

## 原 著

義歯安定剤の使用が *Porphyromonas gingivalis* の  
病原性に及ぼす影響

村上 智彦

岩手医科大学歯学部補綴・インプラント学講座補綴・インプラント学分野

(主任：近藤 尚知 教授)

(受付：2017年12月8日)

(受理：2018年1月5日)

## 和 文 抄 録

義歯安定剤の使用により義歯の維持、安定や咀嚼機能が改善することはこれまで報告されているが、義歯安定剤が口腔微生物に及ぼす影響に関する報告は少ない。そこで本研究は、義歯安定剤使用時の *Porphyromonas gingivalis* の初期付着率、付着菌数の経時的变化、付着状態 (SEM 画像)、上皮細胞破壊因子である gingipain 活性を検索し、義歯安定剤が口腔微生物に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。加熱重合型義歯床用アクリルレジンブロックを作製し、各種義歯安定剤 (クリームタイプ、パウダータイプ、クッションタイプ) を塗布したものを実験群、未処理のものをコントロールとした。菌懸濁液 ( $1.0 \times 10^9$  CFU/ml) を各試料に滴下し、4 °C で2時間培養後、義歯安定剤に付着した菌数を菌種特異的定量 PCR 法にて定量し、初期付着率を算出した。また、付着菌数の経時的变化を測定するために、菌を初期付着させた各試料を ABCM 液体培地に浸漬し 37 °C で1, 2, 3, 6, 12, 24 時間培養し各培養時間における菌数を定量し、付着状態を SEM 画像にて確認した。各培養時間における gingipain 活性は蛍光測定により求めた。

クリームタイプ、パウダータイプの初期付着率は、それぞれ 59.7 % および 70.0 % でクッションタイプ (4.38 %)、コントロール (5.75 %) より高値を示した。また実験群、コントロールともに、培養 12 時間までは経時的に菌数は増殖したが、培養 12 時間以降では増殖率の減少を認めた。SEM 画像により試料表層を確認したところ、クリームタイプとパウダータイプにおいて菌体周囲にバイオフィーム形成を認めた。Arg-gingipain 活性は実験群において培養 1 時間から有意差を認め、培養 6 時間以降で顕著に高値を示した。これらの結果から、義歯安定剤の使用は *P. gingivalis* の病原性を高める可能性が示唆された。

---

Effects of denture adhesives on the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*  
Tomohiko MURAKAMI

Division of Prosthodontics and Oral Implantology, Department of Prosthodontics and Oral Implantology, School of Dentistry, Iwate Medical University  
(Chief: Prof. Hisatomo KONDO)  
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通 1-3-27 (〒 020-8505)

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 43 : 12-23, 2018

## 緒 言

日本は超高齢社会を迎え、2015年において65歳以上の人口が占める割合は26.7%で世界でも高い水準を示している<sup>1)</sup>。2005年以降の歯科疾患実態調査によると、高齢者における義歯装着者の割合は減少傾向を示している<sup>2)~4)</sup>。一方で、高齢者の絶対数は増加傾向を示している<sup>1)</sup>ため、今後も義歯治療を必要とする患者は一定数存在すると考えられる。可撤性義歯の使用は、口腔関連QOLの維持、回復の一手法としてあげられ、全身の健康状態に関与するという報告<sup>5)</sup>があることから、超高齢社会を迎えた我が国において重要な役割を担っていると考えられる。しかし、高度顎堤吸収、遊離端欠損などの要因により、義歯の維持、安定が得られないため自己対策として市販されている義歯安定剤を使用している患者が散見される。義歯安定剤使用経験者は義歯装着者の32.9%に及ぶという報告<sup>6)</sup>があり、義歯安定剤の使用により患者満足度や義歯の維持力、咀嚼能力が向上するという報告<sup>7)~10)</sup>がなされている。義歯安定剤はホームリライナー（クッションタイプ）と義歯粘着剤（クリームタイプ、パウダータイプ、シートタイプ）に大別され、種々のタイプの義歯安定剤が開発、販売されており、長らくその評価は一定していなかった。しかし、近年、American College of Prosthodontists や American Dental Association の意見をまとめた義歯安定剤に関する見解が示され<sup>11), 12)</sup>、義歯安定剤の適切な使用は義歯の維持、安定の向上や、QOLの改善につながる事が報告されたことから、義歯安定剤の中でも義歯粘着剤においてはその有用性が認められるようになってきた<sup>13)~16)</sup>。一方で、クッションタイプの義歯安定剤をメーカー指示と異なる方法で使用したことにより著しい顎堤吸収<sup>17)</sup>や口腔扁平上皮癌<sup>18)</sup>が発生したという症例報告がこれまでなされているが、メーカー指示通り適切に使用した際の口腔微生物の為害作用に及ぼす影響についての報告は少ない。特に、義歯安定剤を部分

床義歯に適用した場合の検討はほとんどなされていない。

部分床義歯装着が口腔に及ぼす為害作用の一つとして、義歯に付着したデンチャーブランクによる残存歯への影響が考えられる。口腔内には多くの微生物が存在しており、これらが義歯床のアクリルレジンに付着することは今までに報告されている<sup>19)</sup>。また、支台歯周囲においてはプラークコントロールが不良となり、歯周病原性細菌数が増加するため、歯周炎のリスクが増大するという報告<sup>20)</sup>があるが、義歯安定剤使用時の口腔微生物の付着、増殖様相については報告が少ない。義歯安定剤に付着した口腔微生物の増殖が亢進するという報告<sup>21)</sup>がある一方、影響しないという報告<sup>22), 23)</sup>もなされており、義歯安定剤の使用が微生物学的為害作用に及ぼす影響については未だ明らかになっていない。

そこで本研究では、部分床義歯に対して義歯安定剤を使用した際の生体為害作用を明らかにすることを目的として、歯周病原性細菌の一つで病原因子として強い組織破壊能を有する *Porphyromonas gingivalis* の義歯安定剤への付着と、義歯安定剤を足場として生じる経時的な菌数の変化について菌種特異的定量PCR法により測定した。さらに、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて *P. gingivalis* の付着様相を視覚的に確認した。また、*P. gingivalis* の病原性の一つで上皮細胞破壊因子として細胞外マトリックスや歯周組織の直接的な破壊に関与するとされているシステインプロテアーゼのうちArg-gingipain<sup>24)</sup>およびLys-gingipain<sup>25)</sup>の活性の経時的変化も測定した。

## 材料および方法

### 1. 使用菌株および実験用菌懸濁液の調整

菌株は *P. gingivalis* ATCC 33277 株を用いた。*P. gingivalis* は5 µg/ml の hemin (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) および0.5 µg/ml の menadione (SIGMA-ALDRICH) 含有の anaerobic bacteria culture media (ABCM 液体培地) (栄研化学, 東京, 日本) を用いて

培養した<sup>26)</sup> *P. gingivalis* を 37 °C, 48 時間, 嫌氣的条件下で前培養, 遠心分離 (2400 × g, 4 °C, 10 分) 後, ペレットを回収し, phosphate buffered saline (PBS) (-) 溶液 (ナカライテスク, 京都, 日本) に OD<sub>600</sub> = 2.0 (1.0 × 10<sup>9</sup> CFU/ml) となるように再懸濁し実験用菌懸濁液とした。

## 2. 実験用試料の作製

加熱重合型義歯床用アクリルレジンを (アクロン<sup>®</sup>: ライブピンク, GC, 東京, 日本) を通法に従い重合し, 10 × 10 × 5 mm のレジンプロックを作製した。作製したレジンプロックを義歯粘膜面調整時に一般的に使用されているカーバイドバーにて削合した際のアクリルレジンの表面粗さと同等となる<sup>19)</sup> ように耐水ペーパー (#400) で上面, 下面, 側面のすべてを研磨した。その後, 121 °C, 15 分間高圧蒸気滅菌を行った。

本研究では, クリームタイプ, パウダータイプ, クッションタイプの3種類の義歯安定剤を用いた。使用した義歯安定剤を表1に示す。クリーンベンチ内にて未使用の義歯安定剤を作製したレジンプロックの上面に 0.011 g ずつ可及

的に薄く塗布し実験用試料とした。また, 未処理のレジンプロックをコントロールとした。義歯安定剤の塗布量に関しては, レジンプロック上面全体を被覆でき, なおかつ吸水によりゲル化したクリームタイプとパウダータイプの義歯安定剤から菌を分離する際に, ゲルを崩壊できる少量であることが求められた。検討した結果 0.011 g が適していた。

## 3. *P. gingivalis* の病原性の検討

各試料を 24 穴プレートに置き, 菌懸濁液を 100 µl ずつ滴下し, 4 °C で 2 時間, 嫌氣的条件下で培養した。本研究では, 最初に滴下した菌がどの程度試料に付着しているかを検討するために, 37 °C 培養による菌の増殖を防ぎ, 菌の有する付着能のみを測定することを目的として 4 °C の条件下で培養した。

### 1) 各試料に付着した *P. gingivalis* の回収

培養終了後, 非付着性の *P. gingivalis* を取り除くためにレジンプロックの側面をピンセットで把持し, 500 µl の PBS (-) 溶液を滴下して各試料を洗浄した。実験群では義歯安定剤を採針にてレジンプロックから剥離し回収した。回

表 1 使用した義歯安定剤

種類	クリーム	パウダー	クッション
品名	新ポリグリップ <sup>®</sup> 無添加	ポリグリップ <sup>®</sup> パウダー無添加	タフグリップ <sup>®</sup> ピンク A
メーカー	グラクソ・ スミスクライン	グラクソ・ スミスクライン	小林製薬
成分	ナトリウム/カルシウム・メトキシエチレン無水マレイン酸共重合体塩, カルボキシメチルセルロース, 軽質流動パラフィン, 白色ワセリン	ナトリウム/カルシウム・メトキシエチレン無水マレイン酸共重合体塩, カルボキシメチルセルロース	酢酸ビニル樹脂, アンモニオアルキルメタクリレートコポリマー, 無水エタノール, 赤色 102 号アルミニウムレーキ, 精製水 (アルコール含有)

回収したクリームタイプとパウダータイプの義歯安定剤はゲル化を認めた。義歯安定剤剥離後のレジンプロックを 1.5 ml の PBS (-) 溶液中で 1 分間ボルテックスし、レジンプロックに残留した *P. gingivalis* を回収した。レジンプロックを取り除き、すでに回収していたゲル化した義歯安定剤を加え遠心分離 (2400 × g, 4 °C, 10 分) した。上清の廃棄後、250 μl の 3 M NaCl 溶液を添加しゲルを崩壊させた (50 °C, 20 分)。

クッションタイプではゲル化を認めなかったため、上記の操作は不要であったが、回収条件を同一にするため、クッションタイプおよびコントロールにおいても同様の操作を行った。

