

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11431

研究課題名(和文)小児のオーラルヘルスプロモーション：嫌気的人工口腔装置による歯周疾患予防法の開発

研究課題名(英文)Oral health promotion for children: evaluation of the periodontal prevention using an Artificial Mouth System

研究代表者

田中 とも子(TANAKA, TOMOKO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：70307958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、歯周病と強い関連があるRed complexの3菌種を用いたバイオフィルム形成とともに歯周病シミュレーション開発の基礎的な検討である。

P. gingivalis, T. forsythia, T. denticola, S. gordoniiおよびS. mutansからAcetylmuramic acid添加TYGVS培地中で、ヒト歯の切片上にバイオフィルム形成を試みた。SEMでの観察、菌叢分析の結果、バイオフィルム形成が確認された。また、バイオフィルムの安定性はいくつかの条件により異なることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is how to establish a biofilm forming protocol by 4 kinds of microorganisms and to develop the basic investigation model in vitro of periodontal disease. The microorganisms were Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola, S.gordonii and S. mutans. We tried biofilm formation on the section of a human tooth with the TYGVS culture medium added N-acetylmuramic acid.

The biofilm formation was confirmed by the SEM observation and the bacterial flora analyses. And we found that the stability of the biofilm is affected by several conditions.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：バイオフィルム Red complex 歯周病

1. 研究開始当初の背景

「歯科口腔保健の推進に関する法律」では、「自ら歯科疾患の予防に向けた取組」などが国民の責務とされた。さらに、第10条では国および地方公共団体は、「個別的または公衆衛生的に行う歯科疾患の効果的な予防のための措置」を行うことになっている。

これまで、研究代表者らは成人の生活習慣病予防ヘルスプロモーション研究を行い、認知レベルは改善するが行動の改善は難しいと報告した。これを支持する報告も見られる。そこで、「ヘルスプロモーションの開始は小児期から実施すべき」との仮説を得て、「小児期に自己解決型ヘルスプロモーションを実施し、自己管理能力向上を確認した」との報告をした。この一連のヘルスプロモーションで、「定期的な歯科検診の受診推進」については一定の効果を見出した。

さらに、小児の自己管理能力の発達に合った「歯科疾患予防に対する自らの取組」に関しては、齲蝕ではフッ化物応用を始めとする特異的な予防法が多数開発されている。しかし、小児の成長に合った段階的な歯周疾患に対する予防法はない。歯周疾患関連菌の殺菌・炎症抑制を目的とした多数の洗口剤・歯磨剤など物理的清掃と併用する歯周疾患予防剤が市販されている程度である。しかし、効果が科学的に確認されている洗口剤はアルコール度数が高く、小児期に応用することは不可能である。一方、漢方薬等の生薬も歯周疾患の症状抑制に効果があるとされており、小児に使用できる新たな予防法開発が期待されている。さもないければ「自ら歯科疾患の予防に向けた取組」が小児では極端に限られ、成人のヘルスプロモーションまで継続せず、ヘルスプロモーションが進まない。

歯周疾患予防法の効果判定にはヒト被験者を用いた *in vivo* 評価が最も好ましい。しかし、適切な歯周疾患予防剤・予防法の選択、使用条件を評価するには、多くの被験者を対象とするため、時間的、経済的および倫理的な制約がある。そこで、当講座ではヒト口腔内の嫌気的環境を人工的に作る人工口腔装置を開発し、*in vitro* の評価を可能とした。

これまでの研究で、歯周疾患は宿主免疫・遺伝因子および環境因子が複雑に関係する口腔細菌による感染症であることが明らかにされてきた。また、口腔細菌は口腔バイオフィルムを形成して、物理的な力や化合物に対する抵抗力を持つことから口腔バイオフィルムを持続的に除去することは難しい。Socransky らは *P. g.*、*T. f.* および *T. d.* の3菌種を Red complex とし、この3菌種の混合感染は歯周疾患の重症度、特にポケットの深さとプロービング時の出血との間に強い関連がある。しかし、原因

菌が同定されても、現状では *in vitro* の予防評価は難しい。

そこで本研究では申請者らが開発した嫌気的人工口腔装置を用い、Red complex を用いてバイオフィルムを作成して、より生体に近い歯肉溝内環境を再現する。そして、歯周疾患予防剤に適した新たな有効成分の同定や応用方法の効率的な開発を行う。

2. 研究の目的

研究代表者の一連のヘルスプロモーション研究から、「小児期の自己解決型ヘルスプロモーションにより、自己管理能力が向上した」と結論した。小児期からの自己管理能力の発達に合った歯周疾患予防法は成人後に向け必須であるが、その開発研究は齲蝕予防法に比べて極めて少ない。これを研究するにはシミュレーションが必要だが、歯周疾患は宿主免疫・遺伝因子および環境因子が複雑に関係する感染症である。

そこで本研究では、申請者らが世界で初めて開発した嫌気的人工口腔装置を用い、歯周疾患に強い関連がある Red complex の3菌種を用いてエナメル質上・歯根上にバイオフィルムを作製する。その結果、ヒト口腔に近い歯肉溝内環境を再現し、歯周疾患の予防に適した化合物の同定や、応用方法の効率的な開発を行うことを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

P. g. ATCC33277 株、*T. f.* ATCC43037 株、*T. d.* ATCC35405 株、*S. gordonii* (*S. g.*) DL1 株・ATCC10558 株および *S. mutans* (*S. m.*) ATCC25175 株である。

(2) バイオフィルム形成用培地の調整

TYGVS 培地を基本とする液体培地に 0.1% N-acetylmuramic acid を添加し、5 菌種共通の培地を調整した。

(3) バイオフィルムの形成

ヒト唾液を用いて人工的にペリクルを附着させた(図1)ヒト歯・歯根部から切り出した切片(被験切片)上に行った。

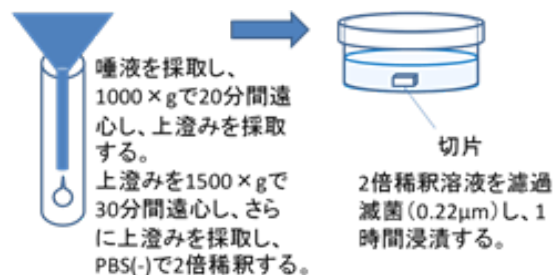


図1 ペリクル加工の方法

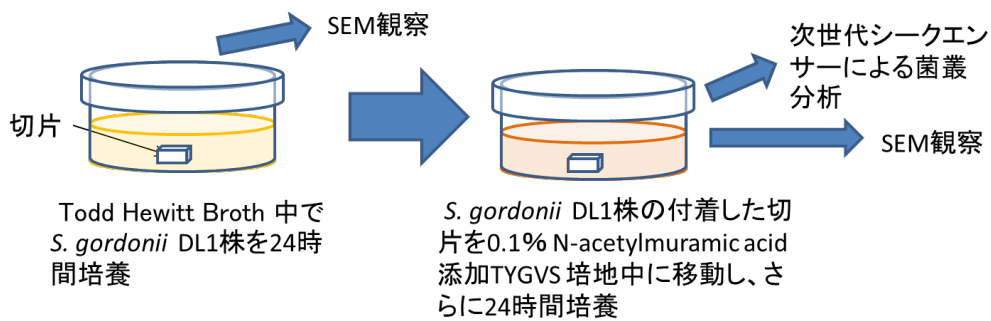


図2 バイオフィーム形成の方法

図2のようにはじめに OD を 1.5 に調整した *S.g* 懸濁液を、被験切片が設置された容器内に満し、24 時間培養した。次いで懸濁液を除去し、各 OD を 1.5 に調整した *P. g.*、*T. f* と *T. d* 懸濁液を被験切片が設置された容器内に入れ、さらに嫌気条件下 (90% N₂、5% CO₂) で 24 時間培養した。

これらの条件と比較検討するために、ペリクル加工無、*S. g* 培養無、*S. g* の代替として *S. m* 培養有と条件を変え、バイオフィームの観察を SEM (日立 S-5000) にて行った。

また、*S.g.*、*P. g.*、*T. f* と *T. d* のバイオフィームについての菌叢分析は調整細菌ゲノムを鋳型として増幅した 16S-V3V4 領域アンプリコンを Miseq 次世代シーケンサーにて配列解析を行った。

(4) バイオフィームを用いたシミュレーション

S. g ATCC10558 株と Red complex の 3 菌種で作成したバイオフィームを用いて、0.9% グルコン酸クロルヘキシジン溶液に 30 秒または 10 分間作用させた。作用直後と 1 日嫌気培養後に菌叢分析を行った。なお、作用溶液のコントロールは DDW とした。

4. 研究成果

(1) バイオフィームの形成

SEM 観察の結果、図4のように 4 菌種すべてが切片上に付着し、バイオフィーム形成が確認された。図5のように *S.g* 培養なしでは、*P. g* のみ少数の付着がみられ、ペリクル加工なし、*S.m* 培養ありでも 4 菌種が確認された。

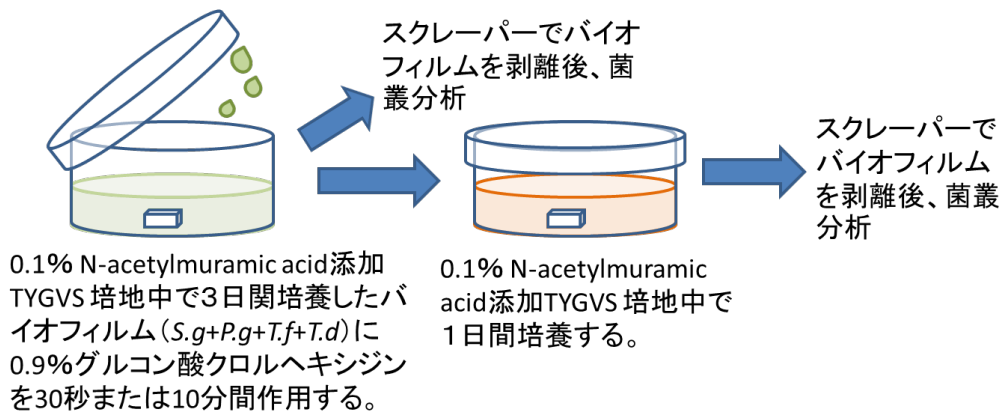
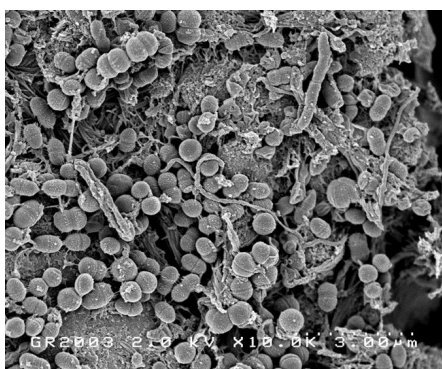
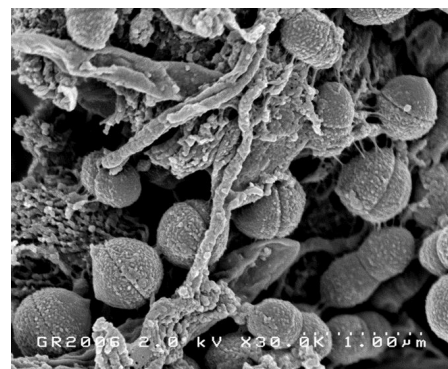


図3 バイオフィームを用いたシミュレーション

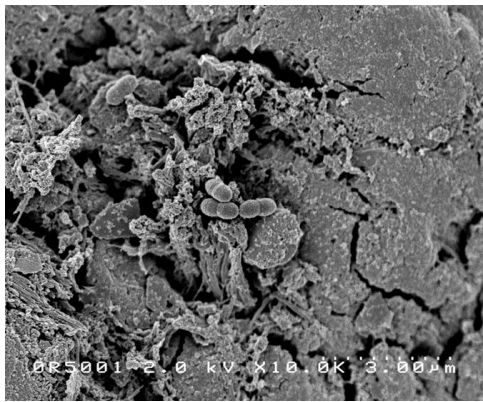


× 10000

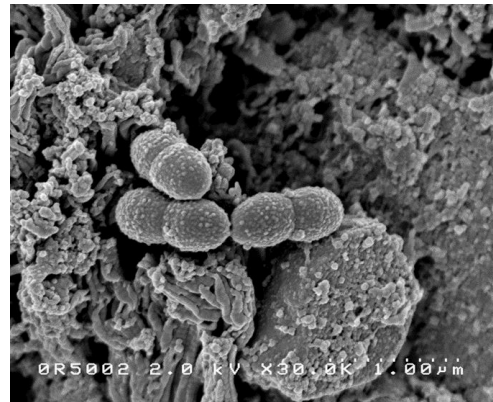


× 30000

図4 ペリクル加工済み切片上の *S.g.*、*P.g.*、*T.f.*、*T.d.* によるバイオフィーム SEM 像



× 10000



× 30000

図5 ペリクル加工済み切片上の *P. g.*、*T. f.*、*T. d.* によるバイオフィルム SEM 像

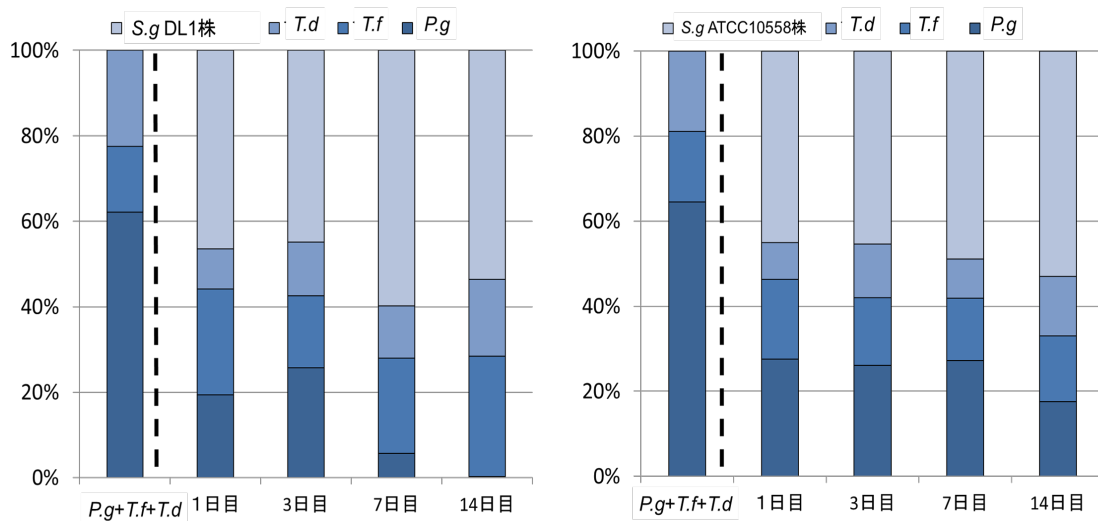


図6 バイオフィルムの経時的菌叢分析

さらに今回の次世代シーケンサーによる菌叢分析 (図6) では、*S. g* は14日経過しても優位であった。*P. g* は3~7日後経時的に減少した。*S. g* ATCC10558株 + Red complex 3菌種のバイオフィルムは、菌層の安定した期間がDL1株より長く、歯周病予防のシミュレーションに用いるにはより安定した結果が得られると考えられた。

(2) バイオフィルムのシミュレーションへの応用

(1)の結果より本シミュレーションへの応用適していると思われる *S. g* ATCC10558株 + Red complex 3菌種のバイオフィルムを用いて、洗口剤効果判定のシミュレーションを行った。

その結果、図7、8のように、作用直後より作用後1日嫌気培養後菌叢分析の結果で、Red complex 3菌種の割合が明らかに減少し、Red complex への効果が評価できた。

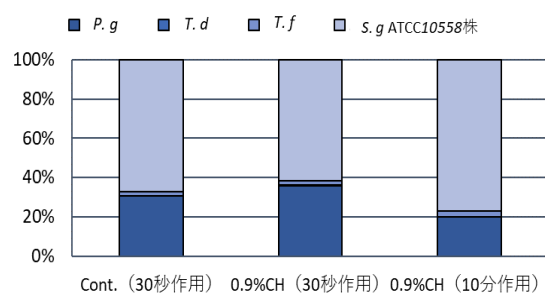


図7 作用直後菌叢分析結果

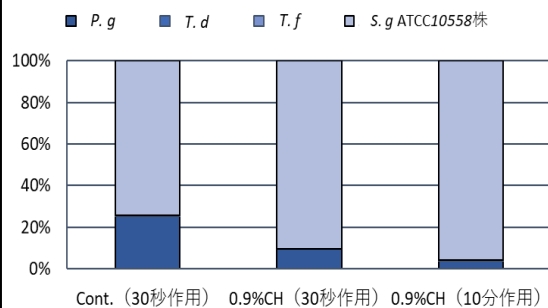


図8 作用後1日培養後菌叢分析結果

(3) まとめ

以上の結果から、今回使用した4菌種(*P. g.*, *T. f.*, *T. d.*と*S. g.*)でのバイオフィルム形成が可能であることが明らかになった。

よりシミュレーションに適したバイオフィルム形成条件を設定するために、今後さらに条件変えて、詳細な検討が必要であると考えられた。

さらに、本研究で形成させたバイオフィルムを用いた歯周病予防のためのシミュレーションへ応用可能であると推察されるが、その評価方法は菌叢分析だけでは、十分とはいえなかった。新たな評価方法としてATPの測定、蛍光色素染色による共焦点レーザー顕微鏡での観察などを検討する予定である。

<引用文献>

田中とも子、伊井久貴、鴨田剛司、村田貴俊、落合真美、八重垣 健、口臭を教材としたヘルスプロモーション研究 歯科定期受診率の向上のために、口衛会誌 59:506、2009

山口 恵、萱場一則、尾島俊之、高久 悟、新村洋未、柳川 洋、全国の市区町村における健康日本 21 による歯の健康に関する項目の現状把握と目標達成に関する調査結果、日公衛誌 54:107-114、2007

田中とも子、八重垣 健、小児のヘルスプロモーションのための3年間のコホート研究、口衛会誌 64:191、2014

Williams RC, Periodontal disease., New Engl. J. Med. 322:373-382、1990

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr., Microbial complexes in subgingival plaque., J. Clin. Periodontol., 25:134-144, 1998

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)

[学会発表](計1件)

田中とも子、八重垣 健、歯周病原細菌による人工バイオフィルム形成に関する基礎的研究、日本口腔衛生学会、2017年6月1日、山形テルサ(山形県山形市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 とも子 (TANAKA, Tomoko)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号: 70307958

(2)研究分担者

八重垣 健 (YAEGAKI, Ken)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号: 40166468