

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10216

研究課題名(和文) 要介護高齢者および健常高齢者に装着された義歯に付着したマイクロバイオームの検討

研究課題名(英文) Analysis of microbiome organized on denture base of older adults

研究代表者

竜 正大 (RYU, MASAHIRO)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：20549985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PCoA解析の結果、属レベルでは床用材料であるアクリルレジン、コバルトクロム合金と、天然歯を想定したハイドロキシアパタイトの3種の試料片上の微生物叢は類似しStreptococcus属やNeisseria属の菌が多数を占めていた。これらはデンタルプラークの形成過程の初期に多くみられる菌である。今回試料片上にはデンタルプラークと似た組成のプラークが形成されていたと考えられる。これに対し、唾液サンプルと各種試料片から得たサンプルとは形成される微生物叢が異なっていた。唾液中には浮遊菌が多くを占めるが、歯や義歯床上の微生物は材料への付着性を持つ菌の割合が多いため、微生物叢が異なったものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの義歯に付着した微生物を検索する研究は、主に特定の微生物もしくは微生物の総数を検討することによって行われており、どのような組成のバイオフィルムが義歯表面に形成されているかについては十分明らかでなかった。今回、16s rRNAシーケンサーを用いて義歯床用材料に形成されたマイクロバイオームを詳細に解析したことで、義歯に付着した微生物叢が唾液の微生物叢と異なり、デンチャープラークと類似していることが明らかとなった。この結果により、義歯清掃のアプローチ法について、デンタルプラークへのアプローチを参考に詳細に検討することが可能になると考えられ、学術的意義の高い研究であったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：By the analysis at genus level of a principal coordinate analysis plot, there were no difference of microbiome on the materials of acrylic resin or cobalt-chromium alloy, which are denture base materials and hydroxyapatite, which is supposed to be natural teeth was found. In particular, Streptococcus and Neisseria spp. were the majority. These bacteria are common in the early stages of dental plaque formation. It is suggested that denture plaque having a composition similar to that of dental plaque was formed on the materials. On the other hand, there were differences in the microbiome between that in saliva and on three kinds of materials. Saliva contains floating bacteria. On the other hand, the microbes on the teeth and denture base have a high proportion of bacteria that adhere to the material, so it is considered that the microbial flora was different.

研究分野：医歯薬学

キーワード：デンチャープラーク 口腔微生物 義歯 高齢者

### 1. 研究開始当初の背景

肺炎は高齢者の死亡原因の第3位を占め、中でも唾液の不顕性誤嚥がその発症原因の1つである誤嚥性肺炎が多くを占めている。口腔微生物は齲蝕や歯周病のみならず誤嚥性肺炎などの全身疾患の発症に関与しており、感染制御の観点からも口腔微生物を制御することが重要であると考えられる。高齢者の口腔内では若年者と比較して、顎堤吸収や口腔粘膜の菲薄化といった物理的变化に加え、口腔マイクロバイーム(微生物叢)の変化が生じていることが報告されている<sup>1)</sup>。研究者らはこれまでに、唾液中微生物数に舌苔やデンチャープラークが関与し<sup>2)</sup>、舌や義歯が口腔微生物のリザーバーとなる可能性を報告してきた<sup>1)</sup>。高齢者においては、歯の喪失に伴い義歯などの補綴装置を装着している人が多く、また加齢に伴い装着する装置も大型化する傾向にある。特に要介護高齢者では、口腔衛生状態の悪化に伴い清掃不良の義歯を装着していることも多く、義歯が口腔微生物の温床となっている可能性が高い。

誤嚥性肺炎の発症には舌苔のマイクロバイームが関係することが明らかとなっているが<sup>3)</sup>、義歯に付着する微生物に関する研究は特定の微生物に対する検討にとどまっており、義歯のマイクロバイームの組成や関与については十分明らかとなっていない。また、要介護高齢者などに装着された清掃状態の不良な義歯のマイクロバイームが清掃状態の良好な義歯と異なるのかについても明らかとなっていないのが現状である。

