

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2022
課題番号：19K19084
研究課題名（和文）義歯への微生物の付着抑制がフレイルの予防に与える効果についての前向き介入研究

研究課題名（英文）The effect of reducing microbial adhesion to dentures on frailty prevention

研究代表者
高草木 謙介（Takakusaki, Kensuke）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：90804584
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）：研究当初の目的とは少々ずれが生じたが、過酢酸製剤による義歯床用レジン上のバイオフィルム殺菌効果および光重合型リライン材に対する *C. albicans* 付着の評価を行い、学術大会にて報告した。
義歯床用材料上に形成した *C. albicans* バイオフィルムを過酢酸溶液に浸漬し、評価した。浸漬後にバイオフィルム量が減少し、顕微鏡画像からは、死細胞となっている菌が多く見られた。光重合型リライン材に対する評価に関しては表面性状と *C. albicans* の初期付着の検証を行った。表面粗さは他の材料と有意差を認めず、硬さは光重合型が高かった。また、光重合型に付着した生菌数は有意に少なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、身体・認知機能の低下により義歯を十分に清掃できない高齢者は増加している。義歯に付着するバイオフィルムの中でも *Candida albicans* は義歯性口内炎や誤嚥性肺炎の原因菌となり、付着したバイオフィルムを除去することは同疾患の治療および予防となる。バイオフィルム除去の方法は、ブラシによる機械的清掃と薬液による化学的清掃に大別されるが、高齢の義歯装着者は機械的清掃が不十分な場合も散見される。このような場合は化学的清掃に頼ることになるが、現在までに化学的清掃のみで十分な方法は確立されていない。本研究では新たな義歯清掃方法の開発により高齢の義歯装着者のQoLの改善に寄与できると考える。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the effect of peracetic acid for disinfection of *C. albicans* biofilms formed on denture base resin (PMMA) and the adhesion of *C. albicans* to the light-cured denture base relining material.
C. albicans biofilms on PMMA were immersed in peracetic acid solution. The amount of biofilm decreased after immersion, and microscopic images showed many dead cells.
The surface properties of the light-cured relining material and the initial adhesion of *C. albicans* were verified. There was no significant difference in surface roughness compared to other materials, and hardness was higher in the light-cured type. The number of viable cells were decreased.

研究分野：歯科補綴学

キーワード： *C. albicans* 義歯性口内炎 デンチャーブランク 補綴 歯科

1. 研究開始当初の背景

これまでに生活習慣病の予防は健康長寿に重要であるといわれてきたが、フレイルが原因で要介護に陥ることも多く、その予防及び進行抑制は喫緊の課題である。フレイルは健康から要介護へ移行する中間の段階と言われおり、体重減少、主観的疲労感、日常生活活動量の減少、身体能力の減弱、筋力の低下などが主な症状である。これらの評価基準の5つの項目のうち、3項目以上該当した場合をフレイル、1~2項目該当した場合を前フレイル、該当項目が0の場合は健康と定義される。フレイルの進行は可逆的であり、早い時期に兆候を発見し、適切な対応をとることで機能の低下を遅らせ健康な状態に戻すことが可能であると考えられている。従って、フレイルの予防及び進行抑制により高齢者の健康寿命の延長を期待できる。

フレイルの発症には多因子が関与していると考えられているが、口腔内環境の悪化が一つの原因であると報告されている。また、最近ではフレイルの評価基準の一つである体重の低下と口腔内のカンジダ属真菌の存在との関連が報告されている。そこで、本研究では、微生物付着抑制効果を持つ義歯を用いた前向き介入研究を行うことで、義歯表面への微生物付着抑制がフレイルの予防や進行抑制に与える影響を検討できないか考えた。

義歯表面に付着する口腔内微生物由来の汚れであるデンチャープラーク中にはカンジダ属真菌が頻りに検出される。申請者は、新規親水性ポリマーであるスルホベタインメタクリルアミド(SBMAM)をコーティングした義歯床用レジンに着目し、SBMAMコーティングした義歯床用レジン表面への *C. albicans* の初期付着が抑制されることを報告した。また、SBMAMは歯科材料として既に臨床で使用されている HEMA や TEGDMA のような物質よりも細胞毒性が低いことが報告されている。本研究ではこれらの結果を踏まえ、前向き介入研究を行うことで義歯表面への微生物付着の抑制が口腔内環境を改善し、フレイルの予防及び進行抑制となりうるかを検証することとした。

2. 研究の目的

研究開始当初の目的は、義歯清掃が不十分な前フレイル期の患者に対し SBMAM コーティングした義歯を装着し前向き介入研究を行うことで、義歯への口腔内微生物の付着の抑制がフレイルの予防および進行抑制に与える効果について明らかにすることであった。

