

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32667

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15858

研究課題名(和文)再生歯肉による歯肉溝モデルの開発：動物実験に代わる前臨床研究

研究課題名(英文)The model of gingival sulcus made from Revival gums: the pre-clinical study for an animal experiment

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は再生歯肉による歯肉溝モデルの開発により、歯周疾患予防法開発のための前臨床研究を推進することである。

Red complexの3菌種(P. g.、T. f.、T. d.)とS. gordoniiを用いて、歯根上へのバイオフィルム形成を試みた。SEM観察と菌叢分析により今回使用した4菌種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。

また、人工歯肉を再生したが再現性が低かった。そこで、幹細胞分離が難しかったプロトコルの再検討により、簡易的に分離が可能となった。しかし、再現性ある人工歯肉が得られず、人工歯肉溝の再現は実現に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is how to establish a gingival sulcus model by reclaimed gums and to drive the pre-clinical study.

The microorganisms were Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola, Streptococcus gordonii. 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 the stem cells segregation became a simple method by the magnetic separation. But reproduction of an artificial gingival sulcus didn't come to realization.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：バイオフィルム 歯肉溝 歯周病

1. 研究開始当初の背景

歯周病関連菌の殺菌等を目的とする製剤は市販されている。そこで、歯周病原菌の感染予防効果が確認されている製剤(トリクロサンなど)の効果を、人工歯肉溝装置で示すことで本装置の評価とする。一方、歯周病の発病段階に合った段階的予防法は必須ながら報告は無い。そこで、本装置で新たな予防・治療法の開発が可能であることを証明する。すなわち、いくつかの生薬(黄連、黄柏、タイミンチバナなど)、その他の抗菌剤を検証し、最適な protocol を開発する。この開発には、莫大な数の動物あるいは被験者が必要であるが、それが、本法では皆無となる。そこで申請者が開発した人工歯肉溝装置を用い、Red complex 等を用いて歯面上にバイオフィルムを形成させる。またヒト再生歯肉によりヒトの歯肉溝内環境を再現する。その結果、獲得被膜・菌付着に始まる歯周病発病の各ステップ、この実態に応じた段階的予防法を確立する。

2. 研究の目的

Porphyromonas gingivalis、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola* の歯周病発生各段階に合致した菌叢の同時培養条件を設定する。そして人工歯肉溝装置でヒト歯質上バイオフィルムを再現する。また我々の方法に従い、ヒト再生歯肉上皮を培養する。第二段階では、歯周病予防に効果のある製剤のバイオフィルムに対する影響とヒト再生歯肉上皮への影響(integrin 64/CD71/CK7/CK8/CK10/CK13/CK14/CK18/CK19/Type IV コラーゲンの免疫・qRT-PCR 等の評価)に分けて評価する。バイオフィルムに対する影響は SEM による形態観察、菌叢分析により評価する。さらに、バイオフィルム作成に使用した培地を回収し、通常の 5%CO₂ 培養環境での再生歯肉に培地回収物を作用させ、上記と同様の評価を行う。

3 - 1. 研究の方法(人工バイオフィルム関連実験)

(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付着させた(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

内に満たし、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、バイオフィルムの観察を SEM(日立 S-5000)にて行った。

また、*S. g*、*P. g*、*T. f* と *T. d* のバイオフィル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) バイオフィル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ルムを用いて、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。

3 - 2. 研究の方法(ヒト再生歯肉上皮関連実験)

(1) ヒト歯肉上皮幹細胞の分離

B. Calenic らの文献に従い口腔粘膜から分離したケラチノサイトを用いて、増殖関連のマーカーである CD71 と 64 インテグリンで 2 段階で磁気分離を行った。64 pos で CD71 neg を幹細胞として分離した。

(2) ヒト再生歯肉上皮の培養

B. Calenic らの文献に従い(1)で分離した幹細胞を Transwell system を用いて、ヒト再生歯肉上皮の培養を行った(図4)。分化の状況を免疫染色(インボルクリン、サイトケラチン 19)で確認した。

4. 研究成果

(1) バイオフィルムの形成

SEM 観察の結果、図5のように 4 菌種すべてが切片上に付着し、バイオフィルム形成が確認された。*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、図6のように *S. m* 培養ありでも 4 菌種が確認された。

さらに今回の次世代シーケンサーによる菌叢分析(図7)では、*S. g* は 14 日経過しても優位であった。*P. g* は 3 ~ 7 日後経日的に減少した。*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 菌種のバイオフィームを用いて、洗口剤（グルコン酸クロルヘキシジン）効果判定のシミュレーションを行った。その結果、図 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。

(3) ヒト再生歯肉による歯肉溝の再現
幹細胞分離が難しかったプロトコルの再検討により、簡易的に分離が可能となった。しかし、再現性ある人工歯肉が得られず、人工歯肉溝の再現は実現に至らなかった。

