

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390425

研究課題名(和文)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* 解析研究課題名(英文)Comprehensive *in situ* analysis of dental biofilm formation and control

研究代表者

恵比須 繁之(Ebisu, Shigeyuki)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・理事・副学長

研究者番号：50116000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのデンタルバイオフィルム(DB)は、*in vitro* のバイオフィルムと違い、700種以上の細菌種が常在し、口腔環境や宿主因子の影響を受ける。本課題は、ヒトの口腔でDBを形成し、評価できる実験モデルを確立し、その形成メカニズムや制御法を検討することが目的であった。24年度は、ヒトの口腔でアパタイトディスク上にDBを形成させる実験モデルを開発した。25年度はそれを用いDBの形成メカニズムの一端を解明し、DB細菌の定量解析および形態学的検索を行った。26年度にはメタゲノム解析法によるDBの定性解析より、細菌量は4日目までに2相性に増加すること、また偏性嫌気性菌属は遅れて増加することを解明した。

研究成果の概要(英文)：Human dental biofilm (DB), which is different from the biofilms *in vitro*, contains more than 700 species of bacteria, and is influenced by the oral environment and host factors. The purpose of this research was to form DB in human oral cavity, to establish an experimental model of DB that can be evaluated, and to examine the formation mechanism and control method. In 2012, experimental model of DB formation on the apatite disc was developed. In 2013, quantitative analysis and morphological observation of the DB bacteria was conducted. In 2014, it is elucidated that bacteria number was increased in biphasic action by day 4, and obligate anaerobic bacteria genus was increased in late by qualitative analysis using metagenomic analysis.

研究分野：歯科保存学

キーワード：細菌、デンタルバイオフィルム、*in situ*、メタゲノム解析、ハイドロキシアパタイト、共焦点レーザー顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

歯科界にバイオフィルム感染症の病態概念を導入した研究代表者らは、種々のオーラルバイオフィルムを多様な組織・形態学的手法を用いて検索し、その実態を発表してきた。また、*in vitro* で単一菌バイオフィルム形成モデルを開発し、分子生物学的、遺伝子工学的あるいは細菌学的手法によるバイオフィルム評価法を確立し、バイオフィルムの形成メカニズムや制御・抑制法に示唆を与えた。しかし、口腔には 700 種以上の細菌種が棲息する上、摂食などにより激変する環境や宿主免疫応答などの宿主因子が関与するため、臨床に直結する解析法としては、*in situ* のバイオフィルムモデルが最適と考えた。

## 2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究課題では、試作 *in situ* バイオフィルム形成モデルをさらに発展させ、ヒトのデンタルバイオフィルムを可及的に再現できるデバイスを開発し、これまでの一連のバイオフィルム研究で培った解析・評価法を用いて、*in situ* デンタルバイオフィルムの形成メカニズムを、改めて解析するとともに、開発したモデルを用いて制御・抑制法の検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験的 *in situ* デンタルバイオフィルムの微細形態学的検索

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 H24-E4)。本研究への参加に同意の得られた 10 人の被験者から試料を採取し、実験に供した。ヒト口腔でのバイオフィルム形成は、我々が新規開発した *in situ* バイオフィルム形成装置を用いて行った。

本装置は連携研究者である本学歯学部附属技工士学校 町博士講師と共同開発したもので、被験者の上顎に装着した装置の頬側にハイドロキシアパタイト(HA)ディスクを挿入し、実験的にバイオフィルムを形成できる(図 1)。



図 1 バイオフィルム形成装置の全貌  
上顎の左右臼歯部の頬側に HA ディスク  
( )を装着

バイオフィルム形成開始 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 時間後にサンプルを取り出し、細菌学的解析、走査型電子顕微鏡(SEM)および透過型電子顕微鏡(TEM)観察に供した。尚、被験者のブラッシング方法、ブラッシング時間は全実験を通して均一化した。

