

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 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22592330

研究課題名 歯垢バイオフィルムの細菌動態に着目した初期齲蝕モニタリングシステム

研究課題名（英文） The monitoring system of incipient caries, and its special attention to bacterial dynamics in dental plaque biofilm

研究代表者

松山 順子 (MATSUYAMA JUNKO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30293236

研究成果の概要（和文）：

蛍光フィルター法によりヒト歯垢バイオフィルムのモニタリングを行った。 10^5 程度のCFUが得られたサンプルでは、嫌気培養でも同程度の細菌数が得られ、モニタリングとして有効であると考えられた。また、齲蝕発症のモデルとして利用される、げっ歯類のプラークから、優勢菌として、*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactococcus garvieae*などが検出された。マウスプラークの細菌構成が明らかとなったことにより、齲蝕発症モデル実験のため一助となると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Plaque biofilm of humans was investigated using a rapid microbial cell counters and anaerobic cultures. On the samples of around 10^5 CFU counted, the same levels of bacterial counts were observed by the anaerobic cultures. While, indigenous plaque microbiota of mice was also analysed, and as a result, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactococcus garvieae* were detected as predominant bacteria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：口腔衛生学、初期齲蝕の予防、歯垢、バイオフィルム

1. 研究開始当初の背景

齲蝕の発生には、歯垢バイオフィルム内における細菌の構成割合、代謝産物、pHなどが関わっている。特に発症初期段階において、バイオフィルムのシフトが起こる。特に、mutans streptococciの割合は、レンサ球菌群の2%以下であり、齲蝕発症初期段階における病原性細

菌の割合は必ずしも高くないことや、non-mutans streptococciや*Actinomyces*といった酸産生性・耐酸性の齲蝕関連細菌群が初期段階に増加することが知られている。

これは、発症初期段階のバイオフィルムでは、病原性細菌の増加に先立ち「齲蝕関連細菌群」が増加すること、健全歯面上バイオフィルムの

細菌種と比較して量的・質的に違いがあることを示している。

小児の齲蝕は年々減少傾向にあり、歯科の果たす役割は、治療から予防へと変化しており、齲蝕の発症（特にその予兆）を科学的に予測することが求められている。そのためには、初期齲蝕発症前段階における齲蝕様病態の検出方法、初期齲蝕のリスクの評価方法を多角的に構築することが重要である。

2. 研究の目的

本研究ではこれに着目し、齲蝕関連細菌群をモニタリングすることにより、発症初期段階におけるバイオフィルムのシフトを早期発見し、齲蝕発症予防の指標とすることを目的とし、歯垢バイオフィルムの細菌動態をモニタリングするシステムの開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 蛍光フィルター法による細菌の定量的解析を行った。口腔サンプルを採取し、蛍光試薬およびポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いて、生菌数を計数した。同時に嫌気培養を行い、生育した細菌数を求めた。

(2) 齲蝕発症のモデルとして利用されることの多い、げっ歯類のプラーク常在菌叢について解析した。生後3週齢および6週齢のICRマウスを用いて、深麻酔下にて上顎第一臼歯を抜去し、緩衝液1.0 mLに浸漬し、健全な歯面上に付着している細菌を浮遊させ、培養用の試料とした。同緩衝液によって希釈し、CDC血液寒天平板に接種し、嫌気および好気培養し、CFUを求めた。1枚あたり50個以下のコロニーが形成された平板上の全てのコロニーからgenomic DNAを抽出後、16S rRNAのユニバーサルプライマーでPCR増幅した。得られたPCR産物を精製し、シーケンスを解析後、NCBIのBLAST search programを用いて、細菌種を同定した。

4. 研究成果

(1) 蛍光フィルター法によって、 10^5 程度のCFUが得られた口腔サンプルの場合、嫌気培養でも同程度の細菌数が得られた。このことから、蛍光フィルター法は、歯垢バイオフィルムの細菌動態をモニタリングするシステムとして利用可能と考えられた。

(2) 3週齢マウスプラークの嫌気および好気培養によるCFUは、平均 $(8.88 \pm 11.4) \times 10^5$ および $(7.53 \pm 13.2) \times 10^5$ であった。

6週齢マウスプラークの嫌気および好気培養によるCFUは平均 $(4.70 \pm 4.67) \times 10^5$ および $(5.85 \pm 7.28) \times 10^5$ であった。

3週齢における優勢菌は、*Enterococcus faecalis*(53%)、*Escherichia coli*(19%)、*Lactococcus garvieae* (8.5%)、*Lactobacillus murinus* (7.4%)、*Lactobacillus intestinalis* (5.3%)、*Lactobacillus reuteri*(4.3%)、*Staphylococcus lentus*(1.1%)、Uncultured organism clone (1.1%)であった。

6週齢における優勢菌は *Enterococcus faecalis*(49%)、*Escherichia coli*(34%)、*Clostridium cocleatum*(5.9%)、*Ruminococcus productus*(2.9%)、Uncultured organism clone (2.9%)、*Parabacteroides goldsteinii* (1.5%)、*Eggerthella lenta* (1.5%)であった。本研究において、マウスプラークの細菌構成を培養法とシーケンス解析を組み合わせた分子生物学的手法によって初めて明らかとなった。この結果は、齲蝕発症モデル実験のため一助となると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

① Sato T, Kenmotsu S, Nakakura-Ohshima K, Takahashi N, Ohshima H: Responses of infected dental pulp to α TCP containing antimicrobials in rat molars. *Arch Histol Cytol* 75: in press, 2013. 査読有.

② Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Quantification and identification of bacteria in acrylic resin denture bases and dento-maxillary obturator- prostheses. *Am J Dent* 25: 171-175, 2012. 査読有.

③ Sato T, Yamaki K, Ishida N, Shoji M, Sato E, Abiko Y, Hashimoto K, Takeuchi Y, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N: Rapid quantification of bacteria in infected root canals using fluorescence reagents and a membrane filter: A pilot study on its clinical application to the evaluation of the outcomes of endodontic treatment. *Int J Dent* 2012. 査読有, Article ID 172935, 4 pages.

④ Komori R, Sato T, Takano-Yamamoto T, Takahashi N: Microbial composition of dental plaque microflora on first molars with orthodontic bands. *J Oral Biosci* 54:107-112, 2012. 査読有. DOI: 10.1016/j.job.2012.01.009

⑤Sato T, Yamaki K, Ishida N, Hashimoto K, Takeuchi Y, Shoji M, Sato E, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N: Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals. *Int J Dent* 2012. 査読有. Article ID 609689, 5 pages.

⑥Ito Y, Sato T, Yamaki K, Mayanagi G, Hashimoto K, Shimauchi H, Takahashi N: Microflora profiling of infected root canal before and after treatment using culture-independent methods. *J Microbiol* 50: 58-62, 2012. 査読有. DOI:10.1007/s12275-012-0459-4

⑦Takenaka S, Ohshima H, Osumi T, Okiji T: Current and future strategies for the control of mature oral biofilms-Shift of a focus from bacteria-targeting to a matrix-targeting approach-. *J Oral Biosci* 54: 173-179, 2012. 査読有. DOI: 10.1016/j.job.2012.09.002

⑧Hashimoto K, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N: Profiling of dental plaque microflora on root caries lesions and the protein-denaturing activity of these bacteria. *Am J Dent* 24: 295-299, 2011. 査読有.

⑨Masaki M, Sato T, Sugawara Y, Sasano T, Takahashi N: Detection and identification of non-*Candida albicans* species in human oral lichen planus. *Microbiol Immunol* 55: 66-70, 2011. 査読有. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00285.x.

⑩Al-Shawafi H, Uematsu H, Takenaka S, Hoshino E: An in vitro model for a packed bacterial mass formation with special attention to less interstitial spaces. *Niigata Dent J* 41: 13-20, 2011. 査読有

⑪河村好章, 長谷川義明, 佐藤拓一: 口腔内細菌叢のコントロール. *ファルマシア* 46: 929-933, 2010. 査読無.

⑫Thaweboon B, Laohapand P, Amornchat C, Matsuyama J, Sato T, Nunez PP, Uematsu H, Hoshino E: Host beta-globin gene fragments in crevicular fluid as a biomarker in periodontal health and disease. *J Periodontal Res* 45: 38-44, 2010. 査読有. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2008.01197.x

⑬Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N: Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy

subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodontal Res* 45: 389-395, 2010. 査読有. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2009.01250.

[学会発表] (計 17 件)

①庄司 恵, 佐藤愛美加, 石田直子, 八巻恵子, 佐藤拓一, 高橋信博: 蛍光フィルターを利用した、感染根管細菌の迅速定量検出法. 第 22 回日本歯科医学会総会、2012 年 11 月 11 日、大阪

②佐藤拓一, 河村好章, 八巻恵子, 島内英俊, 高橋信博: 口腔バイオフィルムの分子生物学的プロファイリング-メタゲノム解析-. 第 22 回日本歯科医学会総会、2012 年 11 月 10 日、大阪

③松山順子, 佐藤拓一, Angela Quispe-Salcedo, 石田直子, 高橋信博, 大島勇人: マウス口腔内プラーク常在菌叢の網羅的解析. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 16 日、郡山

④Sato T, Ohshima T, Miyakawa H, Hamada N: The oral microbiome and biofilm research: new concepts and new approaches by presentation by young researchers. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム、2012 年 9 月 14 日、郡山

⑤佐藤拓一, 河村好章, 八巻恵子, 島内英俊, 高橋信博: 感染根管細菌叢の pyrosequencing 法によるメタゲノム解析. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会、2011 年 10 月 1 日、岐阜

⑥Hoshikawa Y, Tanda N, Endo H, Sato T, Hasegawa A, Kondo T: Intensive perioperative oral care prevents postoperative pneumonia after lung resection. American Thoracic Society 2011 International Conference 2011 年 5 月 17 日 Denver, Colorado, USA

⑦Abiko Y, Sato T, Sakashita R, Takahashi N: Subgingival plaque biofilm microflora of elderly subjects: quantitative analysis of *Porphyromonas gingivalis* and genotyping of its virulence-associated *fimA*. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

⑧Hasegawa A, Sato T, Hoshikawa Y, Kondo T, Takahashi N: Silent aspiration of oral bacteria - microbiological analysis of intraoperative bronchial fluids from

patients with pulmonary carcinoma. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

⑨ Kato K, Tamura K, Nakagaki H, Sakakibara S, Ou Y, Matsumoto S, Fujita K, Sato T: A method for quantitatively evaluating plaque biofilm removing capacity of a dental water jet using EPMA. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

⑩ Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Quantification and identification of bacteria in the maxillary obturator-prostheses. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

⑪ Yamaki K, Sato T, Shimauchi H: Change in infected root canal microflora during the course of root canal treatment. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

⑫ Nishihira T, Nishitani M, Sato T, Abiko Y, Matsushita K, Hamada M, Sakashita R: Community oral health promotion program fostering self-management for elderly people. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

⑬ 佐藤拓一: 口腔フローラのプロファイリング. 第 58 回東北大学歯学会、2010 年 12 月 10 日、仙台.

⑭ 丹田奈緒子, 星川 康, 遠藤ひとみ, 佐藤拓一, 細川亮一, 田浦勝彦, 齋藤恵一, 井川恭子, 鈴木 淳, 小関健由: 高齢肺切除症例に対する周術期口腔ケアの試み. 第 59 回日本口腔衛生学会・総会, 2010 年 10 月 8 日, 新潟

⑮ Hasegawa A, Sato T, Hoshikawa Y, Abiko Y, Kondo T, Takahashi N: Silent aspiration of oral bacteria in elderly subjects. The 88th IADR, July 17, 2010 Barcelona, Spain

⑯ 星川 康, 松田安史, 遠藤ひとみ, 丹田奈緒子, 佐藤拓一, 岡田克典, 近藤 丘: 高齢者肺切除術後肺炎発症機序の解明と予防策. 第 27 回日本呼吸器外科学会総会シンポジウム, 2010 年 5 月 13-14 日, 仙台

⑰ 星川 康, 遠藤ひとみ, 丹田奈緒子, 佐藤拓一, 長谷川彩子, 野田雅史, 佐渡 哲, 大石 久, 前田寿美子, 桜田 晃, 遠藤千頭,

岡田克典, 近藤 丘: 周術期専門的口腔ケア介入の肺切除術後肺炎予防効果. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会, 2010 年 4 月 23-25 日, 京都

〔図書〕 (計 7 件)

① 佐藤拓一 (翻訳) 口腔内微生物叢と歯面のバイオフィーム In: デンタルカリエス—その病態とクリニカルマネジメント、第 2 版、医歯薬出版、2013 年印刷中

② Abiko Y, Sato T, Sakashita R, Takahashi N: Subgingival plaque biofilm microflora of elderly subjects: quantitative analysis of *Porphyromonas gingivalis* and genotyping of its virulence-associated *fimA*. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 176-177, 2012.

③ Hasegawa A, Sato T, Hoshikawa Y, Kondo T, Takahashi N: Silent aspiration of oral bacteria - Microbiological analysis of intraoperative bronchial fluids from patients with pulmonary carcinoma. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 181-182, 2012.

④ Kato K, Tamura K, Nakagaki H, Sakakibara S, Ou Y, Matsumoto S, Fujita K, Sato T: A method for quantitatively evaluating plaque biofilm removing capacity of a dental water jet using EPMA. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 186-188, 2012. February

⑤ Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Quantification and identification of bacteria in the maxillary obturator-prostheses. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 209-211, 2012.

⑥ Yamaki K, Sato T, Hasegawa A, Abiko Y, Hashimoto K, Takeuchi Y, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N: Change in infected root canal microflora during the course of root canal therapy. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 221-222, 2012.

⑦ Nishihira T, Nishitani M, Sato T, Abiko

Y, Matsushita K, Hamada M, Sakashita R:
Community oral health promotion program
fostering self-management for elderly
people. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N.
Takahashi (eds.) Interface Oral Health
Science 2011, Springer, New York, pp.
317-319, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 順子 (MATSUYAMA JUNKO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号 : 30293236

(2) 研究分担者

竹中 彰治 (TAKENAKA SYOJI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号 : 50313549

佐藤 拓一 (SATO TAKUICHI)
東北大学・歯学研究科 (研究院) ・講師
研究者番号 : 10303132