

氏名 田村光平
 学位の種類 博士(歯学)
 学位授与番号 岩医大院歯博第230号
 学位授与の日付 平成19年3月13日
 学位論文題目 口腔細菌バイオフィーム初期形成に及ぼす唾液の影響
 —フローセルシステムによる in vitro 評価—

論文内容の要旨

I. 研究目的

齲蝕と歯周疾患の予防と改善には口腔バイオフィームの制御が不可欠であり、そのためには固体表面への細菌初期付着を正確に評価する事が重要になっている。この口腔細菌バイオフィーム初期形成の評価に、新たなアルゴリズムの画像処理ソフトウェアを持つフローセルシステムを構築し、その特性と性能を検証した。また、唾液がバイオフィーム初期形成に及ぼす影響を菌体とバイオフィーム付着面に対する唾液処理の有無別に検討した。

II. 研究方法

1. ヒト咀嚼刺激唾液 1 ml を BHI100ml で 37°C 18 時間静置培養した。培養液から菌体を回収し (6,000rpm, 5 分)、脱イオン水で 2 回洗浄後、唾液未処理の場合は菌体をリン酸緩衝液 (2 mM KH_2PO_4 , 50mM KCl, 0.5mM CaCl_2 , pH6.8) に分散し (3×10^8 個/ml), 水冷下で超音波処理 (10秒, 3 回, 60W) して細菌浮遊液とした。菌体を唾液処理する場合は集菌, 洗浄, 超音波処理した菌体 10ml に濾過唾液 10ml を加え, 4°C で 1 時間唾液成分を作用させた。これを集菌, 2 回洗浄後, 同様にリン酸緩衝液に浮遊させた。ガラス表面への唾液処理では洗浄したスライドガラスを 4°C で 2 時間濾過唾液に浸漬した。以上により, 菌体とガラスの唾液処理の組み合わせからなる 4 条件についてバイオフィーム初期形成を評価した。

2. 細菌浮遊液はフローセルシステムで還流させた (1.5ml/min)。スライドガラス表面の細菌付着像は CMOS カメラでコンピュータに送り, 専用ソフトウェアにより一定時間毎に 0.1 秒間隔で撮影した 3 枚の画像を順次入力した。細菌付着はフロー開始から 4 時間後まで計測した。以上の全プロセスを各 5 回繰り返した。画像は画像平均化ソフトウェアで不要な浮遊細菌の移動像を除去後, Scion Image で付着細菌を抽出し, ガラスの表面積 1 mm^2 に占める細菌付着面積で評価した。

III. 研究成績

1. 最初に付着した細菌は単菌であり, 主として球菌であった。桿菌で直接付着したのは短桿菌のみであった。細菌は浮遊液中で徐々に共凝集し, 菌塊としてガラス表面や他の菌に付着したため, ガラス表面に直接付着した細菌のみを評価する事は 60 分以後では難しくなった。一方, 菌体を唾液処理した場合は共凝集が抑制され, 単菌のままの細菌が多く見られた。また, ガラス表面と菌体の両方を唾液処理した場合は, 一度ガラスに付着した細菌がフローにより再脱離する挙動が多く観察された。

2. 付着面積を経時的にプロットすると, 唾液未処理の場合ではフロー開始から 60 分後まで面積は直線的に増加し, フロー後 60 分で面積は 0.025 mm^2 に達したが, 以後は大きな変化は見られなかった。同様に 60 分後の面積は, ガラス表面を唾液処理した場合で 0.012 mm^2 , 菌体を唾液処理した場合で 0.045 mm^2 , ガラス表面と菌体の両方を唾液処理した場合で 0.026 mm^2 であった。菌体を唾液処理した場合に初期付着が増加し, ガラス表面を唾液処理した場合で抑制された。

3. 初期付着の評価指標として, フロー開始から 30 分間の直線回帰式を求め, その傾きの値を初期付着率 J_0 (mm^2/min) として評価した。唾液未処理の場合の全 5 回繰り返しの J_0 の平均値 ($\pm \text{SD}$) は $6.00 \pm 1.47 (\times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{min})$ であり, ガラス表面を唾液処理した場合は $3.27 \pm 1.12 (\times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{min})$ と有意に低かった ($p < 0.05$, t-test)。菌体

