

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861846

研究課題名(和文)3Dプリンタを用いた個人トレー一体型オーダーメイド歯ブラシによる菌血症予防の試み

研究課題名(英文)Prevention of bacteremia by custom-made tooth brush which was outputted by CAD/CAM.

## 研究代表者

角田 衣理加(KAKUTA, Erika)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：30585469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動脈硬化、高血圧のリスクであると捉えられはじめた歯原性菌血症の原因となる口腔細菌を3Dプリンタにて作製したオーダーメイド歯ブラシを用いて抑制し、菌血症予防ができるかを検討することを目的とした。各個人から作製した口腔模型からオーダーメイド歯ブラシの設計を行い、3Dプリンタにより出力を行った。オーダーメイド歯ブラシを用いた3DS除菌療法によりStreptococcus mutansの抑制と最高血圧の低下に有効な可能性が示唆された。また、口腔フローラ解析によるVeillonellaとFusobacteriumの割合が揮発性硫黄化合物濃度測定により迅速に予測できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Arteriosclerosis and high-blood pressure were considered as risk factors of odontogenic bacteremia. The aim of this study was to estimate the effect of custom-made tooth brush for prevention of odontogenic bacteremia.

To search for diagnostic marker of odontogenic bacteremia that 26 saliva samples of DNA extracted were examined by quantitative PCR and T-RFLP. The custom-made tooth brush was outputted by CAD/CAM. The 19 subjects were examined for salivary bacteria and arteriosclerosis test were measured at first visit and after Dental Drug Delivery System (3DS therapy) to estimate the effect of custom-made tooth brush for prevention of odontogenic bacteremia. After 3DS therapy of Streptococcus mutans counts and blood pressure was significant lower than first visit of that.

In conclusion, it suggested that the concentration of volatile sulfur compound was able to predict Veillonella and Fusobacterium ratios. And also 3DS therapy may be effective method for blood pressure control.

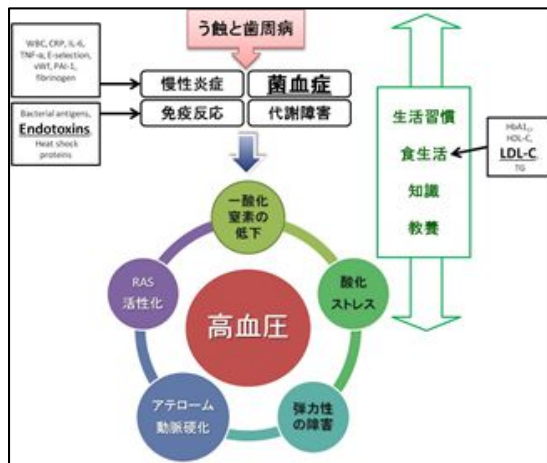
研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯原性菌血症 動脈硬化 3Dプリンタ(CAD/CAM)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の死因の2位が心疾患(15.5%)、4位が脳血管疾患(9.9%)<sup>1)</sup>であり、4人に1人が動脈硬化に起因する疾患により死亡している。また、要介護状態となった原因の第1位は脳血管疾患(21.5%)であり、社会保障費増大の要因になっている<sup>2)</sup>。したがって、日本社会において、動脈硬化の予防は急務と考えられる。近年、う蝕と歯周病のハイリスク者は、歯原性菌血症を日常的に起こしているため、動脈硬化を惹起し、ゆえに高血圧を引き起こす可能性が示唆された<sup>3)</sup>。

近年、医科系雑誌より、口腔微生物が全身の健康を脅かす原因となることを示唆する報告が増えている。既に、歯石除去の際に、一過性の菌血症が生じることはよく知られている<sup>4)</sup>。しかし、近年の報告では、日常的な歯磨きの際に生じる一時的な菌血症がアテローム性動脈硬化のリスクファクターとなる可能性が示唆されている<sup>3)</sup>。



図：菌血症による「歯原性高血圧症」の発症機序（参考文献3より一部改変）

今日まで、う蝕、歯周病の予防方法として、主に歯磨きによる物理的なプラーク除去や化学的に殺菌消毒剤を含有する洗口剤によるうがいが行われてきた。これらの方法の工

ンドポイントは、う蝕、歯周病の予防であった。2005年に口腔細菌の除菌法であるDental Drug Delivery Systemを用いて口腔細菌のコントロールを行うと、極めて短期間に口腔細菌叢が改善されることが報告されており<sup>4)</sup>、唾液検体中の病原菌数/総レンサ球菌数(比率)の改善が確認されている。本研究では、各個人用に作製したオーダーメイド歯ブラシを用いて、より効果的にプラーク除去を行い、さらに、薬剤を歯面および歯頸部に作用させることで、病原性細菌のみをターゲットとした除菌治療を行い、動脈硬化のリスクとなる微生物の血管侵入の阻止を図ることにより、全身の健康増進に寄与できるかどうかを検討する。