しかしながら、研究期間中に、コロナウイルス感染拡大防止の観点から、計画を変更し実験室内で実行可能な研究計画を立案しなおした。まず、過酢酸製剤を用いて義歯上に形成された *C. albicans* のバイオフィルムの殺菌効果を検討することとした。さらに、新規開発された光重合型リライン材に対する *C. albicans* 付着の評価についての研究を行った。本研究では、光重合型および化学重合型リライン材の表面性状を調査し、*C. albicans* 付着の影響を検討した。

3. 研究の方法

過酢酸製剤による義歯床用レジン上のバイオフィルム殺菌効果の検証については、加熱重合型義歯用ポリメチルメタクリレート (PMMA) のプレートを作成し、*C. albicans* の酵母型菌体をプレート上に初期付着させた。48時間培養し、プレート上にバイオフィルムを形成した。500ppm 過酢酸溶液、ポリドント溶液、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に各々5分間浸漬し、付着したバイオフィルムをこすり取り、CFU assay にてバイオフィルムを定量化した。また、蛍光染色したものを共焦点顕微鏡にて、固定・乾燥後のプレートを走査型電子顕微鏡 (SEM) にて視覚的に観察した (図1)。

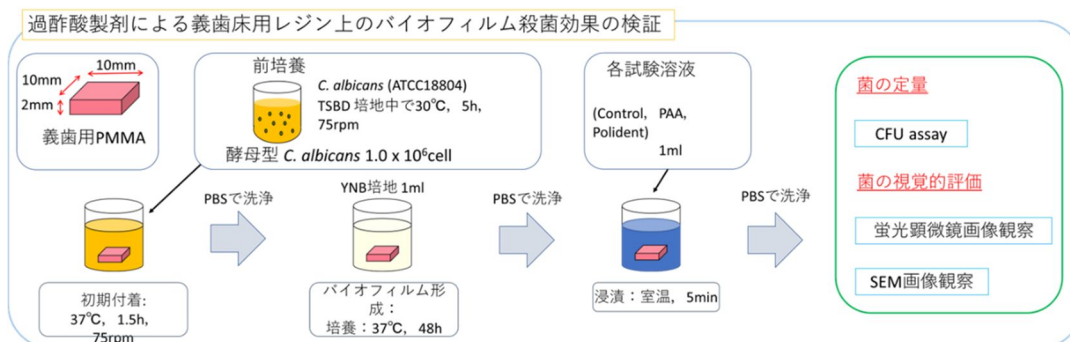


図1 過酢酸製剤による実験の概略図

光重合型リライン材に対する *C. albicans* 付着の評価では、試料は化学重合型および光重合型リライン材、PMMA の 3 種類を用い、重合直後および 24 時間後を用意した。表面性状は、表面粗さとビッカース硬度を測定した。微生物付着試験は、*C. albicans* の菌液を各試料に接種後 24 時間培養し、試料に付着した生菌の ATP 量測定を行った。また、付着した細胞を蛍光染色後に蛍光顕微鏡で視覚的に菌の様子を観察した (図 2)。

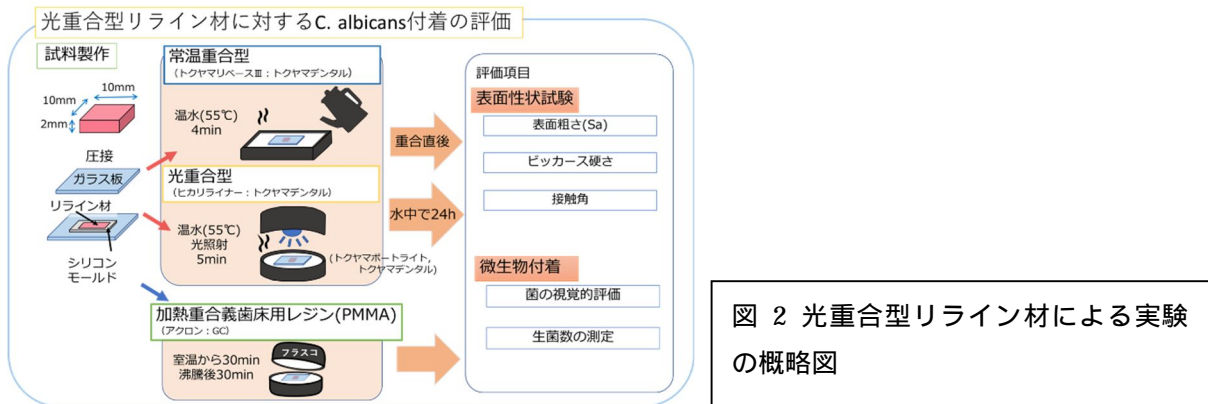


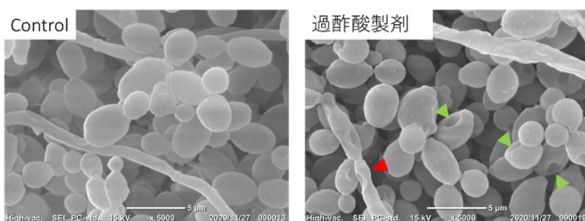
図 2 光重合型リライン材による実験の概略図

4. 研究成果

研究当初の目的とは少々ずれが生じてしまったが、過酢酸製剤による義歯床用レジン上の殺菌効果の検証および光重合型リライン材に対する *C. albicans* 付着の評価を行い、その結果を日本補綴歯科学会第 130 回記念学術大会、令和 4 年度 日本補綴歯科学会 東京支部学術大会にてそれぞれ成果報告を行った。

結果としては、過酢酸溶液では PBS に浸漬した群と比較して有意にコロニー数が減少した。ポリドント溶液は PBS と比較してコロニー数が減少したものの有意差はなかった。過酢酸溶液とポリドント溶液の間にも有意差はなかった。共焦点顕微鏡画像・SEM 画像から過酢酸溶液は死細胞となっている菌の数が多く、特に *C. albicans* の酵母型と菌糸型の両形態を死滅させていた。一方で、ポリドントでは酵母型が主に死滅することが観察された。以上の結果より、過酢酸溶液が義歯表面上の *C. albicans* バイオフィルムの新たな殺菌方法となりうることを示唆された (図 3)。

SEM 画像



▶ : 損傷が認められる部位 (酵母型)
 ▶ : 損傷が認められる部位 (菌糸型)

図 3 バイオフィルムの SEM 画像

光重合型リライン材に対する評価に関しては下記のとおりである。各リライン材の表面粗さには有意差を認めず、硬さは化学重合型よりも光重合型が有意に高かったが PMMA より低い値を示した。光重合型に付着した生菌数は重合直後、24 時間後ともに化学重合型、PMMA よりも有意に少なかった。また、蛍光顕微鏡による観察では、化学重合型の重合直後において酵母型菌体の凝集が確認された。光重合型では酵母型菌体は認めるものの凝集は認められず、付着量もわずかであった (図 4)。研究期間全体を通じて、義歯床用材料に付着する微生物を抑制することで新たな義歯清掃方法の開発を行うことを目指し、研究を行った。

蛍光顕微鏡画像

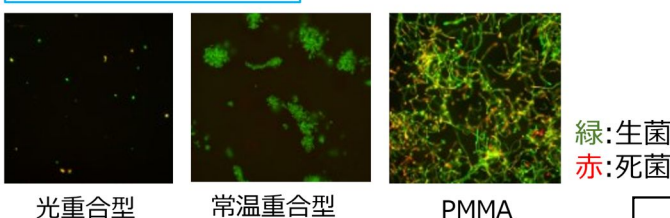


図 4 共焦点顕微鏡画像

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 2件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Tsutsumi-Arai Chiaki, Takakusaki Kensuke, Arai Yuki, Terada-Ito Chika, Takebe Yusuke, Imamura Takahiro, Ide Shinji, Tatehara Seiko, Tokuyama-Toda Reiko, Wakabayashi Noriyuki, Satomura Kazuhito | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Grapefruit seed extract effectively inhibits the Candida albicans biofilms development on polymethyl methacrylate denture-base resin | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0217496 | 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 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 NAGAYAMA Tomiharu, WADA Junichiro, WATANABE Chie, MURAKAMI Natsuko, TAKAKUSAKI Kensuke, UCHIDA Hirofumi, UTSUMI Miona, WAKABAYASHI Noriyuki | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Influence of retainer and major connector designs of removable partial dentures on the stabilization of mobile teeth: A preliminary study | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Dental Materials Journal | 6. 最初と最後の頁 89~100 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2018-272 | 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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 高草木 謙介, 堤 千明, 里村 一人, 若林 則幸 |
| 2. 発表標題 過酢酸製剤による義歯床用レジン上のCandidaバイオフィルム殺菌効果の検証 |
| 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 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuki Arai, Chiaki Tsutsumi-Arai, Kensuke Takakusaki, Noriyuki Wakabayashi, Kazuhito Satomura. |
| 2. 発表標題 Degradation Of Candida Biofilms On PMMA By 405-nm LED Light |
| 3. 学会等名 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高草木謙介, 堤千明, 新井祐貴, 若林則幸, 里村一人 |
| 2. 発表標題 グレープフルーツ種子抽出物の義歯上Candidaバイオフィルム除去効果の検証 |
| 3. 学会等名 日本歯科補綴学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 新井 祐貴, 堤 千明, 高草木 謙介, 若林 則幸, 里村 一人 |
| 2. 発表標題 405-nm LED光照射による義歯上Candidaバイオフィルム破壊効果 |
| 3. 学会等名 日本歯科補綴学会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |