

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861831

研究課題名(和文) FISH法を用いたデンタルプラーク構築過程の解明

研究課題名(英文) Observation of early dental plaque formation process using the FISH method

## 研究代表者

坪井 秀憲 (Tsuboi, Hidenori)

九州大学・歯学研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：60614253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：デンタルプラークの初期形成過程を明らかにすることを目的として研究を行った。3次元構造理解のため非破壊的に細菌種を染め分け可能なfluorescence in situ hybridization法でハイドロキシアパタイトディスク上にプラーク形成させ観察する系を確立した。従来考えられていた層状構造ではなく数種類の菌が集まった山塊状のコロニーが大きくなり融合する形で初期プラークを形成することがわかった。そこでin vitroの系で細菌を混合しこの現象の再現を行ったところ初期山塊状コロニーに類似の構造形成に必要な不可欠な細菌種はNeisseria属とActinomyces属であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the primary dental plaque formation, we constructed the fluorescence in situ hybridization (FISH) method that could observe the non-destructive plaque and classified the bacteria on hydroxyapatite disk. As a result, we discovered that some bacteria made the small colonies of mountain-like formation in early dental plaque and time passed, become fused the colonies made large dental plaque. Next, we mixed the certain bacteria and made similar colonies in vitro. We found that Neisseria genus and Actinomyces genus were essential for aggregation of bacteria and making the similar mountain-like colonies.

研究分野：予防歯科

キーワード：デンタルプラーク FISH

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの口腔では膨大な数の細菌が複雑な相互作用に基づく一つの生態系(細菌叢)を構築しており、近年口腔疾患の発症は特定の菌種というよりその細菌叢全体の変化により起こると考えられるようになってきている。これまでこの細菌叢に含まれる細菌種を明らかにする方法として、T-RFLP法が主に用いられてきた(Kent et al.2003)。T-RFLP法とは細菌が共通に保持している、細胞のタンパク質合成装置であるリボソームに含まれる特定のRNA分子の遺伝子(16SリボソームRNA遺伝子)が種ごとわずかに配列の違うことを利用し、特定の部位のPCR断片を制限酵素処理してその長さを計測することで細菌を種〜属レベルで特定する方法である。また16SリボソームRNA遺伝子のPCR断片を次世代シーケンサーにかけることにより細菌叢内の菌の種類や割合を明らかにする方法もある。う蝕や歯周病の原因となるデンタルプラーク内の細菌種の特定や細菌叢の変化もこの方法を利用して特定可能であり、申請者の所属する研究室では上記の手法によりう蝕経験のない成人は経験のある成人に比べて多様な細菌種を持つことや特定の菌種の割合が高いこと、ある種の細菌の生育が遅いことなど、プラークがユニークな成熟過程を辿ることを明らかにした(Takeshita et al. 2015)。しかしながらプラークを構成する菌種が明らかになる一方でそのプラーク内における細菌同士の構造関係については不明なままである。

## 2. 研究の目的

そこで本研究ではまずは fluorescence in situ hybridization(FISH)法を用いて口腔細菌群集を直接網羅的に観察する手法を開発する。FISH法とは種-属特異的なDNA蛍光プローブを用いて、DNAを抽出せずに細胞中の特定の遺伝子を染めることにより非破壊で

細菌を染める技術であり、この方法を用いることによりプラーク中の菌の位置関係や細菌同士の共凝集関係が明らかにできると考えられる。この技術自体はこれまでも幾多の研究で使われておりそれほど新しい方法ではない(Amann and Fuch. 2008)。しかしながら細菌でFISH法を行う場合、固定・染色の際に細菌をバッファーで洗う必要があるためサンプル上のプラークを破壊してしまいプラーク内での菌の層構造を観察するまでには至らなかった。そのため、これまでは構造解析ではなく主としてサンプルに付着した菌種の特定や培養したバイオフィルムを使用した研究に用いられてきた(Sunde et al. 2003, Malic et al. 2009, Kolenbrander. 2011)。従って菌の属や種それぞれに特異的なプローブの配列に関する知見は大量に整備されており(Amann et al. 1990, Zijngje et al. 2010)今後、この研究を進める上で多いに役立つと考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究ではまず蛍光プローブを用いた in situ hybridization 法(FISH法)を利用してデンタルプラークの構造を保ったまま内部構造を直接観察する方法を確立する。その際にはプローブとして使う遺伝子の部位の選定や立体的な層構造を保ったまま固定染色および顕微鏡観察を行うための方法の検討が必要であると考えられる。系が確立した段階で実際にプラークのヒト口腔内にハイドロキシアパタイトディスクを設置しこのディスク上に形成されるプラークの構造変化の経時的な観察を行い高頻度に検出される共凝集関係の特定を目指す。ある種あるいは属の菌の関係性や特定の構造などが見いだされた際にはその菌属が培養可能であれば培養を行い in vitro の系で実際に菌を混ぜ合わせて共培養しハイドロキシアパタイト上でどのような構造・関係性を示すかを実際

に観察し in vivo で起こった現象の検証・再現を試みる。

#### 4. 研究成果

本研究の最初の目的はヒトの口腔内に設置したハイドロキシアパタイトディスクに付着したデンタルプラーク内において立体構造を保ったまま fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により個々の細菌種を染め分け、観察出来る手法を確立することであった。実際に申請者を含む本研究室に所属する者 3 名

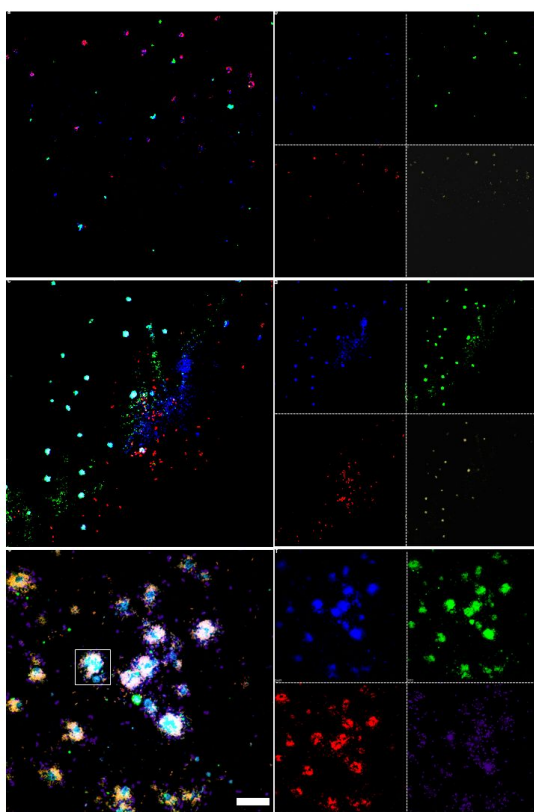


図1  
上から4時間、8時間、16時間ヒト口腔内で形成させたデンタルプラークの形成の初期過程。右側の4枚は緑: *Neisseria* 属 赤: *Streptococcus* 属 紫: *Actinomyces* 属 青: その他を示し左側の大きな1枚は右側4枚を重ね合わせたもの  
Bar = 10 μm 白い口は図3で断面図を示した

に検体作成を依頼し 8.16.24 時間のデンタルプラークを作成し観察したところ *Streptococcus* 属, *Neisseria* 属, *Actinomyces* 属, *Prevotera* 属など 8 属にわたる主要菌属の染め分けを行うことが可能であった。この手法に関しては現在までのところ主要菌属のみでしか試行は行っていないがプローブを作成しさえすればほぼ全ての

菌属・菌種での染め分けが可能であると考えられる。さらに *Streptococcus* 属, *Neisseria* 属, *Actinomyces* 属を用いて共染色を行いデンタルプラーク内の構造解析及び口内細菌の初期付着を経時的に観察した。すると実際のヒトの口腔内においては、これまで考えられていたように層状に菌が堆積してプラークを形成していくわけではなく、幾つかの菌属が集まって一つの山塊状の構造を作りこれが成長してさらに大きなバイオフィルムとして成熟していくような経過が観察できた。(図1) またその際も特定の菌が最下部に存在しており、この菌がデンタルプラークの初期形成過程において重要な役割を果たしている可能性が考えられた。そこで in vitro の系を使用してこの現象の再現・検証を試みた。*Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* および *Neisseria mucosa* をそれぞれ単独で培養して

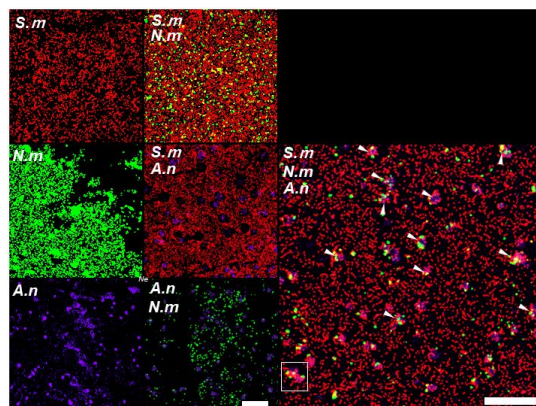


図2  
左から1種、2種、3種混合培養した8時間バイオフィルム  
緑: *Neisseria mucosa* 赤: *Streptococcus mutans*  
紫: *Actinomyces naeslundii*  
Bar = 10 μm 白い口は図3で断面図を示した  
3種混合培養した図の白い矢頭は特徴的な山塊状構造物

も密度の濃い塊上のコロニーは形成できず *S. mutans*-*N. mucosa* および *S. mutans*-*A. naeslundii* でも同様であった。(図2) しかしながら *N. mucosa*-*A. naeslundii* では小規模ながら細菌同士の凝集が確認でき3種を混合すると *N. mucosa*-*A. naeslundii* を中心としてその周辺に *S. mutans* が付着する形で実際の口腔内と似通った山塊状の構造を示すことがわかった。このことからデンタル

ラークの初期構築過程においては *Actinomyces* 属および *Neisseria* 属が重要な役割を果たしているのではないかとということが考えられた。(図3)

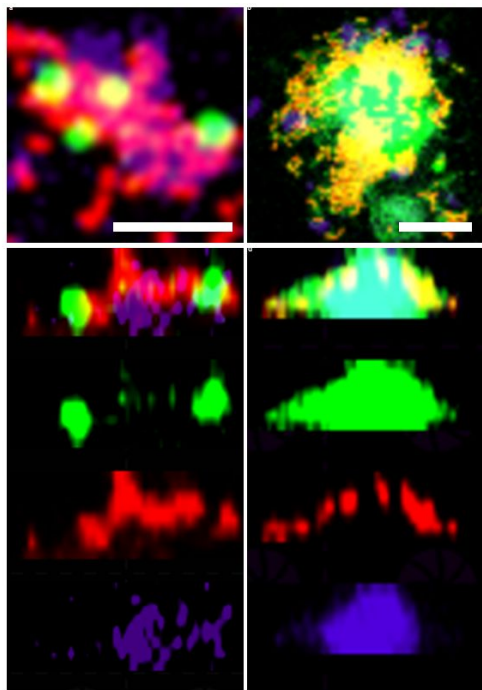


図3  
図1および図2の□で示した山塊状構造物の断面図。  
左:in vitro 右:in vivo 8時間バイオフィルム。  
緑:*Neisseria*属 赤:*Streptococcus*属 紫:*Actinomyces*属  
Bar = 5  $\mu$ m  
中心付近に *Actinomyces*属 周辺に *Streptococcus*属が存在し山状の構造をとっている。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坪井 秀憲 (TSUBOI HIDENORI)

九州大学 歯学研究院・研究員

研究者番号: 60614253

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

特になし

〔学会発表〕

特になし

〔図書〕

特になし

〔産業財産権〕

特になし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.prevent-dent-kyushu-u.com/index.php>