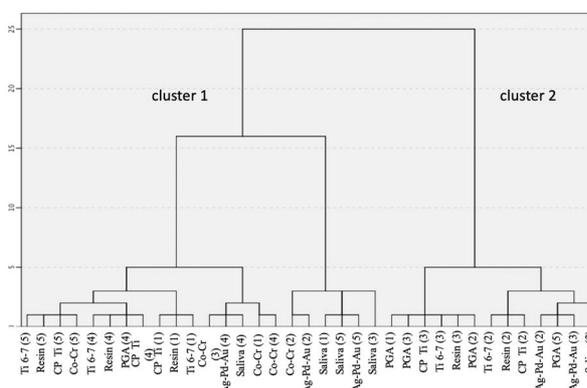
各レジン片(アクリルレジン床付着菌叢解析用)および各金属片(金属床付着菌叢解析用)をヒト新鮮全唾液中に 37 °C、一定時間挿入し、付着したバイオフィーム回収し T-RFLP 法による菌叢パターンを比較する。

(2)メタゲノム DNA を抽出し、ショットガンライブラリーを作製後、MiSeq システムを用いてシーケンスリードを取得し、アセンブルでコンティグ作成後、遺伝子領域を予測し、COG(Clusters of Orthologous Groups)や KEGG データベースに対する相同性検索で菌種を決定する。

(3)義歯床に付着するペリクル様タンパク質の解析として、アクリルレジン片(アクリルレジン床付着菌叢解析用)および金属片(金属床付着菌叢解析用)をろ過滅菌したヒト唾液中に一定時間挿入し、付着したペリクル様タンパク質を回収する。2次元電気泳動法で分析後、分離スポットを質量分析し PMF (Peptide MS fingerprint) 法でデータベースから網羅的に同定する。同定した付着タンパク質を各レジン付着と各金属付着とで比較し、菌叢との相関から特異的な組合せを見出し、プラーク形成に関わるペリクル成分を特定する。

## 4. 研究成果

平成 28 年度で行った実験はデンチャープラーク細菌のメタゲノム解析法による網羅的菌叢解析である。各レジン片(アクリルレジン床付着菌叢解析用)および各金属片(金属床付着菌叢解析用)を 5 名のボランティアの各唾液中に金属およびレジン試料を 1 晩浸漬した後、形成されたバイオフィーム内の細菌 DNA を抽出し、16SrRNA 増幅後、制限酵素処理し、T-RFLP 解析を行った。T-RFLP 解析のパターンを cluster 分析した結果、大きく cluster が 2 つに別れた。Co-Cr は 5 名全て Cluster I に分類され、また PGA は 5 名中 4 名で Cluster II に分類された。純チタン (CP Ti)、チタン合金 (Ti 6-7) とレジンには Cluster I に 3 試料、Cluster II に 2 試料が属していた。同一の被験者の唾液と CP Ti と Ti 6-7 とレジンの T-RFLP プロファイルは近接していた。T-RFLP プロファイルの類似性を Bray-Curtis 解析で検証した結果、CP Ti / Ti 6-7、CP Ti / レジン、Ti 6-7/レジンは高類似性を示し、PGA と Co-Cr は類似性が低かった。この実験結果から金属間で付着する菌叢が異なる可能性が示された。



平成 29 年度では次世代シーケンサーによる遺伝子配列決定法を用いてまず唾液と CP Ti に付着している菌属を同定した結果、唾液、CP Ti での付着する菌属レベルで異なっていることを確

認し(図2) 次に金属間でも異なっていることが確認された。特に Streptococcus 属が最も多い付着パターンと Neisseria 属が最も多い付着パターンと混在しているパターンに分かれた。この結果は T-RFLP での菌叢解析の結果を詳細に裏付けることになったと考えられる。金属間に付着する菌属が違うことから菌属が付着するペリクル様タンパク質も金属間で異なる可能性がある。

