

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10107

研究課題名（和文）根面う蝕研究のための新規 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 for root caries research

研究代表者

前園 葉月（Maazono, Hazuki）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00613390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、根面う蝕を惹起するバイオフィーム研究に最適かつハイスループットな ex vivo バイオフィームモデルを開発することを目的とし、口腔内サンプルを用いた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た定量的・定性的解析を行った。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根面う蝕を有する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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者における残存歯数は年々増加しているが、同時に残存歯の根面に形成される根面う蝕も増加の一途とたどっている。根面う蝕が発症する原因は口腔内に存在するバイオフィームであり、これらについて研究を進めることは疾患の予防や治療に必須である。

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、特に高齢者を被検者とし経時的に実験を進めていくことは現実的ではない。研究室で実際の口腔内に類似した環境で根面う蝕を引き起こすバイオフィームを再現することができれば新薬の開発等につながる理想的な研究環境が得られるため、本研究課題は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）：For developing optimal biofilm model for studying root caries, we prepared biofilms from oral root caries samples ex vivo using several models. In all models, bacterial numbers increased over time up to three weeks. We examined their qualitative characteristics 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. From these results we obtained from this project, we could obtain experimentally-made ex vivo biofilms using oral root caries samples whose bacterial numbers increased over time and biofilms got matured.

研究分野：歯科保存学

キーワード：バイオフィーム 根面う蝕 ex vivo

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会に入り、高齢者における残存歯数が増加している。同時に、高齢者で歯を持つ者の割合も年々増加しており、これには歯肉退縮した歯根面に形成される根面う蝕の発生が深く関与している。この根面う蝕は歯面に形成されたバイオフィームによるものであり、これらバイオフィームを抑制・制御していくことは喫緊の課題である。

申請者らのグループは、*in vitro* での単一菌を用いたバイオフィームモデルに関する研究を長年にわたり行ってきた。その後、よりヒトの口腔細菌叢に類似したラットを用いた *in vivo* でのオーラルバイオフィームモデルや、装置を用いてヒトの口腔内でバイオフィームを作製する *in situ* モデルの開発にも成功した。また、これまでに多くのバイオフィーム研究が世界的に行われてきたが、根面う蝕を対象としたものは少なく、さらに、その報告のほとんどは *in vitro* における培養法に基づいたものであり、実際の病態を反映したものとはいえ難い。

根面う蝕の実態の解明および抑制法の開発にはバイオフィームを網羅的に解析する必要があるが、そのような根面う蝕研究のためのバイオフィームモデルは、現状で一切存在しない。加えて、根面う蝕の治療法に関してはコンポジットレジンおよびガラスイオノマーセメント充填、フッ化物塗布、38%フッ化ジアンミン銀（サホライド®）の塗布が中心であり、何十年間も治療法は変わっていない。その原因は、根面う蝕の病因および病態を解明するための最適な実験モデルが存在しないことに他ならない。

これらの問いを究明することで、根面う蝕の実態の解明および新規抑制法の開発を目指すことは学術的・社会的意義の大きいことであると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、超高齢社会を迎え深刻な問題となっている根面う蝕の抑制・制御を最終目標とし、そのために必要な根面う蝕の病態を反映した実際のヒト口腔内サンプルを用いた根面う蝕 *ex vivo* バイオフィームモデルを構築することを目的とした。さらに、確立したモデルを用いて抗バイオフィーム効果が期待される材料を評価し、根面う蝕の新規抑制法に展開するための研究基盤の確立を目指すこととした。

3. 研究の方法

根面う蝕罹患患者より採取した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量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ルムモデルを用いて根面う蝕罹患者の口腔内サンプルよりバイオフィルムを作製し、作製したバイオフィル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ル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ル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ル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ルムの微細形態学的観察では、経時的にバイオフィルムの厚みが増し、形態の異なる複数菌種からなるバイオフィルムが形成されている様子が明らかとなり、バイオフィルムの構造が複雑化していく様子が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 松井沙織、前園葉月、野杓由一郎、林 美加子	4. 巻 66
2. 論文標題 ラット根管治療モデルを用いた高周波根尖療法の評価	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 大阪大学歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 1-4
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 -
1. 著者名 Matsui S, Yoneda N, Maezono H, Kuremoto K, Ishimoto T, Nakano T, Yumoto H, Ebisu S, Noiri Y, Hayashi M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Assessment of the functional efficacy of root canal treatment with high-frequency waves in rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0239660.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0239660.	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 Carvalho Luana Dutra de, Peres Bernardo Urbanetto, Maezono Hazuki, Shen Ya, Haapasalo Markus, Jackson John, Carvalho Ricardo M, Manso Adriana P	4. 巻 27
2. 論文標題 Doxycycline release and antibacterial activity from PMMA/PEO electrospun fiber mats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Oral Science	6. 最初と最後の頁 e20180663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1590/1678-7757-2018-0663	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Klanliang Kittipit, Asahi Yoko, Maezono Hazuki, Sotozono Maki, Kuriki Nanako, Machi Hiroyuki, Ebisu Shigeyuki, Hayashi Mikako	4. 巻 12
2. 論文標題 An extensive description of the microbiological effects of silver diamine fluoride on dental biofilms using an oral in situ model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11477-1	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Klanliang K, Asahi Y, Maezono H, Kuriki N, Shimaoka T, Machi H, Ebisu S, Hayashi M
2. 発表標題 Effects of silver diamine fluoride on in situ oral biofilm
3. 学会等名 第69回 国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Klanliang, H. Maezono, M. Sotozono, S. Ebisu, M. Hayashi
2. 発表標題 Characteristics of Oral Biofilms Grown in Different Experimental Models
3. 学会等名 The 97th General Session of the International Association of Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝日陽子、クランリアン キッティピット、外園真規、前園葉月、栗木菜々子、野杵由一郎、恵比須繁之、林 美加子
2. 発表標題 初期根面う蝕に関連する口腔バイオフィルム細菌叢の検索
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川西 雄三、前園 葉月、林 美加子
2. 発表標題 慢性根尖性歯周炎を有する下顎第二大臼歯槌状根に非外科処置にて対応した一症例
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前園 葉月, クランリアン キッティピット, 外園 真規, 朝日 陽子, 山口 幹代, 栗木 菜々子, 野杵 由一郎, 林 美加子
2. 発表標題 口腔サンプルを用いて作製したバイオフィルムのモデル間の差に関する検討
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui S, Maezono H, Yoneda N, Yumoto H, Ebisu S, Noiri Y, Hayashi M
2. 発表標題 Evaluation of Anti-biofilm Effects of High-frequency Waves in vitro
3. 学会等名 The 98th General Session of the International Association of Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Klanliang K, Asahi Y, Maezono H, Sotozono M, Kuriki N, Machi H, Ebisu S, Hayashi M
2. 発表標題 Effects of Silver Diamine Fluoride on in situ Oral Biofilm
3. 学会等名 The 98th General Session of the International Association of Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥岡 毅, 前園 葉月, 川西 雄三, 朝日 陽子, 高橋 雄介, 林 美加子
2. 発表標題 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液がEnterococcus faecalis バイオフィルムに及ぼす影響
3. 学会等名 第157回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2022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	野杣 由一郎 (Noiri Yuichiro) (50218286)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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
---------	---------