

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20592477

研究課題名（和文） 定量的層別マッピング法による口腔バイオフィームへの介入効果の評価に関する研究

研究課題名（英文） The study on the method to estimate the bacterial ecology for oral biofilm, by mapping the quantitative distribution of the biofilm elements.

研究代表者

加藤 一夫 (KATO KAZUO)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：60183266

研究成果の概要（和文）：口腔バイオフィーム（歯垢）の細菌生態系を、バイオフィーム内のグルカン、バイオマスおよび口腔レンサ球菌の深度特異的な定量的分布から解析する方法を開発し、フッ化物と糖質が細菌生態系に及ぼす影響を示した。また、250ppm フッ化物溶液の1回洗口による口腔バイオフィームの *in vivo* での酸産生の抑制効果と、バイオフィームの厚さを測定する方法を用いて、ジェット水流によるバイオフィームの除去効果の有効性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This study was carried out to develop a method to estimate the bacterial ecology for oral biofilm, by mapping the quantitative distribution of glucan, biomass and oral streptococci from the outermost to the innermost layers of oral biofilm, indicating the effect of fluorides and sugars on the bacterial ecology. This study also revealed that a single mouthrinse with 250ppm fluoride solution could inhibit the acidogenicity of the oral biofilm *in vivo* and that the irrigation using a dental water jet would be an effective means of biofilm control, by measuring the thickness of the biofilm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口腔バイオフィーム、ミュータンスレンサ球菌、歯垢内密度分布、不溶性グルカン、プラークコントロール、フッ化物、ジェット水流

1. 研究開始当初の背景

(1) 齲蝕や歯周病の病因である歯垢は、多糖類を主成分とする基質と多様な細菌類から構成されるバイオフィームで、成熟した歯垢の表層と内層では、酸素濃度、pH、栄養素の利用性など生態環境が異なるため、層別構造と関連した歯垢生態系の情報は、細菌学、病理

学および予防歯科学的に重要と考えられる。

(2) 研究代表者加藤は、歯垢の層別採取法を微量定量法や画像解析と組み合わせ、歯垢の表層から内層に至る①ミネラル分布、②齲蝕関連菌 (*S. mutans* と *S. sobrinus*) の密度分布、③歯垢体積やバイオマス分布などの解

析を可能にする層別マッピングという方法を開発した。

(3) 層別マッピングによる解析から、①齲蝕関連菌であるミュータンスレンサ球菌の歯垢内での検出パターンには個人差が存在すること、②歯垢抑制・抗菌作用を持つフッ化第一スズ (SnF₂) を応用した後に堆積した歯垢は、応用前に比べ、特に歯垢の内部で細菌密度が増加すること、③ *Lactobacillus reuteri* を配合したヨーグルトを摂取すると唾液中のミュータンスレンサ球菌のレベルは有意に低下するが、層別マッピングによる歯垢内の分布パターンで評価すると有効性に大きな差がみられ、④その *L. reuteri* の効果はキシリトールとの併用により抑制されるといった生態学的な知見が明らかとなり、歯垢への介入効果を層別マッピング法で評価することは重要なテーマであると考えに至った。

2. 研究の目的

(1) 口腔環境中のフッ化物 (F⁻) は、細菌の解糖系に関わる酵素 enolase の作用を阻害し、糖代謝過程の終産物である乳酸の産生を抑制することが知られている。そこで、口腔内でフッ化物 1 回洗口を行った場合の歯垢内のフッ化物の停滞能とフッ化物による短時間の乳酸産生に対する抑制効果とを明らかにする。

(2) 最近の微生物学の進展から、ミュータンスレンサ球菌以外の口腔レンサ球菌についても、齲蝕への関与が注目されている。そこで、層別マッピングで応用する Real-time 定量 PCR を利用した歯垢生態系の評価を口腔レンサ球菌全体に拡大する。

