

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861845

研究課題名(和文) 全身疾患の発症に關与する齲蝕病原菌を早期にコントロールする新規シーラント材の開発

研究課題名(英文) Development of the sealant which controls pathogenic bacteria of dental caries associated with systemic disease

研究代表者

島津 貴咲 (Shimazu, Kisaki)

日本歯科大学・生命歯学部・非常勤講師

研究者番号：80582254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、S-PRG フィラーは各種齲蝕病原菌と感染性心内膜炎原因菌、およびカンジダ症病原真菌に対して増殖抑制能を有することを報告している。本研究では、S-PRG フィラーが口腔バイオフィーム形成に与える影響を検討した。その結果、S-PRG フィラーはバイオフィームの形成抑制効果と、付着抑制効果および共凝集抑制効果を有することが明らかとなった。そのため、小窩裂溝のう蝕予防に用いられるシーラント材にS-PRG フィラーを配合することにより、口腔バイオフィームの形成を抑制する可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus gordonii, a bacterium involved in the initial colonization of tooth surfaces, contributes to dental biofilm formation and is an important cause of infective endocarditis. This study aimed to investigate the influence of S-PRG filler on oral bacterial growth and aggregation of *S. gordonii*. The effect of various concentrations of S-PRG eluate on the growth and the biofilm formation of *S. gordonii* and other oral microorganisms was assessed. In addition, the effect of S-PRG eluate on coaggregation of *S. gordonii* with both *S. oralis* and *Fusobacterium nucleatum* was assessed. Our results indicate that S-PRG eluate treatment reduced both for the growth and for biofilm of all organisms in a dose-dependent manner. Coaggregation of *S. gordonii* was inhibited by S-PRG eluate. These results indicate that the S-PRG filler possesses antimicrobial activity that is mediated by inhibiting growth and biofilm of oral microorganisms, and by suppressing coaggregation of *S. gordonii*.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：バイオフィーム う蝕予防 シーラント 共凝集 自己凝集 S-PRG フィラー

1. 研究開始当初の背景

口腔バイオフィーム形成は、*Streptococcus gordonii* などの口腔レンサ球菌がペリクルを介して歯面に付着し定着することで開始する。また、単独ではバイオフィーム形成が不可能な歯周病菌 *Porphyromonas. gingivalis* は、*S. gordonii* と共凝集することにより成熟したバイオフィームを形成することが知られている。

本研究で焦点を当てた S-PRG (surface reaction-type pre-reacted glass-ionomer) フィラーは、歯科材料に配合することにより、口腔内に対して酸緩衝能を発揮し、フッ素、ストロンチウムなどの様々な元素の徐放能により、抗プラーク (バイオフィーム) 能を示すと考えられている。さらに、S-PRG フィラーは、フッ素を取り込む能力 (リチャージ能) と、取り込んだフッ素を徐放する能力 (リリース能) を有することが知られている。我々はこれまでに、S-PRG フィラー含有シーラントは、非侵襲的に歯面に接着しながらも、他のシーラントよりも高い接着力を示すことを明らかにした。また、本材料はフッ素塗布を行うことにより優れたフッ素リリース・リチャージ能を示すことを明らかにした。

2. 研究の目的

細菌の宿主への定着には数種のアドヘジンが重要な役割を果たしていると考えられており、*S. gordonii* の歯面への付着には、宿主のシアル酸を認識する Hsa アドヘジンが重要な役割を果たしていると考えられている。そこで本研究では、この Hsa アドヘジンのバイオフィーム形成における役割を調べた。

さらに、S-PRG フィラーが口腔バイオフィーム形成に与える影響を検討するため、S-PRG フィラーのイオン溶出液を応用し、口腔内細菌の共凝集と、自己凝集について評価した。

3. 研究の方法

(1) バイオフィーム形成における *Streptococcus gordonii* Hsa アドヘジンの関与

バイオフィームアッセイには96穴マイクロタイタープレートおよびLooら (2000) のバイオフィーム培地を用いた。未処理または底面を複合糖質およびヒト唾液でコートしたプレートに *S. gordonii* DL1株 (野生株) およびその *hsa* 変異株を植菌、37°Cにて培養しバイオフィームを形成させた。クリスタルバイオレットでバイオフィームを染色し、ImageJにて密度を計測した値をバイオフィーム形成能とした。さらに、DL1株を含む *S. gordonii* 野生株6株の唾液コートプレートにおけるバイオフィーム形成能を、サザンブロット法による *hsa* 遺伝子の検出およびウェスタンブロット法による Hsa タンパクの発現の結果と比較した。

(2) S-PRG フィラーが口腔バイオフィーム形成に与える影響

① S-PRG 溶出液の調製

S-PRG フィラーと蒸留水を1:1の割合で24時間混合した。続いて、遠心分離機でフィラーを沈殿させ、上澄み液を0.2 μ mのマイクロクロマトディスクで濾過し、得られた溶液をS-PRG 溶出液とした。なお、各試験溶液と混合後もpHの変動がないことを確認している (pH=7.7)。

② 口腔内細菌の培養

口腔バイオフィーム形成の初期に歯面ペリクルに付着するレンサ球菌として、*S. gordonii* DL1, SK6、*Streptococcus sanguinis* SK1、*Streptococcus oralis* 34を用いた。各レンサ球菌はBHI培地にて37°C、18時間、静置培養した。また、各レンサ球菌と共凝集が報告される歯周病原菌として、*P. gingivalis* ATCC33277を用いた。*P. gingivalis*は、ヘミンとメナジオンを添加したBHI培地にて37°C、48時間、嫌気性条件下で静置培養した。

③ 共凝集試験

培養した各菌を等張緩衝液で洗浄後、同緩衝液で0~50%に調製したS-PRG 溶出液に懸濁し (OD₆₂₀=1.0)、共凝集を観察した。

④ 自己凝集試験

S-PRG 溶出液を等張緩衝液で0~20%に調製し、培養・洗浄した *S. gordonii* を各S-PRG 溶出液と懸濁した (OD₆₂₀=1.0)。低速で遠心分離後、上澄み液の吸光度を測定して共凝集率を算出した (n=3)。

⑤ レンサ球菌の付着能の評価

細菌は、*S. gordonii* DL1、*S. mutans* MT8148、*S. oralis* 34を、培地はBiofilm medium (Looら)を用いた。同培地で0、5、25、50%に調製したS-PRG 溶出液を200 μ l ずつマイクロタイタープレートに分注し、培養した各菌をA_{620nm}=0.01となるように植菌した。その後、37°C嫌気下で一晩動的に培養し、クリスタルバイオレットにより染色、洗浄後、ソフトウェア (Image J version 1.48)を用いて細菌付着量を光学的に評価した。

各濃度のS-PRG 溶出液における細菌付着量の比較には *t* 検定を用いた (n=6)。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム形成における *Streptococcus gordonii* Hsa アドヘジンの関与

未処理のプレートでは、DL1株のバイオフィーム形成能と比較して *hsa* 変異株のそれは18時間の培養で有意に減少した。シアロ糖タンパク質であるフェチュイン、ムチンおよびシアロ糖タンパク質を含む唾液でコートしたプレートでのバイオフィーム形成能は、DL1株と比較して、*hsa* 変異株では有意に減少した。

一方シアル酸を含まないウシ血清アルブミンをコートしたプレートでのバイオフィーム形成能はDL1株と *hsa* 変異株間に有意差は認められなかった (Fig.1)。

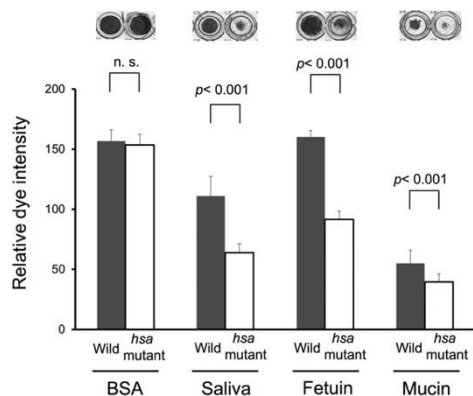


Fig.1 Comparison of the biofilm-forming ability of *S. gordonii* wild type strain DL1 to that of its *hsa* mutant EM230 on flat-bottomed microtiter plates coated with various proteins or human saliva.

調べたすべての *S. gordonii* 野生株で、*hsa* 遺伝子と相同性のある遺伝子領域の存在、および Hsa またはそれに類似するタンパクの発現が認められた (Fig.2)。

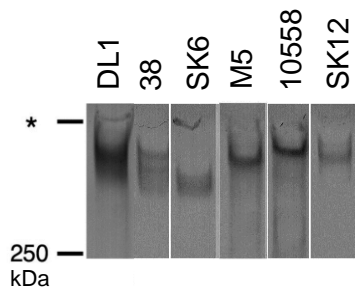


Fig.2 Expression of Hsa protein from various wild type strains.

シアル酸依存性のバイオフィーム形成能は株間で様々であったが、ヒト唾液ムチンMG2に結合すると報告されている野生株 (DL1, SK6, SK12) は、MG2非結合株 (10558, M5) に比べて、有意なシアル酸依存性のバイオフィーム形成能が確認された (Fig.3)。

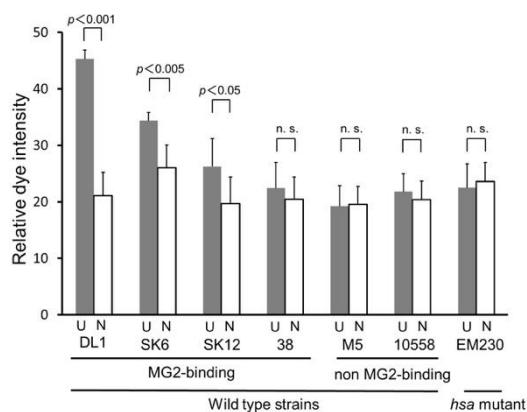


Fig.3 Biofilm-forming ability of *S. gordonii* wild type strain DL1, its *hsa* mutant EM230, and other wild type strains in flat-bottom plates that were pre-coated with saliva and untreated (U) or neuraminidase-treated (N).

以上より、*S. gordonii* のバイオフィーム形成には Hsa アドヘジンと宿主シアル酸含有複合糖質との結合が関連することが示唆された。

(2) S-PRG フィラーが口腔バイオフィーム形成に与える影響

① S-PRG 溶出液による共凝集抑制効果

P. gingivalis と各レンサ球菌において、S-PRG 溶出液の添加により共凝集が抑制されていた (Fig.4)。

	S-PRG			
	0%	5%	25%	50%
<i>S. gordonii</i> DL1	3+	2+	2+	—
<i>S. gordonii</i> SK6	4+	3+	3+	2+
<i>S. sanguinis</i> SK1	4+	4+	3+	3+
<i>S. oralis</i> 34	3+	2+	1+	—

Fig.4 S-PRG 溶出液による *P. gingivalis* と各レンサ球菌との共凝集抑制効果

② S-PRG 溶出液による *S. gordonii* の自己凝集効果

8%以下の S-PRG 溶出液では低い自己凝集率を示したが、その後濃度に依存して上昇し、18% S-PRG 溶出液では80%以上の自己凝集率が認められた (Fig.5)。

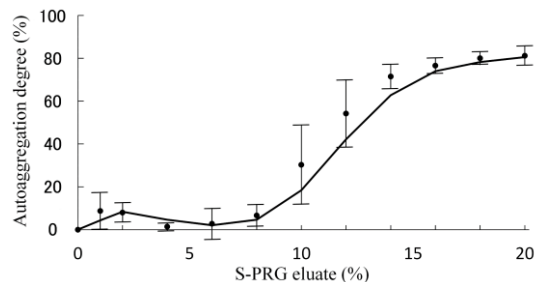


Fig.5 S-PRG 溶出液による *S. gordonii* の自己凝集効果 (n=3)

③ レンサ球菌の付着能の評価

S. gordonii, *S. mutans*, *S. oralis* において、S-PRG 溶出液の添加により細菌の付着能が抑制されていた (Fig.6)。

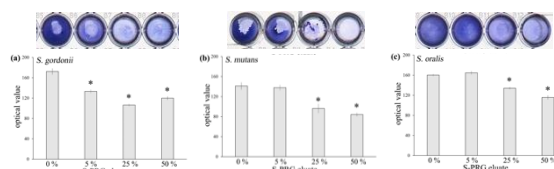


Fig.6 S-PRG 溶出液による細菌の付着抑制効果 (n=6). 写真は、クリスタルバイオレットで染色された付着細菌を示す (上段). *p < 0.001. それぞれコントロール (0% S-PRG 溶出液) と比較.

以上より、S-PRG フィラーは、口腔バイオフィームの形成阻害能力を有する可能性が示唆された。そのため、S-PRG フィラーを歯科材料や歯磨剤等に応用することにより、齲蝕や歯周病、口腔感染症、さらには口腔微生物が原

因となる全身疾患に対する予防効果が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5件)

- ① Oguchi R, Takahashi Y, Shimazu K, Urano-Tashiro Y, Kawarai T, Konishi K, Karibe H. Contribution of *Streptococcus gordonii* Hsa adhesin to biofilm formation. Jpn J Infect Dis. 査読有, 2016 Dec 22. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.492.
- ② Shimazu K, Oguchi R, Takahashi Y, Konishi K, Karibe H: Effects of surface reaction-type pre-reacted glass ionomer on oral biofilm formation of *Streptococcus gordonii*. Odontology. 査読有, 2016 Sep; 104(3), 310-317. doi: 10.1007/s10266-015-0217-2.
- ③ Karibe H, Shimazu K, Okamoto A, and others (6 in total): Prevalence and association of self-reported anxiety, pain, and oral parafunctional habits with temporomandibular disorders in Japanese children and adolescents: a cross-sectional survey. BMC Oral Health. 査読有, 2015 15: 8. doi: 10.1186/1472-6831-15-8.
- ④ Shimazu K, Karibe H, Ogata K: Effect of artificial saliva contamination on adhesion of dental restorative materials. Dent Mater J. 査読有, 2014; 33(4), 545-550. doi: 10.4012/dmj.2014-007.
- ⑤ Karibe H, Greg Goddard, Shimazu K and others (6 in total): Comparison of self-reported pain intensity, sleeping difficulty, and treatment outcomes of patients with myofascial temporomandibular disorders by age group: a prospective outcome study. BMC Musculoskelet Disord. 査読有, 2014; 15: 423. doi: 10.1186/1471-2474-15-423.

〔学会発表〕(計 7件)

- ① Oguchi R, Takahashi Y, Shimazu K, and others (7 in total), Role of *Streptococcus gordonii* Hsa adhesin in biofilm formation. International Association for Dental Research General Session and Exhibition, 2017年3月22-25日, Moscorn West, San Francisco, Calif., USA.
- ② Shimazu K, Karibe H, Yamada H, Ogata K. Comparison of microtensile strength and failure mode under saliva contamination in class V restorations, Proceedings of the International Dental Materials Congress 2016, 2016年11月4-6日, The Stone Hotel, Bari, Indonesia.
- ③ Shimazu K, Karibe H, Yamada H, Ogata K. Influence of saliva contamination on adhesion in class V restorations, 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 2016年5月26-28日, Tokyo Dome Hotel, Tokyo,

Japan.

- ④ Oguchi R, Takahashi Y, Shimazu K, and others (7 in total). Association of Hsa adhesin with biofilm formation of *Streptococcus gordonii*, 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 2016年5月26-28日, Tokyo Dome Hotel, Tokyo, Japan.
- ⑤ 小口莉代, 高橋幸裕, 島津貴咲, 他(計7名): バイオフィーム形成における *Streptococcus gordonii* Hsa アドヘジンの役割, 第29回日本バイオフィーム学会学術集会, 2015年7月10-11日, 愛知県, ホテル竹島.
- ⑥ 小口莉代, 高橋幸裕, 島津貴咲, 他(計7名): ポリスチレン表面へのバイオフィーム形成における *Streptococcus gordonii* Hsa の役割, 平成27年度日本歯科大学歯学会大会・総会, 2015年6月6日, 日本歯科大学新潟生命歯学部, 新潟.
- ⑦ 島津貴咲, 小口莉代, 高橋幸裕, 古西清司, 荻部洋行: マルチイオン徐放性ファイラーが口腔バイオフィーム形成に与える影響, 第53回日本小児歯科学会, 2015年5月21-22日, 広島, 広島国際会議場.

〔その他〕

日本歯科大学生命歯学部小児歯科学講座 ホームページ

<http://www.ndu.ac.jp/~pedo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島津 貴咲 (SHIMAZU Kisaki)

日本歯科大学・生命歯学部・非常勤講師

研究者番号: 80582254