

令和元年6月25日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11567

研究課題名(和文)ポリマイクロバイアルバイオフィームモデルを用いた根面齲蝕研究モデルの開発と応用

研究課題名(英文)Development and application of root caries model using polymicrobial biofilm

研究代表者

向井 義晴 (Mukai, Yoshiharu)

神奈川県立大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40247317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多種細菌から構成されるポリマイクロバイアルバイオフィームモデルを使用して培養期間や糖供給のタイミングによるpHならびに細菌叢の変化を観察し、口腔内環境に近似した活動性・非活動性齲蝕モデル開発の可能性を検討した。初期齲蝕誘発環境をシミュレートした本実験系においてスクロースの添加・非添加により齲蝕関連細菌と歯周病関連細菌の優位性が細かく変化することが確認された。また、本モデルを利用した根面齲蝕予防策の一環として、バイオフィーム細菌叢に与える多種イオン徐放性フィラー溶出液の効果も検討し、S-PRGフィラー溶出液が initial colonizerである菌属を効果的に抑制することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多菌種培養のバイオフィームモデルを使用して初期齲蝕誘発環境をシミュレートした実験系においてスクロースの添加・非添加により齲蝕関連細菌と歯周病関連細菌の優位性が細かく変化することが確認されたことから、今後は、本モデルの基質にエナメル質や象牙質を使用して実際の脱灰現象を再現し、齲蝕予防材料の効果や使用するタイミングの検討、ならびに効果的な再石灰化療法の開発を推進できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study using a biofilm model composed of various bacteria, changes in pH and bacterial flora with culture length and timing of sugar supply were investigated. Using a polymicrobial biofilm model that simulates the environment of the initial stages of caries, we confirmed that dominance of caries-related bacteria and periodontal disease-related bacteria changed due to the presence or absence of a sucrose supply. Because this result of bacterial flora of a biofilm model of the initial caries-inducing environment may lead to the development of materials and procedures for the prevention of dental caries, antimicrobial effects of multi-ion releasing filler eluate on polymicrobial biofilm grown from stimulated saliva were also investigated. As a results, ions in S-PRG eluate not only suppressed total viable bacteria in the biofilms but also initial colonizers of the biofilms.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：バイオフィーム 根面齲蝕 細菌叢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Exterkateらが開発したポリマイクロバイアルバイオフィームモデルは、形成されたバイオフィームはミュータンスレンサ球菌単一種により形成されたバイオフィームに比較して抗菌薬に対し強い耐性を示すことが示されている (Caries Res 2010; 44: 372-379)。また、ten Cate は、本モデルは従来のバイオフィームモデルに比較してより口腔内レベルに近似した固相への強固な付着を得ることが可能であるばかりでなく、多種多様な固相や抗菌薬を応用することが可能な画期的なバイオフィームの培養モデルであることを報告した。

根面象牙質齲蝕は、臨床的には明瞭な表層下脱灰病巣の形態はとらないが口腔内環境が改善されれば表層は再石灰化するが内部では脱灰が進行すると報告されている (Nyvad *et al.*, 1989)。細管内に侵入した歯質破壊の重要な担い手というよりは病変の進行範囲を示す指標として捉えることが適切であるとの報告もある (Thylstrup & Qvist, 1982)。このように象牙質内に侵入した細菌の再発齲蝕への関与、あるいはこれらが再石灰化にどの程度影響をするのかは明らかではなく、様々な齲蝕状態をシミュレートしたバイオフィームの実験系が必要であると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の4つに大別される。

(1) 非活動性根面齲蝕をシミュレートしたポリマイクロバイアルバイオフィームモデルの開発

形成されたポリマイクロバイアルバイオフィームに対し、スクロース添加・非添加の期間を設定することによりバイオフィーム中の細菌が酸産生能低下の非活動性状態になるかを生菌数および乳酸産生量を測定することにより検討する。次いで、歯根象牙質基質上で同様にバイオフィームの形成を行うことにより表層下脱灰病巣を作製した後、スクロース非添加の期間を設定し、その期間における表層下脱灰病巣の進行停止状態を Transverse microradiography (TMR) を用いて検討する。

(2) 根面齲蝕の再発齲蝕をシミュレートしたポリマイクロバイアルバイオフィームモデルの開発

スクロース非添加の期間が経過した後もバイオフィーム中の細菌が死滅することなく休眠状態になっていることを確認するため、ガラス円板上に形成されたバイオフィームに対し再度スクロース添加の培養液を用いることにより細菌の酸産生能がどの程度回復するかを生菌数ならびに乳酸産生量を測定することにより検討する。また、表層下脱灰病巣内部の変化を TMR により検討する。

(3) 根面齲蝕の再石灰化をシミュレートしたポリマイクロバイアルバイオフィームモデルの開発

非活動性根面齲蝕をシミュレートしたモデルが作製できることを確認した後、歯根象牙質表面に形成されたプラークを除去、培養液中にフッ化物イオン、カルシウムイオン、リン酸イオンを様々な割合・濃度で添加することにより細管内に侵入した細菌を非活性の状態に維持した状態における再石灰化の進行様相を TMR にて検討する。

(4) 再石灰化バイオフィームモデルを利用した効果的な再石灰化促進療法の検討

ポリマイクロバイアルバイオフィームモデルを使用した研究において、多種イオン徐放性フィルターである S-PRG フィラー溶出液には効果的な抗菌効果が示されていることから (日歯保存誌 57、414-420、2014)、本モデル下における溶出液の再石灰化促進効果を検討する。

3. 研究の方法

期間中実際に行った研究は以下の3つに大別される。当初の目的に加えポリマイクロバイアルバイオフィームモデルを利用した根面齲蝕予防策の一環として、バイオフィーム細菌叢に与える多種イオン徐放性フィルター溶出液の効果も検討した。

(1) S-PRG フィラー溶出液処理を行った唾液由来バイオフィーム菌叢の群集構造解析およびリアルタイム定量 PCR 法による解析

一被験者から採取した刺激唾液を用い、3種の McBain 2005 培地中で直径 12 mm のガラス試片を 24 時間嫌気培養しバイオフィームを形成した。各実験群は buffered McBain 2005 培養液 (cont: 0.2%スクロース、50 mM PIPES 含有、pH 7.0)、NaF 含有 buffered McBain 2005 培養液 (NaF)、S-PRG 溶出液含有 buffered McBain 2005 培養液 (S-PRG) とし、24 および 34 時間で試験培養液に交換し 48 時間まで嫌気培養を行なった。培養終了後、次世代シーケンサー (MiSeqTM, Illumina, USA) を用いて各バイオフィームサンプル由来の 16S rDNA からシーケンスデータを得て部分塩基配列を決定し、次世代シーケンス・アンプリコン解析を行った。サンプル間の比較解析は、Metagenome@KIN software (World Fusion) を用い、主成分分析およびクラスター解析 (クラスターリング手法: 群平均法, 距離関数: ピアソンの相関係数) により行った。また、Rotor-Gene Q (Qiagen) を用いたリアルタイム定量 PCR 法 (インターカレーター法) により、形成されたポリマイクロバイアルバイオフィーム中の、*Streptococcus* 属、*Actinomyces* 属、*Veillonella* 属の遺伝子コピー数を推定し、各群のデータを比較、検討した。

(2) ポリマイクロバイアルバイオフィームを用いた活動性および非活動性根面齲蝕モデルの開発

刺激唾液を McBain 培養液 (0.2% スクロース、50 mM PIPES 含有、pH 7.0) に混入して 10 時間嫌気培養後、10 時間および 14 時間ごとに培養液を交換し、96 時間あるいは 192 時間まで嫌気培養を行い、ガラス試片上にバイオフィルムを形成した。実験群は 96 時間培養スクロース含有群 (A 群)、98 時間培養スクロース含有 + 96 時間培養スクロース含有群 (B 群)、98 時間培養スクロース含有 + 96 時間培養スクロース非含有群 (C 群) とした。培養液の交換時に使用済み培養液の pH を測定した。培養終了後、各サンプル由来の 16S rDNA からシーケンスデータを得て、部分塩基配列を決定し、次世代シーケンス・アンプリコン解析を行った。またサンプルを段階希釈後、血液寒天培地に塗抹、4 日間嫌気培養後、生菌数を算定した。

(3) 初期齲蝕誘発環境をシミュレートしたバイオフィルム細菌叢の網羅的観察

バイオフィルム形成は Exterkate らの方法に従い、成人刺激時唾液を用いてガラス円板上に行なった。刺激唾液を unbuffered McBain (0.2% スクロース含有) 培養液に加えて嫌気条件下で 10 時間培養し、唾液非含有培養液を用いて 96 時間まで嫌気培養を行った (cont 群)。試験培養液としてスクロース含有培養液 (A 群) および非含有培養液 (B 群) を用いて 192 時間まで嫌気培養を行った。A 群のバイオフィルムは A 群とは別にスクロース含有培養液で 288 時間まで嫌気培養を行った (C 群)。B 群のバイオフィルムはスクロース含有培養液 (D 群) とスクロース非含有培養液 (E 群) を用いて 288 時間まで嫌気培養した。各試料の全細菌数を realtime-PCR 法により分析し、各サンプル由来の 16S rDNA から次世代シーケンサーを用いて、バイオフィルム構造の比較、検討を行なった。

4. 研究成果

(1) S-PRG フィラー溶出液処理を行った唾液由来バイオフィルム菌叢の群集構造解析およびリアルタイム定量 PCR 法による解析

次世代シーケンス・アンプリコン解析の結果、S-PRG フィラー溶出液群、NaF 溶液群、非処理群は異なる菌叢を示した。S-PRG 群では *Streptococcus* 属の *Streptococcus salivarius* が増加し、*Veillonella* 属の *Veillonella dispar* が減少した (Fig.1)。*Streptococcus salivarius* の病原性に関する報告は稀であるだけでなく、*salivarius* が抗菌物質であるイノシンを産生し上気道炎感染の予防に役立っているという報告がある。また、*Veillonella* 属のいくつかの菌種はバイオフィルムの形成に深く関わっていることが報告されていることから、S-PRG フィラー溶出液群では菌叢の健全度が増したとも考察できる。リアルタイム定量 PCR 法により分析を行った結果、全細菌コピー数は S-PRG 群が他群に比べて抑制されており、Cont 群と NaF 群は同等であった。また、*Streptococcus* 属 および *Actinomyces* 属についても、S-PRG 群が他群に比べて強い抑制を示し、特に *Veillonella* 属に対する抑制が顕著であった (Fig.2)。今回の実験により、S-PRG フィラー溶出液は、ポリマイクロバイアルバイオフィルム全菌種、ならびにバイオフィルム中に存在する *Streptococcus* 属、*Actinomyces* 属、特に *Veillonella* 属に対して抑制効果を有することが示された。S-PRG フィラー溶出液は、溶出液中に含まれるフッ化物単体よりも高い抗菌性を示したことから、S-PRG フィラーから徐放されるフッ化物以外のイオンの特定菌種に対する抗菌効果が確認された。

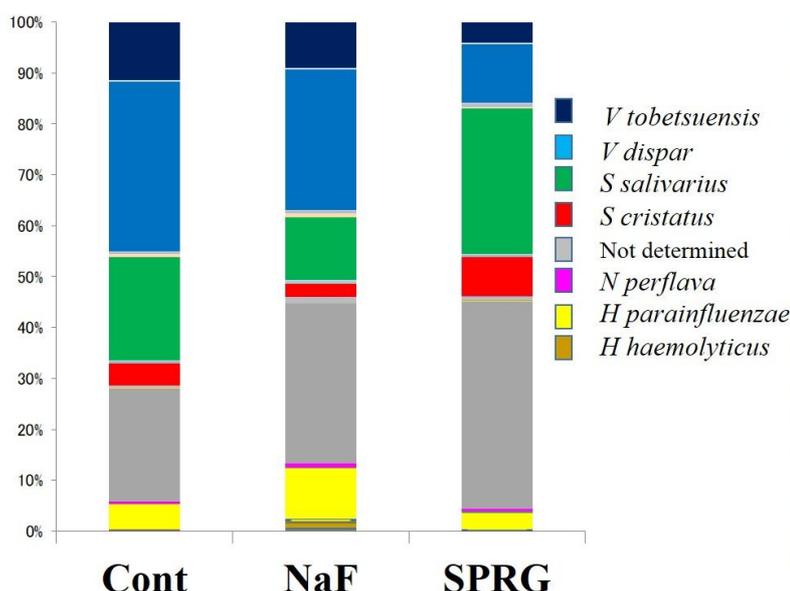


Fig 1. Diversity of bacterial species in PM biofilms grown in each medium
Total read of *Veillonella dispar*, *V tobetsuensis* and *H parainfluenzae* were suppressed and *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus cristatus* were increased in SPRG group. Further, *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus cristatus* were suppressed.

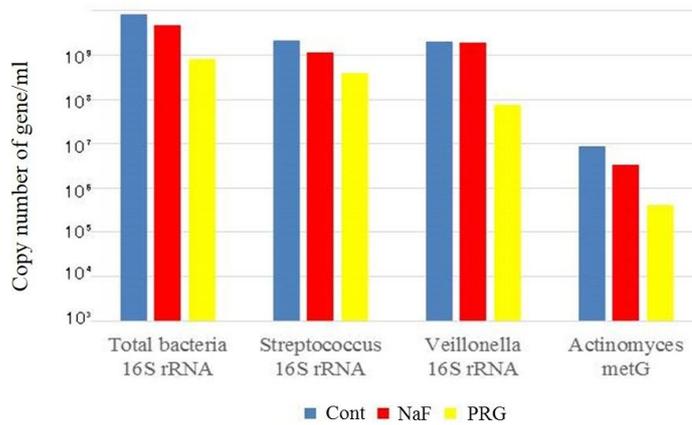


Fig. 2 : Copy numbers of gene amounts of each bacterial species in PM biofilms grown in different medium

(2) ポリマイクロバイアルバイオフィームを用いた活動性および非活動性根面齲蝕モデルの開発

48 時間培養を行ったのち、さらにスクロース含有、あるいは非含有培地でそれぞれ 48 時間培養を行った後の生菌数は、B 群が 1.42×10^8 、A 群は 1.77×10^7 であり、両群間に顕著な差を認めた (Fig.1)。また、両群の細菌叢間には大きな違いが認められた。A 群では、菌叢のほとんどが *Streptococcus* 属で構成され、B 群では *Streptococcus* 属のほか *Veillonella* 属の割合が上昇した (Fig.2)。また A 群の使用済み培養液の pH は 4.6 ~ 4.1 で推移し、B 群の pH は 6.4 ~ 6.8 で推移した (Fig.3)。A 群と B 群は顕著に異なる使用済み培養液の pH および培養終了後の生菌数を示し、その結果はバイオフィームの細菌構造の違いに反映されていた。ポリマイクロバイアルバイオフィームモデルを用いて、スクロースの有無により異なる細菌叢のバイオフィームを形成することができた。また糖代謝の条件を変えることにより *in vitro* で齲蝕活動性を反映するバイオフィームを形成できることが示された。

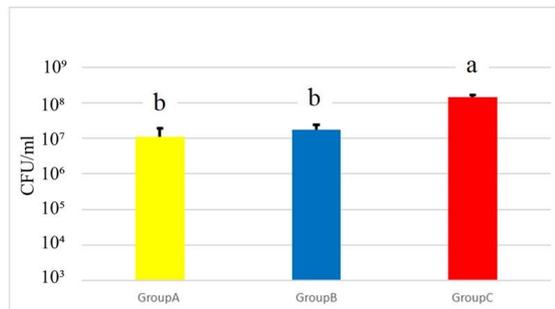


Fig. 1. Viable cells in PM biofilms grown in each of mediums (n=6).

There are no significant differences of CFU among same letter.

There are significant differences of CFU between group C and other groups ($p < 0.05$).

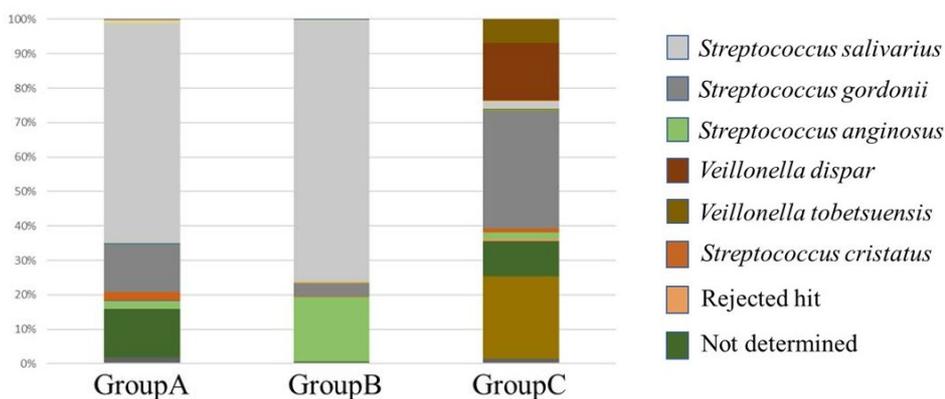


Fig. 2. Next-generation sequencing amplicon analysis of PM biofilms grown in each medium. There were remarkable differences of bacterial diversity in PM biofilms between group C and other groups. In group B, *S. anginosus* increased comparing other groups and *S. gordonii* decreased comparing other groups.

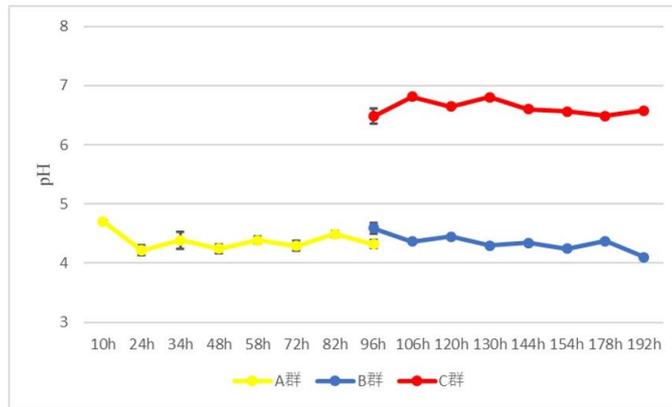


Fig. 3. pH of spent mediums (n=6).
There were remarkable differences of pH between group C and other groups.

(3) 初期齲蝕誘発環境をシミュレートしたバイオフィーム細菌叢の網羅的観察

全細菌数はC, D および A 群は他群に比較して高く、E 群は顕著に低かった (Fig.4)。 *S. mutans* は cont 群のみで認められ (2.42×10^4)、その他の群では検出限界以下であった。 *Veillonella* 属は B 群 (2.18×10^4) および D 群 (2.18×10^9) のみに認められ、D 群で顕著に高かった。各群の細菌叢を解析した結果、cont 群、A 群および C 群において、菌叢の 90% 以上を *S. salivarius* が占めた。B 群では *Granulicatella* 属、D 群では *Veillonella* 属の割合が顕著に増加し、その他の群では *Streptococcus* 属が主に菌叢を構成していた。スクロースの供給がある場合と無い場合とでバイオフィームの菌叢に大きな違いが認められた (Fig.5)。今回の実験結果から、スクロース供給や培養期間などの条件の違いによりバイオフィーム菌叢に変化が認められ、*S. mutans* や *Veillonella* 属の割合は、スクロースの供給条件や培養期間の違いに左右されていることが確認できた。今後、菌が産生する代謝物や pH との関連性を検討することにより、実際の口腔内における活動性あるいは非活動性の根面象牙質齲蝕との比較を行ない、根面象牙質齲蝕モデルとしての必要条件の設定を行うことができると考えられる。

なお、本結果は American Journal of Dentistry に投稿中である。

Fig.4. Analysis of total bacteria (Q-PCR)

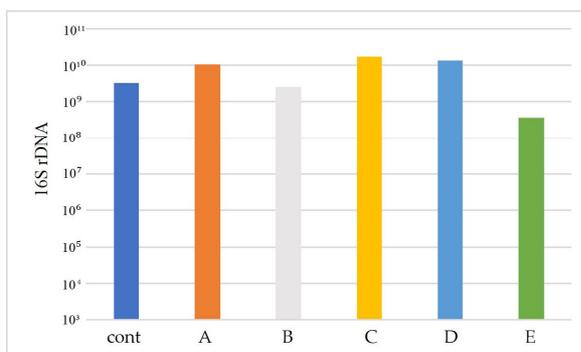
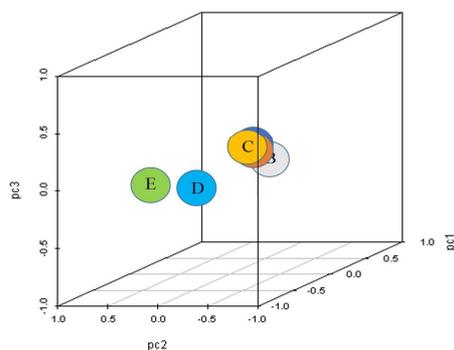


Fig.5. Principal component analysis



No.	medium	bacterial growth period (h)	code
1	+	96h	cont群
2	++	96h+96h	A群
3	+ -	96h+96h	B群
4	+++	96h+96h+96h	C群
5	+ - +	96h+96h+96h	D群
6	+ - -	96h+96h+96h	E群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

石澤将人、富山 潔、長谷川晴彦、浜田信城、向井義晴、S-PRG フィラー溶出液がポリマイクロバイアルバイオフィルムの細菌叢に与える影響、日本歯科保存学雑誌、査読有、61巻6号、2018、354-360

DOI: 10.11471/shikahozon.61.354

〔学会発表〕(計7件)

石澤将人、富山 潔、長谷川晴彦、浜田信城、向井義晴、初期齲蝕誘発環境をシミュレートしたバイオフィルム細菌叢の網羅的観察、神奈川歯科大学学会第53回総会、2018年

石澤将人、富山 潔、長谷川晴彦、浜田信城、向井義晴、ポリマイクロバイアルバイオフィルムの細菌叢に及ぼすスクロースの影響、第148回日本歯科保存学会2018年度春季学術大会、2018年

石澤将人、富山 潔、長谷川晴彦、浜田信城、向井義晴、ポリマイクロバイアルバイオフィルムを用いた活動性および非活動性根面齲蝕モデルの開発、神奈川歯科大学学会第52回総会、2017年

石澤将人、富山 潔、長谷川晴彦、浜田信城、向井義晴、ポリマイクロバイアルバイオフィルムを用いた根面齲蝕モデルの開発、第146回日本歯科保存学会2017年度春季学術大会、2017年

石澤将人、富山 潔、長谷川晴彦、浜田信城、向井義晴、S-PRG 溶出液処理を行った唾液由来バイオフィルム菌叢の群集構造解析、神奈川歯科大学学会第51回総会、2016年

石澤将人、富山 潔、長谷川晴彦、浜田信城、向井義晴、S-PRG フィラー溶出液がポリマイクロバイアルバイオフィルムの群集構造に与える影響 - 次世代シーケンスによるバイオフィルム菌叢の網羅的解析 - 、第145回日本歯科保存学会2016年度秋季学術大会、2016年

石澤将人、富山 潔、長谷川晴彦、浜田信城、向井義晴、S-PRG フィラー溶出液がポリマイクロバイアルバイオフィルムの群集構造に与える影響 - リアルタイム定量 PCR 法による解析 - 、第144回日本歯科保存学会2016年度春季学術大会、2016年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：浜田 信城

ローマ字氏名：HAMADA, nobushiro

所属研究機関名：神奈川歯科大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：20247315

研究分担者氏名：富山 潔

ローマ字氏名：TOMIYAMA, kiyoshi

所属研究機関名：神奈川歯科大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：90237131

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石澤 将人

ローマ字氏名：ISHIZAWA, Masato

研究協力者氏名：長谷川 晴彦

ローマ字氏名：HASEGAWA, haruhiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。