

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏 名 (本籍)	漆 原 優 (埼玉県)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 428 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目	An analysis of the biofilms adhered to framework alloys using <i>in vitro</i> denture plaque models (<i>in vitro</i> デンチャープラークモデルにおけるフレームワーク金属に対する バイオフィルムの解析) Dental Materials Journal impress
論 文 審 査 委 員	主査 教授 里村一人 副査 教授 大井田新一郎 副査 教授 濱田良樹

内 容 の 要 旨

【緒言】

パーシャルデンチャーは口腔衛生状態を不良に導きやすく、プラークの温床となり局所および全身疾患の引き金となる可能性がある。2011 年の日本人口動態統計によると死因の年次推移は肺炎が上昇傾向にあり、誤嚥性肺炎の主な起炎菌は口腔常在菌であることが知られている。

義歯の大きな問題点はプラーク付着性に加え、破折することであるが、金属床義歯は機械的強度に優れ、フレームワーク用金属に使用されるチタンはアレルギー原性が低く生体親和性が良好とされている。さらにレーザーの活用により義歯の破折修理やリフォームが容易に行われるなどの利点から金属床義歯は日本で広く普及していく可能性が考えられるが、チタンを含むフレームワーク用金属の細菌定着性や付着プラークの定量的評価に関する報告はほとんど見当たらない。そこで本研究は、フレームワーク用金属に対するプラーク付着特性を細菌学的に分析し、金属間で比較することにより金属床義歯における使用金属の選択やデンチャープラークの付着を包括的に理解することを目的とした。

【方法】

試料片の製作

CP Ti, Ti6-7, Co-Cr, Ag-Pd-Au, PGA を用いて 20.0×12.0×1.4mm の板状試料を製作し、鏡面研磨を行った。義歯床用レジンコントロールとして、研磨後 1 日間、水中に浸漬した。全ての試料の表面粗さと接触角を測定した。

唾液由来細菌によるバイオフィルム付着の定量解析

各金属 15 個を 5 名のボランティアから採取直後のプール唾液に浸漬し 37℃、好気条件下で 1 晩培養した。2 日目から BHI 培地に浸漬し、1 日ごとに新しい培地に交換した。唾液で 1 晩培養後、BHI 培地に交換後の 4 日、7 日目の試料に付着したバイオフィルム重量を測定し、さらに REDOX

Indicator を用いて付着生菌量，バイオフィーム内の菌体外多糖量を測定した。

唾液由来細菌による付着バイオフィーム菌叢の定性的解析 (T-RFLP による菌叢解析)

5名のボランティアの各唾液に金属およびレジン試料を1晩浸漬した後，形成されたバイオフィーム内の細菌 DNA を抽出し，16Sr RNA 増幅後，制限酵素処理し，T-RFLP 解析を行った。

定性 PCR

唾液中細菌と CP Ti 付着バイオフィームから抽出した細菌 DNA に対し，定性 PCR を行い，以下の細菌種（属レベル，菌種レベル）の存在の有無を確認した．属レベル：*Actinomyces*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Treponema*, *Candida*. 菌種レベル：*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *S. mutans*.

C. albicans と *S. mutans* のフレームワーク金属に対する付着性の定量的評価

各金属試料 10 個を濾過プール唾液に 37℃，好気条件下で 1 晩浸漬したものを2つに分け，*C. albicans* と *S. mutans* の菌液に1日浸漬した．その後，それぞれのバイオフィーム重量測定，生菌量，菌体外多糖体量を測定した。

【結果】

表面性状

コントロールのレジンを除いてすべての試料片において，表面粗さと接触角に有意差は認められなかった。

唾液由来細菌によるバイオフィーム付着の定量解析

バイオフィーム重量，バイオフィーム内の生菌活性量，菌体外多糖体量は経時的に増加し，培養1, 4日目で CP Ti と PGA が有意に高い数値を示し，Ag-Pd-Au は有意に低値を示した．7日目になると Ag-Pd-Au を除いた金属試料とレジンでは全ての検査値で差がなくなった。

