

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17062

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによるヒトのデンタルバイオフィルム制御へのアルギニンの効果判定

研究課題名(英文)Evaluation of the effect of arginine on human dental biofilm control by a next-generation sequencer

研究代表者

岡本 菜々子(栗木菜々子)(Okamoto(Kuriki), Nanako)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60781432

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):オーラルバイオフィルムはう蝕や歯周疾患に深く関与しており、全身疾患とも関連することが報告されている。このバイオフィルムの制御として、プレバイオティクスという概念で、唾液成分のひとつであるアルギニンが注目されている。本研究の目的は、我々が新規開発したin situバイオフィルムモデルを用いて、アルギニン製剤がプラークコントロール法として有用か否かを科学的に検証することである。平成30年度は、in situモデルで評価する方法を確立させた。令和1年度では、in situモデルにて8%アルギニン溶液を使用すると、口腔内のアンモニウムイオン濃度が増加し、口腔内細菌叢を変化させることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、研究代表者らが新規開発したin situバイオフィルムモデルを用いて、ヒトの口腔内におけるデンタルバイオフィルムへのアルギニンの効果を経時的かつ定量的に検索し、そのメカニズムを解明することで、科学的根拠に基づいたプラークコントロール法を具体的に提示することを目的としている。本研究のようなデンタルバイオフィルムの解析および制御・抑制法を創出することは、口腔疾患の予防および治療に有効であるだけでなく、生命科学の発達に貢献し、延いてはヒトの健康増進に繋がると自負している。

研究成果の概要(英文):Oral biofilms are deeply involved in not only caries and periodontal diseases, but also systemic diseases. The aim of this study is to scientifically verify whether or not arginine preparations are useful as a plaque control method using the in situ biofilm model newly developed by the applicants.

In 2018, we established a method to evaluate by in situ model. In 2019, we clarified that when 8% arginine solution was used in situ model, ammonium ion concentration in the oral cavity increased and oral bacterial flora was changed.

研究分野：歯科保存学

キーワード：デンタルバイオフィルム 次世代シーケンサー 制御 アルギニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オーラルバイオフィームはう蝕や歯周疾患に深く関与しており、全身疾患との関連においても注目されている。このバイオフィームを制御することは口腔及び全身の健康を維持するために重要である。ヒトの口腔内に形成されるデンタルバイオフィームは、*in vitro* で形成されたバイオフィームとは異なり、多種多様な口腔内環境や宿主因子に影響を受けている。そのため申請者らは、ヒトの口腔で経時的・定量的にデンタルバイオフィームを形成・評価できる *in situ* バイオフィームモデルを新規開発し、そのモデルにおいて、デンタルバイオフィームの多面的な解析を行ってきた。

一般的に、感染症治療の第一選択は抗菌療法とされてきたが、このバイオフィームは抗生物質に対して抵抗性を持ち、また、抗生物質の使用結果として耐性菌が出現し易く、口腔細菌叢のバランスが破壊されてしまうという問題点が分かってきた。近年、う蝕や歯周病を引き起こす病原性細菌が多く占める細菌叢から、正常な細菌叢へ変化させるアプローチとして、唾液の成分のひとつであるアルギニンが注目されてきている。*In vitro* 研究において、耐酸性能のない口腔内常在細菌がアルギニンからアンモニアを産生し、口腔内の pH を上昇させることで、正常な細菌叢を維持する機構が報告されている。そこで本研究では、口腔内でのデンタルバイオフィームへのアルギニンの効果を検討するのに、*in situ* モデルを用いる必要があると考えた。

2. 研究の目的

上記の背景をもと、本研究課題では、研究代表者らが新規開発した *in situ* バイオフィームモデルを用いて、次世代シーケンサー(NGS)により、デンタルバイオフィームへのアルギニンの効果を経時的かつ定量的に検索し、アルギニン製剤がプラークコントロール法として有用か否かを科学的に検証する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 研究における有効アルギニン濃度の決定

in situ 研究で用いるアルギニン洗口液の有効濃度を決定するため、*in vitro* 研究を行った。以前の報告により、saliva biofilm を作製した¹⁾。つまり、96 穴プレートに 3 人の被験者から採取した唾液を用いて、37℃、4 時間培養を行った。その後各種アルギニン濃度(0%、0.8%、1.6%、2.4%、3.2%、4.0%、4.8%、5.6%、6.4%、7.2%、8.0%) の溶液を 1 分間作用させた。コントロールは滅菌蒸留水を用いた。その後、作用させた菌液の 100 μ l の ATP 測定を行い、さらに残りの菌液 10 μ l 内のアンモニウムイオン(NH_4^+)濃度を電量滴定方式アンモニア計 AT-2000(セントラル科学)にて測定し、アルギニン活性の評価を行った。

(2) *in situ* バイオフィームサンプルの採取

研究代表者らが新規開発した *in situ* バイオフィームモデル(図 1)を用いてデンタルバイオフィームを作製した。被験者に関しては、大阪大学歯学部学生および大阪大学歯学部附属病院の医員から、本研究の内容を説明し、同意を得られるボランティアを募集した。尚、被験者の選択基準は全身及び口腔に異常が認められず、過去 6 か月以内に抗生物質等の薬剤投与を受けていないものとした。サンプルの採取に関しては、申請者が開発した口腔内装置を用いて、デンタルバイオフィームの作製を行う。この口腔内装置はナイトガードと同様に上顎に装着するもので、臼歯部頰側に ハイドロキシアパタイト(HA)ディスクが挿入できるよう改良している。口腔内装置は本学附属技工士学校所属の町講師が作製した。口腔内の装置中に固定した HA ディスク上にデンタルバイオフィームを作製し、試料を採取した。

実験スケジュールは以下に示す(図 2)。被験者には、口腔内装置を 24:00 から翌朝 8:00 まで装着し、起床直後の 8:00 にディスクを採取した(コントロール群)。その後 1 か月間、被験者には前述の有効濃度のアルギニン洗口剤で洗口してもらった。そして、先ほどと同様に口腔内装置を 24:00 から翌朝 8:00 まで装着し、起床直後の 8:00 にディスクを採取した(アルギニン群)。



図 1 *in situ* バイオフィームモデル

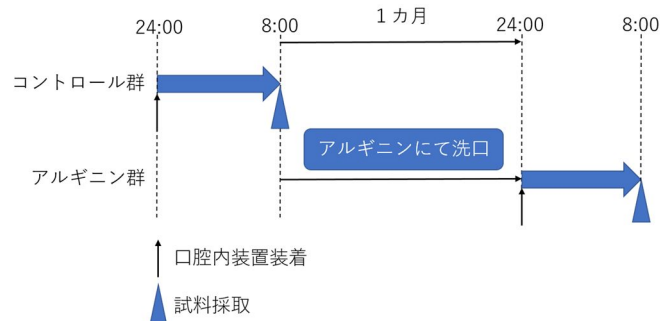


図 2 実験スケジュール

(3) アルギニン作用によるデンタルバイオフィルムの生菌数およびアルギニン活性への影響
 試料を滅菌蒸留水に浸漬し、5分間超音波振動30秒攪拌の後、連続10倍希釈を行った。希釈した菌液をコロニア羊溶血寒天培地に播種し、37℃、好気条件下およびアネロパック®・ケンキを用いた嫌気条件下で48時間培養した後、生菌数を測定した。また、同じ時点で採取した唾液試料から上記と同様にNH₄⁺濃度の測定を行った。

(4) アルギニン作用によるデンタルバイオフィルムの細菌叢への影響
 採取した試料よりDNeasy® PowerSoil DNA Isolation Kit(QIAGEN)を用いてDNA抽出を行い、16S rRNAを標的としたユニバーサルプライマーを用いてV1-V2領域をMiSeq®(Illumina Inc.)にて増幅し、シーケンス解析は97%相同性カットオフに基づく操作的分類単位(OTU)でクラスタリングを行った。得られたシーケンス結果はQIIME pipelineを用いて解析した。

(5) 統計処理
 統計学的有意差の検定は、IBM SPSS® Statistics(version 22.0, IBM SPSS Inc.)を用いたWilcoxon rank sum testを用いて、危険率5%で検定を行った。

4. 研究成果

(1) in vitro 研究における有効アルギニン濃度の決定

上記の各種濃度でのATP測定を行ったところ、ATPでは、各種濃度間で有意差は認められなかった(図3)。次に、アンモニウムイオン(NH₄⁺)濃度を測定したところ、8%のアルギニン溶液において、有意に高く、アルギニンの活性が高いことが示された(図4)。

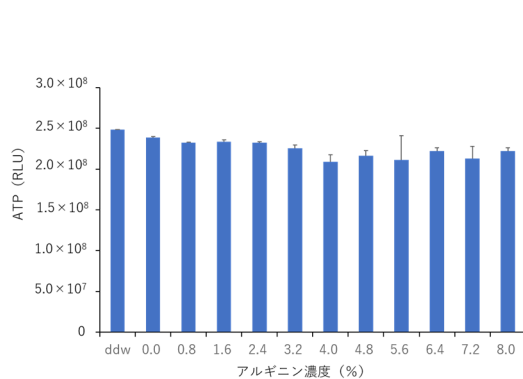


図3. ATP測定

各種アルギニン濃度で有意差は認められなかった
 (Wilcoxon rank sum test)

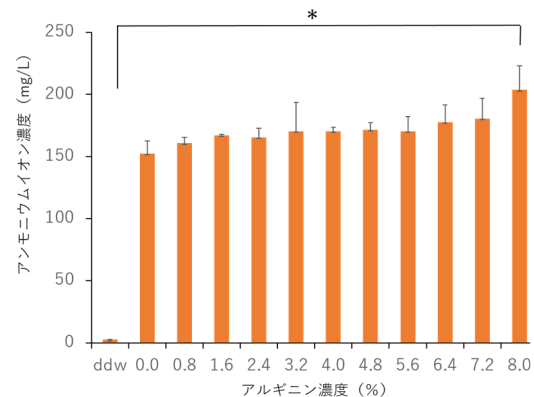


図4. アンモニウムイオン(NH₄⁺)濃度測定

8%アルギニン溶液で有意にNH₄⁺濃度が高かった
 (Wilcoxon rank sum test, * < 0.05)

(2) アルギニン作用によるデンタルバイオフィルムの生菌数およびアルギニン活性への影響
 上記で得られた有効濃度である8%アルギニン溶液を1カ月使用した群とコントロール群において、生菌数には変化は認められなかった。しかし、唾液中のNH₄⁺濃度は、アルギニン群ではコントロール群より有意に上昇した。

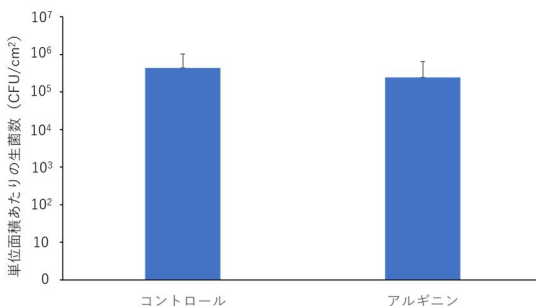


図5. 生菌数測定

生菌数に変化は認められなかった
 (Wilcoxon rank sum test)

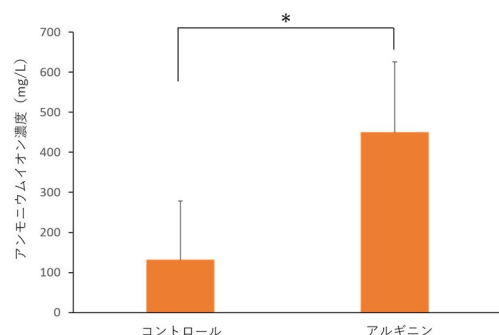


図6. アンモニウムイオン(NH₄⁺)濃度測定

アルギニン群ではコントロール群より有意に濃度が高かった(Wilcoxon rank sum test, * < 0.05)

(3) アルギニン作用によるデンタルバイオフィルムの細菌叢への影響

口腔細菌叢への影響を評価したところ、細菌叢には差異が認められた。まず、門レベルで比較したところ、アルギニン群ではコントロール群と比較し、*Firmicutes* 門が増加し、*Bacteroidetes* 門が減少傾向を示した(図7)。属レベルにおいて、アルギニン群では *Streptococcus* 属や *Neisseria* 属が増加傾向を示した(図8)。また、*Atopobium* 属と *Catonella* 属が有意に減少した(図9,10)。*Atopobium* 属は検出されることが稀な日和見病原体だが、無治療糖尿病患者に皮膚軟部組織感染症で検出されたとの報告がある²⁾。アルギニン群ではこのような細菌属が増加するのを防ぐことで、口腔細菌叢のバランスが破壊されてしまうのを防いでいる可能性が示唆される。

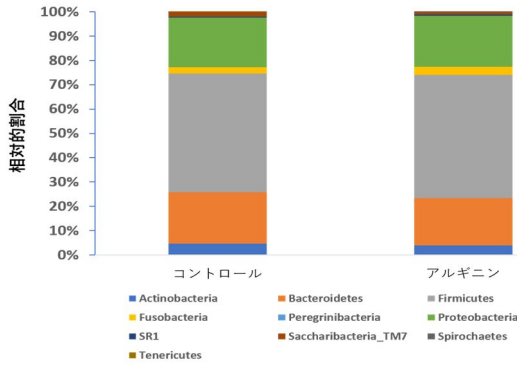


図7. 各細菌門の相対的割合

全被験者のシーケンスデータを平均化した各細菌門の相対的割合を示す

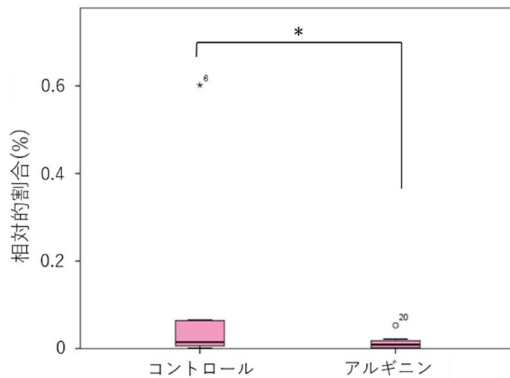


図9. *Atopobium* 属の相対的割合

アルギニン群では有意に割合が少なかった。

ボックスの上辺は第3四分位点,下辺は第1四分位点
黒線は中央値,○が外れ値を示す。

(Wilcoxon rank sum test, * < 0.05)

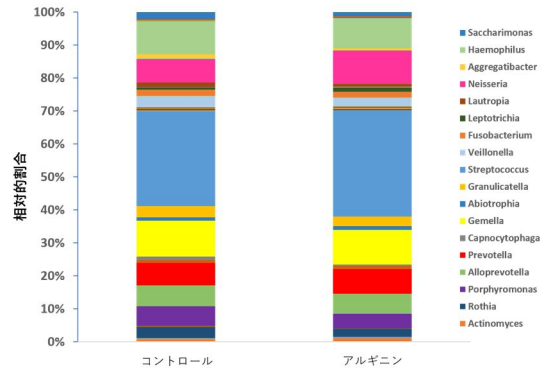


図8. 各細菌属の相対的割合

全被験者のシーケンスデータを平均化した各細菌属の相対的割合を示す

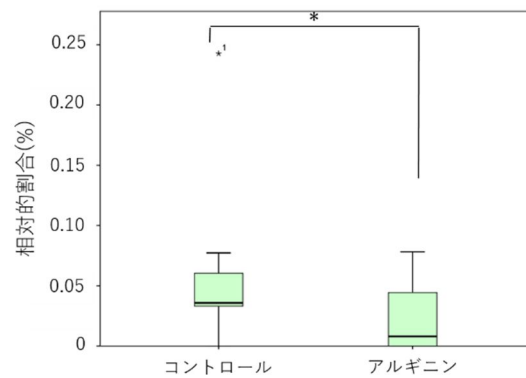


図10. *Catonella* 属の相対的割合

アルギニン群では有意に割合が少なかった。

ボックスの上辺は第3四分位点,下辺は第1四分位点
黒線は中央値,○が外れ値を示す。

(Wilcoxon rank sum test, * < 0.05)

本研究より、8%アルギニン溶液を使用すると、口腔内の NH₄⁺濃度が増加し pH を上昇させることで、口腔内生菌数には影響を与えず、口腔内細菌叢のみを変化させることが示された。一方で、耐酸性能のない口腔内常在細菌が増加することが予測されたが、本研究ではそれらの菌が有意に増加することは認められなかった。今後は、NGS 技術を用いて菌種まで特定し、さらにアルギニン製剤の効果を強化する薬剤を添加するなど、有効なアルギニン製剤を作製することで、さらなるデンタルバイオフィルム制御・抑制法の創出を目指している。

<参考文献>

1. Otten MP1, Busscher HJ *et al.* (2011) *Eur J Oral Sci.* /Apr;119(2):151-5. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00812.x.
2. 岡本 修 *et al.* (2018) 臨床皮膚科 72 巻 6 号 (2018 年 5 月) pp.414-8 doi: https://doi.org/10.11477/mf.1412205435

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi M, Noiri Y, Itoh Y, Komichi S, Yagi K, Uemura R, Naruse H, Matsui S, Kuriki N, Hayashi M, Ebisu S	4. 巻 18(1)
2. 論文標題 Factors that cause endodontic failures in general practices in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Oral Health.	6. 最初と最後の頁 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-018-0530-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 外園真規, 栗木菜々子, 朝日陽子, 町博之, 林美加子, 野杵由一郎, 恵比須繁之	4. 巻 33
2. 論文標題 睡眠による口腔内細菌叢の変化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bacteriak Adherence&Biofilm	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nanako kuriki, Maki Sotozono, Yoko Asahi, Hiroyuki Machi, Yuichiro Noiri, Mikako Hayashi, and Shigeyuki Ebisu
2. 発表標題 Effects of arginine on in situ dental biofilm by NGS
3. 学会等名 IADR（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 外園真規, 栗木菜々子, 朝日陽子, 町博之, 林美加子, 野杵由一郎, 恵比須繁之
2. 発表標題 睡眠がデンタルバイオフィルムに与える影響
3. 学会等名 第32回日本バイオフィルム学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 外園真規, 栗木菜々子, 朝日陽子, 町博之, 林美加子, 野杵由一郎, 恵比須繁之
2. 発表標題 覚醒時および睡眠時に形成されるデンタルバイオフィルムの三次元的構造解析
3. 学会等名 第61回春季歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Sotozono, Y. Asahi N. Kuriki, H. Machi, Y. Noiri, M. Hayashi, S. Ebisu
2. 発表標題 Impacts of Sleep on the Microbiome of Oral Biofilms
3. 学会等名 IADR (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外園真規, 栗木菜々子, 朝日陽子, 町博之, 林美加子, 野杵由一郎, 恵比須繁之
2. 発表標題 睡眠による口腔内細菌叢の変化
3. 学会等名 第33回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	外園 真規 (Sotozono Maki)		