

口腔微生物叢
 歯周病
Porphyromonas gingivalis
 義歯

口腔微生物叢と歯科用アクリルレジンの開発

浜田 信城* 稲葉 啓太郎 倉橋 絢子

神奈川歯科大学分子生物学講座口腔細菌学分野

Oral microbiota and the development of dental acrylic resin

Nobushiro HAMADA, Keitaro INABA and Ayako KURAHASHI

Department of Oral Microbiology, Kanagawa Dental University
 82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan

Abstract

The microbiome of the oral cavity is the second largest microbiota after the gut, and harbors more than 700 species of bacteria, fungi, viruses, and protozoa. The oral microbiota is being increasingly recognized for its role in overall human health and disease. We herein introduce a study on differences in the bacterial composition of dental calculus between the Edo period and modern Japan. We also describe our previous research on antibiotic acrylic resins. Adox, a specially processed zinc powder that is chemically stable and safe, has been shown to suppress the growth of fungi, bacteria, and algae. Therefore, it is used as an antibacterial agent in a wide range of fields. The antimicrobial activity of acrylic resin containing Adox increased in a concentration-dependent manner. Furthermore, their mechanical properties were similar to disks without Adox. Acrylic resin disks containing 1.0% Adox were confirmed to exert antibacterial and deodorizing effects. Transmission electron microscopy revealed that the adherence of *P. gingivalis* to acrylic resin disks containing 1% Adox was significantly less than to acrylic resin disks without Adox.

* 責任著者連絡先：〒 238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町 82
 神奈川歯科大学分子生物学講座口腔細菌学分野
 浜田信城
 TEL: 046-822-8867 e-mail: hamada@kdu.ac.jp

はじめに

口腔内微生物叢の研究が次世代シーケンサーの登場により、劇的な変革を遂げている。これまで行われてきた培養法に代わり、培養を必要とせずに微生物叢の解析や菌種鑑別から微生物叢内での細菌の活動状態も解明できる。また、培養を必要としないために、これまで培養できなかった菌種の役割なども解明されつつある。

日本の総人口は、2021年9月15日現在、12,522万

人であり、そのうち65歳以上の高齢者人口は3,640万人で、総人口に占める割合は29.1%になり、世界で最も高い割合である¹⁾。また、厚生労働省の平成28年歯科疾患実態調査の概要によると、歯周病（4mm以上の歯周ポケットがある）の有病率は、25～34歳で32.4%、45～54歳で49.5%、65～74歳で57.5%と歯周病罹患率が高く、高齢になるにつれ増加し、歯肉出血を有する者の割合は、15歳以上の年齢階級で30%を超え、30歳以上55歳未満で40%を超えている。また、補綴物装着も年齢が高くなるにしたがって、高

