

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18504

研究課題名（和文）アルギニンとフッ化物の併用によるヒトデンタルバイオフィルムの病原性抑制

研究課題名（英文）Arginine and Fluoride Combination Inhibits Pathogenicity of Human Dental Biofilms

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・招へい教員

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病に関与しており、全身への影響も報告されている。このバイオフィルムの制御として、プレバイオティクス概念で、唾液成分のアルギニンが注目されている。また、フッ化物は、そのう蝕予防効果が認められているため、アルギニンとフッ化物を併用した場合の口腔細菌叢への効果を検討する必要があると考えた。

本研究で申請者が開発したバイオフィルムモデルを用い、メタゲノム解析によりアルギニンとフッ化物の併用効果を定量的かつ網羅的に検索したところ、口腔内のNH₄⁺濃度を増やすことで生菌数に影響を与えずに口腔細菌叢のみを変化させることが分かり、アルギニンとフッ化物の相乗効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、デンタルバイオフィルムの制御・抑制法の確立を目指し、申請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、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析により、デンタルバイオフィルムへのアルギニンとフッ化物の効果を定量的・網羅的に検索し、病原性抑制への相乗効果を科学的に検証することを目的としている。これにより、新たなデンタルバイオフィルム制御の創出が期待でき、これは口腔疾病の予防および治療に有効であるだけでなく、さらにはヒトの全身的健康の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 involved in dental caries and periodontal disease, and their effects on the whole body have also been reported. Arginine, a component of saliva, is attracting attention as a prebiotic to control oral biofilms. Since fluoride has been shown to be effective in preventing dental caries, we considered it necessary to investigate the effect of arginine and fluoride on the bacterial flora when they are used in combination. Using an in situ biofilm model developed by the applicants in this study, we performed a quantitative and comprehensive search for the combined effects of arginine and fluoride by metagenomic analysis, and found that arginine and fluoride only changed the oral microflora without affecting the number of viable oral bacteria by increasing NH₄⁺ in the oral cavity, suggesting the synergistic effect of arginine and fluoride.

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 フッ化物

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ルムはう蝕や歯周病に関与しており、全身への影響も報告されている。その制御・抑制法を解明することは、口腔及び全身の健康を維持するために極めて重要である。細菌感染症に対する治療には一般的に抗菌療法が第一選択とされてきたが、バイオフィルムは抗生物質に対して抵抗性をもち、また、その使用結果として耐性菌が出現し、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。これに対するアプローチとして、腸内細菌に対する考えの一つであるプレバイオティクスが注目されてきている。プレバイオティクスとは、大腸内に定着している特定の細菌群の増殖や活性化を促すことによって、宿主に有利な影響を与え、その健康を改善する効果をもつ難消化性物質（炭化水素）である。これを口腔内にも応用できないかと注目されてきているのが、唾液の成分でもあるアルギニンである。これまでに、アルギニンによる口腔内細菌叢の変動についてはいくつかの報告があり、アルギニン脱イミノ化システム(ADS)を用いて耐酸性能のない細菌が pH を上昇させ、それにより口腔内環境を齶蝕になりにくい状態に導くと云われている。その結果、アルギニンは、口腔内のアンモニウムイオンを上昇させ、*Neisseria* 属や *Streptococcus* 属が増加し、*Porphyromonas* 属を減少させるといった、細菌叢の変化を起こすことを明らかとした¹⁾。

フッ化物に関しては、そのう蝕予防効果に関して数多くの肯定的報告がなされている。しかしながら、う蝕は現在も世界中で蔓延している慢性感染性疾患のひとつであり、超高齢社会の我が国では、根面う蝕が多発していることが問題視されており、う蝕のコントロールに関して、フッ化物以外の抑制法も必要とされている。そこで、う蝕抑制効果が報告されているアルギニンとフッ化物を併用した場合に、デンタルバイオフィルムの制御・抑制効果がより増強される可能性があるのではないかと考えた。この相乗効果を検証するため、デンタルバイオフィルムの細菌叢への影響および病原性への影響を評価する必要があると考えた。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究課題では、研究代表者らが新規開発した *in situ* バイオフィルムモデルにて、次世代シーケンサー(NGS)を用いて、アルギニンとフッ化物の併用効果を定量的・網羅的に検索し、病原性抑制に対する効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) *in situ* バイオフィルムサンプルの採取