2) *P. gingivalis* の定量と初期付着率の算出

分離した *P. gingivalis* を含む NaCl 溶液に対して QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Limburg, Netherlands) を用いて DNA を抽出し、菌種特異的定量 PCR 法で菌数を定量した<sup>27)</sup>。定量には、SYBR Green real-time PCR system (Real-time PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup>, タカラバイオ, 滋賀, 日本) を使用した。PCR 反応液は希釈した DNA 1 μl をテンプレートとし、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect Real Time, タカラバイオ) 12.5 μl, 表 2 に示す 10 μM のプライマー各 0.5 μl, および滅菌蒸留水 10.5 μl で全量 25 μl に調整した。反応条件は、95 °C 30 秒で DNA を熱変性させた後、95 °C 5 秒, 58 °C 30 秒の 2 steps とし、これを 40 サイクル行った。なお、検量線を作成するために OD<sub>600</sub>=2.0 (1.0 × 10<sup>9</sup> CFU/ml) を段階希釈し Threshold Cycle (Ct) 値の測定を行った。

最初に滴下した菌数 (1.0 × 10<sup>8</sup> CFU) に対する、各試料に付着していた菌数 (4 °C, 2 時

間培養後) の割合を算出し、初期付着率 (%) とした。

3) 付着菌数の経時変化

実験群, コントロールの各試料に実験用菌懸濁液を 100 μl 滴下し 4 °C で 2 時間培養した後、500 μl の PBS (-) 溶液で洗浄した。洗浄したそれぞれの試料を 1.5 ml の ABCM 液体培地に浸漬し、37 °C で 1, 2, 3, 6, 12, 24 時間、嫌気的条件下で培養した。各培養時間における *P. gingivalis* の菌数を 3.1) および 3.2) と同様の方法により定量した。

4) SEM による試料表層の観察

初期付着時と 12 時間培養した各試料を 2.5 % グルタルアルデヒド -0.1 M リン酸緩衝液で前固定 (4 °C, 2 時間) し、1 % 四酸化オスミウム -0.1 M リン酸緩衝液で後固定 (4 °C, 2 時間) した。その後、エタノール上昇系列で脱水後、t-ブタノールを用いて凍結乾燥 (VFD-216<sup>®</sup>, 真空デバイス, 茨城, 日本) した。凍結乾燥後、オスミウムを蒸着 (OPC60A<sup>®</sup>, フェルジェン, 愛知, 日本) し、走査型電子顕微鏡 (SU8010<sup>®</sup>, 日立ハイテクノロジーズ, 東京, 日本) を用い加速電圧 2 kV の条件下で試料表層を観察した。

5) Gingipain 活性の経時変化

タンパク質分解酵素である Arg-gingipain 活性, Lys-gingipain 活性の経時変化を計測するため、各試料を 3.3) と同様の実験条件で培養した。各培養時間において、培養液を回収し遠心分離 (2400 × g, 4 °C, 10 分) を行いその上清を回収した。回収した上清を 0.45 μm のフィルターにて濾過し、gingipain 活性の計測を行った<sup>28,29)</sup>。すなわち、得られた濾過後の上清 2.6 μl に、di-sodium hydrogen phosphate 溶液 (ナ

表 2 菌種特異的定量 PCR 法で使用したプライマー

ターゲット遺伝子	配列 (5' to 3')	Product length (bp)
<i>P. gingivalis</i> 16S rDNA	tgtagatgactgatggtgacaacc	197
	acgtcatccccacctctc	

カライトスク)と sodium dihydrogen phosphate 溶液 (関東化学, 東京, 日本) を混和して調整した 0.5 M の NaPi (pH 7.5) 溶液 20  $\mu$ l, 0.5 M の ethylenediaminetetraacetic acid 溶液 (ナカライトスク) 2  $\mu$ l, 0.01 M のペプチド蛍光基質 (4-methylcoumaryl-7-amide : MCA 基質) (ペプチド研究所, 大阪, 日本) 0.4  $\mu$ l, PBS (-) 溶液 175  $\mu$ l を加え, 全量を 200  $\mu$ l とし 37  $^{\circ}$ C で 5 分間反応させ, 蛍光測定を行い各培養時間における gingipain 活性の強さと経時的変化を検討した. また, 単位菌数 ( $1.0 \times 10^8$  CFU) あたりの gingipain 活性 (比活性) を算出することにより *P. gingivalis* の gingipain 産生能の変化を検討した.

なお, 蛍光測定には分光蛍光光度計 (F-2000<sup>®</sup>, HITACHI, 東京, 日本) を用い, 励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm とした. MCA 基質には Boc-Phe-Ser-Arg-MCA および Boc-Val-Leu-Lys-MCA を用いた.

#### 4. 統計解析

上記実験 (n=1) を繰り返し 10 回施行し, 得られた結果を平均値  $\pm$  標準偏差で示し, Kruskal-Wallis 検定で多重比較を行い, ポストホックテストとして Bonferroni 法を用いた. 統計学的解析には, R (the R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) をもとに開発された EZR (ver. 1.36, 自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉, 日本)<sup>30)</sup> を使用した. 有意水準は 5% とした.

## 結 果

#### 1. *P. gingivalis* 菌数定量のための検量線

$1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$  CFU/ml までの検出限界の範囲で相関が確認され ( $R^2 = 0.9828$ ), 検量線は  $y = 3E+27x^{-15.9}$  であった (図 1).