(3) 歯垢内のグルカン、バイオマス、齲蝕関連菌の分布からフッ化物や機能性食品の成分が歯垢生態系に与える影響を、次の 2 つの方法から評価する。

①口腔環境中のフッ化物 (F⁻) は、細菌の解糖系に関わる酵素 enolase の作用を阻害し、糖代謝過程の終産物である乳酸の産生を抑制する。歯科診療に用いられるガラスアイオノマーセメント (GIC) は、口腔環境中に F⁻ を徐放する特性をもち、歯垢に覆われた GIC から放出された F⁻ は、歯垢内部に一時的に停滞する。この depth-specific な環境変化は、主要な乳酸産生菌である口腔レンサ球菌の生態にも影響することが予想される。そこで、GIC による局所的 F⁻ 濃度の上昇が歯垢生態系におよぼす影響を検討する。

②ミュータンスレンサ球菌がスクロースから合成する不溶性グルカンは、歯垢内の物質拡散特性を変化させ、歯面への酸の影響を増

大させる。そこで、醸酸性でグルカン合成の基質となるスクロースと、どちらの性質も持たないキシリトールを配合したチューインガムを用いた糖質暴露による介入で、歯垢内のグルカン、バイオマスおよび齲蝕関連菌が受ける影響を検討する。

(4) 口腔洗浄器から高洗浄圧で断続的に噴射されるジェット水流は、バイオフィルムの厚さを減少させ、水の圧力や低張性の影響により、菌体の破壊や基質成分の選択的な消失が起きることが予想される。そこで、その基礎的検討として、バイオフィルム厚さを測定することにより、ジェット水流によるバイオフィルム除去効果を評価する。

3. 研究の方法

(1) グルコースで誘導される歯垢内の乳酸産生に対するフッ化ナトリウム (NaF) 1 回洗口による短時間の抑制効果と歯垢内のフッ化物の停滞能を、次の 2 つの方法で検討した。①被験者 9 名に 250ppm、500ppm または 900ppm のフッ化物溶液で洗口させた。洗口前、洗口 15 分および 30 分後に採取した歯垢を試料として、in vitro で 1mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に懸濁し、グルコース 10mM を添加後、歯垢 pH の低下をポータブル pH 計で 25 分間モニターした。また、イオン電極を用いて歯垢中のフッ化物濃度を測定した。

②被験者 10 名にフッ化物溶液 (250ppm) または蒸留水で洗口させた。10 分後に 10% グルコース溶液で洗口させ、その 5 分後に歯面から歯垢を採取した。緩衝液で 20 倍に希釈後、回収した上清中のフッ化物濃度をイオン電極法で測定した。また、乳酸濃度は固定化酵素メンブレン法で L 体を定量し、歯垢細菌がラセミ体で産生するのを考慮し計測値を 2 倍に補正した。

(2) 健全なエナメル質およびフッ化物を徐放するガラスアイオノマー・セメント (GIC) を充填したエナメル質に堆積した歯垢内のレンサ球菌の密度分布を比較検討した。

被験者 20 名の上顎大臼歯頬側面に、GIC を充填したエナメル質および未充填のエナメル質を組み込んだ歯垢採取装置を取り付け、7 日間その部位の清掃を中止した。回収試料は直ちに凍結乾燥後、methacrylate に包埋し、ウルトラミクロトームで試料表面から、観察用 (3 μm × 2) と DNA 抽出用 (4 μm × 4) の切片を、底部に達するまで切削した。この操作を 5 回反復したものを 1 試料分画 (厚さ 110 μm) とし、試料当たり 8 ~ 10 層の層別分画に分離した。

観察用切片は染色後、画像解析ソフトで面積を求め、切片の厚さを基に試料分画のバイオマス容積を推定した。DNA 抽出用切片は、

lysozyme と mutanolysin で前処理後、DNA 精製キットで genomic DNA を抽出し、*S. mutans* の DNA 量を Real-time PCR で定量した。

口腔レンサ球菌の検出には、次のプライマーと蛍光プローブを用いた。

Forward primer: 5' - AGA TGG ACC TGC GTT GTA TTA GCT -3'

Reverse primer: 5' - TAC TGC TGC CTC CCG TAG GA -3'

Probe: FAM- 5' - CAC ACT GGG ACT GAG ACA CGG CCC-3' -TAMRA

これらは、16S rDNA 領域の塩基配列からプライマー設計ソフトを使って設計し、特異性の判定は、遺伝子バンク (NCBI) に登録された口腔レンサ球菌の塩基配列をもとに BLAST の類似配列検索等を利用し、positive control を用いて操作を確認した。

