

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592223

研究課題名(和文)

抗菌成分の浸透拡散性能を指標とする根管バイオフィームに対する抗菌戦略の探求

研究課題名(英文)

New approaches for antimicrobial strategies for biofilm in infected root canal

研究代表者 竹中 彰治 (TAKENAKA SHOJI)

新潟大学・歯医学系・助教

研究者番号：50313549

研究成果の概要(和文)：

虫歯が進行して歯の神経まで細菌が侵入すると神経が死んで根の先に感染病巣ができる。この治療には複数回の治療が必要で、再度無菌化することが困難であり、効果的な治療法や効率化のための研究が行われている。新しい根管(歯の神経の通り道)清掃法の効果を評価することはその有効性を証明するために必要不可欠であるが、口腔内と近似したモデルを用いて評価する必要がある。本研究では、口腔内を再現した新しい人工感染根管モデルの作製法と評価法を探索した。

研究成果の概要(英文)：

The overall success rate of conventional root canal treatment has been shown to range from about 65 % to 95%. Recently, some new technologies have been developed for the purpose of effective elimination of infected regions, efficiency of treatment, and reduction of treatment period. The estimation of these technologies are needed for clinical use. A new technology has been developed for artificial root infected model and estimation of root canal treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：保存修復学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：バイオフィーム、共焦点レーザー顕微鏡、感染根管

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 今や「バイオフィーム」という概念は歯科界においても定着し、単に歯や口腔内の固形構造物上に付着または固着した細菌集塊(=デンタルプラーク)としてではなく、water channel と呼ばれる栄養分を取り込み、老廃物を効果的に排出する水路を発達させた構造体を形成するとともに細菌間で情報を交換、伝達し、状況に応じて病原性を発現する、など特

異な性質を持つ「バイオフィーム」として捉えられるようになった(Costerton JW et al: Science 284, 1318-1322, 1999; Marsh: Caries Res. 38, 204-211, 2004)。

(2) バイオフィームに関する研究は菌体外多糖の構造、活動休止期の細菌の存在、クオラムセンシングを始めとした遺伝子制御と情報伝達、バイオフィーム内部への抗菌成分の拡散など考

慮すべき因子が多く、多方面からのアプローチが必要である (Costerton JW and Stewart PS: Scientific American 285(1), 74-81, 2001)。申請者らは、「バイオフィーム中への物質の浸透・拡散」に焦点を絞り、バイオフィームの構造機能解析ばかりでなく得られた結果から付着・形成部位、病原性に応じた臨床応用可能な効果的殺菌法の提示までを最終目標として研究を重ねてきた (Takenaka S et al.: J Infect Chemother: 7, 87-93, 2001; Zhu M and Takenaka S: Oral Microbiol Immunol: 16, 54-56, 2001)。

(3) バイオフィーム中での物質の浸透・拡散は重要な要素である。バイオフィームの中の細菌は局所的に高い密度で存在し菌体外多糖の存在とともに水の流れを遮断し物質輸送を制限できる。そのため、拡散は細菌凝集の中で有力な輸送システムであり、浸透性に優れる抗菌成分は短時間でバイオフィーム深層部まで到達しうる。

(Stewart PS: J of Bacteriol. 185(5), 1485-1491, 2003)。

(4) また申請者は、キャピラリーガラスリアクターと2光子レーザー顕微鏡を用いて人工バイオフィームに起こる殺菌効果をリアルタイムに観察、解析する技術確立した。この方法は、従来の解析方法が固定や粉碎回収が必要なため反応後の1時点の情報しか得られないのに対し、同一のバイオフィームに起こる反応をリアルタイムに観察することが可能であるため、抗菌物質がどのように浸透しどこから殺菌効果を発現したかを知ることができる点で他に類のない分析方法である。

## 2. 研究の目的

本プロジェクトの目的は、引き続き「バイオフィーム内部への浸透・拡散」に焦点を当て、象牙質内および根尖病巣のバイオフィームを想定したモデル構築とともに、バイオフィームに未接触でも象牙細管を通して殺菌効果が期待できる効果的なバイオフィーム破壊法を開発することである。

これまで、感染根管モデルは大きく分けて次の2つの方法により作製され殺菌効果の評価に用いられてきた。

(1) 天然抜去歯をあらかじめ脱灰したのち、細菌培養し象牙細管内に侵入させ感染根管モデルを作製

(2) 天然抜去歯を用いて感染根管モデルを作製したのち、ニッパー等を用いて歯を垂直に切断し、その切断面を観察する

しかし、これらの方法には以下のような欠点があった。

①これまで歯を脱灰せずに切断する技術がなかったため、感染根管モデル作製前に脱灰する必要があった。しかし、脱灰された根管へ速やかに細菌侵入するため *in vivo* の状態が再現されておらず、実際の感染根管と性状が異なり根

管内バイオフィームが過大評価される。

② *In vivo* バイオフィームを観察しているものの、観察対象がたまたま切断された1面に限られる。

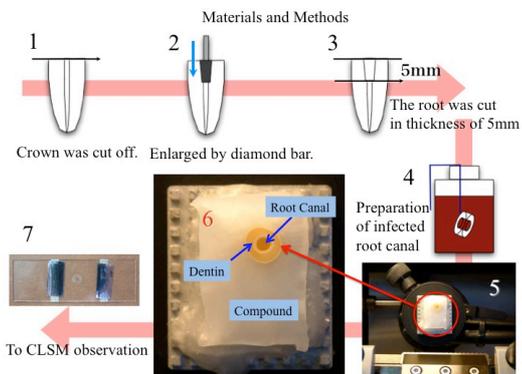
それに先立ち、嫌気条件下での共焦点レーザー顕微鏡での観察のための生死判定技術の確立も行う。申請者らは、嫌気要求度の高い1部の細菌種において、広く用いられている SYTO9/PI を用いた生死判定法では染め分けることができないことを報告している (Fukuda T, Takenaka S et al.: Microbial ecology in health and disease 16, 205-210, 2004)。

## 3. 研究の方法

(1) 浸透・拡散性能を指標とした根管バイオフィームに対する抗菌戦略探求のための象牙細管内侵入細菌の未固定、非脱灰による新しい生死判定技術の確立

以下の手法により、上記項目2の①、②欠点を補い、実験前脱灰も必要とせず、かつ固定も必要としない象牙細管内の細菌の生死を直接判定する方法を確立した。

- ① ヒト新鮮抜去歯の歯冠部を切断
- ② 切断面から 5mm の深さまでダイヤモンドバーにて形成。次亜塩素酸ナトリウムと EDTA を用いて有機成分、スメア層を除去
- ③ 切断面から 5mm のところで切断し、ガス滅菌
- ④ *E. faecalis* を用いて 37°C、1ヶ月嫌気培養し感染根管モデルを作製、想定される抗菌成分による根管洗浄を行う
- ⑤ SYTO9+Propidium Iodide もしくは Calcein-AM による蛍光染色ののち、凍結切片作製
- ⑥ 川本テープ法を用いた未固定、非脱灰で 10um の切片を作製
- ⑦ 共焦点レーザー顕微鏡で観察



(2) バイオフィーム深層部への高分子化合物の拡散性について

バイオフィーム制御に抗菌成分を用いる

場合、その浸透性能は物質のチャージ、親水・疎水性のバランス、菌体外マトリックスへの感受性などに影響を受けバイオフィーム深層部への浸透に数十秒から数分要するため、より浸透性のよいものを選択する必要がある。バイオフィーム深層部への優れた浸透拡散性能を有する物質を探索するため、物質の分子量とチャージの与える影響について検索した。

キャピラリーバイオフィームリアクター内部に形成させた同一のバイオフィームに対し、蛍光標識したアニオン性多糖類 (Dextran conjugate fluorescein, 3K, 10K, 40K, 70K) および陽イオン性化合物 (グルコン酸クロルヘキシジン) をそれぞれ送り込み、中心部に到達するまでの時間あるいは中心部の細菌が死菌と判断されるまでの時間を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、MetaMorph software を用いて計測した。バイオフィーム中心部に到達するまでの時間は、バイオフィーム内外部の蛍光量の比が平衡状態となった時間の 90% に達するまでの時間 (T90) を算出した。

(3) 洗口液および液体歯磨の *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する膜傷害・剥離効果

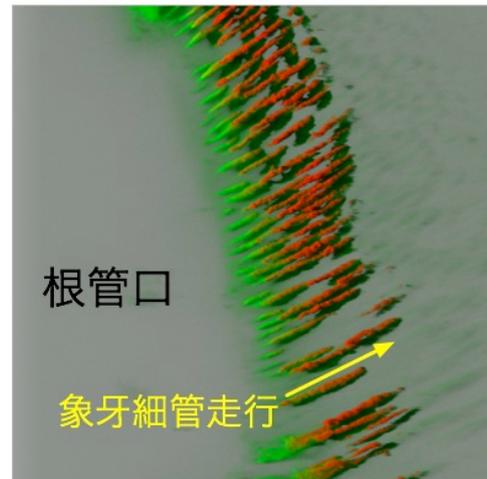
器具が到達しえない局所への化学的コントロールの一つとして使用されている含嗽剤は、プロフェッショナルケア後に使用することでプラーク抑制、歯周病予防に有効であると報告されている。一方、局所に形成したバイオフィームに対しては、口腔内での作用時間が 30 秒と限られるためその浸透性が重要な因子である。本研究では、*Streptococcus mutans* バイオフィームの深層部に対する含嗽剤の膜傷害効果および剥離効果について比較検討した。

使用した材料は、国内外で販売されている洗口液・液体歯磨に分類される 4 種類およびコントロール (バッファー、C 群) で、主成分別に 0.12% クロルヘキシジン (CX 群)、塩化セチルピリジニウム (CP 群)、イソプロピルメチルフェノール 1 種 (IP 群)、チモール 1 種 (TH 群) である。*Streptococcus mutans* ATCC 25175 株を、ガラスベースディッシュを用い 0.5% sucrose 含有 BHI 液体培地中で 24 時間嫌気培養することによりバイオフィームを形成させた (n=6)。24 時間後、Calcein-AM (CAM; 10ug/ml) を 2 時間作用させ生菌を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス FV300: Ex/Em= 488/510-530) を用いて、XYZ 断層像を採取したのち、焦点をバイオフィーム底面に固定し、各材料の作用直後から 15 秒間隔で 10 分間共

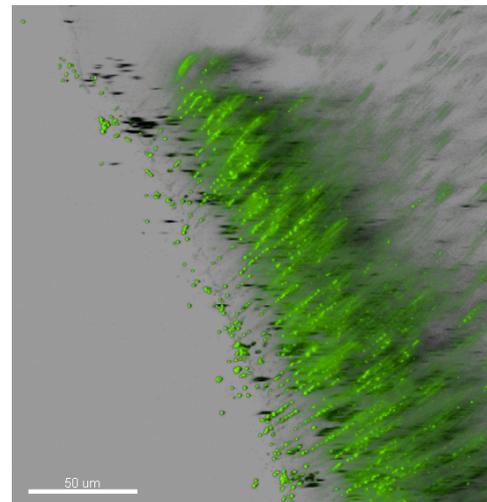
焦点画像をリアルタイムに採取した。採取した共焦点画像から無作為に最もバイオフィームの厚みがある部位を含む 3 領域 (25 $\mu$ m 四方) の厚み (概算値) を算出し、蛍光量の減少率を Metamorph ソフトウェアを用いて解析した。また、作用前後のディッシュ付着面の細菌の分散剥離効果を領域内の細菌密度で比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1) SYTO9 (緑: 生菌)、PI (赤: 死菌)



Calcein-AM (緑: 生菌)



現在、根管洗浄法の評価を進行中

(2) 本研究では、人工バイオフィームへの種々の高分子化合物の浸透を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察、解析するとともに拡散係数を算出した。キャピラリー中央部に形成されたバイオフィームは、クラスター状をしており、浸透時間はバイオフィームの直径に伴って大きくなった。

浸透時間は外因性のパラメータであり、形と大きさに左右される。そこで、我々は内因性的パラメータとして拡散係数により評価した。拡散係数  $De=0.31R^2/t90$  で計算される (R はバイ

オフィウム直径)。本実験におけるバイオフィウム中での  $D_e$  は蒸留水中の  $D_e$  と比較して 22% (IgG) から 90%(3000-MW)であり、分子量の増大に伴って有効拡散係数は減少した。この違いは、バイオフィウムの構成成分に対する高分子の吸着程度、電氣的相互関係によるものと推測される。

バイオフィウムへの高分子化合物の有効拡散係数に関する研究データには、未だ一定のコンセンサスが得られていない。有効拡散係数のばらつきの原因としてテクニック固有の問題、溶質の輸送を促進する対流輸送、バイオフィウム外層の物質輸送を妨げるものの存在 (計測前の不適切な処理) が考えられる。

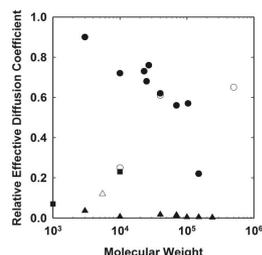


FIG. 2. Comparison of relative  $D_e$ s of macromolecules measured in dental plaque or in in vitro oral biofilms. Sources: ●, this study; △, reference 1; ○, reference 1; ▲, reference 2; ■, reference 5.

(3) バイオフィウムの厚み (概算値) は最大で  $31.5\mu\text{m}$  であった。領域内の蛍光量が 50%減少するまでに要した最大時間は、それぞれ 90 秒 (TH 群)、240 秒 (IP 群)、360 秒 (CX 群) および 450 秒 (CP 群) であり、TH 群はバイオフィウム底面の細菌に対して速やかに膜傷害効果を与えた (2 元配置分散分析, Dunnett test,  $p < 0.05$ )。50%蛍光量減少までの時間はバイオフィウムの厚みと正の相関関係にあり、それぞれ  $y = 1.892x$ ,  $r^2 = 0.964$  (TH 群),  $y = 8.672x$ ,  $r^2 = 0.995$  (IP 群),  $y = 10.784x$ ,  $r^2 = 0.990$  (CX 群) および  $y = 12.112x$ ,  $r^2 = 0.977$  (CP 群) であった。蛍光消失までに要する時間は最も効果が高かった TH 群においても最大 135 秒必要であった。また、すべての群において、ディッシュ付着面の細菌の分散剥離効果は認められなかった。

今回作成した *S. mutans* バイオフィウムにおいては、TH 群が有意にバイオフィウム底面の細菌に対しても膜傷害効果を与えていたが、30 秒接触ではバイオフィウム内部の細菌に傷害与えることができなかった。また、すべての群において反応前後でガラス界面のバイオフィウム構造は変化がなく、残ったバイオフィウム構造はバイオフィウム再形成の足がかりとなりえる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① 竹中彰治, Betsey Pitts, 若松里佳、大墨竜也、Philip Stewart, 興地隆史: 人工バイオフィウム深層部への各種高分子化合物の拡散性. *Bacterial Adherence & Biofilm* 23, 2011 (in press) (査読無)
- ② 武井典子, 藤本篤士, 木本恵美子, 竹中彰治, 福島正義, 奥瀬敏之, 岩久正明, 石川正夫, 高田康二: 高齢者の口腔機能の評価と管理のシステム化に関する研究 第 1 報 自立者の総合的な検査法、改善法、効果の評価法について, *老年歯科医学*, 23(4), 384-396, 2009. (査読有)
- ③ 竹中彰治, 小林千夏、若松里佳、福島正義、興地隆史: 新規歯面コーティング材の短期的臨床評価. *歯科審美*, 22, 41-47, 2009. (査読有)
- ④ 若松里佳、竹中彰治、本間春菜、尾添裕美子、福島正義、興地隆史: 新規歯面コーティング材塗布のアンケートによる審美性評価. *歯科審美*, 21, 22-29, 2009. (査読有)
- ⑤ Takenaka S, Trivedi HM, Pitts B, Stewart PS: Diffusion of macromolecules in model oral biofilms. *Appl Environ Microbiol*; 75, 1750-1753, 2009. (査読有)
- ⑥ Takenaka S, Wakamatsu R, Ozoe Y, Tomita F, Fukushima M, Okiji T. Translucency and color change of tooth-colored temporary coating materials. *Am J Dent*, 22(6), 361-365, 2009. (査読有)
- ⑦ 竹中彰治、興地隆史: 口腔における成熟バイオフィウムの制御戦略. *Bacterial Adherence & Biofilm*, 22, 1-6, 2008. (査読無)
- ⑧ Takenaka S, Trivedi HM, Corbin A, Pitts B, Stewart PS: Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms. *Appl Environ Microbiol*; 74(6), 1869-1875, 2008. (査読有)
- ⑨ Iizuka N, Takenaka S, Shigetani Y, Okiji T.: Removal of Resin-based Root Canal Filling Materials with K3 Rotary Instruments: Relative Efficacy for Different Combinations of Filling Materials. *Dent Mater J.*, 27(1): 75-80, 2008. (査読有)
- ⑩ Shigetani Y, Takenaka S, Okamoto A, Abu-Bakr N, Iwaku M, Okiji T. Streptococcus mutans on the generation of fluorescence from artificially-induced enamel and dentin carious lesions in vitro. *Odontology*, 96(1): 21-25, 2008. (査読有)
- ⑪ 重谷佳見, 竹中彰治, 飯塚直之, 興地隆史:

レジン系根管充填材料の封鎖性および接着性-固形根管充填材・シーラー界面に対する検討-. 日歯内療誌, 29(1), 30-36, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

①Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Okiji T.: Comparison of different experimental techniques for visualizing viability of biofilm bacteria. International Joint Symposium on Oral Science. Bali, Indonesia, December 17-18, 2010.

②若松里佳、竹中彰治、大墨竜也、福田敬、富田文仁、興地隆史: in vitro バイオフィームモデル形成能と含嗽剤の殺菌効果. 日本歯科保存学会秋季学術大会 (第 133 回)、岐阜, 10/28-29, 2010.

③若松里佳、竹中彰治、大墨竜也、興地隆史: 口腔バイオフィームに対する各種含嗽剤の浸透性について. バイオフィーム研究会, 富士宮, 9/11, 2010.

④竹中彰治、Betsey Pitts, 若松里佳、大墨竜也、Philip Stewart, 興地隆史: 人工バイオフィーム深層部への各種高分子化合物の拡散性について. 第 24 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会, 東京, 7/9, 2010.

⑤武井典子、藤本篤士、木本恵美子、竹中彰治、福島正義、石川正夫、高田康二、岩久正明: 高齢者の口腔ケアに関する研究 第 4 報 要介護者の口腔機能の検査法と管理法の検討, 第 20 回日本老年歯科医学会総会・学術大会 プログラム・抄録集, 161, 神奈川. 6.20. 2009.

⑥Takenaka S, Pitts B, Wakamatsu R, Okiji T.: Advantages of using two-photon laser scanning microscopy for biofilm imaging. 56th Annual meeting meeting of JADR. Nagoya, November 29-30, 2008.

⑦竹中彰治、興地隆史: 人工バイオフィームを用いた物質の浸透・拡散動態の解析-口腔内バイオフィーム制御の基礎的検討-. 第 21 回日本歯科医学総会. 横浜, 11/14-16, 2008.

⑧小林千夏、竹中彰治、若松里佳、韓臨麟、福島正義、興地隆史: 新規歯面コーティング材の経時的口腔内変化. 日本歯科保存学会 2008 年秋季学術大会 (第 129 回), 富山, 11/6-7, 2008.

⑨武井典子、石川正夫、高田康二、竹中彰治、福島正義: 子どもの発育と口腔の審美性について-子育ての時期における母親の意識-. 第 19 回日本歯科審美学会学術大会, 新潟, 10/11-12, 2008.

⑩藤本篤士、武井典子、木本恵美子、竹中彰治、福島正義、奥瀬敏之、渡辺勉、石川正夫、高田康二、岩久正明: ケアハウス入所者への介護予防プログラムが口腔機能の維持向上と WHO/QOL に及ぼす効果. 第 19 回日本老

年歯科医学会, 老年歯学, 23, p197-198, 岡山, 6/19-20, 2008.

⑪武井典子、藤本篤士、木本恵美子、竹中彰治、福島正義、奥瀬敏之、渡辺勉、石川正夫、高田康二、渋谷耕司、岩久正明: 高齢者の口腔ケアに関する研究 (第 3 報) -前・後期の口腔環境の検査法と口腔機能管理プログラムの検討-. 第 19 回日本老年歯科医学会, 老年歯学, 23, p189-190, 岡山, 6/19-20, 2008.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹中 彰治 (TAKENAKA SHOJI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 50313549

### (2) 研究分担者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA KUNIHICO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 30220718

興地 隆史 (OKIJI TAKASHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 80204098