

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592853

研究課題名(和文)慢性期の口腔ケアの効果は、どうして遅延するのか

研究課題名(英文)Causes of the delay in efficacies of oral care during chronic phase

研究代表者

柏原 稔也(KASHIWABARA, Toshiya)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：90274232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、慢性期の口腔ケアの効果が遅延する原因を明らかにすることを試み、口腔ケアの意義を再認識し、効果的な口腔ケア法を探ることにある。そのために、文献考察、光トポグラフィーを用いた口腔および四肢への刺激が前頭前野の脳血流量に及ぼす影響、マウスへの口腔刺激が行動パターン(不安感誘発)および免疫機能に及ぼす影響、口腔ケア状態の簡易計測法に関する研究を行った。その結果、ヒトに対する口腔への刺激が他部位への刺激と比較して脳機能に及ぼす影響まで見いだすことができたが、免疫機能については見いだすことができなかった。この遅延、逆に言えば効果は、多因子的な要素が強いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify why the efficacies of oral care is delayed in the chronic phase, to re-recognize the significance of oral care, to explore effective oral care methods. The following research has been done: literature review, measurements of the cerebral blood flow in the prefrontal cortex using a light topography (NIRS), the effect of oral stimulation on the immune function and behavior patterns (Induction of anxious feeling) in mice, and the development of simple oral care evaluation method. As a result, it could be found to impact on the activity of brain function by the stimulation into the oral cavity compared to that into the other site, but little effect on immune function was found. It is suggested that the delay, conversely the effect, would be multifactorially caused.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：高齢者 誤嚥性肺炎 口腔ケア 口腔刺激 免疫

### 1. 研究開始当初の背景

口腔ケア(ここでの定義は、狭義の器質的口腔ケアを意味する)の有用性は Yoneyama らの報告(Lance,1999)以来、医療関係者に広く認められるようになり、多くの施設で実践されている。Yoneyama らの報告以外にも、口腔ケアの有効性を間接的および直接的に支持する数多くの基礎データあるいは臨床報告がなされている。我々も、Yoneyama らの報告のデータの解析の一部を担って以来、独自に研究を進め、とくにデンチャープラークと咽頭微生物叢等の関連、デンチャープラークおよびカンジダを中心とした病原性の解明とその制御に関して、長年、研究を進め、評価されている。

その中で、脳卒中発症直後などの ICU、SCU 入院における急性期の口腔ケアは口腔内のプラークが直接的な感染源になるため、この感染源を可及的に少なくすることにより、種々の感染症防止できるものと理解される(弘田ら, Chest, 2010)。

一方、Yoneyama らのデータをはじめとする慢性期患者に対する効果データをよく見ると、口腔ケア介入後の初期は、対照群と口腔ケア群で咽頭微生物叢の差は認められず、約半年後に差が見られるようになり、その後、徐々に発熱、肺炎も減少し、有意差を示すようになっていく。医療関係者も我々も持続的な口腔ケアが重要であると認識している。このように口腔ケアの効果が数ヶ月単位あるいは年単位を経て現れる遅延の事実をどう解釈したらよいだろうか? この部分に口腔ケア、口腔機能の大きな意義が含まれているのではないかと推察した。

つまり、感染源の除去ならば、1, 2 回の口腔ケアで改善されるわけで、我々は、慢性期の口腔ケアの効果は、何らかの違う経路を介して、発熱、肺炎防止に関与していると考えた。

### 2. 研究の目的

慢性期の口腔ケアの効果が遅延する原因を明らかにすることを試み、口腔ケアの意義を再認識し、効果的な口腔ケア法を探ることにある。

### 3. 研究の方法

#### 1) 文献考察

慢性期の口腔ケアの効果の時期について言及した論文について、ヒトを対象とした英語および日本語での論文を検索した。英語論文は、PubMed を用いて、“Oral care”, “and Assessment”, のキーワードを用いて検索し、日本語論文は医学中央雑誌を用いて、“口腔ケア”のキーワードを用いて検索を行った。抽出された論文のタイトル、要約及び本文全体を精査し対象となる文献を選択し、本研究に合致する研究の観点から文献考察をおこなった。

#### 2) 口腔および四肢への刺激が前頭前野の脳血流量に及ぼす影響

口腔刺激が脳機能活動に影響を与え、それが、免疫系など2次的に影響を及ぼすことを検討するためにヒトを対象とした以下の実験を行った(承認番号 1780)。

被験者は、欠損および顎口腔機能に異常が認められない健常有歯顎者 5 人(男性 4 名、女性 1 名、28.2 歳 $\pm$ 2.49)とした。近赤外光脳計測装置(光トポグラフィ、WOT-100、日立、東京)を用いて前頭前野の脳血流量を、防音室内で椅座位にて測定した。振動刺激には、マイクロバイプレター(10.0 mm)を皮膚表面(合谷、心包区、内踝)に貼付、指先(親指・示指)、両口唇、上下顎前歯、上下顎臼歯で挟む計 7 条件とした。本実験における測定時間は、60 秒-30 秒-60 秒(安静-刺激-安静)とした。1 日で各条件 5 回ずつ測定、それを 3 日間測定し、安静時と刺激時における脳血流量を比較した。

#### 3) マウスへの口腔刺激が行動パターンおよび免疫機能に及ぼす影響

2)と同様な仮説をもとにマウスを用いた以下の実験を行った(承認番号 13138)。

##### (1) マウスへの振動刺激装置の作成

マイクロバイプレター( $\phi$  10.0 mm, ボルトン)を円筒状( $\phi$  15.0 mm, 長さ 120.0 mm)のプラスチックの先端に設置し、その円筒を持ちながら、マイクロバイプレター先端が刺激すべき部位に当たるような構造とした。刺激時間は 60 秒であった。バイプレターの強度は 6122 mm $\cdot$ G であった。

##### (2) マウスへの刺激

用いたマウスは C57BL/6J 雌 12 週齢であった。作製した振動刺激装置をフリーハンドでマウス頬部に 1 分間刺激する群(口腔刺激群)、同様な刺激方法で後肢に刺激する群(後肢群)、およびコントロールとして刺激なしの群(無刺激群)の 3 群を被験群とした。刺激は朝 8 時頃、晩 8 時頃に 6 週間行った。1 回目の実験は各群 3 匹ずつ、2 回目の実験は各群 4 匹ずつとした。飼育環境は、室温 21 $\pm$ 2、湿度 50 $\pm$ 15%とし、照明は午前 6 時から 12 時間に設定した。飼料は、固形飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)、飲料水は水道水をいずれも自由摂取させた。

##### (3) 高架十字迷路実験によるストレスの評価

バイオリサーチセンター社製の幅 60 mm $\times$ 長さ 295 mm の高架十字迷路センターエリアにオープンアーム側を頭にしてマウスを配置し、その行動をビデオ画像行動解析装置(Smart 3.0, バイオリサーチセンター社)を用いて 5 分間測定した。計測は、刺激開始直前および刺激 6 週間後に午後 8 時に行った。今回は事前に迷路を経験させることはせずに実験当日にのみ行った。

当該十次迷路のセンターエリアにオープンアーム側を頭にしてマウスを配置し、5 分間その行動を測定した。

検討項目として、以下の分析を行った。  
 オープンアームへの侵入回数、オープンアームへの滞在時間の実測値、総アーム侵入回数に対するオープンアームへの侵入回数の割合、測定時間に対するオープンアームへの滞在時間の割合、クローズドアームへの侵入回数、クローズドアームへの滞在時間の実測値、総アーム侵入回数に対するオープンアームへの侵入回数の割合、測定時間に対するクローズドアームへの滞在時間の割合、オープンアーム内での移動距離、総移動距離に対するオープンアーム内での移動距離の割合、オープンアーム内で Resting (不動状態) の時間、クローズドアーム内での移動距離、総移動距離に対するクローズドアーム内での移動距離の割合、クローズドアーム内で Resting (不動状態) の時間、総 Resting (不動状態) 時間に対するオープンアーム内での Resting (不動状態) 時間の割合、総 Resting (不動状態) 時間に対するクローズドアーム内での Resting (不動状態) 時間の割合を計測した。

#### (4)免疫機能評価

高架十字迷路実験後、直ちにマウスをジエチルエーテルにて安楽死させ、脾細胞を抽出し、96 ウェルプレート上に1回目は $5 \times 10^5$ 個ずつ、2回目は $1 \times 10^6$ 個ずつ培養播種した。T細胞を増殖させる mitogen として Concanavalin A (ConA)  $1 \mu\text{g/ml}$ , B細胞を増殖させる mitogen として Lipopolysaccharide (LPS)  $5 \mu\text{g/ml}$ , 無刺激群には PBS のみを加え、 $37 \pm 5\%$   $\text{CO}_2$  条件下で72時間培養した。培養終了2時間前に試薬 (Cell Counting Kit-8, DOJINDO) を加え、2時間後、細胞増殖反応をマイクロプレートリーダー (450 nm) にて測定した。

#### 4) 口腔ケア効果の簡易測定法

微生物中の ATP がルシフェリンと酸素の存在下で、ルシフェラーゼ (酵素) を反応させることにより AMP に変化し、その際の光エネルギーを測ることで、義歯の汚れを評価する方法を開発し、その有用を検討した。

ATP 抽出剤・発光試薬を含んだ綿棒 (ルシパック Pen, キッコマン) で所定の義歯等を一定条件化で拭き取り、それをルミテスター (PD-30, キッコマン) で計測した。

対象はアクリル義歯と粘膜調整材裏装義歯を水 200ml 中で超音波洗浄 (ウルトラソニッククリーナー-SUC-70 松風) し、浸漬液の ATP 量を測定し、洗浄時間後 (1, 2, 4, 8 分) との関係を検討した。

併せて口腔観察法として、小型口腔カメラによる方法について検討を行った。

### 4. 研究成果

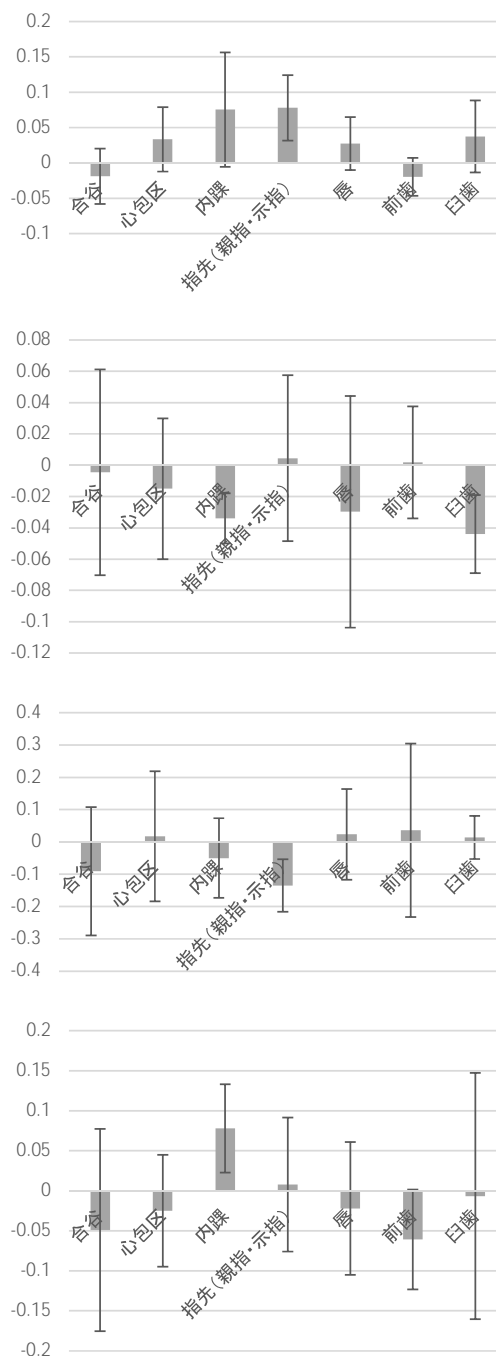
#### 1) 論文考察

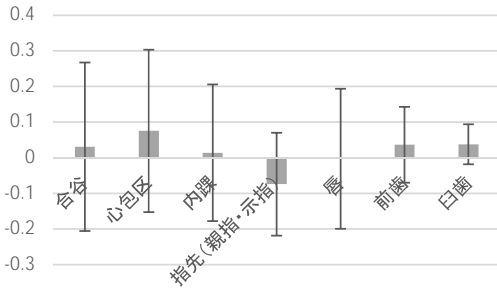
“Oral care” and “Assessment” で 263 件、“effects” で 19 件がヒットしたものの、関連が

あるものは 4 件、参考文献で可能性が高いものが 13 件に次ぎなかった。しかし命題である慢性期の口腔ケアの効果の時期について言及したのは日本語、英語ともなかった。

#### 2) 口腔および四肢への刺激が前頭前野の脳血流量に及ぼす影響

5 人の被験者の脳血流量の変化を下図に示す。





被験者全体における刺激の種類に関して、脳血流量の変化に有意な違いは認められなかったものの、個人で比較すると刺激の種類に応じて脳血流量は一定の増減パターンを示した。以上の結果より、効果に個人差はあるものの口腔に対する振動刺激は脳活動を対象としたリハビリテーションの面からは効果的である可能性が示唆された。

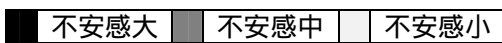
### 3) マウスへの口腔刺激が行動パターンに及ぼす影響

口腔刺激群、後肢刺激群、無刺激群を比較した場合、口腔刺激群が最も不安感が強い傾向が認められた(下表)。

	進入回数				滞在時間				移動距離				不動時間			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
無刺激群	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
口腔刺激群	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
後肢刺激群	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

■: 無刺激群, ■: 口腔刺激群, ■: 後肢刺激群

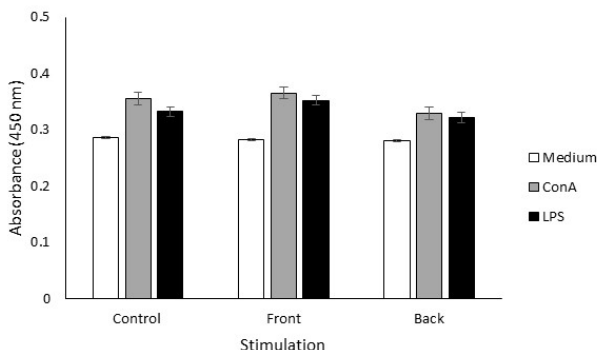
a: オープンアーム(実測値), b: クローズドアーム(実測値), c: オープンアーム(割合), d: クローズドアーム(割合)



### 4) マウスへの口腔刺激が免疫機能に及ぼす影響

結果を下図(上段は  $5 \times 10^5$  個, 下段は  $1 \times 10^6$  個の播種条件)に示す。

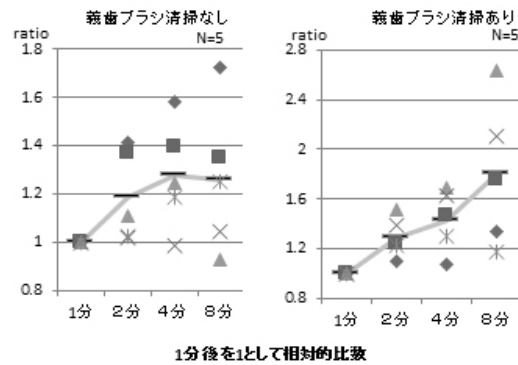
口腔刺激群、後肢刺激群、無刺激群を比較した場合、T細胞、B細胞いずれもとくに有



意な増殖能の差は認められなかった。

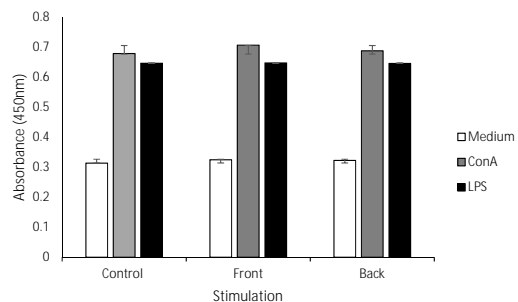
### 5) 口腔ケア効果の簡易測定法

口腔ケアと歯科医療デバイスとの関係について調査し、それを報告にまとめた。義歯の汚れを、綿棒で拭き取り、その中の微生物中のATP量をルシフェラーゼアッセイで計測し、定量的な汚れとして評価する方法を提案し、その妥当性を示した。その中で、超音波洗浄の前に手によるブラシ洗浄の有効性が示唆された。また、口腔内デジタルカメラによる口腔内の汚れの観察方法も検討した。



### 6) まとめ

本研究は、慢性期の口腔ケアの効果が遅延する原因を明らかにすることを試み、口腔ケアの意義を再認識し、効果的な口腔ケア法を探ることになった。そのために、文献考察、光トポグラフィーを用いた口腔および四肢への刺激が前頭前野の脳血流量に及ぼす影響、マウスへの口腔刺激が行動パターンおよび免疫機能に及ぼす影響、口腔ケア状態の簡易計測法に関する研究を行った。また、正常者を対象に、口腔顎顔面の温熱刺激による唾液流量の変化について調査し、顎下部の温熱刺激によって唾液流量が上昇することを見い



出した。口腔ケアに伴う唾液流量の変化も考えられた。唾液中miRNAに注目し、エピジェネティックな関係も考えられた。

直接的な口腔ケア効果の遅延についての要因を見いだすことができなかったが、口腔ケアという微生物除去ではなく口腔への刺激が何らかの要因を引き起こしている可能性は示唆された。つまりこの遅延、逆に言えば効果は、多因子的な要素が強いことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計5件)

Sapaar B, Nur A, Hirota K, Yumoto H, Murakami K, Amoh T, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. *J Appl Microbiol*. 査読有, 2014,  
doi: 10.1111/jam.12483.

柏原 稔也, 米山 武義, 中道 敦子, 本田 剛, 東岡 紗知江, 後藤 崇晴, 永尾 寛, 市川 哲雄, In vitro カンジダバイオフィルムに対する電解次亜水の効果, 老年歯科医学, 査読有, (0914-3866), 28 巻, 3 号, 2013, Page277-283

東岡 紗知江, 本釜 聖子, 本田 剛, 柏原 稔也, 永尾 寛, 市川 哲雄, 口腔ケアと歯科医療デバイス, 四国歯学会雑誌, 査読無, 24 巻, 2 号, 2012, Page35-37

Goto T, Nishinaka H, Kashiwabara T, Nagao K, Ichikawa T. Main occluding area in partially edentulous patients: changes before and after implant treatment. *J Oral Rehabil*. 査読有, 2012, 39(9), 677-683.

Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. *J Dent*. 査読有, 2012 査読有, 40(8), 686-692

doi: 10.1016/j.jdent.2012.04.026.

### 〔学会発表〕(計7件)

Higaki N, Goto T, Iwawaki Y, Nagao K, Ichikawa T. Efficiency of oral stimulations on brain function activities: Evaluations using wearable near-infrared spectroscopy. The 15th Biennial Meeting of International College of prosthodontics 2013.9.18-21 The Lingotto Congress Centre (Italy)

檜垣 宣明, 後藤 崇晴, 石田 雄一, 友竹 偉則, 永尾 寛, 市川 哲雄, 多田 望. 口腔内刺激が脳機能活動に与える影響. 平成 25 年度 公益社団法人日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会 2013.8.31 総合あんしんセンター(高知県)

岩脇 有軌, 水澤 典子, 岩田 武男, 小野 信二, 友竹 偉則, 市川 哲雄, 吉本 勝彦. 機械的刺激応答性 miRNA の同定. 第 5 回 日本 RNAi 研究会 2013.08.29-31 グランドプリンスホテル広島(広島県)

本田 剛, 比嘉 仁志, 東岡 紗知江, 本釜 聖子, 永尾 寛, 市川 哲雄. 多チャンネルセンサを用いた嚙下音記録による嚙下動態評価. 日本老年歯科医学会第 24 回学術大会 2013.6.6 大阪国際会議場(大阪府)

東岡 紗知江, 比嘉 仁志, 本田 剛, 本釜 聖子, 永尾 寛, 市川 哲雄. スダチの

おい刺激による咀嚼嚙下促進補助法の開発: 刺激剤と刺激方法の検討. 日本老年歯科医学会第 24 回学術大会 2013.6.5 大阪国際会議場(大阪府)

柏原 稔也, 米山 武義, 市川 哲雄. in vitro カンジダバイオフィルムに対する電解次亜水の効果. 日本口腔機能水学会 第 14 回学術大会 2013.3.24 北海道歯科医師会館(北海道)

本田 剛, 後藤 崇晴, 内藤 禎人, 柏原 稔也, 市川 哲雄. ルミテスターを用いた義歯の超音波洗浄効果の評価. 第 5 回 日本義歯ケア学会学術大会 2013.1.27 大阪歯科大学附属病院(大阪府)

### 〔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:  
出願年月日:  
国内外の別:

#### ○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

柏原 稔也 (KASHIWABARA, Toshiya)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号: 9 0 2 7 4 2 3 2

### (2)研究分担者

市川 哲雄 (ICHIKAWA, Tetsuo)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 9 0 1 9 3 4 3 2

永尾 寛 (NAGAO, Kan)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号: 3 0 2 2 7 9 8 8

### (3)連携研究者

弘田 克彦 (HIROTA, Katsuhiko)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号：60199130