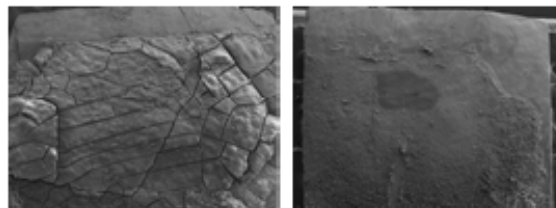
(3) フッ化物や機能性食品の成分が歯垢内のグルカン、バイオマスおよび齶蝕関連菌に与える影響を、次の2つの方法で検討した。
①被験者 13 名の上顎大白歯側面に、エナメル質または口腔環境中に F- を徐放する特性のあるガラスイオノマーセメント (GIC) の小片を組み込んだ歯垢採取装置を取り付け、7 日間その部位の清掃を中止した。各被験者からの試料採取はクロスオーバーデザインで 2 度行った。回収試料は直ちに凍結乾燥後、methacrylate に包埋し、ウルトラミクロトームで試料表面から、観察用 (2 $\mu\text{m} \times 2$)、DNA 抽出用 (4 $\mu\text{m} \times 2$)、分析用 (4 $\mu\text{m} \times 6$) の切片を、底部に達するまで切削した。この操作を 5 回反復したものを 1 試料分画 (厚さ 180 μm) とし、試料当たり 5 ~ 7 層の層別分画に分離した。

観察用切片は染色後、画像解析ソフトで面積を求め、切片の厚さを基に試料分画のバイオマス容積を推定した。分析用切片は、1 M 硫酸 25 μl を加え電子レンジで加熱処理 (250W、30 分) 後、pH を調整し、固定化酵素メンブレン法で D-グルコース濃度を定量した。結果は、バイオマス量で補正し、グルカン量に換算した。DNA 抽出用切片は、lysozyme と mutanolysin で前処理後、DNA 精製キットで genomic DNA を抽出し、*S. mutans* の DNA 量を Real-time PCR で定量した。

②被験者 14 名の上顎臼歯に歯垢採取装置を取り付け、4 日間にわたりその部位の清掃を中止し、歯垢を堆積させ、その間 1 日当たり 6 個のガム (計 15 g) を噛ませた。スクロースまたはキシリトールを配合した 2 種類のチューインガムを使ったクロスオーバー試験として歯垢試料を 2 回採取した。層別分画の分離、バイオマスとグルカンの定量および genomic DNA を抽出は上記と同様に行い、各試料分画からの *S. mutans* の検出は、通常の PCR で行った。

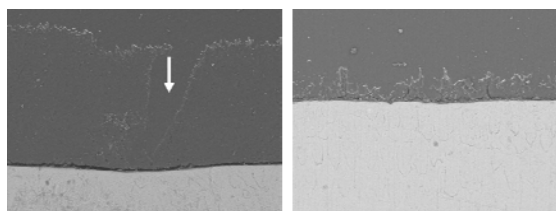
(4) 被験者 30 名の上顎臼歯部に 1 対の健全なエナメル質を組み込んだ装置を取り付け、バイオフィームを堆積させた。装置上の一方のエナメル質を、口腔外にて 707kPa、350kPa または 120kPa の洗浄水圧で 5 秒間洗浄し、もう一方は未洗浄のまま対照とした。エナメル質を凍結乾燥させ、表面を白金でコーティングした後、試料面の二次電子像を撮影した。

図 1 未洗浄エナメル質 (左) と洗浄したエナメル質 (右) の二次電子像 (倍率 $\times 40$)



次に、メタクリル酸メチルで包埋し、エナメル質中央部の断面を露出させた。鏡面研磨・洗浄後、カーボン蒸着を行い、反射電子像を撮影した (矢印は、凍結乾燥によるバイオフィームの収縮を示す)。

図 2 未洗浄エナメル質 (左) と洗浄したエナメル質 (右) 上のバイオフィーム断面 (反射電子像, 倍率 $\times 1,000$)



反射電子像上のエナメル質とバイオフィームの最外層を示す白金の薄層で挟まれた面積を画像解析ソフトで測定し、洗浄した歯面と未洗浄の歯面のバイオフィーム厚さの差から、バイオフィームの除去率を算出した。

