OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	実験的 in situ デンタルバイオフィルムの包括的解析
Author(s)	和氣, 菜々子
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56140
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学　位　論　文

実験的 *in situ* デンタルバイオフィルムの包括的解析

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻（歯科保存学教室）

（指導教員：林　美加子教授）

和氣　菜々子

本論文の要旨の一部は、第 139 回日本歯科保存学会（平成 25 年 10 月，秋田）、第 141 回日本歯科保存学会（平成 26 年 10 月，山形）、第 29 回日本バイオフィルム学会（平成 27 年 7 月，愛知）、第 143 回日本歯科保存学会（平成 27 年 11 月，東京）、62nd Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research (December, 2014, Osaka, Japan)、93th International Association for Dental Research General Session (March, 2015, Boston, USA)において発表した。

目次

I. 緒言 1

II. 実験方法および結果 6

1. *in situ* バイオフィルムモデルの開発および解析

1) 方法

2) 結果 10

2. ピロシーケンスによるバイオフィルム形成細菌の同定 13

2-1. シーケンス解析における DNA 抽出法の確立

1) 方法

2) 結果 15

2-2. バイオフィルム形成細菌の同定

1) 方法

2) 結果 16

III. 考察 19

IV. 結論 27

V. 謝辞 28

VI. 参考文献 29

VII. 図表 43

I. 緒言

細菌が固体表面に付着し共存して複合体を形成した状態をバイオフィルムという[1)]。口腔内には700種以上の細菌が生息しており[2,3)]、これらの細菌が歯、歯肉溝など様々な所で、唾液、抗生物質といった口腔内環境や宿主免疫といった宿主因子に影響を受けながらバイオフィルムを形成している[4)]。デンタルバイオフィルムは齲蝕・歯周病のような口腔疾病の主要な病原因子であり、その構成細菌の相互作用が病原性に影響を及ぼしていると考えられる[5)]。そのため、デンタルバイオフィルムの形成メカニズムを解明することは口腔疾病の予防および治療につながると考えられる。これまで多種多様な *in vitro* バイオフィルム形成モデルが開発され、単一あるいは複数細菌種のバイオフィルムの構造や形成メカニズム、遺伝子発現、あるいは排除・抑制法に関する研究報告が行われてきた[6-11)]。しかしながら、ヒトのデンタルバイオフィルムの形成には細菌成分、唾液の流れ、栄養環境等の影響があるため、限定された細菌を用いた *in vitro* モデルによって口腔環境を模倣することは困難である。従って、ヒトの口腔でデンタルバイオフィルムを形成・評価できる *in situ* モデルを開発し、その形成メカニズムや制御・抑制法を検討することが極めて重要である。

これまでの *in situ* デンタルバイオフィルム研究において、歯面に付着した歯肉縁上バイオフィルムを剥離したもの [12, 13] や歯周ポケットにペーパーポイントを挿入し採取した歯肉縁下バイオフィルム [14] のように、デンタルバイオフィルムの一部が試料として用いられてきた。その後、ありのままのデンタルバイオフィルムを解析するために、取り外し可能なディスクを用いた *in situ* バイオフィルム形成モデルが開発され、その分析が行われてきた [15-18]。しかし、これらの研究の評価は顕微鏡を用いた定性的分析が多く、デンタルバイオフィルムの形成メカニズムを解明するには不十分であった。また、デンタルバイオフィルムは経時的に構成細菌の多様性や優勢な細菌種が変化することで、口腔疾患を引き起こす病原性バイオフィルムにシフトしていくと推察されている [11, 19]。口腔疾患の病因論を理解するには、*in situ* モデルにてバイオフィルムを形成し、その構成細菌の変化を定量分析および遺伝子学的解析等を用いて詳細かつ包括的に評価することが必要と考えられる。

自然界の細菌叢には、生存しているが培養できない細菌種（viable but non-culturable; VBNC） [20, 21] が大半を占めており、細菌叢の研究には培養によらない解析手法が必須である。これらの手法のうち、最も汎用されているのは 16S リボソーム RNA 遺伝子（16S rRNA）を用いた菌種組成解析である [2, 3, 22]。これはサンプル中に混在している細菌の 16S rRNA 配列を調べ、データベ

ース上の配列情報と比較することで、細菌種を同定しサンプルの細菌叢を評価する方法である。従来こうした 16S rRNA 解析は、単離培養したり 16S rRNA 配列をクローニングしたりという手法で実施されていたが、次世代シーケンサーの開発により、培養等を経ずに一度にデータを得ることができるようになった [23, 24]。

この次世代シーケンス解析技術の開発に伴い、世界的にはヒトの体の内部および表面に生息する細菌叢の網羅的遺伝子解析が注目されている [25]。2012 年にはヒトマイクロバイオームプロジェクト（HMP）により、健常者成人における体の 5 つの臓器・器官 （気道、皮膚、口腔、腸および膣）の細菌叢についての大規模な研究が行われ [26]、これにより、健常者の正常微生物群の構成が初めて明らかにされた。また、このプロジェクトの取り組みにより、肥満や炎症性腸疾患では腸内細菌の多様性が低下し [27, 28]、膣炎では膣内細菌の多様性が増加していることが明らかにされており [29]、ヒトの健康・疾患において常在菌叢の変化が及ぼす影響について解明がすすめられている。口腔細菌叢に関しては、HMP により頬粘膜、唾液、歯肉縁上バイオフィルム、縁下バイオフィルムおよび舌表面における細菌叢の比較が行われている [30]。また齲蝕罹患患者と非罹患者における口腔細菌叢の比較 [31] や歯周組織の炎症状態 （正常、歯肉炎、歯周炎）による歯肉縁下バイオフィルム細菌叢の比較が次世代シーケンス解析技術

を用いて行われている[14]。しかし、これらの解析は一時点のものであり、細菌叢の変化を経時的かつ詳細に解析した研究はほとんどない。

また、これまでデンタルバイオフィルムの構成細菌については、時空間モデルが提唱されている[10]。まず、歯の表面に唾液の糖タンパクが付着しペリクルを形成し、そのタンパクのレセプターに対するアドヘジンを所有する *Streptococcus* 属を含むグラム陽性菌が付着する（初期定着細菌群）。さらにそれらに対するアドヘジンを持つ菌種が凝集し（後期定着細菌群）、初期定着細菌群の代謝産物を栄養源として増殖していく。このように細菌同士の凝集および相互関係により成熟バイオフィルムが形成されていくと考えられている。しかしながら、これはあくまでも *in vitro* の凝集関係を総括したものに過ぎず、*in situ* において細菌叢の経時的変化を詳細に解析したものではない。

近年になって、ディスクを使用した *in situ* モデルを用いて形成した実験的デンタルバイオフィルムの構成細菌が、16S rRNA 遺伝子シーケンスにより包括的に同定され始めた[32, 33]。しかし、バイオフィルム形成初期から成熟バイオフィルム形成に至るまで、3 日以上にわたり構成細菌の経時的変動を詳細な時間区分で評価したという報告はない。そこで、本研究では、ヒトのデンタルバイオフィルム形成メカニズムを解明することを目的とし、ヒトの口腔でバイオフィルムを経時的に形成・評価できるモデルを開発し、形成した実験的デンタルバ

イオフィルムの定量分析および 3 次元的検索を行った。さらに、形成したデンタルバイオフィルムを次世代シーケンサーを用いて、16S rRNA 遺伝子を標的としたシーケンス解析に供し、その構成細菌の経時的かつ包括的な同定を行った。

II. 実験方法および結果

---

1. *in situ* バイオフィルムモデルの開発および解析

本研究の端緒として、口腔内装置を用いたバイオフィルムモデルを新規に開発し、実験的デンタルバイオフィルムを形成後、定量分析および 3 次元的検索を経時的に行った。

1) 方法

(1) *in situ* バイオフィルム形成モデル

本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を受け、遂行された （承認番号 H24-E4）。被験者の選択基準は全身及び口腔に異常が見られず、過去 6 か月以内に抗生物質等の薬剤投与を受けていない者とし、大阪大学大学院歯学研究科職員および学生の 10 人（男性 3 名、女性 7 名）で、年齢 26 ～ 30 歳（27.1 ± 1.2 歳）を対象とした。これら被験者の口腔内状態は O'Leary の PCR 26.8 ± 15.6、DMF 歯数 6.7 ± 5.0 およびプロービング値 3mm 以内であった（表 1）。

口腔内装置はナイトガード同様に上顎に装着するもので、臼歯部頬側にハイドロキシアパタイト（HA）ディスクが挿入できるよう改良した （図 1）。頬粘膜や舌の動きによってバイオフィルムが破壊されないように装置内に HA ディ

スクを挿入し、ありのままのバイオフィルムを形成させた。被験者には Beyth らの方法[34] と同様に、口腔内装置を 96 時間まで装着し、食事の際は湿潤下で保管し、口腔内のブラッシングを行った後再度装着するよう指示した。その間、装置は湿度の保った容器の中に保管するよう指示した。被験者のブラッシング方法および時間は均一化し、毎食後歯磨剤を用いずに 5 分間行うよう指示した。

(2)　実験デザイン

図 2 に本研究の実験デザインを示した。口腔内の装置中に固定した 8 個の HA ディスク上に形成されたデンタルバイオフィルムを経時的に採取し、評価に供した。被験者 1 人に対しディスクの個数が 8 個に限られているため、Ⅰ期（0 – 12 時間）、Ⅱ期（12 – 48 時間）およびⅢ期（48 – 96 時間）の 3 つの期間に分けて実験を行った（図 2）。各期間において評価する時間を 4 回とし、各時間ごとに 2 個ずつディスクを採取した。すなわちⅠ期では、8:00 に装置を装着し、1、4、8 および 12 時間における試料採取をそれぞれ 9:00、12:00、16:00 および 20:00 に行った。また、Ⅱ期では 20:00 に装置を装着し、12、16 および 24 時間における試料採取をそれぞれ、翌日の 8:00、12:00 および 20:00 に行い、48 時間の試料採取は 2 日後の 20:00 に行った。さらに、Ⅲ期では 20:00 に装置を装着し、