### 2. 研究の目的

う蝕と歯周病のハイリスク者は、歯原性菌血症を日常的に起こしているため、動脈硬化を惹起し、ゆえに高血圧のリスクであると捉えられはじめた。本研究では、歯原性菌血症の原因となる口腔細菌を3Dプリンタ(CAD/CAM)にて作製したオーダーメイド歯ブラシを用いて抑制し、菌血症予防ができるかどうかを検討することを目的とする。そのため、オーダーメイド歯ブラシをブラッシングによる物理的プラークコントロールのみならず、デンタルドラッグデリバリーシステム(3DS)による化学的プラークコントロールにも用いる。さらに、歯科診療室内で歯原性菌血症の迅速検査の指標となる項目があるかどうかを検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯原性菌血症診断マーカーの模索

歯原性菌血症の診断マーカーとして、3DS

除菌療法は、口腔細菌の制御が目的であるため、チェアサイドで実施可能な細菌迅速検査として有用な項目を見出すことを目的に、本研究に同意の得られた26名を対象に口腔細菌の代謝産物である揮発性硫黄化合物(VSC)濃度の測定と唾液中細菌の測定を実施した。

被験者には、測定当日の起床時から飲食を禁止し、プレストロン(ヨシダ、東京)、オーラルクロマ(エフアイエス、兵庫)を用いてVSC濃度の測定を行った。唾液は、5分間パラフィンガム咀嚼による刺激時唾液を吐出法にて採取した。DNA抽出には、InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)を用いた。12,000rpmで10分間遠心により、リン酸緩衝生理食塩溶液(PBS)を除去した。その後、56℃,30分インキュベート、10秒撹拌、さらに100℃,8分インキュベート、10秒撹拌し、12,000rpmで遠心後、上清を回収し、唾液細菌DNAサンプルとした。唾液細菌DNAサンプルは、qPCR法(Takara, ThermalCycler Dice Real time System SYBR® Premix ExTaqTm, PCR条件95℃10分、95℃15秒,60℃20秒40サイクル、Dissociation)により、*Prevotella intermedia*(*P. intermedia*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)、総菌数の測定を実施した。各被検菌は各々O.D.600=1.0になるように標準菌株を培養し、菌液を10<sup>8</sup>cell/ml(バクテリアカウンター血球計算盤(サンリード硝子, 埼玉))に調整し、唾液細菌DNAサンプルと同様にスタンダードカーブを作製した。

口腔フローラ解析は、T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)

はテクノスルガ・ラボ,静岡に委託し、実施した。

(2) 3Dプリンタを応用したオーダーメイド歯ブラシ作製システムの構築

個人から作製した口腔模型を用い、オーダーメイド歯ブラシの設計を行った。口腔模型より3Dデジタル情報を収集(STLファイル化)し、3Dプリンタ(CAD/CAM)により、出力を行った。

(3) 3DS除菌療法の動脈硬化予防効果の検討

本研究に同意の得られた19名を対象に、オーダーメイド歯ブラシを使用した3DS除菌療法を実施した。初診時および3DS除菌療法後に来院2時間前から飲食を禁止し、5分間パラフィンガム咀嚼による刺激時唾液を出法にて採取した唾液を用いて、細菌検査(総菌数、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*))を実施した。また、血管健康度は血圧、baPWV、ABIの測定を初診時および3DS除菌療法後に行い、動脈予防効果の検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 歯原性菌血症診断マーカーの模索

唾液細菌DNAサンプルから得られた各菌数とVSC測定の結果より、Spearmanの相関係数を算出したところ、*P. intermedia*数と(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S濃度に正の相関が認められた(表1)ことから、歯科診療室における細菌迅速検査として、VSC測定が有用な可能性が示唆された。

	H <sub>2</sub> S	CH <sub>3</sub> SH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	ブレストロン
<i>P. intermedia</i>	0.36	0.31	0.49*	0.36
<i>T. denticola</i>	0.09	0.08	0.29	0.17
<i>F. nucleatum</i>	-0.08	-0.05	0.07	0.30
総菌数	-0.07	-0.27	-0.06	0.05

(Spearman の相関係数、\* :  $p < 0.05$ )

表 1 : リアルタイム PCR による各菌数と VSC の相関係数

次に T-RFLP による口腔フローラ解析の結果を図 1 に示す。

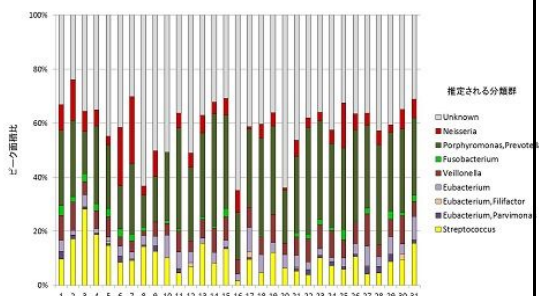


図 1 : 口腔フローラ解析の結果

口腔フローラ解析によるピーク面積 (%) と VSC 測定の結果より、Spearman の相関係数を算出した。その結果、*Veillonella* と *Fusobacterium* は VSC 値と相関が認められたことから、歯科診療室における細菌迅速検査として、VSC 測定が有用な可能性が示唆された(表 2)。

(2) 3D プリンタを応用したオーダーメイド歯ブラシ作製システムの構築

個人から作製した口腔模型を用い、オーダーメイド歯ブラシの設計を行い、口腔模型より 3D デジタル情報を収集 (STL ファイル化) し、3D プリンタ (CAD/CAM) により、出力を行い、図 2 に示すオーダーメイド歯ブラシを

制限酵素 ( <i>Msp</i> )	H <sub>2</sub> S	CH <sub>3</sub> SH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	ブレストロン
<i>Streptococcus</i>	0.12	0.04	0.05	0.15
<i>Eubacterium, Parvimonas</i>	0.49*	0.37	0.41*	0.48*
<i>Eubacterium, Filifactor</i>	-0.13	0.01	0.11	0.00
<i>Eubacterium</i>	-0.20	-0.09	-0.27	-0.47*
<i>Veillonella</i>	0.54*	0.40*	0.53*	0.38
<i>Fusobacterium</i>	0.49*	0.48*	0.41*	0.65*
<i>Porphyromonas, Prevotella</i>	0.29	0.25	0.26	-0.08

(Spearman の相関係数、\* :  $p < 0.05$ )

表 2 : 口腔フローラ解析によるピーク面積 (%) と VSC の相関

得た。



図 2 : 3D プリンタ (CAD/CAM) により出力されたオーダーメイド歯ブラシ

(3) 3DS 除菌療法の動脈硬化予防効果の検討

3DS 除菌療法開始前と比較して、3DS 除菌療法後に *S. mutans* 菌数が減少 (Wilcoxon 検定,  $p < 0.01$ ) し、上腕最高血圧が低下した (Wilcoxon 検定,  $p < 0.05$ ) (表 3)。

	<i>S.mutans</i> 菌数	上腕最高血圧
3DS 除菌療法開始前	4800(1470-13200)	130(125-137)
3DS 除菌療法後	720(0-3900)	125(117-133)
<i>p</i> 値	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05

(Wilcoxon 検定)

表 3：3DS 除菌療法前後の *S. mutans* 菌数と上腕最高血圧の比較

以上のことから、オーダーメイド歯ブラシによる 3DS 除菌療法は、*S. mutans* の抑制と最高血圧の低下に有効な可能性が示唆された。また、口腔フローラ解析による *Veillonella* と *Fusobacterium* の割合が揮発性硫黄化合物濃度測定により迅速に予測できる可能性が示唆された。

<引用文献>

平成 23 年 人口動態統計月報年計(概数)の概況, 厚生労働省

平成 22 年国民生活基礎調査の概況, 厚生労働省

Periodontitis and blood pressure: the concept of dental hypertension. Tsioufis C, Kasiakogias A *et al.*: Atherosclerosis. 219 p.1-9, 2011.

Bacteraemia following periodontal procedures. Denis F. Kinane<sup>1</sup>, Marcello P. Riggio *et al.*: J Clin Periodontol. 32 p.708-13, 2005.

Hiroaki Takeuchi, Kazuo Fukushima *et al.*: Clinical study of mutans streptococci using 3DS and monoclonal antibodies. Japanese Journal of Infectious Diseases, 54:34-36, 2001.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Morozumi T, Nakagawa T, Nomura Y, Kakuta E, *et al.* Salivary pathogen and serum antibody to assess the progression of chronic periodontitis: a 24-mo prospective multicenter cohort study. J Periodontal Res. 査読有,2016 Jan 20.

doi: 10.1111/jre.12353. [Epub ahead of print]

Otsuka R, Imai S, Kakuta E, *et al.* Application of chimeric glucanase comprising mutanase and dextranase for prevention of dental biofilm formation. Microbiol Immunol. 査読有,2015;59:28-36. doi: 10.1111/1348-0421.12214.

〔学会発表〕(計 4 件)

武内博朗, 河野結, 角田衣理加, 他. 咀嚼機能回復と保健指導の組み合わせによる体組成・栄養の改善に関する研究. 第 64 回口腔衛生学会総会(つくば国際会議場、茨城県つくば市) 2015.5.27-29.

山田秀則, 角田衣理加, 岡田彩子, 他. 全身的な健康を歯科から考える"予防医科"としての概念を歯科へ『3DS 除菌外来』の試み(第二報). 第 64 回口腔衛生学会総会(つくば国際会議場、茨城県つくば市) 2015.5.27-29.

野邑浩美, 井田亮, 角田衣理加, 他. 唾液検査と歯面除菌清掃法(3DS)を併用した定期管理の 10 年間の評価. 第 64 回口腔衛生学会総会(つくば国際会議場) 27.5.27-29.

角田衣理加, 山田 秀則, 岡田 彩子, 他.

全身的な健康を歯科から考える"予防医科"  
としての概念を歯科へ『3DS 除菌外来』の試  
み(第一報). 第 63 回口腔衛生学会総会(熊本  
市民ホール、崇城大学ホール、熊本県熊本市)  
2014.5.29-31.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

角田衣理加 ( KAKUTA, Erika )

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号 : 30585469