

令和 6 年 5 月 29 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：20K09974

研究課題名（和文）歯性菌血症の克服を目指したデンタルバイオフィルムの能動的脱離メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of active biofilm dispersal associated with odontogenic bacteremia

研究代表者

山口 幹代（Yamaguchi, Mikiyo）

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：30523089

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）：本研究では、歯性菌血症の要因となるデンタルバイオフィルムからの口腔細菌の能動的脱離メカニズムを明らかにすることを目的に、ex vivoバイオフィルムモデルの確立を試みた。歯周病治療あるいは根管治療が必要とされる外来患者から採取した歯肉縁下バイオフィルムあるいは根管内バイオフィルム由来の細菌を用いて、チャンバースライド上でバイオフィルムを形成し、バイオフィルムから脱離しやすい細菌構成およびバイオフィルムに残存しやすい細菌構成を遺伝子解析法にて網羅的に同定し、明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオフィルム感染症では、バイオフィルムから一部の細菌の脱離が生じることで、急性化や感染の拡大が起こる。歯科領域において、デンタルバイオフィルムからの脱離は、辺縁性および根尖性歯周炎の急性化、歯性菌血症、ならびに口腔細菌の関与が示唆されている全身疾患の発症や増悪の誘因になると考えられ、その制御法の開発は急務である。本研究では、細菌の脱離のうち、持続感染の発症・継続に大きな役割を果たすと考えられる能動的脱離に焦点をあて、歯周ポケットおよび根管内から採取したバイオフィルムを用いて、脱離しやすい細菌構成を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried establishment of ex vivo biofilm model to investigate molecular mechanism of active biofilm dispersal associated with odontogenic bacteremia. We showed the distinctive composition of microbiota with tendency to disperse from biofilm originated in subgingival biofilm or microbiota of root canal.

研究分野：歯科保存学

キーワード：デンタルバイオフィルム 歯性菌血症 バイオフィルムの能動的脱離

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バイオフィーム感染症では、バイオフィームから一部の細菌の脱離が生じることで、急性化や感染の拡大が起こる。歯科領域において、デンタルバイオフィームからの脱離は辺縁性および根尖性歯周炎の急性化、歯性菌血症、ならびに口腔細菌の関与が示唆されている全身疾患の発症や増悪の誘因になると考えられる。脱離には、せん断力などによる受動的脱離と遺伝子発現の変化により制御される能動的脱離がある。口腔外科処置やブラッシング時に起こる菌血症は受動的脱離によるものであり、歯周病治療を含む口腔ケアによりデンタルバイオフィームを除去することで、受動的脱離を最小限に抑え、菌血症の程度を小さくできるとされている。一方、辺縁性あるいは根尖性歯周炎罹患歯においては、歯肉縁下あるいは根管や根尖孔外に存在するバイオフィームが細菌のリザーバーとなり、能動的脱離が絶え間なく生じている可能性があるが、その詳細を説明した研究報告はなく、その分子メカニズムや制御法は不明である。

### 2. 研究の目的

実際の臨床現場で辺縁性あるいは根尖性歯周炎罹患歯における能動的脱離を証明することは困難であるため、本研究では、辺縁性歯周炎罹患歯の歯肉縁下および根尖性歯周炎罹患歯の根管から採取したバイオフィームを用いて *ex vivo* バイオフィームモデルを確立し、より臨床に近い環境下での能動的脱離の分子メカニズムの解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象患者の選択

大阪大学歯学部附属病院を受診し、歯周病治療あるいは根管治療が必要とされ、それぞれ 6 mm 以上の歯周ポケットあるいは直径 5 mm 以上の根尖病巣を有する歯が存在すると診断された外来患者のうち、同意の得られた患者 5 名を対象とした。

#### (2) 臨床試料の採取

歯周ポケット試料は、歯周ポケット深さが 6 mm 存在する部位を選択し、歯肉縁上プラークを除去した後、滅菌したグレーシーキュレットにて歯肉縁下バイオフィームを採取した。

管内試料は、ラバーダム防湿後、K ファイルにて管内バイオフィームを採取した。

#### (3) バイオフィームの形成

採取したバイオフィームをそれぞれヘミンおよびメナジオン含有 Tryptic Soy Broth (TSB) に懸濁し、唾液処理を施したチャンバースライド上に播種後、嫌気的条件下で 24 時間培養し、バイオフィームを形成した。

#### (4) 能動的脱離の誘導と残存バイオフィームおよびバイオフィームから脱離した細菌の同定

(3) の上清を除去し、PBS またはヘミンおよびメナジオン含有 TSB を添加し、37 °C 嫌気的条件下にて 30 分培養後、残存バイオフィームおよびバイオフィームから脱離した細菌から、DNeasy PowerSoil Pro Kit を用いて細菌 DNA を抽出し、MiSeq にて 16S rRNA の V1-V2 領域を対象にした DNA のシーケンス解析を行った。

### 4. 研究成果

残存バイオフィームおよび脱離した細菌をシーケンス解析した結果、各被験者において同定された細菌綱および細菌種をそれぞれ図 1、図 2 に示す。

被験者 1 では、バイオフィーム形成後、上清を PBS および TSB に交換後、残存したバイオフィームには Clostridia 綱、Negativicutes 綱が、脱離した細菌には Bacilli 綱、Bacteroidia 綱が多く同定された (図 1)。被験者 4 では、残存したバイオフィームには Actinomycetia 綱が、脱離した細菌には Bacilli 綱が多く同定された (図 1)。被験者 5 では、残存したバイオフィームには Negativicutes 綱が、脱離した細菌には Bacilli 綱が多く同定された (図 1)。被験者 6 では、残存したバイオフィームには Actinomycetia 綱が、脱離した細菌には Bacilli 綱が多く同定された (図 1)。

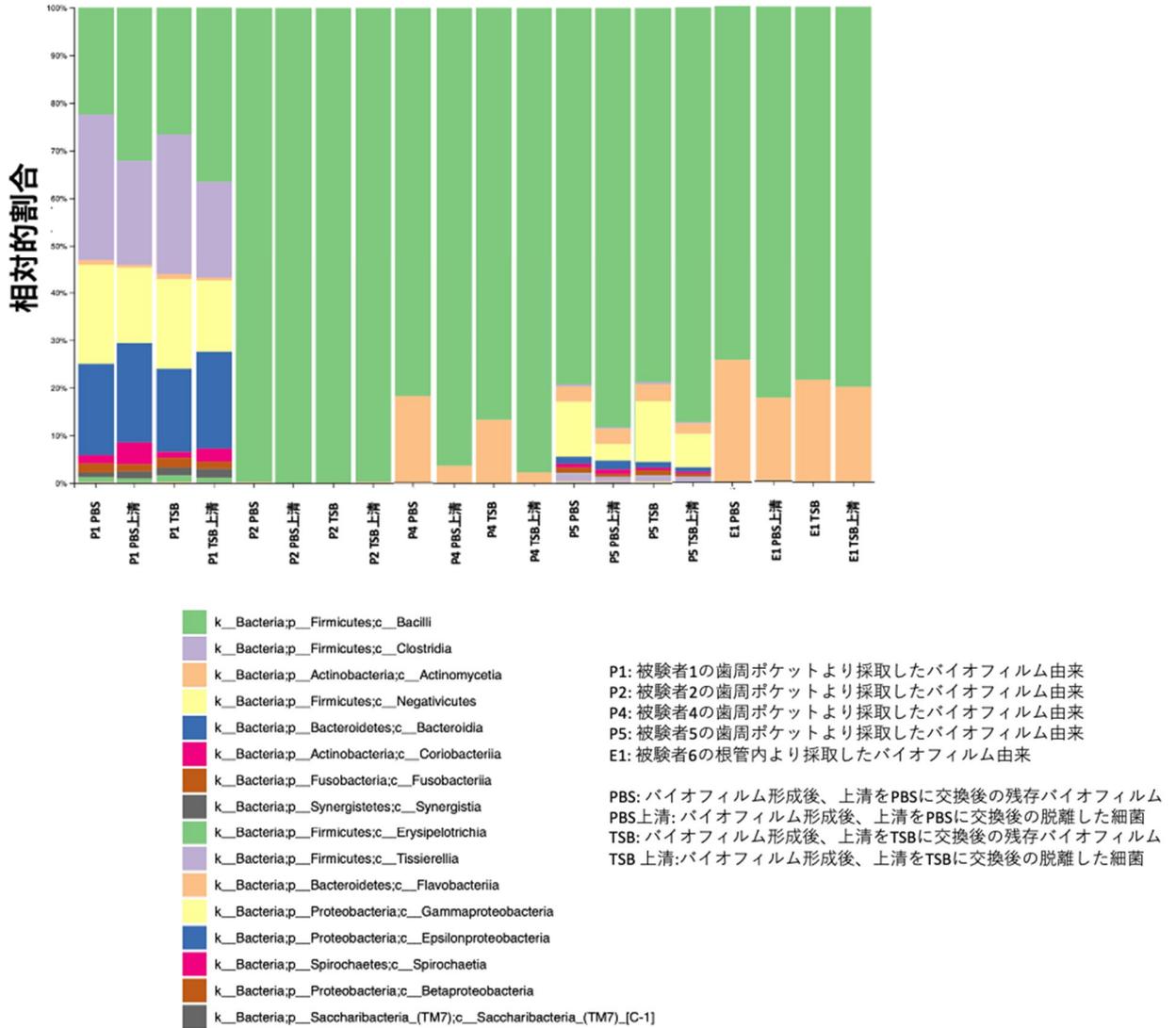


図1 各種試料における構成細菌網の相対的割合

また、被験者1では、残存したバイオフィルムには *Peptostreptococcus stomatis*, *Streptococcus sanguinis* が多く、脱離した細菌には *Enterococcus faecalis*, *Prevotella oralis* が多く同定された (図2)。被験者2では、脱離した細菌には、*Streptococcus mutans* が多く同定された。被験者4では、残存したバイオフィルムに、*Lactocaseibacillus paracasei* が、脱離した細菌には *Streptococcus anginosus* が多く同定された (図2)。被験者5では、残存したバイオフィルムに *Granulicatella adiacens*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis* が、脱離したバイオフィルムには *Streptococcus anginosus* が多く同定された (図2)。被験者6では、残存したバイオフィルムには *Streptococcus sanguinis* が、脱離したバイオフィルムには *Streptococcus cristatus* が多く同定された (図2)。

以上の結果より、細菌網では、Bacilli 網がバイオフィルムから脱離しやすく、Negativicutes 網および Actinomycetia 網がバイオフィルムに残存しやすい傾向があることが明らかとなった。また、細菌種では、*Streptococcus anginosus* がバイオフィルムから脱離しやすく、*Streptococcus sanguinis* がバイオフィルムに残存しやすい傾向があることが明らかとなった。

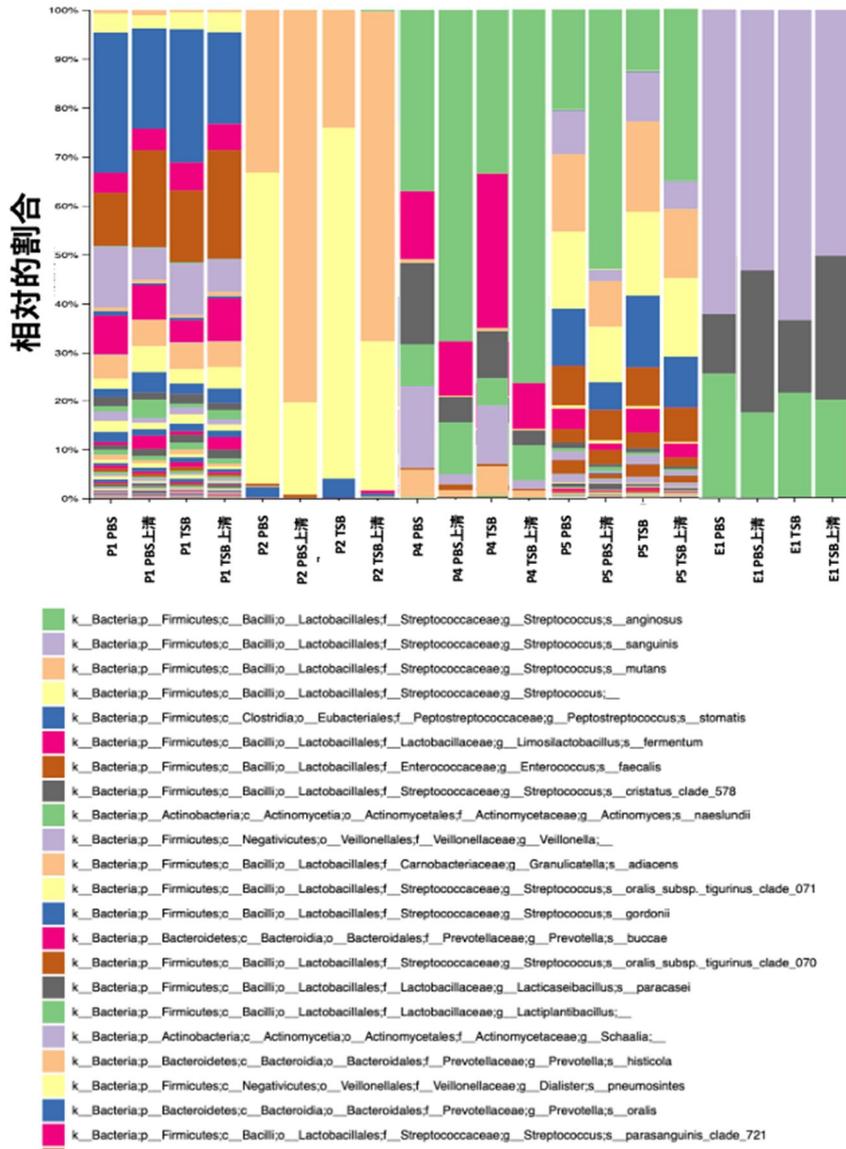


図2 各種試料における構成細菌種の相対的割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 8
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 -
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 Sotozono M, Kuriki N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Yamaguchi M, Iida T, Ebisu S.	4. 巻 9
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 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0259850	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0件

〔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	恵比須 繁之 (Ebisu Shigeyuki) (50116000)	大阪大学・大学院歯学研究所・招へい教授  (14401)	
研究分担者	岡本 菜々子（栗木菜々子） (Okamoto Nanako) (60781432)	大阪大学・大学院歯学研究所・招へい教員  (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
---------	---------