

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	<a href="https://doi.org/10.18910/56140">https://doi.org/10.18910/56140</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 和氣 菜々子 )

論文題名 実験的 *in situ* デンタルバイオフィルムの包括的解析

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

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。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再現することは困難である。従って、ヒトのデンタルバイオフィルムを形成し、評価できるモデルを開発し、その形成メカニズムや制御・抑制法を検討することが重要である。そこで本研究では、ヒトの口腔で経時的にデンタルバイオフィルムを形成・評価できるモデルを開発し、そのモデル上で作製した実験的デンタルバイオフィルムの定量分析および構成細菌の経時的かつ包括的な解析を行うことで、ヒトの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を目的とした。

## 【材料及び方法】

1. *in situ* バイオフィルム形成モデルの開発

本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認下で実施した（承認番号 H24-E4）。本研究に関して同意の得られた被験者10人に装着した口腔内装置より試料を採取し、実験に供した。口腔内装置はナイトガードと同様に上顎に装着するもので、臼歯部頰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。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（1, 4, 8, 12, 16, 24, 48, 60, 72および96時間後）に評価した。評価は、バイオフィルム形成細菌の生菌数測定、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、共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）による3次元の定量解析を行った。さらに、16S rRNA 遺伝子を標的としたシーケンス解析を用いて、バイオフィルム形成細菌の同定を行った。なお、被験者のブラッシング方法および時間は均一化した。

## 2. バイオフィルム形成細菌の生菌数測定

サンプルを回収後、滅菌蒸留水に浸漬し、5分間超音波振動後、コロンビア羊溶血寒天培地に播種して48時間培養したのち、colony forming unit (CFU)を経時的に測定した。生菌数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。

## 3. SEM観察およびTEM観察

サンプルを回収後、ハーフカルノフスキー溶液で固定、エタノールによる脱水、凍結乾燥、白金蒸着後、SEM観察に供した。さらに、別のディスクを固定、脱水後、エポキシレジンにて包埋し、超薄切片を作製し、酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛にて2重染色後、TEM観察に供した。

## 4. CLSMによる3次元の定量解析

ディスク上に形成したバイオフィルムをLIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kitにて染色し、CLSMにて3次元の観察を行った。また、画像解析ソフト（Imaris 5.0.1）より得られた像から、バイオフィルムの厚みおよび生菌・死菌の体積の解析を行った。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。

## 5. バイオフィーム形成細菌の同定

PowerSoil® DNA Isolation Kitを用いて試料よりDNAを抽出した後、16S rRNA遺伝子を標的とし、次世代シーケンサーIonPGM®を用いピロシーケンスを行い、得られたシーケンスデータはQIIME®を用いて解析した。口腔内細菌の多様性の変化は Shannon指数を用いて解析した。Shannon指数、各細菌属の割合はKruskal-Wallis検定および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。

### 【結果および考察】

#### 1. バイオフィーム形成細菌の生菌数測定およびCLSMによる3次元定量解析

バイオフィーム形成細菌数は12時間後まで急速な増加を示し、その後漸増した後、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。また、CLSM像より、時間の経過とともにバイオフィームの付着面積が増加しており、生菌と死菌の混在したバイオフィームが観察できた。その厚みおよび生菌・死菌の体積の増加は、生菌数の増加とほぼ同様に二相性の増加傾向を示した。

#### 2. SEMおよびTEMによる観察

SEMおよびTEM観察により、8時間後にバイオフィームが観察され、12時間後には球菌主体のマルチレイヤーからなるバイオフィームが形成された。その後、48時間後になると、球菌、糸状菌、紡錘菌といった多様な細菌型から構成されるバイオフィームへと成熟していくことが示された。

#### 3. バイオフィーム形成細菌の同定

これまでの報告ではデンタルバイオフィー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が、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時間後で最も高くなることが明らかとなった。これは、12時間後及び16時間後に酸素分圧が減少するために好気性菌が減少する一方、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、バイオフィーム環境が嫌気性に偏ることで、偏性嫌気性菌が附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。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ものの、統計処理を行ったところ一定の傾向が認められた。すなわち、門レベルにおいて、16時間後まではFirmicutes門が優勢であり、その後48時間後にFusobacteria門およびBacteroidetes門の割合が増加した。さらに、属レベルではおよそ16時間後までStreptococcus属が20%以上を占めていたのに対し、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が優勢となり、96時間後には短期間と比較し、統計学的に有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。これは通性嫌気性菌であるStreptococcus属が初期段階で急速な増加を示した後、バイオフィーム内が嫌気的環境になることで、その後偏性嫌気性菌であるFusobacterium属、Prevotella属およびPorphyromonas属が急速な増加を示したのではないかと推察される。本研究により、開発された *in situ* デンタルバイオフィームモデルを用いて、口腔内細菌の多様性の解析を行うことが可能となった。今後は、本モデルを用いて、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行い、健常者の結果と比較することを検討している。それらにより、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と期待される。

### 【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ームを実験的に形成し、経時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ー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。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 和 氣 菜 々 子 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	林 美加子
	副 査	教授	川端 重忠
	副 査	准教授	中村 渉
	副 査	講師	大川 玲奈
<b>論文審査の結果の要旨</b>			
<p>本研究は、ヒトの口腔で歯肉縁上デンタルバイオフィルムを形成・評価できるモデルを開発し、形成した実験的バイオフィルムを経時的かつ包括的に検索したものである。</p> <p>その結果、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が明らかになり、それは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により生じることを解明した。</p> <p>以上の研究成果は、ヒトのデンタルバイオフィルムの形成メカニズムを解明するうえで重要な知見であり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。</p>			