

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592816

研究課題名(和文) マイクロコスム長期培養モデルを用いた齲蝕原生および群集構造の解析

研究課題名(英文) Analysis of cariogenicity and community structure in microcosm biofilm

研究代表者

富山 潔 (Tomiyama, Kiyoshi)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：90237131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロコスムバイオフィームを用いた *in vitro* モデルが、口腔内を模した、表層下脱灰病巣を誘発できることを確認・報告した。本モデルを用いて作成したバイオフィームに SPRG フィラー含有歯磨材による処理を行なうことにより、顕著に脱灰を抑制することを報告した。また、渋柿由来の縮合型タンニンを含む食品・化粧品等の原料 (Pancil PS-M；リリース科学工業株式会社) が、濃度依存的にガラス上で形成したバイオフィームの生菌数を抑制することを報告した。

研究成果の概要(英文)：Our results showed microcosm biofilm model has a potential to simulate biofilm inducing subsurface lesions. Also, toothpaste including S-PRG filler inhibited dentin demineralization induced by biofilms. Furthermore, Pancil PS-M as food additive including condensed tannin has a potential to suppress viability of biofilms.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：biofilm microcosm antimicrobial chlorhexidine tannin S PRG filler

1. 研究開始当初の背景

齲蝕は口腔内細菌が歯面に定着してプラークを形成し、細菌が産生した酸が直下の歯質を脱灰して発症する感染症であると広く認識されている。そして、言うまでもなく現在の齲蝕病因論は、ミュータンス連鎖球菌を主要な病原細菌とする特異的感染論に基づいている。しかしながら一方で、齲蝕は単なる感染症ではなく口腔常在菌叢の機能異常の結果であり、齲蝕の病原菌は存在しないという考え方が2004年のORCA symposiumにおいて議論され(D. Beighton and C.H. Sissons, *Caries Res* 2004; 38: 325 – 329)、満場一致で受諾された。バイオフィーム構造内において、ミュータンス連鎖球菌のみが、その特徴をいかんなく発揮することは不可能であると思われる。近年、口腔内と同じ細菌種の多様性に富んだ、マイクロコスムバイオフィームを用いた研究が、齲蝕学の分野において注目され始め(Lisa Wong *et al*, *Arch Oral Biol* 2007; 52: 280 – 289)、2010年のIADRにおいて、健康なヒト口腔内の細菌種が、実は、予測されていた300~400種を大きく上回っていたことが、海外研究協力者の一人であるten Cate JMにより報告された。私達は、Exterkate RAMらが開発したAmsterdam Active Attachment model(*Caries Res* 2010; 44: 372 – 379)を用いて、長期培養マイクロコスムモデルを考案し、作成したバイオフィームが安定した代謝活性を示すことを2010年ORCAで報告、本モデルを用いて抗菌剤の抗菌効果を同年のIADRで報告し、高い評価を得ることができた、

2. 研究の目的

本研究の目的は、今までに検討されることの少なかった、口腔内と同程度の多菌種を含むバイオフィーム(マイクロコスムバイオフィーム)の特徴を明らかにし、さらにできれば、健康な口腔内におけるバイオフィームおよび病的なバイオフィームの特徴

を明らかにし、より理論的な口腔内病変の治療法を確立することである。臨床が行われる現場においては、健全歯質や治療部位の脱灰抑制を達成することは、高齢者の残存歯数を増加させることに繋がるはずであり、高齢化社会において、高齢者の健康増進の一助となるはずである。

私達は、抗菌薬がマイクロコスムの代謝活性に及ぼす影響とその後のバイオフィームの回復、そして、バイオフィームが固相の違いによって、どのような代謝活性の違いを呈するのかを評価するためのモデルとして、バイオフィームにより形成を促した象牙質表層下脱灰病巣モデルを考案し、評価、報告した。

3. 研究の方法

実験1) クロルヘキシジンがマイクロコスムバイオフィームの代謝および群集構造に与える影響：ウシ下顎中切歯の歯根部の歯頸部直下から8mm根尖側の位置を水平に切断し(Isomet™, Buehler, USA)、得られた円筒状試片を2分割(Well 3242, Walter Ebner, Germany)した後、表面を2000番の耐水研磨紙で研磨し、さらに直径6mm厚さ1mmの円盤状象牙質試料を切り出した。試料2枚の表面が両側となるように貼りわせ、バイオフィーム形成用試片とした。実験群は、ガラス群(処理なし)、象牙質群(処理なし)、0.05%グルコン酸クロルヘキシジン処理群、0.2%グルコン酸クロルヘキシジン処理群、の4群とした(n = 10)。バイオフィームの培養には、1被験者から採取した刺激唾液を用い、バイオフィームモデルとしてAmsterdam Active Attachment model(Exterkate RAMら、2010)に従い、培養液にMcBain 2005(0.2%スクロース含有)を用い、培養液の交換を10時間、14時間の間隔で1日2回行なう連続嫌気培養を8日間行なった。交換済みの培養液に対してpHの測定(9618-10D, F-71, Horiba)およびカルシウム溶出量の測定を行なった。培養停止時のバイオフィームは、乳酸産生量

の測定後，超音波で剥離し(PBS 浸漬下)，propidium monoazide (PMA)処理を行った後，DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) により，群集構造の解析を行った．また，同じ群を用いて，培養終了時に血液寒天培地を用いて4日間，培養を行った後，生菌数の測定を行なった．

実験2) マイクロコスモバイオフィームを用いた表層下脱灰病巣モデルの開発：実験1と同様のバイオフィーム形成用試片を作成した．実験群は，ガラス群(G)，対照群(F非含有: 0F)，0.2 ppm F含有培養液群(0.2F)，2.5 ppm F含有培養液群(2.5F)の4群とした(n = 6)．バイオフィームの培養も実験1と同様の条件で，連続嫌気培養を8日間行なった．交換済みの培養液に対してpHの測定(9618-10D, F-71, Horiba)を行ない，その後，実験終了時に血液寒天培地を用いて生菌数測定を行なった．さらに培養終了後の象牙質試片より厚さ300 μmの薄切切片を作製し，Transversal Microradiography (TMR)を撮影後(PW3830, Spectris, UK)，ミネラル喪失量(IML)を測定し(TMR2000, Inspector, The Netherlands)した後，One-way ANOVAおよびTukeyの検定により有意水準5%にて統計学的分析を行ない，各群の脱灰様相を比較検討した．

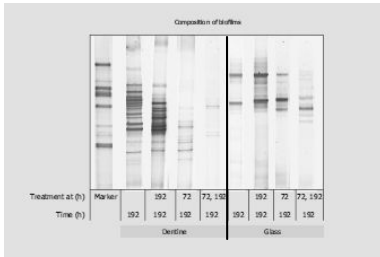
実験3) SPRG フィラー含有歯磨材のマイクロコスモバイオフィームへの抗菌効果：被験材料にはウシ下顎中切歯の歯根部の歯頸部直下から直径6 mm厚さ1 mmの円盤状象牙質を用い，試料2枚の表面が両側となるように耐熱性の接着剤にて貼りわせ，バイオフィーム形成用試片とした．また，スタンダード被験材料としてガラスを用いた．本実験に使用した歯磨材は粒径1 μmのSPRG フィラーを5%の割合で含有する歯磨材および950ppmF含有歯磨材(製品A)の2種類である．実験群は，ガラス群(G)，950 ppm F含有歯磨材・ガラス群(950G) S-PRG フィラー含有歯磨

材・ガラス群(SPG) 対照象牙質群(D)，950 ppm F含有歯磨材・象牙質群(950D)，S-PRG フィラー含有歯磨材・象牙質群(SPD)の6群とした(n = 6)．バイオフィームの培養にマイクロコスモバイオフィームモデルを使用した．培養法は実験1および2と同様で，連続嫌気培養を8日間行なった．バイオフィームの培養3日目において，3倍希釈した歯磨材に5分間浸漬後，バイオフィームをCPW液により十分に洗浄してから8日目まで培養を続けた．交換済みの培養液に対してはpHの測定(9618-10D, F-71, Horiba)を行なった．その後，実験終了時に血液寒天培地を用いて生菌数測定を行なった．さらに培養終了後の象牙質試片より厚さ300 μmの薄切切片を作製し，Transversal Microradiography (TMR)を撮影後(PW3830, PANalytical)，ミネラル喪失量(IML)および病巣深度(LD)を測定(TMR2000, Inspector)した後，One-way ANOVAおよびTukeyの検定により有意水準5%にて統計学的分析を行ない，各群の脱灰様相を比較検討した．

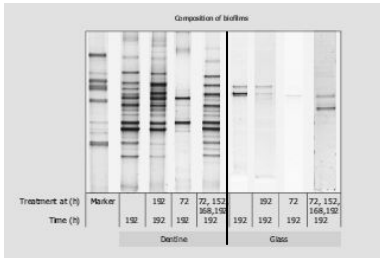
4. 研究成果

実験1) クロロヘキシジンがマイクロコスモバイオフィームの代謝および群集構造に与える影響：

DGGEによる群集構造解析の結果は，ガラス上と象牙質上では，バイオフィーム中の細菌叢の多様性が全く異なっていた．また，培養72時間の時点で，0.05あるいは0.2%グルコンサンクロロヘキシジン処理を加えることにより，その後，192時間まで培養期間を延ばしても，バイオフィーム中の細菌叢は，非処理の場合に比べて，多様性が低いことがわかった．一方で，192時間培養を行い，成熟したバイオフィームに対しては，両濃度ともに，バイオフィーム中の細菌叢に影響を与えることはなかった．

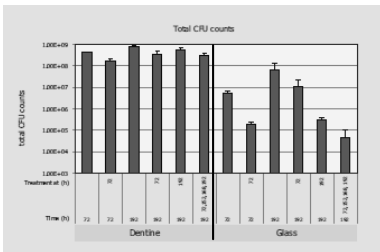


0.05 % グルコン酸クロルヘキシジン処理後のマイクロコスモバイオフィルム中の細菌叢の多様性」



0.2 % グルコン酸クロルヘキシジン処理後のマイクロコスモバイオフィルム中の細菌叢の多様性

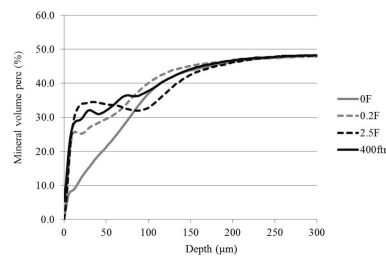
0.2 % グルコン酸クロルヘキシジン処理は、ガラス上に形成されたバイオフィルムの生菌数に顕著な影響を与えたが、象牙質上の細菌叢に対しては、効果を及ぼさなかった。



以上の実験結果は、細菌種の多様性に富んだ象牙質上のバイオフィルムは、形成後初期においては、細菌種の多様性に対して、影響を受けやすいが、形成が長期間に及ぶと、影響を受けにくいことがわかった。これは、細菌外多糖体の形成量などが原因である可能性が考えられる。また、抗菌剤の生菌数に対する影響は、象牙質上のバイオフィルムは受けにくく、ガラス上で受けやすいことがわかった。これは、DGGE の結果も示している通り、菌種の多様性に富んだ象牙質上のバイオフィルムの方が、クロルヘキシジンの影響を受けやすい特定種の割合が低く、影響を受けにくいということに起因しているのではない

かと考えられる。マイクロコスモバイオフィルムを用いた *in vitro* モデルにより形成した長期バイオフィルムは、形成された固相により、抗菌剤による影響が異なるということが考えられる。

実験 2) マイクロコスモバイオフィルムを用いた表層下脱灰病巣モデルの開発: 0.2F 群および 2.5F 群では、明瞭な表層を伴った表層下脱灰病巣の形成が確認され、2.5F 群の表層ミネラル密度は 0.2F 群に比較して上昇していたが、対照の 0F 群では表層が不明瞭な脱灰病巣が形成されていた。0.2F 群および 2.5F 群の表層には、ラミネーション構造が認められた。各群の平均 IML は、他群に比較して 0F 群が有意に大きく、0.2F 群と 2.5F 群間に有意差は認められなかった。



また象牙質上で培養した 3 群の総細菌数は G 群に比較して有意に多かった。口腔内唾液に含まれるフッ化物濃度であるとされる 0.2ppm F を含有させたマイクロコスモバイオフィルムモデルは表層を伴う象牙質脱灰病巣を形成した。象牙質で培養を行なった 3 群の pH は、G 群に比較し顕著に高く、象牙質から溶出した成分が緩衝作用を生じさせている可能性が示唆された。さらに培養の終了時点において 3 群 (0F, 0.2F, 2.5F) の pH 値間には有意差が認められなかったが、0.2 ppm F および 2.5 ppm F は、バイオフィルムによる象牙質の脱灰過程において表層形成の役割を担うとともに脱灰抑制を促すが、総細菌数やバイオフィルム中の細菌の糖代謝には大きな影響を及ぼさない可能性があることがわかった。これらの結果より、本モデルはバイオフィルムの性質、細菌叢の多様性の分

析，各種抗菌薬の効能，う蝕の予防効果を期待したコーティング材および充填材料の評価など，様々な分野への応用が期待できることが示唆された。

実験3) SPRG フィラー含有歯磨材のマイクロコスモバイオフィームへの抗菌効果：

象牙質上バイオフィームに対して両歯磨材処理(950D, SPD)を行った後の培養液 pH は，培養終了時まで一貫して D 群に比較して有意に低かったが ($p < 0.05$)，歯磨材間で有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。また，培養終了時における生菌数は，SPD が 950D に比較し低い傾向を示した。TMR 分析において，D 群のミネラルプロファイルでは表層はほとんど認められず，脱灰も顕著であった。950D 群においても表層は認めるものの明らかな病巣が認められた。一方 SPD 群は，D 群および 950D 群に比較し表層および病巣体部のミネラル密度は高く維持されていた。SPD 群の IML および LD は D 群および 950D 群に比較し有意に低い値となった ($p < 0.05$)。象牙質試料において 2 種類の歯磨材処理間には培養液 pH の差は認められなかったが，生菌数では SPD 群が低い傾向を示し，また IML および LD の比較においても SPD 群が 950D 群に比較し有意に低くなったという本結果は，S-PRG フィラーがストロンチウムイオンやホウ酸イオンを徐放し，これらが緩衝作用あるいは抗菌作用を表すとともに，同時に徐放されるフッ化物イオンと相まって優れた脱灰抑制を誘導した可能性を示唆している。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 11 件)

1. TOMIYAMA K, MUKAI Y, KUMADA H, SHIYA T, KURAMOCHI E, MIYAKE K, HASEGAWA H, WATANABE K, HAMADA N, EXTERKATE RAM, TEN CATE JM,

TERANAKA T.

Effect of the toothpaste containing S-PRG filler on the metabolism of polymicrobial biofilms.

ORCA (European Organization for Caries Research), Liverpool, UK, 2013

2. TOMIYAMA K, MUKAI Y, KUMADA H, WATANABE K, SHIYA T, HAMADA N, EXTERKATE RAM, TEN CATE JM, TERANAKA T.
Development of microcosm biofilm model inducing subsurface dentinal lesions *in vitro*.
IADR Pan European Region , Helsinki, Finland, 2012
3. 富山 潔, 向井義晴, 齋藤正寛, 渡辺清子, 熊田秀文, 河田 亮, 東 一善, 二瓶智太郎, 椎谷 亨, 三宅 香, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 中村健一, 奥原正國, 邊見篤史, 高橋 理, 浜田信城, 寺中敏夫. 柿タンニンが長期培養ポリマイクロバイアルバイオフィームの形成に与える影響. 神奈川歯科大学学会 第 48 回
総会, 2013
4. 富山 潔, 向井義晴, 齋藤正寛, 渡辺清子, 熊田秀文, 河田 亮, 東 一善, 二瓶智太郎, 椎谷 亨, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 寺中文字子, 三宅 香, 中村健一, 奥原正國, 邊見篤史, 高橋 理, 浜田信城, 寺中敏夫. 柿タンニンの長期培養ポリマイクロバイアルバイオフィーム形成に対する抗菌効果. 第 139 回 日本歯科保存学会 秋季学会, 2013 .
5. 富山 潔, 向井義晴, 齋藤正寛, 渡辺清子, 熊田秀文, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 寺中文字子, 三宅 香, 二瓶智太郎,

- 浜田信城, 寺中敏夫. カキタンニン含有抗菌剤 (Pancil[®] PS-M) のポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する付着抑制効果 .
第 29 回 医学生物学電子顕微鏡技術学会, 2013 .
6. 富山 潔, 向井義晴, 齋藤正寛, 二瓶智太郎, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 寺中文子, 三宅 香, 熊田秀文, 渡辺清子, 中村健一, 奥原正國, 邊見篤史, 浜田信城, 寺中敏夫. カキタンニンのポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する抗菌効果 .
第 138 回 日本歯科保存学会 春季学会, 2013 .
7. 富山 潔, 向井義晴, 椎谷 亨, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 熊田秀文, 渡辺清子, 浜田信城, 寺中敏夫. マイクロコスムバイオフィルムを応用した *ex vivo* 表層下脱灰病巣モデルの確立 . 神奈川歯科大学学会 第 47 回総会, 2012 .
8. 富山 潔, 向井義晴, 熊田秀文, 椎谷 亨, 三宅 香, 長谷川晴彦, 渡辺清子, 浜田信城, 寺中敏夫. S-PRG フィラー含有歯磨剤がマイクロコスムバイオフィルムに与える影響 .
第 137 回 日本歯科保存学会 秋季学会, 2012 .
9. 富山 潔, 向井義晴, 熊田秀文, 椎谷 亨, 渡辺清子, 浜田信城, 寺中敏夫. マイクロコスムバイオフィルムによる *in vitro* 表層下脱灰病巣モデルの確立 .
第 136 回 日本歯科保存学会 春季学会, 2012 .
10. 富山 潔, 向井義晴, 飯塚純子, 椎谷 亨, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 平山倫子, 平林正道, 藤野富久江, 寺中敏夫. フッ素系ナノフィラー含有シール材の象牙質脱灰抑制能 .

- 神奈川歯科大学学会 第 46 回総会, 2011 .
11. 富山 潔, 向井義晴, 飯塚純子, 椎谷 亨, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 平山倫子, 平林正道, 藤野富久江, 寺中敏夫. 試作フッ素系シール材の象牙質脱灰抑制 .
第 135 回日本歯科保存学会 秋季学会, 2011 .

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 (計 0 件)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富山 潔 (TOMIYAMA Kiyoshi)

神奈川歯科大学・歯学研究科 (研究院)・
講師

研究者番号: 90237131

(2) 研究分担者

寺中敏夫 (TERANAKA Toshio)

神奈川歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号: 60104460

向井義晴 (MUKAI Yoshiharu)

神奈川歯科大学・歯学研究科 (研究院)・
准教授

研究者番号: 40247317

(3) 連携研究者

()

研究者番号: