

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659847

研究課題名(和文)細菌バイオミネラリゼーションを応用したシールド・レストレーション

研究課題名(英文)The application of bacterial biomineralization to sealed restoration

研究代表者

吉山 昌宏 (YOSHIYAMA, MASAHIRO)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10201071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：供試菌としてCorynebacterium matruchotiiを用い、寒天培地および液体培地に塩化カルシウムを添加して培養した。誘導およびミネラル形成期間を2～12か月とし、石灰化物の形成を観察した。その結果、液体培養では2か月よりミネラル形成を示し、ミネラル形成期間の増加にともない、菌体内石灰化が明らかになった。固形培養では明らかな石灰化物形成を認めなかった。C. matruchotiiにおいて、カルシウムを多く含む環境で培養することにより細菌のバイオミネラリゼーションを生じさせることができた。また、誘導方法は、液体培地での誘導が望ましいとの結論を得た。

研究成果の概要(英文)：We used Corynebacterium matruchotii as test bacteria, and we cultured bacteria to the agar medium and a liquid medium which added calcium chloride. We set a period of an instruction and the mineral formation with 2-12 months and observed the formation of the calcium deposition. As a result, we observed the mineral formation in the liquid culture from two months, and the calcification in the cell body became clear with the increase between the mineral formative periods. We did not accept the clear calcium deposition formation in the solid culture. C. matruchotii produced bacterial biomineralization by culturing it in calcium-rich environment. In addition, we got a conclusion that the instruction in the liquid medium is desirable for an instruction method.

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：歯学 歯科保存修復学 細菌学 接着歯学

## 1. 研究開始当初の背景

バイオミネラリゼーションとは、生物が無機鉱物をつくる作用(生体鉱物化作用)のことで、貝やウニ、真珠等の海洋生物での生体鉱物化作用が知られている。海洋中に溶け込んでいる各種ミネラルイオンを捕集、濃縮して、貝やトゲ、真珠等が作られる。口腔内で見られる歯石は、デンタルプラーク細菌に唾液中のリンやカルシウムが蓄積し、ハイドロキシアパタイトとなったものであり、バイオミネラリゼーションの一例である。臨床の場で、歯石が咬合面小窩裂溝に沈着し、天然のシーラント(小窩裂溝封鎖剤)となっているのに遭遇することがある。歯石の下の歯面にはう蝕は存在しない。研究分担者の大原らは、これまでにう蝕原性細菌を人為的に石灰化し小窩裂溝封鎖剤へ応用することを目的とし、大腸菌をモデル系としてアルカリホスファターゼ遺伝子導入による酵素活性の上昇および石灰化の誘導実験をおこない、細菌の人為的石灰化に成功している( Microbiologica, 2002; 25(1):107-110. )。本研究の着想は、その延長線上にあり、シールドレストレーションへの応用を図るものである。

## 2. 研究の目的

象牙質う蝕の治療においては接着力の向上と2次う蝕の発生防止という観点から、軟化象牙質を完全に除去することが基本とされている。その結果、深部う蝕が発生した場合には抜髄に至るケースが後を絶たないのが現状である。近年の高まる患者ニーズに対して、無痛治療や出来る限り歯を抜かない、削らない Minimal Intervention の概念に基づいた新たな治療法が求められ

ている。可及的にう蝕を除去した後のう蝕原細菌を含むう蝕象牙質に対して接着性レジンを用いて直接修復を行うシールド・レストレーション法は、接着材料ならびに接着技法の発展を背景にその可能性が拓け始めている( Yoshiyama et al., J Dent Res, 2002)。本術式において重要となる事項は、接着性レジンで封鎖したう蝕細菌を不活化することである。う蝕治療の原則は、歯質に侵入した細菌の完全削除とされている。しかし実際には細菌は、う蝕病変の深部まで侵入しているため、必要以上に健全な歯質を除去せざるを得ないのが現状である。

そこで口腔内細菌をシールドレストレーションに利用してはどうかという発想で、本研究を計画した。生物が生体の内外に無機鉱物結晶を作るバイオミネラリゼーション( biomineralization )の機構を細菌に導入し、う蝕病変における細菌を石灰化誘導することにより、う蝕の進行停止、管理を試みることを目指す。局所でバイオミネラリゼーションを生じさせるために、ミネラルイオンの供給法、ミネラル結晶を形成、成長させるための環境作りやその条件を検討する必要がある。また、有機基質の存在も必要と考えられ、積極的に作用させるために有機基質を産生する組み換え菌を作製する。異なる有機基質を産生する細菌の混合培養やバイオフィームを利用した細菌集合体としての石灰化、う蝕歯質の石灰化を計画している。

## 3. 研究の方法

供試菌として *Corynebacterium matruchotii* ATCC 14266 (NCTC 10254) 株を用いた。培養は、液体培地と固形培地を用い、2種の培養法にてミネラリゼーシ

オン実験を行った。いずれの場合にもミネラル化誘導群は 1mmol/L の濃度でカルシウムを添加した。

誘導 2 ~ 12 か月後、液体培地中の菌を遠心法にて集菌したものあるいは固形培地上の集落をホルマリン溶液で固定しパラフィン包埋を行い、厚さ 5µm の切片を作製した。脱パラフィン後、グラム染色、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) およびアリザリンレッド染色を施し、光学顕微鏡にて菌体およびミネラル化の状況を観察した。

#### 4 . 研究成果

2 か月間までの石灰化誘導およびミネラル形成期間において、HE 染色では一部の菌がカルシウム陽性を示唆する暗紫色を呈していた。同部は、アリザリンレッド染色においても、薄い赤色を呈しており、カルシウム化合物沈着の可能性を示した。いずれの場合にも菌体そのものが染色されており、菌体内石灰化が誘導される可能性を示唆していた。また、液体培地で培養した場合に菌の内部に粒状物を認めた。2 か月から 12 か月の期間においては、4 か月後に染色状態は明瞭かつ広範囲になり、アリザリンレッド染色においては赤色を呈した。12 か月後には、アリザリンレッド染色の赤色変化は著明であった。高拡大観察では、菌体そのものが染色されており、菌体内石灰化が誘導されていると考えられた。

菌塊の変化を比較した場合、ミネラル化誘導期間を延長するにともない、菌体の凝集が増加したが、菌どうしの接着の減少が認められた。このことは菌体内の石灰化が進行した結果、菌体の生活反応が減少し細胞間のつながりが減少したためである

と予測された。

固形培養では、12 か月のものでも明らかな染色変化は認められなかった。

以上、*Corynebacterium matruchotii* において、カルシウムを多く含む環境で培養することにより細菌のバイオミネラル化を生じさせることができた。また、誘導方法は、液体培地での誘導が望ましいとの結論を得た。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

大原直子、細菌バイオミネラル化誘導の試み、第 139 回日本歯科保存学会学術大会、2013 年 10 月 17 日、秋田市

大原直子、口腔連鎖細菌による歯根象牙質う蝕の誘発、第 137 回日本歯科保存学会学術大会、2012 年 11 月 22 日、広島市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉山 昌宏 (YOSHIYAMA MASAHIRO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10201071

(2)研究分担者

西谷 佳浩 (NISHITANI YOSHIHIRO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60325123

大原 直子 (OHARA NAOKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80301365

大原 直也 (OHARA NAOYA)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号:70223930