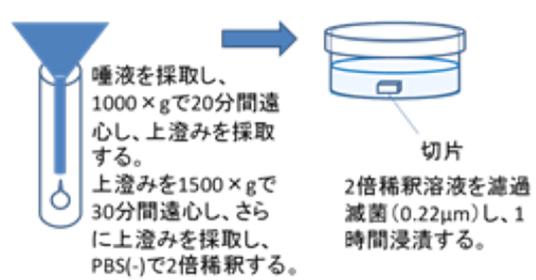


図 1 ペリクル加工の方法

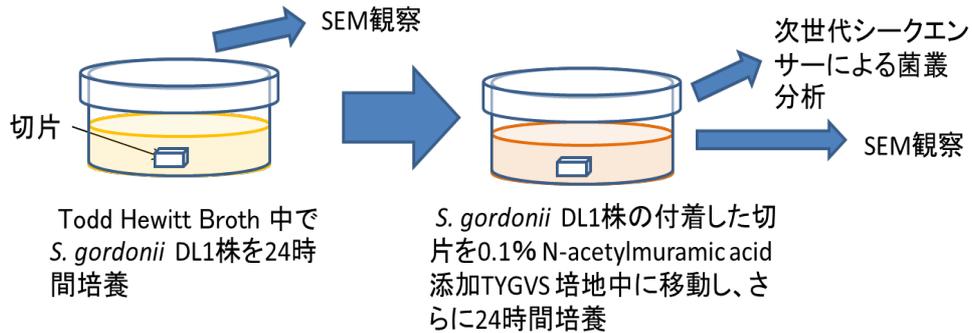


図 2 バイオフィーム形成の方法

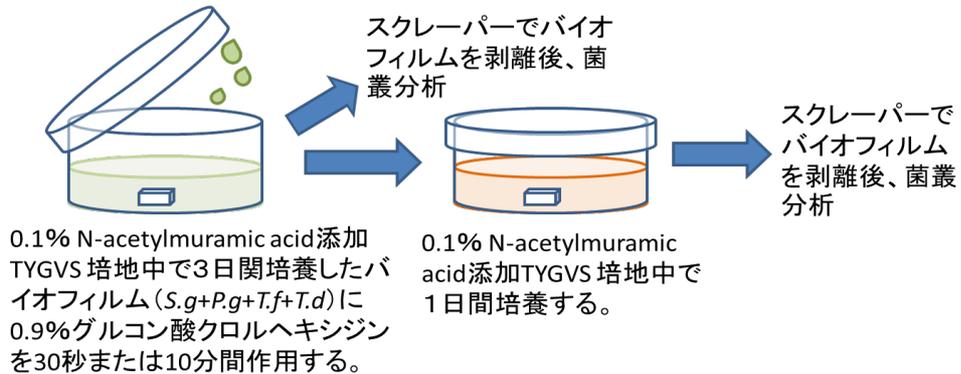


図 3 バイオフィームを用いたシミュレーション

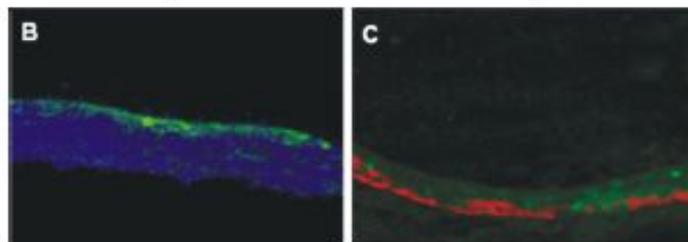
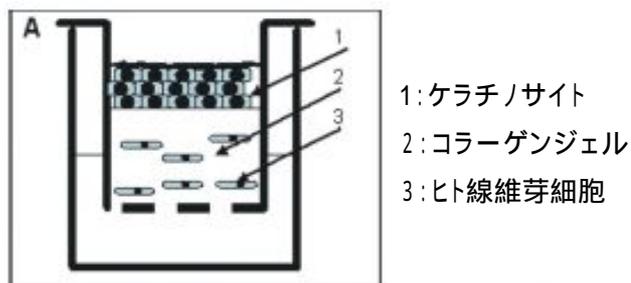
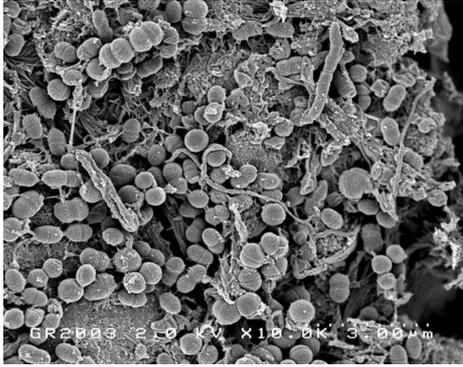


