

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09953

研究課題名（和文）口腔バイオフィーム細菌叢の機能に着目した根面う蝕の早期検出および制御法の開発

研究課題名（英文）Development of control method for root caries focusing on the functions of oral biofilm microbiota

研究代表者

朝日 陽子（Asahi, Yoko）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50456943

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）：根面う蝕病変よりバイオフィームを採取し、根面う蝕に関連するバイオフィーム細菌の機能について検討を行った。その結果、健全な露出根面に形成されたバイオフィームとは異なる機能を有する可能性が示された。一方、亜鉛ガラス含有ガラスイオノマーセメントがバイオフィームに及ぼす影響を検討した結果、*Actinomyces naeslundii*の生菌数およびバイオフィームの厚みがコントロール群と比較し減少すること、また遺伝子の発現が変化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

高齢者の保有歯数が増加し、加齢や歯周病による歯肉退縮に伴う根面う蝕の急増が歯科において深刻な問題となっており、根面う蝕に対する効果的な予防・制御法が切望されている。本研究により、根面う蝕病変部によりバイオフィーム細菌叢の機能が変化することが示された。得られた結果は、根面う蝕の病態解明や新たな抑制法の開発の一助となりうる。

研究成果の概要（英文）：Biofilms were collected from root caries lesions, and the function of biofilm bacteria associated with root caries was investigated. The results suggested that microbiota associated with root caries lesion may have a different function from the biofilm formed on the healthy exposed root surface.

On the other hand, as a result of investigating the effects of zinc-glass-containing glass ionomer cement on biofilms, it was shown that the number of viable bacteria and the thickness of the biofilm of *Actinomyces naeslundii* decreased compared to the control group, and that gene expression changed.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：バイオフィーム 根面う蝕 細菌叢 機能

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会に突入し、また高齢者の保有歯数が増加していることにより、加齢や歯周病による歯肉退縮に伴う根面う蝕の急増が歯科において深刻な問題となっており、根面う蝕に対する効果的な予防・治療法が切望されている。う蝕などの口腔感染症の主因は口腔バイオフィームであり、これらの疾患はバイオフィーム細菌叢のバランスが崩れること(ディスバイオーシス)により引き起こされる。根面う蝕をより効果的に制御するためには、根面う蝕に関連する細菌叢の特徴を明らかにすることが必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、初期根面う蝕に着目し、根面う蝕罹患患者より採取した臨床サンプルを用いてう蝕病変部のバイオフィームを遺伝子解析することにより、根面う蝕に関連する細菌叢の特徴を探索することである。また、得られる結果をもとに、初期根面う蝕に対する効果的な化学的コントロール法につき検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 根面う蝕バイオフィーム細菌叢の解析

#### 被験者の選択

大阪大学歯学部附属病院を受診した根面う蝕を有する患者のうち、インフォームドコンセントを行い同意が得られた患者を対象とした。

#### 臨床サンプルの採取

生理食塩水にて洗浄後、根面う蝕のう窩よりバイオティクスサンプルを滅菌した歯科用器具にて採取した。また、対照群として健全な露出根面よりバイオフィームサンプルを採取した。

#### シーケンス解析

PowerSoil DNA Isolation Kit を用いて DNA の抽出を行い、シーケンス解析に供した。

### (2) 化学的制御法の検討

#### バイオフィーム形成

亜鉛ガラス含有グラスアイオノマーセメント(ケアダインレストア)および従来型グラスアイオノマーセメント(フジ VII)を用いて、ディスクを作成した。*Actinomyces naeslundii* を用いて、ディスク上にバイオフィームを形成させた。なお、対象群として、ハイドロキシアパタイトディスクを使用した。

#### 生菌数測定

採取したサンプルよりバイオフィームを剥離し、BHI 寒天培地に播種した。その後、Colony forming unit をカウントし、生菌数を算出した。

#### 3 次元的観察

採取したサンプルを live/dead Bacterial Kit にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

#### RNA シーケンス解析

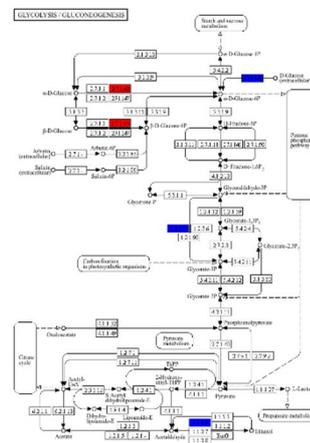
ディスクよりバイオフィームを剥離し、Trizol を用いて RNA の抽出を行い、RNA シーケンス法による網羅的解析に供した。

## 4. 研究成果

### (1) 根面う蝕バイオフィーム細菌叢の解析

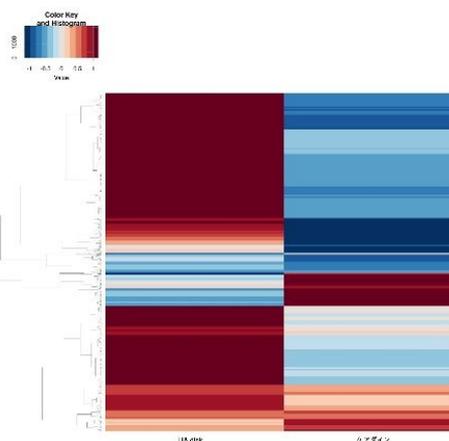
根面う蝕病変部のバイオフィームと健全露出根面に形成されるバイオフィーム、および初期根面う蝕と進行した根面う蝕病変部のバイオフィームでは、それぞれでより多く有する遺伝子には差があることが示された。その中には、解糖系や炭水化物の代謝に関する遺伝子も含まれていた。

右図：初期根面う蝕病変と健全露出根面に形成されたバイオフィームの比較(解糖系)



## (2) 化学的制御法の検討

ハイドロキシアパタイトディスク, 亜鉛ガラス含有ガラスアイオノマーセメントおよび従来型ガラスアイオノマーセメント硬化体上に形成されたバイオフィルムにおける *Actinomyces naeslundii* の生菌数は, 亜鉛ガラス含有ガラスアイオノマーセメント < 従来型ガラスアイオノマーセメント < ハイドロキシアパタイトディスクの順で多くなり, 3 群間において統計学的に有意差を認めた。また, 各サンプル上に形成されたバイオフィルムの厚みは, 亜鉛ガラス含有ガラスアイオノマーセメント < 従来型ガラスアイオノマーセメント < ハイドロキシアパタイトディスクの順で厚みが大きかった。RNA シーケンス解析の結果, ハイドロキシアパタイトディスク上と比較し, 亜鉛ガラス含有ガラスアイオノマーセメント硬化体上に形成された *A. naeslundii* のバイオフィルムにおいて, 遺伝子の発現が抑制されており (右図), その中にはタンパク分解酵素も含まれていた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Klanliang K, Asahi Y, Maezono H, Sotozono M, Kuriki N, Machi H, Ebisu S, Hayashi M.	4. 巻 12
2. 論文標題 An extensive description of the microbiological effects of silver diamine fluoride on dental biofilms using an oral in situ model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 7435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11477-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sotozono M, Kuriki N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Yamaguchi M, Iida T, Ebisu S.	4. 巻 16
2. 論文標題 Impact of sleep on the microbiome of oral biofilms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0259850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0259850. eCollection 2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sotozono M, Kuriki N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Machi H, Iida T, Ebisu S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Impacts of sleep on the characteristics of dental biofilm.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80541-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Asahi Y, Naito K, Kanda H, Niwano K, Takegawa D, Yumoto H, Noiri Y, Hayashi M.	4. 巻 60
2. 論文標題 Clinical investigation of the inhibitory effects of tooth-coating materials on initial active root caries: A pilot randomized controlled trial.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicina60010150.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Motoki, Asahi Yoko, Duncan Henry Fergus, Kuriki Nanako, Takahashi Yusuke, Hayashi Mikako	4. 巻 2023
2. 論文標題 Repair of an Extensive External Cervical Resorption Lesion Using Intentional Replantation with Crown Rotation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Case Reports in Dentistry	6. 最初と最後の頁 21039999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2023/2103999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 朝日陽子、栗木菜々子、前園葉月、島岡 毅、恵比須繁之、野杵由一郎、林 美加子
2. 発表標題 難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖部根管内と根尖孔外バイオフィームにおける細菌叢の比
3. 学会等名 第37回日本バイオフィーム学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 朝日陽子、内藤克昭、神田ひかる、庭野和明、武川大輔、湯本浩通、野杵由一郎、林美加子
2. 発表標題 初期活動性根面う蝕患者におけるケアデザインZIF-Cのバイオフィーム抑制効果に関する臨床評価
3. 学会等名 第159回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shimaoka T, Maezono H, Ono S, Kawanishi Y, Asahi Y, Takahashi Y, Hayasih M
2. 発表標題 The inhibitory effect of on-demand aqueous chlorine dioxide solution on polymicrobial biofilm.
3. 学会等名 21st ESE Biennial Congress
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maezono H, Shimaoka T, Ono S, Takahashi Y, Asahi Y, Kitano K, Ikawa S, Hayashi M
2. 発表標題 The antimicrobial effect of peroxyntic acid on polymicrobial biofilms.
3. 学会等名 21st ESE Biennial Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島岡 毅, 前園 葉月, 川西 雄三, 朝日 陽子, 高橋 雄介, 林 美加子
2. 発表標題 要時生成型亜塩素酸イオン水溶液がEnterococcus faecalis バイオフィームに及ぼす影響
3. 学会等名 第157回 歯科保存学会2022年度秋季学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Klanliang K, Asahi Y, Maezono H, Kuriki N, Shimaoka T, Machi H, Ebisu S, Hayashi M
2. 発表標題 Effects of silver diamine fluoride on in situ oral biofilm
3. 学会等名 第69回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	三浦 治郎	大阪大学・歯学部附属病院・助教	
	(Miura Jiro)		
	(70437383)	(14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------