

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学位論文

睡眠が口腔バイオフィルムに及ぼす影響

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)

外園 真規

目次

I. 緒言	1
II. 実験方法および結果	5
1. 口腔内の各部位における細菌叢の睡眠による変化	5
1) 方法	
2) 結果	
2. 睡眠による実験的デンタルバイオフィルムの変化	9
(1) 実験的バイオフィルムの構造および細菌叢	
1) 方法	
2) 結果	
(2) 実験的デンタルバイオフィルムの病原性	
1) 方法	
2) 結果	
III. 考察	18
IV. 結論	26
V. 謝辞	27
VI. 参考文献	28
VII. 図表	38

本論文の一部は、

第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2017 年, 10 月, 岩手) , 第 61 回春季
日本歯周病学会学術大会 (2018 年, 6 月, 東京) , 第 32 回日本バイオフィルム
学会学術集会 (2018 年, 7 月, 栃木) , 97th International Association for Dental
Research General Session (July, 2019, Vancouver, Canada) , 第 33 回日本バイオフィ
ルム学会学術集会 (2019 年, 7 月, 福岡) において発表した。

I. 緒言

人体では、皮膚、口腔、鼻腔、腸および膣などそれぞれの部位で細菌が固有の生態系を築いている。ヒトの口腔内には700種を超える微生物が生息しており、歯面、口蓋、頬粘膜、歯肉および舌など様々な部位でバイオフィルムを形成している [1, 2, 3]。特に、歯面に形成されるデンタルバイオフィルムは、世界的に罹患者の多い慢性感染性疾患であるう蝕や歯周病といった口腔感染症の原因であるとされてきた [4, 5, 6]。このことに加え、近年では口腔内細菌叢の不均衡 (dysbiosis) がう蝕および歯周病の発症に関わるとされている [7, 8]。したがって、口腔感染症の予防のためには、デンタルバイオフィルムをはじめとした口腔バイオフィルムを構成する細菌叢を理解し、健康側に制御することが重要である。

バイオフィルムは、菌体と菌体外マトリックスから構成されているが、菌体外マトリックスの存在によって抗菌物質が浸透しにくいこと [9]、バイオフィルム中の細菌は浮遊細菌とは異なる遺伝子発現を示すこと [10, 11] や、バイオフィルム下層の細菌は休眠状態に近い細胞が多いこと [12, 13] など、さまざまな機序によりバイオフィルムは抗菌物質に対する抵抗性を示す [14, 15, 16]。このため、デンタルバイオフィルムを含む口腔バイオフィルムの除去は、ブラッシングなどによる機械的除去が最も効果的であるとされているが、口腔ケアの効

果的な介入時期についてはいまだ不明な点が多い。例えば、就寝前に口腔ケアを実施することが重要であるという考えが広く浸透しているが、この理論的根拠は、睡眠時には唾液分泌量が低下し [17]，唾液中の細菌数が睡眠中に急激に増加し起床時に最も多くなるという古典的な報告 [18] である。しかし、これは唾液中の細菌数を評価したもので、う蝕や歯周病の原因とされているデンタルバイオフィームを含む口腔バイオフィームは考慮されていない。

近年の次世代シーケンサーなどのゲノム解析技術の発達により、ヒト細菌叢の解析が疾患の予防や治療法の開発につながり得る標的として注目されている。健康なヒト細菌叢の特徴および細菌叢と疾患との関連を明らかとするために、Human Microbiome Project (HMP, 2007-2016年) によりヒトの様々な部位の細菌叢が 16S rRNA シーケンス解析により検索された [1]。その結果、ヒト口腔細菌叢は腸内細菌叢と並んで、ヒト細菌叢の中で構成細菌の種類が多く、多様性の高い部位の一つであることが明らかとなった [19]。また、唾液およびデンタルバイオフィームの細菌叢は被験者間における多様性が高く、さらに口腔はブラッシングなどの宿主の行動の影響を受けやすいため、同一被験者でも経時的に細菌叢が変化することが示されている [20]。一方で、睡眠の口腔バイオフィーム細菌叢への影響は、その検索方法の困難さなどから、ほとんど研究されていない。

ところで、デンタルバイオフィームを評価するために、これまで様々な *in vitro*

モデルが開発され [21, 22, 23, 24] , 抗菌効果を有する物質の抗バイオフィルム効果の検討やその作用機序の解明, バイオフィルム細菌の遺伝子発現など, 多くのバイオフィルムに関する研究が行われてきた。しかし, デンタルバイオフィルムは, 唾液, pH, 酵素および宿主免疫など様々な因子の影響を受けながら形成されているため [9] , *in vitro* モデルではこれらの因子を総合的に反映させることが不可能であり, 口腔内の実態を再現することができない。また, 口腔内で形成されたバイオフィルムを対象とした研究においては, ペーパーポイントを用いて歯面や歯肉溝から歯肉縁下デンタルバイオフィルムを採取する方法 [25, 26, 27] , キュレットなどの歯科用インスツルメントを用いて歯肉縁上および歯肉縁下デンタルバイオフィルムを採取する方法 [27] および歯ブラシを用いてデンタルバイオフィルムを採取する方法 [28] などが行われてきた。しかし, これらの方法では定量的解析が困難であり, また, 採取の際にバイオフィルムが器具により破壊されるため構造解析が不可能である。

そこで, 先行研究において, 口腔内で実験的にデンタルバイオフィルムを形成できる *in situ* デンタルバイオフィルムモデルを開発し [29] , バイオフィルムを経時的かつ定量的に解析することや構造解析を可能とした。そこでは, デンタルバイオフィルム構成細菌数およびデンタルバイオフィルムの厚みは形成開始から 48 時間を境に二相性の増加を示すこと, また 16S rRNA シーケンス解析によ

り、形成開始から 48 時間後に *Fusobacterium* 属および *Prevotella* 属といった偏性嫌気性細菌の相対的割合が増加してくることを報告した [29]。

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細菌叢に与える影響を検索した。さらに、*in situ* デンタルバイオフィルムモデルを用いて、睡眠がデンタルバイオフィルム構成細菌数に与える影響を定量的に測定するとともに、睡眠がデンタルバイオフィルムの構造および細菌叢に与える影響についても包括的に解析した。

II. 実験方法及び結果

1. 口腔内の各部位における細菌叢の睡眠による変化

1) 方法

① 試料の採取

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 H30-E42）。以下の基準を満たす大阪大学大学院歯学研究科職員および学生 10 名を対象とした。①全身疾患がない、②未処置のう蝕がない、③4 mm 以上の歯周ポケットがない、④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、⑤喫煙をしない者を被験者の選択基準とした [30]。基準を満たした 10 名の被験者のうち、男性は 6 名、女性は 4 名で、年齢は 27～32 歳であった。これらの被験者の DMF 歯数の平均は 4.5 であった。

試料採取を起床直後に行う群（起床直後群）と就寝前に行う群（就寝前群）の両群を、すべての被験者に対して適用した（図 1）。各群とも、試料採取の 7 日前および 24 時間前に術者による口腔内清掃を実施した。睡眠時間は、24：00 から 8：00 に統一し、起床直後群では 8：00 に、就寝前群では 24：00 に試料採取を行った。2 回目の口腔内清掃以降は、試料採取まで被験者自身によるブラッシングなどの口腔内清掃は控えるよう指示し、口腔バイオフィルムの形成時間を 24 時間に均一化した。

試料の採取は、HMP の方法 [1, 31] を一部改変して行った。すなわち、頬粘膜、硬口蓋粘膜、舌、歯肉粘膜表面のバイオフィームは、Isohelix swab (Sci Trove, Kent, United Kingdom) を用いて採取を行った。また、グレーシーキュレットを用いて、上顎右側第一大臼歯、下顎左側第一大臼歯、上顎左側中切歯、下顎右側中切歯、上顎左側第一小臼歯、下顎右側第一小臼歯の歯肉縁上および歯肉縁下デンタルバイオフィームを採取した。唾液は安静時唾液を採取し、100 μ l を実験に供した。

② シーケンス解析

採取した試料は、DNeasy[®] PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出し、16S rRNA を標的としたユニバーサルプライマー (表 1) を用いて V1-V2 領域を MiSeq[®] (Illumina Inc., San Diego, California, U.S.A.) にて増幅し、97%相同性カットオフに基づく操作的分類単位 (Operative Taxonomic Units, OTU) でクラスタリングを行った。シーケンス結果は、Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) pipeline を用いて解析した。

細菌叢構造の評価は、統計分析ソフト R 3.6.1 を用いて、Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) および危険率 5% にて Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) を行った。相対的割合に関する統計学的有意差の検定は、IBM SPSS[®] Statistics (version 22.0, IBM SPSS Inc., Endicott, New York,

U.S.A.) を用いて、Wilcoxon rank sum test を危険率 5 %にて行った。

2) 結果

全試料を対象とした Bray-Curtis distance に基づく NMDS の結果を図 2 に示す。

Bray-Curtis distance に基づく PERMANOVA より、採取部位によって細菌叢構造が有意に異なることが示された (PERMANOVA, $P=0.001$)。また、試料採取部位ごとに NMDS を行った結果を図 3 に示す。舌において起床直後と就寝前の細菌叢構造が有意に異なっていた (PERMANOVA, $P=0.046$)。

次に、門レベルおよび属レベルにおける各細菌種の相対的割合を、図 4 および図 5 に示す。門レベル (図 4) では、*Actinobacteria* 門は歯肉粘膜において、他の部位と比較し相対的割合が低いことが明らかとなった。*Firmicutes* 門の割合は、頬粘膜、口蓋および歯肉粘膜では 50%程度であったのに対し、歯肉縁下デンタルバイオフィルム、歯肉縁上デンタルバイオフィルム、唾液および舌表面では 15~30%と低い結果となった。属レベル (図 5) では、歯肉粘膜において、*Actinomyces* 属の相対的割合は他部位と比較し低かった。一方、歯肉縁下および歯肉縁上デンタルバイオフィルムでは、*Corynebacterium* 属および *Capnocytophaga* 属の相対的割合が他部位よりも高い結果となった。就寝前および起床直後における口腔バイオフィルム構成細菌のうち、相対的割合に有意差を認めた属を図 6 に示す。*Prevotella* 属は、頬粘膜、口蓋粘膜、舌表面、および

唾液において、就寝前と比較し起床直後に有意に割合が高かった (Wilcoxon rank sum test, 頬粘膜 : $P=0.013$, 口蓋粘膜 : $P=0.028$, 舌 : $P=0.013$, 唾液 : $P=0.011$) 。

Corynebacterium 属は、頬粘膜, 口蓋粘膜, 歯肉粘膜および歯肉縁上デンタルバイオフィルムで、就寝前より起床直後に有意に割合が高かった (Wilcoxon rank sum test, 頬粘膜 : $P=0.015$, 口蓋粘膜 : $P=0.013$, 歯肉粘膜 : $P=0.031$, 歯肉縁上デンタルバイオフィルム : $P=0.022$) 。上記の属とは対照的に *Streptococcus* 属の相対的割合は、頬粘膜において起床直後よりも就寝前に有意に高い結果となった (Wilcoxon rank sum test, $P=0.005$) 。

Rothia 属の相対的割合は歯肉粘膜では就寝前よりも起床直後に有意に高く (Wilcoxon rank sum test, $P=0.011$) , 一方、唾液および舌においては就寝前に有意に高い結果となり (Wilcoxon rank sum test, 唾液 : $P=0.007$, 舌 : $P=0.022$) , 同じ細菌種であっても部位によって睡眠が及ぼす影響が異なっていた。

2. 睡眠による実験的デンタルバイオフィルムの変化

(1) 実験的デンタルバイオフィルムの構造および細菌叢

1) 方法

① *in situ* デンタルバイオフィルムの形成

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 H29-E17）。被験者の選択基準は 1. 項と同様とし、大阪大学大学院歯学研究科職員および学生を対象とした。基準を満たした 10 名の被験者のうち、男性は 7 名、女性は 3 名で、年齢は 26～30 歳であった。これらの被験者の DMF 歯数の平均は 5.1 であった。実験的デンタルバイオフィルムの形成は、*in situ* デンタルバイオフィルムモデル [29] を用いて行った（図 7）。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直径 6 mm、厚さ 1.5 mm のハイドロキシアパタイトディスク（HA ディスク、オリンパステルモバイオマテリアル株式会社、東京、日本）を挿入し、ディスク上に実験的にバイオフィルムを形成させるものである。口腔内装置は、厚さ 1.5 mm の熱可塑性レジンシート（Erkodule, Erkodent, Pfalzgrafenweiler, Germany）を用いて作製した。実験は、バイオフィルムを覚醒時から形成し始める覚醒群と睡眠直前から形成し始める睡眠群に分けて行い、両群を全ての被験者に適用した。覚醒群では 8:00 に、睡眠群では就寝前の 24:00 に口腔内装置の装着を開始した（図 8）。バイオフィ

ルム形成開始から 8, 16, 24 時間後に HA ディスクを採取し、以下の実験に供した。口腔内装置で一度に使用できるディスクの枚数が限られているため、I 期と II 期に分け実験を行った (図 8)。すなわち、I 期では各試料採取時間に HA ディスクを 2 枚ずつ採取し、一方を生菌数測定、他方を総菌数測定およびシーケンス解析に供する DNA 抽出に用いた。また、II 期には各試料採取時間に HA ディスクを 2 枚ずつ採取し、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。両群とも睡眠時間を 24:00 から翌日 8:00 までの 8 時間に統一した。食事の際は口腔内装置を水中で保管し、ブラッシング後に再装着するよう指示した。また、被験者のブラッシング方法および時間は均一化し、歯磨剤および洗口剤を使用しないよう指示した。

② 生菌数測定

採取した HA ディスクを滅菌蒸留水に浸漬し、5 分間超音波処理を行うことによりバイオフィルムを剥離、懸濁後、コロンビア 5%ヒツジ血液寒天培地 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.) に播種した。その後、37°C、好気条件下で 24 時間、あるいはアネロパック®・ケンキ (三菱ガス化学株式会社、東京、日本) を用いた嫌気条件下で 48 時間培養した後に、コロニー数の測定を行った。

③ リアルタイム PCR による総菌数測定

HA ディスクを採取し、DNeasy® Powersoil® DNA Kit (QIAGEN)を用いて DNA 抽出を行った。その後、16S rRNA を標的としたユニバーサルプライマー (表 1) および Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) にてリアルタイム PCR を行い、総菌数を測定した。検量線の作成には、*Streptococcus mutans* ATCC 25175 のゲノム DNA を用いた。

④ 共焦点レーザー顕微鏡観察

採取した HA ディスクを PBS にて洗浄し、山本らの方法 [32] と同様に、菌体外多糖を FITC 標識 concanavalin A (FITC-ConA, Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, U.S.A.) および FITC 標識 Wheat Germ Agglutinin (FITC-WGA, Thermo Fisher Scientific.) で蛍光標識し、DNA は Diamid-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific.) で蛍光標識した。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM, LSM700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて観察した後、画像解析ソフト Imaris® (Imaris 5.01, Bitplane AG, Zurich, Switzerland) にて解析を行った。

⑤ シーケンス解析

採取した試料より DNeasy® PowerSoil® DNA Isolation Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行い、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 MiSeq® (Illumina Inc.) にて増幅し、シーケンス解析は 97% 相同性カッ

トオフに基づく操作的分類単位 (OTU) でクラスタリングを行った。得られたシーケンス結果は QIIME pipeline を用いて解析した。

⑥ 統計処理

統計学的有意差の検定は、IBM SPSS[®] Statistics (version 22.0, IBM SPSS Inc.) を用いた。生菌数測定、総菌数測定、菌体体積および菌体外多糖体積には Friedman test, シーケンス解析には Wilcoxon rank sum test を用いて、危険率 5 % で検定を行った。

2) 結果

① 生菌数測定

実験的デンタルバイオフィルム構成細菌の生菌数は、経時的に増加したが (図 9) , 8, 16, 24 時間後の各評価時間において、覚醒群と睡眠群の間で生菌数には有意差を認めなかった (Friedman test, $P > 0.05$)。

② リアルタイム PCR による総菌数測定

実験的デンタルバイオフィルム構成細菌の総菌数は、生菌数と同様に経時的に増加したが (図 10) , 各評価時間において覚醒群と睡眠群の間に有意差を認めなかった (Friedman test, $P > 0.05$) 。

③ 共焦点レーザー顕微鏡観察 (CLSM 観察)

CLSM 観察により得られた代表的な像を図 11A に示す。覚醒群と睡眠群のい

ずれにおいても、16 時間後以降にバイオフィルムがディスク全体を被覆する像が認められた。菌体外多糖の体積 (図 11B-a) は、8 時間後の覚醒群で、睡眠群と比較して有意に大きかった (Friedman test, $P=0.005$)。16 時間後以降、菌体外多糖体積に、覚醒群および睡眠群の 2 群間には有意差を認めなかった (図 11B-a, Friedman test, $P>0.05$)。また、菌体の体積は両群において経時的に増加したが、各評価時間で有意差を認めなかった (図 11B-b, Friedman test, $P>0.05$)。

④ シーケンス解析

被験者 10 名の解析結果には個人差が認められたが、共通の傾向も認められた。門レベルでの結果を図 12 に示す。実験的デンタルバイオフィルム構成細菌の大部分は、*Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門、*Fusobacteria* 門、*Proteobacteria* 門に属していた。*Bacteroidetes* 門の相対的割合は、覚醒群 8 時間よりも起床直後である睡眠群 8 時間の方が高かった。さらに、覚醒群において、*Bacteroidetes* 門の相対的割合は経時的に増加した (覚醒群 8 時間 : 7.2 %、16 時間 : 13.1 %、24 時間 : 26.1 %)。一方、睡眠群においては、*Bacteroidetes* 門の相対的割合に大きな変化は認められなかった。また、覚醒群および睡眠群の両群で、*Firmicutes* 門の割合は経時的に減少した。

次に、属レベルでの結果を図 13 に示す。*Neisseria* 属の相対的割合は、睡眠群では形成開始から 8 時間後に最も低く、16 時間後以降に増加したが (睡眠群 8

時間：6.8 %，8 時間：19.2 %，24 時間：19.1 %) ， 覚醒群では経時的な変化は認められなかった (覚醒群 8 時間:17.8 %，16 時間:21.5 %，24 時間:19.8 %) 。

Streptococcus 属の相対的割合は，覚醒群および睡眠群で経時的に減少したが，特に覚醒群において，16 時間後から 24 時間後の間に大きく減少した。

各評価時間における相対的割合に関して，覚醒群と睡眠群の間に有意差を認めた属を図 14 に示す。形成開始から 8 時間後に，*Neisseria* 属の相対的割合は，起床直後である睡眠群より覚醒群で有意に高い結果となった (Wilcoxon rank sum test, $P=0.005$) 。これとは対照的に，*Corynebacterium* 属，*Prevotella* 属，*Capnocytophaga* 属および *Fusobacterium* 属の相対的割合は，起床直後である睡眠群で有意に高かった (Wilcoxon rank sum test, *Corynebacterium* 属： $P=0.028$ ，*Prevotella* 属： $P=0.013$ ，*Capnocytophaga* 属： $P=0.028$ ，*Fusobacterium* 属： $P=0.025$) 。形成開始から 16 時間後には，*Corynebacterium* 属および *Granulicatella* 属の相対的割合は，覚醒群より睡眠群で有意に高かった (Wilcoxon rank sum test, *Corynebacterium* 属： $P=0.012$ ，*Granulicatella* 属： $P=0.012$) 。バイオフィルム形成開始から 24 時間後には，*Prevotella* 属および *Fusobacterium* 属の相対的割合は睡眠群と比較し，起床直後に採取した試料である覚醒群で有意に高い結果となった (Wilcoxon rank sum test, *Prevotella* 属： $P=0.007$ ，*Fusobacterium* 属： $P=0.008$) 。また，*Streptococcus* 属は，起床直後である覚醒群で有意に割合が低かった

(Wilcoxon rank sum test, $P=0.022$)。

(2) 実験的デンタルバイオフィルムの病原性

1) 方法

① *in situ* デンタルバイオフィルムの形成

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 H29-E17)。被験者の選択基準は 1.項と同様とし、大阪大学大学院歯学研究科職員および学生の 10 名 (男性 6 名, 女性 4 名, 年齢 26~32 歳) を対象とした。これらの被験者の DMF 歯数の平均は 4.2 であった。実験的デンタルバイオフィルムの形成は、2. の (1) 項と同一のモデルを用いて行った。試料採取を就寝前に行う群 (就寝前群) と起床直後に行う群 (起床直後群) の両群をすべての被験者に対して適用した (図 15)。就寝前群では口腔内装置を 24:00, 起床直後群では 8:00 に装着し、いずれも、装着開始から 24 時間後に試料として HA ディスクを採取した。

② 定量的リアルタイム PCR

採取した HA ディスクを滅菌蒸留水に浸漬し、5 分間超音波処理を行うことによりバイオフィルムを剥離、懸濁後、RNeasy® PowerBiofilm® Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。その後、ReliaPrep™ RNA Clean-Up and Concentration System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, U.S.A.) にて精製し、High-Capacity

RNA-to-cDNA™ Kit (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California) を用いて cDNA を合成した。

う蝕に関しては *S. mutans* が持つ、不溶性グルカン産生に関わる糖転移酵素である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* の持つ、補体抑制に関わるインターパイン A (*inpA*) , *Fusobacterium nucleatum* の持つ接着因子である FadA (*fadA*) , および *Porphyromonas gingivalis* のリシン特異的ジンジパイン (*kgp*) を標的とし、2. の (1) 項と同様の方法でリアルタイム PCR を行った。また、16S rRNA 遺伝子を標的とした各細菌種に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。その後、標的遺伝子の発現量を各細菌種の 16S rRNA 発現量で補正し、起床直後に対する就寝前の各病原遺伝子の相対的発現量を算出した。使用したプライマーの配列を表 1 に示す。検量線の作成には、*S. mutans* ATCC 25175, *P. intermedia* ATCC 25611, *F. nucleatum* 1436 および *P. gingivalis* ATCC 33277 より抽出した RNA を鋳型として合成した cDNA をそれぞれ用いた。統計学的有意差の検定は、IBM SPSS® Statistics (version 22.0, IBM SPSS Inc.) を用いて、Wilcoxon rank sum test にて危険率 5 %で行った。

2) 結果

リアルタイム PCR による遺伝子発現量の解析の結果 (図 16) , *S. mutans* の *gtfB* の相対的発現量は就寝前に高い傾向が認められ、*P. intermedia* の *inpA* の相

対的発現量は起床直後よりも就寝前に有意に高かった (Wilcoxon rank sum test, $P=0.028$)。一方, *F. nucleatum* の *fadA* は就寝前よりも起床直後に有意に高く (Wilcoxon rank sum test, $P=0.007$), *P. gingivalis* の *kgp* においても同様の傾向が認められた。

III. 考察

本研究では、効果的な口腔ケアの介入時期を探求する研究の一環として、睡眠が口腔バイオフィルムに及ぼす影響を詳細に検索した。デンタルバイオフィルムの日内変動に関するこれまでの報告は限られており、歯肉縁上デンタルバイオフィルムを染色した歯面を写真撮影し、付着面積によりバイオフィルム量を可及的に定量化したもの [33,34] や、日中または睡眠時間を含む夜間の 12 時間の間に形成されるデンタルバイオフィルムを顕微鏡観察したもの [35] であり、睡眠によるデンタルバイオフィルムの変化を理解するには不十分であった。さらに、デンタルバイオフィルム以外に関しては、唾液中の特定の細菌種には日内変動が認められること [36] が報告されているが、デンタルバイオフィルムを含む、多様な部位に形成される口腔細菌叢の日内変動に関する報告は少ない。

本研究の実験デザインには睡眠の影響を評価するうえで大きな利点があると考えられる。睡眠が口腔バイオフィルムに与える影響を検索するために、就寝前および起床直後に連続して口腔バイオフィルムを試料として採取し、睡眠の前後で比較検討を行うことは妥当な方法のように思える。しかし、この方法ではバイオフィルムの形成にかかる時間が異なる。先行研究により *in situ* デンタルバイオフィルムモデルで作成した実験的バイオフィルムの細菌叢は経時的に変化することが明らかとなっており [29] , バイオフィルム形成にかかる時間が異なる

ると、睡眠の影響を正確に評価することが困難である。そこで、本研究ではバイオフィーム形成開始時刻の異なる 2 つのスケジュールを全ての被験者に対して適用することにより、経時的な変化による影響を排除し、バイオフィームの形成時間を統一して睡眠がデンタルバイオフィームを含む口腔バイオフィームに及ぼす影響を検討した。

in situ デンタルバイオフィームモデルを用いた本研究により、24 時間の実験期間中に、覚醒群および睡眠群におけるデンタルバイオフィーム構成細菌数は経時的に増加することが示された (図 9, 図 10)。これは形成開始から 96 時間後までのデンタルバイオフィームを経時的に解析した先行研究 [29] における形成開始から 24 時間までの報告と同様の結果であった。他方、唾液中の細菌数は睡眠中に増加し、起床時に最も高くなるという報告 [18] により、現時点ではバイオフィーム構成細菌も睡眠中に増加するものと予想されている。しかし、本研究において、デンタルバイオフィーム構成細菌数は各評価時間において覚醒群および睡眠群の 2 群間に有意差を認めず (図 9, 図 10)、これまでの予想に反し、デンタルバイオフィーム構成細菌数は睡眠の影響を受けないことが新たに明らかとなった。

また、CLSM 観察より、菌体体積は覚醒群および睡眠群の両群で経時的に増加したが (図 11B-b)、各評価時間では覚醒群と睡眠群の間に有意な差を認めず、

生菌数および総菌数と同様の変化を示すことが明らかとなった。一方、菌体外多糖の体積に関しては、8時間後に覚醒群よりも起床直後である睡眠群において有意に菌体外多糖体積が小さかった (図 11B-a)。Marsh らの報告 [37] によると、睡眠中のデンタルバイオフィルムの主な栄養源は唾液であり、さらに睡眠中の唾液に含まれる糖およびタンパク質量は覚醒時よりも少ないことが明らかとなっている [17, 38]。このことから、就寝時はバイオフィルムにとっての飢餓状態であり [39]、菌体外多糖の産生が低下していると考えられる。また、唾液中のタンパク質の中には歯面にペリクルを形成し、細菌の歯面への付着を促すものが存在する [40]。睡眠中に、唾液中のタンパク質量の低下によるペリクルの性質の変化が、バイオフィルム構造に影響を及ぼした可能性も示唆された。

16S rRNA を標的としたシーケンス解析では、実験的デンタルバイオフィルムにおける *Prevotella* 属および *Fusobacterium* 属の相対的割合は、起床直後である睡眠群 8 時間および覚醒群 24 時間において有意に高かった (図 14A および図 14C)。過去に我々は、実験的デンタルバイオフィルムにおいて、*Prevotella* 属および *Fusobacterium* 属の相対的割合は形成開始から 48 時間後に急激に増加することを報告した [29]。唾液はリゾチーム、ラクトフェリン、シスタチン、分泌型 IgA など細菌に対する様々な防御因子を含む。また、唾液の分泌量および唾液の嚥下は細菌の除去に寄与することで口腔バイオフィルム細菌叢の均衡を維

持するうえで重要な役割を果たしている [41]。睡眠により、これらの唾液の性質および分泌量あるいは酸素分圧などの口腔内環境が変化することで、*Prevotella* 属や *Fusobacterium* 属といった偏性嫌気性細菌の割合が増加したと考えられる。

Neisseria 属の相対的割合は、バイオフィルム形成開始から 8 時間後に、起床直後である睡眠群よりも覚醒群で有意に高かった (図 14A)。*Neisseria* 属の口腔細菌は常在細菌であり、Ritz の報告 [42] によると、形成開始 1 日から 3 日後の歯肉縁上デンタルバイオフィルムにおける *Neisseria* 属の割合は 10%程度を占め、5 日後にその割合は低下してくる。本研究での *Neisseria* 属の相対的割合は、睡眠群においては、形成開始から 8 時間後は 6%程度で、16 時間後に急激に割合が増加し 20%程度となり、24 時間後も 20%程度であった。一方、覚醒群においては、*Neisseria* 属の割合は 8, 16, 24 時間後においてほぼ 20%で一定であった。

Neisseria 属の相対的割合は、バイオフィルム形成開始初期には口腔内環境に依存するが、その後、睡眠による口腔内の環境変化の影響を受けないことが示唆された。

Corynebacterium 属の相対的割合は、実験的デンタルバイオフィルム形成開始から 8 および 16 時間後に覚醒群よりも睡眠群において有意に高く、24 時間後に同程度になるという結果となった (図 13, 図 14)。*Corynebacterium* 属の相対的

割合は、形成されてから 3 日目の歯肉縁上デンタルバイオフィルムで約 1%で、3 日後以降に増加することが Ritz により報告されている [42]。また、*Corynebacterium* 属に属する口腔内細菌として *Corynebacterium matruchotti* がよく知られており、これはデンタルバイオフィルムの石灰化および歯石形成に重要な役割を果たしている [43]。したがって、就寝時から形成されたバイオフィルムに相当する睡眠群では、*Corynebacterium* 属の割合が覚醒群よりも高い状態が長く続き、歯石形成のリスクが上昇する可能性がある。

口腔内には歯面以外にも頬粘膜、口蓋粘膜や舌表面など様々な部位でバイオフィルムが形成されている。これらの口腔バイオフィルム細菌叢に関して、属レベルにおいて起床直後と就寝前の各部位における細菌の割合を比較したところ、*Prevotella* 属や *Corynebacterium* 属は、多くの部位で起床直後において相対的割合が高いことが明らかとなった (図 6)。また、*Rothia* 属は、睡眠による相対的割合の変化が部位により異なっていた (図 6)。口腔バイオフィルムは唾液、宿主免疫および pH など様々な環境因子の中で形成される [9] が、睡眠中には唾液の分泌量が低下すること [17]、また唾液成分に変化が生じることが報告されており [17, 38]、これらの様々な環境因子の変化が口腔バイオフィルム細菌叢に影響を及ぼしたと考えられる。また、部位によって睡眠の影響が異なる属が存在したことは、バイオフィルムの形成部位の表面性状や睡眠によって変

化した環境へのバイオフィルムの反応が部位により異なっていたからではないかと推察される。しかし、口腔内の環境変化が各部位に及ぼす影響の詳細は明らかにされておらず、細菌叢との関連も含め、今後の課題である。

16S rRNA を標的としたシーケンス解析より、8時間の睡眠後のデンタルバイオフィルムは偏性嫌気性細菌の割合が上昇し、覚醒時に形成されたものよりも歯周病に関連する細菌を多く含む可能性が示唆されたが、バイオフィルムの菌叢構造解析のみではバイオフィルムの病原性を評価することは困難であるため、病原性遺伝子の発現量の解析を行った。リアルタイム PCR による遺伝子発現量の解析では、*F. nucleatum* の *fadA* および *P. gingivalis* の *kgp* の相対的発現量は起床直後に高かった (図 16)。*F. nucleatum* はヒト口腔内以外にもヒト大腸癌の組織から高頻度に検出される [44, 45]。また、FadA は大腸における *F. nucleatum* の細胞への付着および細胞浸潤に関わる因子であることが報告されている [46]。これらの大腸癌と *F. nucleatum* に関する報告を基に、口腔内においても研究がすすめられ、歯周病においても大腸癌の場合と同様に、FadA が *F. nucleatum* の歯周組織に対する付着および細胞浸潤に関与する可能性が示唆されている [47]。本研究では、睡眠後に歯周病に関する遺伝子のひとつである *fadA* の発現が上昇していることが示唆された。一方で、*S. mutans* の *gtfB* は就寝前に高い傾向が認められ、歯周病とは対照的に、就寝前にもう蝕に関連する遺伝子のひとつで

ある *gtfB* の発現が上昇していることが示唆された。

P. intermedia のインターパイン A は補体経路を抑制することが知られており [48] , 歯周病の病原因子の一つであると考えられている。このことから, *inpA* の相対的発現量も歯周病の病原因子である *kgp* や *fadA* と同様に睡眠後に高くなるのではないかと予想された。しかし, 実際には *inpA* の発現量は就寝前に有意に高い結果となった (図 16) 。インターパイン A は補体抑制作用以外に, 口腔内では主にアルブミン分解を行っており [49] , 唾液中アルブミン量は午後 11 時に最大値を示すことが報告されている [50] 。本研究は健康な被験者を対象としたものであるため, *inpA* に関しては, *fadA* や *kgp* と異なり, 歯周病の病原因子としてよりもアルブミン分解酵素としての特徴が強く表れ, 基質の量が増加する就寝前に相対的発現量が増加したと考えられる。しかしながら, 本研究で注目したこれらの病原性因子はほんの一部に過ぎず, 病原性のさらなる理解のためには RNA シーケンスなど網羅的な機能解析が必要である。

ところで, 口腔ケアをいつ行うべきかという問題に関して, 複数の見解が存在している。例えば, 歯周病に関しては, 48 時間ごとのブラッシングが歯肉炎の悪化を抑制するという Lang の報告 [51] がある。また, う蝕予防の観点からは, 細菌が糖を代謝し産生する有機酸がエナメル質表面を脱灰し [52, 53] , また, 糖摂取後にエナメル質表面の pH が低下する [54] ことから, 毎食後のブラッシ

ングが重要であるという考えもある。これらの見解に加え、本研究より、8時間の睡眠後に *Fusobacterium* 属および *Prevotella* 属といった偏性嫌気性菌の相対的割合が増加していること (図 14) , また、睡眠後に一部の細菌の歯周病に関連する遺伝子の発現が上昇していること (図 16) が示されたことから、起床後の口腔ケアも歯周病予防のために有意義であることが示唆された。また、睡眠群 24 時間、すなわち就寝前に相当する時刻に採取した試料では *Streptococcus* 属の相対的割合が高くなっており (図 14C) , *gtfB* の相対的発現量が高い傾向があったため (図 16) , 就寝前に口腔ケアを行うことはう蝕予防に寄与できる可能性がある。

本研究における起床直後の偏性嫌気性細菌の割合の増加や遺伝子発現の増加はわずかなものである。これは健康な被験者における日内変動の変化を観察しているためであると思われるが、同時にこのような研究を基盤として、歯周病など口腔疾患を有する患者を対象とした研究を推進することで、疾患や個人の口腔内の状態などリスクに応じた効果的な口腔ケアの確立に近づくものと考えている。

IV. 結論

睡眠により口腔バイオフィルム細菌叢の構成は変化するが、その変化は細菌種やバイオフィルムが形成される部位によって異なることが分かった。

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、および睡眠中は菌体外多糖の産生が低下することが明らかとなった。さらに、睡眠後には、一部の細菌の歯周病に関連する病原遺伝子の発現量が高くなることが示唆された。

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）林美加子教授に深甚なる感謝の意を表します。また，恵比須繁之教授には，丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。深く感謝申し上げます。実験の指導を通じて多くの知識や示唆を頂きました朝日陽子博士と栗木菜々子博士に感謝致します。

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，元岡大祐博士に感謝致します。

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] Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012; 486: 215-21.
- [2] Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 14547-52.
- [3] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 5721-32.
- [4] Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, Listl S, Celeste RK, Guarnizo-Herreño CC, Kearns C, Benzian H, Allison P, Watt RG. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019; 394: 249-260.
- [5] Clarke JK. On the Bacterial Factor in the Etiology of Dental Caries. *Br J Exp Pathol*. 1924; 5: 141–147.
- [6] Asikainen S, Chen C, Slots J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1996; 11: 387-94.
- [7] Simón-Soro, A. & Mira, A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol*. 2015; 23: 76-82.
- [8] Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity:

the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology.

Mol Oral Microbiol. 2012; 27: 409-19.

[9] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001; 358: 135-8.

[10] Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1999; 181: 5993-6002.

[11] Kuchma SL, O'Toole GA. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. Curr Opin Biotechnol. 2000; 11: 429-33.

[12] Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol. 1987; 41: 435-64.

[13] Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. PLoS Pathog. 2009; 5: e1000354.

[14] Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 2001; 9: 34-9.

[15] Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. J Bacteriol. 2001; 183: 6746-51.

- [16] Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 2002; 292: 107-13.
- [17] Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol.* 1972; 220: 529-45.
- [18] Nolte WA. *Oral microbiology with basic microbiology and immunology.* 4th ed. 1982; 198-201.
- [19] The Human Microbiome Project Consortium. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. *Nature.* 2013; 486: 207-14.
- [20] Hall MW, Singh N, Ng KF, Lam DK, Goldberg MB, Tenenbaum HC, Neufeld JD, G Beiko, Senadheera DB. Inter-personal diversity and temporal dynamics of dental, tongue, and salivary microbiota in the healthy oral cavity. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2017; 26; 3: 2.
- [21] Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Asai H, Suga H, Ebisu S. Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodontal Res.* 2010; 45: 255-61.
- [22] Yamaguchi M, Sato K, Yukitake H, Noiri Y, Ebisu S, Nakayama K. *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.* 2010; 78: 3801-12.

[23] Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Izutani N, Azakami H, Ebisu S. Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 5887-92.

[24] Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S. Time course of gene expression during *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 6733-6.

[25] Ramich T, Schacher B, Scharf S, Röllke L, Arndt R, Eickholz P, Nickles K. Subgingival plaque sampling after combined mechanical and antibiotic nonsurgical periodontal therapy. *Clin Oral Investig.* 2015; 19: 27-34.

[26] Shiba T, Watanabe T, Kachi H, Koyanagi T, Maruyama N, Murase K, Takeuchi Y, Maruyama F, Izumi Y, Nakagawa I. Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms. *Sci Rep.* 2016; 6: 30997.

[27] Belibasakis GN, Schmidlin PR, Sahrman P. Molecular microbiological evaluation of subgingival biofilm sampling by paper point and curette. *APMIS.* 2014; 122: 347-52.

[28] Peterson SN, Meissner T, Su AI, Snesrud E, Ong AC, Schork NJ, Bretz WA.

Functional expression of dental plaque microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 14; 4: 108.

[29] Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Gotoh K, Miura J, Machi H, Iida T, Ebisu S. Temporal dynamics of bacterial microbiota in the human oral cavity determined using an *in situ* model of dental biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2016; 10; 2: 16018.

[30] Aagaard K, Petrosino J, Keitel W, Watson M, Katancik J, Garcia N, Patel S, Cutting M, Madden T, Hamilton H, Harris E, Gevers D, Simone G, McInnes P, Versalovic J. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB J.* 2013; 27: 1012-22.

[31] Pamela McInnes, Mary Cutting. Manual of Procedures for Human Microbiome Project Core Microbiome Sampling Protocol A HMP Protocol # 07-001 Version Number: 12.0 29. <https://www.hmpdacc.org/hmp/resources/> (最終閲覧日 : 2019. 12. 2)

[32] Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Kuboniwa M, Hayashi M, Ebisu S. The *sinR* ortholog PGN_0088 encodes a transcriptional regulator that inhibits polysaccharide synthesis in *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 biofilm. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56017

[33] Quirynen M, Dekeyser C, van Steenberghe D. The influence of gingival

inflammation, tooth type, and timing on the rate of plaque formation. *J Periodontol.* 1991; 62: 219-22.

[34] Quirynen M, van Steenberghe D. Is early plaque growth rate constant with time? *J Clin Periodontol.* 1989; 16: 278-83.

[35] Dige I, Schlafer S, Nyvad B. Difference in initial dental biofilm accumulation between night and day. *Acta Odontol Scand.* 2012; 70: 441-7.

[36] Takayasu L, Suda W, Takanashi K, Iioka E, Kurokawa R, Shindo C, Hattori Y, Yamashita N, Nishijima S, Oshima K, Hattori M. Circadian oscillations of microbial and functional composition in the human salivary microbiome. *DNA Res.* 2017; 24: 261-70

[37] Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontol 2000.* 2016; 70: 80-92.

[38] Sashikumar R, Kannan R. Salivary glucose levels and oral candidal carriage in type II diabetics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 706-11.

[39] Lingström P, Imfeld T, Birkhed D. Comparison of three different methods for measurement of plaque-pH in humans after consumption of soft bread and potato chips. *J Dent Res.* 1993; 72: 865-70.

[40] Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle – a review. *Adv Dent Res.* 2000; 14: 22-8.

- [41] Lynge Pedersen, AM Belstrøm. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent.* 2019; 80 Suppl 1:S3-S12.
- [42] Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 1967; 12: 1561-8.
- [43] Ooi SW, Smillie AC, Kardos TB, Shepherd MG. Intracellular mineralization of *Bacterionema matruchotii*. *Can J Microbiol.* 1981; 27: 267-70.
- [44] Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Taberner J, Baselga J, Liu C, Shivdasani RA, Ogino S, Birren BW, Huttenhower C, Garrett WS, Meyerson M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; 22: 292-8.
- [45] Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA, Holt RA. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; 22: 299-306.
- [46] Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe.* 2013; 14: 195-206.
- [47] Ping Liu, Yi Liu, Jianning Wang, Yang Guo, Yujie Zhang, Shuiqing Xiao. Detection of *Fusobacterium Nucleatum* and *fadA* Adhesin Gene in Patients with Orthodontic

Gingivitis and Non-Orthodontic Periodontal Inflammation. PLoS One. 2014; 9: e85280.

[48] Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen KA, Wawrzonek K, Manandhar SP, Popadiak K, Riesbeck K, Eick S, Blom AM. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. PLoS Pathog. 2009; 5: e1000316.

[49] Byrne DP, Manandhar SP, Potempa J, Smalley JW. Breakdown of albumin and haemalbumin by the cysteine protease interpain A, an albuminase of *Prevotella intermedia*. BMC Microbiol. 2015; 24: 15: 185.

[50] Richter J, Král V, Zukov I, Subrt P, Rahm J. Circadian changes of the SIgA, lysozyme, albumin and copper content of saliva. Czech Med. 1980; 3: 249-54.

[51] Lang NP, Cumming BR, Loe H. Toothbrushing frequency as it relates to plaque development and gingival health. J Periodontol. 1973; 44: 396-405.

[52] Williams JL. A contribution to the study of pathology of enamel. Dental Cosmos. 1897; 39: 269-301.

[53] Black GV. Operative Dentistry. 6th ed vol. 1. 1936; 129.

[54] Robert MS, Benjamin FM. A Quantitative Method for Evaluating Physical and Chemical Agents which Modify Production of Acids in Bacterial Plaques on Human Teeth. J Dent Res. 1943; 22: 45-51.

- [55] Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, 115-175.
- [56] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- [57] Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 625-30.
- [58] Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing *gff* genes. *Arch Oral Biol.* 2012; 57: 678-83.
- [59] Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Iida T, Shizukuishi S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 168-76.
- [60] Periasamy S, Kolenbrander PE. *Infect Immun.* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. 2009; 77: 3542-51.
- [61] Azelmat J, Larente JF, Grenier D. The anthraquinone rhein exhibits synergistic antibacterial activity in association with metronidazole or natural compounds and

attenuates virulence gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. Arch Oral Biol. 2015; 60: 342-6.

[62] Meuric V, Gracieux P, Tamanai-Shacoori Z, Perez-Chaparro J, Bonnaure-Mallet M. Expression patterns of genes induced by oxidative stress in *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23: 308-14.

表1 本研究に使用したプライマー

プライマー	配列	参考文献
16S rRNA 27F forward	AGRGTTTGATCMTGGCTCAG	[55, 56]
16S rRNA 338R reverse	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT	[57]
<i>gtfB</i> forward	CACTATCGGCGGTTACGAAT	[58]
<i>gtfB</i> reverse	CAATTTGGAGCAAGTCAGCA	[58]
<i>S. mutans</i> 16S rRNA forward	AGCGTTGTCCGATTTATTG	[58]
<i>S. mutans</i> 16S rRNA reverse	CTACGCATTTACCGCTACA	[58]
<i>inpA</i> forward	GAAGGACAACACTACAGCGGAAA	[48]
<i>inpA</i> reverse	TCCTTTCGTTAGTTCGCTGA	[48]
<i>P. intermedia</i> 16S rRNA forward	TCCACCGATGAATCTTTGGTC	[59]
<i>P. intermedia</i> 16S rRNA reverse	ATCCAACCTTCCCTCCACTC	[59]
<i>fadA</i> forward	CACAAGCTGACGCTGCTAGA	[47]
<i>fadA</i> reverse	TTACCAGCTCTTAAAGCTTG	[47]
<i>F. nucleatum</i> 16S rRNA forward	CTTAGGAATGAGACAGAGATG	[60]
<i>F. nucleatum</i> 16S rRNA reverse	TGATGGTAACATACGAAAGG	[60]
<i>kgp</i> forward	AGCTGACAAAGGTGGAGACCAAAGG	[61]
<i>kgp</i> reverse	TGTGGCATGAGTTTTTCGGAACCGT	[61]
<i>P. gingivalis</i> 16S rRNA forward	TGGGTTTAAAGGGTGCGTAG	[62]
<i>P. gingivalis</i> 16S rRNA reverse	CAATCGGAGTTCCTCGTGAT	[62]

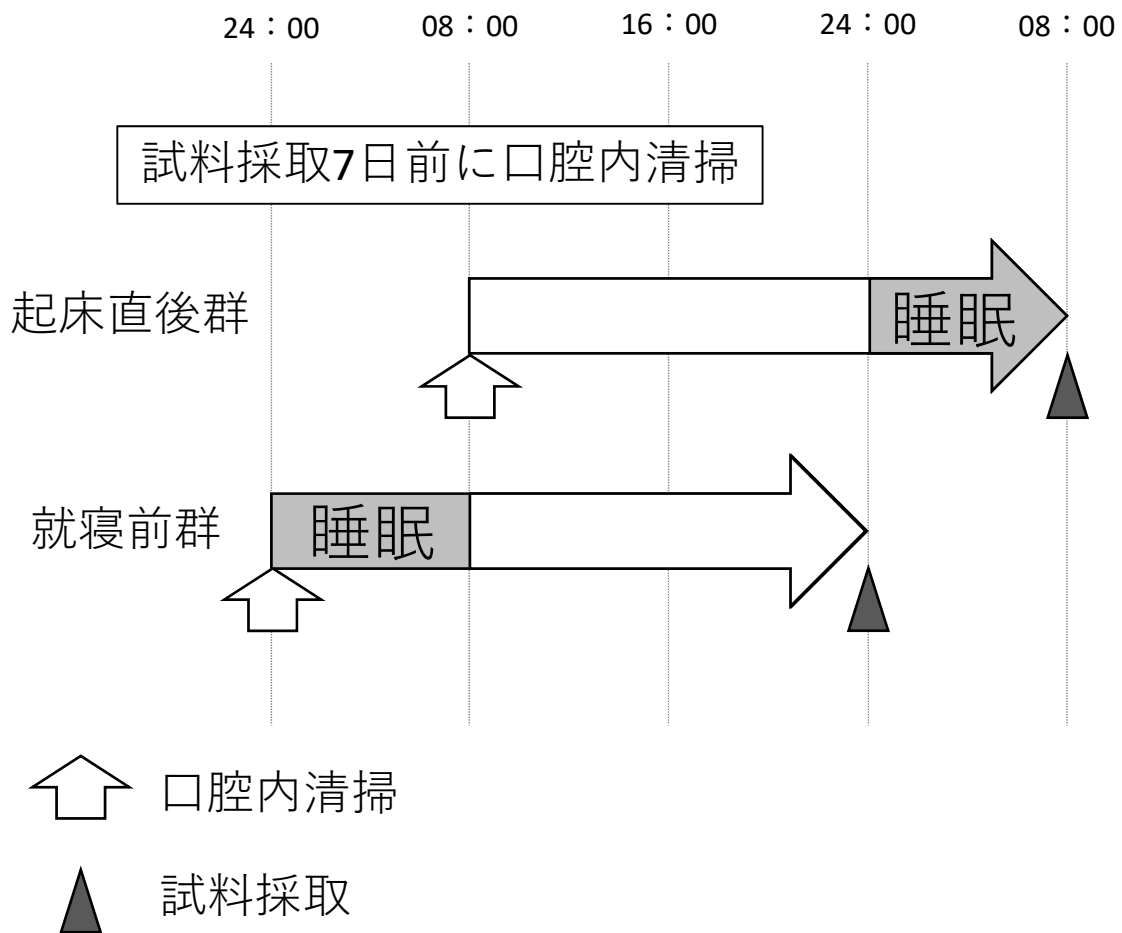
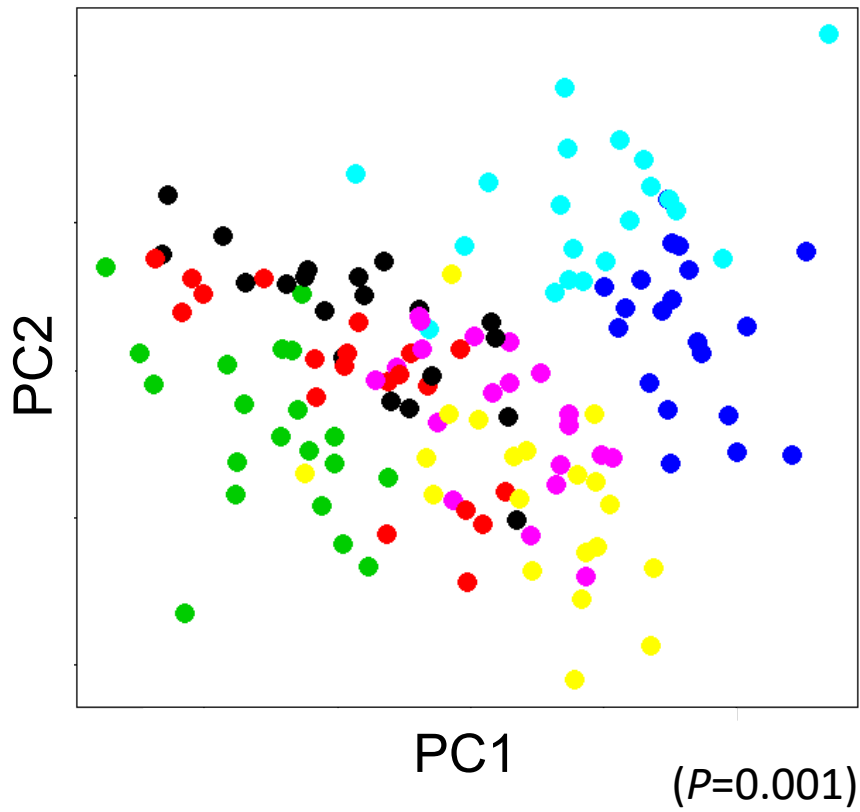


図1 実験1の実験スケジュール

各群とも試料採取の7日前および24時間前に術者による口腔内清掃を行った。2回目の口腔内清掃後は、試料採取まで被験者自身による口腔内清掃は控えた。



- 頬粘膜
- 口蓋粘膜
- 歯肉粘膜
- 歯肉縁下デンタルバイオフィルム
- 歯肉縁上デンタルバイオフィルム
- 唾液
- 舌

図2 全試料を対象としたBray-Curtis distanceに基づくNMDS
 ()内の数値はPERMANOVAによる有意確率を示す。各プロットの
 の色は採取部位を示す。試料採取部位により細菌叢構造は有意に
 異なっていた (n=10, PERMANOVA, $P < 0.05$)。

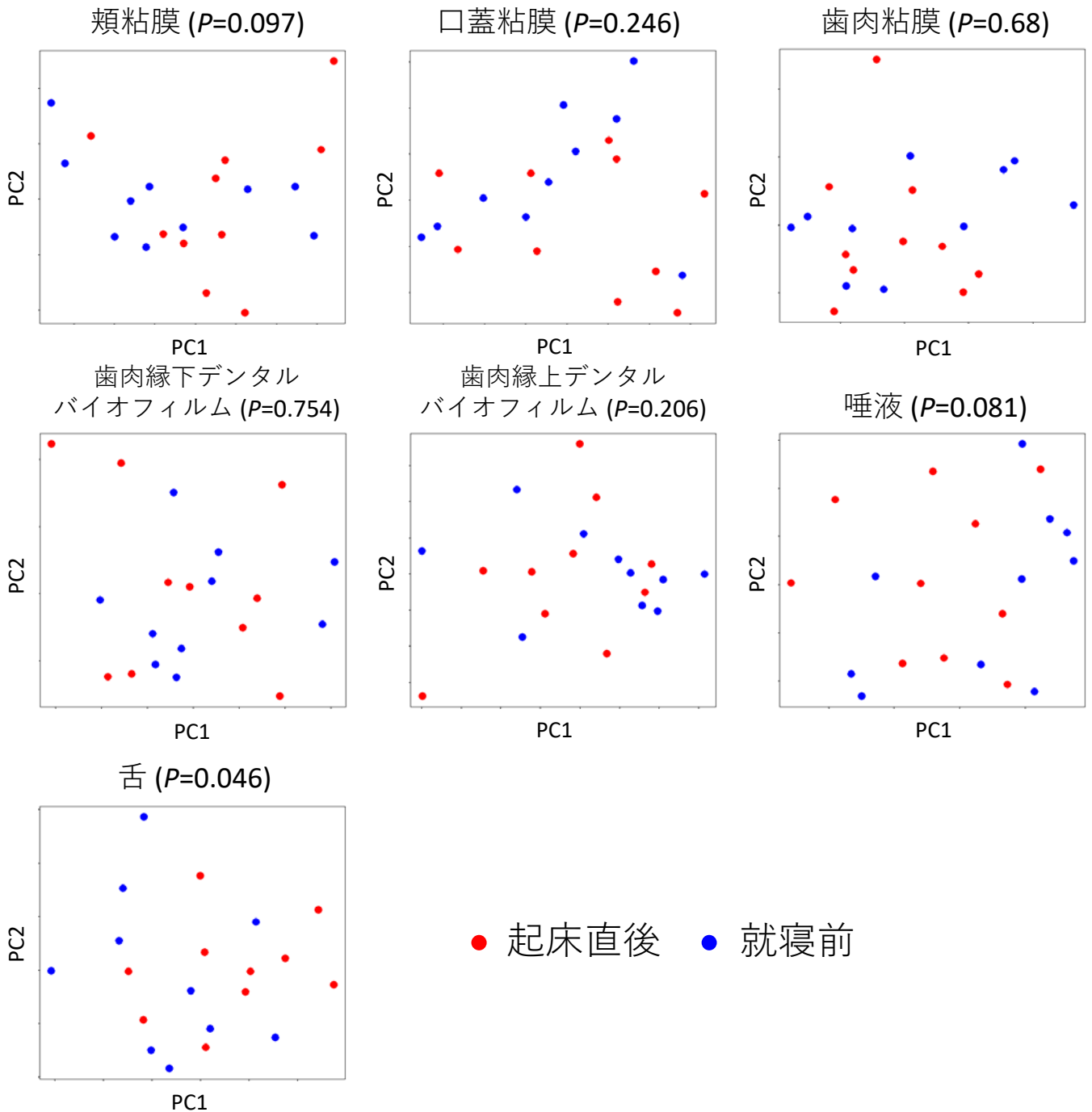


図3 部位別の試料を対象としたBray-Curtis distanceに基づくNMDS
 ()内の数値はPERMANOVAによる有意確率を示す。各プロットの色は採取
 時間を示す (n=10)。
 舌において、起床直後と就寝前の細菌叢構造は有意に異なっていた
 (PERMANOVA, $P < 0.05$)。

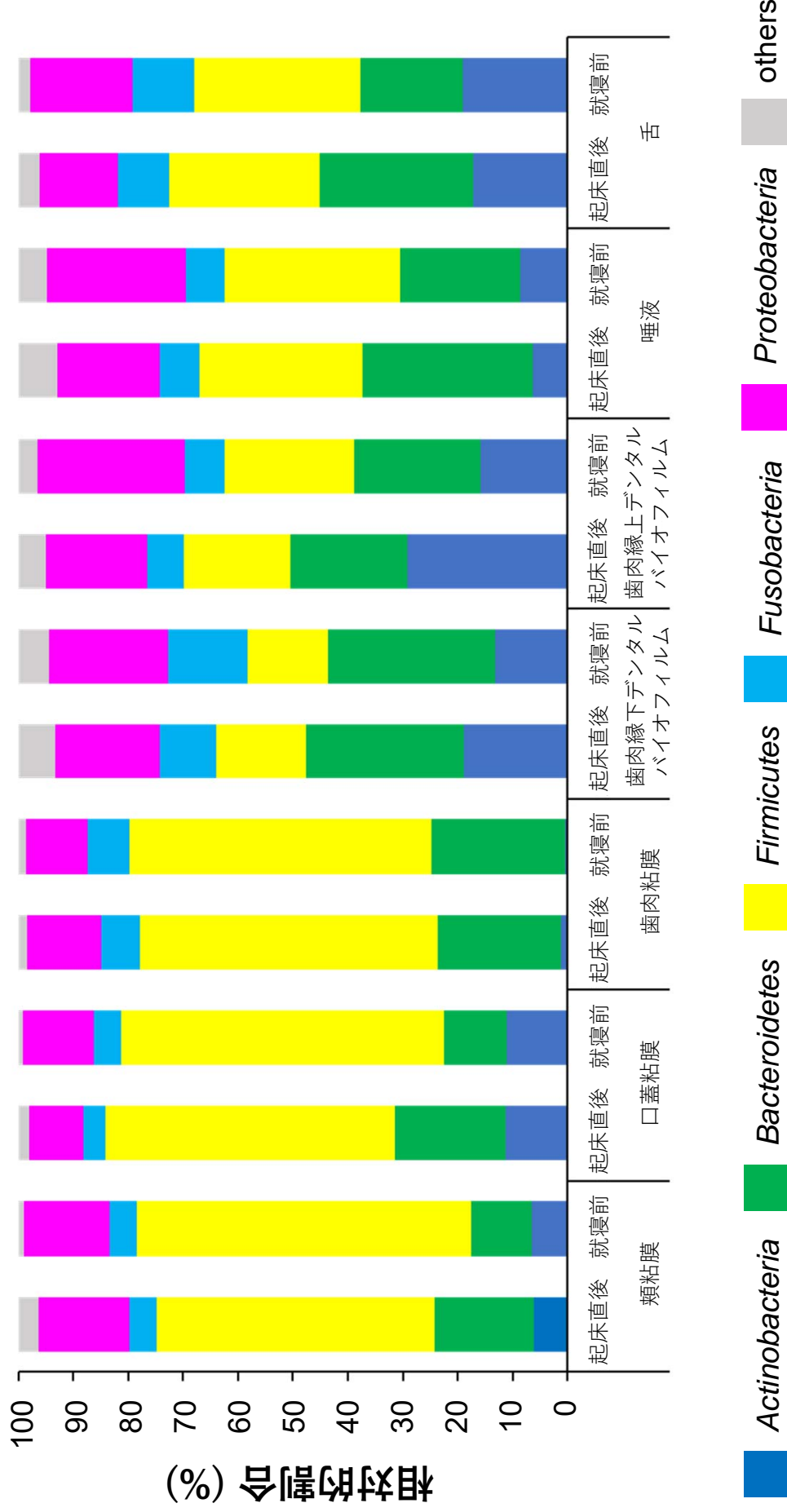


図4 門レベルでの相対的割合
 門レベルでの相対的割合を示す (n=10)。部位に関わらずほぼすべてがActinobacteria門, Bacteroidetes門, Firmicutes門, Fusobacteria門, Proteobacteria門に属していた。
 歯肉粘膜表面のバイオフィームは他の部位と比較し, Actinobacteria門の相対的割合が低かった。

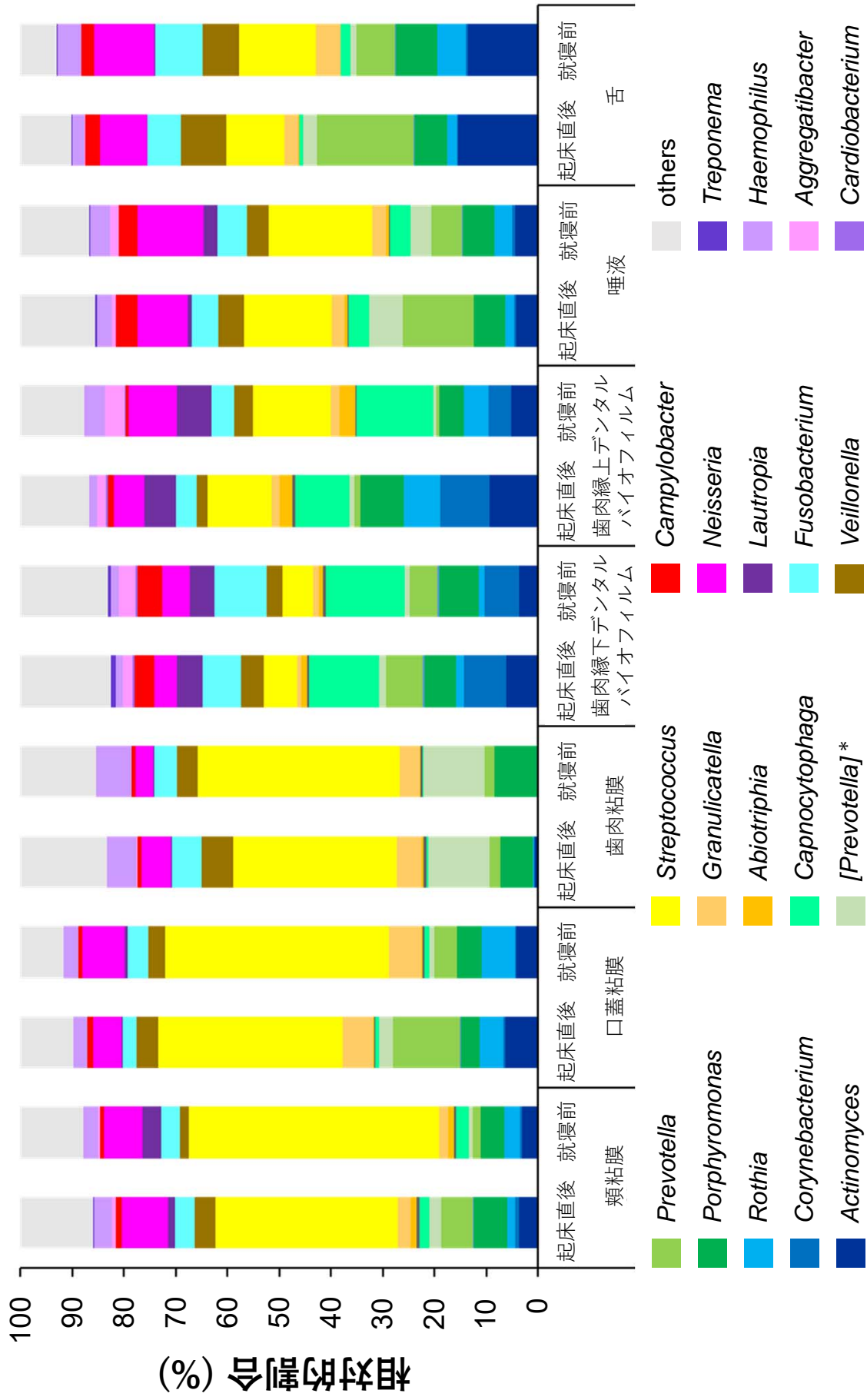


図5 属レベルでの相対的割合
 属レベルでの相対的割合を示す (n=10)。歯肉縁上および歯肉縁下デンタルバイオフィームは *Corynebacterium* 属, *Capnocytophaga* 属の割合がほかの部位と比較し高かった。
 *: *Bacteroidales* 目に属する未同定な属で, 系統的に *Prevotella* 属に近縁である。

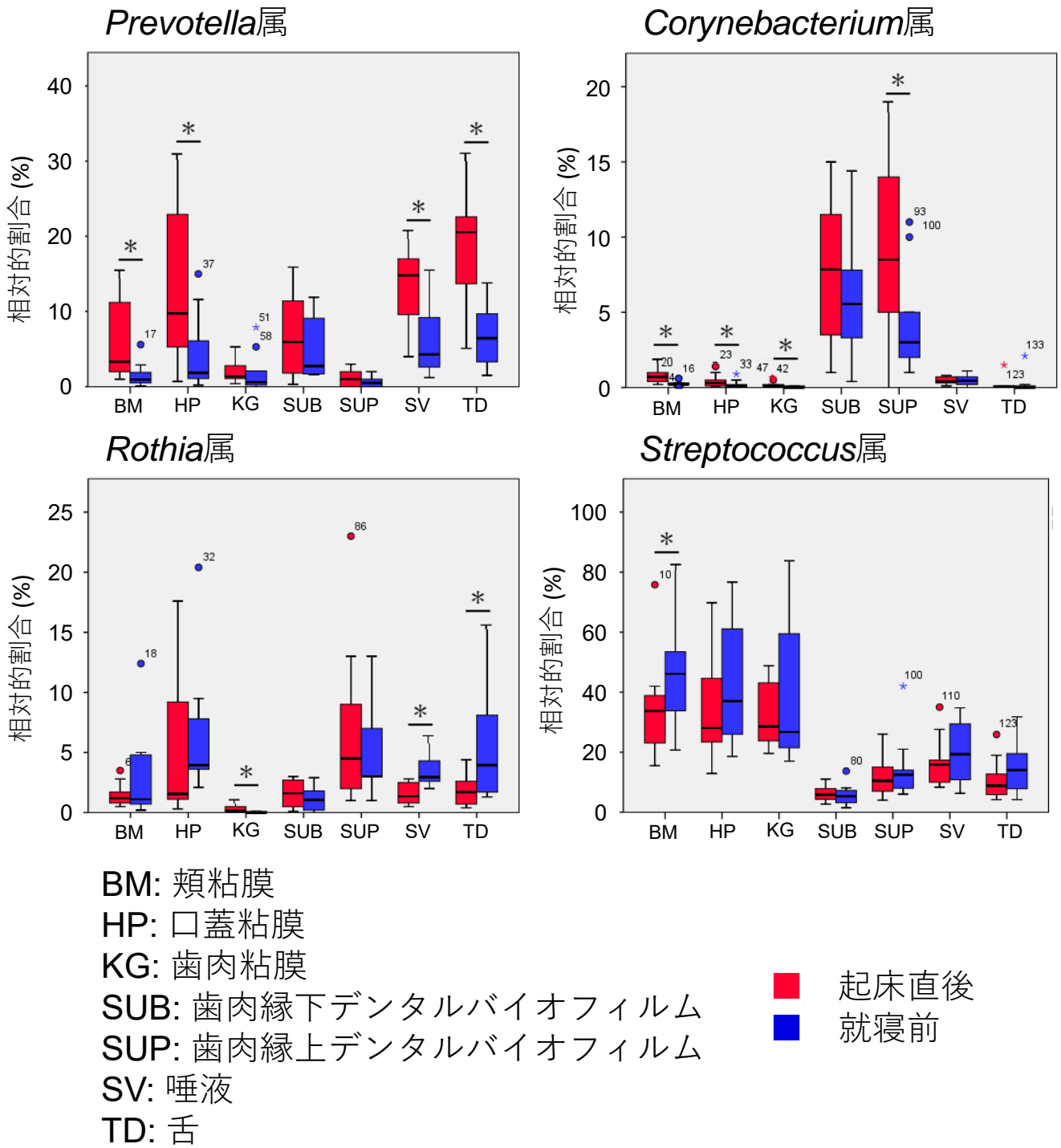


図6 属レベルでの相対的割合の変化

起床直後および就寝前の2群間に有意差を認めた属を示す (n=10)。●印および★印は外れ値を表す。

頬粘膜、口蓋粘膜、唾液および舌の *Prevotella* 属の相対的割合は起床直後で有意に高かった。頬粘膜、口蓋粘膜、歯肉粘膜および歯肉縁上デンタルバイオフィルムの *Corynebacterium* 属の相対的割合は起床直後で有意に高かった (Wilcoxon rank sum test, * : $P < 0.05$)。

Rothia 属の相対的割合は、歯肉粘膜では起床直後に有意に高く、一方で唾液および舌においては就寝前に有意に高かった (Wilcoxon rank sum test, * : $P < 0.05$)。

Streptococcus 属の相対的割合は頬粘膜において就寝前に有意に高かった (Wilcoxon rank sum test, * : $P < 0.05$)。



図7 *in situ* デンタルバイオフィルムモデル
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を挿入する。

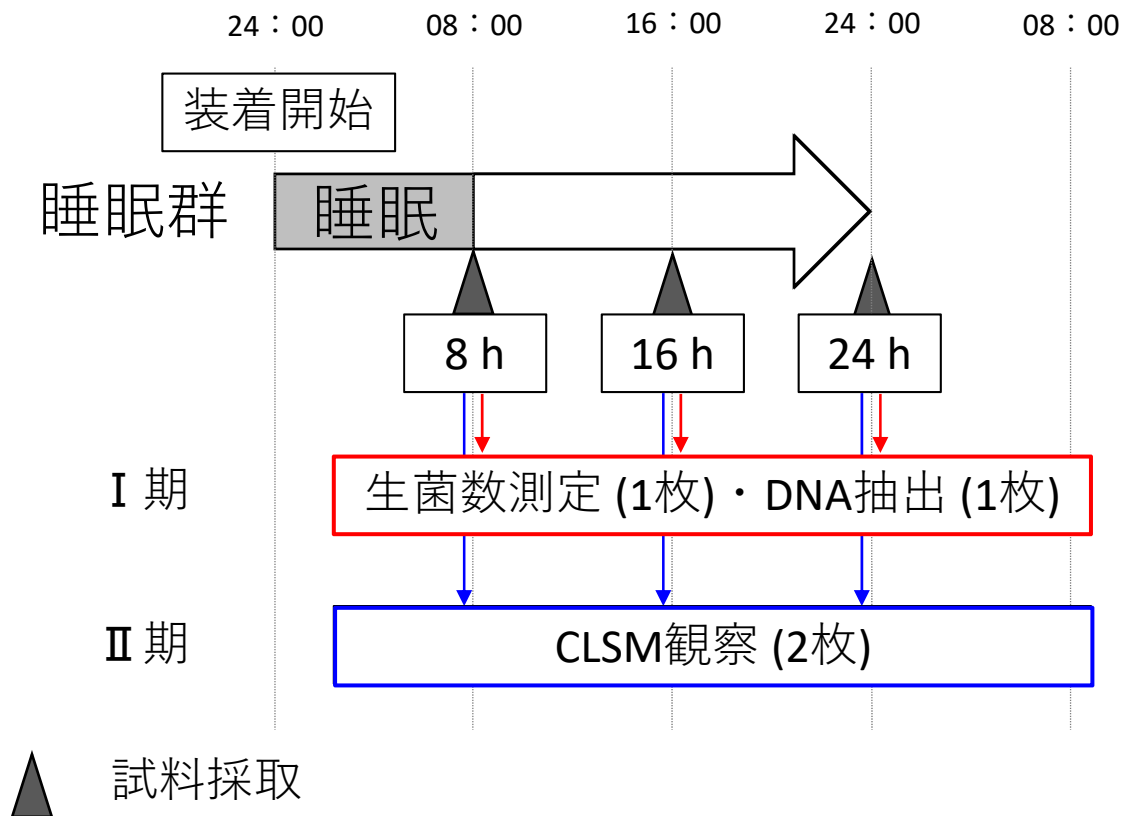
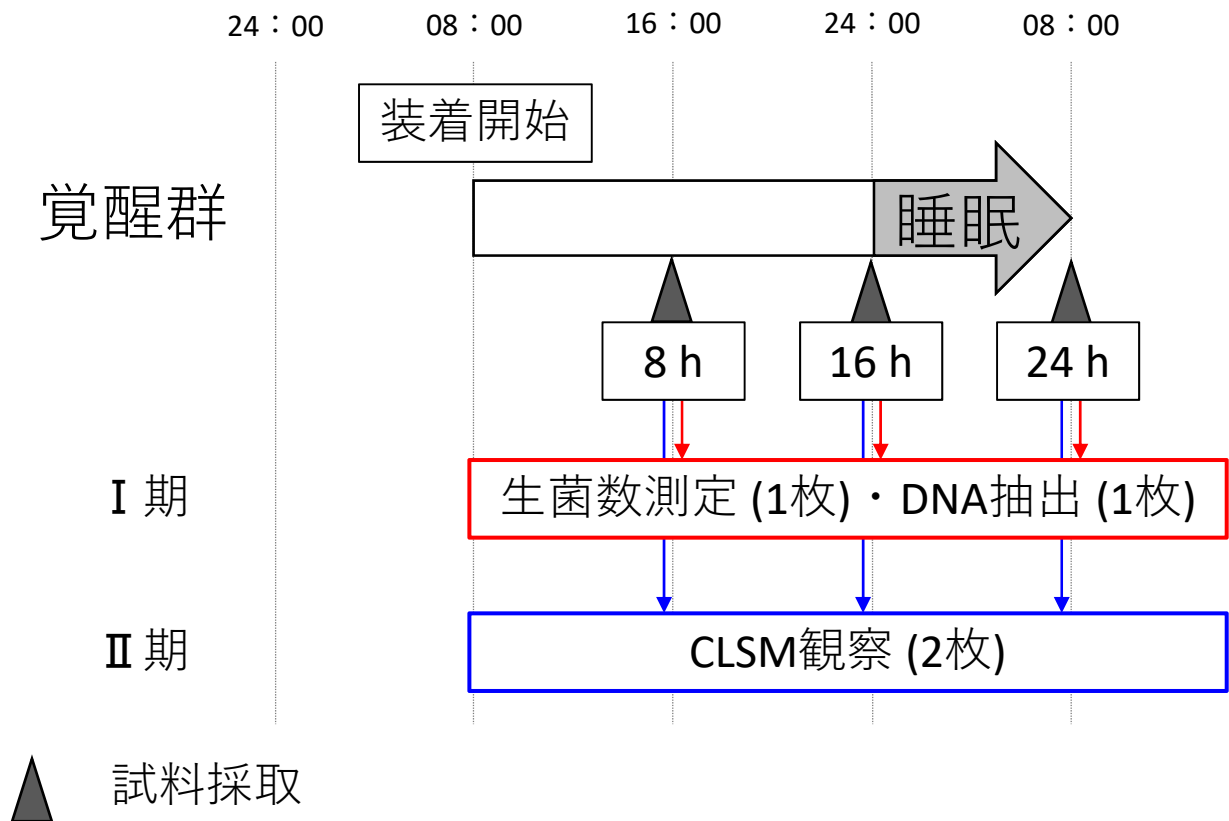


図8 実験2 (1) の実験スケジュール

各群とも口腔内装置の装着から8, 16, 24時間後にHAディスクを採取した。各評価時間に I 期ではHAディスクを2枚ずつ採取し, 一方を生菌数測定, 他方をDNA抽出に用いた。また, II 期ではHAディスクを2枚ずつ採取し, 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察に供した。

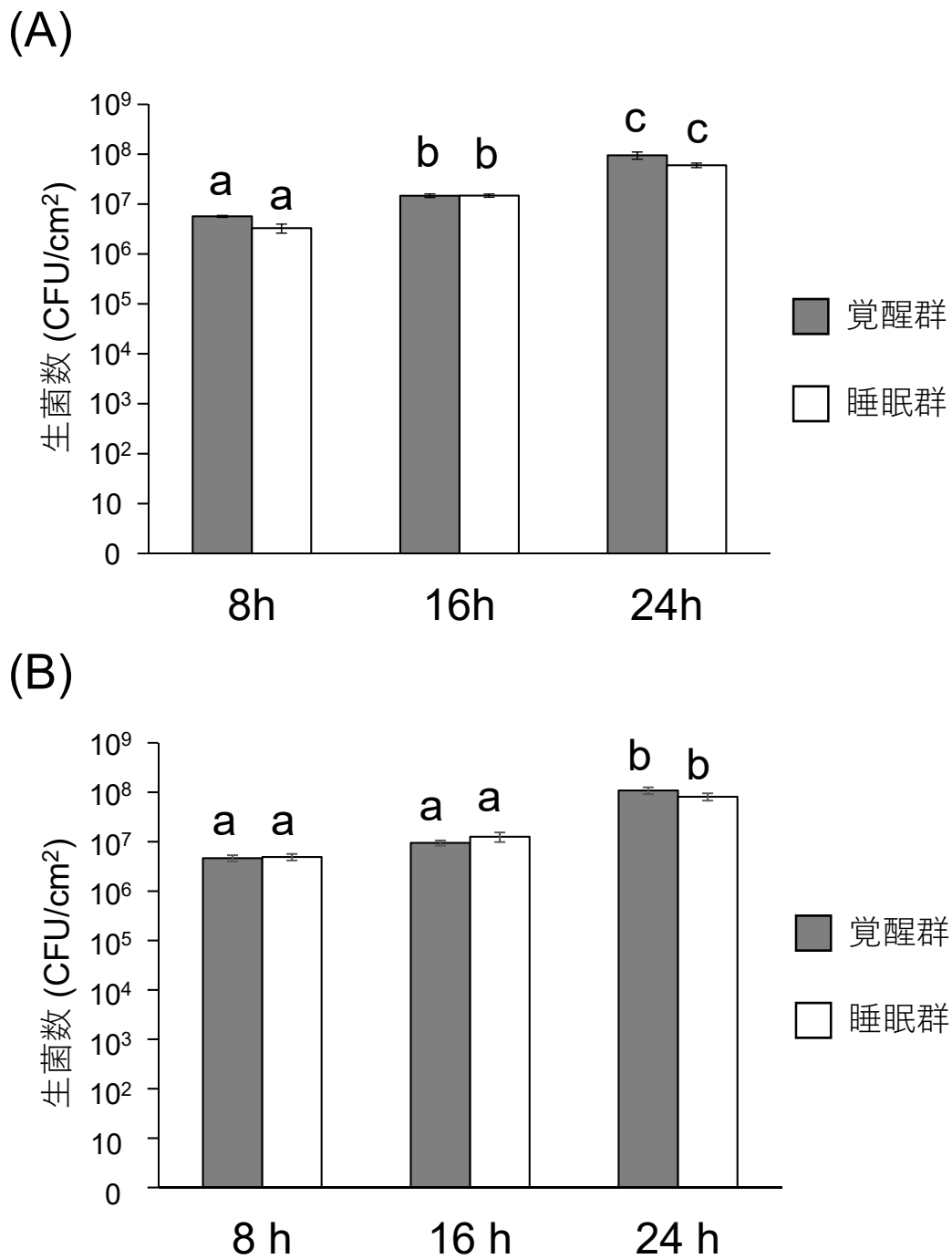


図9 生菌数測定

好気条件下での培養の結果を (A), 嫌気条件下での培養の結果を (B) に示す。異なる文字間で有意差を認める (n=10, Friedman test, $P < 0.05$)。

好氣的条件および嫌氣的条件において生菌数は経時的に増加したが、各評価時間で覚醒群および睡眠群の2群間に有意な差を認めなかった (Friedman test, $P > 0.05$)。

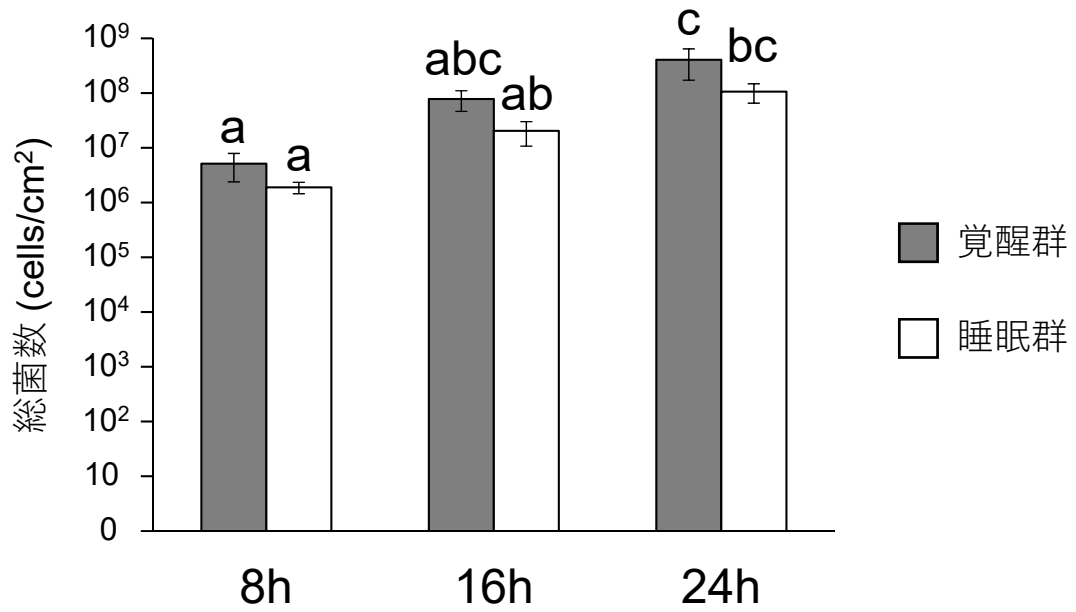
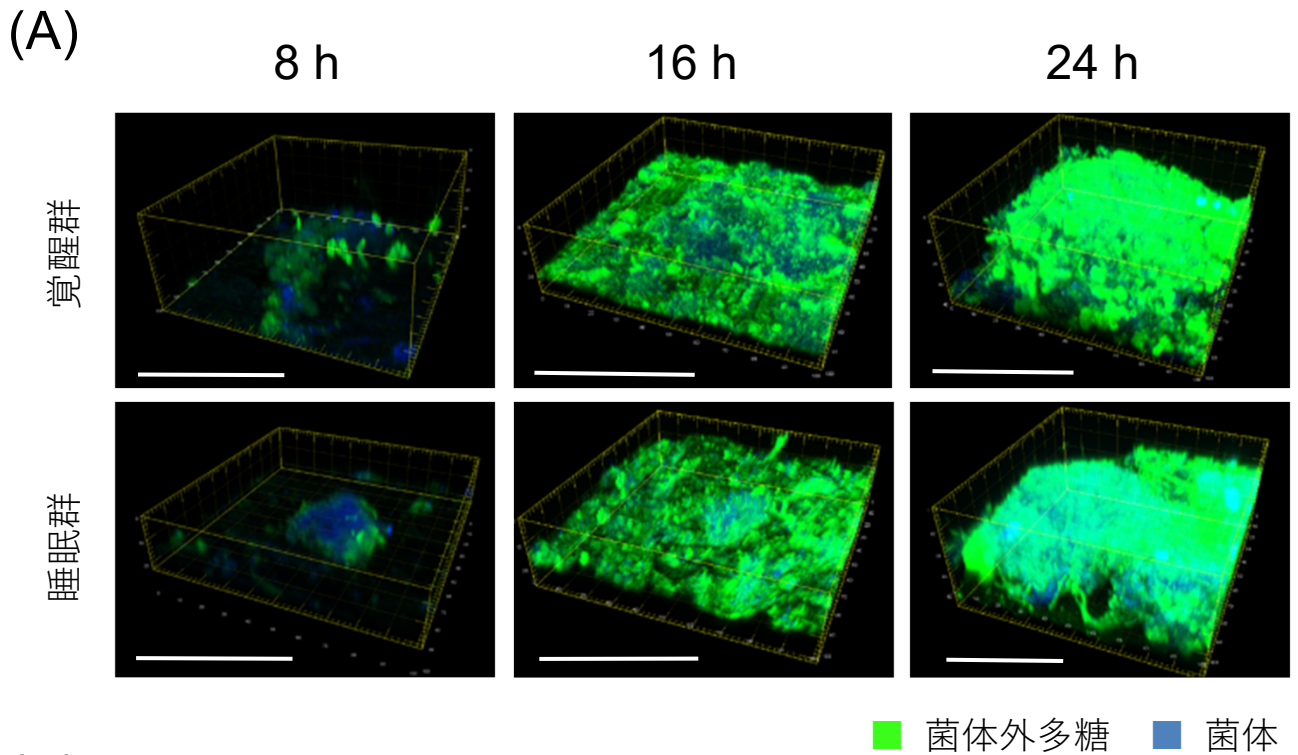


図10 リアルタイムPCRによる総菌数測定
異なる文字間で有意差を認める (n=10, Friedman test, $P < 0.05$)。
総菌数は経時的に増加したが、各評価時間で覚醒群および睡眠群の2群間に有意差を認めなかった (Friedman test, $P > 0.05$)。



(B)

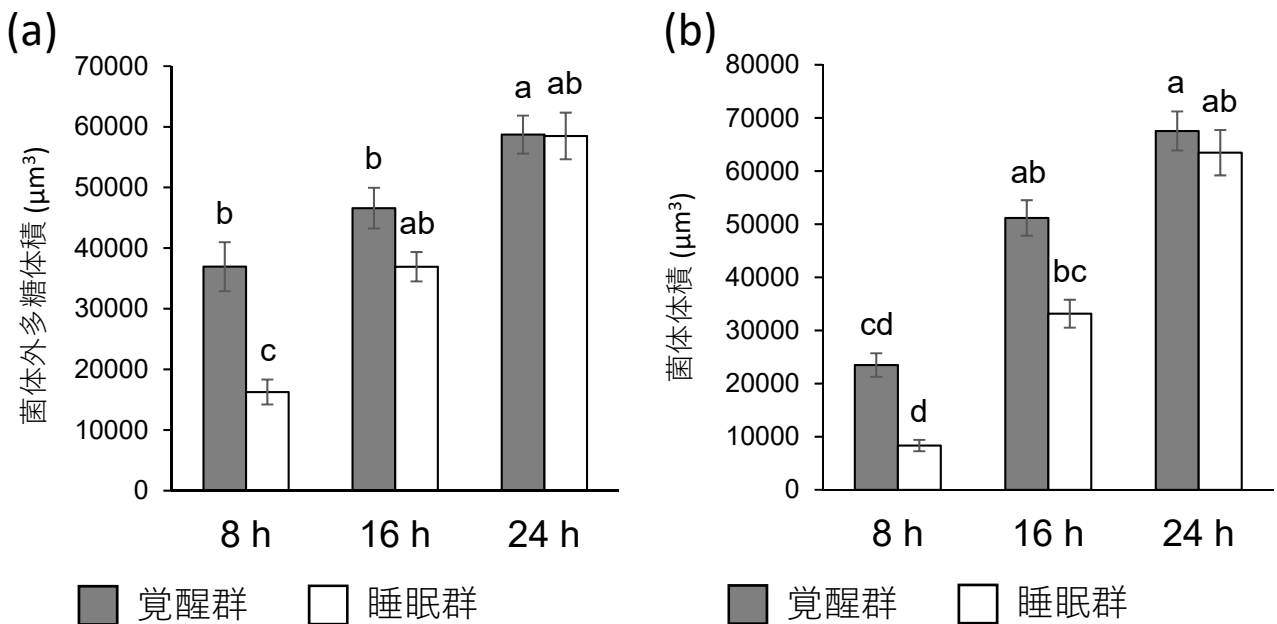


図11 共焦点レーザー顕微鏡観察

(A) 共焦点レーザー顕微鏡観察で得られた代表的な像を示す。菌体外多糖は緑、菌体は青で示される。16時間後以降、ディスク全体をバイオフィルムが被覆する像が認められた。スケールバー：50 μm

(B) Imaris®による画像解析の結果を示す (a：菌体外多糖体積，b：菌体体積)。異なる文字間で有意差を認める (n=10, Friedman test, $P<0.05$)。 (a) 8時間後に菌体外多糖の体積は覚醒群で有意に大きかった (Friedman test, $P<0.05$)。 (b) 菌体の体積は経時的に増加したが、各評価時間において、覚醒群および睡眠群の2群間に有意差を認めなかった (Friedman test, $P>0.05$)。

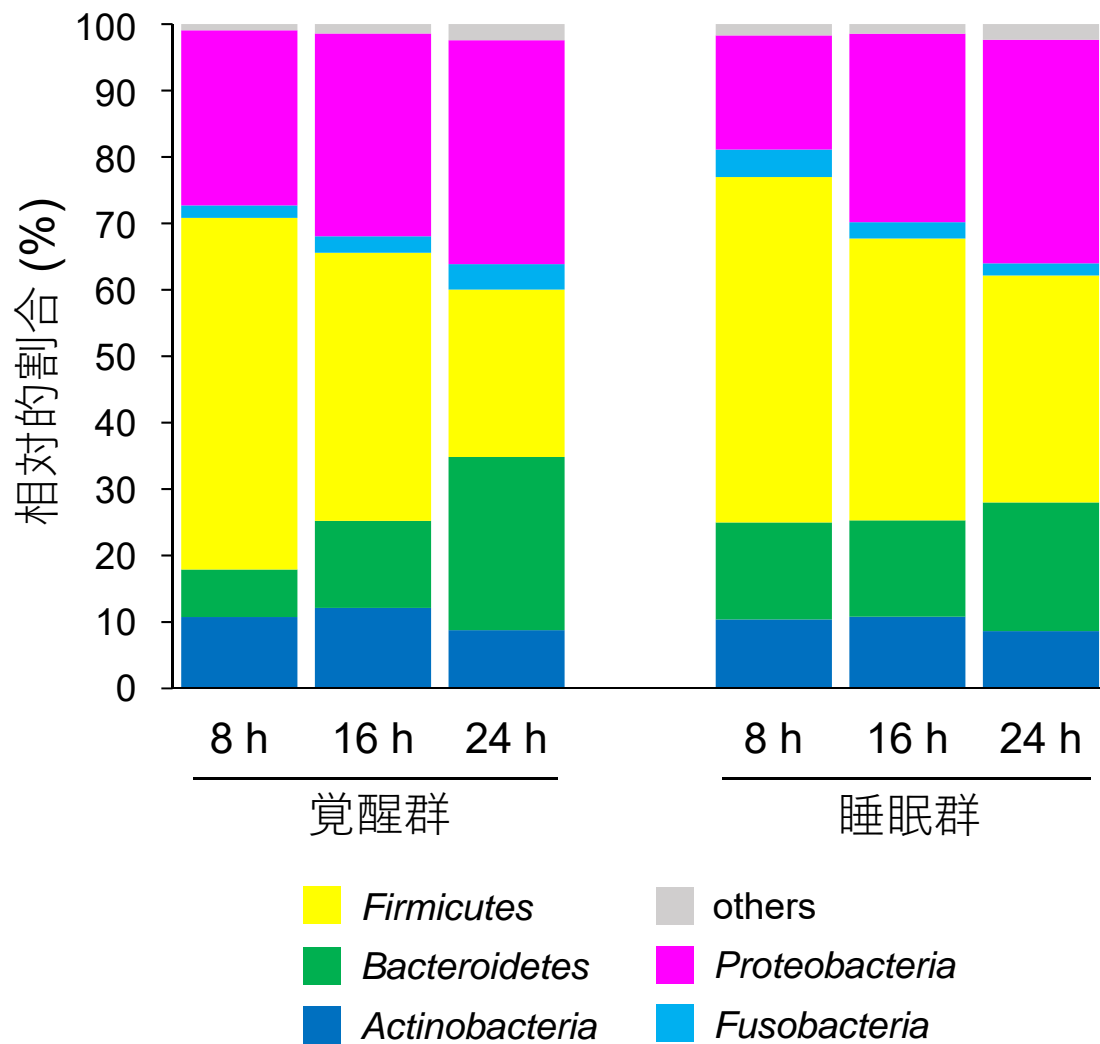


図12 門レベルでの相対的割合

門レベルでの相対的割合を示す (n=10)。

覚醒群において *Bacteroidetes* 門の相対的割合は徐々に増加した。また、覚醒群と睡眠群の両群で経時的に *Firmicutes* 門の割合が減少した。

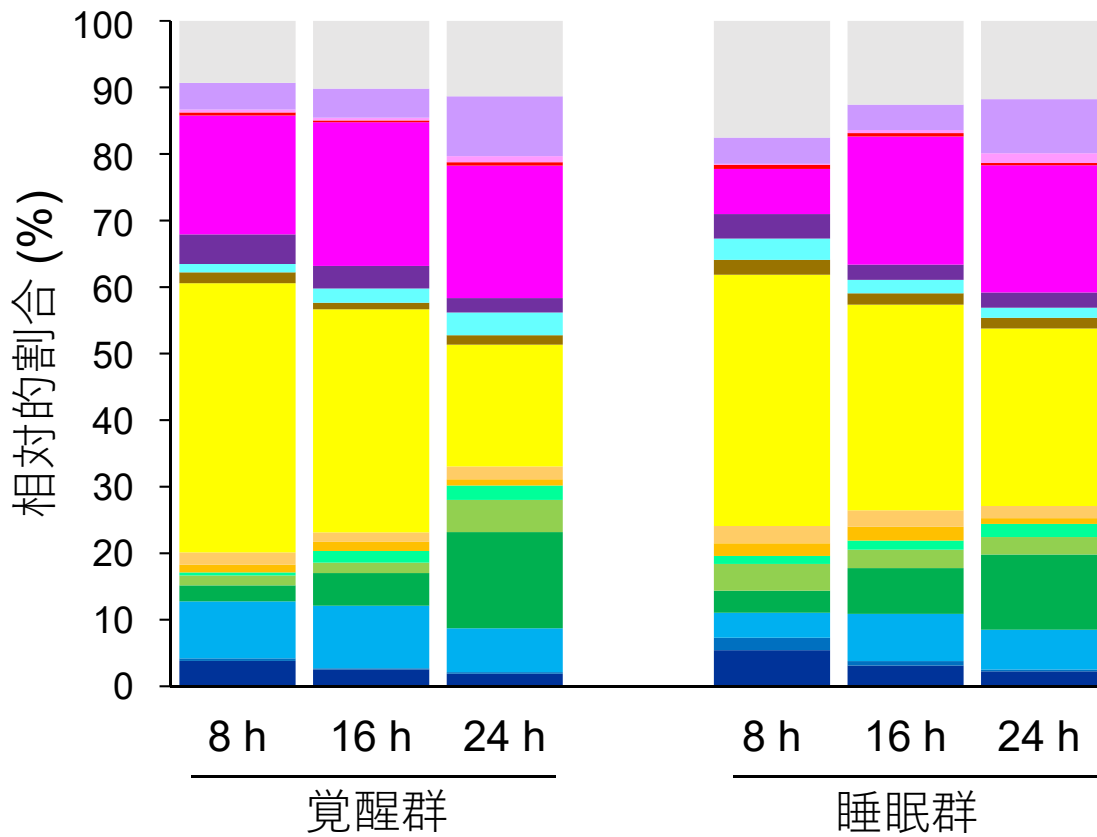


図13 属レベルでの相対的割合

属レベルでの相対的割合を示す (n=10)。

8時間後では、睡眠群より覚醒群で*Neisseria*属の割合が高かった。また、*Streptococcus*属の相対的割合は、覚醒群および睡眠群の両群で経時的に減少した。

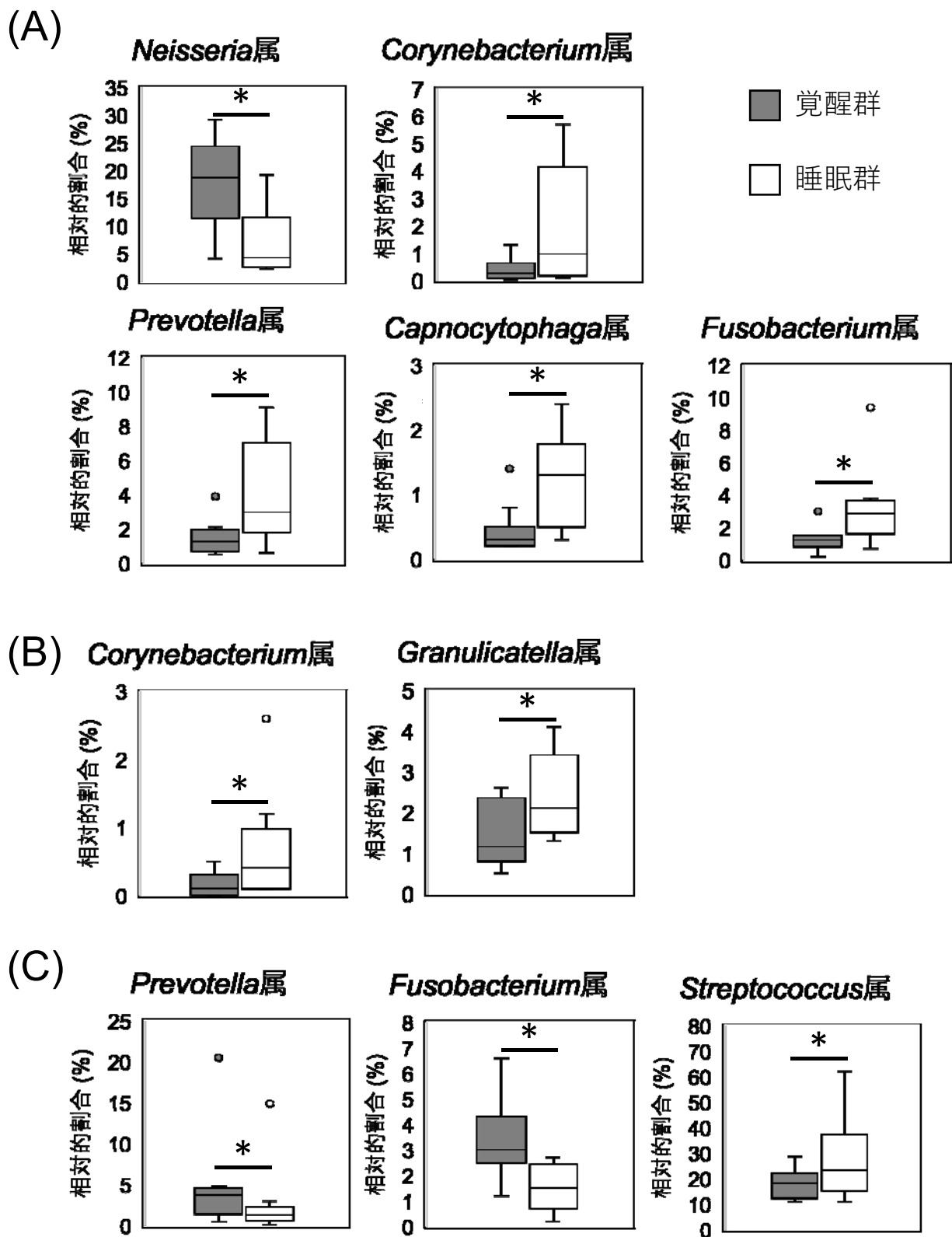


図14 各評価時間ごとの属レベルでの相対的割合
 (A) 8時間後, (B) 16時間後, (C) 24時間後に覚醒群と睡眠群の2群間に有意差を認めた属を示す (n=10, Wilcoxon rank sum test, * : $P < 0.05$)。●および○印は外れ値を表す。Prevotella属およびFusobacterium属の相対的割合は起床直後である睡眠群8時間 (A) および覚醒群24時間 (C) で有意に高かった (Wilcoxon rank sum test, * : $P < 0.05$)。

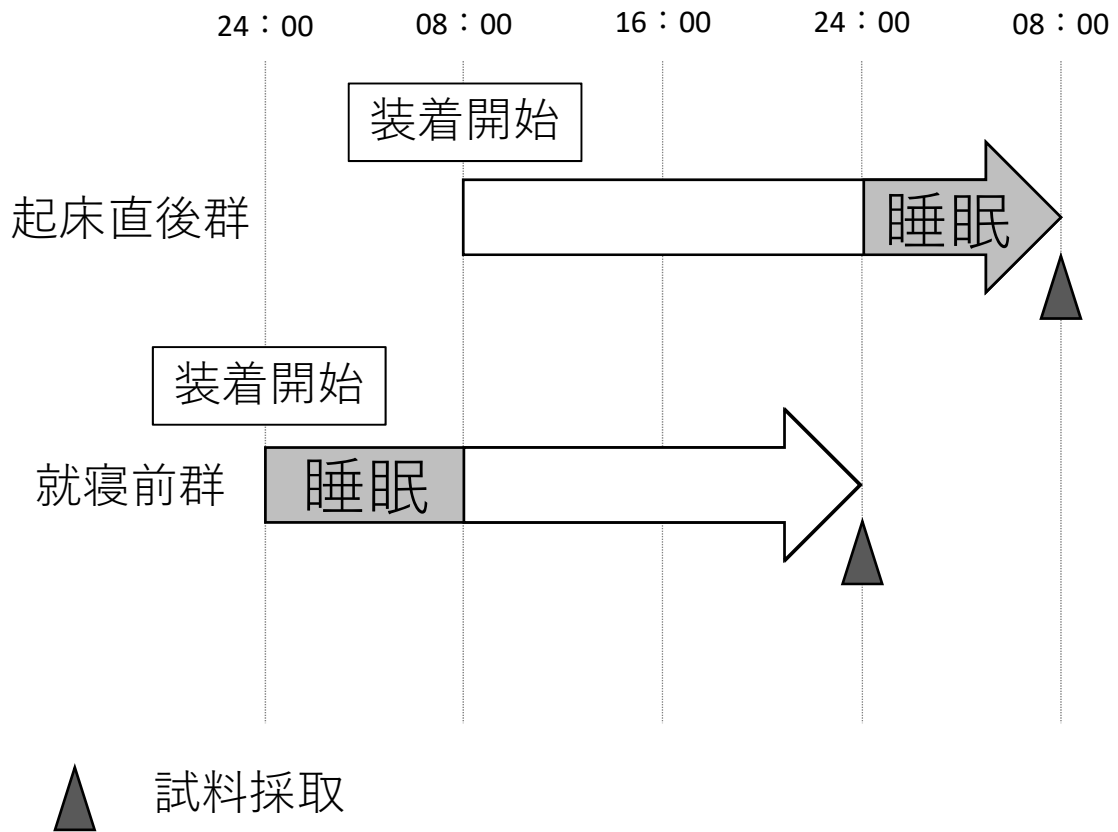


図15 実験2 (2) の実験スケジュール
各群とも口腔内装置の装着から24時間後にハイドロキシアパタイトディスクを8枚採取した。

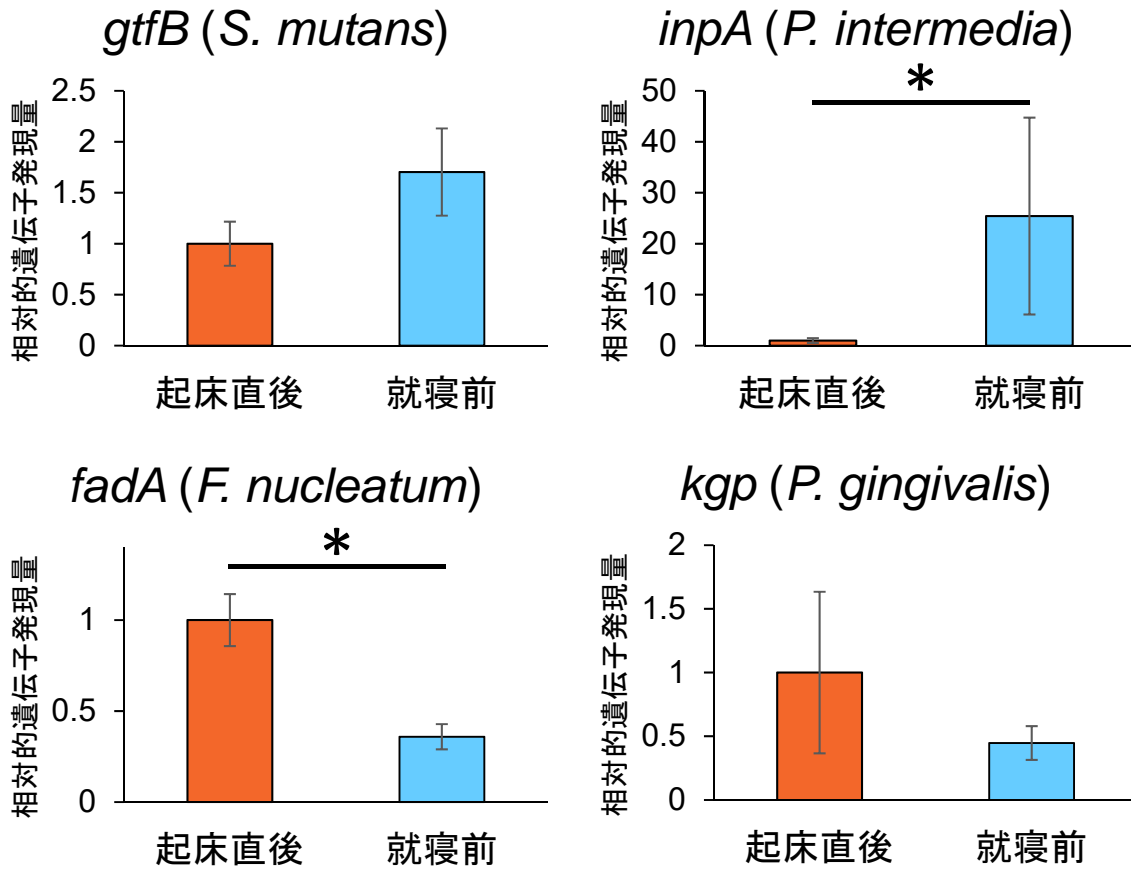


図16 相対的遺伝子発現量

起床直後に対する就寝前の各病原遺伝子の相対的発現量を示す (n=10)。 *inpA*の相対的発現量は就寝前に有意に高かった (Wilcoxon rank sum test, * : $P < 0.05$)。また, *fadA*の相対的発現量は起床直後に有意に高く (Wilcoxon rank sum test, * : $P < 0.05$) , *kgp*の発現量も同様の傾向を示した。

