

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462878

研究課題名(和文) 口腔バイオフィルムにおける菌体外マトリックスの時空間的動態のin situ解析

研究課題名(英文) In situ analysis of temporal and spatial dynamics of oral biofilm

研究代表者

朝日 陽子 (Asahi, Yoko)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50456943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉縁上バイオフィルムを可及的に再現することができるin situバイオフィルムモデルを用いて、デンタルバイオフィルム形成過程における構成細菌種の経時的動態を検索した。その結果、通性嫌気性菌が主体であった細菌叢が、バイオフィルムの成熟とともに偏性嫌気性菌の割合を増すことが明らかとなった。一方、菌体外多糖の形成量は経時的に増加し、また形成量に経時的な変化を認める糖成分があったが、一定の傾向は認めなかった。また、新たな走査型電子顕微鏡観察法であるイオン液体を用いた方法において、バイオフィルム観察に適するイオン液体の評価を行った。

研究成果の概要(英文)：Using the in situ biofilm model that reproduces supragingival biofilm, we investigated the temporal dynamics of biofilm-forming bacterial species during the dental biofilm formation. As a results, the initial population of facultative anaerobic bacteria was replaced with the population of gram-negative anaerobic bacteria during dental biofilm formation. Also, in a method using an ionic liquid that is a new scanning electron microscopy observation method, ionic liquids suitable for biofilm observation was evaluated.

研究分野：医歯薬学

キーワード：バイオフィルム in situバイオフィルムモデル

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは、宿主防御機構や抗生物質に抵抗性を示す。従って、デンタルバイオフィーム感染症に対して、治療法の第一選択は機械的除去であるが、除去困難な部位に形成されたバイオフィームに対しては、新たな化学的コントロール法が必要である。

口腔内には500種類以上の細菌が存在しており、これらの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ている。デンタルバイオフィーム感染症に対する化学的コントロール法を確立するためには、実際の環境を模した複数菌種から構成されるバイオフィームを用いた検討が必要である。

我々は、ヒト口腔内でバイオフィームを形成する装置 (*in situ* バイオフィームモデル) を新規に開発し、バイオフィーム形成過程におけるバイオフィーム細菌数の経時的動態を明らかにした。その結果、バイオフィーム形成96時間後までのバイオフィーム細菌の生菌数の増加曲線はシグモイド状を呈した。デンタルバイオフィームでは、経時的に構成細菌叢が変化し、またそれに伴い菌体外マトリックスにも経時的な変化を生じると考えられる。

2. 研究の目的

in situ バイオフィームモデルを用いてデンタルバイオフィームを作製し、経時的にサンプルを取り出し、デンタルバイオフィーム形成過程における構成細菌種および菌体外マトリックスの経時的動態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) デンタルバイオフィーム構成細菌叢の経時的動態

in vivo バイオフィーム形成

申請者らが開発した口腔内バイオフィーム形成装置 (ナイトガードの材料を用いて作製) を用いて、バイオフィーム形成を行った。装置の頬側に付与したポケットにハイドロキシアパタイトディスク (HA ディスク) を挿入し、HA ディスク上にデンタルバイオフィームを形成させた。なお、装置については研究協力者である町 博之に作製を依頼した。なお、実験開始1週間前に被験者の全顎的スケリングを行い、実験期間中はブラッシングおよび飲食時以外は口腔内装置の装着を行った。装置のポケットより経時的 (4-96時間) にバイオフィームサンプルを取り出し、以下の解析に供した。

透過型電子顕微鏡による微細形態学的観察

上記 項にて採取したサンプルを固定・脱水後、エポキシレジンに包埋した。その後、超薄切片を電子染色し透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察に供した。

16S rRNA シーケンス解析

上記 項にて採取したサンプルより、PowerSoil® DNA Isolation Kit にて DNA を抽

出した。その後、16S rRNA をターゲットとし、次世代シーケンサー Ion PGM® を用いた Pyrosequencing を行った。得られたシーケンスデータは QIIME® を用いて解析した。

(2) 形成時期の違いによるデンタルバイオフィームの比較

(1) 項の方法でバイオフィームを作製した。バイオフィーム形成開始時期を午前と夜間に設定した。バイオフィーム形成8-16時間後にバイオフィームサンプルを採取し、以下の解析に供した。

定量的解析

上記 にて採取したサンプルより超音波処理にてバイオフィームを剥離し、コロムビア血液寒天培地に接種した。Colony forming unit をカウントし、生菌数を算出した。

シーケンス解析

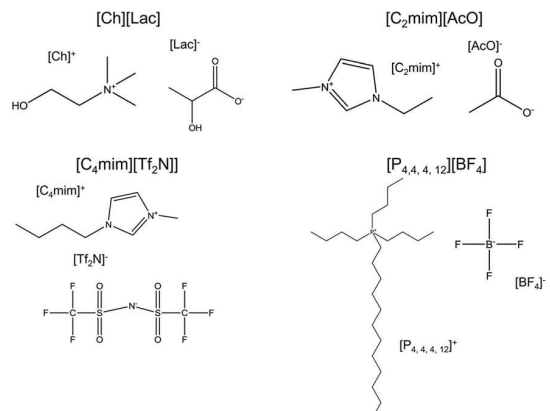
上記 項にて採取した試料を (1) 項と同様の方法にて解析を行い、細菌叢の同定を行った。

(3) デンタルバイオフィームの菌体外マトリックスの経時的動態

上記 (1) 項の方法でバイオフィームを作製した。バイオフィーム形成4-24時間後にサンプルを採取し、ConA-Alexa350, ABA-FITC, WGA-Rhodamine にて染色後、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて観察を行った。得られたデータより画像解析ソフト Imaris にてそれぞれの成分の定量を行った。

(4) 走査型電子顕微鏡によるバイオフィーム観察の新規方法の確立

Streptococcus mutans を用い、フローセルモデルにてバイオフィームの形成を行った。作製したバイオフィームを従来法およびイオン液体を用いた方法での走査型顕微鏡観察に供した。イオン液体を用いる方法においては、疎水度、粘調度などの異なる4種のイ



オン液体 (図1) を用いて比較検討を行った。また、イオン液体が菌体外マトリックスに及ぼす影響を検討するために、作製したバイオフィームサンプルにイオン液体を作用させ、TEM および CLSM にて観察を行った。TEM 観察においては、ルテニウムレッド、CLSM 観察においては Concanalcalin A-

tetramethylrhodamine conjugate による染色を行った後、観察を行った。

図1 実験に用いたイオン液体

4. 研究成果

(1) デンタルバイオフィーム構成細菌叢の経時的動態

微細形態学的観察結果(図2)

TEM 観察にて、バイオフィーム形成4時間後にペリクル様構造物に付着するグラム陽性の球菌が認められた。バイオフィーム形成8時間後、ペリクル様構造物上に層状に重なった細菌が認められ、大部分がグラム陽性球菌だった。12時間後には、様々な大きさの球菌や桿菌、線状菌など多種多様な形態の細菌がみられた。バイオフィーム形成16および24時間後には、バイオフィーム細菌の密度が上昇し、活発に分裂している細菌が観察された。また、グラム陰性桿菌も認められた。バイオフィーム形成72時間以降には、バイオフィーム細菌の密度が低下した。また、グラム陰性菌の増加やゴーストセルの出現がみられた。

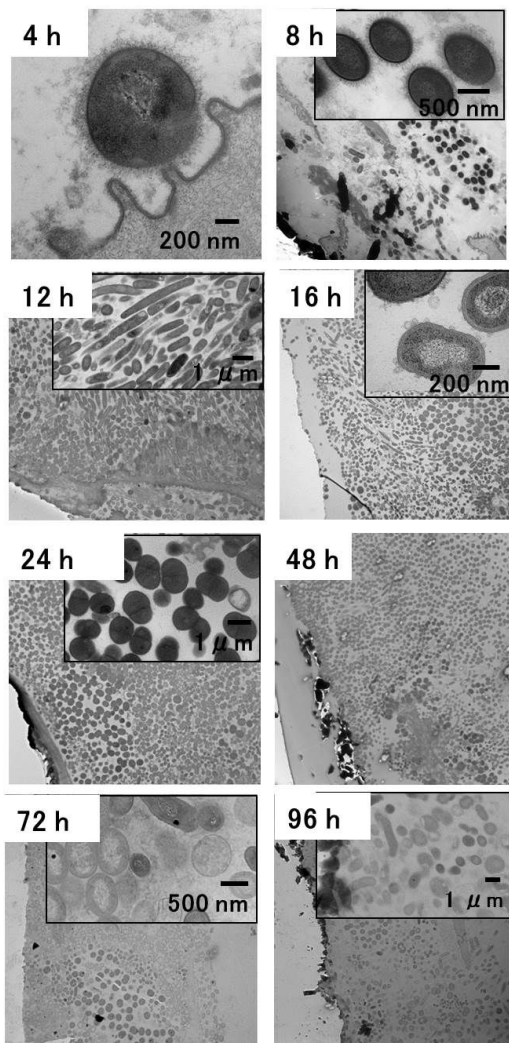


図2 微細形態学的観察結果

シーケンス解析結果(図3)

門レベルでは、バイオフィーム形成16時間まで Firmicutes 門の増加が認められ、その後 Fusobacteria 門および Bacteroidetes 門の増加がみられた。また、72時間後に Proteobacteria 門が急速に増加するサンプルを認めた。一方、Bacteroidetes 門が緩やかに増加するサンプルもあった。属レベルでは、12-16時間まで Streptococcus 属の増加を認め、その後 Fusobacterium 属および Porphyromonas 属などの偏性嫌気性菌の増加がみられた。Streptococcus 属は初期には全細菌に占める割合が20%以上であったが、96時間後には5%以下となった。Firmicutes 門の大部分が Streptococcus 属、Fusobacteria 門の大部分が Fusobacteria 属、また Bacteroidetes 門は Capnocytophaga 属、Prevotella 属、Porphyromonas 属が占めていた。

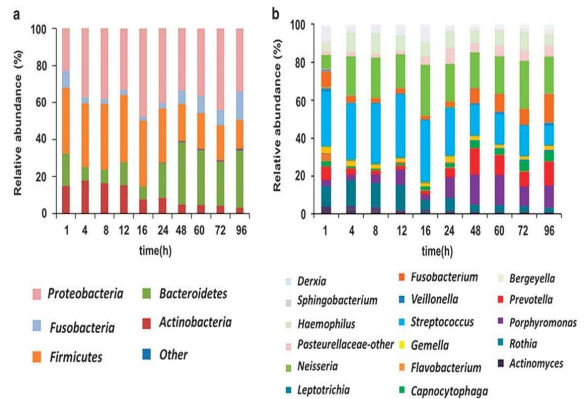


図3 シーケンス解析結果

a) 門 b) 属

(2) 形成時期の違いによるデンタルバイオフィームの比較

われわれの先行研究にて、バイオフィーム形成における細菌数の増加は一定ではなく、バイオフィーム形成12時間後まで急速に増殖し、その後増加速度が低下、48時間後に再び急速な増加を示した。そこでバイオフィーム形成時期の違いによるデンタルバイオフィームの相違につき検索を行った。

定量的解析の結果、いずれの時間帯においても、日中と夜間に形成されるバイオフィーム量には有意差を認めなかった(図4)。

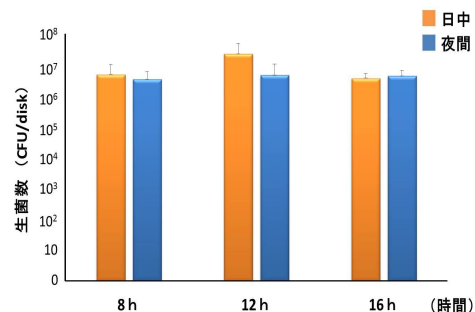


図4 定量的解析結果

シーケンス解析の結果，個人差が認められたが，平均することで一定の傾向がみられた(図5)。すなわち，日中と比較して夜間に形成されたバイオフィルムは，Proteobacteria 門の割合が少なく，Fusobacteria 門および Bacteroidetes 門の占める割合が高かった。

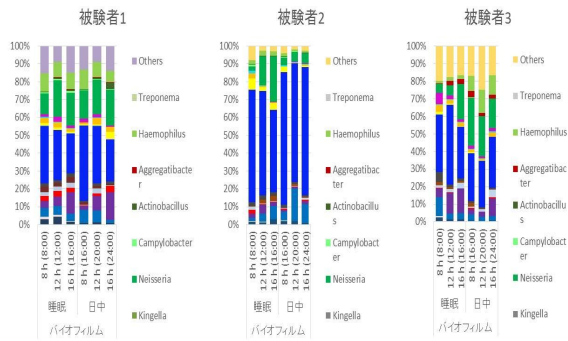


図5 シーケンス解析結果

(3) デンタルバイオフィルムの菌体外マトリックスの経時的動態(図6, 7)

菌体外多糖の形成量は経時的に増加した。バイオフィルム形成8および24時間において，糖成分の形成量の間有意差を認めた。また β 1c/NAc 特異的レクチンである WGA は，バイオフィルム形成後8時間以前と12時間以降において有意差を認めた。Gal/GalNAc 特異的レクチンである ABA は，バイオフィルム形成8時間以前と24時間の間で有意差を認めた。

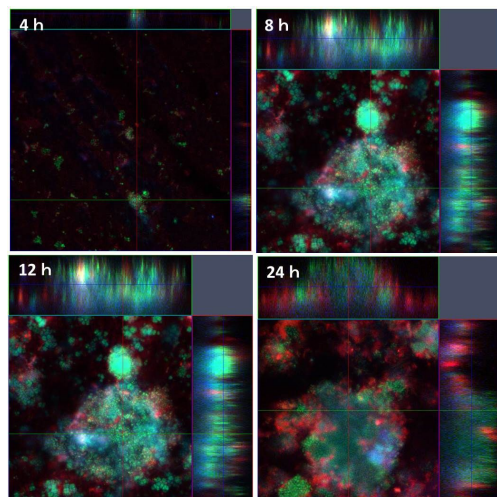


図6 CLSM 像
赤：WGA 青：ConA 緑：ABA

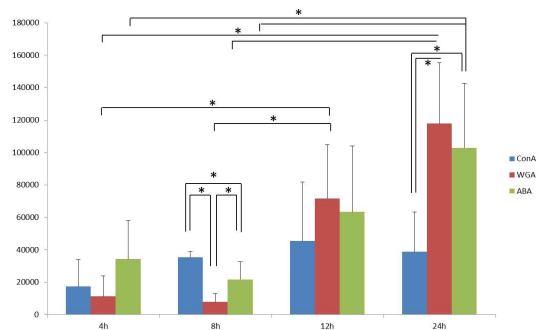


図7 定量結果

(4) イオン液体を用いたバイオフィルムの観察

従来の走査型電子顕微鏡観察法において，水分を多く含むバイオフィルムは固定や乾燥などの処理を行う必要がある。これに対してイオン液体を用いた観察法は，水分を含むサンプルにおいて乾燥処理を行わず観察するものである。新たな走査型電子顕微鏡観察の方法として，イオン液体を用いた観察法を用い，バイオフィルムの観察を行った。

従来の脱水・蒸着を行う方法でみられたバイオフィルムサンプルの乾燥が，イオン液体を用いた方法にて改善された(図8)。

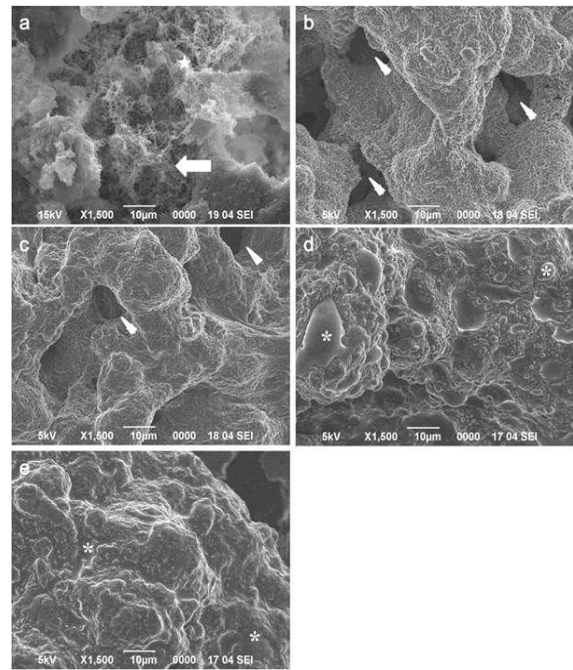


図8 SEM 観察結果

a) 従来法 b) [Ch][Lac] c) [C2mim][AcO]
d) [C4mim][Tf2N] e) [P4,4,4,12][BF4]

また，TEM 観察および CLSM 観察において，イオン液体はバイオフィルムの菌体外マトリックスに影響を及ぼさないことが明らかとなった(図9, 10)。

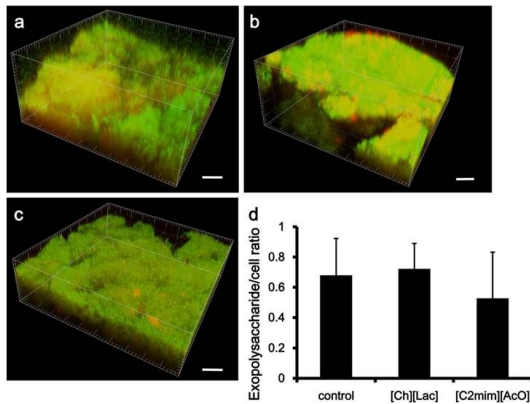


図9 CLSM 観察によるイオン液体がマトリックスに及ぼす影響の検索

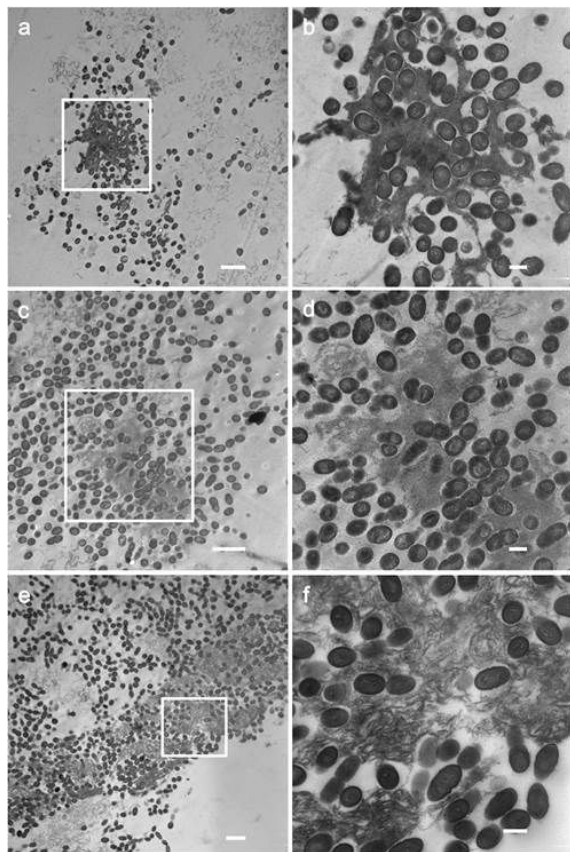


図10 TEM 観察によるイオン液体がマトリックスに及ぼす影響の検索

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

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 and Microbiomes*, 査読有

2, 2016, 16018.

和氣菜々子、朝日陽子、町 博之、野杵由一郎、恵比須繁之、林 美加子、メタゲノム解析による実験的 *in situ* デンタルバイオフィーム構成細菌の包括的同定、*Bacterial Adherence & Biofilm*, 査読無 29, 2015, 125-129.

Asahi Y, Miura J, Tsuda T, Kuwabata S, Tsunashima K, Noiri Y, Sakata T, Ebisu S, Hayashi M, Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express*, 査読有 5(1), 2015, 6.

Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S, Hayashi M, Inhibition of polysaccharide synthesis by the *sinR* orthologue PGN_0088 is indirectly associated with the penetration of *Porphyromonas gingivalis* biofilms by macrolide antibiotics. *Microbiology*, 査読有 161, 2014, 422-9.

Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, Azakami H, Hayashi M, Ebisu S, Effects of the tea catechin Epigallocatechin Gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol*, 査読有 116(5), 2014, 1164-71.

〔学会発表〕(計 8 件)

永山智崇、朝日陽子、住岡龍一、米田直道、松井沙織、後藤満帆、野杵由一郎、恵比須繁之、林 美加子、過剰根管充填された難治性根尖性歯周炎の治療経過における細菌学的解析、第 145 回日本歯科保存学会、2016 年 10 月 28 日、松本市
山口幹代、伊藤勇紀、須崎尚子、堅田千裕、外園真規、川西雄三、増田晃一、米田直道、朝日陽子、山田朋美、伊藤祥作、林 美加子、ニッケルチタン FKG レイスによる湾曲根管形成実習の教育効果、西日本歯内療法学会第 16 回研修会、2016 年 9 月 11 日、大阪市

永山智崇、朝日陽子、住岡龍一、米田直道、野杵由一郎、恵比須繁之、林 美加子、難治性根尖性歯周炎において根尖孔外バイオフィーム以外の原因の関与が考えられた 1 症例、第 144 回日本歯科保存学会、2016 年 6 月 10 日、宇都宮市
和氣菜々子、朝日陽子、町 博之、野杵由一郎、恵比須繁之、林 美加子、メタゲノム解析による実験的 *in situ* デンタルバイオフィーム構成細菌の包括的同定、第 29 回日本バイオフィーム学会、2015 年 7 月 11 日、名古屋市

和氣菜々子、朝日陽子、町 博之、野杵由一郎、恵比須繁之、林美加子、実験的 *in situ* デンタルバイオフィーム構

成細菌の包括的解析、第 143 回日本歯科保存学会、2015 年 11 月 13 日、東京都
Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Machi H, Ebisu S, Hayashi M, Time-dependent Analysis of Dental Biofilms by New *in situ* Model, 93th IADR, 2015 年 3 月 13 日, Boston, USA

Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Machi H, Ebisu S, Hayashi M, Quantitative Analysis of Human Dental Biofilms by New *in situ* Model, JADR, 2014 年 12 月 4 日, Osaka
和氣菜々子、朝日 陽子、町 博之、野杣 由一郎、恵比須 繁之、林美加子、デンタルバイオフィルムの形成と制御に関する包括的 *in situ* 解析～各細菌属の経時的定量解析～第 141 回日本歯科保存学会、2014 年 10 月 31 日、山形

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝日 陽子 (ASAHI, Yoko)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号：50456943

(2) 研究分担者

野杣 由一郎 (NOIRI, Yuichiro)
新潟大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50218286

三浦 治郎 (MIURA, Jiro)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70437383

恵比須 繁之 (EBISU, Shigeyuki)
大阪大学・歯学研究科・特任教授
研究者番号：50116000
(平成 28 年度より分担者として参画)