

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11113

研究課題名(和文)細菌の非活動化因子による新規根面う蝕治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel root caries treatment by bacterial inactivation factor

研究代表者

大原 直子(OHARA, Naoko)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：80301365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、根面う蝕の進行を抑制する治療法を開発することを目的とし、in vitroの系での根面う蝕誘発モデルの作製・構築を行った。根面う蝕誘発モデルを用い、う蝕原性細菌の菌種や培養条件によるう蝕病変進行や細菌動態の相違について検討した。また*A. naeslundii*、*A. viscosus*、*A. israelii*に着目し、バイオフィルム形成能および酸産生能について検討した。その結果、3種の菌が関わる根面う蝕の病態の違いと根面う蝕進行メカニズムに関する重要なデータを得た。

研究成果の概要(英文)：In this study an in vitro root caries induction model system was constructed to develop a new treatment for inhibition of progression of root caries. Using this model system, we investigated the influence on root caries progression bacteria dynamics of the carious lesion by strains and the culture conditions of cariogenic bacteria. The results showed that three *Actinomyces* species, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, and *A. israelii*, possessed different characteristics on the pathology and the mechanisms of root caries progression.

研究分野：歯科保存学

キーワード：根面う蝕 う蝕誘発モデル う蝕細菌

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎え、残存・機能する歯の根面う蝕の増大が危惧されている。患者の唾液分泌量の減少や身体機能の衰えによるプラークコントロールの悪化など予防管理に苦慮する例も多く、根面う蝕の病態解明および治療法の確立は急務である。これまでに歯冠部（エナメル質）う蝕について多くの研究結果が蓄積されてきたが、根面う蝕に関して十分にはなされていない。

本研究では、根面う蝕誘発モデルを用いて歯根の象牙細管内に侵入増殖した細菌の種類や培養環境の相違による細菌の遺伝子発現プロファイルを解析する。得られた候補の中からう蝕細菌の非活動化因子を選択し、病変部の細菌に対し分子生物学的アプローチによるう蝕治療法を模索する。

2. 研究の目的

本研究は、*in vitro* の系での根面う蝕誘発モデルの作製および構築を行い菌種や培養条件によるう蝕病変進行や細菌の動態の違いを観察するとともに、細菌の遺伝子発現を解析しう蝕の非活動化に結びつく因子を用いた根面う蝕の進行抑制法を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

1) 根面象牙質へ細菌の感染実験（人工根面う蝕の誘発）

根面象牙質への細菌感染実験には、根面う蝕原性細菌として、*Actinomyces viscosus*、*A. naeslundii*、*Streptococcus mutans*、*S. sanguis*、*S. sobrinus* を行いた。被験歯としては、ヒト抜去歯の解剖学的歯頸部に近い歯根象牙質部の平坦面を露出し、中央部（3mm × 3mm）を除いた全ての歯面をネイルバーニッシュでコーティング後、24時間ガス滅菌を行った。感染実験では、調整した菌液に被験歯を浸漬し、37℃嫌気条件で反応させて根面う蝕を誘発した。必要に応じて、タイプ IV

コラゲナーゼやスクロースを添加した。そして感染菌の象牙細管内への侵入深度、培地の pH の変化や歯質の着色状態や硬さの変化から根面う蝕の進行について解析した。

2) う蝕原性細菌のバイオフィーム形成能および酸産生能

バイオフィーム形成能を検討するため、*A. naeslundii*、*A. viscosus*、*A. israelii* に着目し、フィブロネクチンあるいはポリ-D-リジン（PDL）でコートされた面で培養し菌の接着および増殖を比較した。また、酸産生能に対する検討として、培地中に5%グルコースを添加し、培養液あるいは上記のコート面に形成されたバイオフィーム表面での pH を測定した。

3) 根面う蝕誘発モデルでの *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104、*A. viscosus* ATCC 15987、*A. israelii* ATCC 12102 の細菌動態の相違について

人工根面う蝕誘発モデルにて、歯根表面に形成されたバイオフィームを観察するとともに、経時的にバイオフィーム表面の pH および培養液の pH を測定し比較検討した。また人工根面う蝕モデルで得られた試料を、ホルマリン固定・脱灰後、パラフィン包埋を行い、露出根面に対して垂直に組織切片を作製した。その後、染色を施し、象牙質への細菌侵入を観察、評価した。

4. 研究成果

1) 根面象牙質へ細菌感染（人工根面う蝕の誘発）

細菌種によってバイオフィームの形成と象牙細管への侵入、酸産生能等への影響は異なり、その特性が相乗作用として重なった場合にう蝕の進行が実現することが明らかとなった。また、根面う蝕の進行には歯根象牙質と細菌との関係のみならず歯根の形態学的特徴が大きく関与していることが明らかとなった。

2) バイオフィーム形成能および酸産生能について

フィブロネクチンあるいはポリ-D-リジン (PDL) でコートされた面で培養し菌の接着および増殖を比較したところ、すべての菌で非コート面と比較して菌の接着性向上が認められた。フィブロネクチンとポリ-D-リジン (PDL) の比較では、フィブロネクチンのコート面の方が菌の接着が強く認められた。菌種の比較では、どちらのコート面に対しても *A. israelii* の接着が最も低かった。フィブロネクチンのコート面では、菌の付着能は *A. naeslundii* が高く、*A. viscosus*、*A. israelii* の順であった。

酸産生能としては、いずれの菌においても培養液およびバイオフィーム表面の pH の低下を認めたが、*A. israelii* で低下が顕著であった。グルコースの添加の有無の比較では、*A. viscosus* のフィブロネクチン上のバイオフィーム表面の pH 低下が著明であった。また、グルコース非添加の培地では、*A. naeslundii*、*A. viscosus* は菌塊としてコート面に付着する傾向が認められたが、グルコース添加培地では、菌塊としてではなく菌が薄膜状で付着したことから、培養液中の糖の存在は菌の付着能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

3) 根面う蝕誘発モデルでの *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104、*A. viscosus* ATCC 15987、*A. israelii* ATCC 12102 の細菌動態の相違について

根面う蝕誘発モデルでは、歯面の *A. naeslundii* のバイオフィームの pH が培養液と比べて低いことが明らかとなった。*A. naeslundii* の象牙細管内への侵入が顕著だったことと合わせると、歯質に侵入した *A. naeslundii* はう蝕病変ではコントロールしにくい存在となり、病原性を発揮する可能性が推察された。

一方、*A. israelii* の酸産生能は強くバイ

オフィームの pH も低下していた。根面う蝕モデル作製実験において *A. israelii* は歯面付着能が低いにもかかわらず歯面に最も顕著な凹みを形成している事象と、一致する結果であり、菌が産生する酸による脱灰あるいは有機成分の分解力は他の菌と比較して強力であることが明らかとなった。

以上、根面う蝕に強く関わっているとされる菌種とう蝕進行メカニズムとの関連性について明らかにした。

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 6 件)

澁谷和彦, 松崎久美子, 大原直子, 島田康史, 吉山昌宏、口腔乾燥症モデル作製のための基礎的研究 吸水および乾燥による充填用材料の質量変化、147 回日本歯科保存学会秋季学術大会 2017 年 10 月 26-27 日、マリオス盛岡地域交流センター (岩手県盛岡市)

山路公造, 横山章人, 松崎久美子, 大原直子, 島田康史, 神農泰生, 高橋圭, 田畑泰彦, 吉山昌宏、直接覆髄に BMP 配合アルギン酸ゲルを用いた場合の硬組織反応、第 15 回日本再生歯科医学会総会・学術大会、2017 年 10 月 21 日、大阪歯科大学創立百周年記念館 (大阪市)

小野瀬里奈, 大原直子, 松崎久美子, 澁谷和彦, 横山章人, 高橋圭, 神農泰生, 山路公造, 島田康史, 吉山昌宏、充填用コンポジットレジンを経時的色調変化、第 38 回岡山歯学会学術集会、2017 年 10 月 1 日、岡山大学歯学部 (岡山市)

大原直子, 小野瀬里奈, 松崎久美子, 澁

谷和彦, 横山章人, 神農泰生, 山路公造, 吉山昌宏、充填用コンポジットレジンの色調に関する検討、第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会、2017 年 06 月 08 日、リンクステーションホール青森 (青森市)

神農泰生, 大原直子, 松崎久美子, 高橋圭, 山路公造, 吉山昌宏、咬耗面積・接触面積・咬合接触点による咬耗症例の解析、第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2016 年 10 月 27 日、キッセイ文化ホール (長野県松本市)

大原直子, 田中久美子, 澁谷和彦, 横山章人, 竹内晶子, 山路公造, 西谷佳浩, 吉山昌宏、セルフアドヒーシブセメント中の MDP 濃度が接着強さに及ぼす影響、第 143 回日本歯科保存学会学術大会、2015 年 11 月 12 日、文京シビックホール (東京都文京区)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

大原直子 (OHARA, Naoko)
岡山大学 大学病院・講師
研究者番号：80301365

(2) 研究分担者

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

大原直也 (OHARA, Naoya)
岡山大学 医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70223930

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し