を唾液処理した場合は 10.02 ± 1.73 ($\times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{min}$)と有意に高く ($p < 0.005$, t-test), ガラス表面と菌体の両方を唾液処理した場合は 4.42 ± 1.41 ($\times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{min}$)であった。

4. 繰り返し測定誤差は、唾液未処理で24.6%以内、ガラス表面の唾液処理で34.5%以内、菌体の唾液処理で17.4%以内、ガラスと菌体の唾液処理で31.9%以内であると確認され、ガラス表面を唾液処理した場合に誤差が大きくなった。

IV. 考察及び結論

1. フローセルシステムは唾液由来細菌バイオフィーム初期形成のリアルタイムでの定量評価に有用である事が示され、初期付着率 J_0 を用いる事で、個人間の付着状態の違いや付着に作用する因子を評価する事は可能であると考えられた。

2. ガラス表面への唾液処理はヒト唾液由来細菌の初期付着を有意に低下させる事が示唆され、これは細菌との静電的相互作用の変化や、唾液タンパク質が吸着したガラス表面の不規則な凹凸の形成などの影響が考えられた。

3. 菌体への唾液処理では初期付着を明らかに促進させる事が示唆され、これは唾液タンパクが菌体に吸着して細菌の共凝集過程に変化が生じ、単菌が増加した事によるガラス表面への付着機会増加の影響が考えられた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 米 満 正 美 (予防歯科学講座)

副査 教授 木 村 重 信 (口腔微生物学講座)

副査 教授 加 藤 裕 久 (歯科薬理学講座)

近年、医用生体材料の開発や環境工学など様々な分野でバイオフィームに関する研究が活発に行われている。歯科の二大疾患である齲蝕と歯周疾患は Dental Plaque といわれるバイオフィームが原因である。Dental Plaque の形成、成熟に関する研究は主に顕微鏡学的、形態学的な側面から行われてきた。最近では細菌の歯面への付着課程をリアルタイムで観察するフローセルシステムが開発され研究がされているが、それらは単一または二菌種の標準株を用いて行われている。一方、口腔内には400種以上もの細菌が生息し、それらが相互に作用しながらバイオフィームを形成している。

本研究は、バイオフィームの初期形成を評価する研究モデルとして、新たなアルゴリズムの画像処理ソフトを持つフローセルシステムを構築し、その特性および性能を多菌種からなるヒト唾液由来細菌群を対象として検討した。また、口腔内状況を考慮し、ヒト唾液由来細菌群によるバイオフィーム初期形成に及ぼす影響を菌体とバイオフィーム付着面(スライドガラス)のそれぞれについて唾液処理の有無別に検討した。

その結果、最初に付着した細菌は単菌であり、主として球菌であった。桿菌で直接付着したのは短桿菌のみであった。細菌は浮遊液中で徐々に共凝集し、菌塊としてガラス表面や他の菌に付着したためガラス表面に直接付着した細菌のみを評価することは60分以降では困難となった。一方、菌体を唾液処理した場合は共凝集が抑制され、単菌のままの細菌が多く見られた。また、ガラス表面と菌体の両方を唾液処理した場合は、一度ガラスに付着した細菌がフローにより再脱離するのが多く観察された。付着面積を経時的に計測した結果、唾液未処理の場合ではフロー開始から60分までは面積が直線的に増加し、それ以降は大きな変化は見られなかった。菌体を唾液処理した場合に初期付着が増加し、ガラス表面を唾液処理した場合で抑制された。フロー開始から30分間の付着面積から直線回帰式を求めその傾きの値を初期付着率として評価した結果、菌体のみを唾液処理した場合で有意に高く、ガラス表面と菌体の両方を唾液処理した場合はガラス表面のみを唾液処理した場合と同様に低かった。

以上のことから、今回構築したフローセル評価システムはバイオフィームの初期付着の評価に有用であることが示唆された。また、ガラス表面への唾液処理は初期付着を有意に低下させること、菌体への唾液処理は初期付着

を促進させることが明らかとなった。

この研究は今後のバイオフィルムの解明および歯科疾患の予防に大きく貢献するものと考えられる。

試験・試問の結果の要旨

本論文の目的、概要について説明がなされ、研究方法、結果に対する考察について試問した結果、適切な解答が得られた。また、今後の研究に意欲を示し、十分な見識を持っているので学位に値すると評価した。