

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04384

研究課題名(和文) ヒトのデンタルバイオフィルムの網羅的解析と新規コントロール法の開発

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of human dental biofilms and development of new control methods

研究代表者

恵比須 繁之 (Ebisu, Shigeyuki)

大阪大学・歯学研究科・招へい教授

研究者番号：50116000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：in situモデルを用いてデンタルバイオフィルムの多面的解析を行った結果、睡眠によりバイオフィルム構成細菌数は変化しないが、睡眠中に偏性嫌気性細菌の相対的割合が高くなることや菌体外多糖の産生が低下することを明らかにした。さらに、睡眠によりバイオフィルム構成細菌の病原遺伝子の発現量が変化することが示唆された。また、睡眠後に口腔内の各部位におけるバイオフィルムの構成細菌の割合が変化することと、その変化は部位により異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デンタルバイオフィルムの病原性を最も効果的にコントロールするための介入時期については未解明な点が多く、これを明らかにするためにはデンタルバイオフィルムの日内変動を理解することが必要不可欠である。本研究により睡眠時におけるデンタルバイオフィルムの変化が明らかとなり、得られた研究成果はより効果的なデンタルバイオフィルムのコントロール法の確立に有意義な示唆を与えるものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using in situ biofilm model, it is revealed that the numbers of biofilm-forming bacteria were not affected by sleep and the abundances of obligates anaerobes increased after sleep. Furthermore, it was shown that the expression level of pathogenic genes in biofilm bacteria changed during sleep. In addition, the microbiota in different locations in the oral cavity is affected by sleep and changes depend on the genera of bacteria and on characteristics of the surface on which oral biofilms form.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：デンタルバイオフィルム in situ シーケンス解析 オーラルバイオフィルム 細菌 共焦点レーザー顕微鏡

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

デンタルバイオフィームは口腔の主な疾患であるう蝕や歯周病の主要な病原因子と考えられている。また、口腔疾患と全身疾患との関係も注目されており、デンタルバイオフィームを制御することは口腔および全身の健康を維持するために重要である。現時点では、セルフケアを含めたデンタルバイオフィームの物理的除去が最も効果が高いが、科学的根拠に基づいたバイオフィームのコントロール法の確立は口腔保健における最重要課題の一つである。

一方、ヒトのデンタルバイオフィームは、*in vitro*で形成されるバイオフィームとは異なり、700種以上の細菌が存在し、口腔環境や宿主因子の影響を受けている。我々は、ヒト口腔内で経時的かつ定量的にデンタルバイオフィームを形成・評価できる *in situ* バイオフィームモデルを開発し、ヒトの口腔内でのバイオフィーム形成メカニズムの一端を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究は、我々が開発した *in situ* バイオフィームモデルにおいてデンタルバイオフィームの日内変動を多面的に解析し、より効果的なデンタルバイオフィームのコントロール法を提示することを目指したものである。

3. 研究の方法

(1) *in situ* バイオフィームモデルにおけるデンタルバイオフィームの日内変動の多面的解析 *in situ* バイオフィームの作製

インフォームドコンセントを行い、同意が得られた10人を被験者とした。我々が開発した口腔内装置 (npj Biofilms and Microbiomes, 2016, 2, 16018) を用いてデンタルバイオフィームを作製した。睡眠がデンタルバイオフィームに及ぼす影響を検討するために、バイオフィーム形成を睡眠直前から開始する睡眠群と起床直後から開始する覚醒群の2つのスケジュールにて実験を行った。バイオフィーム形成8, 16, 24時間後に、装置よりバイオフィームサンプルを採取し、以下の解析に用いた。なお、睡眠時間は全ての被験者において24:00から8:00に統一した。

細菌数測定

生菌数測定：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播種した。Colony forming unit をカウントし、生菌数を算出した。

総菌数測定：DNA抽出後、ユニバーサルプライマーを用いて real-time PCR を行い、総菌数を測定した。

3次元定量解析

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、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した後、画像解析ソフト Imaris[®]にて3次元定量解析を行った。

シーケンス解析

採取したサンプルより PowerSoil[®] DNA Isolation Kit を用いて細菌由来DNAの抽出を行い、16S rRNA の V1-V2 領域をターゲットとし、シーケンス解析を行った。得られた塩基配列を QIIME にて解析した。

病原遺伝子の発現量の評価

バイオフィーム形成24時間後のサンプルよりRNAを抽出し、*gtfB* (*Streptococcus mutans*), *inpA* (*Prevotella intermedia*), *fadA* (*Fusobacterium nucleatum*), *kgp* (*Porphyromonas gingivalis*) を標的としリアルタイムPCRを行った。

(2) 口腔内の各部位におけるバイオフィーム細菌叢の睡眠による変化

歯肉縁上および歯肉縁下の歯面、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ームおよび唾液を採取した。サンプルの採取は、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。採取したサンプルからDNAを抽出し、16S rRNA の V1-V2 領域を増幅し、MiSeq[®]にてシーケンス解析を行った。

4. 研究成果

(1) *in situ* モデルにおけるデンタルバイオフィームの日内変動の多面的解析

細菌数測定

デンタルバイオフィーム構成細菌の生菌数は、いずれの評価時間においても、覚醒群と睡眠群の間に有意差を認めなかった(図1)。睡眠時に唾液中の細菌数が増加するという報告により、睡眠時に形成されるバイオフィームの細菌数も増加すると推測されてきたが、単位面積当たりの生菌数は睡眠により変化しないことを明らかにした。また、バイオフィーム構成細菌の総菌数も、生菌数と同様にいずれの評価時間においても2群間に有意差を認めなかった(図2)。

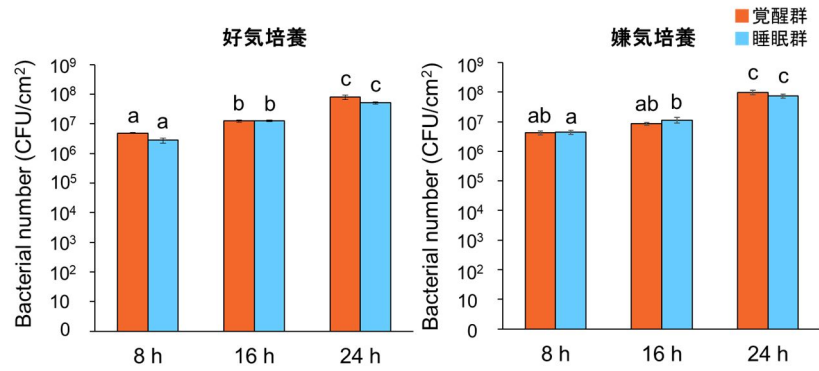


図1 生菌数測定結果 (異なる文字間で有意差を認める)

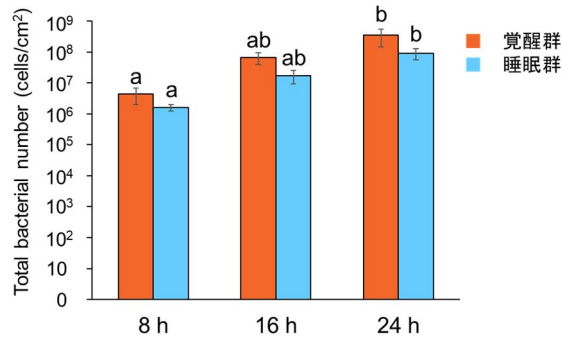


図2 総菌数測定結果 (異なる文字間で有意差を認める)

3 次元的定量解析

バイオフィーム形成 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 (図 3)。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ームの構造に影響したことが示唆された。

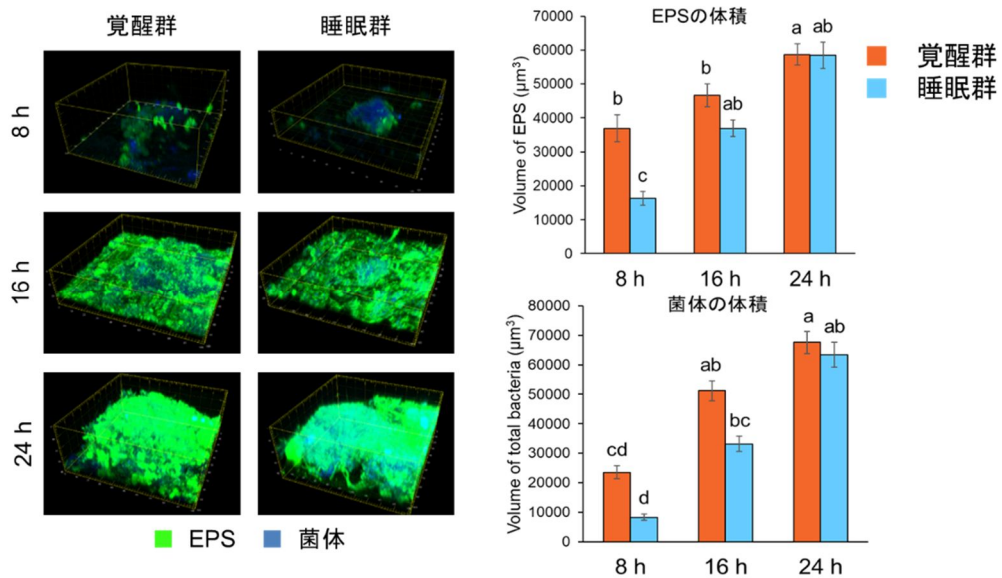


図3 3 次元的解析結果

シーケンス解析による細菌叢の変化

バイオフィーム形成 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 (図 4)。睡眠により、唾液の性質や分泌量、酸素分圧などの口腔内環境が変化することで、*Fusobacterium* 属や *Prevotella* 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。

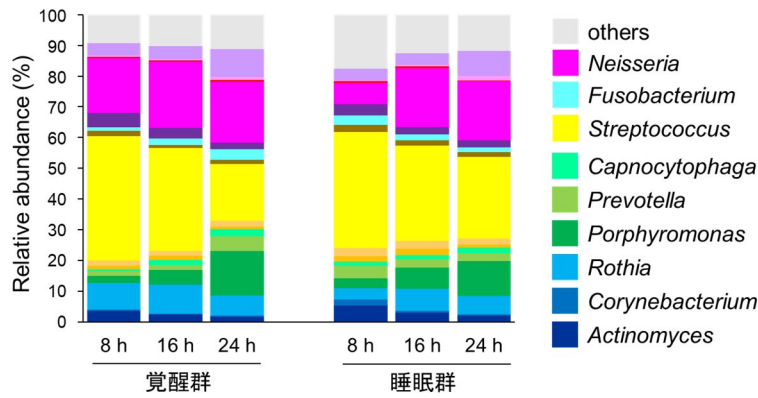


図4 属レベルにおけるシーケンス解析結果

病原遺伝子の発現

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 (図5)。

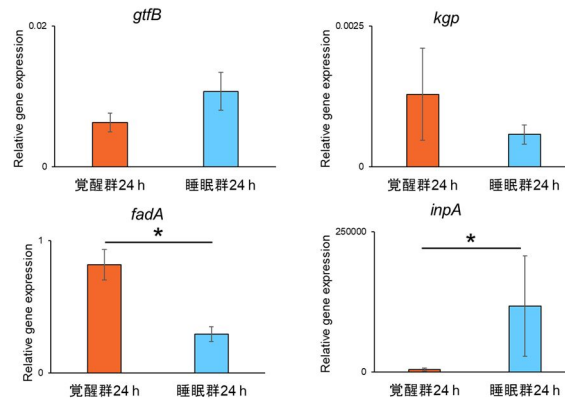


図5 各細菌種における病原遺伝子の発現量

(2) 口腔内の各部位におけるバイオフィーム細菌叢の睡眠による変化

起床直後と就寝前におけるバイオフィーム間での細菌叢に類似性は認めなかった(図6)。一方、各細菌種の属レベルでの相対的割合を各部位ごとに比較したところ、被験者10人の細菌叢には個人差が認められたが、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、舌表面のバイオフィームおよび唾液で、*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かった。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ームでは就寝前より起床直後に有意に高かったが、唾液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。

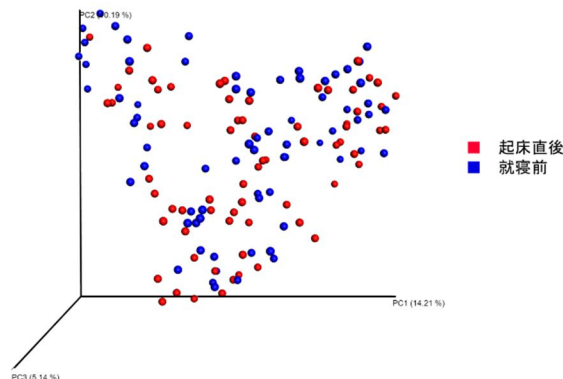


図6 主成分分析の結果

本研究より、部位によって様々であるが、睡眠後に口腔内の各部位における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、睡眠によりデンタルバイオフィルム構成細菌数は変化しないが、起床直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や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、睡眠によりバイオフィルム構成細菌の病原遺伝子の発現量が変化することが示唆された。

本研究を礎として、口腔疾患を有する患者を対象とした研究を展開することで、疾患や個人の口腔内の状態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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamaguchi M1, Noiri Y, Itoh Y, Komichi S, Yagi K, Uemura R, Naruse H, Matsui S, Kuriki N, Hayashi M, Ebisu S.	4. 巻 18(1)
2. 論文標題 Factors that cause endodontic failures in general practices in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-018-0530-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsui S, Yoneda N, Maezono H, Kuremoto K, Ishimoto T, Nakano T, Yumoto H, Ebisu S, Noiri Y, Hayashi M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Assessment of the functional efficacy of root canal treatment with high-frequency waves in rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0239660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0239660. eCollection 2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sotozono M, Kuriki N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Machi H, Iida T, Ebisu S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Impacts of sleep on the characteristics of dental biofilm.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80541-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kuriki N, Asahi Y, Sotozono M, Machi H, Noiri Y, Hayashi M, Ebisu S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Next-Generation Sequencing for Determining the Effect of Arginine on Human Dental Biofilms Using an In Situ Model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacy (Basel)	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmacy9010018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 外園真規, 栗木菜々子, 朝日陽子, 町 博之, 林 美加子, 恵比須繁之
2. 発表標題 日中および睡眠時に形成されるデンタルバイオフィルムの比較検討
3. 学会等名 第147回日本歯科保存学会2017年度秋季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 外園真規, 栗木菜々子, 朝日陽子, 町博之, 林美加子, 野杵由一郎, 恵比須繁之
2. 発表標題 覚醒時および睡眠時に形成されるデンタルバイオフィルムの三次元的構造解析
3. 学会等名 第61回春季歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 外園真規, 栗木菜々子, 朝日陽子, 町博之, 林美加子, 野杵由一郎, 恵比須繁之
2. 発表標題 睡眠がデンタルバイオフィルムに与える影響
3. 学会等名 第32回日本バイオフィルム学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井沙織, 前園葉月, 呉本勝隆, 米田直道, 恵比須繁之, 湯本浩通, 的場一成, 石本卓也, 中野貴由, 野杵由一郎, 林美加子
2. 発表標題 ラット根管治療モデルを用いた高周波根尖療法の評価
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsui S, Maezono H, Kuremoto K, Yoneda N, Ebisu S, Yumoto H, Ishimoto T, Nakano T, Noiri Y, Hayashi M
2. 発表標題 High-frequency waves promote periapical healing by inducing cell growth factors.
3. 学会等名 96th International Association for Dental Research General Session (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nanako kuriki, Maki Sotozono, Yoko Asahi, Hiroyuki Machi, Yuichiro Noiri, Mikako Hayashi, and Shigeyuki Ebisu
2. 発表標題 Effects of arginine on in situ dental biofilm by NGS
3. 学会等名 97th International Association for Dental Research General Session (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maki Sotozono, Nanako kuriki, Yoko Asahi, Hiroyuki Machi, Yuichiro Noiri, Mikako Hayashi, and Shigeyuki Ebisu
2. 発表標題 Impact of Sleeping on Characteristics of in situ Dental Biofilm
3. 学会等名 97th International Association for Dental Research General Session (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Klanliang K, Maezono H, Sotozono M, Ebisu S, Hayashi M
2. 発表標題 Characteristics of Oral Biofilms Grown in Different Experimental Models.
3. 学会等名 97th International Association for Dental Research General Session (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前園 葉月, クランリアン キッティピット, 外園 真規, 朝日 陽子, 山口 幹代, 栗木 菜々子, 野杵 由一郎, 林 美加子
2. 発表標題 口腔サンプルを用いて作製したバイオフィルムの実験モデル間の差に関する検討
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝日陽子, クランリアン キッティピット, 外園真規, 前園葉月, 栗木菜々子, 野杵由一郎, 恵比須繁之, 林 美加子
2. 発表標題 初期根面う蝕に関連する口腔バイオフィルム細菌叢の検索
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会2019年度秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 外園 真規, 栗木 菜々子, 朝日 陽子, 町 博之, 林 美加子, 野杵 由一郎, 恵比須 繁之
2. 発表標題 睡眠による口腔内細菌叢の変化
3. 学会等名 第33回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Klanliang K, Asahi Y, Maezono H, Sotozono M, Kuriki N, Machi H, Ebisu S, Hayashi M
2. 発表標題 Effects of silver diamine fluoride on in situ oral biofilm
3. 学会等名 98th International Association for Dental Research General Session (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sotozono M, Asahi Y, Kuriki N, Machi H, Noiri Y, Hayashi M, Ebisu S
2. 発表標題 Impacts of Sleep on the Microbiome of Oral Biofilms
3. 学会等名 98th International Association for Dental Research General Session (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsui S, Maezono H, Yoneda N, Yumoto H, Ebisu S, Noiri Y, Hayashi M
2. 発表標題 Evaluation of anti-biofilm effects of high-frequency waves in vitro
3. 学会等名 98th International Association for Dental Research General Session (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野村 由一郎 (Noiri Yuichiro) (50218286)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	朝日 陽子 (Asahi Yoko) (50456943)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	栗木 菜々子(和氣菜々子) (Kuriki Nanako) (60781432)	大阪大学・歯学部附属病院・医員 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------