4. 研究成果

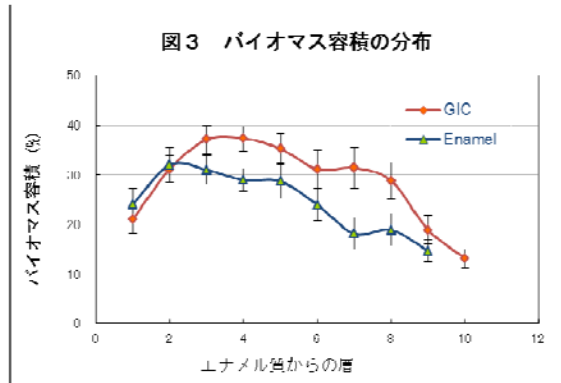
(1) NaF 洗口によるフッ化物が歯垢中に保持されることで、フッ化物洗口から短時間では歯垢内での乳酸産生の抑制が確認され、フッ化物洗口が in vivo での歯垢の齶蝕誘発性を阻害することが明らかになった。

① in vitro でグルコースを添加した場合、NaF 1 回洗口による短時間の抑制効果は、250ppm の場合 30 分以内、500ppm または 900ppm では 30 分以上持続すると考えられた。また、その間、歯垢内でのフッ化物濃度の上昇が認められた。

② フッ化物洗口 (250 ppm) から 10 分後のグルコース洗口の分析結果から、乳酸産生は約

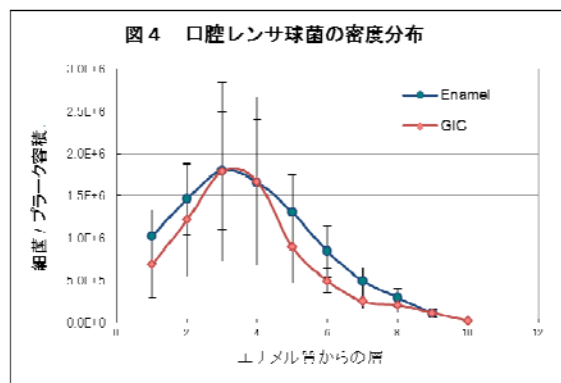
30%抑制された。またそのときの歯垢中の残留フッ化物濃度は約13ppmであった。

(2) GICを充填したエナメル質と健全なエナメル質に形成された歯垢内のバイオマス容積は、ともに最外層から上昇しエナメル質に接する内層に向かって低下する分布を示した(図3)。



口腔レンサ球菌の密度プロファイルを図2に示した。

ともに、歯垢内部にピークをもつ山形の分布であったが、GICを充填したエナメル質では、エナメル質と接する最内層で有意(Wilcoxon test, $p < 0.01$)に細菌密度の低下がみられた(図4)。GICからの徐放による局所的F⁻濃度の上昇が、口腔レンサ球菌の成長に抑制的に作用する可能性を示唆した。



(3) フッ化物や機能性食品の成分が歯垢生態系に与える影響について、次の結果となった。

①エナメル質とガラスアイオノマーセメント(GIC)に堆積した歯垢内のグルカン、バイオマス、*S. mutans*の分析から、*S. mutans*の検出されない歯垢でのバイオマスとグルカンの相関は、歯垢密度が高ければグルカンも多くなることを示したが、*S. mutans*の検出された歯垢では、バイオマスに比して多量のグルカンが一部に存在したため、両者の相関は有意ではなかった。このことから、

glycosyltransferaseによるグルカン合成は、GIC上に堆積した歯垢内でも可能なことが示唆された。

②歯垢内のグルカンとバイオマスの密度分布に対するスクロスおよびキシリトール配合のチューインガムの影響をみたところ、スクロス群層別分画からの*S. mutans*の検出率(94.0%)は、キシリトール群(63.6%)より高くなったが、有意な差ではなかった。どちらの歯垢も層別分画内とのバイオマスとグルカン量には有意な相関がみられた。2種類のガムを使ったこのクロスオーバー試験からは、歯垢の構造と基質の組成に関しては、限定された効果しか認められなかった。