### (2) 実験的 *in situ* デンタルバイオフィルムの定量的 3 次元解析

上記(1)項と同一被験者に同じ方法で *in situ* デンタルバイオフィルムを作製し、バイオフィルム形成開始 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 時間後にサンプルを取り出し、生化学的に colony forming unit (CFU)を測定すると同時に LIVE/DEAD 染色後、経時的に共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察に供した。

### (3) 実験的 *in situ* デンタルバイオフィルム中の特定細菌の経時的定量解析

上記(1)(2)項と同一被験者に同じ方法で *in situ* デンタルバイオフィルムを作製し、口腔内装置中のアパタイトディスクを経時的(12, 24, 48, 60, 72, 96 時間後)に採取した後、HA ディスク上に形成されたバイオフィルムを回収し、PowerSoil® DNA Isolation Kit にて DNA を抽出し、ユニバーサルプライマーを用いるリアルタイム PCR にて全細菌量の定量を行った。さらに、Streptococcus 属および Fusobacterium 属はそれぞれの特異プライマーを用いるリアルタイム PCR にて細菌数の定量を行った。

### (4) メタゲノム解析による実験的 *in situ* デンタルバイオフィルムの包括的同定

上記(1)~(3)項と同一被験者に同一の方法で *in situ* デンタルバイオフィルムを作製し、口腔内装置中のアパタイトディスクを経時的(1, 4, 8, 12, 24, 48, 60, 72, 96 時間後)に採取し評価した。DNA の抽出は、上記(3)項と同じ方法で行い、16srRNA 遺伝子を標的とし、次世代シーケンサー Ion PGM®を用いた pyrosequencing 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。

## 4. 研究成果

### (1) 実験的 *in situ* デンタルバイオフィルムの微細形態学的検索

SEM および TEM 観察より、バイオフィルム形成 8 時間後に、球菌が主体のバイオフィルムが観察された。バイオフィルム形成 12 時間後には糸状菌が出現、16 時間後にはマトリックス様構造物で被覆された像が認められた。24 時間および 48 時間後には、球菌、糸状菌および桿菌の多様な形態から構成されたバイオフィルムがみられた(図 2 a, b)。

定量的解析結果より、細菌数は 12 時間後まで急速に増加を示した。その後 48 時間後まで少しずつ増加を示し、60 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。これにより 96 時間後までの細菌の生菌数の増加曲線はシグモイド状を示した (図 3)。多くの観察時期において、バイオフィーム構成細菌数は被験者間で 10 倍程度の個体差を認めた。

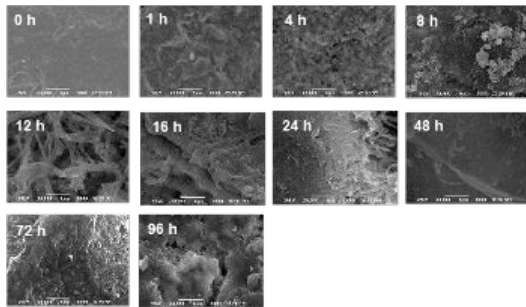
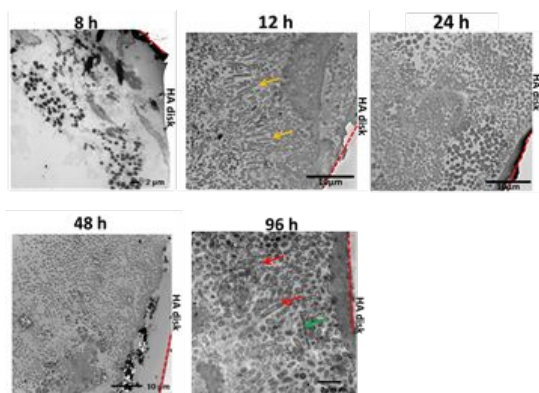


図 2 a *in situ* デンタルバイオフィームの SEM 像



● 図 2 b *in situ* デンタルバイオフィームの TEM 像 (赤の点線: HA ディスク表面、線状菌(糸状菌)あるいは紡錘菌)

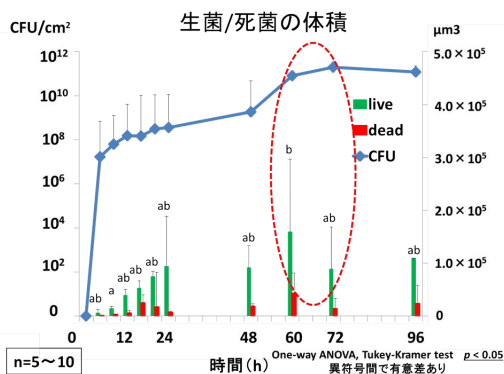


図 3 デンタルバイオフィームの細菌量と死菌/生菌の体積比

(2) 実験的 *in situ* デンタルバイオフィームの定量的 3 次元解析

デンタルバイオフィームを CLSM にて経時的に観察したところ、時間の経過とともにコロニー数が増加し、さまざまな細菌構造を含む生菌と死菌の混在したコロニーが観察できた。その厚みとしては: 4 時間後 21.4 (±15.9) μm, 8 時間後 19.6 (±5.2) μm, 12 時間後

29.98 (±13.9) μm, 20 時間後 29.1 (±7.6) μm, 24 時間後 39.5 (±9.1) μm, 48 時間後 39.5 (±9.7) μm, 60 時間後 50.3 (±11.4) μm, 72 時間後 49.8 (±12.2) μm, 96 時間後 46.2 (±3.0) μm となった (図 4)。デンタルバイオフィームは 24 時間後まで急速に増加し、その後 24-36 時間は緩やかな増加を示したが、その後 24 時間で再び急速に増加した。また、60 時間後で厚みは急速に増加し、プラトーに達した。これは細菌数のシグモイド状増加に一致する。これにより、バイオフィームの厚みの増加はおおよそ生菌数の増加と一致することが示された。一方で、生菌数の増加が認められるが、厚みは増加を示さない部分が存在し、この期間ではバイオフィームの形成範囲を広げているのではないかと推察される。また、60 時間後以降、CLSM 像にてディスク全体にバイオフィームが形成されていたのが確認できたにもかかわらず、厚みが増加しなかったのは、その間にバイオフィームが剥がれやすい性状を示すのではないかと考えられる。

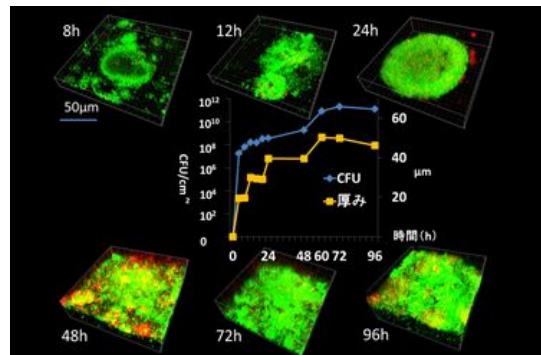


図 4 *in situ* デンタルバイオフィーム CLSM 像

48 時間後に死菌の割合が増加するが、その後は生菌も再び増加傾向を示す。

(3) 実験的 *in situ* デンタルバイオフィーム中の特定細菌の経時的定量解析

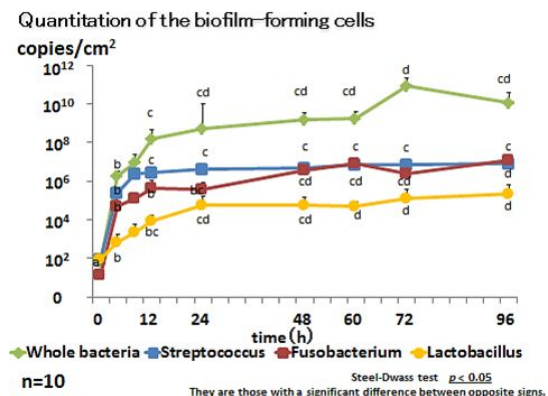


図 5 特定細菌の定時的定量解析

Streptococcus と Fusobacterium 属は 12 時間後まで急速に増加した。その後 96 時間後まで緩やかに経時的に増加傾向を示した。一方、Lactobacillus 属は 24 時間後まで比較的急な

増加を示すものの、その後は96時間後までほとんど増加は示さず、一定であった(図5)。総菌数は、図3と同じ傾向を示して増加した。

#### (4)メタゲノム解析による実験的 *in situ* バイオフィルムの包括的同定

被験者10人のデータには個人差が認められたが、共通の傾向も認められた。それは、まずRhylum レベルでは12 - 24時間後までにFirmicutes門が増加し、その後48時間後にFusobacterium 門およびBacteroides門が増加した。さらに、GenusレベルではFirmicutesはほぼStreptococcus属、FusobacteriaはほぼFusobacterium属で占められ、BacteroidetesはCapnocytophaga属、Prevotella属、Porphyromonas属が多くの割合を占めた(図6)。経時的な傾向としては、およそ12時間後にStreptococcus属が有意に増加し、さらに48時間後にStreptococcus属が急速な増加を示した後、バイオフィルム内が嫌気的環境になることで、偏性嫌気性細菌であるFusobacterium属やPorphyromonas属が急速な増加を示したのではないかと推察される。

本研究より、ヒトの口腔内で形成した実験的デンタルバイオフィルムは、通性嫌気性細菌(Streptococcus属)から偏性嫌気性細菌(FusobacteriumやPorphyromonas属)へと細菌叢がシフトすることにより、全細菌量が2相性(シグモイド状)に増加することが明らかとなった。

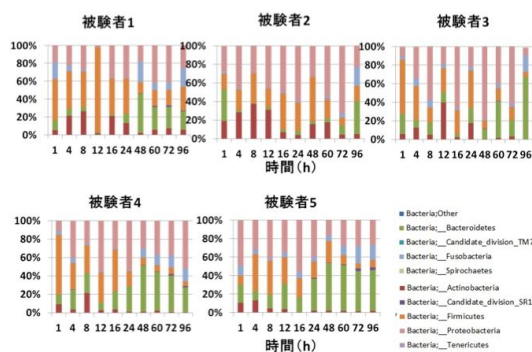


図6 メタゲノム解析による包括的同定  
一方、研究計画当初に予定していた、*in situ* デンタルバイオフィルムモデルを用いたバイオフィルムの制御法については、研究期間内に実施することができず、課題として残った。実験内容をよく理解し、協力的なボランティアを集めることに時間を費やした。今後は研究資金の目途がつけば、是非遂行し成果を発表できればと考えている。

#### 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15件)\*

Asahi Y, Miura J, Tsuda T, Kawabata S,

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

10. 1186/s13568-015-0097-4

Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S, Hayashi M. (2015): Inhibition of polysaccharide synthesis by the sinR orthologue PGN0088 is indirectly associated with the penetration of *Porphyromonas gingivalis* biofilms by macroride antibiotics. *Microbiology* 161:422-429 (査読有).

10. 1099/mic.0.000013

Kuremoto K, Noiri Y, Ishimoto T, Yoneda N, Yamamoto R, Maezono H, Nakano Y, Hayashi M, Ebisu S. (2014): Promotion of endodontic lesions in rats by a novel extraradicular biofilm model using obturation materials. *Applied Environmental microbiology* 80: 3804-3810 (査読有).

10. 1128/AEM00421-14

Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, Azakami H, Hayashi M, Ebisu S. (2014): Effects of the tea catechin Epigallocatechin Gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol*113: 1164-1171(査読有).

10.1111/jam.12458

Karim MM, Nagao A, Mansur FJ, Matsunaga T, Akakabe Y, Noiri Y, Ebisu S, Kato A, Azakami H. (2013): The periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens* produces an autoinducer-2-inactivating enzyme. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77: 1080-1085(査読有).

10.1271/bbb.130047

Karim MM, Nagao Y, Mansur FJ, Matsunaga T, Akakabe Y, Noiri Y, Ebisu S, Kato A, Azakami H. (2013): LuxS affects biofilm maturation and detachment of the periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. *J Biosci Bioengi* 116: 313-318(査読有).

10.1016/j.jbiosc.2013.03.013

Yamaguchi M, Noiri Y, Yamamoto R, Asahi Y, Maezono H, Kuramoto K, Hayashi M, Ebisu S. (2013): *Porphyromonas gingivalis* biofilms persist after chlorhexidine treatment. *Euro J Oral Sci* 121: 162-168(査読有).

10.1111/eos.12050

Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Kuboniwa M, Hayashi M, Ebisu S. (2013): The sinR ortholog PGN\_0088 encodes a transcriptional regulator that inhibits polysaccharide synthesis in *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 biofilms. *PLOS one* 8: 422-429 (査読有).

10.1371/journal.pone.0056017

Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Suga H, Azakami H, Ebisu S. (2012): Synergistic effects of

antibiotics and an *N*-acyl homoserine lactone analogue on *Porphyromonas gingivalis* biofilm. *J Appl Microbiol*112: 404-411(査読有). 10.1111/j.1365-2672.2011.05194x  
**恵比須繁之**,野杵由一郎(2013): デンタルバイオフィルムを探求する. *Bacterial Adherence & Biofilm* 27: 19-23(査読有).  
高橋雄介,吉岡靖介,朝日陽子,永山智崇,野杵由一郎,林美加子(2013): う蝕象牙質除去後の残存細菌に Er:YAG レーザーが与える影響. *日歯保存誌* 56: 1-8(査読有).

[学会発表](計 21 件)

松井沙織,野杵由一郎,呉本勝隆,米田直道,**恵比須繁之**,林美加子: 実験病理学的根尖孔外バイオフィルムモデルの開発. 第 12 回日本顕微鏡歯科学会学術大会, 2015, 4, 18, 東京.  
Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Machi H, **Ebisu S**, Hayashi M.: Time-dependent analysis of dental biofilms by novel *in situ* model. The 93th International Association for Dental Research, 2015,3,14, Boston, USA.  
Noiri Y, Asahi Y, Takahashi Y, **Ebisu S**, Hayashi M.: A study on the control of residual dental biofilm by the dental laser. Division of Photon Science and Technology the institute for Academic Initiatives Osaka University-100 Opto Researches of Osaka University, 2015,1,14, Osaka, Japan.  
Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Machi H, **Ebisu S**, Hayashi M.: Quantitative analysis of human dental biofilms by new *in situ* model. The 62nd Japanese Association for Dental Research, 2014,12,4 大阪.  
呉本勝隆,野杵由一郎,米田直道,松井沙織,石本卓也,中野貴由,林美加子,**恵比須繁之**: ラット根尖孔外バイオフィルムモデルの改良. 第 140 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2014,10,31, 山形.  
米田直道,野杵由一郎,呉本勝隆,松井沙織,石本卓也,中野貴由,林美加子,**恵比須繁之**: ラット感染根管治療モデルの開発. 第 140 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2014,10,31, 山形.  
Manusr F, Karim M, Noiri Y, Azakami H: Purification and characterization of autoinducer-2 inactivating enzyme in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. *IUMS* 2014,7,30, Montreal, Canada.  
野杵由一郎: 『新時代の歯内療法: エビデンスとアートの融和』難治症例の実態と対応: バイオフィルム感染症にフォーカスして. 第 35 回日本歯内療法学会学術大会, 2014,7,12, 新潟.  
朝日陽子,栗木菜々子,三浦治郎,町博之,野杵由一郎,林美加子,**恵比須繁之**: デンタルバイオフィルム形成に関する *in situ* 解析~微細形態学的観察~. 第 139 回

日本歯科保存学会秋季学術大会, 2013,10,18, 秋田.  
**恵比須繁之**,野杵由一郎: - バイオフィルム 私たちをとりまく環境と健康との関わり デンタルバイオフィルムを探求する. 第 27 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会, 2013,7,12, 東京.  
Yamaguchi M, Noiri Y, Ito Y, Komichi S, Hayashi M: Investigation on factors causing refractory periapical periodontitis in general practices. 9th International Federation of Endodontic Association, 2013,5,26, Tokyo.  
Furuya Y, Takeda Y, Noiri Y, Hayashi M: Effectiveness of CT and MTA for endodontic surgery: A case report. 9th International Federation of Endodontic Association, 2013,5,25, Tokyo.  
Kuremoto K, Noiri Y, Ishimoto T, Yoneda N, Maezono H, Nakano T, Hayashi M, **Ebisu S**: Time course micro-CT analysis of periapical lesions using extraradicular biofilm model in rat. 9th International Federation of Endodontic Association, 2013,5,25, Tokyo.  
Asahi Y, Noiri Y, Maezono H, Yamaguchi M, Sakiyama R, Hayashi M, **Ebisu S**: Effects of sub-MIC green tea catechin on *Porphyromonas gingivalis* Biofilm. The 91th International Association for Dental Research, 2013,3,22, Siattle, USA.  
Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Kuremoto K, Hayashi M, **Ebisu S**: Altered protein expressions by subminimum inhibitory concentrations of azithromycin on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. 6th American Society of Microbiology Conference on Biofilms, 2012,10,3, Miami, USA.  
Yamaguchi M, Noiri Y, Asahi Y, Maezono H, Yamamoto R, Kuremoto K, Hayashi M, **Ebisu S**: Dispersal of *Porphyromonas gingivalis* biofilm induced by environmental factors and proteases. 6th American Society of Microbiology Conference on Biofilms, 2012,10,3, Miami, USA.  
Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Yamamoto R, Kuremoto K, Hayashi M, **Ebisu S**: Role of PGN\_0088 of *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation and antibiofilm effect of macrolide antibiotics. 6th American Society of Microbiology Conference on Biofilms, 2012,10,3, Miami, USA.  
呉本勝隆,野杵由一郎,石本卓也,永山智崇,騎馬和歌子,前園葉月,山本れいこ,米田直道,中野貴由,林美加子,**恵比須繁之**: 根尖孔外バイオフィルムモデルにおけるラット根尖病巣のマイクロCT解析. 第 136 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2012,11,23.  
薮根敏晃,野杵由一郎,山本れいこ,山口

幹代,朝日陽子,前園葉月,永山智崇,呉本勝隆,騎馬和歌子,林美加子,恵比須繁之:難治性根尖性歯周炎に関わるバイオフィルム構成細菌種と臨床症状との関係.第136回日本歯科保存学会春季学術大会,平成24年6月29日,沖縄.

- ⑩ 吉岡靖介,野杵由一郎,高橋雄介,藪根敏晃,朝日陽子,永山智崇,古谷 優,栗本絵里子,北川蘭奈,武田侑子,大嶋 淳,山本由美子,住岡龍一,永井真澄,坂東秀典,林 美加子:軟化象牙質除去後の残存細菌に対してEr:YAGレーザーが与える影響.第136回日本歯科保存学会春季学術大会,平成24年6月29日,沖縄.

〔図書〕(計1件)

興地隆史,野杵由一郎,村松 敬(2015):第5章根尖性歯周組織疾患;エンドドンテックス(興地隆史,須田英明,中村洋編集主幹,阿南壽,五十嵐 勝,石井信之,勝海一郎,林 美加子,松島 潔),第4版永末書店,東京,48-61.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
記載事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

・恵比須 繁之(EBISU SHIGEYUKI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・理事・副学長  
研究者番号:50116000

(2) 研究分担者

・野杵 由一郎(NOIRI YUICHIRO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号:50218286

- ・木ノ本喜史(KINOMOTO YOSHIFUMI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員  
研究者番号:10252694
- ・山口幹代(YAMAGUCHI MIKIYO)  
大阪大学・歯学部付属病院・医員  
研究者番号:30523089
- ・朝日陽子(ASAHI YOUKO)  
大阪大学・歯学部付属病院・助教  
研究者番号:50456943
- ・高橋 雄介(TAKAHASHI YUSUKE)  
大阪大学・大学院歯学系研究科・助教  
研究者番号:60397693