

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17133

研究課題名(和文) 口腔内サンプルを用いた新規ex vivoバイオフィームモデルの開発

研究課題名(英文) Development of novel ex vivo biofilm model using oral samples

研究代表者

前園 葉月(Maezono, Hazuki)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00613390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内サンプルよりバイオフィームを作製したところ、細菌数はいずれのモデルにおいても経時的に増加することが明らかとなった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡等で定性的に解析したところ、観察期間中はほぼ生菌からなるバイオフィームが形成されることが明らかとなった。また、走査型電子顕微鏡を用いたバイオフィームの微細形態学的観察では、経時的にバイオフィームの厚みが増し、構造が複雑化していく様子が観察された。さらにピロシーケンス解析では、いずれのモデルにおいても類似した構成細菌が認められた。以上の結果より、今回作製したex vivoバイオフィームは経時的に生菌数が増加するとともに成熟することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内で起こる、う蝕や歯周炎といった疾患の主たる原因は口腔内に存在するバイオフィームである。これらについて研究を進めていくことは疾患の予防や治療に欠かせない。研究を進めていく上で、実際の口腔内で実験を進めていくことは理想的ではあるが、現実的ではない。簡便に実験室で実際の口腔内に類似した環境でバイオフィームを作製することができれば新薬の開発等につながり、理想的な研究環境が得られる。今回の研究結果はこれらにつながる学術的意義や社会的意義に富んだものと言える。

研究成果の概要(英文)：We prepared experimentally biofilms from oral samples ex vivo using several models. In all models, bacterial numbers increased over time. We examined their qualitative characteristics with confocal laser scanning microscope and found that biofilms were composed of vital cells during the observation period. Also, we examined biofilms micromorphology with scanning electron microscope and found biofilms were getting thicker and complex component over time. Moreover, main bacterial components were similar with all the models we tested by pyrosequencing analysis. From these results we obtained from this project, we could obtain experimentally-made ex vivo biofilms using oral samples whose bacterial numbers increased over time and biofilms got matured.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：バイオフィーム ex vivo

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは微生物が産生する菌体外マトリックスで囲まれた微生物の集合体で、不活化された表面または生物活性を持つ表面に形成される。歯や口腔軟組織に形成されたバイオフィームはう蝕や歯周炎といった口腔バイオフィーム感染症の主因であり、歯科領域と密接な関わりを持つ。申請者らのグループはこれまでバイオフィームについての研究を行ってきた。これまでも *in vitro* で行われてきた研究を進展させ、よりヒトの口腔内に近いラットを用いた *in vivo* でのデンタルバイオフィームモデルの開発 (Kuremoto *et al*, *Appl Environ Microbiol*, 80, 3804-10, 2014) や、装置を用いてヒト口腔内でハイドロキシアパタイトディスク上にバイオフィームを作製する *in situ* モデルの開発 (Wake *et al*, *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2, 16018, 2016) にも成功した。しかしながら、動物実験モデルや *in situ* モデルは *in vitro* での実験系と異なりサンプル数や実験系に限界があるという側面も持ち合わせているのが実情であり、より実際の口腔内に近く、よりハイスループットなバイオフィームモデルを開発することが切望されている。

2. 研究の目的

本研究では、辺縁性歯周炎や難治性根尖性歯周炎といった、機械的除去が困難な部位に形成されたバイオフィームに起因するオーラルバイオフィーム感染症の新規抑制制御法の開発を念頭に、ヒト口腔内サンプルを用いて複数のモデルを用いてバイオフィームを作製する。作製したバイオフィームを定量的および定性的に解析することにより、バイオフィームモデル間の違いについて検討し、バイオフィーム研究に最適かつハイスループットな *in vitro* バイオフィームモデルを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

口腔内サンプルを用い、静置系およびフローセル系バイオフィームモデルを用いてバイオフィームを作製した。作製したバイオフィームについて、バイオフィーム中の細菌数およびバイオマスを培養法および染色法を用いて定量的に解析し、さらに走査型電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィームを定性的に解析した。得られた結果について、現存する *in situ* モデルや動物実験モデルの結果と比較検討した。

4. 研究成果

静置系およびフローセル系バイオフィームモデルを用いて口腔内サンプルよりバイオフィームを作製し、作製したバイオフィーム中の細菌数について培養法を用いて解析したところ、いずれのモデルにおいても1週間から3週間までの観察期間を通して経時的に増加し、またその細菌数はフローセル系バイオフィームの方が早く増加することが明らかとなった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて作製したバイオフィームを定性的に解析したところ、共焦点レーザー顕微鏡による観察では、観察期間である3週間まではほぼ生菌からなるバイオフィームが形成されることが明らかとなった。また、走査型電子顕微鏡を用いたバイオフィームの微細形態学的観察では、経時的にバイオフィームの厚みが増し、形態の異なる複数菌種からなるバイオフィームが形成されている様子が明らかとなり、バイオフィームの構造が複雑化していく様子が観察された。さらに *in situ* で作製したバイオフィームと *ex vivo* で作製したバイオフィームをピロシーケンス解析の結果、いずれのモデルにおいても類似した構成細菌が認められた。以上の結果より、口腔内サンプルを用いて作製した *ex vivo* バイオフィームは経時的に生菌数が増加するとともに成熟することが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

- 1 . 前園 葉月, クランリアン キッティピット, 外園 真規, 松井 沙織, 米田 直道, 野村 由一郎, 林 美加子; 口腔サンプルを用いた新規 *ex vivo* バイオフィルムモデルの開発 . 第39回日本歯内療法学会学術大会 (2018).
- 2 . Matsui S, Noiri Y, Hayashi M, Maazono H, Kuremoto K, Yoneda N, Ebisu S, Yumoto H, Matoba K, Ishimoto T, Nakano T; High-frequency Waves Promote Periapical Healing by Inducing Cell Growth Factors. The 96th General Session of the International Association of Dental Research (2018).
- 3 . Hirose N, Kitagawa H, Maazono H, Hayashi M, Haapasalo M, Imazato S; Dentin Permeability and Bactericidal Effects of MDPB-containing Cavity Disinfectant. The 96th General Session of the International Association of Dental Research (2018).
- 4 . Klanliang K, Maazono H, Yamaguchi M, Sotozono M, Matsui S, Yoneda N, Noiri Y, Hayashi M; Assessment of novel *ex vivo* biofilm models using oral sample. The International Federation of Endodontic Associations 11th World Endodontic Congress (2018).
- 5 . 松井沙織, 前園葉月, 呉本勝隆, 米田直道, 恵比須繁之, 湯本浩通, 的場一成, 石本卓也, 中野貴由, 野村由一郎, 林美加子; ラット根管治療モデルを用いた高周波根尖療法の評価. 第149回日本歯科保存学会 2018年度秋季学術大会 (2018).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：マーカス ハパサロ教授

ローマ字氏名：Prof. Markus Haapasalo

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。