The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	睡眠が口腔バイオフィルムに及ぼす影響
Author(s)	外園, 真規
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76295
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　外園　真規　）	
論文題名	睡眠が口腔バイオフィルムに及ぼす影響

論文内容の要旨

【背景・目的】

口腔内には700種を超える微生物が多様な部位に生息し，バイオフィルムを形成している。睡眠中に唾液中の細菌数が急増することが報告され，就寝前のプラークコントロール実施の理論的根拠とされているが，歯面など他の部位に関しては睡眠との関連は明らかにされていない。本研究では，効果的な口腔ケアを探求することを最終目標として，まず，口腔内の各部位に形成されるバイオフィルムに対する睡眠の影響を検索した。さらに，口腔内で実験的デンタルバイオフィルムを形成することのできる*in situ*デンタルバイオフィルムモデルを用いて睡眠の影響に関する包括的解析を行った。

【方法】

1. 被験者の選択

被験者は，全身および口腔に異常の認められない本研究に同意の得られた大阪大学歯学研究科職員および学生10名とした。本研究は，大阪大学歯学研究科倫理委員会の承認を受けて実施した (H29-E17, H30-E42) 。

2. 口腔内の各部位における細菌叢の睡眠による変化

試料採取の1週間前および24時間前に術者による口腔清掃を行い，唾液，歯肉縁上および歯肉縁下デンタルバイオフィルム，舌表面，硬口蓋表面，頬粘膜表面，角化歯肉表面に形成されたバイオフィルムを採取した。試料の採取は，就寝前および起床直後に行う2つのスケジュールで行った。採取した試料からDNAを抽出し，16S rRNAを標的としたユニバーサルプライマーを用いてV1-V2領域を増幅，MiSeq®にてメタゲノム解析を行った。統計学的有意差の検定は，Wilcoxon rank sum testを用い，危険率5 %で評価した。

3. 睡眠による実験的デンタルバイオフィルムの変化

*in situ*デンタルバイオフィルムモデルを用いて実験的バイオフィルムを形成した。このモデルは被験者の上顎に装着した口腔内装置の頬側に歯面を模倣したハイドロキシアパタイトディスク (HAディスク) を設置して，バイオフィルムを形成させるものである。実験は覚醒群と睡眠群に分けて行い，覚醒群では8：00に，睡眠群では24：00に口腔内装置の装着を開始した。両群とも睡眠時間は24：00から8：00に統一した。口腔内装置の装着開始から8，16，24時間後に試料としてHAディスクを採取し，HAディスク上に形成されたバイオフィルムを以下の実験に供した。

1) 生菌数測定

採取したバイオフィルムを剥離，懸濁後，コロンビアヒツジ血液寒天培地に播種し，好気および嫌気条件下で培養後にコロニー数を測定した。

2) リアルタイムPCRによる総菌数測定

DNA抽出後，16S rRNAのV1-V2領域を標的としたユニバーサルプライマーを用いて，7500 Fast Real-Time PCR systemにてリアルタイムPCRを行い，総菌数を測定した。

3) メタゲノム解析

上記2.項と同様の方法で解析を行った。

4) 共焦点レーザー顕微鏡観察(CLSM観察)

菌体外多糖およびDNAをFITC標識concanavalin A，FITC標識Wheat Germ AgglutininおよびDiamid-2-phenylindoleで蛍光標識し，CLSMにて観察した後，画像解析ソフトImaris®にて三次元的解析を行った。

5) リアルタイムPCRによる遺伝子発現量の検索

形成開始から24時間後の試料を5分間超音波処理し，RNA抽出後，cDNAを合成した。代表的な病原性細菌および

病原遺伝子として,う蝕に関しては*Streptococcus mutans*のグルコシルトランスフェラーゼB (*gtfB*) , 歯周病に関しては*Prevotella intermedia*のインターパインA (*inpA*) ,*Fusobacterium nucleatum*の接着因子 (*fadA*) ,*Porphyromonas gingivalis*のリシン特異的ジンジパイン (*kgp*) を標的としリアルタイムPCRを行った。

6) 統計学的有意差の検定

相対的割合と遺伝子発現に関してはWilcoxon rank sum test,その他に関してはFriedman testを用い，危険率5 %で評価した。

【結果および考察】

1. 口腔内の各部位における細菌叢の睡眠による変化

起床直後と就寝前の各細菌種の属レベルでの相対的割合を比較したところ，個人差はあるものの共通の傾向が認められた。すなわち，頬粘膜表面，口蓋粘膜表面，唾液，舌表面のバイオフィルムで*Prevotella*属の相対的割合は起床直後において就寝前よりも有意に高く，他の試料採取部位においても起床直後に高い傾向を示した。これとは対照的に，*Streptococcus*属の相対的割合はほとんどの部位で起床直後よりも就寝前で高い傾向があった。*Rothia*属の相対的割合は，歯肉表面のバイオフィルムでは就寝前より起床直後に有意に高かったが，唾液および舌においては就寝前で有意に割合が高く，同じ細菌種であっても採取部位により睡眠による相対的割合の変化が異なっていた。睡眠により属レベルでの細菌構成が変化することが明らかとなったが，その変化はバイオフィルム形成部位によって異なることが示唆された。

2. 睡眠による実験的デンタルバイオフィルムの変化

1) 生菌数測定

バイオフィルム構成細菌の生菌数は，覚醒群と睡眠群を比較すると，すべての試料採取時間において2群間に有意差を認めなかった。睡眠中に唾液中の細菌数が増加するという半世紀前の報告より，睡眠時に形成されるバイオフィルムの細菌数も増加すると推測されているが，単位面積当たりの生菌数は睡眠により変化しなかった。

2) リアルタイムPCRによる総菌数測定

生菌数と同様，バイオフィルム構成細菌の総菌数はすべての試料採取時間で2群間に有意差を認めなかった。

3) メタゲノム解析

8時間後に，覚醒群で*Neisseria*属の割合が有意に高く，一方で睡眠群では*Prevotella*属や*Fusobacterium*属の割合が有意に高かった。24時間後には，覚醒群において睡眠群よりも*Fusobacterium*属や*Prevotella*属の割合が有意に高く，*Streptococcus*属の割合が有意に低かった。生菌数測定および総菌数測定の結果と併せると，バイオフィルム構成細菌数は変化しないが，8時間の睡眠後に一部の偏性嫌気性細菌の相対的割合が高くなることが明らかとなった。

4) CLSM観察

8時間後に，菌体外多糖の体積は，睡眠群と比較し覚醒群で有意に大きかった。睡眠中の口腔内細菌の主な栄養源は唾液であり，睡眠中には唾液に含まれる糖やタンパク量が低下することが報告されている。このことから栄養状態の差異がバイオフィルムの構造に影響したことが示唆された。

5) リアルタイムPCRによる遺伝子発現量の検索

各病原遺伝子の細菌種あたりの相対的発現量は，*fadA*は起床直後に就寝前より有意に高く，*kgp*も起床直後に高い傾向があり，起床直後に一部の細菌の歯周病に関連する遺伝子発現が上昇していることが示唆された。*fadA*や*kgp*とは対照的に*inpA*の相対的遺伝子発現量は就寝前に起床直後よりも有意に高かった。インターパインAはアルブミン分解酵素として作用しており，唾液中アルブミン濃度は午後11時に最高となることが報告されている。このことから*inpA*は基質であるアルブミン濃度に依存して就寝前に発現が上昇したと考えられる。

【結論】

本研究より，部位によって程度は様々であるが，睡眠後に各部位での口腔バイオフィルムの構成細菌の割合が変化することが示された。また，睡眠によって実験的デンタルバイオフィルム構成細菌数は変化しないが，睡眠の直後には*Prevotella*属などの偏性嫌気性細菌の割合が高くなることや睡眠中の菌体外多糖の産生が低下すること，および睡眠により病原遺伝子の発現量が変化することが明らかとなった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　外園　真規　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	林　美加子
	副 査　教授	川端　重忠
	副 査　准教授	野村　良太
	副 査　講師	村上　旬平

論文審査の結果の要旨

本研究では，効果的な口腔ケアの介入時期を探求する一環として，睡眠が口腔バイオフィルムに与える影響を検索した.

その結果，デンタルバイオフィルム構成細菌数は睡眠により変化しないが，睡眠後には *Prevotella* 属などの偏性嫌気性細菌の割合が高くなること，および，睡眠後には一部の細菌の歯周病に関連する遺伝子の発現量が高くなることが明らかとなった.

以上の研究成果は，起床後の口腔ケアを提案する新たな科学的根拠となるものであり，本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める.