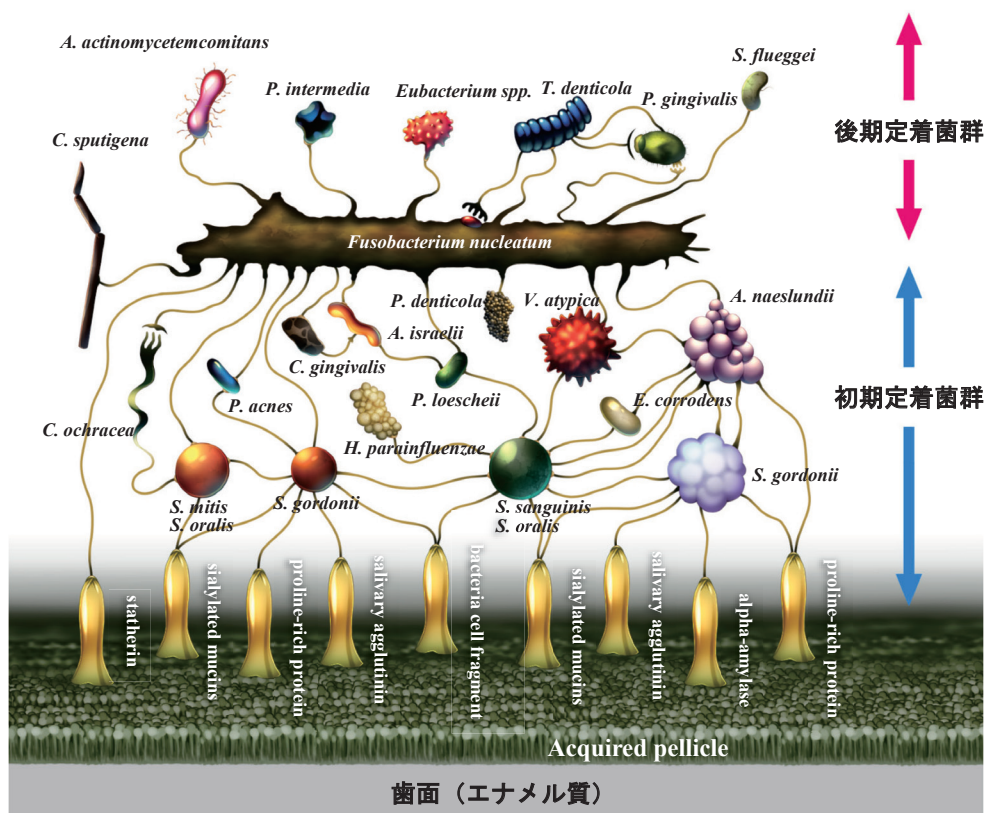


図1 プラークの付着様式と共凝集

成熟プラーク内での初期定着細菌と後期定着細菌が共凝集して存在する。Kolenbrander PE *et al.*: Microbiol Mol Biol Rev. 2002; 66(3): 486-505. から改変

くなり 80～84 歳では部分床義歯 42.4%，全部床義歯 31.3% と報告されている²⁾。

このように、口腔疾患は日本でも重要な口腔感染症疾患であることから、本総説では、次世代シーケンサーにより明らかにされた口腔内微生物叢の研究とわれわれが行っている抗菌物質アドクスの歯科領域への応用について解説する。

1. 口腔内微生物叢

デンタルプラークは、約 70% が細菌であり 1 g 当たり約 10^{11} 個の細菌が含まれ多種多様な細菌が存在する。プラークは、バイオフィルムであり、固体への細菌付着や細菌同士の凝集により形成された細菌凝集塊である (図 1)。しかし、現在の培養技術でも培養困難あるいは培養不可能な微生物が存在する。そこで、これまでの細菌学の研究手法である病原微生物を分離し、培養を行って病原性状を明らかにする方法とは、異なる解析手法が登場している。

2000 年半ばに米国で登場した遺伝子の塩基配列を高速に読み出せる次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer: NGS) が開発された。メタゲノム解

析では、従来の培養を基本とする方法では困難であった難培養、未培養系統に属する微生物のゲノム情報を得ることができる。また、疾患と微生物叢との関係や発症メカニズムの解明、さらには疾患の予防や治療法の開発につながると期待されている。

微生物という肉眼では見えない生物をはじめ顕微鏡を用いて観察したのが、オランダ人のアントニー・ファン・レーウエンフック (Antony van Leeuwenhoek, 1632-1723) である。レーウエンフックは趣味でレンズを磨き、最大 266 倍もの拡大力のある自作の単式レンズ顕微鏡を使って雨水やデンタルプラークなど身の回りにあるさまざまなものを長年観察し、おびただしい数の微少な生物がそれらのなかにいることを発見している³⁾。

それから、約 300 年の月日を経た現在、ヒトの口腔内微生物叢に関する情報をインターネットで確認することが可能になった。米国のフォーサイス研究所 (Forsyth Institute) が関わるヒトオーラルマイクロバイオームデータベース (eHOMD; <http://www.homd.org/>) があり、口腔、咽頭、鼻腔、副鼻腔およ



図2 江戸時代の木製義歯 神奈川県歯科医師会「歯の博物館」所蔵

び食道の微生物叢（マイクロバイオーム）に関する情報を提供している。現在、eHOMDでは合計775種の微生物が含まれており、すべての種のうち、57%は正式名称が付けられているもの、13%は培養できるが名称が付けられていないもの、30%は未培養系統群（難培養微生物）であると記載されている。無数の微生物を生体と同じ状態で再現することが困難であるために、細菌を培養せずにその状態にある細菌叢を構成するすべての微生物の遺伝子を解析することで、微生物叢に存在する菌種や構成比率、遺伝子発現状態なども把握することが可能になってきている。歯科領域においても、微生物叢の構成や比率、微生物叢内での特定細菌の役割に関する研究が進められ⁴⁾、う蝕⁵⁾、歯周病^{6,7)}やインプラント周囲炎^{8,9)}に関わる微生物叢の解析だけでなく、義歯付着微生物叢^{10,11)}、腸管への口腔細菌の移行^{12,13)}や口腔微生物叢と全身疾患^{14,15)}などに関する多くの報告がある。

