

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19024

研究課題名（和文）In vitro培養系での口腔バイオフィルムの再現と抗菌性材料の評価

研究課題名（英文）Establishment of an in vitro culture system with the ability to reproduce oral biofilm and evaluation of the effects of antibacterial restorative materials

研究代表者

神野 友樹（Kohno, Tomoki）

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：10839202

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、まず、独自のバイオリアクターを新たに構築し、修復材料表面での口腔バイオフィルム形成を再現するための培養条件を検討した。その結果、構築したバイオリアクターを用いて、ヒト唾液由来の細菌懸濁液をスクロースとともに材料表面に滴下しながら培養することで、実際の口腔内で形成されるバイオフィルムの厚みや細菌数、生菌率を再現することが可能となった。さらに、構築したバイオリアクターを用いて、亜鉛含有ガラス配合セメントの抗菌・抗プラーク性を評価したところ、亜鉛含有ガラス配合セメントは材料表面でのバイオフィルム形成を抑制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

口腔内でのバイオフィルム形成を模倣するために、これまで、種々のバイオリアクターが開発されたが、それらのほとんどは実際の口腔内でのバイオフィルムの性状を再現することを狙ったものではなかった。本研究により、独自に構築したバイオリアクターを用いて、in situでのバイオフィルム形成をin vitroで再現することが可能となったことで、本培養システムは、修復材料だけでなく、口腔内で使用するさまざまな材料の抗菌・抗プラーク性の評価にも応用でき、感染性疾患の発生予防に役立つ新たな抗菌性材料の開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, a new bioreactor was assembled, and its usefulness was assessed by evaluating the ability to reproduce in situ oral biofilm formed on restorative materials. Using the bioreactor assembled with the incubation condition to drop a bacterial suspension collected from human saliva and sucrose, it was possible to mimic the thickness, bacterial number, and live/dead bacterial ratio of the biofilm formed on the surface of restorative materials in situ. Moreover, the antibacterial/anti-plaque effects of the cement incorporating zinc-containing glasses were evaluated using the bioreactor assembled, and the effects to inhibit oral biofilm formation on its surface were demonstrated.

研究分野：保存修復学，歯科材料学

キーワード：バイオリアクター バイオフィルム 歯科材料 抗菌性 抗プラーク性

1. 研究開始当初の背景

歯科における二大疾患であるう蝕と歯周病は、ともに口腔細菌により引き起こされる感染性疾患であり、歯あるいは修復材料表面への細菌の付着や定着を制御することが、これら疾患の予防、治療に必要不可欠である。また、高齢者や要介護者では、堆積したプラークの誤嚥や誤飲によって呼吸器・消化器系疾患をまねく危険性もあり、歯あるいは修復材料表面におけるプラークの制御に更なる注意が必要である。

このような背景から近年、表面へのプラークの付着を抑制することを目的として、修復材料に抗菌性を付与する試みが行われている。これまで、これらの材料の開発・実用化に際しては、阻止斑形成試験や細菌付着試験等の *in vitro* での簡単な抗菌試験により効果が示されてきた。しかし、口腔内は、唾液が常に灌流しつつ、多種多様な細菌が棲息する過酷な環境であるため、実質的な抗菌性・抗プラーク性を評価するには実際の口腔内に材料を装着・固定し、*in situ* の検証を行う必要がある。ただし、これには多数のボランティアの協力が必要であり、労力や費用、時間等、多くの点で効率的とは言いがたい。したがって、実際の口腔内での材料表面へのバイオフィーム形成を再現しつつ、抗菌性・抗プラーク性の評価が可能な *in vitro* 培養系を構築することが必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、まず、実際の口腔内での修復材料表面でのバイオフィーム形成を解析した後、二系統の流路を備えたフローセルタイプのバイオリアクターを新規に構築し、口腔内でのバイオフィーム形成を再現するための培養条件を検討した。さらに、確立した培養条件のもとで、亜鉛含有ガラス配合セメントの抗菌性・抗プラーク性を評価した。

3. 研究の方法

(1) *in situ* でのバイオフィーム形成の評価

硬化試料の口腔内への設置

大阪大学大学院歯学研究科・歯学部及び歯学部附属病院倫理審査委員会による承認 (R2-E19) のもと、口腔清掃状態の良好な 5 名のボランティアに対し、直径 5 mm、厚さ 1 mm のコンポジットレジン (MI ; MI Fil, GC) の硬化試料を取り付けたアクリル製スプリントを作成し、食事とブラッシングの時間を除いて口腔内に装着した。

バイオフィームの解析

口腔内に 24 時間装着後、スプリントを回収して試験片を取り外し、各試験片上に形成されたバイオフィームに LIVE/DEAD 染色を施した後、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて観察し、画像解析ソフト Imaris を用いてバイオフィームの厚み・生菌率を算出した。また、各試験片上に形成されたバイオフィームを採取し、バイオフィーム中の細菌数をコロニーカウント法により測定した。

(2) バイオリアクターの構築と培養条件の検証

バイオリアクターの構築

ペリスタポンプ、シリコンチューブ、チャンバー付きスライドガラス等を使用し、二系統の流路を備えたフローセルタイプのバイオリアクターを組み立てた (図 1)。大阪大学大学院歯学研究科・歯学部及び歯学部附属病院倫理審査委員会による承認 (R1-E52) のもと、採取したヒト唾液由来の細菌懸濁液を人工唾液または BHI 液体培地を用いて、菌数が約 10^5 CFU/mL となるように調整した。フローセル内に MI の硬化試料を固定し、一方の流路から菌液を 30 mL/h の速度で滴下し、もう一方の流路から 0.2% スクロース溶液を培養開始 0、6、12 時間後に 0、15、30、または 60 分間試料上に滴下して、24 時間培養を行った。

培養条件の検討

実験 (1) - と同様に、各試料上に形成されたバイオフィームを解析し、バイオフィームの厚みと細菌数の測定、および生菌率の算出を行い、*in situ* でのバイオフィームと同量のバイオフィーム形成が得られる培養条件 (使用培地、スクロース滴下時間) を検討した。



図 1. 構築したバイオリアクター (外観)

(3) バイオリアクターを用いた抗プラーク性の評価

被験試料の作製

フッ素徐放型ガラスアイオノマーセメント (F7 ; フジ VII, GC) 、亜鉛含有ガラス配合グラ

スアイオノマーセメント (CA ; ケアダイレストア、GC) を使用し、直径 5 mm、厚さ 1 mm の各硬化試料を作製した。

抗プラーク性の評価

構築したバイオリアクターを用いて、実験(2)で確定した培養条件のもとで、F7 または CA 上でのバイオフィーム形成を評価した。コントロールとして MI を使用した。

4. 研究成果

(1) *in situ*でのバイオフィーム形成の評価

24 時間スプリントを装着後、MI 試料上に形成されたバイオフィームの厚み、細菌数、ならびに生菌率を測定したところ、それぞれ 29 μm 、 2.7×10^7 CFU/disc、32%であった (図 2)。

(2) バイオリアクターを使用した培養条件の検討

バイオリアクターを使用して、BHI 培地で希釈した菌液を滴下することで形成されたバイオフィーム中の生菌率は、人工唾液で希釈した菌液を用いた場合よりも有意に高く ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey 's HSD test)、口腔内のバイオフィームと同等であった (図 3)。すなわち、人工唾液よりもペプチドやアミノ酸が豊富に含まれる BHI 培地を使用したことで、バイオフィーム内の細菌の生菌率が増加したと考えられる。また、スクロースの滴下時間が長くなるに従って、形成されるバイオフィームの厚みが増加し、とくに、スクロースを培養開始 0、6、12 時間後に 15 分間 (計 45 分間) 滴下させた場合は、バイオフィームの厚み、バイオフィーム中の細菌数および生菌率が口腔内で形成されたものと同等であった ($p > 0.05$, ANOVA, Tukey 's HSD test ; 図 4)。この結果は、菌体外多糖の産生に關与するスクロースの添加量を調整することで、バイオフィームの厚みを調整することができることを示しており、BHI 培地を使用し、0.2%スクロース溶液を計 45 分間滴下しながら培養することで、実際の口腔内と同等の性状のバイオフィームを MI 試料上に形成できることが分かった。

(3) バイオリアクターを用いた抗プラーク性評価

実験(2)で確定した培養条件のもとで、F7 および CA のバイオフィーム形成抑制効果を評価したところ、CA 上に形成されたバイオフィームの厚みは、F7 および MI に比べて有意に低かった ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey 's HSD test ; 図 5)。また、CA 上に形成されたバイオフィーム中の生菌数は、F7 および MI に比べて有意に少ないことが確認された ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey 's HSD test ; 図 6)。研究代表者らは、これまで、亜鉛含有ガラス配合セメントが、酸性環境下で亜鉛イオンの溶出が促進され、口腔細菌の増殖や付着が抑制されることを、簡単な *in vitro* 実験により確認してきた。本研究で、構築したバイオリアクターを用いて、スクロースを添加した条件でヒト唾液由来の細菌懸濁液を滴下しながら培養したところ、セメントからの亜鉛イオンの溶出により、材料表面でのバイオフィーム形成が抑制されることが確認された。

以上より、新規に構築したバイオリアクターを用いて、ヒト唾液由来の細菌懸濁液を滴下しながら培養することで、口腔内で形成されるバイオフィームを再現することが可能であり、本システムが、材料表面でのプラーク付着を *in vitro* で評価するための培養系として有用であることが明らかとなった。また、確定した培養条件のもとでバイオリアクターを用いてバイオフィーム形成を評価したところ、亜鉛含有ガラス配合セメントは、コンポジットレジンやフッ素徐放型ガラスイオノマーセメントに比べて、材料表面でのバイオフィーム形成を抑制することが明らかとなった。

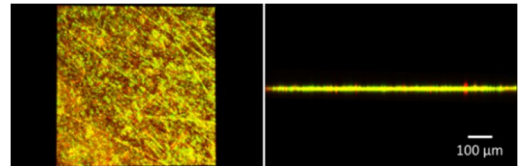


図 2. *In situ*でのバイオフィーム形成 (CLSM 像)

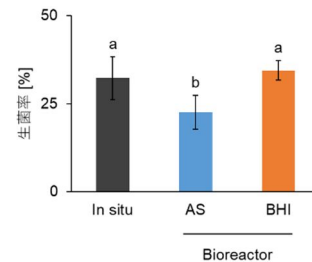


図 3. 使用培地がバイオフィーム内の細菌の生菌率に及ぼす影響 (AS:人工唾液、a, b: 異なる文字間に有意差を認める ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey 's HSD test))

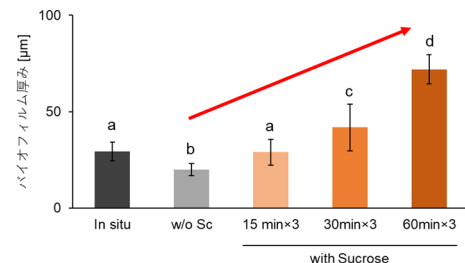


図 4. スクロース滴下時間がバイオフィーム厚みに及ぼす影響 (w/o Sc: スクロース非添加、a-d: 異なる文字間に有意差を認める ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey 's HSD test))

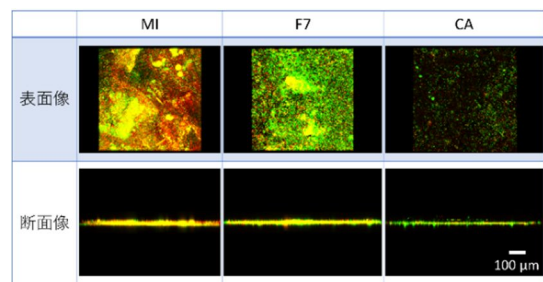


図 5. 各試料上に形成されたバイオフィーム (CLSM 像)

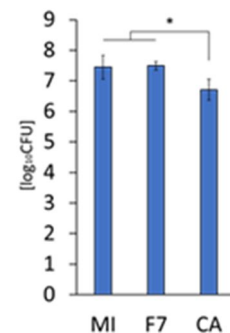


図 6. 各試料上に形成されたバイオフィーム中の細菌数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Imazato S, Kohno T, Tsuboi R, Thongthai P, Xu HHK, Kitagawa H	4. 巻 39
2. 論文標題 Cutting-edge filler technologies to release bio-active components for restorative and preventive dentistry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 69 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2019-350	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 該当する

1. 著者名 Liu Y, Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S	4. 巻 39
2. 論文標題 Acidity-induced release of zinc ion from BioUnion filler and its inhibitory effects against Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 547 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2019-061	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 Kohno T, Liu Y, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S	4. 巻 37
2. 論文標題 Evaluation of ion release and the recharge ability of glass-ionomer cement containing BioUnion filler using an in vitro saliva-drop setting assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 882 ~ 893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dental.2021.02.022	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 北川晴朗、神野友樹、壺井莉理子、今里 聡
2. 発表標題 口腔バイオフィルムを忠実に再現できるバイオリクターの構築
3. 学会等名 日本歯科理工学会 第74回秋期学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S
2. 発表標題 Zinc-ion release and recharge ability of GIC containing BioUnion filler
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohno T, Liu Y, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S
2. 発表標題 Anti-biofilm effects of glass ionomer cement containing BioUnion filler
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohno T, Liu Y, Deng F, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S
2. 発表標題 Evaluation of anti-biofilm effects of bio-active GIC using a bioreactor
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神野友樹、壺井莉理子、北川晴朗、今里 聡
2. 発表標題 カプセル練和型グラスアイオノマーセメントの抗菌性・抗バイオフィルム効果
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2020年度春季学術大会 (第152回)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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