研究代表者らが新規開発した *in situ* バイオフィルムモデル(図1)を用いてデンタルバイオフィルムを作製した。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ルムの作製を行う。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ルムを作製し、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(control 群)。その後1カ月間、被験者には 8%アルギニンおよびフッ素配合歯磨剤(1450ppm F⁻, Colgate-Palmolive, USA)でブラッシングしてもらった。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(arginine + F 群)。NGS 解析において、アルギニン群は以前の研究で採取した DNA 抽出サンプルを用いた¹⁾。



図1 *in situ* バイオフィルムモデル

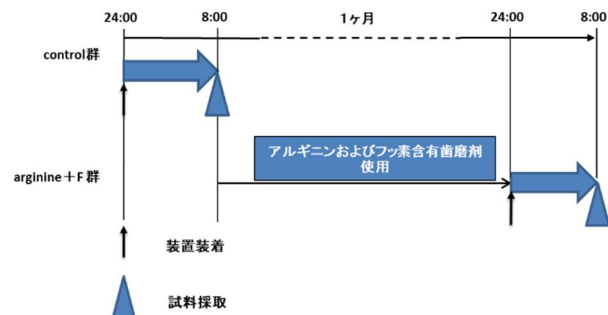


図2 実験スケジュール

(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
試料を滅菌蒸留水に浸漬し、5分間超音波振動30秒撹拌の後、連続10倍希釈を行った。希釈

した菌液をコロンビア羊溶血寒天培地に播種し、37℃、嫌気条件下（アネロパック®・ケンキ）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アンモニウムイオン（NH₄⁺）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。

（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

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。

（4）統計処理

生菌数およびアンモニウムイオン濃度測定における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。また、NGSの群間比較解析において、Linear discriminant analysis effect size(LEfSE, ver 1.0.8)を用いて群間で相対存在量の異なる系統の有無についての統計的検定を行った²⁾。

4. 研究成果

（1）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

8%アルギニンおよびフッ素配合歯磨剤を1カ月使用した群（arginine+F）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、arginine+F 群ではコントロール群より有意に上昇した。

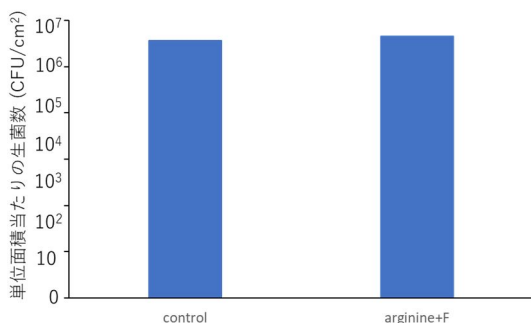


図3. 生菌数測定

生菌数に変化は認められなかった

(Wilcoxon rank sum test)

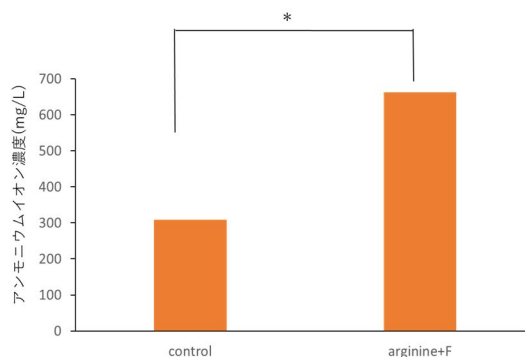


図4. アンモニウムイオン（NH₄⁺）濃度測定

併用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)

（2）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、arginine 群および arginine+F 群では control 群と比較し、Firmicutes 門が増加し、Bacteroidetes 門が減少傾向を示した(図5)。属レベルにおいて、arginine 群および arginine+F 群では Streptococcus 属や Gemella 属が増加傾向を示し、Porphyromonas 属が減少傾向を示した(図6)、これは以前のアルギニン単体の研究と同様であった¹⁾。