興味深い報告として、古代の微生物叢の進化に関する研究を行っているアメリカの人類学者クリスティーナ・ワーリナーが、2014年に古代人の口腔マイクロバイオームの詳細なメタゲノムおよびメタプロテオミクスから得られた研究報告がある¹⁶⁾。ドイツのダールハイムの中世修道院跡（約950年-1200年）から出土した軽度から重度の歯周病を有する4体の成人人骨の歯石からDNAを抽出して検索した結果、歯周病の代表的な病原菌であるレッド・コンプレックスの3菌種である *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* が存在し、現代のヒト口腔内微生物叢に存在する歯周病原細菌が確認されている。レッド・コンプレックスの3菌種が、古代の歯石サンプルに特に多く含まれており、病原遺伝子と

そのタンパク質も検出されている。口腔衛生状態、食事や生活様式の変化にもかかわらず、現代と同様に中世においても歯周病に強く関連していたことが示されている。一方で、深川（東京）から発掘された江戸時代後期（18世紀-19世紀）の12個体の歯石から抽出したDNAを解析した結果、江戸時代の人達の歯石からはレッド・コンプレックスの3菌種が検出されなかったことが明らかにされている。理由として、日本が島国であることに加え、江戸時代は約200年間にわたって実施された鎖国政策により、日本と諸外国との貿易が極端に制限されたことで外国からの細菌伝播が少なかったことから、江戸時代の人々は現代人と異なる細菌で構成されていた可能性がある¹⁷⁾と報告している。歯周病関連細菌が江戸時代と現代の日本人で異なり、現代の日本人の口腔内に存在するレッド・コンプレックスの3菌種が海を渡ってきた可能性を明らかにしたとても興味深い研究である。

2. 義歯細菌叢と歯科用アクリルレジンの開発

江戸時代には、口腔清掃が十分に行われず歯石除去も行われなかったことが原因で歯を失った人が多く存在した。歯周病は、「はくさ」と呼ばれていたことから、口臭がひどかったことが推測される。日本では、欧米にはない木製義歯が精巧に作られていた歴史がある（図2）。義歯作製を職業とする入れ歯師は、蜜蝋をお湯で柔らかくして型をとり、この陰型に蜜蝋を圧接して陽型を作る。この陽型に朱をつけて柘植の木に圧接し、当たる箇所を彫刻していく。木床義歯の前歯には白い蠟石や人の抜けた歯を差し込み、奥歯の咬合面には銅や銀の釘を打ち、硬い食べ物も噛めたと記されている¹⁸⁾。その後、幕末から明治初期に外国人歯科医が来日し、横浜居留地で開業したことにより、米

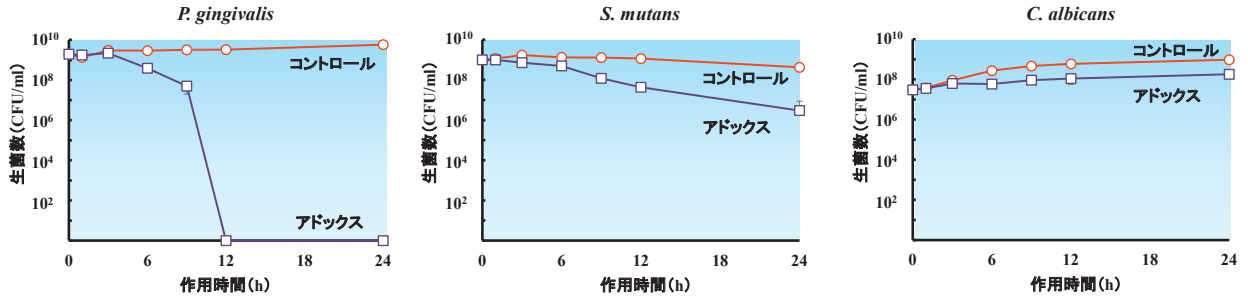


図3 *P. gingivalis*, *S. mutans*, *C. albicans*に対するアドックス粉末の抗菌効果
 菌懸濁液に1.0%濃度のアドックス粉末を添加し、24時間培養を行った。アドックス粉末の添加により、生菌数の経時的な現象が認められた。○, コントロール; □, 1%アドックス添加. 渡辺秀大ら: 神奈川歯学. 55 (1): 57-67, 2020. から引用