唾液由来細菌による付着バイオフィーム菌叢の定性的解析 (T-RFLP による菌叢解析)

T-RFLP 解析のパターンを cluster 分析した結果，大きく cluster が2つに別れた．Co-Cr は5名全て Cluster I に分類され，また PGA は5名中4名で Cluster II に分類された．CP Ti, Ti 6-7 とレジン Cluster I に3試料，Cluster II に2試料が属していた．同一の被験者の唾液と CP Ti と Ti 6-7 とレジンの T-RFLP プロファイルは近接していた．T-RFLP プロファイルの類似性を Bray-Curtis 解析で検証した結果，CP Ti / Ti 6-7, CP Ti / レジン, Ti 6-7 / レジンは高類似性を示し，PGA と Co-Cr は類似性が低かった。

定性 PCR

各 CP Ti のバイオフィーム中に *Actinomyces* 属，*Fusobacterium* 属，*Haemophilus* 属，*Mycoplasma* 属，*Peptostreptococcus* 属，*Prevotella* 属，*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *S. mutans* の存在が確認できた

C. albicans と *S. mutans* のフレームワーク金属に対する付着性の定量的評価

両菌種とも Ag-Pd-Au は付着量が少なく，CP Ti, PGA では高く，レジンと同等かそれ以上であった．一方，Co-Cr は *S. mutans* の付着性においては CP Ti, PGA と同様に高かったが，*C. albicans* は付着しにくい傾向を示した。

【考察】

本実験に使用した金属サンプルの表面粗さと接触角は試料間での有意差はなかった。唾液由来細菌によるバイオフィーム付着は、初期付着から成熟過程において付着重量、生菌活性量、菌体外多糖体量とも PGA>Ti>Ti6-7>Co-Cr>Ag-Pd-Au の順であった。しかし成熟バイオフィームでは Ag-Pd-Au を除きほとんど材料間の差がなくなっていた。また、コントロールのレジン上のバイオフィーム量は4日目までは金属より少なかったが、7日目では有意差がなくなっているが、これは4日目まではモノマーの溶出が持続し、抗菌効果を示したと考えられる。バイオフィーム成熟過程において金属間の付着量に差があることが示されたので、次に菌叢が異なっているかについて定性的な分析を行った。T-RFLP 法のピークエリアパターンから Co-Cr は他の金属に比べバイオフィームを構成する菌種が異なっていた。Co-Cr が特有のパターンであることは cluster 解析の結果、Cluster I に集積していることから明らかであった。また、cluster 解析において同一被験者からの唾液と CP Ti と Ti 6-7 とレジンとは常に近接していることから、CP Ti と Ti 6-7 とレジン上のバイオフィームは口腔全体の菌叢を反映していたと考えられる。そこで群間の差を反映する指標である Bray-Curtis 解析を行った結果、CP Ti と Ti 6-7 とレジンの T-RF の類似度が高い結果を示したことから、付着様式が近い可能性が考えられた。定性 PCR の結果から、CP Ti には誤嚥性肺炎と歯周病原因菌の存在が確認できた。各金属試料への *C. albicans* と *S. mutans* の付着特性を検討した結果、*C. albicans* の初期付着は唾液由来のバイオフィーム実験と同様に PGA>CP Ti>Ti 6-7> Co-Cr>Ag-Pd-Au の順となっていたのに対し、Co-Cr に対する *S. mutans* の付着は PGA, CP Ti と同程度に多かった。この結果から *S. mutans* は金属を選択して付着している可能性が考えられる。

【結論】

1. フレームワークに用いられる金属ではバイオフィームがレジンと同等かそれ以上の付着することが分かった。
2. 各金属における菌叢の解析の結果から、金属間で付着する菌叢が異なる可能性が示された。
3. 各種試料用合金には誤嚥性肺炎原因菌や全身に影響を与える嫌気性菌がバイオフィームに存在していた。
4. CP Ti と PGA は他の金属に比較してバイオフィームおよび *S. mutans* や *C. albicans* が多く付着する傾向にあり、Ag-Pd-Au の付着量は少ない傾向を示した。