

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 向井陽子(広島県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第507号
学位授与年月日 令和2年3月14日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Analysis of plaque microbiota and salivary proteins adhering to dental materials
(歯科材料に付着するプラークの細菌叢と付着唾液タンパク質の解析)
Journal of Oral Biosciences 第62巻 第2号 182頁～188頁掲載 2020年3月6日発行
論文審査委員 主査 教授 花田信弘
副査 教授 山越康雄 副査 教授 大久保力廣

内容の要旨

【緒言】

口腔内では歯だけではなく、補綴物や修復物の表面に必ずプラーク(口腔バイオフィルム)が形成される。口腔内のバイオフィルムを形成する様々な口腔常在微生物の中には、齲蝕、歯周炎、インプラント周囲炎といった口腔感染症の原因になるものが存在する。

しかしながら、口腔内で使用される金属には、様々な微生物が付着するが、他の材料との比較は行われておらず、付着菌叢は材料ごとに特異性を示すのかと、同一口腔内で歯に付着するプラークは異なるのかは、分かっていない。また、歯科材料表面に形成されるペリクルが歯のペリクルと類似しているかは不明である。

そこで本研究では、唾液タンパク質と歯科材料に付着した微生物叢の関係性を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

<使用した歯科用材料サンプル>

純チタン(P-Ti)、Co-Cr合金(Co-Cr)、金銀パラジウム合金(Ag-Pd-Au)、メーカーの指示通りに重合させた義歯床用レジン(resin)で、板状の資料を製作した。対照としてハイドロキシアパタイト(HA)を使用した。

<口腔内装置の製作、装着とDNA回収>

研究プロトコルは鶴見大学倫理審査委員会によって承認され(承認番号:1704)、全てのボランティアからインフォームドコンセントを得た。選ばれた8人のボランティアの口腔内で、各サンプルに付着した微生物叢を回収するために各ボランティアの左右臼歯部頬側歯肉部にサンプルを入れる箱型のブロックを有する可撤性口腔内装置を作製した。

ボランティアは飲食や歯を磨く時以外、24時間口腔内装置を装着し、回収した材料サンプルは装置から外して蒸留水ですぐ細菌DNAを抽出した。また、口腔内装置を回収する際に各ボランティアから安静時唾液を1ml採取し、細菌DNAを抽出した。DNAの抽出には、ISOSPIN Fecal DNAキット(ニッポンジーン社製)を用い、ビートビーディング法で行った。DNA抽出後、NanoDrop Spectrophotometer ND-1000(Thermo Fisher Scientific Inc. DE, USA)を使用して抽出されたDNAを定量し、使用するまでサンプルを-80℃で保存した。

<16S rRNA 遺伝子シーケンス解析>

16S rRNA 遺伝子のV3～V4領域は、341F-806Rプライマーを使用して唾液DNAサンプルから増幅した。DNAライブラリーの調製はKAPA HiFi HotStart(日本ジェネティクス)を使用し、アダプターをPCR産物に付加した。PCR産物の

16S rRNA 遺伝子配列決定は、製造元の指示に従って Illumina MiSeq (イルミナ社) を使用して実施した。

<情報分析>

FastQC ファイルは、イルミナのペアエンド 16S rRNA 遺伝子アンプリコシークエンス後に取得され、操作上の分類単位 (OTU) の分類と多様性分析は、QIIME 1.9.1 を使用して実行した。Usearch を使用して、配列を OTU にクラスター化した。OTU は HOMD リファレンスデータベースを使用して、属レベルまで分類学的に分類した。

<統計解析>

潜在的な細菌バイオマーカーは、線形判別効果サイズ (LEfSE) を使用して探索した。プリンシパル座標分析 (PCoA) は、QIIME を使用した非加重 UniFrac 距離と加重 UniFrac 距離に基づいて行った。

<付着唾液タンパク質の回収>

8人のボランティアの食前の安静時の唾液を採取し、4℃、30分、15,000gで遠心分離後、ろ過滅菌し、同量ずつ混ぜ、8人分のプール唾液として使用した。各歯科用材料サンプルおよびコントロール材料をろ過プール唾液に1晩、4℃で浸漬させた。蒸留水ですすぎ、タンパク抽出液 (8M 尿酸, 2% CHAPS, 0.5% IPG Buffer (pH3-11), 1.2% Detreak reagent (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を含む水和物) に数時間浸漬させ、付着唾液タンパク質を回収した。

<低分子タンパク質の解析>

付着唾液タンパク質を脱塩・濃縮し、MALDI TOF-MS (Microflex LT, Bruker Japan Corporation, Yokohama, Japan) と Flex Control 2.0 ソフトウェア (Bruker Japan Corp.) を使用して分析した。

<高分子タンパク質の二次元電気泳動解析>

付着唾液タンパク質を限外ろ過法により濃縮した。対照として、ろ過プール唾液を2倍濃縮したタンパク抽出液と1:1の割合で混合し、濃度は他のサンプルと同様になるよう調整した。二次元電気泳動では、付着唾液タンパク質 150 µg を 7 cm IPG ストリップに塗布し、一次元目の等電点電気泳動後、ストリップをドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲル (10 cm × 10 cm, 12.5%) の上に置き、水平装置による二次元電気泳動により、分子量に応じてタンパク質を分離した。

< MALDI-TOF/MS 解析 >

二次元電気泳動ゲルの CBB 染色で現れたスポットを切り取り、MALDI-TOF analysis (Microflex LRF 20, Bruker Daltonics) と Flex Analysis 3.0. を用いて解析した。また、付着唾液タンパク質の同定には、MASCOT を使用した。

【結 果】

<菌叢の解析>

全てのサンプルで *Streptococcus* 属 (31.27-40.57%), *Nisseria* 属 (26.23-35.02%), *Heamophilus* 属 (7.74-13.84%) の順で多く、全体の 72 ~ 83% を占めた。唾液では、*Nisseria* 属 (17.13%), *Prevotella* 属 (12.09%), *Heamophilus* 属 (13.45%), *Streptococcus* 属 (11.79%), *Fusobacterium* 属 (9.40%), *Porphyromonas* (7.75%) 属の順で多くを占めた。サンプル間で上位を占める細菌は類似していたが、唾液は異なる結果となった。PCoA では、Unweighted と weigted の両方で唾液だけが他とは異なるクラスターを形成した。そこで、サンプルと唾液の細菌叢を LEfSe で比較をし、サンプルに付着に関連する属と種を調べたところ、属レベルでは *Gemella* と *Streptococcus*、種では、*Streptococcus sp oral taxon 058*, *Neisseria mucosa*, *Gemella haemolysans*, *Rothia dentocariosa* がサンプルの付着に関与していることが分かった。

<低分子タンパク質の解析>

各サンプルに付着した唾液タンパク質と唾液タンパク質を MALDI-TOF (Microflex LT, Bruker Daltonics) 分析で現れたピークは、純チタンで 30, Co-Cr で 22, Ag-Pd-Au で 19, 義歯床用レジンで 18, HA で 20, 唾液で 72 のピークが見つかり、共通のピークが 11 見つかった。純チタンのみで見つかったピークは 3, Co-Cr のみで見つかったピークは 2, レジンのみで見つかったピークは 1 だった。各サンプルで異なるピークがいくつか見つかったが、唾液と比べると、サンプル間では似たようなところにピークが確認された。

<高分子タンパク質の解析>

二次元電気泳動の結果、唾液から選択され、サンプルに付着したタンパク質のスポット数は、純チタンで 25 スポット、Co-Cr で 24 スポット、Ag-Pd-Au で 23 スポット、Resin で 22 スポット、HA で 23 スポット観察された。全てのサンプルに共通するスポットは 21 スポット観察された。