図 4 ヒト再生歯肉上皮の培養 (文献 より)
A: 培養の概略図、B: インボルクリン (緑) での免疫染色像、
C: サイトケラチン 19 (赤) での免疫染色像



× 10000

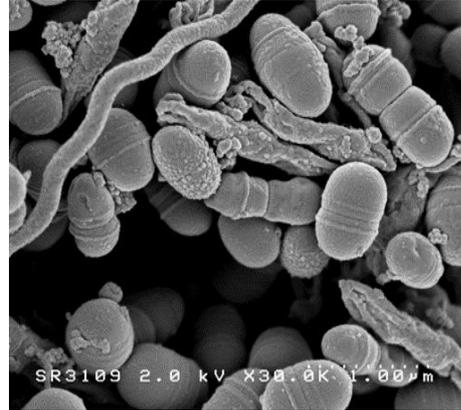


× 30000

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



× 10000



× 30000

図6 ペリクル加工済み切片上の *S.m.*, *T.f.*, *T.d.* によるバイオフィルム SEM 像

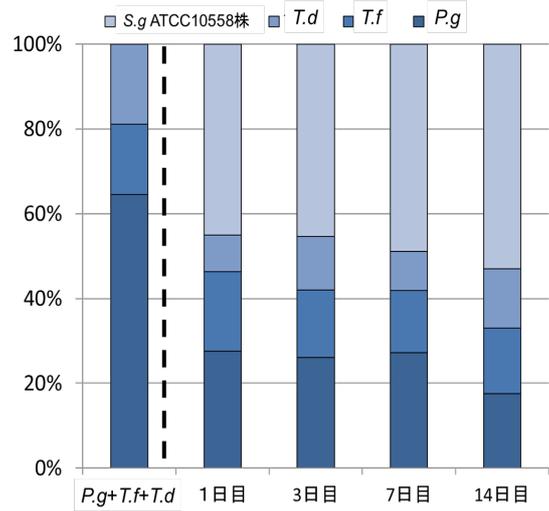
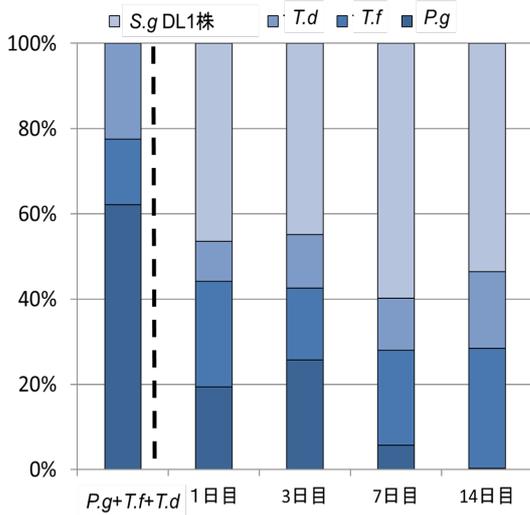


図7 バイオフィルムの経時的菌叢分析

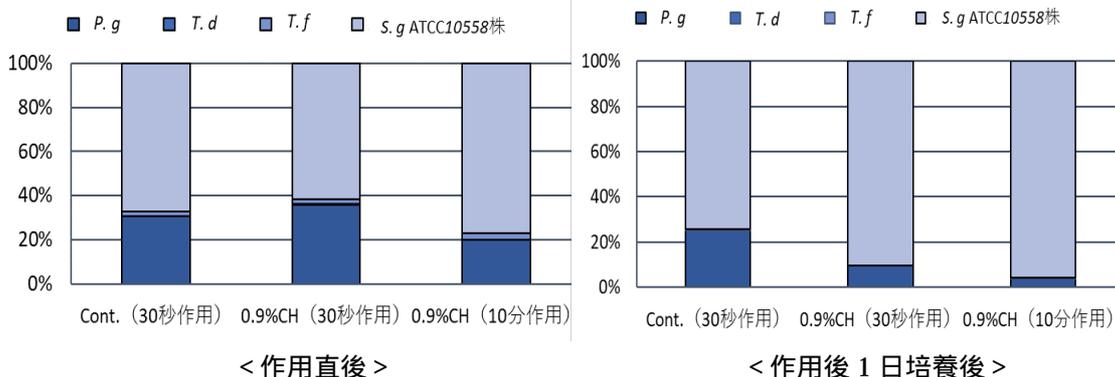


図8 グルコン酸クロルヘキシジン作用後菌叢分析結果

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。

また、今回試みたヒト歯肉上皮幹細胞の分離方法は従来のフローサイトメーターによる分離では煩雑であった操作を短時間で、簡易に行うことが可能となることになった。

<引用文献>

B. Calenic, et al., Characterization of oral keratinocyte stem cells and prospects of its differentiation to oral epithelial equivalents., *Romian Journal of morphology and Embryology*. 51:641-645, 2010

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

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

(2)研究分担者

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