#### 2. 各試料への初期付着率

*P. gingivalis* の各試料への初期付着率について検討した結果, 滴下した菌数 ( $1.0 \times 10^8$  CFU) に対し, クッションタイプとコントロー

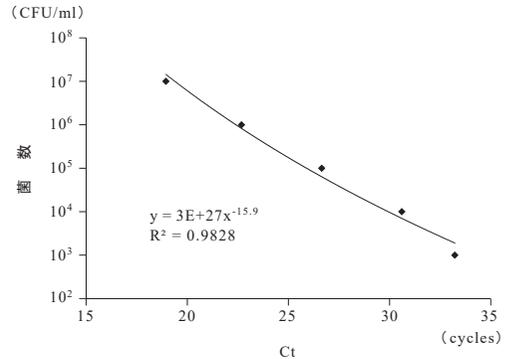


図 1 : *P. gingivalis* の菌数定量のための検量線  
*P. gingivalis* OD<sub>600</sub>=2.0 ( $1.0 \times 10^9$  CFU/ml) を段階希釈し, 検量線を作成した.

ルにはそれぞれ 4.38%, 5.75% 付着したが, クリームタイプとパウダータイプにはそれぞれ 59.7%, 70.0% 付着し有意差を認めた (図 2).

#### 3. 付着菌数の経時的変化

各試料に付着した *P. gingivalis* の経時的な菌数の変化を計測した結果, 実験群, コントロールともに経時的な増殖を示したが, いずれも培養 12 時間以降の増殖率は減少した. また, 同一培養時間における付着菌数を比較した結果, すべての培養時間においてクリームタイプ, パウダータイプに付着する菌数はクッションタイ

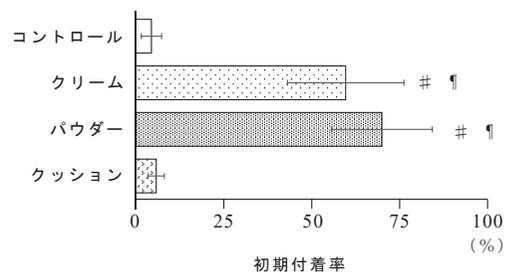


図 2 : 各試料における *P. gingivalis* の初期付着率  
初期付着率 (%) = {付着した菌数 / 最初に滴下した菌数 ( $1.0 \times 10^8$  CFU)}  $\times$  100  
(#): コントロールと比較し, (¶): クッションタイプと比較し有意に高値を示す ( $p < 0.05$ ).

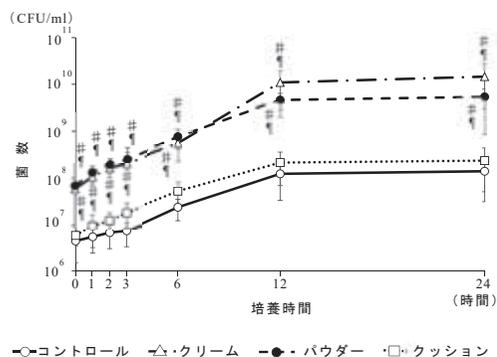


図3：各試料における *P. gingivalis* 数の経時的变化  
*P. gingivalis* が付着した各試料を培養した際の菌数の変化を示す。

(#)：コントロールと比較し，(¶)：クッションタイプと比較し有意に高値を示す ( $p < 0.05$ )。

プ、コントロールより高値を示した。一方で各培養時間の *P. gingivalis* の増殖率について、各試料間に有意差は認められなかった (図3)。

#### 4. SEM 画像による検討

各試料への菌付着状態を SEM 画像により観察した (図4A～H)。初期付着時および12時間培養時で、コントロール、クッションタイプと比較し、クリームタイプ、パウダータイプではバイオフィルムの形成が認められた (図4C～F)。

#### 5. Gingipain 活性の経時的变化

Gingipain 活性の経時的变化を検討した結果、実験群ではコントロールと比較し、Arg-gingipain 活性においては培養1時間から有意差を認め、培養6時間以降で顕著に高値を示した (図5-A)。Lys-gingipain 活性においては、コントロールおよびクッションタイプと比較し、培養3時間まではクリームタイプとパウダータイプで有意差を認め、培養6時間ではパウダータイプのみ有意差を認めた。培養12時間以降では、コントロールと比較し、すべての実験群で顕著に高値を示した (図5-B)。

Gingipain の比活性を検討した結果、Arg-gingipain 比活性では、コントロールと比較し、クリームタイプでは培養1時間で、パウダータイプでは培養6時間で、クッションタイプでは培養1時間から有意差を認めた。特に培養6時間以降でクッションタイプが高値を示し、培養24時間ではすべての実験群で顕著に高値を示した (図6-A)。一方、Lys-gingipain 比活性では、コントロールと比較し、クッションタイプでは培養12時間以降、パウダータイプでは培養24時間で顕著に高値を示した (図6-B)。

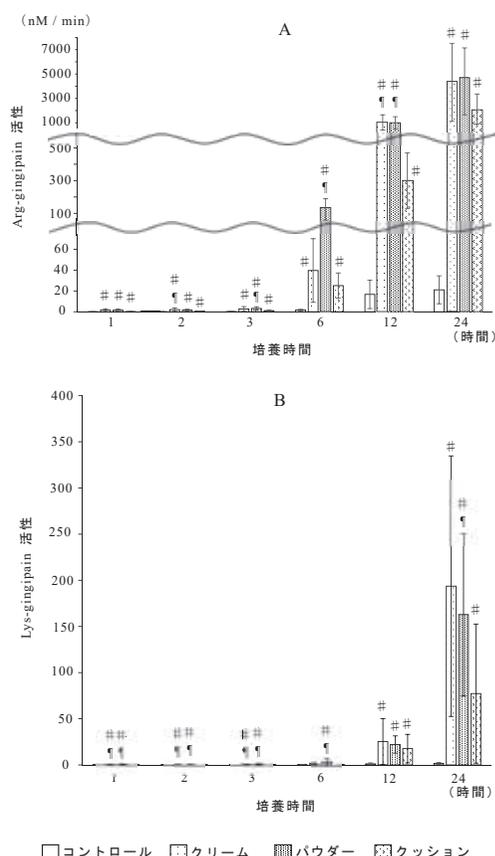


図5：各試料における gingipain 活性の経時的变化  
*P. gingivalis* が付着した各試料を培養した際の gingipain 活性を示す (A: Arg-gingipain 活性, B: Lys-gingipain 活性)。