研究代表者らは義歯の装着が口腔マイクロバイームに与える影響に着目し、16s rRNA シークエンサーを用いて要介護高齢者と健常高齢者それぞれに装着された義歯表面のマイクロバイームを解析し、義歯の清掃状態の違いによる影響を検討することとした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、要介護者と健常高齢者それぞれの義歯表面に付着した口腔マイクロバイームの組成を明らかにし、義歯の清掃状態の違いによる影響を検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象者

当初、要介護高齢者および健常高齢者を対象として義歯表面からサンプルを採取する予定であったが、新型コロナウイルス感染症の拡大のために研究協力施設からの立ち入り制限等がかり、予定していた研究協力施設における要介護高齢者からの試料採取が行えない状況が続いた。また、健常高齢者からの試料採取に関しても、同じく新型コロナウイルス感染症の状況によって満足に行えない状況となり、当初の研究計画を完了することが現実的に難しい状況となった。そのため、研究計画を一部変更して健常者10名(平均年齢 $28 \pm 1.73$ 歳)を被験者として追加し、義歯床用レジン試験片に付着した口腔マイクロバイームの解析を行って、本研究目的である義歯に付着した口腔微生物叢についての検討を行うこととした。

#### (2) 口腔微生物叢の解析

各種床用材料の試料片を付着させた上顎用口腔内アプライアンスを被験者に装着させ、形成された微生物叢を解析した。試料片は、床用材料であるアクリルレジン(PMMA)とコバルトクロム合金(Co-Cr)と、天然歯を想定したハイドロキシアパタイト(HA)の3種類を用いた。試料は、直径5mm、厚さ2mmの円盤状ディスクに成形した。また、比較対象として安静時唾液についても検討した。

各種義歯床用材料について試料片を頬面に付着させた口腔内アプライアンスを48時間、食事時とブラッシング時以外装着させた(図1)。装着期間後、試料片を採取し、vortexにより試料片からの微生物を剥離させた。そして微生物のDNAを抽出後に、PCRにて16s rRNA coding領域(V3-V4領域)を増幅し、Miseqを用いて各試料片に付着した微生物叢の解析を行った。各試料片の微生物叢の内訳であるOperational Taxonomic Unit(OTU)を求め、各材料について主座標分析PCoA解析を行った。また、各試料上の細菌の属および種レベルでのOTU値に対し、Kruskal-Wallis検定を行った( $\alpha=0.05$ )。



図1 試料片を付着させた口腔内アプライアンス

#### 4. 研究成果

PCoA 解析の結果、属レベルでは床用材料であるアクリルレジン (PMMA) とコバルトクロム合金 (Co-Cr) と、天然歯を想定したハイドロキシアパタイト (HA) の 3 種の試料片上の微生物叢は類似し、微生物叢中の割合としては *Streptococcus* 属や *Neisseria* 属の菌が多数を占めていた (図 2)。これらの菌は、デンタルプラークの形成過程の初期に多くみられる菌である。そのため、今回試料片上にはデンタルプラークと似た組成のプラークが形成されていたと考えられる。この結果は、ペリクルにより材料表面が被覆されたことにより、異なった素材に類似したマイクロバイオームが形成されたことを示唆している。

これに対し唾液サンプルと各種試料片から得たサンプルとでは、形成される微生物叢が異なっていた。唾液中には浮遊菌が多くを占めるが、歯や義歯床上の微生物は材料への付着性を持つ菌の割合が多くなったため、唾液と試料片上の微生物叢が異なると考えられる。

種レベルの検討では、PMMA は Co-Cr および HA との間で *Streptococcus* 属の組成が異なっていた。これは、材料の表面特性の違いがペリクルの微細構造に影響を与えたために、種レベルで材料ごとに付着しやすい菌が異なったものと考えられるが、詳細については今後更なる検討を行う必要がある。

