

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：32667
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：18K09923
研究課題名（和文）歯周炎の初期臨床モデル：歯肉溝フローラコントロールによる歯周炎予防法の開発

研究課題名（英文）Early clinical model of periodontitis: Development of periodontitis prevention method by gingival sulcus flora control

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、*P. gingivalis*、*T. forsythia*、*T. denticola*、*S. gordonii*を用いた人工バイオフィーム形成法と人工バイオフィームに対する各種成分の影響評価法を考案することを目的とした。菌叢解析の結果、開発した培養液は4種類の細菌を同時に培養できることが確認された。グルコン酸クロルヘキシジンに暴露すると、バイオフィーム内の生残微生物の減少と死菌の増加が濃度依存的に示された。以上より用いた4菌種から人工バイオフィームを作成できること、グルコン酸クロルヘキシジンのバイオフィームへの影響から、成分効果による人工バイオフィームの変化を評価可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病予防剤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が、適切な歯周病予防剤の選択、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、本研究の目的はRed complexを用いてバイオフィームを作成して、歯周病予防剤に適した新たな有効成分や応用方法の効率的な開発とした。研究結果から今回用いた手法は、成分効果を効率的に評価することができ、指標として利用できる可能性が高いため、このシミュレーションが予防策の開発に役立つことを実証した。

研究成果の概要（英文）： This study aimed to devise a method for artificial biofilm formation using *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, and *Streptococcus gordonii*, as well as a method for evaluating the effects of various ingredients on the artificial biofilm. Our microflora analysis confirmed that the culture medium we developed was capable of culturing four different bacterial species at the same time. The distribution of dead bacteria differed according to the difference in the concentration of exposed chlorhexidine gluconate. Moreover, the rate of attachment of viable cells decreased in a concentration-dependent manner. Many bacteria were detached from the biofilm in the group exposed to 0.09% chlorhexidine gluconate. Exposure to chlorhexidine gluconate induced a concentration-dependent decrease in living microorganisms and an increase in dead microorganisms in the biofilm. This study demonstrates that this simulation could help develop preventive measures.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：バイオフィーム 歯周病 Red complex

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームに定着した細菌は、多くの場合、実質的な薬剤耐性を示す。これまでのヒトのバイオフィーム研究により、単独で生存・機能する微生物はほとんどなく、多様なコミュニティが存在することが確認されている。

Porphyromonas gingivalis (*P. g*) を含むほとんどの口腔内細菌がバイオフィームを形成するために用いる主なコミュニケーションシステムは LuxS クォーラムセンシングシステムと考えられている。このシステムは、口腔内細菌が生産するシグナル分子であるオートインデューサ-2 の中間体の形成を阻害し、クォーラムセンシングのプロセスを妨害してバイオフィームの形成を抑制することが示されてきた。

しかしながら、ほとんどの抗バイオフィーム実験では、単一種の浮遊菌モデルを用いている。したがって、*in vivo* 試験の前に薬剤の抗バイオフィーム活性をスクリーニングする方法を開発することは有意義なことである。オートインデューサ-2 阻害剤に関する研究のほとんどは、バイオフィーム形成に焦点を当てているが、Suzuki ら と Muna Aqawi は、薬剤成分と酵素の抗バイオフィーム活性の反応を徹底的に調べ、抗バイオフィーム活性が多面的に細菌に影響を与えること、細菌がバイオフィームを形成する能力を持っていることを示した。

歯周病は、最も一般的な感染性バイオフィーム疾患の一つであり、数種類の歯周病菌が原因である。特に、*P. g*、*Tannerella forsythia* (*T. f*)、*Treponema denticola* (*T. d*) は「レッドコンプレックス」と呼ばれ、歯周病の重症度と密接に関連しており、歯周病に対する抗菌治療のターゲットと考えられている。

T. d は、他の口腔内細菌種、特に *P. g* や *Fusobacterium nucleatum* と相互作用し、その共凝集が歯周病の進行(バイオフィームの形成)に寄与している可能性が高いとされている。*T. d* と *P. g* の存在は、バイオフィームの形成と物理的に関連しているとされている。

レッドコンプレックスを死滅させる抗バイオフィーム剤を配合した口腔ケア製品の開発は、歯科疾患予防のための健康行動に大きな影響を与える可能性がある。そこで、歯に直接付着する機構を持たない *P. g*、*T. f*、*T. d* を用いて、人工的に歯にバイオフィームを形成させる方法を開発した。歯面にバイオフィームを形成するためには、唾液ペリクルと *Streptococcus gordonii* (*S. g*) が必要である。この方法は、歯垢バイオフィームにおける細菌細胞間相互作用に基づくものである。

2. 研究の目的

本研究では、*P. g*、*T. f*、*T. d*、*S. g* を用いた人工バイオフィーム形成法と、人工バイオフィームに対する各種成分の影響評価法を考案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

P. g ATCC33277、*T. f* ATCC43037、*T. d* ATCC35405、*S. g* ATCC10558、*S. g* ATCC35105 (DL1 株) および *S. mutans* (*S. m*) ATCC25175 である。

(2) バイオフィー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) バイオフィームの形成

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 に調製した *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、ペリクル加工なし、*S. g* 培養なし、*S. g* の代替として *S. m* 培養ありと条件を変え、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-V3/V4 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。

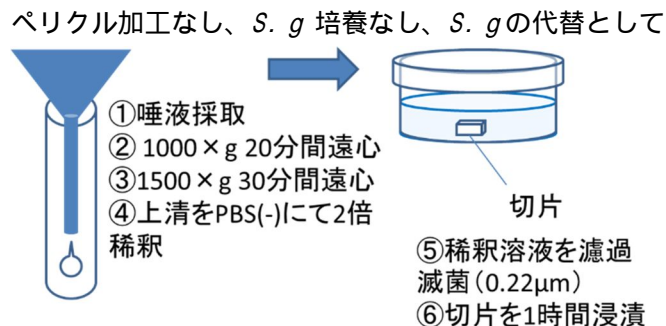


図1 ペリクル加工の方法

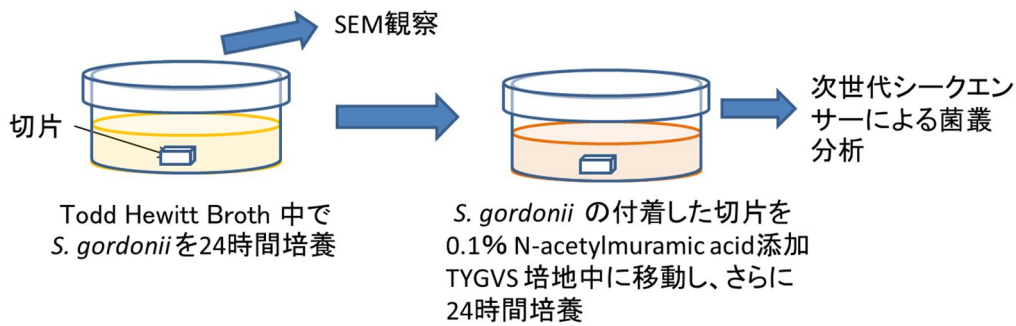


図2 バイオフィーム形成の方法

(4) バイオフィームを用いたシミュレーション

S. g ATCC10558 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%グルコン酸クロールヘキシジン溶液に30秒または10分間作用させた(図3)。作用直後に蛍光染料染色による観察を行った。なお、作用溶液のコントロールはDDWとした。

