

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462793

研究課題名(和文) 口腔バイオフィルムの初期形成機構の解明

研究課題名(英文) Resolution of Oral Biofilme Formation at Early Stage

研究代表者

中澤 太 (NAKAZAWA, Futoshi)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：60115053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔バイオフィルムはムシ歯や歯周病の原因であり、その初期形成過程にはストレプトコッカス属とベイロネラ属細菌が重要な役割を担うことから、両細菌属の関連と口腔内における分布と出現頻度を解明し、以下の成果を得た。1. ベイロネラの産生する物質がストレプトコッカス属のバイオフィルム形成を抑制した。2. ベイロネラの1菌種のドラフトゲノムを解明した。3. ベイロネラの新種を短時間で同定できる新しい方法を確立した。4. 唾液細菌叢のメタゲノム解析の結果、口腔清掃状態が良い場合はストレプトコッカスが、悪い場合はベイロネラが増加していた。5. 清掃状態の悪い口腔内には未知のベイロネラが多く生息していた。

研究成果の概要(英文)：Oral biofilm cause dental caries and periodontal disease. Streptococcus and Veillonella are known to have important roles in the biofilm formation at early stage. This study demonstrated the following results. 1. Auto inducer from *V. tobetsuensis* inhibited biofilm formation of *S. gordonii*. 2. Draft genome of *V. tobetsuensis* was revealed. 3. New method for identification of all veillonella species was established. 4. Based on metagenome analysis of saliva, it was demonstrated that Streptococcus species increased in good oral hygiene, but Veillonella species increased in poor oral hygiene. 5. Many unknown Veillonella species inhabited in oral cavities with poor oral hygiene.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：口腔バイオフィルム Veillonella Streptococcus メタゲノム解析 口腔清掃

1. 研究開始当初の背景

口腔感染症の予防には、口腔バイオフィルムの除去が有効である。しかし口腔バイオフィルム形成の詳細な機構が不明なため、現段階では物理的除去法以外に、口腔バイオフィルムを制御する方法はない。

2. 研究の目的

口腔バイオフィルムの初期形成機構を解明するために、口腔バイオフィルム初期定着菌であるストレプトコッカス属細菌とペイロネラ属細菌とのバイオフィルムを用い、1) バイオフィルム構成菌種の経時的变化を定量する。2) ペイロネラ属細菌におけるバイオフィルム形成遺伝子を探索する。3) オートインデューサー様分子を分離同定する。4) 菌体外多糖を分離精製し、その構造と機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) ワイヤー法を用い、ストレプトコッカス属の4菌種とペイロネラ トウベツエンシスの組合せ(対照としてペイロネラ属の他の5菌種の組合せを用いる)によって形成されるバイオフィルムおよび浮遊菌体について、その絶対量と菌種構成比を定量的リアルタイムPCRで解析する。

(2) 最大量のバイオフィルム形成したストレプトコッカス属菌種を用い、バイオフィルム形成菌体細胞と浮遊(バイオフィルム非形成)菌体細胞の遺伝子発現の差異を解析し、ペイロネラ属細菌においてバイオフィルム形成に關与する遺伝子を明らかにする。次いで、その欠損株を用いバイオフィルム形成を定性・定量的に解析する。

(3) ペイロネラ トウベツエンシスの培養上清から、オートインデューサー様分子を同定し、その遺伝子を明らかにする。次いで、その遺伝子欠損株を作成し、バイオフィルム形成に及ぼす役割を解明する。

(4) ペイロネラ トウベツエンシスが産生する菌体外多糖体を精製し、その化学構造を解析すると同時に、その多糖体がバイオフィルム形成に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 我々が開発したワイヤー法を用いて、口腔ストレプトコッカス属細菌(イニシャルコロナイザー)4菌種と口腔ペイロネラ属細菌(アーリーコロナイザー)6菌種の組合せ(合計24の組合せ)で、実験的バイオフィルムを形成させた。そして、各バイオフィルムとバイオフィルム非形成の浮遊菌を経時的に得て、それぞれ絶対量と菌種構成比を経時的に解析した。その結果、24の組合せによるバイオフィルム形成は4つのパターンに分類されることを明らかにした。また、ペイロネラ トウベツエンシスが共存した場合、ストレプトコッカス属のバイオフィルム形成が最も促進された。

(2) 歯周病病巣のバイオフィルムにおけるペオロネラ属菌種の出現頻度と分布: 歯周ポケットが4 mm以上とそれ以下の歯周病病巣のバイオフィルムを構成するペイロネラ属6菌種の検出頻度を解析した結果、ペイロネラパルブラが重篤な歯周病病巣から優位に高い頻度で検出されることを明らかにした。

(3) 歯科ユニットの水系パイプライン中のバイオフィルムに関する研究: 本学歯科病院で用いている歯科ユニットの水系パイプライン中のバイオフィルムの総菌数(CFU/ml)を測定し、そのバイオフィルム除去には、天然精油(ティーツリーオイル)やポセイドンシステムによって作成される電解水が極めて有効であることを明らかにした。

(4) 金属表面への口腔細菌のバイオフィルム形成は、ラクトフェリンのコーティングによって阻止された。

(5) ナタ豆からのアルコール抽出液には、バイオフィルム形成抑制効果があり、マウスを用いた歯周病誘発インビボ実験においても、口腔バイオフィルム量の減少のみならず、歯槽骨吸収の抑制が認められた。

(6) ペイロネラ トウベツエンシスが培地中に産生するオートインデューサー-2様の物質が、ストレプトコッカス属菌種によるバイオフィルム形成を抑制した。

(7) ペイロネラ トウベツエンシスのドラフトゲノムシーケンスを明らかにした。

(8) ハイビスカスの花卉からのアルコール抽出物が、複数の口腔細菌によるバイオフィルム形成を抑制した。

(9) タイ学童の口腔内診査を行いその清掃状態によって good, moderate, poor の3群に分類し、それぞれから舌垢と唾液を採取し、以下の研究成果を得た。

次世代シクエンサーを用いて全唾液の細菌叢のメタゲノム解析を行った結果、口腔清掃状態の悪化に伴って、ストレプトコッカス属細菌の割合が減少し、ペイロネラ属細菌が増加していた。

ペイロネラ 6 菌種を同定できる PCR プライマーを開発し、各唾液試料について、菌種レベルでの分布と出現頻度を解析した結果、口腔清掃状態の悪化に伴って、ペイロネラ パルブラが増加し、ペイロネラ ロゴサが減少していた。

舌垢試料についても同様の結果を得たことから、ペイロネラ パルブラを清掃状態のマーカーとして、口腔感染症の予防に応用できることが示唆された。

唾液および舌垢試料から、これまでに報告されていないペイロネラ菌種（未同定ペイロネラ菌株）が多数分離された。その割合は、口腔清掃状態に伴って増加していた。

(10) 上記の未同定ペイロネラ菌株について、*rpoB*, *dnaK*, 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行い、その遺伝学的特性を解析した結果、以下の研究成果を得た。

これらの未同定ペイロネラ菌株は、これまで報告されているペイロネラ属細菌種とは大きく異なる遺伝学的クラスターを形成すると同時に、著しい遺伝学的多様性を有することが明らかになった。

その中の1つについて、ペイロネラ チルドレンシスと命名し、新菌種として国際機関に登録する準備を進めている。

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 16 件) 全て査読有

1. Citra F. Theodorea, Izumi Mashima, Boonyanit Thaweboon, Sroisiri Thaweboon, Futoshi Nakazawa. Molecular detection of oral *Veillonella* species in the saliva of children with different oral hygiene statuses. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2017, 6(7).
<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas>

2. Koutaro Yamazaki, Izumi Mashima, Futoshi Nakazawa, Yasuhiro Nakanishi, Morio Ochi. Application of Dental Implants Coated with Titanium Nitride; The Experimental Study with *Porphyromonas gingivalis* Infection. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Volume 6 Number 1 (2017) pp. 130-142. DOI : <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.017>

3. Herastuti Sulistyani, Mari Fujita, Futoshi Nakazawa. Effect of roselle calyx extract on gingipain activity, production of inflammatory cytokines, and oral bacterial morphology. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. vol. 6, no. 3. P961-965, 2016/17

4. Ayumi Saeki, Toshihiko Suzuki, Akira Hasebe, Ryosuke Kamezaki, Mari Fujita, Futoshi Nakazawa, and Ken-ichiro Shibata. Activation of nucleotide-binding domain-like receptor containing protein 3 inflammasome in dendritic cells and macrophages by *Streptococcus sanguinis*. Cellular Microbiol. 2016 Sep 7. doi: 10.1111/cmi.12663.

5. Izumi Mashima, Citra Fragrantia Theodorea, Boonyanit Thaweboon, Sroisiri Thaweboon, Futoshi Nakazawa. Identification of *Veillonella* Species in the Tongue Biofilm by Using a Novel One-step Polymerase Chain Reaction Method. PLOS ONE, 11(6): e0157516. doi: 10.1371/journal.pone.0157516, 2016.

6. Sulistyani H, Fujita M, Miyakawa H, Nakazawa F. Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. Asian Pacific Journal of Topical Medicine; 9(2): 119-124, 2016.

7. Mashima I, Nakazawa F. Draft Genome Sequence of *Veillonella tobetsuensis* ATCC BAA-2400^T Isolated from Human Tongue Biofilm. Genome Announcements, 3(4): 1-2, 2015.

8. Izumi MASHIMA, Hiroshi MIYAKAWA, Futoshi NAKAZAWA. The role of AI-2 like substance from *Veillonella tobetsuensis*. Bacterial Adherence & Biofilm, 29:79-83, 2015.

9. Fujita M, Mashima I, Nakazawa F. Monitoring the decontamination efficacy of the novel Poseidon-S disinfectant system in dental unit water lines. J Microbiol Immunol Infect, 15: 1684. DOI:10.1016/j.jmii.2015.05.006.

10. Mashima I, Nakazawa F. The interaction between *Streptococcus* spp. and *Veillonella tobetsuensis* in oral biofilm formation at early stage, J Bacteriology, 197(13): 2104-2111, 2015.

11. Mashima I, Fujita M, Nakatsuka Y, Kado T, Furuichi Y, Sulistyani H, Nakazawa F. The Distribution and Frequency of *Veillonella* spp. associated with Chronic Periodontal Diseases, Int J Current Microbiol & Applied Sciences, 4(3): 150-160, 2015.

12. Mashima I, Oka Y, Aoki M, Nakazawa F. Application of tea tree oil for disinfection of dental unit waterlines, The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido, 33(1):1-8, 2014.

13. Mashima I, Nakazawa F. The influence of oral *Veillonella* species on biofilms formed by

Streptococcus species. *Anaerobe*, 28: 54-61, 2014.

14. Sato T, Nakazawa F. Coaggregation between *Prevotella oris* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Microbiol Immunol Infect*, 47(3): 182-186, 2014.

15. Futami Nagano-Takebe, Hiroshi Miyakawa, Futoshi Nakazawa, Kazuhiko Endo. Inhibition of initial bacterial adhesion on titanium surfaces by lactoferrin coating. *Biointer phases*. Vol. 9, No. 2, p029006-1 ~ p029006-7, June 2014. DOI: 10.1116/1.4867415

16. Izumi MASHIMA, Futoshi Nakazawa, The Beginning of Application of Quorum Quenching for Replacing Traditional Antibiotics, *The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido*, 33(2):13-16, 2014.

[学会発表](計 24 件)

1. Citra Fragrantia THEODOREA, Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. *RpoB* and *DnaK* Sequences of Unidentified *Veillonella* Isolates. Congress of International Association of Dental Research-South-East Asia Division. 2017.8.10-13. Taipei, Taiwan.

2. Citra F. THEODOREA, Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. Correlation of Oral *Veillonella* Species with Oral Hygiene Status. General Session of International Association of Dental Research. 2017.3.20-25. San Francisco, USA.

3. Izumi MASHIMA, Citra F. THEODOREA, Futoshi NAKAZAWA. Exploring the Microbial Community in Saliva from Children. General Session of International Association of Dental Research. 2017.3.20-25. San Francisco, USA.

4. Izumi Mashima, Citra F. Theodora, Futoshi Nakazawa. (タイ) 児童唾液中の細菌叢の探索. 日本細菌学会. 2017.3.19-21. 仙台市

5. Citra Fragrantia THEODOREA, Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. DNA sequence analysis of the novel *Veillonella* species isolated from saliva of Thai children. 日本細菌学会. 2017.3.19-21. 仙台市

6. 眞島いづみ, Citra Fragrantia THEODOREA, 中澤 太. 口腔 *Veillonella* 全 6 菌種同定 One Step PCR 法の開発. 日本細菌学会北海道支部会. 2016.9.17. 札幌市

7. Citra Fragrantia THEODOREA, Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. Distribution of Oral *Veillonella* species Associated with Oral Hygiene Status. 日本細菌学会北海道支部会. 2016.9.17. 札幌市

8. 眞島いづみ, シトラ セオドレア, 中澤 太. タイ児童舌苔から分離された *Veillonella* 属新菌種の塩基配列解析. 歯科基礎医学会 2016.8.24-26. 2016. 札幌市

9. Izumi Mashima, Citra Fragrantia Theodora, Hiroshi Miyakawa, Futoshi Nakazawa. The Strategy for Oral Biofilm -The Best Use of Oral *Veillonella*. 歯科基礎医学会 2016.8.24-26. 2016. 札幌市

10. Citra Fragrantia THEODOREA, Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. The Distribution and Frequency of Oral *Veillonella* species in Saliva from Thai Children Associated with Oral Hygiene Status. 歯科基礎医学会 2016.8.24-26. 2016. 札幌市

11. Izumi MASHIMA, Koutaro YAMAZAKI, Futoshi NAKAZAWA, Yasuhiro NAKANISHI, Morio OCHI. APPLICATION OF TITANIUM NITRIDE FOR DENTAL IMPLANTS: A RABBIT STUDY, Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration. 6.3-4, 2016. Bangkok. Thailand.

12. Citra Fragrantia THEODOREA, Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. Distribution and Frequency of Oral *Veillonella* species in Saliva from The Children in Thailand. 日本細菌学会. 3.23-25, 2016, 大阪市

13. Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. The effects of AI-2 from *Veillonella tobetsuensis* in oral biofilm formation at early stage. 日本細菌学会. 3.23-25, 2016, 大阪市

14. Citra Fragrantia THEODOREA, Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. Distribution and Frequency of Oral *Veillonella* species in Saliva among 8 to 15-Year-old Children in Thailand. 北海道医療大学歯学会. 2016. 3. 5. 札幌市

15. Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. The role of autoinducers from *Veillonella* in the formation of oral biofilms. ASM Conference on Bifilms October 24-29, 2015. Chicago, USA.

16. 眞島いづみ, 宮川博史, 中澤 太. 口腔バイオフィルム初期形成期における Cyclic dipeptide の影響. 歯科基礎医学会. 2015. 9.11-13. 新潟市

17. M.Fujita, K. Osada, H. Miyakawa, A. Kamaguchi, F. Nakazawa. *Streptococcus mutans* の既成バイオフィルムにおけるモノテルペンアルコールならびにセスキテルペンアルコールの浸透機構の評価. 歯科基礎医学会.

2015. 9.11-13. 新潟市

18. Sulistyani Herastuti, Fujita Mari, Miyakawa Hiroshi, Kamaguchi Arihide, Nakazawa Futoshi. Effect of Roselle calyx extract on biofilm formation, cytokine production and gingipain activity. 歯科基礎医学会. 2015. 9.11-13. 新潟市

19. 眞島いづみ, 宮川博史, 中澤太, Veillonella tobetsuensis 由来 Autoinducer-2 様物質の役割、日本バイオフィルム学会、2015. 7.10-11、愛知県蒲郡市

20. Izumi MASHIMA, Arihide KAMAGUCHI, Hiroshi MIYAKAWA, Mari FUJITA, Futoshi NAKAZAWA. Analysis of Quorum Sensing System by Early Colonizers in Oral Biofilm. 日本細菌学会. 2015. 3.26-28. 岐阜市

21. 眞島いづみ, 宮川博史, 鎌口有秀, 藤田真理, 中澤太. Veillonella tobetsuensis 由来 Autoinducer-1 の活性とその部分精製. 北海道医療大学歯学会 . 2015. 3. 7. 札幌市

22. Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. Production of autoinducers by Veillonella tobetsuensis associated with oral biofilm formation at early stage. JADR. 2014.12.4-5. Osaka, Japan

23. Izumi MASHIMA, Futoshi NAKAZAWA. Detection of Autoinducers from Veillonella tobetsuensis and Their Roles in Biofilm formation. Conference on Cell-cell Communication in Bacteria. 2014.10.18-21. San Antonio, USA.

24. Izumi MASHIMA, Arihide KAMAGUCHI, Hiroshi Miyakawa, Mari FUJITA, Futoshi NAKAZAWA. Detection and Purification of Autoinducers from Veillonella tobetsuensis. 歯科基礎医学会 2014.9.25-27 福岡市

〔図書〕(計 1 件)

1. 中澤太 他、学建書院、口腔微生物学 第 5 版、2015、p100-158.

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中澤 太 (NAKAZAWA Futoshi)
北海道医療大学・歯学部・微生物学分野・教授
研究者番号：60115053

(2)研究分担者

宮川 博史 (MIYAKAWA Hiroshi)
北海道医療大学・歯学部・微生物学分野・講師
研究者番号：30219729

藤田 真理 (FUJITA Mari)
北海道医療大学・歯学部・微生物学分野・助教
研究者番号：50405669

(3)連携研究者

眞島 いづみ (MASHIMA Izumi)
日本学術振興会特別研究員
研究者番号：60770782

(4)研究協力者

CITRA F. Theodora (シラ フ ヲ グ ラ テア)
北海道医療大学・大学院歯学研究科・大学院生

Boonyanit THAWEBEON
(ブ ニヤニット タハブーン)
Department of Oral Microbiology,
Faculty of Dentistry,
Mahidol University・講師

Sroisiri THAWEBEON (スロイシリ タハブーン)
Department of Oral Microbiology,
Faculty of Dentistry,
Mahidol University・教授