

令和元年6月11日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17188

研究課題名（和文）MPCポリマーコーティング義歯による口腔内細菌バイオフィルム抑制効果の網羅的検証

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of the antiadhesive action of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine coating on an acrylic resin denture base material

研究代表者

高橋 那奈（TAKAHASHI, NANA）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：80635061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまで”汚れない義歯（入れ歯）”の開発を目指し、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）ポリマーを義歯にコーティングし細菌繁殖を防ぐ研究を行ってきた。本申請では上顎全部床義歯（総入れ歯）装着者22人の義歯に付着するプラーク内の細菌種の解析、MPCコーティング前後の細菌種の変化の解析を主に行った。

その結果、義歯に付着するプラークは歯に付着するプラーク内の細菌と同様に通性嫌気性菌という種類の細菌が多く、誤嚥性肺炎の原因菌も被験者全員から検出された。また、コーティング前後でプラーク内の細菌種に変化はなく、コーティングにより疾患を誘発する可能性は低いということがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまでも2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）ポリマーを義歯（入れ歯）にコーティングし、”汚れない義歯”の開発を目指してきた。その際には1種類の口腔内細菌を選択し、それに対してのMPCポリマーの効果を分析していた。

今回のように実際の義歯に付着する細菌類をまず特定し、それらに対してのMPCポリマーの働き（例えば特定の菌への効果の有無等）をみることであったことは、今後のMPCポリマーの臨床応用へ向けた貴重なデータとなりうると言える。

研究成果の概要（英文）：We have been conducting research to prevent bacterial growth by coating 2-methacryloyloxyethyl phosphoryl choline (MPC) polymer on dentures with the aim of developing "clean dentures". In this application, analysis of bacterial species in the plaque adhering to the dentures of 22 people wearing the maxillary full dentures and those changes before and after MPC coating were mainly performed.

As a result, there were many facultative anaerobes in denture plaque as well as in the plaque adhering to the teeth, and the causative bacteria of aspiration pneumonia were also detected in all the subjects. Moreover, it turned out that there is no change of the bacterial species in the denture plaque before and after coating, and that the coating is less likely to cause disease.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：MPC 義歯 デンチャープラーク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の急速な高齢化の進展により、可撤性義歯による治療の需要は増え続けている。義歯使用者における重要な問題点として、細菌やプラーク等が付着することにより、残存歯のう蝕や歯周病、口腔粘膜の炎症、さらには全身状態の低下した者では誤嚥性肺炎の原因となりうるものが挙げられる。また、要介護者や認知症患者の増加もあり、義歯を含む口腔衛生状態はますます悪化していると言える。肺炎は我が国の死因第3位となっており、国民の健康の維持増進のためには、可撤性義歯を介した口腔内からの感染リスクを軽減させることは急務である。(Iinuma T et al. J Dent Res 2015)

申請者は生体適合性材料である MPC(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)に注目し、東京大学大学院工学系研究科石原研究室との連携の下、この MPC を義歯床表面にコーティングすることを想定して、様々なコーティング方法を研究してきた。

まず、グラフト重合法により共有結合を持つブラシ状の密な MPC コーティングを基板表面に施し、強固なバイオフィルムを形成するとされる *S.mutans* のバイオフィルム形成を抑制し、またブラシ刷掃を想定した機械的刺激に対しても耐久性を持つことを示した。(J.Prosthet. Dent. 112 (2014) 194-203.) しかし、重合法の煩雑さやコスト的な問題により歯科臨床での実用化が困難であったため、より簡便な方法でアクリル基板と共有結合が可能な PMBPaz(Poly-(MPC-co-n-butylmethacrylate(BMA)-co-2-methacryloyloxyethyl oxy-p-azidobenzoate) ACS. Appl. Mater. Interfaces. 5 (2013) 6832-6836.)を用い、*S.mutans* バイオフィルム形成が約 90%抑制されることを見出した。(論文投稿中) これにより PMBPaz の有効性が確認されたことから、実際の患者の使用する義歯床表面においてもバイオフィルム形成量に変化があるかについても検証を行い、PMBPaz コーティングをした義歯ではバイオフィルム形成が約 80%抑制された。(論文投稿中)

2. 研究の目的

これまでの申請者らの研究では、強固なバイオフィルムを形成し、培養等の手技も比較的容易な *S.mutans* を主に用いてバイオフィルム形成量を検証してきた。しかし口腔内細菌叢には他の細菌や真菌等の多くの微生物が含まれている。そこで実際に患者の義歯表面に存在するそれらの微生物に対し MPC ポリマーコーティングが有効であるかを網羅的に検証する必要があり、その検証結果を元により効果を向上させる方法等についても開発していく必要があると考えた。

3. 研究の方法

【MPC ポリマーコーティングの有効性の網羅的検証】(平成 29 年度)

(1) デンチャープラークの採取

研究の主旨に同意を得られた義歯装着患者の義歯床表面から、デンチャープラークを採取する。

・対象者：昭和大学歯科病院補綴歯科外来に通院する全部床義歯装着患者 50 名

・採取部位：全部床義歯粘膜面

(2) デンチャープラークに含まれる微生物種および構成割合の解析

採取したプラークに含まれる微生物の DNA を抽出後、次世代シーケンズ解析を行い、デンチャープラーク中の微生物の種類や構成割合を検出する。

(3) MPC ポリマーコーティングの有効性検証実験に用いる微生物の選定

(2) の解析において、構成割合の高かった上位 5 種をデンチャープラークに含まれる主な微生物として選定する。

(4) 基板を使用したバイオフィルム形成試験

選定されたデンチャープラーク中の各微生物に対し、MPC ポリマーコーティングによってどの程度バイオフィルム形成を抑制できているかを検証するため、バイオフィルム形成試験を行う。具体的には、義歯床用アクリルレジン製基板を製作し、表面に PMBPaz を紫外線重合にてコーティングする。この基板上でそれぞれの微生物を一定期間培養し、形成されたバイオフィルムを採取し、吸光度測定にて定量する。

(5) MPC ポリマーコーティングの有効性の評価

(4) の結果を元に、デンチャープラーク内の様々な微生物に対し、MPC ポリマーコーティングがどの程度有効であったかを、統計解析等を行い評価する。

【MPC ポリマーコーティングの改良】(平成 30 年度)

(1) 微生物の付着機構の検証

平成 29 年度で行った MPC ポリマーコーティングの有効性の網羅的検証の結果を元に、MPC ポリマーコーティングがあってもバイオフィルム形成量が他と比較して多い微生物が存在する場合には、その原因を検証していく。具体的には、微生物が物質表面に付着する際に必要なタンパク質や糖等を同定し、MPC ポリマーコーティングをした基板表面上でタンパク質吸着試験や糖吸着試験を行い、どの程度の吸着がみられるかを解析する。また表面の親水性、疎水性の違いによって微生物の付着程度にどの程度差があるか等も確認する。

(2) MPC ポリマーコーティングの改良のための基礎的研究

(1) で得られた結果を元に、より微生物が付着しにくくバイオフィルム形成を抑制できるような MPC ポリマーコーティングを得るべく、改良されたシステムの開発を目指す。MPC はメタ

クリロイル基を持つことから、様々なモノマーとの重合性に富んでいる。この性質を利用し、微生物の付着に関わる物質を阻害するようなモノマーを探索し、MPC と共重合させる基礎的研究を行う。

(3) 新たな MPC ポリマーコーティングの有効性の検証

基礎的研究によって開発された新たな MPC ポリマーは、義歯床用アクリルレジンへのコーティング方法やコーティング後のバイオフィーム形成抑制能等を検証し、評価していく。

4. 研究成果

研究期間を通じて主に MPC ポリマーコーティングの有効性の網羅的検証について成果を得ることができた。

実験では、上顎全部床義歯を装着中の患者 22 人に対し、義歯清掃状態に関するアンケート、デンチャープラークの 16SrRNA シークエンス解析、義歯へ MPC ポリマー (PMBPAz) コーティング、細菌叢多様性解析 (Shannon 指数)・類似性解析 (Bray-Curtis 指数) を行った。その結果、被験者のデンチャープラーク細菌叢から歯周病原菌や感染性心内膜炎原因菌はほぼ検出されなかったが、誤嚥性肺炎原因菌属が全員から検出された。また、構成細菌の多様性とアンケート結果との相関をみると、義歯洗浄剤の使用回数や義歯清掃頻度が高い患者は Shannon 指数が低い強い相関が認められた。夜間に義歯を装着している患者はそうでない者に比べ有意に Shannon 指数が低くなった。義歯清掃状態が良好であるほどデンチャープラークの多様性は低く未熟な細菌叢であり、成熟プラークにみられるような歯周病に関与する菌が少なくなっていると考えられる。さらに、PMBPAz コーティング前後の細菌叢の類似性を比較すると、コーティング前後でデンチャープラーク細菌叢の類似性は高くプラーク内の恒常性が維持されていると考えられる。これらの結果から、上顎全部床義歯のデンチャープラーク細菌叢は、デンタルプラーク細菌叢と同様に通性嫌気性菌が半数以上を占める、義歯清掃状態が良好なほどデンチャープラークは構成細菌叢の多様性は低く、デンタルプラークの形成初期段階と類似した細菌叢である、PMBPAz コーティングはデンチャープラーク内の恒常性を変化させないため、細菌叢の変化による疾患誘発性は低いと考えられる、という結論を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Tsukahara A, Ikeya K, Iwasa F, Morisaki H, Fukunishi M, Takahashi N, Kuwata H, Baba K

Analysis of bacterial flora in denture plaque by NGS
International Association for Dental Research(国際学会)
2018 年

塚原明弘, 池谷賢二, 岩佐文則, 福西美弥, 久志本那奈, 馬場一美
デンチャープラーク細菌叢の 16SrRNA メタゲノム解析
日本老年歯科医学会 第 29 回学術大会
2018 年

塚原明弘, 池谷賢二, 岩佐文則, 森崎弘史, 福西美弥, 高橋那奈, 桑田啓貴, 馬場一美
次世代シーケンサーによるデンチャープラーク細菌叢の解析
日本補綴歯科学会 第 8 回学術大会
2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。