(4) ジェット水流によるバイオフィルムの平均除去率を、表1に示した。

表1 バイオフィルムの平均除去率

水圧 (kPa)	試料数	バイオフィルム厚さ (mean ± SD; μm)				バイオフィルム厚の減少率 (mean ± SD; %)		P*
		洗浄群		対照群				
707	8	2.16	0.82	26.0	18.2	85.5	11.4	0.010
350	10	1.88	0.66	15.2	7.53	85.1	7.2	0.0006
102	9	2.93	1.56	9.37	7.94	63.4	13.7	0.027

ジェット水流を利用して歯面を清掃する口腔洗浄器は、近年、高い洗浄圧で断続的な水流を噴射する製品が開発されている。しかし、これまでジェット水流のバイオフィルム除去効果を定量的に評価する方法を報告した研究はほとんどなく、臨床的な歯垢指数を用いた評価から、その効果は低いとされてきた。今回のバイオフィルムの厚さを測定した研究から、通常の洗浄水圧の範囲(350~700kPa)でも、2日間堆積させたin vivo歯肉縁上バイオフィルムの約85%を除去できることが明らかになり、ジェット水流による洗浄はプラークコントロールの有効な手段であることが示唆された。

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3件)

- ① Kato K, Tamura K, Nakagaki H: Quantitative evaluation of the oral biofilm-removing capacity of a dental water jet using an electron-probe microanalyzer. Archs Oral Biol 57(1): 30-35, 2012. 査読有
- ② 榊原章一, 中野 崇, 加藤一夫, 中垣晴男, 福田 理: フッ化ナトリウム 1 回洗

口 (250ppmF) がグルコース作用後の歯垢内乳酸産生に与える影響. 小児歯誌, 49(5): 459~464, 2011. 査読有

- ③ Kato K, Tamura K, Nakagaki H: Distribution profiles of cariogenic streptococci within dental plaque treated with stannous fluoride gel. *Cariology Today* 5: 26~28, 2009. 査読無

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① Kato K, Tamura K, Nakagaki H: Quantitative Evaluation of Plaque Biofilm Removing Capacity of a Dental Water Jet Using Electron Probe Micro-Analyzer. 58th ORCA Congress (Kaunas, Lithuania), 2011.7.9.
- ② Kato K: Oral biofilm: approaches to reduce cariogenicity. The 33rd Scientific Meeting on Research and Continuing Education in Odonto ~ Stomatology, Ho Chi Minh University of Medicine and Pharmacy (Ho Chi Minh, Vietnam), 2011. 4. 4. (招待講演)
- ③ Kato K, Tamura T, Sakakibara S, Ou Y, Nakagaki H: Influence of sweetened gum chewing on profiles of biomass volume and glucan within dental plaque. 57th ORCA Congress (Montpellier), 2010.7.9.
- ④ 榊原章一, 中野 崇, 長縄友一, 王陽基, 加藤一夫, 中垣晴男, 福田 理: グルコース曝露後の歯垢中に産生される乳酸濃度および残留グルコース濃度にフッ化物洗口の及ぼす影響. 第48回日本小児歯科学会(名古屋), 2010.5.20.
- ⑤ Kato K, Tran T Thuy, Tamura K, Sakakibara S, Ou Y, Nakagaki H: Profiles of biomass volume and glucan within dental plaque grown on enamel and glass-ionomer cement. 56th ORCA Congress. (Budapest, Hungary), 2009.7.3.
- ⑥ Tran T Thuy, Kato K, Nakagaki H, Kawainiura Y, Sato T: Streptococcal distribution within plaque formed on enamel with glass-ionomere cement. 56th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR) (Nagoya, Japan), 2008.11.29.
- ⑦ Nakajo K, Asanoumi T, Shibata A, Yagishita Y, Kato K, Takahashi N: Short-term Effect of NaF-mouthrinse on Glucose-induced pH Fall in Plaque. IADR 2008 (Toronto, Canada), 2008.7.3.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① *Interface Oral Health Science* 2009, Sasano T, Suzuki O 編, Springer (東京), 2010, 総ページ 435, 分担 p237~239, p267~268, p271~272

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 一夫 (KATO KAZUO)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号: 60183266

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし