

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463237

研究課題名(和文) 齲蝕関連細菌群をターゲットとした歯垢バイオフィルムの多角的解析と齲蝕予防への展開

研究課題名(英文) Multifaceted approach to the analyses of dental plaque biofilm targeting dental caries-associated bacteria, and its application to dental caries prevention

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：齲蝕実験モデルとして使われることが多い、マウスの口腔内プラーク細菌叢について、16S rRNA PCR法、シーケンス法により網羅的解析を行った。3週、6週、9か月齢の離乳前後のマウス口腔内から、Enterococcus, Escherichia, Lactobacillus, Lactococcus, Clostridiumなどが検出された。

ヒトでは小児のプラーク細菌叢は、Streptococcus, Actinomyces, Veillonellaが優勢菌であり、それとは異なる結果となった。ヒトとマウスでは食性が異なることから、プラーク細菌構成が大きく異なると推察された。

研究成果の概要(英文)：As an animal model of dental caries, mice have been generally utilized. In this study, dental plaque microbiota of pre- and post-weanling, were analyzed by using molecular biological techniques. Enterococcus, Escherichia, Lactobacillus and Lactococcus were predominant. From the findings of the present study, the bacterial composition of dental plaque microbiota of mice varies markedly from that of humans (in which Streptococcus, Actinomyces and Veillonella are predominant); and this may be due to differences in the daily diet.

研究分野：歯学

キーワード：細菌叢 齲蝕 バイオフィルム PCR法 プラーク マウス

1. 研究開始当初の背景

齲蝕が減少傾向にある現在、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、初期齲蝕発症前段階の歯垢バイオフィーム内で、齲蝕病原性細菌の増加に先立って、齲蝕関連細菌群が増加することに着目し、その動態変化を多角的アプローチにより解析する。これにより、引き続き起こる齲蝕病原性細菌群の動態を予測し、エビデンスに基づく齲蝕発症の予測、リスク評価法を構築する。

3. 研究の方法

齲蝕発生モデルとして使われることの多い、マウス口腔内のプラーク細菌叢を対象とした。深麻酔下にて、ICR マウス 16 匹（生後 3・6 週齢および 9 ヶ月齢）の、上顎第一臼歯を抜去し、40 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）に浸漬し、試料とした。分散均一化後、同緩衝液によって希釈し、CDC 血液寒天平板に接種した。嫌気（7 日間）および好気培養（3 日間）後、生育したコロニー数より細菌量（CFU）を求め、純培養した。純培養に成功したコロニーから DNA を抽出し、16S ribosomal RNA-PCR シークエンス法（Sato *et al.* 2012）によって細菌種を同定し、細菌構成について解析した。

4. 研究成果

3 週齢、6 週齢および 9 ヶ月齢マウスのプラーク試料の Colony-forming Units: CFU (嫌気培養) は、それぞれ平均で、 $(8.9 \pm 11.4) \times 10^5$ 、 $(1.7 \pm 3.2) \times 10^5$ および $(4.7 \pm 4.7) \times 10^3$ であった。一方、6 週齢および 9 ヶ月齢マウス糞便試料の CFU (嫌気培養) は、それぞれ平均で、 $(1.5 \pm 0.1) \times 10^8$ および $(2.8 \pm 1.5) \times 10^8$ であった。

3 週齢および 6 週齢マウス・プラークの優勢菌は、それぞれ *Enterococcus* 属 (53% および 31%)、*Escherichia* 属 (19% および 26%)、*Lactobacillus* 属 (17% および 21%)、*Lactococcus* 属 (17% および 20%)、*Lactococcus* 属 (8.5% および 8.3%) であった。その一方で、9 ヶ月齢マウス・プラークでは、*Lactobacillus* 属 (83%)、*Lactococcus* 属 (8.6%) が優勢菌として検出された。

これらの優勢菌について、糞便との比較・検討を行ったところ、*Lactobacillus* 属が 6 週齢マウスのプラークおよび糞便の両方から検出され、またこれに加えて、*Propionibacterium* 属および *Parabacteroides* 属が 9 ヶ月齢マウスのプラークおよび糞便の両方から検出された。

本研究の結果、3 週齢および 6 週齢という離乳前後のマウス・プラーク細菌叢の細菌構成、ならびに 9 ヶ月齢という成熟したマウス・プラーク細菌叢の細菌構成が、厳密な嫌気培養システムとシークエンス解析という分子生物学的手法を組み合わせることによって、初めて明らかとなった。

人間（ヒト）のプラーク細菌叢の解析は、活発に行われており、その中で信頼できる解析によれば、小児ならびに成人のプラーク細菌叢の構成は、どちらも、*Streptococcus* 属、*Actinomyces* 属、*Veillonella* 属が優勢菌であると報告されている（Milnes *et al.* 1993, Hoshino *et al.* 1989）。これは主に、ヒトとマウスでは食性（に加えて食事/食餌内容）が全く異なることから、プラーク細菌叢の細菌構成が大きく異なることが考えられた。

本研究によって、マウス口腔内のプラーク細菌叢を齲蝕発生モデルとして利用し、初期齲蝕発症前段階の歯垢バイオフィーム解析を行う際の基礎となる新たな知見が得られた。さらに、加齢が口腔内プラーク細菌叢に及ぼす影響やヒトとの差異についても留意すべき知見が得られた。

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 11 件)

1. Abiko Y, Sato T, Sakashita R, Tomida J, Kawamura Y, Takahashi N: Profiling subgingival microbiota of plaque biofilms in the elderly. *J Oral Biosci* **58(2)**: 62-65, 2016. (査読あり) doi:10.1016/j.job.2015.12.002

2. Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Mayanagi G, Washio J, Takahashi N: PCR-dipstick DNA chromatography for profiling of a subgroup of caries-associated bacterial species in plaque from healthy coronal surfaces and periodontal pockets. *Biomed Res* **37(1)**: 29-36, 2016. February (査読あり) https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biomedres/37/1/_contents

3. Tanda N, Hoshikawa Y, Ishida N, Sato T, Takahashi N, Hosokawa R, Koseki T: Oral malodorous gases and oral microbiota: From halitosis to carcinogenesis. *J Oral Biosci* **57(4)**: 175-178, 2015. November (査読あり) doi:10.1016/j.job.2015.05.004

4. Sato T, Tomida J, Naka T, Fujiwara N, Hasegawa A, Hoshikawa Y, Matsuyama J, Ishida N, Kondo T, Tanaka K, Takahashi N,

Kawamura Y:
Porphyromonas bronchialis sp. nov.,
isolated from intraoperative bronchial
fluids of a patient with non-small cell lung
cancer.
Tohoku J Exp Med **237(1)**: 31-37, 2015.
September (査読あり)
doi:10.1620/tjem.237.31

5. Sato T, Kenmotsu S, Nakakura-
Ohshima K, Takahashi N, Ohshima H:
Responses of infected dental pulp to αTCP
containing antimicrobials in rat molars.
Arch Histol Cytol **73(4+5)**: 165-175, 2015.
July (査読あり)
<http://doi.org/10.1679/aohc.73.165>

6. Ishida N, Sato T, Hoshikawa Y, Tanda N,
Sasaki K, Kondo T, Takahashi N:
Microbiota profiling of bronchial fluids of
patients with pulmonary carcinoma.
J Oral Biosci **57(2)**: 110-117, 2015.
May (査読あり)
doi:10.1016/j.job.2014.11.001

7. Kawamura Y, Kuwabara S, Kania SA,
Kato H, Hamagishi M, Fujiwara N, Sato T,
Tomida J, Tanaka K, Bemis DA:
Porphyromonas pogonae sp. nov., an
anaerobic but low concentration oxygen
adapted coccobacillus isolated from lizards
(*Pogona vitticeps*) or human clinical
specimens, and emended description of the
genus *Porphyromonas* Shah and Collins
1988.
Syst Appl Microbiol **38**: 104-109, 2015.
March (査読あり)
doi: 10.1016/j.syapm.2014.11.004

8. Matsuyama J, Kinoshita-Kawano S,
Hayashi-Sakai S, Mitomi T, Sano-Asahito
T:
Severe impaction of the primary
mandibular second molar accompanied by
the displacement of the permanent second
premolar.
Case Rep Dent 2015. (査読あり)
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/582462>

9. Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M,
Tanner ACR, Takahashi N:
Rapid and sensitive PCR-dipstick DNA
chromatography for multiplex analysis of
oral microbiota.
BioMed Res Int 2014. 10 pages. (査読あり)
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/180323>

10. Hasegawa A, Sato T, Hoshikawa Y,
Ishida N, Tanda N, Kawamura Y, Kondo T,
Takahashi N:

Detection and identification of oral
anaerobes from intraoperative bronchial
fluids of patients with pulmonary
carcinoma.
Microbiol Immunol **58(7)**: 375-381, 2014.
July (査読あり)
doi: 10.1111/1348-0421.12157

11. Matsuyama J, Tanaka R, Iizawa F,
Sano T, Kinoshita-Kawano S,
Hayashi-Sakai S, Mitomi T: Clinical and
radiographic findings and usefulness of
computed tomographic assessment in two
children with regional odontodysplasia.
Case Rep Dent 2014. (査読あり)
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/76439>

(学会発表) (計 19 件)

1. Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M,
Mayanagi G, Abiko Y, Washio J, Takahashi
N:
PCR-dipstick DNA chromatography for
multiplex and semi-quantitative analysis
of plaque biofilm microbiota.
Innovative Research for Biosis-Abiosis
Intelligent Interface Symposium:
The 6th International Symposium for
Interface Oral Health Science
18-19 January, 2016, Gonryo-Kaika
(Sendai, Miyagi), Program and Abstracts p.
61

2. 鷺尾純平, 小川珠生, 北村 淳, 森島浩允,
Tian Lingyang, 石黒和子, 真柳 弦, 安彦友
希, 佐藤拓一, 高橋信博:
メタボローム解析: 口腔疾患の発生機序解明
への新たなアプローチ
第 68 回東北大学歯学会 インターフェイス
口腔健康科学研究紹介
2015 年 12 月 11 日, 東北大学大学院歯学研
究科 (宮城県・仙台市): 招待講演

3. Tanda N, Ishida N, Takahashi N, Sato T,
Hoshikawa Y, Hosokawa R, Koseki T
Malodorous gases from saliva of
perioperative patients of lung resection.
The 63rd Annual Meeting of the Japanese
Association for Dental Research, Fukuoka
Convention Center (Fukuoka, Fukuoka),
31 October, 2015

4. 田中香お里, 佐藤拓一, 八巻恵子, 林 将
大, 河村好章:
嫌気性無芽胞グラム陽性桿菌 *Olsenella* spp.
の薬剤感受性
第 63 回日本化学療法学会西日本支部総会,
奈良春日野国際フォーラム(奈良県・奈良市)
2015 年 10 月 15-17 日

5. Sato T, Yamaki K, Kawamura Y, Tomida

- J, Tian L, Ishida N, Takeuchi Y, Hashimoto K, Abiko Y, Matsuyama J, Takahashi N. Profiling of microbiota from infected root canals with and without marginal leakage using anaerobic culture and molecular biological techniques (16S rRNA genes sequencing).
The 25th ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)
28 April, 2015, Copenhagen, Denmark
6. Tomida J, Morita Y, Sato T, Kawamura Y.
Antimicrobial susceptibility profiles of *Helicobacter cinaedi* strains isolated from patients in Japan.
The 25th ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)
25 April, 2015, Copenhagen, Denmark
7. 河村好章, 佐藤拓一, 富田純子, 森田雄二, 中 崇, 藤原永年, 田中香お里:
発育にビタミン K を要求する新しい *Porphyromonas* 属菌種の分類学的検討
第 88 回日本細菌学会総会, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)
2015 年 3 月 26-28 日
8. Yamaki K, Sato T, Ishida N, Tian L, Hashimoto K, Shimauchi H, Takahashi N:
Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals with/without marginal leakage.
The 93rd IADR General Session & Exhibition
13 March, 2015, Boston, USA
J Dent Res **94 Spec Iss A**: 3084, 2015
(www.dentalresearch.org).
9. Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N:
PCR-dipstick DNA chromatography for semi-quantitative analysis of oral microbiota.
The 93rd IADR General Session & Exhibition
13 March, 2015, Boston, USA
J Dent Res **94 Spec Iss A**: 2646, 2015
(www.dentalresearch.org).
10. Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N:
A novel method for oral microbiota analysis: PCR-dipstick DNA chromatography.
China-Japan-Korea Dental Science Symposium
8-9 November, 2014, Dalian, China.
11. Quispe-Salcedo A, Sato T, Matsuyama J, Ohshima H:
Response of infected dental pulp to capping with a mixture of three antibacterial drugs (3Mix) or calcium hydroxide cement in mouse molars.
第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014 年 9 月 27 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
12. Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G, Yamaki K, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N:
PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex analysis of oral microbiota.
第 56 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム, 2014 年 9 月 25 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
13. 三富智恵, 河野芳朗, 河野承子, 松山順子, 坂井幸子, 佐野富子:
アルキル化抗腫瘍薬によるラット歯根形成障害 - 根尖部における経日的変化 -
第 52 回日本小児歯科学会, きゅりあん (東京都・品川区), 2014 年 5 月 16-17 日,
14. 松山順子, 佐野富子, 坂井幸子, 三富智恵, 河野承子, 田中 礼:
Regional Odontodysplasia の臨床的ならびにエックス線学的所見
第 52 回日本小児歯科学会, きゅりあん (東京都・品川区), 2014 年 5 月 16-17 日
15. Kawamura Y, Kuwabara S, Kania SA, Kato H, Hamagishi M, Hayakawa S, Fujiwara N, Naka T, Sato T, Tomida J, Tanaka K, Yoshida Y, Morita Y, Bemis DA:
Porphyromonas pogonae sp. nov., a strong beta-hemolytic, low concentration oxygen tolerant species from lizards and human clinical specimens.
The 114th General Meeting of ASM, 20 May, 2014, Boston, USA.
16. Matsuyama J, Sato T, Quispe-Salcedo A, Mayanagi G, Takahashi N, Ohshima H:
Comprehensive analysis of indigenous plaque microbiota of pre- and post-weanling, and grown-up mice.
The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 21 January, 2014, Katahira-Sakura Hall (Sendai, Miyagi)
17. 松山順子, 佐藤拓一, Angela Quispe-Salcedo, 高橋信博, 大島勇人:
離乳前後および成熟マウスの口腔内プラーク常在菌叢の網羅的解析。
第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 22 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

18. Matsuyama J, Sato T, Ishimaru H, Muraoka K, Yamashita Y, Quispe-Salcedo A, Mayanagi G, Takahashi N, Ohshima H: Comprehensive analysis of indigenous plaque microbiota in mice. The 2nd IADR-APR(Asia Pacific Region): JADR Mini-Symposium, 21 August, 2013, Bangkok, Thailand.

19. Sato T, Kawamura Y, Ishida N, Yamaki K, Matsuyama J, Takahashi N: Molecular biological profiling of oral biofilm: Quantitative and qualitative analyses. The 2nd IADR-APR(Asia Pacific Region): JADR Mini-Symposium, 21 August, 2013, Bangkok, Thailand.

〔図書〕(計 2件)

1. Sato T, Kawamura Y, Yamaki K, Ishida N, Tian L, Takeuchi Y, Hashimoto K, Abiko Y, Mayanagi G, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N: Oral microbiota in crevices around dental implants: profiling of oral biofilm. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) Interface Oral Health Science 2014: Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface, Springer, Tokyo, pp. 45-50, 2015. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55192-8_4

2. Sakashita R, Takami M, Ono H, Nishihira T, Sato T, Hamada M: Preventing aspiration pneumonia for the elderly: a review focused on the impact of the consistency of food substances. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) Interface Oral Health Science 2014: Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface, Springer, Tokyo, pp. 335-351, 2015. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55192-8_29

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

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)

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

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

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

鷲尾 純平 (WASHIO Jumpei)
東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

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

大島 勇人 (OHSHIMA Hayato)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：70251824