

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792201

研究課題名（和文）パラサイト—義歯床用材料間インターフェースの解析

研究課題名（英文）Investigation of interface between parasite and denture base materials

研究代表者

竹内 裕尚（TAKEUCHI YASUHISA）

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80586511

研究成果の概要（和文）：

これまでに、義歯や顎義歯などアクリル樹脂製の補綴装置の内部に存在する微生物について調べた研究は少ない。本研究では、補綴装置のアクリル樹脂部内部より微生物を検出し、その量や種類について詳細を調べた。長期間使用した補綴装置アクリル樹脂部の内部には細菌が生息していることが明らかとなった。またこれらの細菌は複数種で存在しており、義歯使用者の口臭や誤嚥性肺炎などの口腔疾患に関与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Few studies have examined the bacterial invasion in the acrylic resin prostheses. The aim of this study is to quantify and identify the microorganisms in the acrylic resin denture bases and in the inner space of acrylic resin obturator of dento-maxillary prostheses after long-term use. Several species of viable bacteria were detected in acrylic resin denture bases and obturators. The findings of this study suggest that acrylic resin prostheses and bacteria inside the acrylic resin prostheses may be associated with oral malodor and oral/respiratory infections in individuals wearing prostheses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：有床義歯、細菌

1. 研究開始当初の背景

義歯は主に歯科用アクリル樹脂で構成され、その表面には口腔に存在する多種多様な微生物（パラサイト）が付着し、増殖し、微生物叢（バイオフィルム）を形成する。そのため表面バイオフィルム中に存在する微生物やその代謝産物は、義歯使用者や、免疫防御機能の低下した者の口臭や、日和見感染症、誤嚥性肺炎等の重篤な呼吸器感染症を発症する病原性因子になる。

義歯の長期使用により、表面に付着した微生物は表面における増殖に留まらず、材料表

面に存在する微小亀裂や、修理材料との界面等の微小な隙間から材料内部へ侵入する可能性がある。

特に歯科用アクリル樹脂は多孔性・吸水性という物性をもち、内部に侵入した微生物は食物や唾液中のタンパク質等の基質の供給が促され、内部においてもバイオフィルムを形成すると考えられる。

さらに、内部バイオフィルムは、表面バイオフィルムとは異なり、その除去が困難であるため、歯科用アクリル樹脂は、長期間にわたり微生物やその代謝産物ならび

に唾液中の様々な分解酵素へ曝されることになる。

以上のことから、歯科用アクリルレジンは微生物の温床となり、その結果、義歯自体が口臭や呼吸器感染症におけるより危険度の高い病原性因子になると考えられる。さらに、そのような汚染された義歯の長期間の使用により、歯科用アクリルレジンの生物学的劣化を引き起こすものと推測される。

これまでに、義歯表面に存在する微生物叢に関する報告は多くあるものの、義歯内部に存在する微生物についてはほとんど報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究では、義歯床用材料として頻用される歯科用アクリルレジンの表面および内部に存在する微生物叢の定量的、定性的解析、生物学的劣化 (Biodegradation, Biodeterioration) の解析により、パラサイト (微生物) - 歯科用アクリルレジ間インターフェイスの特徴を明らかにし、その改質方法を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

患者は、東北大学病院歯科咬合回復科に通院する患者で、インフォームドコンセントの得られた者で、過去3か月において抗生物質等の薬物療法の既往のない患者を対象とした。

これらの患者より、義歯の新製等の理由により不要となったアクリルレジ製の義歯 (13床) を回収した。回収後、実験開始まで密閉容器に入れて保湿し 4°C で保存した。可能な限り口腔内での使用環境を反映するために保存期間は3日間までとした。また、同病院内に通院中で、中空型オブチュレーターを付した顎義歯を装着し、問題なく使用している患者 (11床) を対象とし、その顎義歯内部より試料を採集した。

義歯床内部からの試料の採集

義歯アクリルレジンの表面を 70% エタノールにて消毒後、無菌的に切断した。その切断面から滅菌ラウンドバーを用いてレジン削片を採集し (約 0.1 mg)、40mM リン酸カリウム緩衝液に懸濁した。懸濁液をホモジナイザーにて粉碎後、同緩衝液にて 10^0 - 10^{-7} に連続段階希釈を行った。希釈後の各懸濁液を血液寒天平板に塗抹し、速やかに嫌気グローブボックス内に搬入し、37°C、嫌気条件下にて7日間培養した。平板上の各コロニーを計数し、義歯床内部に生存する細菌密度を測定した。さらに、純培養後の各コロニーより DNA を抽出し、PCR 法にて 16s RNA genes

を増幅後、DNA シークエンス解析を行った。genebank data base に基づいた細菌種の同定を行った。

顎義歯オブチュレーター内部からの試料の採集

顎義歯のオブチュレーター表面を 70% エタノールにて消毒後、オブチュレーター外壁より滅菌ラウンドバーにて内腔へ穿通した。オブチュレーター内部に液体の貯留を認める場合は、その液体を滅菌シリンジにて回収し、試料とした。一方、オブチュレーター内部に液体の貯留を認めない場合は、40mM リン酸カリウム緩衝液 1.0mL を注入後、攪拌し、再度滅菌シリンジにて回収して試料とした。試料は義歯内部からの試料と同様に粉碎後、連続段階希釈を行い、血液寒天平板に塗抹後、37°C にて好気および嫌気条件下にて7日間培養した。培養後のコロニー数を計数し、オブチュレーター内部に生存する細菌密度を測定した。さらに、各コロニーから DNA を抽出し、DNA シークエンス解析により細菌種の同定を行った。

4. 研究成果

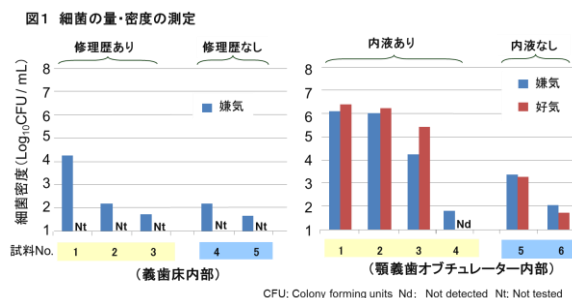
アクリルレジ製義歯床内部

全 13 サンプルのうち、5 サンプルから (38.5%) 細菌が検出された (表)。

表 義歯床および顎義歯オブチュレーター内部からの細菌の検出

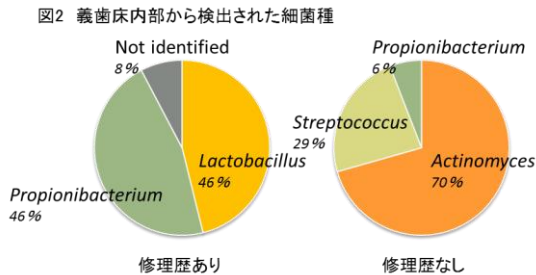
試料採取部位	細菌の検出率 (%)
義歯床内部	合計 5/13 (38.5)
	修理歴あり 3/5 (60.0)
	修理歴なし 2/8 (25.0)
顎義歯オブチュレーター内部	合計 6/11 (54.5)
	内液あり 4/5 (80.0)
	内液なし 2/6 (33.3)

修理歴ありの群では、5 サンプル中 3 サンプル (60.0%) から細菌が検出され、それらの細菌密度 6.0×10^2 - 1.8×10^5 CFU/mg であった (図 1)。



一方、修理歴なしの群では、8 サンプル中 2 サンプル (25.0%) から細菌が検出され(表)、細菌密度は 4.0×10^2 , 1.3×10^3 CFU/mg であった (図 1)。

修理歴ありの群からは *Lactobacillus* 属 (4 菌種)、*Propionibacterium*(1 菌種) が同定された。一方、修理歴なしの群からは、*Actinomyces* (2 菌種) と *Streptococcus* (1 菌種) が同定された (図 2)。70%エタノール消毒後のアクリルレジン製顎義歯床表面から細菌の検出は認められなかった。



アクリルレジン製顎義歯オブチュレーター内部

全 11 床のうち 5 床の顎義歯中空型オブチュレーター内部には液体 (内液) が存在し、6 床には、内液を認めなかった。全 11 サンプル中 6 サンプル(54.5%) から細菌が検出された (表)。