そこで平成 30 年度は CP Ti、Ti 6-7、Co-Cr、金銀パラジウム合金 (Ag-Pd-Au)、PGA と義歯床用レジンを用いて各種材料に付着するペリクル様タンパク質の解析実験を行った。各種材料をろ過したヒト唾液に 1 晩浸漬し、付着したペリクル様タンパク質の抽出を行い、限外ろ過法で遠心・濃縮を行った。ペリクル様タンパク質濃度を比較すると各材料ごとに付着量が異なることが示された(図3)。2次元電気泳動後、銀染色と CBB 染色を用いて、金属や義歯床用レジンに付着するペリクル様タンパク質の比較を行った。2次元電気泳動の結果より、各材料に付着するペリクル様タンパク質のスポットは、共通なものの特有なもののが検出された。このことから材料ごとに付着するペリクル様タンパク質が選択されている可能性が考えられた。

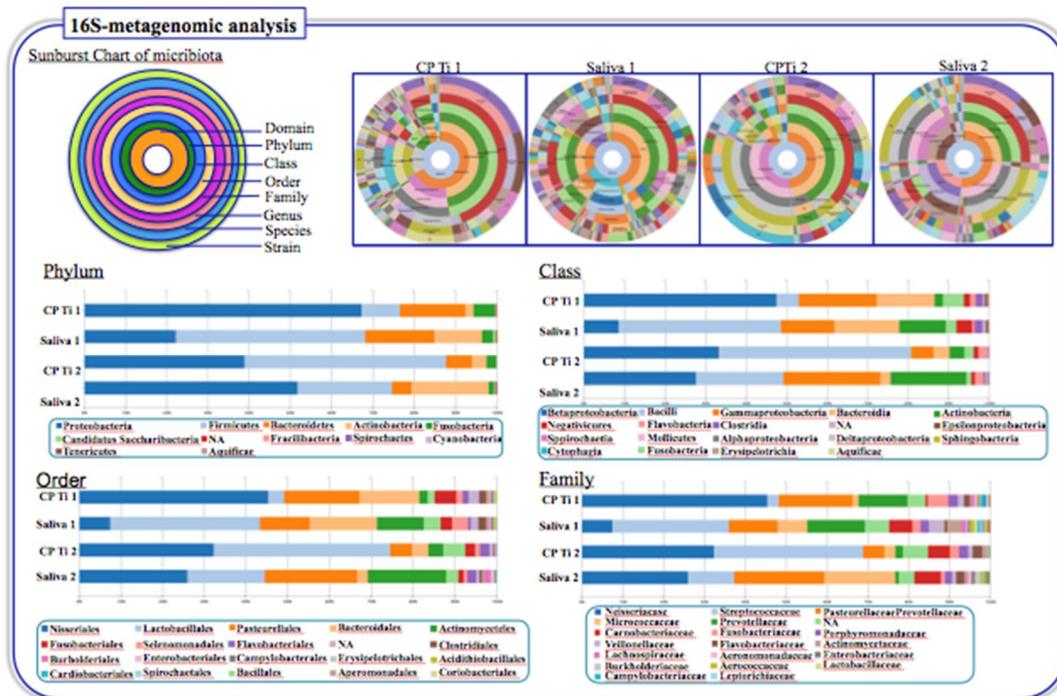


図 2

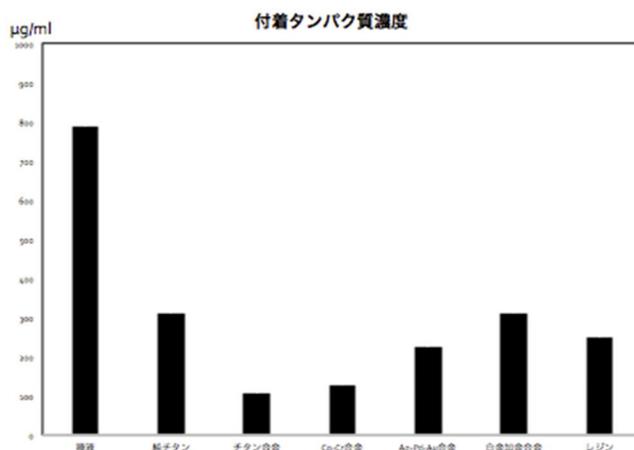


図 3

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

鳥居麻菜, 漆原 優, 大島朋子, 前田伸子, 大久保力廣. プラークモデルを使った歯科用金属に付着する口腔バイオフィルムの菌叢解析. 公益社団法人日本補綴歯科学会第 126 回学術大会. 2017 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。