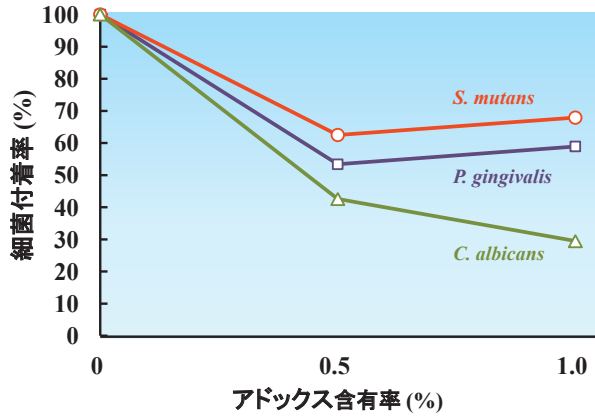


図4 アドックス含有アクリルレジンドискへの付着性試験
 アドックス含有アクリルレジンドискを口腔細菌の懸濁液に浸漬させて培養を行った。18時間後、アクリルレジンドиск表面に付着した細菌を超音波処理で剥離して、生菌数を測定した。0.5%および1.0%アドックス含有アクリルレジンでは、濃度依存的に付着菌数が減少した。○, *S. mutans*; □, *P. gingivalis*; △, *C. albicans*. 渡辺秀大ら: 神奈川歯学. 55 (1): 57-67, 2020. から引用

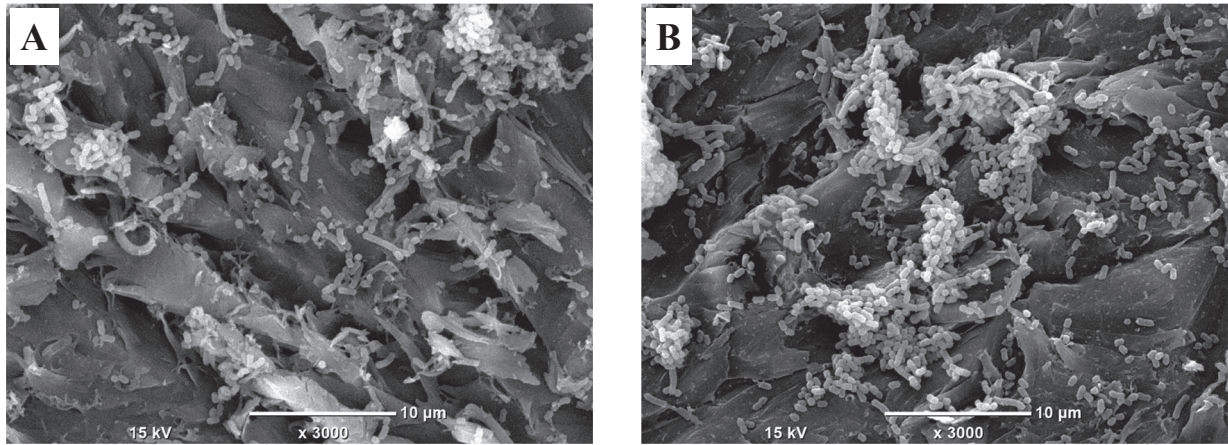


図5 走査型電子顕微鏡観察像
 懸濁液に浸漬させて18時間培養後の1.0%アドックス含有アクリルレジンドиск(A)と無含有アクリルレジンドиск(B)への細菌付着状態を電子顕微鏡観察したところ、1.0%アドックス含有アクリルレジンドиск表面への*P. gingivalis*菌体の付着量が少ないことが確認された。

表1 アドックス粉末の消臭効果

添加量 (g)	CH ₃ SH (ppb)	
2.0	4.6 ±	8.1
1.0	1.7 ±	2.9
0.5	11.0 ±	19.1
コントロール	664.3 ±	201.2

渡辺秀大ら：神奈川歯学. 55 (1) : 57-67, 2020. から引用

国からの新しい材料が入ってきたために、木製義歯からゴム床や金属床に変わった経緯がある。また、1940年に加熱重合レジジン（バイオレジン）が販売されてゴム床からレジジン床へと変わった¹⁹⁾。

口腔微生物は口腔内疾患だけでなく、誤嚥性肺炎などの全身疾患の原因として重要である。特に、義歯は口腔微生物の温床になるため、効果的な義歯清掃や口腔清掃が誤嚥性肺炎の発症予防に重要である。高齢化社会における全身管理との関係においても口腔微生物の増殖を長期に抑制する歯科材料の開発が必要と考えられる。実際、義歯などの可撤性床装置と関連した床下粘膜の炎症には、口腔内の微生物が深く関わり、義歯床粘膜面にみられる *Candida albicans* を主体とするデンチャープラークが重要であることが報告されている^{10,11,20)}。

これまでに、義歯に抗菌性を付与する試みは多数行われてきたが、床用レジジンの物性に影響せず、口腔細菌に対する抗菌性や消臭効果を有する材料の実用化はできていない。そのため、われわれは比較的安価であり、光照射を必要としない酸化亜鉛を特殊加工した Adox（アドックス；株式会社アドックス，東京，日本）に着目した。アドックスの作製法は特許の関係で明らかにされていないが、（財）日本食品分析センターなど各種公的機関で安全性が証明されており、防菌防霉剤として住建材、塗料をはじめ日用品や調理器具などに利用され、多くの企業で採用されている。

われわれは、アドックスのアクリルレジジンへの添加による物性、抗菌性と消臭効果について報告している²¹⁾。アドックス含有量を0.5%、1.0%と1.5%の3種類で吸水性試験と曲げ弾性率を検討し、弾性率や吸水性に影響しないことが確認されている。また、*Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* や *Candida albicans* に対する殺菌効果が認められ（図3）、アドックス含有アクリルレジジンディスクに対しても付着菌数が減少することが確認された（図4）。*P. gingivalis* 菌体懸濁液に1.0%アドックス含有アクリルレジジンディスクと無含有アクリルレジジンディスクを浸漬させて18時間培養後のディスク表面への細菌付着

表2 アドックス含有アクリルレジジンディスクの消臭効果

含有率 (%)	CH ₃ SH (ppb)	
1.5	4.0 ±	6.9
1.0	55 ±	20.8
0.5	215.0 ±	24.0
コントロール	465.7 ±	112.2

渡辺秀大ら：神奈川歯学. 55 (1) : 57-67, 2020. から引用

状態を走査型顕微鏡で観察した。その結果、1.0%アドックス含有アクリルレジジンディスクでは、アドックス無含有アクリルレジジンディスクに比較してディスク表面への菌体付着量が少ないことが確認された（図5）。さらに、消臭効果の検討として、アドックス粉末と *P. gingivalis* 培養菌液 10 μl を含ませたる紙を試験管内に入れて密閉したものを1時間後にメチルメルカプタン（CH₃SH）量を測定した。また、アドックス含有アクリルレジジンディスクを *P. gingivalis* 菌液へ2日間浸漬し、洗浄後、3日目にアクリルレジジンディスクに吸着したメチルメルカプタン量を測定した。その結果、アドックス粉末単体だけでなく1.0%アドックス含有アクリルレジジンディスクにおいても強力な消臭効果を有することが確認された（表1, 2）。

酸化亜鉛を特殊加工したアドックスのこれらの効果は、粒子の表面で生成される活性酸素種（ROS）や亜鉛イオン放出や膜の機能不全などが考えられている²²⁻²⁶⁾。

アドックスは、口腔環境の改善と全身疾患の予防に寄与する有用性の高い素材であることは疑いのないものと考えられたことから、歯科材料メーカーなどとの連携を取りながら、今後も更なる詳細な検討を進めていきたいと考えている。

結 論

口腔微生物叢の研究は、生体の恒常性および病態に関する新しい知見が数多く得られている。これらの研究結果は、疾患の原因解明や予防医薬の開発につながる貴重な情報である。われわれも手段は異なるが、口腔環境を健全な状態に維持する目的のため、抗菌性を有する酸化亜鉛を特殊加工されたアドックスを添加した歯科材料の研究を行っている。口腔細菌の増殖を抑制する静菌的な作用と消臭効果を有する歯科材料により、健全な口腔環境の維持に貢献できると考えられる。今後、ゲノム解析によりアドックスの口腔微生物叢への影響についても検討していきたいと考えている。

利益相反

申告すべき利益相反はない。

文 献

- 総務省統計局：高齢者の人口 <https://www.stat.go.jp/data/jinsui/new.html>
- 厚生労働省：平成 28 年歯科疾患実態調査結果の概要 <https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/62-28-02.pdf>
- 石原和幸，今井健一，大島朋子ほか編：口腔微生物学—感染と免疫— 第 7 版。学建書院。2021。
- Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R *et al.*: The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* **6**(1): 46–56, 2012.
- Peterson SN, Snesrud E, Schork NJ *et al.*: Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. *Int Dent J.* **61** Suppl 1(01): 11–22, 2011.
- Wang J, Qi J, Zhao H *et al.*: Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Sci Rep.* 2013; **3**: 1843. doi: 10.1038/srep01843.
- Huang Y, Zhao X, Cui L *et al.*: Metagenomic and metatranscriptomic insight into oral biofilms in periodontitis and related systemic diseases. *Front Microbiol.* 2021 Oct 13; **12**: 728585. doi: 10.3389/fmicb.2021.728585.
- Heuer W, Kettenring A, Stumpp SN *et al.*: Metagenomic analysis of the peri-implant and periodontal microflora in patients with clinical signs of gingivitis or mucositis. *Clin Oral Investig.* 2012 Jun; **16**(3): 843–50. doi: 10.1007/s00784-011-0561-8.
- Shiba T, Watanabe T, Kachi H *et al.*: Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms. *Sci Rep.* 2016 Aug 8; **6**: 30997. doi: 10.1038/srep30997.
- O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ *et al.*: The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS One.* 2015 Sep 14; **10** (9): e0137717. doi: 10.1371/journal.pone.0137717.
- Shi B, Wu T, McLean J *et al.*: The denture-associated oral microbiome in health and stomatitis. *mSphere.* 2016 Dec 28; **1**(6): e00215-16. doi: 10.1128/mSphere.00215-16.
- Olsen I, Yamazaki K: Can oral bacteria affect the microbiome of the gut?. *J Oral Microbiol.* 2019; **11**(1): 1586422. doi: 10.1080/20002297.
- Iwauchi M, Horigome A, Ishikawa K *et al.*: Relationship between oral and gut microbiota in elderly people. *Immun Inflamm Dis.* 2019 Sep; **7**(3): 229–236. doi: 10.1002/iid3.266.
- Sharma N, Bhatia S, Sodhi AS *et al.*: Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol.* **4**(1): 42–66, 2018.
- Le Bars P, Matamoros S, Montassier E *et al.*: The oral cavity microbiota: between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract. *Can J Microbiol.* **63**(6): 475–492, 2017.
- Warinner C, Rodrigues JF, Vyas R *et al.*: Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nat Genet.* **46**(4): 336–344, 2014.
- Shiba T, Komatsu K, Sudo T *et al.*: Comparison of periodontal bacteria of Edo and modern periods using novel diagnostic approach for periodontitis with micro-CT. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Sep 20; **11**: 723821. doi: 10.3389/fcimb.2021.723821.
- 大野爾英：明治期における歯科治療の変遷。国際歯学士日本部会誌。 **52** (1) : 24–30, 2021。
- 宮崎光治，谷 嘉明，西村文夫ほか：歯科材料・器械の変遷（平成 16，17 年度歯科材料・器械調査研究報告書）。歯科材料・器械。 **27** (1) : 28–109, 2008。
- Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T: Denture plaque—past and recent concerns. *J Dent.* **26**(4): 299–304. 1998.
- 渡辺秀大，稲葉啓太郎，和田悠希ほか：抗菌性 aPIZAS を用いた歯科用アクリルレジンの開発に関する研究。神奈川歯学。 **55** (1) : 57–67, 2020。
- Sawai J, Kawada E, Kanou F *et al.*: Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *J Chem Eng Jpn.* **29**(4): 627–633, 1996.
- Sawai J, Kojima H, Igarashi H *et al.*: *Escherichia coli* damage by ceramic powder slurries. *J Chem Eng Jpn.* **30**(6): 1034–1039, 1997.
- Sawai J, Shoji S, Igarashi H *et al.*: Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *J Ferment Bioeng.* **86**(5): 521–522, 1998.
- Yang Z, Xie C: Zn²⁺ release from zinc and zinc oxide particles in simulated uterine solution. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **47**(2): 140–145, 2006.
- Zhang L, Jiang Y, Ding Y *et al.*: Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *J Nanopart Res.* **9**: 479–489, 2007.