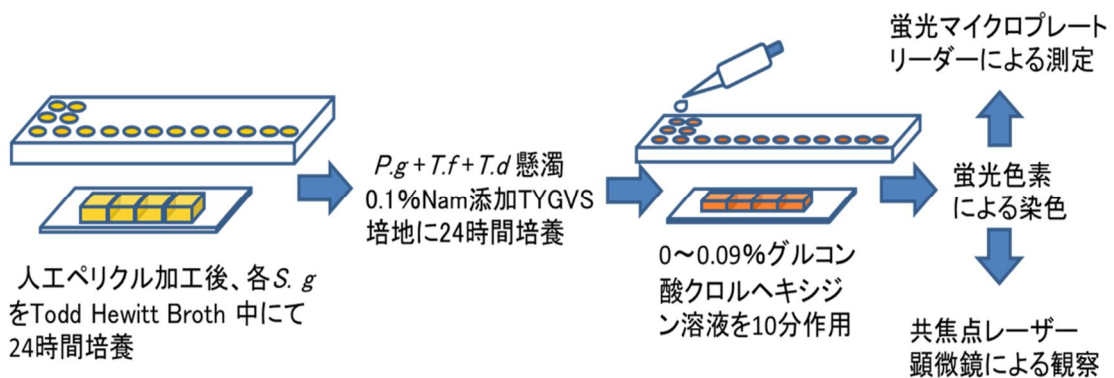


図3 バイオフィームを用いたシミュレーション

(5) 蛍光染料染色による観察

人工バイオフィームを様々な濃度(0%-0.09%)のグルコン酸クロールヘキシジンに10分間曝露した。その後、蛍光色素(LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit L7007; Thermo Fisher Scientific)により染色した。陰性対照(NC)は、人工バイオフィーム形成後に直接蛍光色素で染色した。バイオフィームを構成する微生物の生存率は、染色後速やかに共焦点レーザー顕微鏡(LSM 700、LSM T-PMT、ZEISS; Oberkochen, Germany)による観察、または蛍光マイクロプレートリーダー(Microplate Reader SH-9000、Corona Electric; Mito, Japan)により測定することにより確認した。

4. 研究成果

(1) バイオフィームの形成

人工バイオフィーム内の構成微生物の経時変化を評価するために、微生物叢の解析を行った。14日後の人工バイオフィーム内の微生物分布は、*S. g* が最も高い割合を観察した(*S. g* ATCC10558:53.01%、*S. g* ATCC35105:53.62%)

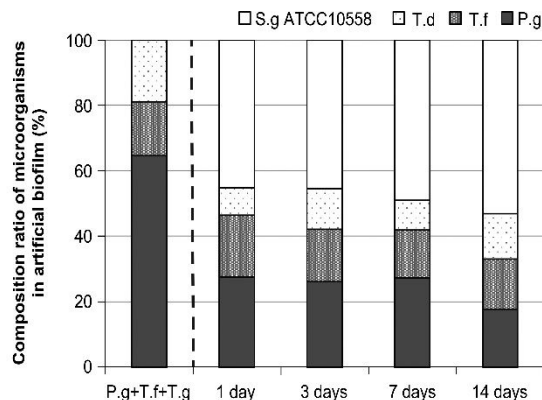


図4 人工バイオフィームの菌叢解析の結果

菌層の安定期間は *S. g* ATCC10558 に Red complex の3菌種を加えたものよりも短かった。*P. g*の分布は3日目と7日目;3日目と14日目で有意差があった。*T. f*は全群で有意差はなかった。*T. d*の人工バイオフィーム内分布は、全群で有意差が認められた。*S. g* ATCC 35105の分布は、1日目と3日目で有意差があった。*S. g* ATCC10558とRed complexの3菌種を含むバイオフィーム(図4)(n=3)では、3日目と7日目、3日目と14日目で*P. g*の分布に有意差はなかった。*P. g*は7日目以降、経時的に数が減少した。*T. f*の分布は、全群で有意な差はなかった。さらに、*T. d*の分布は、

1日目と14日目で有意差が認められた。*S. g* ATCC 10558 は、全群で有意差を認めなかった。これらの結果から、形成開始から3日目の *S. g* ATCC10558 と Red complex の3菌種を含むバイオフィルムをグルコン酸クロルヘキシジン曝露実験の実験材料とした。

SEM 観察の結果、図5のように *S. g* + *P. g*, *T. f*, *T. d* 4菌種すべてがペリクル加工した切片上には付着し、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、*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 + Red complex 3菌種のバイオフィルムは、菌層の安定した期間が ATCC35105 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が適していると思われる *S. g* ATCC10558 + Red complex 3菌種のバイオフィルムを用いて、グルコン酸クロルヘキシジンの効果判定のシミュレーションを行った。

その結果、図6のように、作用直後の蛍光マイクロプレートリーダーでの測定では、作用時間に関わらず0.09%Chで生菌率が大きく低下していた。また、濃度依存的に付着している生菌率が低下していた。さらに、グルコン酸クロルヘキシジン溶液の曝露によりバイオフィルムから脱落する細菌が多くなることが分かった。

さらに、共焦点レーザー顕微鏡による観察では曝露したグルコン酸クロルヘキシジン濃度の違いにより死細菌の分布が異なることが明らかになった。

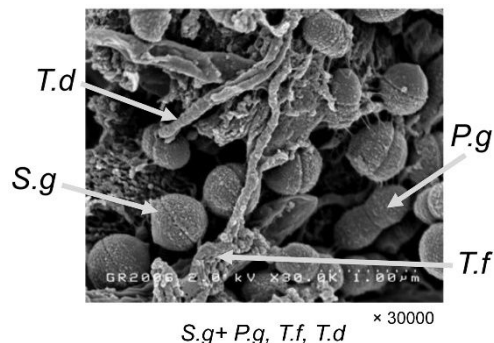


図5 人工バイオフィルムのSEM像

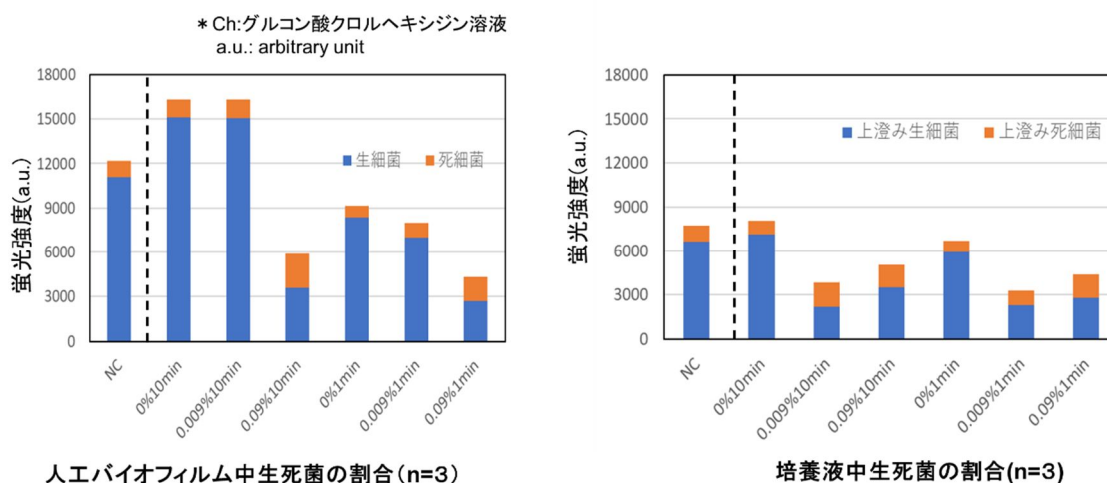


図6 グルコン酸クロルヘキシジンの人工バイオフィルムへの効果

(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、今後さらに条件を変えて、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の応用における評価方法として蛍光色素染色による観察は有用であった。

<引用文献>

Hendrickson EL, Wang T, Dickinson BC, Whitmore SE, Wright CJ, Lamont RJ, Hackett M. Proteomics of *Streptococcus gordonii* within a model developing oral microbial community. *BMC Microbiol* 2012; 12: 211.

Choi H, Ham SY, Cha E, Shin Y, Kim HS, Bang JK, Son SH, Park HD, Byun Y. Structure-activity relationships of 6- and 8-gingerol analogs as anti-biofilm agents. *J Med Chem* 2017; 60: 9821-9837.

Suzuki Y, Nagasawa R, Senpuku H. Inhibiting effects of fructanase on competence-stimulating peptide-dependent quorum sensing system in *Streptococcus mutans*. *J Infect Chemother* 2017; 23: 634-641.

Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M, Tebyanian H. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019; 38: 2005-2019.

Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol* 2013; 28: 83-101.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 とも子
2. 発表標題 人工バイオフィルムを用いた歯周病予防法開発に関する研究
3. 学会等名 口腔衛生学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 とも子
2. 発表標題 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 3
3. 学会等名 口腔衛生学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 とも子
2. 発表標題 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 2
3. 学会等名 口腔衛生学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	八重垣 健 (Yaegaki Ken) (40166468)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------