(#)：コントロールと比較し，(¶)：クッションタイプと比較し有意に高値を示す ( $p < 0.05$ )。

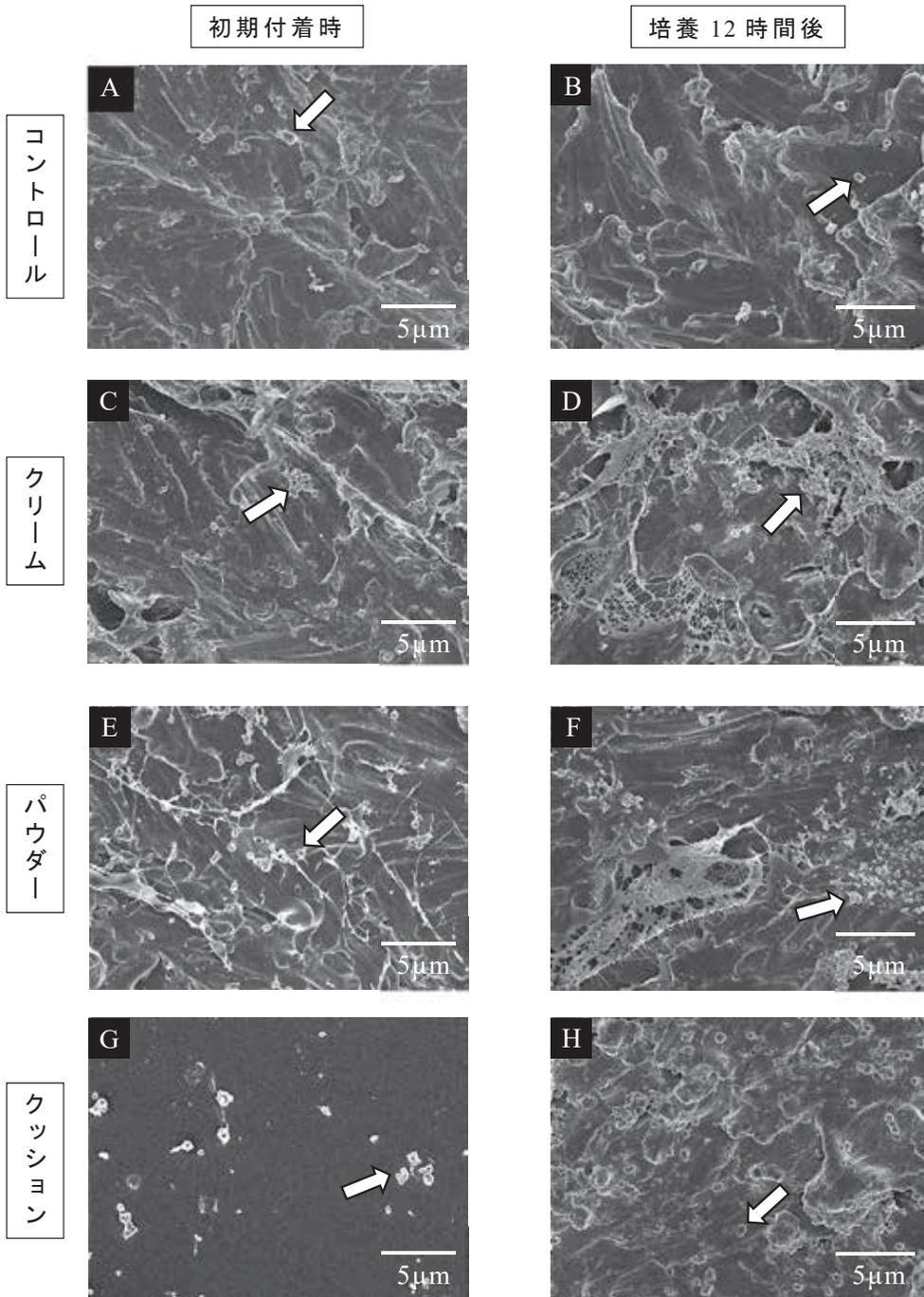


図4： *P. gingivalis* の付着状態

初期付着時と培養 12 時間後における各試料表面の SEM 画像 (5000 倍) を示す。矢印は *P. gingivalis* を示す。バイオフィルムは糸状の形態を呈する。A：コントロール・初期付着時，B：コントロール・培養 12 時間後，C：クリームタイプ・初期付着時，D：クリームタイプ・培養 12 時間後，E：パウダータイプ・初期付着時，F：パウダータイプ・培養 12 時間後，G：クッションタイプ・初期付着時，H：クッションタイプ・培養 12 時間後。

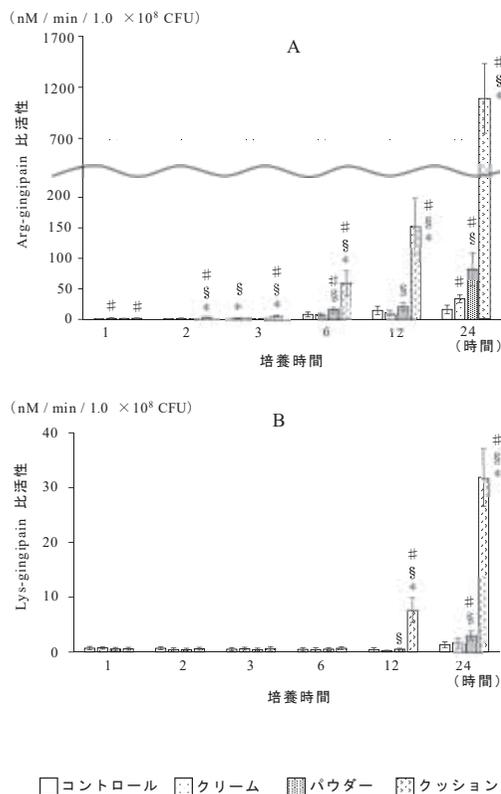


図6：各試料における gingipain の比活性の経時変化

単位菌数 ( $1.0 \times 10^8$  CFU) あたりの gingipain 活性を示す (A: Arg-gingipain 比活性, B: Lys-gingipain 比活性). (#): コントロールと比較し, (\$) : クリームタイプと比較し, (\*) : パウダータイプと比較し有意に高値を示す ( $p < 0.05$ ).

## 考 察

口腔内には多くの口腔微生物が存在しているが、これまでアクリルレジンの表面性状と付着菌数の関連性<sup>19)</sup>や、義歯床用アクリルレジンのよりアクリル系軟質裏装材への菌付着が多いという報告<sup>31,32)</sup>がなされている。一方で、義歯安定剤に対する口腔微生物の付着についての報告は少ないが、アクリルレジンの表面性状が異なり、軟質裏装材と同様に義歯と口腔粘膜間に介在する義歯安定剤においても菌の付着や増殖に影響を及ぼす可能性が考えられた。義歯安定剤

に対する口腔微生物の付着に関する報告の多くは全部床義歯を想定したものであった。現在、部分床義歯に使用可能な義歯安定剤も存在していることから、部分床義歯装着時を想定した検討も必要であると考えたため、本研究では残存菌の歯周組織に対して強い組織破壊能を有する *P. gingivalis* に着目した。*P. gingivalis* が義歯に付着すること<sup>19)</sup>や、部分床義歯の使用により口腔衛生状態が低下し歯肉退縮が生じること<sup>33)</sup>から、衛生管理が不良な状況下では義歯が *P. gingivalis* 増殖の足場となることが予測された。また、従来の報告では主に菌数の変化に着目されており、*P. gingivalis* が口腔粘膜に直接為害性を及ぼすとされるタンパク質分解酵素についての検討は僅少であったため本研究では Arg-gingipain および Lys-gingipain の経時変化にも着目し検討を加えた。

結果より、*P. gingivalis* のクリームタイプ、パウダータイプの初期付着率は、それぞれ 59.7% および 70.0% でクッションタイプ (4.38%)、コントロール (5.75%) より高値を示した。これは、コントロールやクッションタイプと異なり、クリームタイプおよびパウダータイプでは、吸水によりゲル状となる際に、*P. gingivalis* が絡め取られたためと考えられる。実際に義歯安定剤を使用した場合、クリームタイプ、パウダータイプでは *P. gingivalis* の付着リスクが高くなる可能性が考えられた。

付着した *P. gingivalis* 数の経時変化に関しては、実験群、コントロールともに、培養 12 時間までは経時的な菌数の増殖を示したが、それ以降の増殖率は減少していた。同一培養時間における付着菌数の比較では、すべての培養時間においてクリームタイプ、パウダータイプへの付着菌数が高値を示した。一方で各試料間における経時的な増殖率に差はなく、初期付着時の菌数の差が培養後の菌数の差となっていた。これまでに、Ozkan ら<sup>22)</sup>は菌の増殖に関して義歯安定剤とアクリルレジンの有意差がないと報告している。Ozkan らは in vivo で患者に義歯や口腔内の清掃指導を行った状況で付着菌

数を計測しており、義歯安定剤使用前は義歯や被検者の口腔内が清潔に保たれている環境であった。しかし、本研究は *in vitro* で試料に *P. gingivalis* を付着させ、培養中に菌の洗浄が行われることなく増殖様相を計測している。そのため、初期付着時の菌数が少ないと考えられる Ozkan らの結果とは異なり、初期付着時に多くの菌が付着したクリームタイプとパウダータイプの義歯安定剤において培養後に高値を示したと考えられる。また、測定方法の違いが影響している可能性も考えられた。これまでの研究では、採取した菌を再度培養しコロニー数を測定していたが、本研究では定量的 *real-time* PCR 法を用い、培養した菌の全数をその時点で測定したために異なる結果となったと予想される。口腔衛生状態が不良な場合、義歯床下のような閉鎖された環境下では初期付着時により多くの *P. gingivalis* が付着すると考えられるクリームタイプとパウダータイプでは *P. gingivalis* が増殖し続け、口腔内に影響を及ぼし続けることが示唆された。

菌付着後の各試料表面を SEM により観察した結果、クリームタイプ、パウダータイプでバイオフィルムの形成が認められた。口腔内を想定すると、バイオフィルム形成により他の菌の付着が誘導され、*P. gingivalis* 以外の菌に起因する悪影響も生じる可能性があるため、クリームタイプとパウダータイプの使用時は注意が必要である。

付着菌数は培養初期から増加傾向を示したが、gingipain 活性は培養 6 時間以降で顕著に亢進した。Gingipain 活性は菌が飢餓状態に陥った際に亢進することから<sup>34)</sup>、培養 6 時間程度で培地からの栄養補給が滞った可能性が考えられた。実際の口腔内でも義歯と粘膜が密着し栄養補給が得られづらくなるため、義歯安定剤の適用直後から gingipain 活性亢進までの時間には差が生じる可能性が考えられる。従って gingipain 活性が亢進する前までに義歯洗浄を行うことが肝要である。Arg-gingipain と Lys-gingipain の比活性を検討した結果、特にクッ

ションタイプにおいて培養 6 時間以降で顕著に高値となり、比活性が亢進したことが示された。Gingipain は強力なタンパク質分解酵素で口腔粘膜組織を破壊し、炎症を引き起こすことが明らかにされている<sup>35)</sup>。このことから、他の義歯安定剤と比較してクッションタイプに付着した *P. gingivalis* の口腔粘膜に対する為害作用は増大することが推察される。しかし、比活性の亢進が認められた要因としては義歯安定剤に含まれる成分の影響が考えられるものの詳細は明確になっていないため今後検討が必要である。

## 結 論

得られた結果から、アクリルレジンと比較し義歯安定剤、特にクリームタイプとパウダータイプの使用は *P. gingivalis* の付着が亢進し、増殖し続けることが明らかとなった。また、実験群における gingipain 活性は培養 6 時間以降で高値を示し、比活性はクッションタイプが顕著に高値を示した。以上のことから、義歯安定剤の使用は *P. gingivalis* の病原性を高める可能性が示された。義歯安定剤使用の際には口腔内細菌数を減少させてから適用することが肝要であると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、懇切丁寧なご指導と多大なるご協力を賜りました微生物学講座分子微生物学分野の佐々木実教授、下山佑先生、生命科学技術支援センターの石田欣二技師長、小笠原勝利技師、補綴・インプラント学講座の近藤尚知教授、野村太郎先生をはじめ講座員の皆様に心より感謝の意を表します。

## 利 益 相 反

本研究において開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) 総務省. “平成 27 年国勢調査人口等基本集計結果.” 2016-10-26. <http://www.stat.go.jp/data/kokusei/2015/kekka/kihon1/pdf/youyaku.pdf>. (参

- 照 2017-11-03).
- 2) 厚生労働省. “平成17年歯科疾患実態調査.” 2007-01-19. <http://www.mhlw.go.jp/topics/2007/01/tp0129-1b.html>. (参照 2017-11-03).
  - 3) 厚生労働省. “平成23年歯科疾患実態調査.” 2012-04. <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-23.html>. (参照 2017-11-03).
  - 4) 厚生労働省. “平成28年歯科疾患実態調査.” 2017-09-15. <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-28.html>. (参照 2017-11-03).
  - 5) Shimazaki, Y., Soh, I., Saito, T., Yamashita, Y., Koga, T., Miyazaki, H., Takehara, T.: Influence of dentition status on physical disability, mental impairment, and mortality in institutionalized elderly people. *J. Dent. Res.*, 80: 340-345, 2001.
  - 6) Coates, A. J.: Usage of denture adhesives. *J. Dent.*, 28: 137-140, 2000.
  - 7) Kapur, K. K.: A clinical evaluation of denture adhesives. *J. Prosthet. Dent.*, 18: 550-558, 1967.
  - 8) Kelsey, C. C., Lang, B. R., Wang, R. F.: Examining patients' responses about the effectiveness of five denture adhesive pastes. *J. Am. Dent. Assoc.*, 128: 1532-1538, 1997.
  - 9) Ozcan, M., Kulak, Y., de Baat, C., Arikan, A., Uçankale, M.: The effect of a new denture adhesive on bite force until denture dislodgement. *J. Prosthodont.*, 14: 122-126, 2005.
  - 10) Nicolas, E., Veyrune, J. L., Lassauzay, C.: A six-month assessment of oral health-related quality of life of complete denture wearers using denture adhesive: a pilot study. *J. Prosthodont.*, 19: 443-448, 2010.
  - 11) Shigli, K.: Aftercare of the complete denture patient. *J. Prosthodont.*, 18: 688-693, 2009.
  - 12) Felton, D., Cooper, L., Duqum, I., Minsley, G., Guckes, A., Haug, S., Meredith, P., Solie, C., Avery, D., Deal Chandler, N.: Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J. Prosthodont.*, 20 Suppl: S1-S12, 2011.
  - 13) Koronis, S., Pizatos, E., Polyzois, G., Lagouvardos, P.: Clinical evaluation of three denture cushion adhesives by complete denture wearers. *Gerodontology*, 29: e161-169, 2012.
  - 14) Munoz, C. A., Gendreau, L., Shanga, G., Magnuszewski, T., Fernandez, P., Durocher, J.: A clinical study to evaluate denture adhesive use in well-fitting dentures. *J. Prosthodont.*, 21: 123-129, 2012.
  - 15) Quiney, D., Nishio, Ayre., Milward, P.: The effectiveness of adhesives on the retention of mandibular free end saddle partial dentures: An in vitro study. *J. Dent.*, 62: 64-71, 2017.
  - 16) de Oliveira Junior, N. M., Rodriguez, L. S., Mendoza Marin, D. O., Paleari, A. G., Pero, A. C., Compagnoni, M. A.: Masticatory performance of complete denture wearers after using two adhesives: a crossover randomized clinical trial. *J. Prosthet. Dent.*, 112: 1182-1187, 2014.
  - 17) Woelfel, J. B., Kreider, J. A.: Home reliner ruins dentures and causes shrinkage. *J. Prosthet. Dent.*, 20: 319-325, 1968.
  - 18) 岡達, 牧弥寿夫, 金田敏郎: 市販の軟性義歯接着剤(いわゆる義歯安定剤)の誤用により発症したと思われる口底部扁平上皮癌の一例. *日口腔科会誌*, 34: 245-249, 1985.
  - 19) Yamauchi, M., Yamamoto, K., Wakabayashi, M., Kawano, J.: In vitro adherence of microorganisms to denture base resin with different surface texture. *Dent. Mater. J.*, 9: 19-24, 1990.
  - 20) Mine, K., Fueki, K., Igarashi, Y.: Microbiological risk for periodontitis of abutment teeth in patients with removable partial dentures. *J. Oral Rehabil.*, 36: 696-702, 2009.
  - 21) Sampaio-Maia, B., Figueiral, M. H., Sousa-Rodrigues, P., Fernandes, M. H., Scully, C.: The effect of denture adhesives on *Candida albicans* growth in vitro. *Gerodontology*, 29: e348-356, 2012.
  - 22) Ozkan, Y. K., Uçankale, M., Ozcan, M., Uner, N.: Effect of denture adhesive on the microorganisms in vivo. *Gerodontology*, 29: 9-16, 2012.
  - 23) Rajaram, A., Manoj, S. S.: Influence of 3 different forms of a commercially available denture adhesive material on the growth of *Candida* species: An in vitro study. *J. Prosthet. Dent.*, 118: 379-385, 2017.
  - 24) Chen, Z., Potempa, J., Polanowski, A., Wikstrom, M., Travis, J.: Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.*, 267: 18896-18901, 1992.
  - 25) Pike, R., McGraw, W., Potempa, J., Travis, J.: Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J. Biol. Chem.*, 269: 406-411, 1994.
  - 26) 石河太知: 分泌型白血球プロテアーゼインヒビターによる歯肉上皮細胞の *Porphyromonas gingivalis* 感染制御. *岩医大歯誌*, 35: 29-41, 2010.
  - 27) Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, S., Hamada, S.: Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1426-1430, 1999.
  - 28) Kadowaki, T., Yoneda, M., Okamoto, K., Maeda, K., Yamamoto, K.: Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.*, 269: 21371-21378, 1994.

- 29) Nemoto, T. K., Ohara-Nemoto, Y., Bezerra, G. A., Shimoyama, Y., Kimura, S.: A *Porphyromonas gingivalis* Periplasmic Novel Exopeptidase, Acyl-peptidyl Oligopeptidase, Releases N-Acylated Di- and Tripeptides from Oligopeptides. *J. Biol. Chem.*, 291: 5913-5925, 2016.
- 30) Kanda, Y.: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.*, 48: 452-458, 2013.
- 31) Radford, D. R., Sweet, S. P., Challacombe, S. J., Walter, J. D.: Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J. Dent.*, 26: 577-583, 1998.
- 32) Nevzatoglu, E. U., Ozcan, M., Kulak-Ozkan, Y., Kadir, T.: Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin. Oral Investig.*, 11: 231-236, 2007.
- 33) Costa, L., do Nascimento, C., de Souza, V. O., Pedrazzi, V.: Microbiological and clinical assessment of the abutment and non-abutment teeth of partial removable denture wearers. *Arch. Oral Biol.*, 75: 74-80, 2017.
- 34) Nishimata, H., Ohara-Nemoto, Y., Baba, T. T., Hoshino, T., Fujiwara, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Nemoto, T. K.: Identification of Dipeptidyl-Peptidase (DPP) 5 and DPP7 in *Porphyromonas endodontalis*, Distinct from Those in *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*, 9: e114221, 2014.
- 35) Travis, J., Pike, R., Imamura, T., Potempa, J.: *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 32: 120-125, 1997.

## Effects of denture adhesives on the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*

Tomohiko MURAKAMI.

Division of Prosthodontics and Oral Implantology, Department of Prosthodontics and Oral Implantology, School of  
Dentistry, Iwate Medical University  
(Chief: Prof. Hisatomo KONDO)

[Received : December 8 2017 : Accepted : January 5 2018]

**Abstract** : Denture adhesives improve denture retention, stability and masticatory function. However, the effects of denture adhesives on oral microorganisms have not been elucidated. This study aimed to investigate the effects of three different forms of denture adhesives (cream, powder and cushion forms) on the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*. To this end, the number of adherent *P. gingivalis*, scanning electron microscope (SEM) images of biofilm formation on the surface of specimens, and gingipain activity were examined.

In this in vitro study, *P. gingivalis* strain ATCC33277 suspension was seeded on acrylic resin and each type of denture adhesive, and incubated for 2 hours at 4 °C. The number of *P. gingivalis* adherent to the resin/ denture adhesives was quantified using a quantitative real-time PCR assay. Then, to simulate conditions of use for denture adhesives, the specimens of adherent *P. gingivalis* were incubated for 1, 2, 3, 6, 12 and 24 hours at 37 °C in ABCM medium. The number of adherent *P. gingivalis* at the end of each incubation period was quantified, and the surfaces of the specimens were examined under a SEM. Gingipain activity was examined using a fluorescence assay.

The degree of initial adhesion was significantly higher with cream and powder adhesives. The number of adhered *P. gingivalis* increased with time, however, the slower growth rate was shown after an incubation period of 12 hours. In cream and powder adhesives, biofilm formation was observed by SEM. For all the denture adhesives, high Arg-gingipain activities were observed after 6 hours. Our results indicate that denture adhesives likely enhance the pathogenicity of *P. gingivalis*.

**Key words** : denture adhesive, *Porphyromonas gingivalis*, pathogenicity, gingipain activity