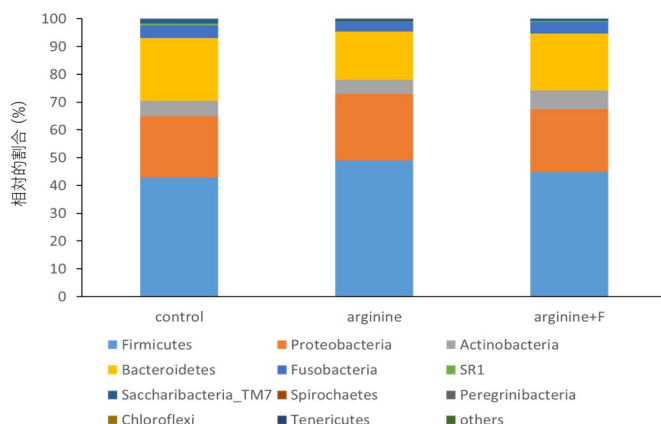


図5. 各細菌門の相対的割合

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

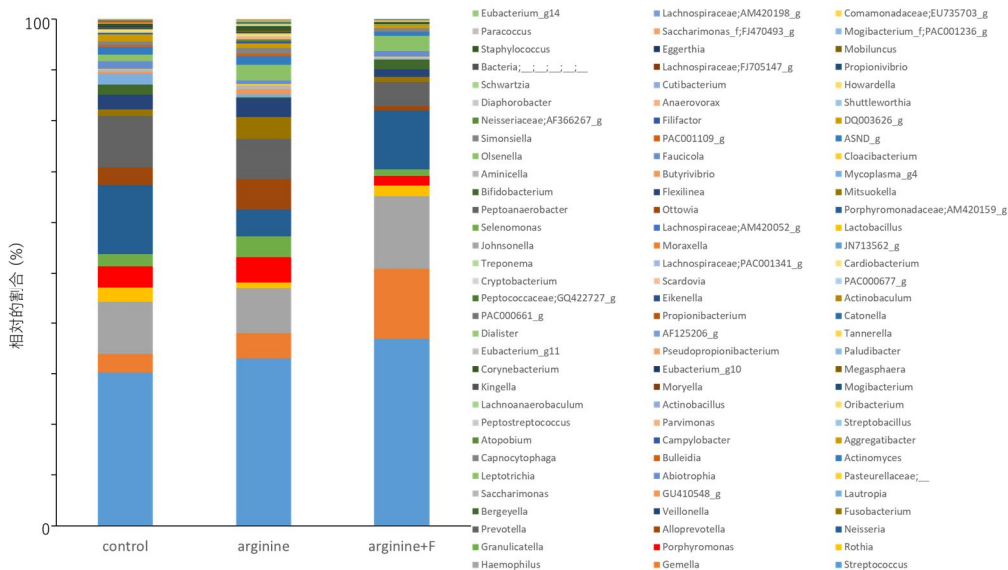


図 6. 各細菌門の相対的割合

全被験者のシーケンスデータを平均化した各細菌属の相対的割合を示す

水色 : *Streptococcus*, オレンジ : *Gemella*, 赤 : *Porphyromonas*

また,NGS の群間比較解析において,LEfSE (ver 1.0.8) を用いて群間で相対存在量の異なる系統があるか検定を行ったところ,control 群ではアルギニン付与群より有意に *Porphyromonas* 属が多く存在することが分かった.さらに,arginine 群では arginine+F 群より有意に *Lactobacillus* 属が多く存在することが示された(図 7).これは,フッ素を添加したことで,アルギニンの効果が増強され,耐酸性能のある細菌属の増加を防ぐことができたのではないかと考えられる.

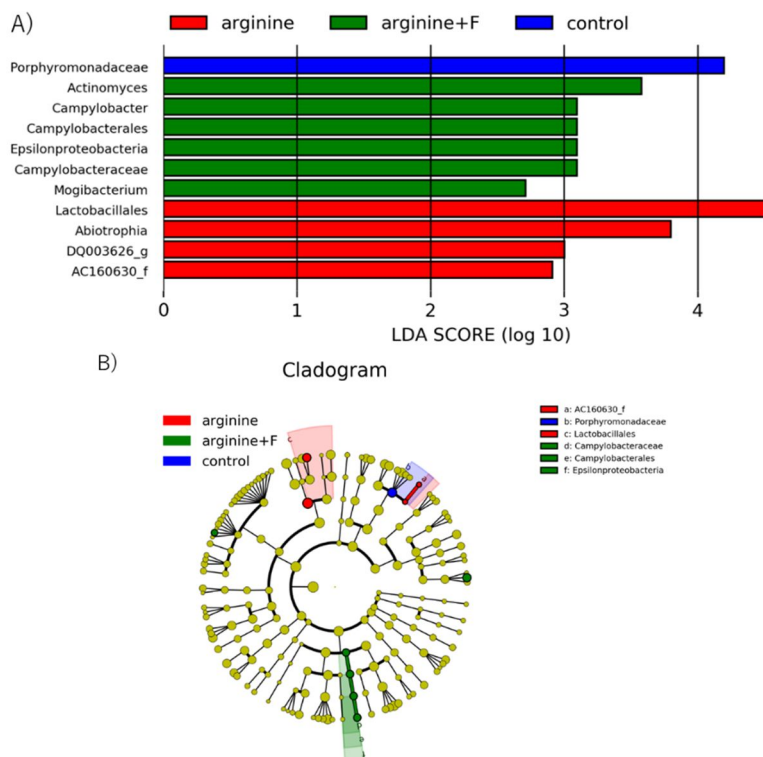


図 7. NGS の群間比較解析における,LEfSE 解析

A) 全被験者の NGS データの群間で相対存在量の異なる系統について統計的解析を行った

B) 上記データをクラドグラムで図示した. arginine 群は赤, arginine+F 群は緑で示しており,対局の位置に存在していることがわかる.

本研究より、8%アルギニンおよびフッ素含有歯磨剤を使用すると、口腔内の NH_4^+ 濃度が増加することで、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。また、NGSの群間比較解析の統計処理を行ったところ、control群ではアルギニン付与群より有意に *Porphyromonas* 属が多く存在することが分かった。さらに、arginine群では arginine+F群より有意に *Lactobacillus* 属が多く存在することが示された。これにより、口腔細菌叢へのアルギニンとフッ化物の相乗効果が示唆された。今後は、NGS技術を用いて菌種特定や機能因子の解析を行うことで、メカニズムの解明の必要があると考えられ、それにより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. N. Kuriki, Y. Asahi, M. Sotozono, H. Machi, Y. Noiri, M. Hayashi, S. Ebisu, Next-generation sequencing for determining the effect of arginine on human dental biofilms using an *in situ* model, *Pharmacy (Basel)*. 9 (2021) 18.
2. N. Segata, J. Izard, L. Waldron, D. Gevers, L. Miropolsky, W.S. Garrett, C. Huttenhower, Metagenomic biomarker discovery and explanation, *Genome Biol.* 12 (2011) R60. (Epub 2011/06/28).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

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 -
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 -

1. 著者名 Okamoto M, Matsumoto S, Moriyama K, Huang H, Watanabe M, Miura J, Sugiyama K, Hirose Y, Mizuhira M, Kuriki N, Leprince JG, Takahashi Y, Kawabata S, Hayashi M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Biological Evaluation of the Effect of Root Canal Sealers Using a Rat Model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics14102038.	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 廣瀬 奈々子, 岡本 基岐, 木ノ本 喜史, 栗木 菜々子, 森山 輝一, 林 美加子	4. 巻 65
2. 論文標題 Oehler 3型陥入歯の上顎左側側切歯に感染根管治療を行った1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 174-183
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 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 岡本 基岐, 木ノ本 喜史, 栗木 菜々子, 沢田 啓吾, 高橋 雄介, 村上 伸也, 林 美加子.	4. 巻 64
2. 論文標題 歯根形態異常により生じた歯内-歯周疾患の1例.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 171-180
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 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 Motoki Okamoto, Fergus Duncan Henry, Yusuke Takahashi, Nanako Kuriki, Matsumoto Sayako, Mikako Hayashi	4. 巻 2
2. 論文標題 Partial Pulpotomy to Successfully Treat a Caries-Induced Pulpal Micro-Abscess: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Dental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fdmed.2021.678632	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 Sotozono Maki, Kuriki Nanako, Asahi Yoko, Noiri Yuichiro, Hayashi Mikako, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Yamaguchi Mikiyo, Iida Tetsuya, Ebisu Shigeyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Impact of sleep on the microbiome of oral biofilms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0259850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0259850	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 Kuriki N, Asahi Y, Sotozono M, Machi H, Noiri Y, Hayashi M, Ebisu S.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Next-Generation Sequencing for Determining the Effect of Arginine on Human Dental Biofilms Using an In Situ Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacy (Basel).	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmacy9010018.	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 Sotozono M, Kuriki N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Machi H, Iida T, Ebisu S.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Impacts of sleep on the characteristics of dental biofilm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80541-5.	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 睡眠が口腔バイオフィルムに及ぼす影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM	6. 最初と最後の頁 27-31
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0件

〔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) (00876675)	新潟大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (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
---------	---------