48、60、72 および 96 時間における試料採取をそれぞれ 2 日後の 20:00、3 日後の 8:00 および 20:00、 4 日後の 20:00 に試料を採取した。

(3) バイオフィルム形成細菌の生菌数測定

試料を滅菌蒸留水に浸漬し、5 分間超音波振動 30 秒撹拌の後、連続 10 倍希釈を行った。希釈した菌液をコロンビア羊溶血寒天培地 （日本 BD, 福島）に播種し、37℃、アネロパック®・ケンキ（三菱ガス化学, 東京）を用いた嫌気条件下で 48 時間培養した後、生菌数を測定した。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡による 3 次元的定量解析

HA ディスク上に形成したバイオフィルムを LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (L7007; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて室温で 15 分間染色後、蒸留水にて洗浄した。試料をスライドガラス上に固定した後、共焦点レーザー顕微鏡 （CLSM, LSM700; Carl Zeiss, Oberkochem, Germany）にて観察を行った。また画像解析ソフト (Imaris 5.0.1; Bitplane AG, Zurich, Switzerland)にて 3 次元像の構築を行い、バイオフィルムの厚みと生菌・死菌の体積を解析した。

(5) 走査型電子顕微鏡による観察

試料を採取後、0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) にて洗浄後、Asahi らの方法 [35] に準じて調整した。すなわち、0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝 - 2.5% グルタールアルデヒド - 2% パラホルムアルデヒド (pH 7.4) 溶液にて 30 分間浸漬固定し、0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) により 3 回洗浄した。続いて、上昇エタノール系列 (50-100%) で脱水し、t-ブタノール (和光純薬工業, 大阪) で置換後、凍結乾燥装置 (JFD310; 日本電子, 東京) を用いて乾燥し、プラズママルチコーター (PMC5000; メイワフォーシス, 大阪) にて白金蒸着を施した。調整した試料は、走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-6390LV; 日本電子, 東京) 下の観察に供した。

(6) 透過型電子顕微鏡による観察

試料を採取後、0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) にて洗浄後、Asahi らの方法 [36] に準じて調整した。すなわち、2.5% グルタールアルデヒドにて 30 分浸漬固定後、2% オスミウム酸にて 1 時間浸漬固定した。続いて、上昇エタノール系列 (50-100%) で脱水し、エポキシレジン (Epon 812; Shell Chemical, CA, USA)に置換・包埋した。調整した試料は、ウルトラミクロトーム (LKB 2088 Ultrotome V; LKB BROMMA, Stockholm, Sweden) にて厚さ

80～90nm に薄切し超薄切片を作製後、酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛にて 2 重染色し、透過型電子顕微鏡（TEM, H-800; Hitachi 東京）下の観察に供した。

(7) 統計処理

生菌数、バイオフィルムの厚みおよび生菌・死菌の各時点における統計学的有意差の検定は、一元配置分散分析および Turkey-Kramer 法を用いて危険率 5 %で評価した。

2) 結果

(1) バイオフィルム形成細菌の生菌数測定および CLSM による 3 次元的定量解析

培養法よりバイオフィルム形成細菌数は 12 時間後まで急速な増加を示し、その後は漸増するが、48 時間後に再び急速に増加し、72 時間後でプラトーに達した。このことより 96 時間後までの細菌の生菌数は二相性に増加することが明らかとなった (図 3)。

CLSM 像より 8 時間後にバイオフィルムが観察でき、時間の経過とともにバイオフィルムの付着面積が増加した。48 時間後にはディスク全体にバイオフィ

ルムが観察され、死菌も認められるようになった（図 4A）。また、バイオフィルムの厚みは、生菌数の変化とほぼ同様に二相性の増加を示した（図 4B）。すなわち、厚みは経時的に増加し、12 時間後では約 30 μm、24 時間後では約 40 μm に増加した。その後漸増するが、48 時間後に再び急速な増加を示し、72 時間後では厚みが約 50 μm に達した。しかし、96 時間後では約 45 μm を示し、厚みは減少傾向を示した。さらに、バイオフィルムの体積も、同様に経時的に増加傾向を示し、60 時間後に最大となり、その後減少傾向を示した（図 4B）。

(2) SEM および TEM による観察

SEM 観察より、8 時間後に球菌主体のバイオフィルムが認められ、12 時間後にはマルチレイヤーからなるバイオフィルムが形成された。その後、48 時間後以降には分厚い菌体外多糖様のマトリックス構造物で被覆されたバイオフィルムが観察された（図 5A）。

TEM 観察より、8 時間後にペリクル様構造物に付着する球菌がみられた。12 時間後の構成細菌種の形態型は球菌が主体であったが、糸状菌や桿菌も観察された。48 時間後には細菌密度が顕著に増加し、複数層にも及ぶ約 40μm の厚みのバイオフィルムが観察された。96 時間後には、球菌、糸状菌、紡錘菌といっ

た多種多様な細菌型からなる混合菌種バイオフィルムが観察された。さらに、ディスク側には死菌と思われるゴーストセルが多く観察された（図 5B）。

2. ピロシーケンスによるバイオフィルム形成細菌の同定

2-1. シーケンス解析における DNA 抽出法の確立

シーケンス解析における DNA 抽出法を確立するために、2 つの方法を用いてバイオフィルムを回収後、DNA 抽出を行い比較検討した。

1）方法

バイオフィルム形成後の各時点（1，12，24，48，60 および 96 時間）において、被験者 10 人より 2 個ずつ HA ディスクを採取し、一方はディスクごと DISRUPTOR GENIE (SI-D288; エムエス機器, 大阪)を用いて粉砕処理を行い、DNA 抽出を行った（以下、Beads 法）。他方は、滅菌蒸留水中で 5 分間の超音波処理および 30 秒間の撹拌によりバイオフィルムを剥離し、遠心分離によりバイオフィルムを回収した後 DNA 抽出を行った （以下 Sonication 法）。これら 2 つの方法でバイオフィルム試料を回収後、PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA)にてゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA に対し、16S rRNA を対象とするユニバーサルプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、各時点における全細菌数の定量を、Kuremoto らの方法[37]に準じて行った。すなわち、DNA ポリメラーゼ 10 µl（SYBR® Select Master

Mix; Life Technologies, Grand Island, NY, USA）、ユニバーサルプライマー (784F: AGGATTAGATACCCTGGTA, 1061R: CRRCACGAGCTGACGAC) [38] (最終濃度 各 900 nM) 各 0.5 µl、および抽出 DNA 液 1 µl に滅菌蒸留水を加えて全量 20 µl の PCR 反応溶液とし、Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system (Life Technologies)にて、initial denature 95℃で 10 分間、denature 95℃で 15 秒間、annealing 65℃で 1 分間、extesion 72℃で 1 分間、サイクル数 40 の条件でターゲット DNA の増幅を行った。増幅中の蛍光シグナルの検出は各サイクルの終了後に行った。増幅終了後、60℃から 95℃へ温度を上昇させ、この間 0.5℃の間隔で蛍光シグナルを検出して融解曲線を作製し、増幅産物の特異性を確認した。検量線を作製するための標準試料には *Streptococcus mutans* NCTC10449 を用いた。データは 7500 System SDS Software Version 2.0.2 (Life Technologies)を用いて解析した。

また、*Streptococcus* 属および *Fusobacterium* 属に関しては、*Streptococcus* 属特異プライマー（Forward: CGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAG, Reverse: GCCGTCCCTTTCTGGTAAG） [39] および *Fusobacterium* 属特異プライマー（Forward: GCGGAACTACAAGTGTAGAGGT, Reverse: AGCGTCAGTATCTGTCCAGT） [39] を用いた。

2)　結果

Beads 法と比較し、Sonication 法の方が、全細菌、*Streptococcus* 属および *Fusobacterium* 属の細菌量において、被験者間のばらつきが認められた（図 6)。

2-2. バイオフィルム形成細菌の同定

DNA 抽出法を Beads 法に決定し、ピロシーケンスによるバイオフィルム形成細菌の包括的同定を行った。

1) 方法

(1) 実験デザイン

口腔内装置に固定した 8 個の HA ディスク上に形成されたデンタルバイオフィルムを経時的に採取し、評価した (図 2C)。

(2) ピロシーケンスによるバイオフィルム形成細菌の同定

Beads 法にてバイオフィルムを回収後、PowerSoil® DNA Isolation Kit にて DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の V5-V6 領域は、2-1. 1）と同様のプライマーセットを用いて増幅した。その後、Ion Fragment Library Kit (Life Technologies)にてライブラリを調整し、Ion PGM® Sequencing 400 Kit (Life

Technologies)を用いて Ion PGM® sequencer (Life Technologies)で塩基配列を決定した。得られた塩基配列は QIIME を用いて解析した。さらに、UCLUST version 1.2.22q を用いて、97%の類似性により操作的分類単位（OTU）に分類した。OTU 分類には Greengenes データベースおよび RDP Classifier version 2.2 の配列を参照した。

(3) 統計処理

Shannon 指数および各時点における各細菌属の割合は、Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 法を用いて統計処理を行い、危険率 5 %で有意差検定を行った。

2) 結果

(1) 口腔細菌の多様性の変化

Shannon 指数より、バイオフィルム構成細菌の多様性は 12 時間後および 16 時間後に減少し、その後増加傾向を示し、96 時間後で最も多様性が高いことが明らかとなった（図 7）。

(2) シーケンス解析

被験者 10 人の解析結果には個体差が認められたが （図 8）、それらの平均値を算出することにより一定の傾向が認められた （図 9, 10）。すなわち、門レベルでは、16 時間後までに *Firmicutes* 門が優勢であったのに対し、その後 48 時間後以降に *Fusobacteria* 門および *Bacteroidetes* 門が増加した （図 9）。

属レベルでは、*Firmicutes* 門は主に *Streptococcus* 属、*Fusobacteria* 門は主に *Fusobacterium* 属で占められ、*Bacteroidetes* 門 は *Capnocytophaga* 属、*Prevotella* 属 、*Porphyromonas* 属が大部分を占めた（図 10）。また、全細菌に対する割合が平均的に 1 %以上を占める属の経時的変化を表 2 に示した。これより、好気性菌および通性嫌気性菌の割合は 1 時間後から 24 時間後までおよそ 70 %を占めていたのに対し、48 時間後以降は 50 ～ 60 %に減少した。一方、偏性嫌気性菌の割合は、1 時間後から 24 時間後まで 20 %以下であったのに対し、48 時間後以降は 30 ～ 40 %に増加した。さらに、平均的に 5 %以上を占める細菌属の経時的変化を評価した （図 10B）。*Streptococcus* 属の全細菌に占める割合は初期において 20%以上であったが、24 時間後以降減少し、96 時間後には 5 %以下となった。一方、*Fusobacterium* 属の割合は 48 時間後以降から増加し、96 時間後では 4 時間後（ P=0.0380 ）、8 時間後（ P=0.0233 ）、12 時間後（ P =0.0207 ）、16 時間後（ P=0.0122 ）、24 時間後（ P=0.0340 ）と比較し有意に増加した。また、*Porphyromonas* 属の割合も 48 時間以降から増加し、1 時間

後（ P=0.0265)および 16 時間後（ P=0.0480 ）と比較し 96 時間後に有意に増加した。さらに、*Prevotella* 属の割合も 48 時間後以降から増加し始め、4 時間後（ P=0.0482)、 8 時間後（ P=0.0070)、12 時間後（ P=0.0092)および 16 時間後（ P=0.0122)と比較し 96 時間後に有意に増加した。以上より、およそ 16 時間後まで *Streptococcus* 属が 20 %以上を占め、48 時間後以降に *Fusobacterium* 属、*Porphyromonas* 属および *Prevotella* 属などの偏性嫌気性菌が優勢となり、96 時間後にはこれらが統計学的に有意に増加することが明らかとなった。

III. 考察

これまで様々なデンタルバイオフィルムモデルが開発され、解析が行われてきた[15-18]。しかし、従前の研究は定性的分析が多く、デンタルバイオフィルムの形成メカニズムを理解するには不十分であった。また、現在までのところ、*in situ* デンタルバイオフィルムの解析に関する報告は初期[32]あるいは長期[33]の一時点にのみに着目したものであった。そこで本研究では、バイオフィルムを非破壊的かつ経時的に評価できる *in situ* モデルを用い、4 日後までバイオフィルムを形成させ、健常者の口腔細菌叢の変化を初期バイオフィルムから成熟バイオフィルムに至るまで詳細に評価した。これにより、*in situ* モデルで作製したバイオフィルムの生菌数が二相性に増加することが初めて明らかとなった。また今回の結果では 4 日後に生菌数がプラトーに達したが、これは、ヒト口腔内で HA ディスク上に形成したバイオフィルムの定量分析の報告[33]と類似していた。他方で、これまではデンタルプラークの細菌数は 1 g あたりとしての定量結果しか報告されておらず[40]、分母には菌体以外の菌体外マトリックスや剥離細胞等の重さが含まれていた。本研究において *in situ* バイオフィルムモデルを用いることにより、初めて単位面積あたりの細菌数として定量することが可能となった。

また、CLSM 像により、実験的バイオフィルムの厚みおよび体積の解析を行ったところ、これらの経時的変化は生菌数と同様の変化を示すことが明らかとなった （図 4B)。一方で、生菌数およびバイオフィルムの表面積が増加しているにも関わらず、厚みが増加しない期間があった （図 4A, B)。この結果より、バイオフィルムはまず厚みを増し、その後面積を広げ、また厚みを増すというサイクルを繰り返すことが示唆された。また、60 時間後以降 CLSM 像にてディスク全体にバイオフィルムが形成されたにもかかわらず、厚みおよび生菌・死菌の体積が減少傾向を示したのは、その間にバイオフィルムのデタッチメントが発生したためと推察される。デタッチメントには 2 つのメカニズム、すなわちプログラム化されたデタッチメントと機械的デタッチメントがある [41]。今回の結果から、どちらか確定することは困難であるが、3 次元構造の維持において厚さが限界に達することによりデタッチメントが生じたと考えられる。

次に、SEM および TEM にて実験的バイオフィルムの経時的観察を行ったところ、8 時間後にバイオフィルムが観察され、12 時間後には球菌主体のバイオフィルムが形成されるようになった。その後、球菌、糸状菌、紡錘菌といった多様な形態から構成されるバイオフィルムへと成熟していくことが示された。これは、歯面に付着したデンタルバイオフィルムの微細形態学的検索における以前の報告 [42-47] と同様の変化であり、今回の *in situ* バイオフィルムモデルの

有用性かつ再現性が示された。

これまで Kolenbrander らによりデンタルバイオフィルム構成細菌の時空間モデルの仮説が提唱されている[10]。今回、形成細菌の定量で得られた生菌数の二相性の増加曲線に着目し、バイオフィルム形成 48 時間後から 72 時間後でみられた細菌数の急速な増加において初期定着細菌群から後期定着細菌群へ細菌叢が変動すると仮説を立てた。それを検証するために、次世代シーケンス解析技術を用いて実験的デンタルバイオフィルムの構成細菌の経時的かつ包括的な同定を行った。

近年、細菌叢の網羅的解析研究には培養によらない解析手法の開発が必須となっており、その中で最も汎用されているのは次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析法である[23–25]。これは、ゲノム DNA を鋳型にしてそこに存在する 16S rRNA を一括増幅し、それらをシーケンスすることによって菌種や菌種組成を調べる生態学的研究である。ここで重要なことは、細菌叢からの DNA 抽出の手法の確立である。細菌叢には様々な種類の細菌が混在しているため、細菌以外の細胞や DNA を除く工程、バイアスのない溶菌方法、菌種組成が変化しないサンプルの長期保存および搬送方法などを確立することが必要不可欠である。これは定量性が高く再現性もある解析データの取得や他のデータとの互換性を可能にするうえで重要である。そのため、本研究では HMP のサンプルプ

ロトコールを参考とした[48]。その際、バイアスのないDNA抽出法を比較検討する必要があると考え、今回の実験的バイオフィルムの経時的な菌種同定に際しては、2種類の手法を比較した。その結果、Beads法と比べて、Sonication法の方が上下のばらつきが認められた（図6)。これは、Sonication法の方が手技の工程が多く技術的誤差が出やすいためと考えられ、ピロシーケンス解析において、DNA抽出はBeads法で行うこととした。また、本研究において試料採取を3つの期間に分けて行った。初期バイオフィルムにおいて、試料採取の日が異なることで細菌構成に変化が生じるかどうかをシーケンス解析にて比較検討したところ、構成細菌の割合に有意な差は認められなかったとの報告があり[32]、それを基に試料採取を別日におこなっても問題ないと判断した。一方、成熟バイオフィルムにおいて、類似の報告はないが、12時間はⅠ期およびⅡ期、48時間はⅡ期およびⅢ期と両期間において試料を採取し、それぞれの細菌構成に違いがないことをシーケンス解析にて確認した（データ示さず）。

シーケンス解析法を用いて、まず口腔内細菌の多様性の変化を経時的に解析した。これまでの報告ではデンタルバイオフィルムの成熟には経時的に構成細菌の多様性が増加することが実証されている[10, 33]。興味深いことに、本研究において構成細菌の多様性は12時間後および16時間後まで減少し、その後増加傾向を示し、96時間後で最も多様性が高くなった（図7)。これに関しては、

12 時間後及び 16 時間後に酸素分圧が減少し好気性菌が減少する一方、*Streptococcus* 属といった通性嫌気性菌のみが増殖することで、多様性が減少したと考えられる。さらに、バイオフィルム環境が嫌気性に偏ることで、偏性嫌気性菌が付着しやすい環境となり、再び多様性が増加したと推察される。また、*Streptococcus* 属など通性嫌気性菌の代謝産物の影響あるいは栄養供給が不足することで多様性が一時的に減少した可能性がある。例えば、*S. sanguinis* などの連鎖球菌は H_2O_2 を産生することで他の細菌の生育を妨げるが、H_2O_2 に感受性の高い *Actinomyces* 属とは凝集することが報告されている [49]。しかしながら、この多様性の変化の要因を解明するには、酸素、栄養および pH といった環境因子を含めてさらに検討する必要がある。

今回行ったシーケンス解析では、健常者を代表する被験者のデータに個人差が認められた。これは今までの報告と一致する [30, 32] ものの、統計処理を行ったところ、ある一定の傾向が認められた。初期バイオフィルムにおいて、*Streptococcus* 属が優勢であることはこれまでの培養法による解析 [50, 51] やシーケンス解析 [32, 33] の結果と類似していた。これは *Streptococcus* 属がエナメル質上のペリクルと付着機構のバリエーションを多く持ち [52 - 54]、唾液成分を栄養源として代謝する能力を有するためと考えられている [55]。本研究においても、エナメル質の主成分であるハイドロキシアパタイトからなるディスクに

Streptococcus 属が優先的に付着したと考えられる。また、8 時間後までの初期デンタルバイオフィルムにおいて、*Streptococcus* 属、*Gemella* 属、*Neisseria* 属が全ての被験者で検出され、これらが初期定着細菌のコアグループであるとの報告がある [32]。今回の結果はこれと類似しており、この 3 属のうちの *Streptococcus* 属および *Neisseria* 属が初期において優勢であった。さらに、*Fusobacterium* 属および *Prevotella* 属は 1 時間後の割合が 5 %以上であったのに対し、その後一時的に減少傾向を示した（表 2, 図 10B)。これは 1 時間後では全体の細菌総量が少ない為に、少量の細菌でも構成割合が高くなっていることが原因と考えられる。その上、個体間でも構成細菌の割合にばらつきが多く認められた（図 8B)。よって、1 時間後の構成細菌の割合は安定性に欠け、信頼性の低いデータと思われる。一方、4 時間後以降の短時間における全細菌量に対する構成細菌の割合は、個体間において比較的ばらつきがなく安定していることより、信頼性の高い試料として扱って問題ないと考えられる。すなわち、4 時間後から 24 時間後までの短時間において、*Fusobacterium* 属および *Prevotella* 属の割合は 5 %以下であることが明らかとなった。

48 時間後以降になると、*Fusobacterium* 属、*Prevotella* 属および *Porphyromonas* 属などの偏性嫌気性菌の割合が増加していたが（図 10)、これは *in situ* における以前の報告と概ね一致していた [10, 33, 51]。Ritz らが 9 日間に

わたり、縁上プラークの微生物組成の変化を培養法にて調べたところ、1 日目は *Streptococcus* 属や *Neisseria* 属などの好気性菌および通性嫌気性菌の割合が多かったのに対し、9 日目では *Fusobacterium* 属、*Corynebacterium* 属などの割合が増加していたと報告している。最近報告されている分子生物学的手法を用いた細菌叢の研究においても、初期バイオフィルムから成熟バイオフィルムにかけて細菌叢の変動が生じていることが報告されており [5, 56-58]、今回の結果は今までの報告を裏付ける結果となった。また、Diaz らによると、初期定着細菌のコアグループである菌属はバイオフィルム内を嫌気性に傾け、偏性嫌気性菌のコロニー形成に有利なバイオフィルムニッチを形成することで、好気性から嫌気性への菌叢の変化を起こすのではないかと論述している [32]。

また、ブラッシング時間間隔による口腔内の衛生状態および歯肉の炎症状態に関する報告が行われている [59]。Lang らは、48 時間に 1 回ブラッシングを行えば、プラークスコアは増加しても歯肉炎が悪化しないことを報告した。彼らはバイオフィルム形成 48 時間後以降にバイオフィルム内において量的変化だけでなく、質的変化が起こっていると考察している。これに対し、我々の今回の結果はその答えとなったのではないかと考えられる。つまり、バイオフィルム形成 48 時間後に通性嫌気性菌が主体であった細菌叢が、歯肉炎の主要原因菌といわれる [57, 60] *Fusobacterium* 属、*Prevotella* 属および *Porphyromonas* 属などの

偏性嫌気性菌の割合が増すために、歯肉炎を悪化させる環境にシフトしていると考えられる。これより、細菌叢の経時的変動という観点から考えると、歯肉炎に対する予防策のみを考慮したブラッシング間隔としては、最低限 48 時間に 1 回は行うのが好ましいと考えられる。

本研究により、開発された *in situ* デンタルバイオフィルムモデルを用いて、口腔内細菌の多様性の解析を行うことが可能となった。本モデルはデンタルバイオフィルム抑制法の検討・検定モデルとして利用価値が大きいと考えられる。今後は、齲蝕罹患患者および歯周病罹患患者の細菌叢の経時的同定を本モデルを用いて行い、健常者の結果と比較する必要がある。そして、それはヒトの口腔における健康・疾患に関わる細菌叢の包括的理解の一助となるであろう。

IV . 結論

本研究より、

・ヒトの口腔で歯肉縁上デンタルバイオフィルムを実験的に形成し、経時的かつ定性的ならびに定量的に評価できるモデルを開発した。

・実験的デンタルバイオフィルムの生菌数は二相性に増加することを明らかとした。

・その構成細菌の解析により、通性嫌気性菌が主体であった細菌叢が、成熟するにつれて偏性嫌気性菌の割合を増すことで、二相性の増加が生じることを明らかとした。

Ⅴ. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、御指導と御高配を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）恵比須繁之教授ならびに林美加子教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始変わらぬご指導を賜りました野杁由一郎博士および朝日陽子博士に心から感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御協力と御助言を賜りました大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター感染症メタゲノム研究分野　飯田哲也教授、中村昇太博士、後藤 和義博士および元岡大祐博士に深く感謝致します。

最後になりましたが、本研究に対し様々な御支援を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

VI . 参考文献

1. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49: 711 - 45.

2. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 43: 5721 - 32.

3. Kroes I, Lepp PW, Relman DA. (1999) Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 14547 - 52.

4. Stewart PS, Costerton JW. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet. 2001* 358: 135 - 8.

5. Socransky SS, Haffajee AD. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol. 2000* 38: 135 - 87.

6. Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Asai H, Suga H, Ebisu S. (2010) Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodontal Res.* 45: 255 - 61.

7. Yamaguchi M, Sato K, Yukitake H, Noiri Y, Ebisu S, Nakayama K. (2010) A *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of the polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation, and increased biofilm formation. *Infect Immun.* 78: 3801 - 12.

8. Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Izutani N, *et al.* (2011) Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 55: 5887 - 92.

9. Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S. (2011) Time course of gene expression during *Porphyromonas gingivalis*

strain ATCC 33277 biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 77: 6733 - 6.

10. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. (2006) Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol. 2000* 42: 47 - 79.

11. Marsh PD, Moter A, Devine DA. (2011) Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol. 2000* 55: 16 - 35.

12. Okuda K, Takazoe I. (1980) Activation of complement by dental plaque. *J Periodontal Res.* 15: 232 - 9.

13. Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Simón-Soro A, Mira A. (2014) Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC Genomics.* 15: 311 - 23.

14. Park OJ, Yi H, Jeon JH, Kang SS, Koo KT, Kum KY *et al.* (2015) Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in distinct periodontal conditions. *J Dent Res.* 94 : 921 - 7.

15. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E *et al.* (2007) The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence *in situ* hybridization. *J Med Microbiol.* 56: 681 - 7.

16. Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B. (2007) *In situ* identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence *in situ* hybridization. *Eur J Oral Sci.* 115: 459 - 67.

17. Karygianni L, Follo M, Hellwig E, Burghardt D, Wolkewitz M, Anderson A *et al.* (2012) Microscope-based imaging platform for

large-scale analysis of oral biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 78: 8703 - 11.

18. Schillinger C, Petrich A, Lux R, Riep B, Kikhney J, Friedmann A, *et al.* (2012) Co-localized or randomly distributed? Pair cross correlation of in vivo grown subgingival biofilm bacteria quantified by digital image analysis. *PLoS One.* 7: e37583.

19. Marsh PD. (2006) Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health* 15: 6 - 12.

20. Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. (1982) Survival and viability of nonculturable Escherichia coli and Vibrio cholerae in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol.* 8: 313 - 23.

21. Oliver JD. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol.* 43: 93 - 100.

22. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA *et al.* (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 183: 3770 - 83.

23. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, *et al.* (2012) Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitisand health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* 6: 1176 - 85

24. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD,*et al.* (2013) The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 7: 1016 - 25.

25. NIH HMP Working Group (2009) The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 19: 2317 - 23.

26. Human Microbiome Project Consortium (2012) A framework for human microbiome research *Nature* 486: 215 - 21.

27. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE *et al.* (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457: 480 - 4.

28. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C *et al.* (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59 - 65.

29. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. (2005) Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med.* 353: 1899 - 911.

30. Human Microbiome Project Consortium. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486: 207 - 14.

31. Yang F, Zeng X, Ning K, Liu KL, Lo CC, Wang W *et al.* (2012) Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J.* 6: 1 - 10.

32. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr *et al.* (2006) Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol.* 72: 2837 - 48.

33. Takeshita T, Yasui M, Shibata Y, Furuta M, Saeki Y, Eshima N *et al.* (2015) Dental plaque development on a hydroxyapatite disk in young adults observed by using a barcoded pyrosequencing approach. *Sci Rep.* 5: 8136.

34. Beyth N, Yudovin-Farber I, Perez-Davidi M, Domb AJ, Weiss EI. (2010) Polyethyleneimine nanoparticles incorporated into resin composite cause cell death and trigger biofilm stress *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 22038 – 43

35. Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Suga H, Azakami H, Ebisu S. (2012) Synergistic effects of antibiotics and an N-acyl homoserine lactone analog on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol.* 112: 404 - 11.

36. Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R *et al.* (2014) Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol.* 116: 1164 - 71.

37. Kuremoto K, Noiri Y, Ishimoto T, Yoneda N, Yamamoto R, Maezono *et al.* (2014) Promotion of endodontic lesions in rats by a novel extraradicular biofilm model using obturation materials. *Appl Environ Microbiol.* 80: 3804 - 10.

38. Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One*. 3: e2836.

39. Kianoush N, Nguyen KA, Browne GV, Simonian M, Hunter N. (2014) pH gradient and distribution of streptococci, lactobacilli, prevotellae, and fusobacteria in carious dentine. *Clin Oral Investig.* 18: 659 - 69.

40. 奥田克爾（2004）口腔内バイオフィルム、医歯薬出版、東京: 7 - 8

41. Davies D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2: 114 - 22.

42. Löe H, Theilade E, Jensen SB. (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 36: 177 - 87.

43. Nyvad B, Fejerskov O. (1987) Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand J Dent Res.* 95: 287 - 96.

44. Nyvad B, Fejerskov O. (1989) Structure of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries. *Caries Res.* 23: 151 - 8.

45. Nyvad B. (1993) Microbial colonization of human tooth surfaces. *APMIS Suppl.* 32: 1 - 45.

46. Nyvad B, Fejerskov O. (1994) Development, structure and pH of dental plaque. *Textbook of clinical cariology*: 89 – 110

47. 恵比須繁之、野杁由一郎 (2006) 口腔のバイオフィルム　化学療法の領域 22: 545 – 51

48. Aagaard K, Petrosino J, Keitel W, Watson M, Katancik J, Garcia N. *et al.* (2013) The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB J.* 27: 1012 - 22.

49. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. (2008) Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 190: 4632 - 40.

50. Nyvad B, Kilian M. (1987) Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand J Dent Res.* 95: 369 - 80.

51. Ritz HL. (1967) Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 12: 1561 - 8.

52. Demuth DR, Duan Y, Brooks W, Holmes AR, McNab R, Jenkinson HF. (1996) Tandem genes encode cell-surface polypeptides SspA and SspB

which mediate adhesion of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* to human and bacterial receptors. *Mol Microbiol.* 20: 403 - 13.

53. Egland PG, Dû LD, Kolenbrander PE. (2001) Identification of independent *Streptococcus gordonii* SspA and SspB functions in coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun.* 69: 7512 - 6.

54. Takahashi Y, Konishi K, Cisar JO, Yoshikawa M. (2002) Identification and characterization of *hsa*, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1. *Infect Immun.* 70: 1209 - 18.

55. Palmer RJ Jr, Kazmerzak K, Hansen MC, Kolenbrander PE. (2001) Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms *in vitro* using saliva as the sole nutrient source. *Infect Immun.* 69: 5794 - 804.

56. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. (1994) Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17: 788 - 92.

57. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 25: 134 - 44.

58. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD. *et al.* (2004) Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 97: 1311 - 8

59. Lang NP, Cumming BR, Löe H. (1973) Toothbrushing frequency as it relates to plaque development and gingival health. *J Periodontol.* 44: 396 - 405.

60. Moore WE, Moore LV. (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol. 2000* 5: 66 - 77.

年齢	26 ～ 30（ 27.1 ± 1.2 ）歳
O'Leary の PCR	26.8 ± 15.6
DMF 歯数	6.7 ± 5.0
プロービング値	3mm 以下

表1 被験者の所見（n = 10）

genus	1h	4h	8h	12h	16h	24h	48h	60h	72h	96h
Actinomyces	3.80%	1.91%	0.84%	0.79%	0.77%	0.73%	0.75%	0.59%	0.54%	0.74%
Rothia	8.36%	13.8%	12.8%	13.3%	5.25%	7.04%	3.56%	3.53%	3.06%	1.95%
Capnocytophaga	2.31%	0.56%	0.43%	0.74%	1.59%	1.55%	3.53%	2.47%	4.94%	4.88%
Gemella	3.07%	2.72%	2.06%	1.64%	1.59%	2.70%	2.05%	1.57%	1.63%	2.00%
Streptococcus	28.9%	29.4%	31.8%	33.1%	32.4%	25.1%	15.8%	15.8%	15.8%	10.2%
Neisseria	7.09%	20.4%	21.0%	17.7%	26.9%	19.9%	18.7%	19.5%	25.1%	19.3%
Pasteurellaceae;Other	1.39%	2.09%	1.75%	1.51%	4.15%	8.08%	4.39%	5.29%	5.10%	5.19%
Haemophilus	4.67%	9.96%	10.9%	8.33%	7.81%	8.80%	6.91%	7.79%	10.0%	5.88%
Derxia	7.29%	3.12%	3.62%	4.45%	7.57%	1.83%	1.44%	0.80%	1.23%	1.64%
Porphyromonas	3.25%	2.83%	4.71%	8.15%	2.81%	10.7%	15.8%	15.8%	10.4%	11.7%
Prevotella	6.80%	3.30%	1.89%	2.01%	1.87%	4.73%	13.8%	10.3%	7.53%	12.4%
Fusobacterium	8.20%	3.47%	2.55%	2.76%	2.03%	2.89%	7.43%	9.44%	8.36%	15.0%

表 2 OTU の属分類

各被験者の各時点でのバイオフィルム形成細菌属の相対的割合

優勢な細菌属（平均の相対的割合が 1%以上の属）を示している。

各時点において、これらの割合の総数は少なくとも 85.2%を占めている。

A)

B)

C)

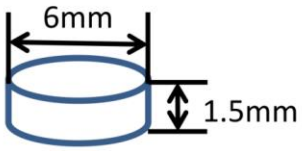

図1 *in situ*バイオフィルム形成モデル
口腔内装置はナイトガードを改良したもので、その上顎臼歯部頬側に8個のHAディスクを挿入している。
A) 口腔内装置の写真
B) 装着時の写真 （矢印はHAディスク）
C) HAディスクのサイズ

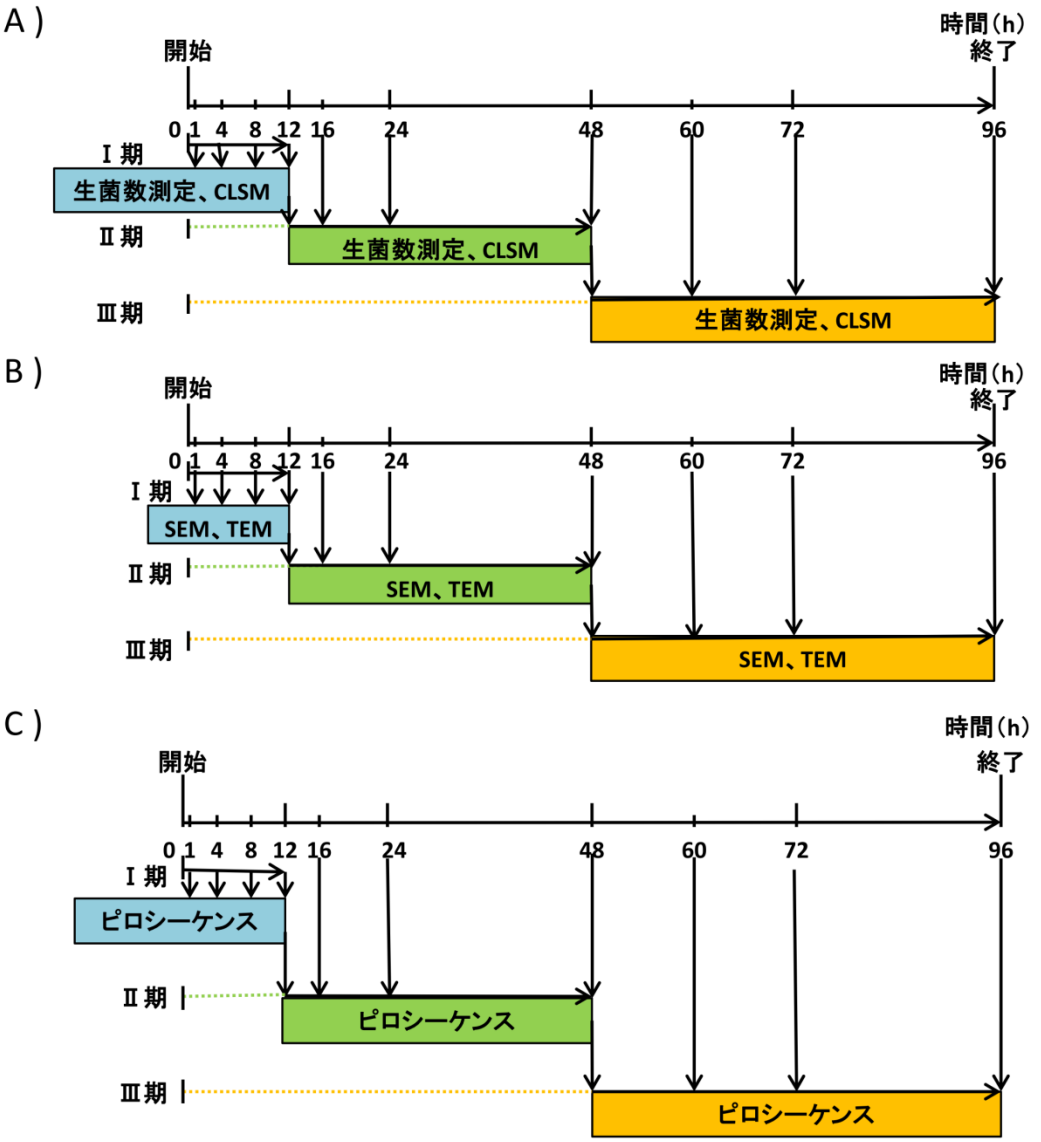

図2 実験スケジュール
A) バイオフィルム形成細菌の生菌数測定および共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）による3次元的定量解析
B) 走査型電子顕微鏡（SEM）および透過型電子顕微鏡（TEM)による観察
C) ピロシーケンスによるバイオフィルム形成細菌の同定

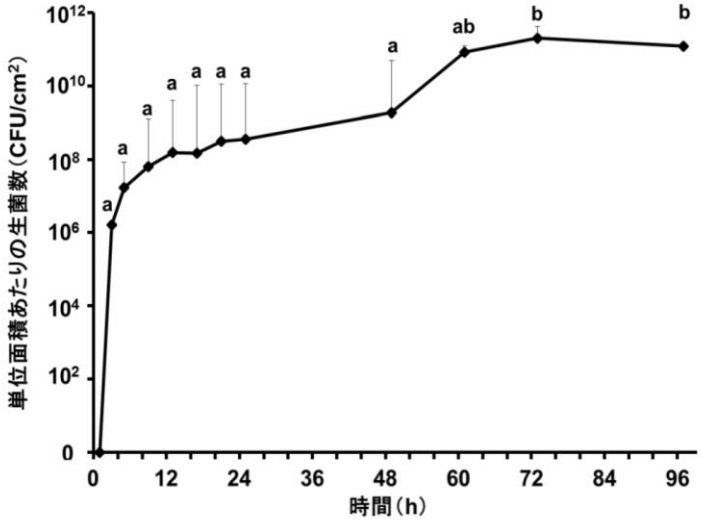

図3 バイオフィルム形成細菌の定量
縦棒は標準偏差を示す (n=10)。a, b: 異なる文字間で有意差を認める。
(一元配置分散分析, Tukey-Kramer法, $P < 0.05$)

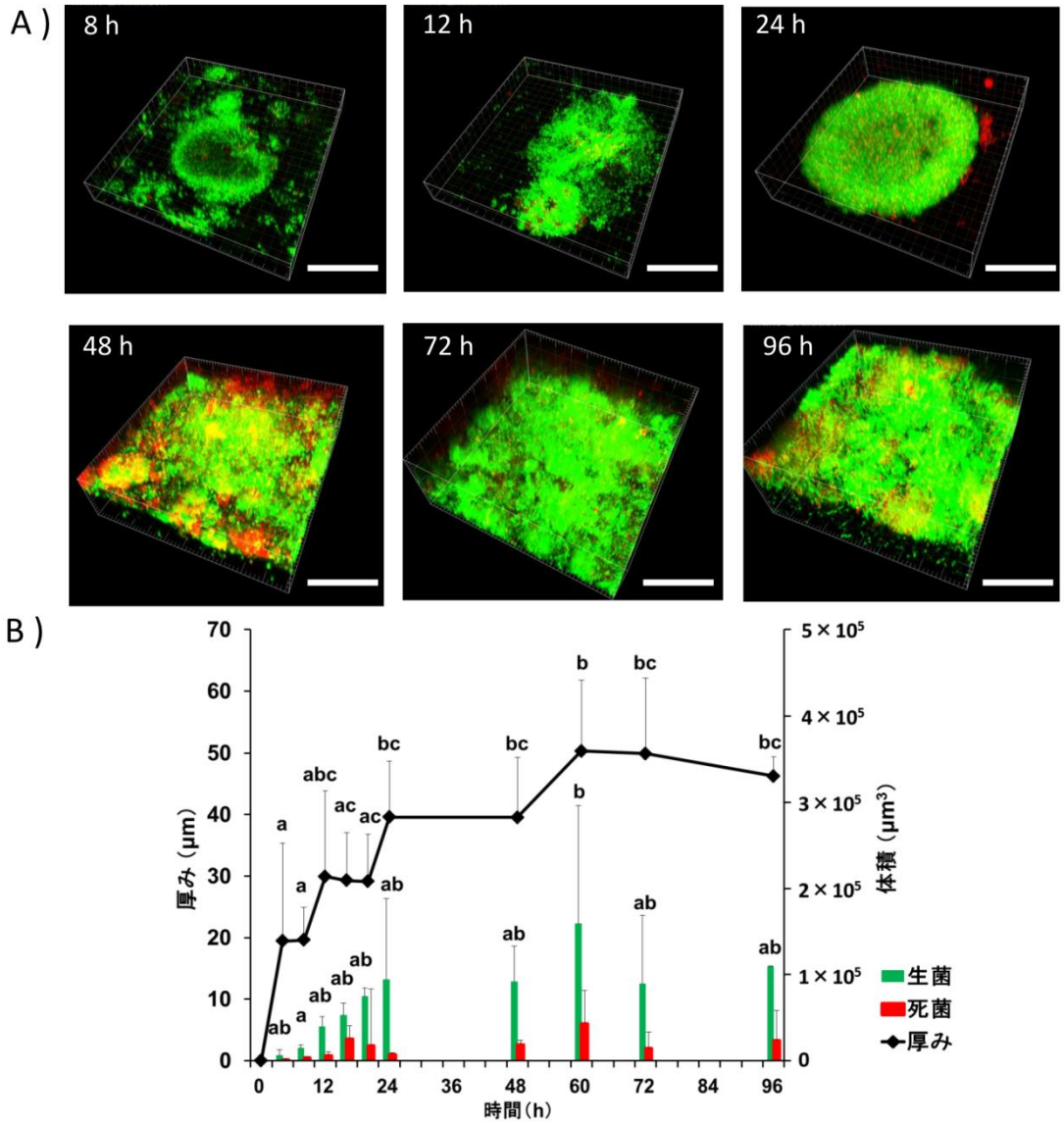

図4 CLSMを用いた3次元的定量解析

A) CLSM像

スケールバー: 50 μm、緑: 生菌、赤: 死菌

B) バイオフィルムの厚みおよび生菌・死菌の体積の測定

左軸は厚みを示し、右軸は体積を示す。縦棒は標準偏差を示す (n=10) 。

a, b, c: 同一グラフ線の異なる文字間で有意差を認める。(一元配置分散分析, Tukey-Kramer法, $P < 0.05$)

死菌の体積は、いずれの時点間でも有意差は認められなかった。

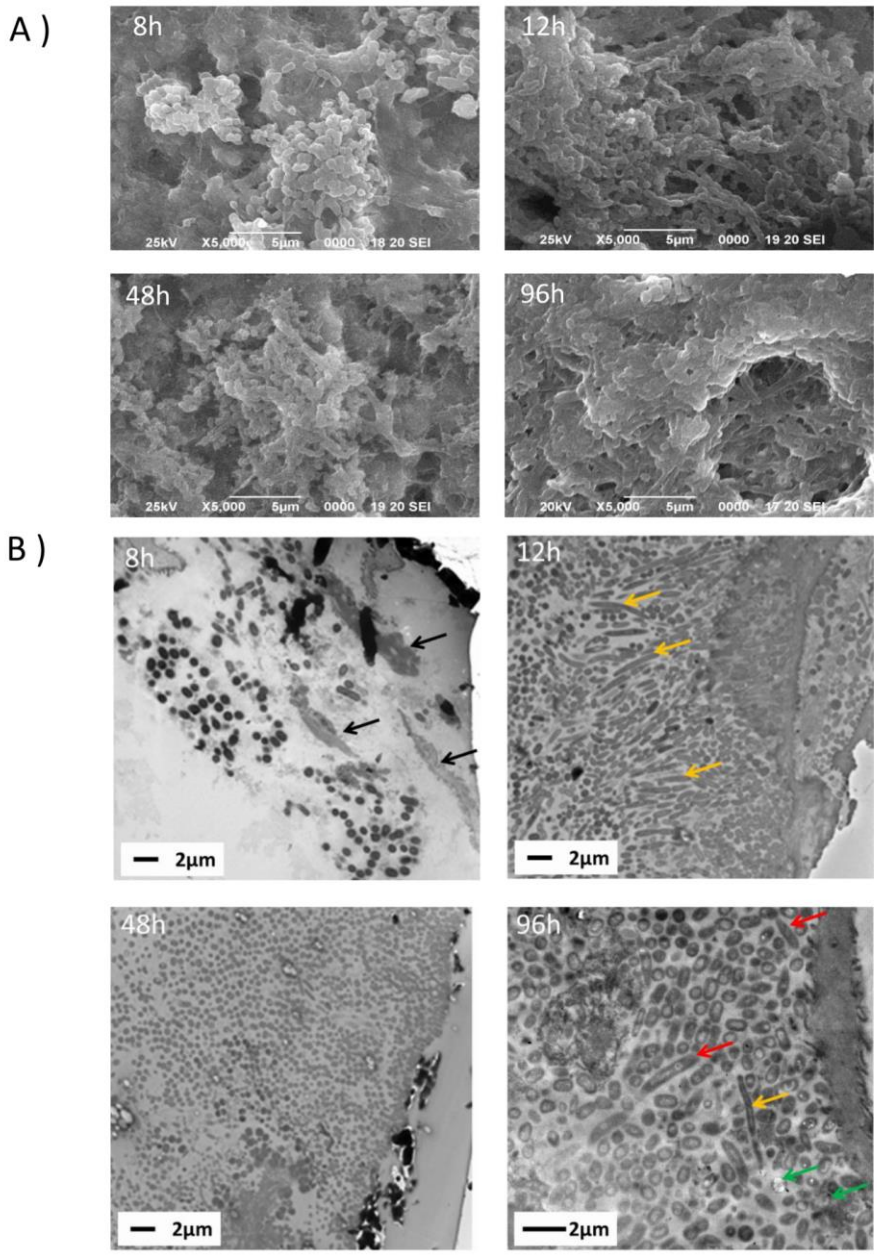

図5 微細形態学的観察
A) SEM像
B) TEM像
右側はHAディスク側を示す。黒矢印：ペリクル、黄矢印：糸状菌、赤矢印：紡錘菌、緑矢印：ゴーストセル

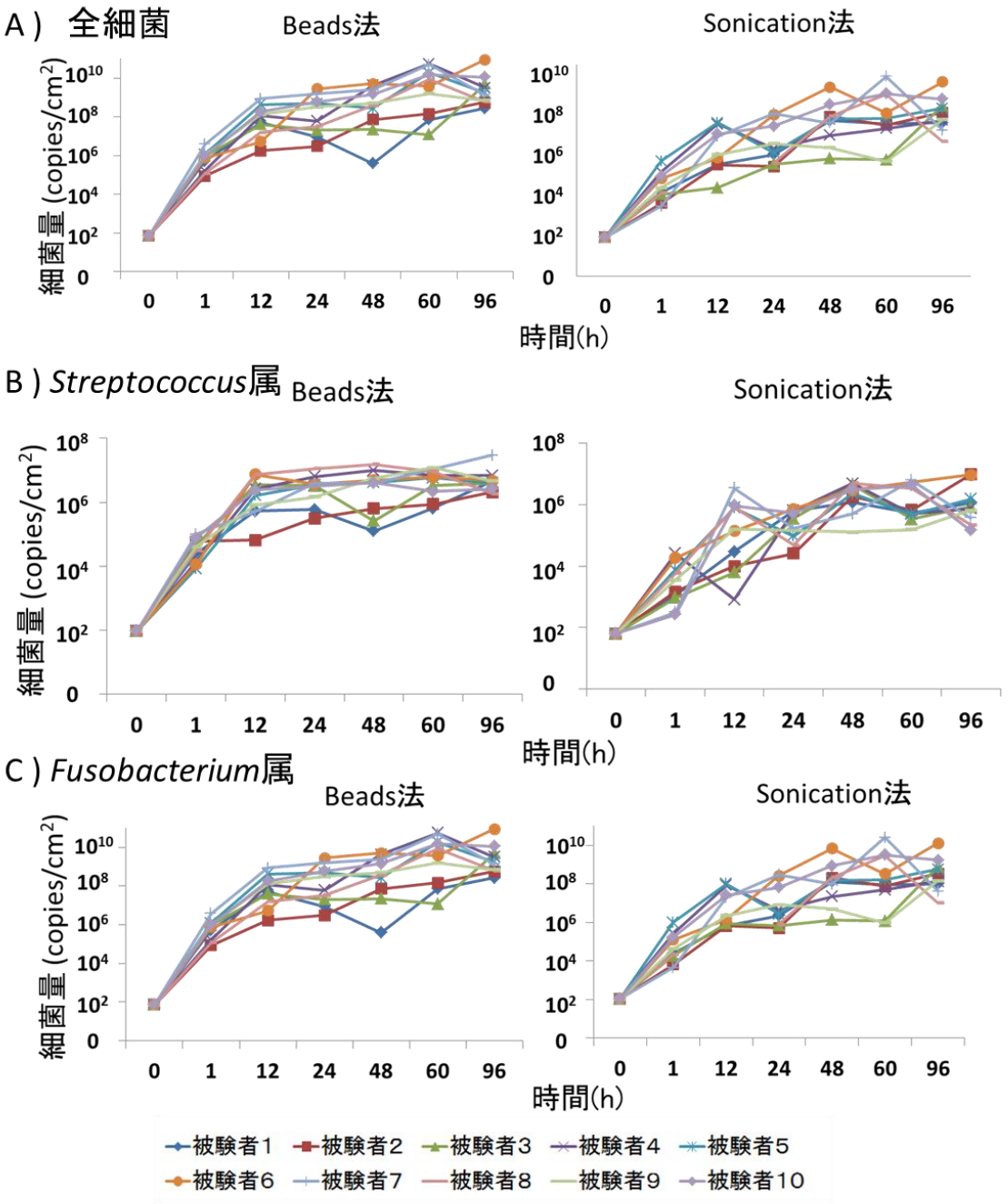

図6 リアルタイムPCRによるDNA抽出法の比較
全細菌(A)、*Streptococcus*属（B）、*Fusobacterium*属（C）の細菌量の経時的変化を示す。

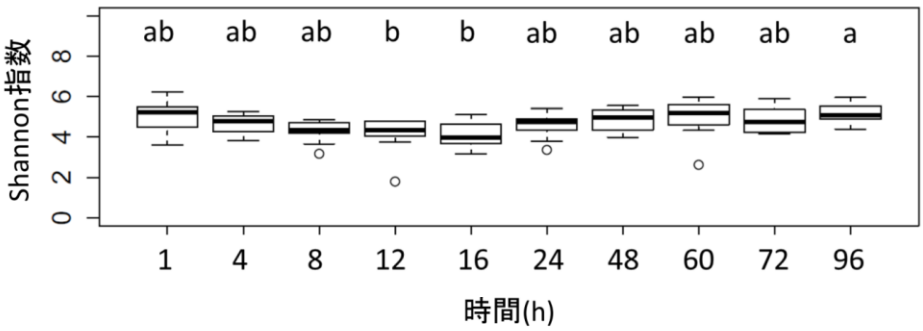

図7 口腔内細菌の多様性の経時的変化
ボックスプロットは全被験者の Shannon指数を示す。
ボックスの上辺は第 3 四分位点、下辺は第 1 四分位点
黒線は中央値、〇が外れ値を示す (n=10) 。
a, b : 異なる文字間で有意差を認める。
（Kruskal-Wallis検定, Steel-Dwass法, $P < 0.05$)

A)

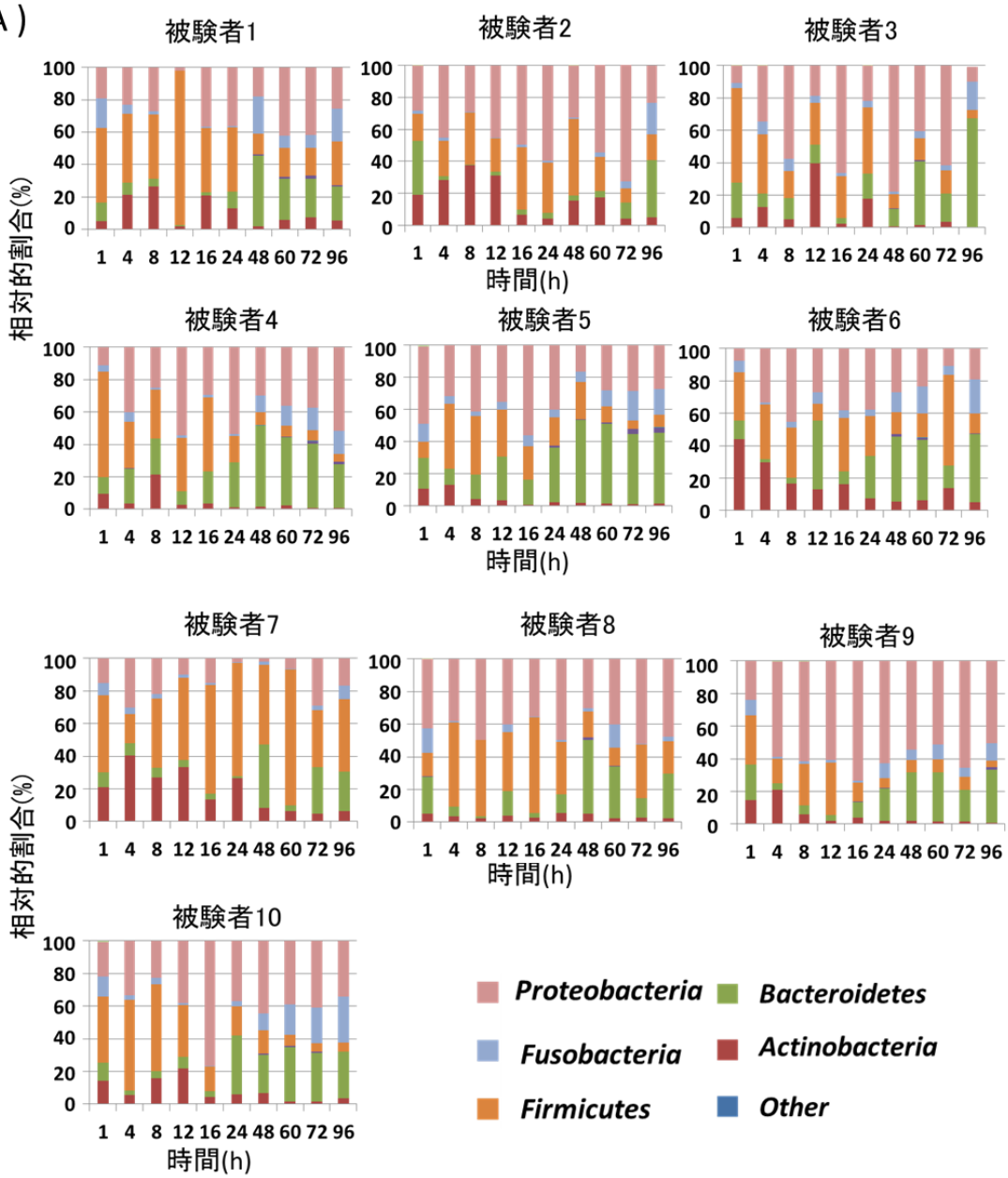

図 8 全被験者のシーケンスデータ

A) 各被験者の各時点におけるバイオフィルム形成細菌門の相対的割合

B)

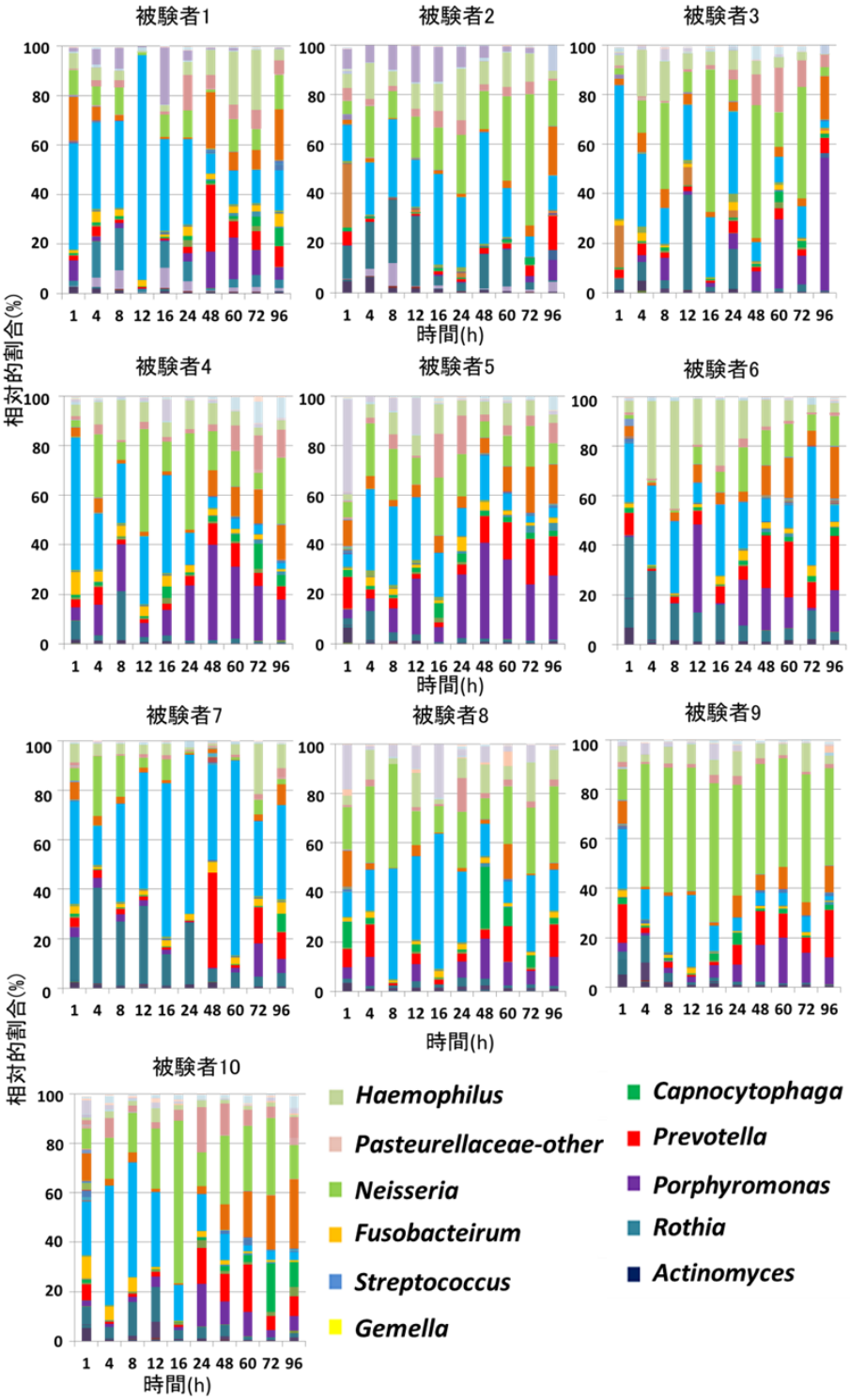

図8 全被験者のシーケンスデータ

B) 各被験者の各時点でのバイオフィルム形成細菌属の相対的割合
優勢な細菌属（平均の相対的割合が1%以上の属）を示す。

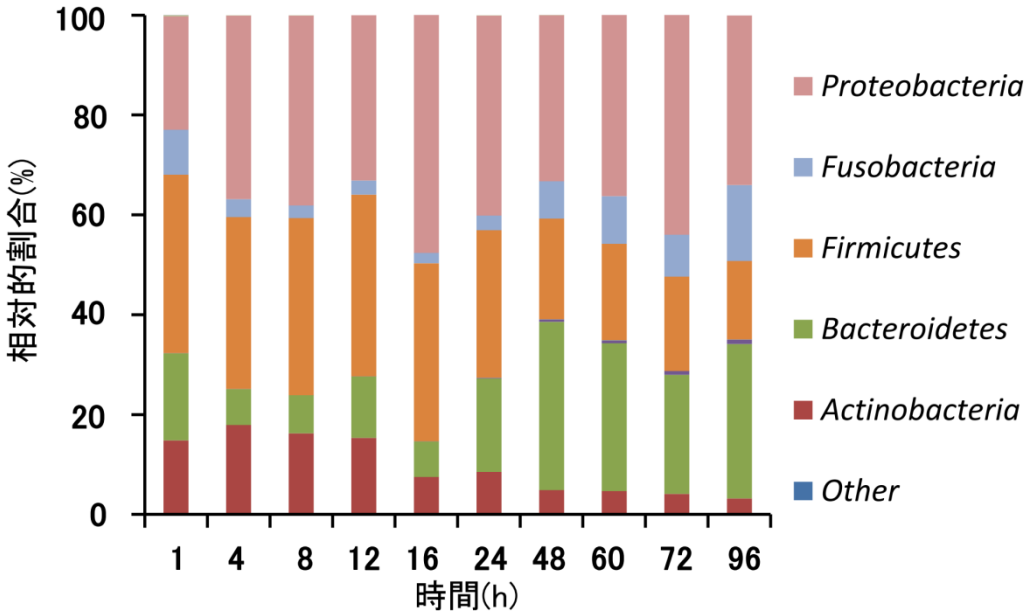

図9 各時点での各細菌門の相対的割合
全被験者のシーケンスデータを平均化した各細菌門の相対的割合を示す(n=10)。

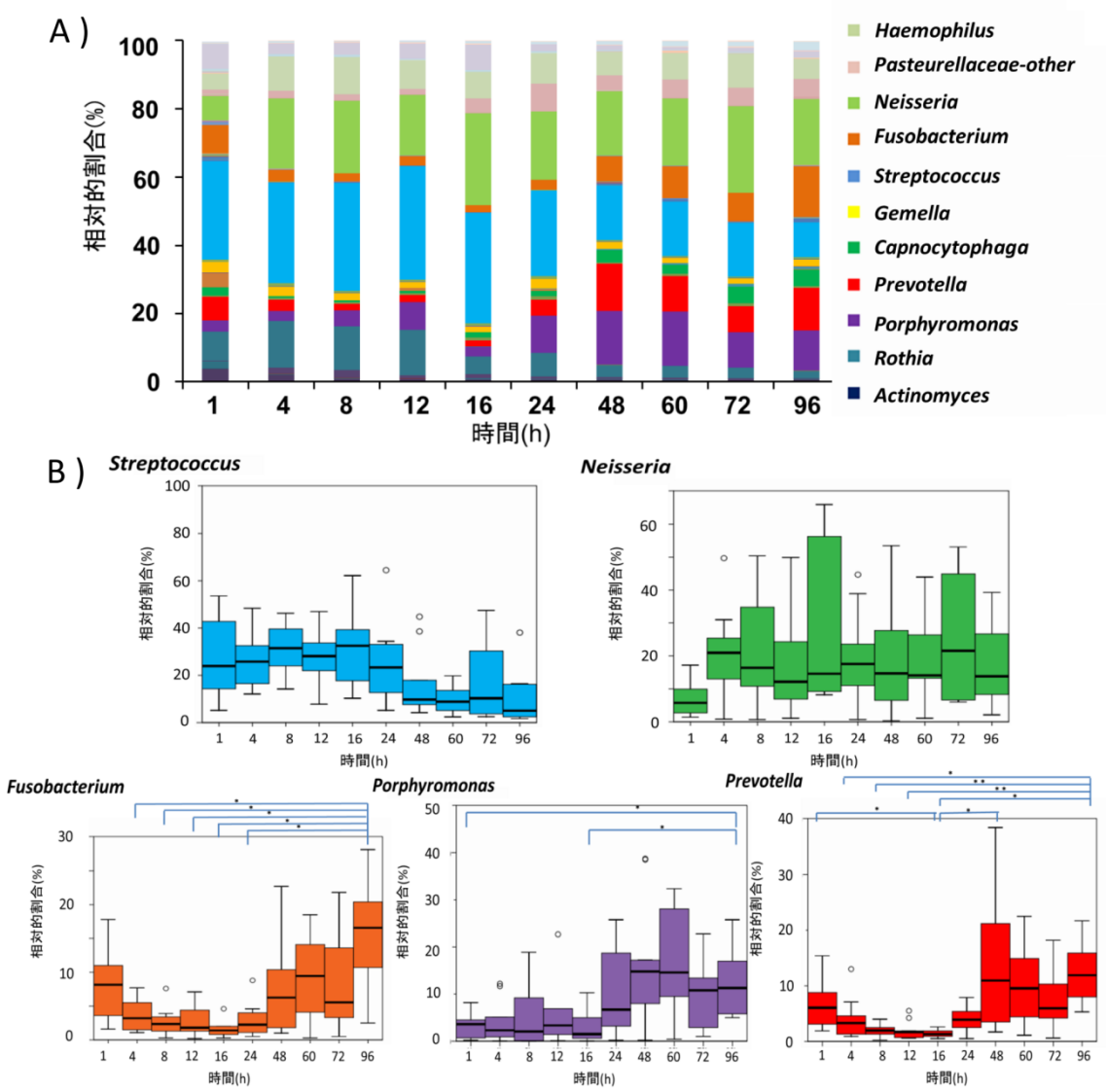

図10 各時点での各細菌属の相対的割合

A) 全被験者のシーケンスデータを平均化した各細菌属の相対的割合 (n=10)
優勢な細菌属（平均の相対的割合が1%以上の属）を示す。

B) 平均の相対的割合が5%以上の5属の経時的変化 (n=10)
ボックスの上辺は第 3 四分位点、下辺は第 1 四分位点
黒線は中央値、〇が外れ値を示す。
（Kruskal-Wallis検定, Steel-Dwass法, ＊ $P < 0.05$, ＊＊ $P < 0.01$ ）