内液が存在した群からは、5 サンプル中 4 サンプル(80.0%) から細菌が検出された。検出された細菌密度は、嫌気培養では $5.0 \times 10^{-1.2} \times 10^6$ CFU/mL、また、好気培養では、 $1.7 \times 10^5 - 2.5 \times 10^6$ CFU/mL であった。

一方、内液が存在しない群からは、6 サンプル中 2 サンプル(33.3%) から細菌が検出された。細菌密度は、嫌気培養で $1.1 \times 10^2 - 2.2 \times 10^3$ CFU/mL、また、好気培養では $5.0 \times 10^{-1.9} \times 10^3$ CFU/mL であった(図 1)。嫌気培養および好気培養の間で、細菌密度の有意差は認められなかった。

内液が存在した群からは *Olsenella*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Pantoea*, *Peptoniphilus*, *Klebsiella* (3 菌種), *Pseudomonas* 属の 9 菌属 11 菌種が検出された。

一方、内液が存在しない群からは *Lactobacillus* 属の 4 菌種のみが検出された (図 3, 4)。また 70%エタノール消毒後のアクリルレジン製顎義歯オブチュレーター表面から細菌の検出は認められなかった。

図3 顎義歯オブチュレーター内部から検出された細菌種 (嫌気培養)

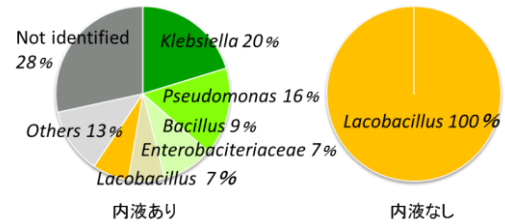
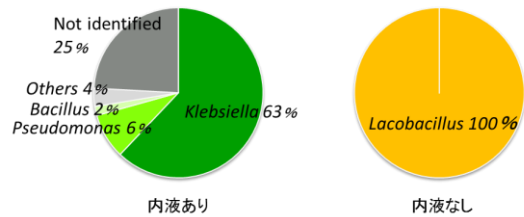


図4 顎義歯オブチュレーター内部から検出された細菌種 (好気培養)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Quantification and identification of bacteria in acrylic resin denture bases and dento-maxillary obturator-prostheses. Am J Dent, 2012 Jun; 25(3):171-175. (査読あり)
2. Sato T, Yamaki K, Ishida N, Hashimoto K, Takeuchi Y, Shoji M, Sato E, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N: Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals. Int J Dent. 2012;2012:609689. doi: 10.1155/2012/609689. Epub 2012 Apr 3. (査読あり)
3. Sato T, Yamaki K, Ishida N, Shoji M, Sato E, Abiko Y, Hashimoto K, Takeuchi Y, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N: Rapid quantification of bacteria in infected root canals using fluorescence filter - A pilot study on its clinical application to the evaluation of the outcomes of endodontic treatment-. Int J Dent. 2012;2012:172935. doi: 10.1155/2012/172935. Epub 2012 May 27. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. 石黒和子, 鷺尾純平, 佐久間陽子, 竹内裕尚, 佐々木啓一, 高橋信博 alamar Blue を用いた微量細菌付着定量法の歯周病関連細菌 3 菌種への応用 Journal of Oral

Biosciences. (郡山), 抄録集
49(S):pp126, 2012年9月9-11日

2. Takeuchi Y, Koyama S, Sasaki K:
Examination of factors affecting the
presence of bacteria in the obturator of
dento-maxillary prostheses. 13th
International College of Prosthodontists
(Hawaii, Big Island, USA), 抄録集 p. 188,
2011年9月15, 16日

[図書] (計2件)

1. Y. Takeuchi, K. Nakajo, T. Sato, Y. Sakuma,
K. Sasaki, N. Takahashi: Detection of viable
bacterial cells in acrylic resin denture bases.
Interface Oral Health of Science 2011,
Springer, pp209-211, 2012.
2. Y. Sakuma, J. Washio, Y. Takeuchi, K.
Sasaki, N. Takahashi: A high-sensitive
alar Blue method for evaluating bacterial
adhesion to biomaterials. *Interface Oral
Health of Science 2011*, Springer, pp201-203,
2012.

[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

竹内 裕尚 (TAKEUCHI YASUHISA)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 80586511

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: