

令和 4 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23104

研究課題名（和文）in situデンタルバイオフィームモデルを用いた効果的な口腔ケア方法の確立

研究課題名（英文）The establishment of effective oral care using in situ dental biofilm model

研究代表者

外園 真規（Sotozono, Maki）

新潟大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00876675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：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、口腔内で実験的にデンタルバイオフィームを作製することができる in situデンタルバイオフィームモデルを用いて、睡眠がデンタルバイオフィー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ー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。デンタルバイオフィー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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

う蝕や歯周病の原因となるデンタルバイオフィーム（プラーク）を構成する細菌は就寝中に急激に増加すると予想されてきた。しかし、本研究で就寝中のデンタルバイオフィーム構成細菌数の増加率は起床時と差は認められなかった。一方で、デンタルバイオフィームを構成している細菌の種類の変化していることが明らかとなった。この結果は、口腔ケアに対して新たな知見を与える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, the effects of sleep on characteristics of dental biofilm were investigated using in situ dental biofilm model, which enabled us to form experimental dental biofilm in oral cavity, in order to explore effective method of oral care. The viable bacterial cell count, real-time PCR, 16S rRNA sequences analysis and confocal laser scanning microscopy observation were performed. This study revealed that dental biofilms containing obligate anaerobes were formed and the structures of dental biofilms changed during sleep, whereas the numbers of biofilm-forming bacteria did not change during sleep. The findings of this study will aid in establishment of evidence-based methods for improved oral care.

研究分野：細菌学

キーワード：デンタルバイオフィーム 睡眠 細菌叢

1. 研究開始当初の背景

(1) 効果的な口腔ケアとその根拠

ヒト口腔内の微生物が歯面に形成するデンタルバイオフィルムを含む口腔バイオフィルムのコントロールの重要性が広く認識されている。睡眠時には唾液分泌量が低下し、唾液中の細菌数が急激に増加し起床時に最も多くなるという1982年のNolteの研究に基づき、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一般的に浸透している。しかしながら、その報告は唾液中の細菌数を評価したものであり、疾患の原因とされているデンタルバイオフィルムを評価したのではない。

(2) デンタルバイオフィルム研究のための *in vitro* モデルと本研究に使用した *in situ* モデル

デンタルバイオフィル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、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 [1]、*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。

申請者が所属する研究グループで過去に開発した *in situ* デンタルバイオフィルムモデルを用いることとした。このモデルはマウスピース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が挿入された口腔内装置である。この口腔内装置は、被験者の歯列に装着し口腔内でハイドロキシアパタイトディスク上に実験的にデンタルバイオフィルムを作製し、ディスクごとバイオフィルム試料を採取するというものである（図1）。

そこで、本研究では、上記の *in situ* モデルを用いて睡眠時および覚醒時に形成されるデンタルバイオフィルムを作製し、包括的解析を行うこととした。



図1 *in situ* バイオフィルムモデル

2. 研究の目的

「デンタルバイオフィルムは、睡眠により、量的および質的にどのように変化するか？」を学術的「問い」として、先端的手法にて研究を展開することとした。睡眠とデンタルバイオフィルムの形成に関する口腔内実験を行うこととした。睡眠時と覚醒時におけるデンタルバイオフィルムの形成を「量」と「質」の両面から測定し、デンタルバイオフィルムの実態を理解し、科学的に効果的な口腔ケアの確立することを最終目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 被験者の選択

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）。また、被験者全員に本研究の目的および方法を文書により説明し、同意書を得て研究を行った。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 [2]。

(2) 実験スケジュール

バイオフィルム形成開始時刻の異なる2つのスケジュール（図2）を適用する。すなわち、バイオフィルム形成を、覚醒時から開始する覚醒群では8:00に、就寝直前から開始する睡眠群では就寝直前の24:00に口腔内装置の装着を開始し、各群において形成開始から8、16、24時間後に経時的に試料を採取し、実験に供した。この設定は、経時的な変化による影響を排除し、睡眠の影響を検討できるようスケジュールを立案したものである。なお、本申請研究においては、生物試料の採取条件の可及的な正確さが非常に重要な要件と考えられるため、申請者は実験中、被験者と同じ施設に宿泊し、試料を正確に採取し、直ちに操作できるようにした。

(3) 評価方法

先述のスケジュールに従い形成させた試料を用い、睡眠がデンタルバイオフィルムにおよ

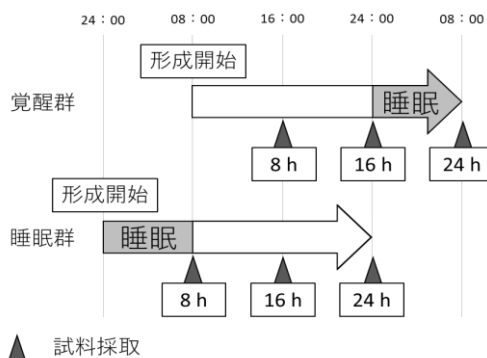


図2 実験スケジュール

ばす影響を次の4つの実験により探索した。

① 生菌数測定

採取した試料を超音波により剥離，懸濁し寒天培地に播種して好気条件下および嫌気条件下で培養し，コロニー数を測定することによりバイオフィーム形成細菌数を評価した。

② リアルタイムPCRによる総菌数測定

試料よりDNAを抽出し，16S rRNAのV1-V2領域を標的としたプライマーを用いてリアルタイムPCRによる総菌数の測定を行った。

③ 共焦点レーザー顕微鏡観察による三次元的構造解析

採取した試料の菌体外多糖をFITC，菌体をDAPIで蛍光標識し，共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM, LSM700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて観察し，三次元的構造の解析を行った

④ 16S rRNA シーケンス解析による細菌叢の評価

試料より細菌のゲノムDNAを抽出し，16S rRNAの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。

4. 研究成果

(1) 結果

① 生菌数測定

実験的デンタルバイオフィーム構成細菌の生菌数は，経時的に増加したが，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 (図3A: 好气的条件, 図3B: 嫌气的条件, 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ー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，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 (図3C, Friedman test, $P>0.05$)。

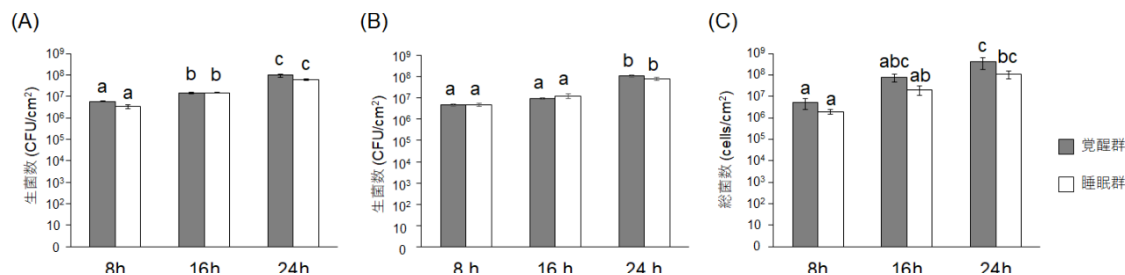


図3 生菌数測定およびリアルタイムPCRによる総菌数測定

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4A) に示す。得られた三次元画像データを画像解析ソフト Imaris を用いて，菌体外多糖および菌体の体積を測定した。菌体外多糖の体積は，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 (図4B-a, 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4B-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4B-b, Friedman test, $P>0.05$)。

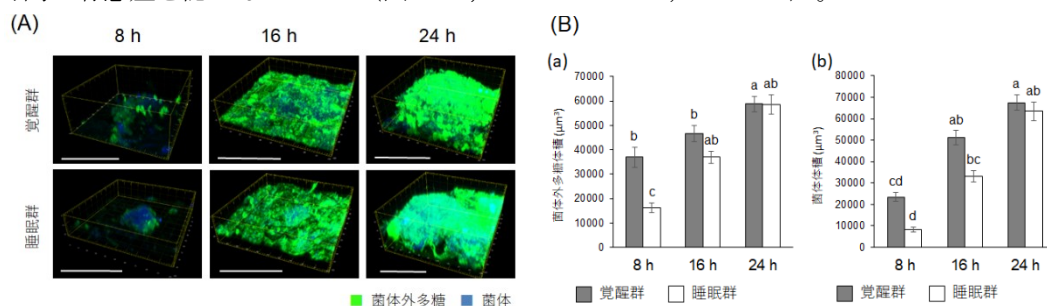


図4 共焦点レーザー顕微鏡観察像と菌体外多糖および菌体体積

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。

属レベルでの結果を(図5)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。*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6)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(図6A, 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(図6A, 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(図6B, Wilcoxon rank sum test, *Corynebacterium*属: $P=0.012$, *Granulicatella*属: $P=0.012$)。バイオフィーム形成開始から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(図6C, 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(図6C, Wilcoxon rank sum test, $P=0.022$)。

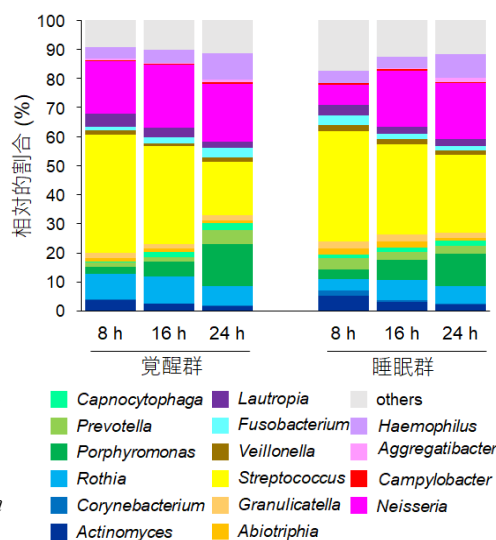


図5 属レベルでの相対的割合

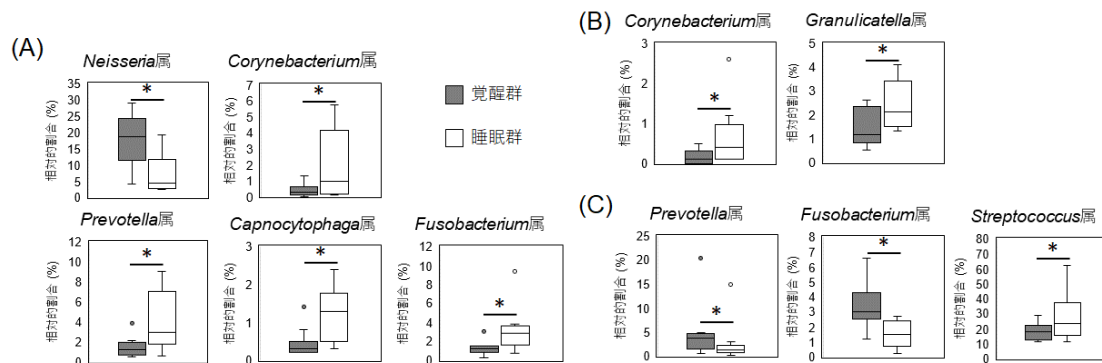


図6 各評価時間ごとの属レベルでの相対的割合

(2) 考察および結論

① デンタルバイオフィーム構成細菌数

*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。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[3]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[4]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6)、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。

② デンタルバイオフィームの三次元的構造解析

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4B-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4B-a)。Marshらの報告[5]によると、睡眠中のデンタルバイオフィー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[6, 7]。このことから、就寝時はバイオフィームにとっての飢餓状態であり[8]、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菌面にペリクルを形成し、細菌の菌面への付着を促すものが存在する[9]。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、バイオフィーム構造に影響を及ぼした可能性も示唆された。

③ デンタルバイオフィームの細菌叢解析

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ームにおける *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 6A および図 6C)。過去に我々は、実験的デンタルバイオフィームにおいて、*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[3]。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ー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[10]。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。

④効果的な口腔ケアの時期

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[11]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[12, 13]、また、糖摂取後にエナメル質表面の pH が低下する[14]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。

<参考文献>

- [1] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001; 358: 135-8.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Nolte WA. *Oral microbiology with basic microbiology and immunology*. 4th ed. 1982; 198-201.
- [5] Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontol 2000*. 2016; 70: 80-92.
- [6] Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol*. 1972; 220: 529-45.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle - a review. *Adv Dent Res*. 2000; 14: 22-8.
- [10] Lynge Pedersen, AM Belström. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent*. 2019; 80 Suppl 1:S3-S12.
- [11] Lang NP, Cumming BR, Loe H. Toothbrushing frequency as it relates to plaque development and gingival health. *J Periodontol*. 1973; 44: 396-405.
- [12] Williams JL. A contribution to the study of pathology of enamel. *Dental Cosmos*. 1897; 39: 269-301.
- [13] Black GV. *Operative Dentistry*. 6th ed vol. 1. 1936; 129.
- [14] 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.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sotozono Maki, Kuriki Nanako, Asahi Yoko, Noiri Yuichiro, Hayashi Mikako, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Machi Hiroyuki, Iida Tetsuya, Ebisu Shigeyuki	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 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
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 Sotozono Maki, Kuriki Nanako, Asahi Yoko, Noiri Yuichiro, Hayashi Mikako, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Yamaguchi Mikiyo, Iida Tetsuya, Ebisu Shigeyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Impact of sleep on the microbiome of oral biofilms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0259850	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sotozono Maki, Asahi Yoko, Kuriki Nanako, Noiri Yuichiro, Hayashi Mikako, Ebisu Shigeyuki
2. 発表標題 Impacts of Sleep on the Microbiome of Oral Biofilms
3. 学会等名 General session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------