25 のスポットから、14 のタンパク質が同定された。その中で、全てのサンプルに共通したタンパク質は 13 あり、それは

immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region, polymeric immunoglobulin receptor precursor, albumin, alpha-amylase, zinc-alpha2-glycoprotein precursor, HRPE773, proline rich protein, prolactin-inducible protein precursor, cystatin SA-III, cystatin-SN precursor, immunoglobulin kappa light chain, alloalbumin Venezia, cystatin-S precursorであった。

【考 察】

歯と材料に付着する菌叢の結果から、唾液中から一部の細菌が選ばれ、それぞれのサンプルに付着するが、サンプル間では大きな差はないと考えられる。しかし、特徴的な付着しやすい細菌を我々は特定することができた。これらはHAに初期付着する細菌として報告されている細菌と共通していた。しかし、材料に関しては付着しやすい細菌の検討をした報告がほとんどない。

一方、歯と材料に付着するペリクル様タンパク質としての低分子タンパク質と高分子タンパク質の比較の結果では、ピークパターンおよび、泳動パターンに差が認められないことから、HAとその他の材料に付着するペリクル様タンパク質の構成はほぼ同じと考えられる。ペリクル様タンパク質は初期付着細菌のレセプターとなっており、中でも proline rich protein や alpha-amylase は *Streptococcus* 属のレセプターとして知られている。我々の研究でも HA をはじめ、どの材料でも proline rich protein と alpha-amylase が確認され、且つ、*Streptococcus* 属が優位に付着していた。つまり、類似したペリクル様タンパク質の構成には、同様の菌叢が形成されると考えられる。しかし、プラーク構成菌の全てのペリクル内のレセプタータンパク質が明らかになっていないので、今後、今回の結果を利用して詳細に検討する必要があると考えられる。

審査の結果の要旨

純チタン (P-Ti)、Co-Cr 合金、金銀パラジウム合金 (Ag-Pd-Au) および義歯床用レジンに付着する細菌叢とタンパク質の分析を行い、さらに材料に付着したペリクル様タンパク質と歯科材料に付着した微生物叢の関係性を検討した。

本研究では次のような実験を行っている。まず、8名のボランティアの左右臼歯部頬側歯肉部にサンプルを入れる箱型のブロックを有する可撤性口腔内装置を作製した。純チタン (P-Ti)、Co-Cr 合金、金銀パラジウム合金 (Ag-Pd-Au)、義歯床用レジンおよび対照としてハイドロキシアパタイト (HA) の板状の試料を作製し、口腔内装置の箱型のブロック中に装填した。8名のボランティアが口腔内に装置を24時間装着後、板状の試料サンプルを回収し、付着した細菌叢からDNAとタンパク質を抽出した。同時に唾液サンプルも回収しDNAとタンパク質を抽出した。細菌叢の分析は、16SrRNA 遺伝子のV3～V4領域を用いてアンプリコン解析を実施した。また、各板状サンプルに付着したタンパク質と唾液タンパク質を質量分析計 (MALDI-TOF MS) で分析した。

菌叢の解析では、属レベルでは *Gemella* と *Streptococcus* が優勢であった。菌種レベルでは、*Streptococcus sp oral taxon 058*, *Neisseria mucosa*, *Gemella haemolysans*, *Rothia dentocariosa* が付着に関与していた。

低分子タンパク質の解析では、唾液タンパク質の多様性と比べて各板状サンプルに付着したタンパク質は類似していた。高分子タンパク質の分析では、すべてのサンプルに共通するタンパク質として13のタンパク質が同定された。

以上の結果から、ハイドロキシアパタイト (HA) とその他の材料に付着するペリクル様タンパク質の構成はほぼ同じと結論した。ペリクル様タンパク質は初期付着細菌のレセプターとなっており、proline rich protein や alpha-amylase は *Streptococcus* 属のレセプターとして知られている。

本研究は、細菌叢の量的な減少を目指した現在のプラークコントロールから細菌叢の質的改変を目指す将来のペリクルコントロールへ予防歯科を進化させていく上で重要な知見を提供するものであり、口腔細菌学およびその臨床応用分野に多大な貢献をすると期待される。よって、本論文は博士 (歯学) の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。