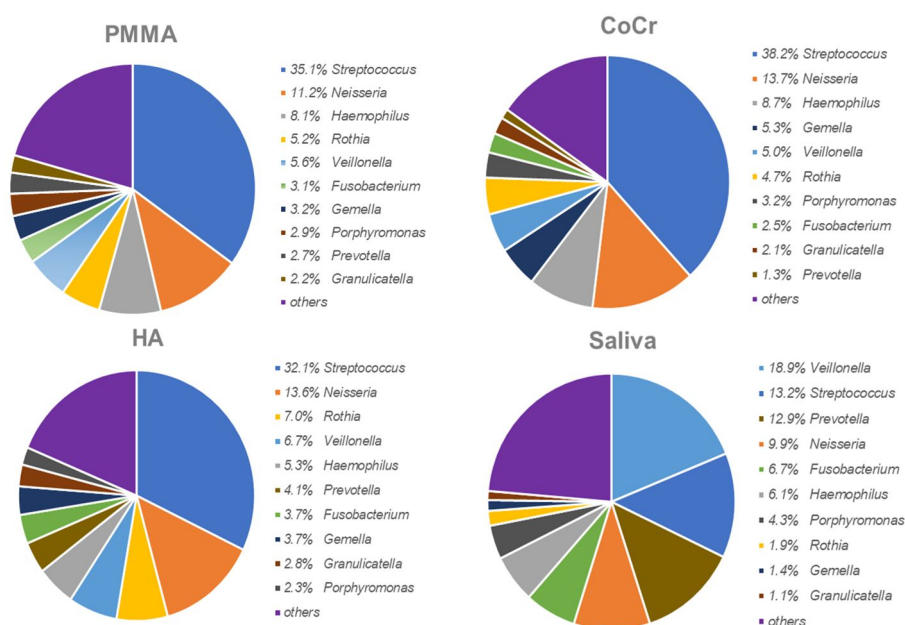


図 2 属レベルでの微生物叢

本研究結果より、義歯床用レジン表面がペリクルにより被覆され、デンタルプラークと類似したマイクロバイオームが形成されることが示唆された。このことは、義歯を入れるだけでは微生物叢には大きな悪影響を与えないこと、清掃状態の不良な義歯への清掃はデンタルプラークへのアプローチを参考とすることへの根拠になるとも考えられる。

#### < 引用文献 >

- 1) Yasui M, Ryu M, Sakurai K, Ishihara K. Colonisation of the oral cavity by periodontopathic bacteria in complete denture wearers. *Gerodontology*. 2012, 29: e494-502.
- 2) Ryu M, Ueda T, Saito T, Yasui M, Ishihara K, Sakurai K. Oral environmental factors affecting number of microbes in saliva of complete denture wearers. *J Oral Rehabil*. 2010; 37: 194-201.
- 3) Kageyama S, Takeshita T, Furuta M, Tomioka M, Asakawa M, Suma S, et al. Relationships of Variations in the Tongue Microbiota and Pneumonia Mortality in Nursing Home Residents. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018 Jul 9;73: 1097-1102.
- 4) Idoji S, Mori T, Maeda Y, Okada M, Nokubi T, Okuno Y, Makishima, T, Hayashi, K. Cleaning and maintenance of removable prosthetic Appliances. Part1. *J Jpn Prosthodont Soc*. 1991; 35: 290-292.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryu Masahiro, Oki Takeshi, Ohta Midori, Sakurai Kaoru, Ueda Takayuki	4. 巻 62
2. 論文標題 Effect of Lip-seal Resistance Training on Lip-seal Strength in Young Adults	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Bulletin of Tokyo Dental College	6. 最初と最後の頁 163 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2209/tdcpublication.2020-0058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryu Masahiro, Ueda Takayuki, Sakurai Kaoru	4. 巻 71
2. 論文標題 An Interprofessional Approach to Oral Hygiene for Elderly Inpatients and the Perception of Caregivers Towards Oral Health Care	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Dental Journal	6. 最初と最後の頁 328 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.identj.2020.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竜正大, 根津裕一, 石原和幸, 櫻井薫
2. 発表標題 義歯床用材料に付着したマイクロバイオームの16s rRNA シークエンサーを用いた網羅的検討
3. 学会等名 第307回東京歯科大学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 壮, 竜 正大, 上田貴之
2. 発表標題 義歯洗浄用ジェルを使用した清掃が義歯床用アクリルレジン表面粗さに与える影響
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第130回記念学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石原 和幸  (ISHIHARA KAZUYUKI)  (00212910)	東京歯科大学・歯学部・教授   (32650)	
研究 分担者	上田 貴之  (UEDA TAKAYUKI)  (20366173)	東京歯科大学・歯学部・教授   (32650)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------