

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2018 年度 博士論文

齧蝕細菌叢をシミュレートした

バイオフィルムモデルの開発

—細菌叢に及ぼすスクロースの影響—

2019 年 3 月 1 日

石澤 将人

Masato Ishizawa

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

う蝕制御修復学講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2018 年度 博士 論文

齲蝕細菌叢をシミュレートした

バイオフィルムモデルの開発

—細菌叢に及ぼすスクロースの影響—

2019 年 3 月 1 日

石澤 将人

Masato Ishizawa

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

う蝕制御修復学講座

口腔統合医療学講座

向井義晴教授 指導

## 論文内容要旨

本研究では多種細菌から構成される *ex vivo* ポリマイクロバイアルバイオフィルムモデルを使用して培養期間や糖供給のタイミングによる pH ならびに細菌叢の変化を観察し、口腔内環境に近似した活動性・非活動性齲蝕モデル開発の可能性を検討した。

バイオフィルム形成は Exterkate らの方法に従い、成人刺激時唾液を用いてガラス円板上で行なった。すなわち、0.2%スクロース含有 unbuffered McBain 培養液に刺激唾液を加えて嫌気条件下で 10 時間培養した後、5 群に分けてさらに培養を継続した。cont, A および C 群は、0.2%スクロース含有培養液で、それぞれ 96, 192 および 288 時間まで培養した。B および E 群はスクロース含有培養液を用いて、96 時間培養を行った後、スクロース非含有培養液でそれぞれ 192 および 288 時間まで培養を行った。D 群は、スクロース含有培養液を用いて 96 時間培養を行った後、スクロース非含有培養液で 192 時間まで、さらに 288 時間まではスクロース含有培養液で培養を行った。各群において交換時に回収した使用済み培養液の pH を測定した。また各試料の全細菌数を real-time QPCR 法により分析した。さらに各サンプル由来の 16S rDNA から、次世代シーケンサーを用いて、バイオフィルム構造の比較、検討を行なった。

培養液の pH は、cont, A および C 群では 4.1~4.4 で推移し、培養時間の経過による変動は認められなかった。スクロース非含有の培養液に交換した B 群では pH は速やかに応答し 6.2~6.5 で推移した。D 群においてはスクロースの供給を再開させたことにより 4.1~4.4 となり、E 群ではスクロースの供給を絶ち続けたことにより 6.2~6.5 で推移した。全細菌数は C, D および A 群は他群と比較して高く、E 群は顕著に低かった。S. mutans は cont 群のみで認められ ( $2.42 \times 10^6$ )、その他の群では検出限界以下であった。Veillonella 属は B 群 ( $2.18 \times 10^4$ ) および D 群 ( $1.06 \times 10^9$ ) のみに認められ、D 群で顕著に高かった。cont, A, および C 群において菌叢の 90%以上を S. salivarius が占めた。B, D, および E 群において S. parasanguinis が顕著に増加した。特に E 群では構成している菌叢の 90%以上を占めた。B 群では G. adiacens, D 群では Veillonella 属(V. dispar, V. tobetsuensis)の割合が顕著に増加した。また、この 2 群では cont, A, C および E 群と比較して菌叢の Streptococcus 属が占める割合が減少していたものの、それらを除くすべての群において Streptococcus 属が主な菌叢を構成していた。主成分解析及びクラスター解析において B, D, および E 群 は他群と比較して異なる細菌叢を示した。

多菌種培養のバイオフィルムモデルを使用して初期齲蝕誘発環境をシミュレートした実験系においてスクロースの添加・非添加により齲蝕関連細菌と歯周

病関連細菌の優位性が細かく変化することが確認されたことから、今後は、本モデルの基質にエナメル質や象牙質を使用して実際の脱灰現象を再現し、齲蝕予防材料の効果や使用するタイミングの検討、ならびに効果的な再石灰化療法の開発を推進できると考えられた。

## 論 文 審 査 要 旨

本論文は、口腔内環境に近似した齲蝕モデルを作成する一環として、多種細菌で構成されるポリマイクロバイアルバイオフィルムモデルを使用して、その培養期間や糖供給のタイミングによる pH と細菌叢の変化を観察した論文である。

歯冠部齲蝕の減少傾向が認められる一方で、増加傾向を示す根面齲蝕の発症メカニズムは十分に解明されていない。本研究は、多菌種で構成されるバイオフィルムを使用して、培養期間、糖供給のタイミングによる pH の変化、さらに細菌叢の変化を観察することで、口腔内に近似した環境下における活動性齲蝕・非活動性齲蝕病原性バイオフィルムモデルの構築を目的として行われた。このような口腔内の環境を再現したモデルの構築は、科学的根拠に基づく根面齲蝕の予防や治療に有効な評価法の開発につながると期待される。ポリマイクロバイアルバイオフィルムに関する研究の進展は、今後の歯科臨床に貢献することが明白であり、その研究目的は高く評価できる。

本論文で用いられた成人刺激唾液を用いたポリマイクロバイアルバイオフィルムモデルは、Exterkate らによる先行研究において確立された方法である。口腔内環境を再現することを目的として、異なるタイミングでスクロースを添加し、pH の変化、real-time QPCR 法による全細菌数の分析、さらに次世代シーケンサーによるバイオフィルム構成の比較・検討を行っている。また、単一唾液サンプルからのバイオフィルム作製という制約の中で、細菌叢の比較には主成分分析、ならびにクラスター解析を用いており、適切な解析手法が用いられている。このように、本論文における研究方法の組み立ては理論的であり、また本学研究倫理審査委員会による承認を受けて実施され、十分な倫理的配慮もなされている。

本論文では以下のような結果が得られた。

1. 異なる期間においてスクロースの供給を行った結果、いずれの群もスクロース添加時には pH は 4.1~4.2 で推移し、非添加時には pH 6.2~6.5 を示し、培養期間の経過による pH の変動はなかった。
2. 全細菌数の測定の結果、糖質供給の期間と培養期間に一致して細菌数の増加が認められた。

3. 細菌叢の構成としては、*S.mutans* は糖質添加 96 時間の control 群においてのみ認められ、培養途中で糖質非添加期間のある群において *Veillonella* 属が、また全培養期間で糖質供給がある場合には *S.salivarius* が著明に増加していた。
4. 主成分分析およびクラスター解析の結果、糖質非添加での培養期間のある群では細菌叢の構成が異なっていた。

このような結果を受けて、考察においては *S.salivarius* の産生物質による *S.mutans* のクオラムセンシング抑制について言及している。また、培養期間中で糖質非添加期間を設定した場合にバイオフィーム中で *Veillonella* 属が優位となったことについては、スクロース供給を絶つことにより、*S.salivarius* の優位性が減弱し、歯周病関連細菌の増加を促す菌の増殖を生じたと考察している。さらに一旦絶ったスクロース供給を再開しても細菌叢中の *S.salivarius* の優位性は回復しないという興味ある知見が得られたことにより、さらなる研究の遂行が望まれる。

以上のように、本研究においてポリマイクロバイアルバイオフィームを使用して初期齲蝕誘発環境をシミュレートして、スクロースの添加・非添加により齲蝕関連細菌と歯周病関連細菌の優位性が細かく変化することが確認されたことは、これまでの報告にない新しい知見であり、今後の生体環境を再現した齲蝕誘発の機序の解明と齲蝕予防に関する道筋を示した点は高く評価できる。

本審査委員会は、論文内容および関連事項に関して口頭試問を行ったところ、十分な回答が得られることを確認した。さらに、ポリマイクロバイアルバイオフィームを用いた齲蝕誘発モデルの開発は、今後の歯科医療の発展への貢献が期待できるとの結論に至った。そこで、本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2019 年 3 月 1 日

主 査：木本 茂成

副 査：三辺 正人

副 査：合田 征司

## 緒 言

先進国においては歯冠部齲蝕が減少傾向にあるのに対して根面齲蝕は減少していないか、むしろ増加している<sup>1)</sup>。そのような根面齲蝕の発症メカニズムは歯冠部齲蝕に比較して未だ十分に解明されておらず、有効な治療法が確立されていないのが現状である。口腔ケア製品としてのグルコン酸クロルヘキシジンの長期使用が、高齢者の肺炎による死亡率を上昇させるという報告<sup>2)</sup>もあり、その使用法をエビデンスに基づいて改善するか、あるいは他の抗菌療法などを開発する必要があると考える。また最良の方法は、耐性菌の出現を生じさせない抗菌療法であるべきだとも考える。Nyvadらによる齲蝕評価法<sup>3)</sup>では、活動性齲蝕や非活動性齲蝕を評価するための方法が示されているが、今後さらに科学的な根拠を得て、根面齲蝕の予防や治療につながる評価法が開発されることが望まれている。そのような状況において、バイオフィルムを使用した活動性齲蝕と非活動性齲蝕を再現する象牙質根面齲蝕モデルを開発することは、非常に有用であると考え。我々は Exterkate ら<sup>4)</sup>が開発したポリマイクロバイアル (PM) バイオフィルムを用いた研究をこれまで報告してきた<sup>5,6)</sup>。本モデルは口腔内に存在する多種細菌からなるバイオフィルムを唾液から作製することが可能な簡便で優れたモデルである。本研究では、多種細菌から構成されるバイオフィルムモデルを使用して培養期間や糖供給のタイミングによる pH

ならびに細菌叢の変化を観察し、口腔内を模倣した環境下における活動性・非活動性齶蝕病原性バイオフィルムモデル開発の可能性を検討した。

## 実験材料及び方法

### 1. 培養液の作製

PM バイオフィルム形成のための標準培養溶液として、0.2 %スクロース含有 unbuffered McBain 2005 (脱イオン水, PIPES, mucin, Bacto peptone, Trypticase peptone, yeast extract, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, hemin, vitamin K1, pH 7.0) <sup>7)</sup>を用いた。

### 2. PM バイオフィルムの形成

直径 12 mm, 厚さ 0.15 mm のガラス円板を 24 well culture plate に適合する Lid に取り付けられたクランプに固定後、オートクレーブで滅菌し、バイオフィルム形成用試料とした。ガラス円板表面への PM バイオフィルム形成は、Exterkate らの方法 <sup>4)</sup> に従い行なった。健全な被験者 1 名から採取した刺激唾液を滅菌ガラスウールで濾過し、滅菌グリセリンで 2 倍に希釈した後、-80 °C で保存した。50 倍希釈となるよう unbuffered McBain (0.2 % スクロース含有) 培養液中に加えて 24 well 中に分注した後、培養液中にガラス円板を懸架し、嫌気条件下 (37 °C, CO<sub>2</sub> : 10 %, H<sub>2</sub> : 10 %, N<sub>2</sub> : 80 %) で 10 時

間培養を行った。その後、5群においてさらに培養を継続した。すなわち14時間、10時間の間隔で培養液（唾液非含有）を交換し、cont, AおよびC群は、0.2%スクロース含有培養液で、それぞれ96, 192および288時間まで培養した。BおよびE群はスクロース含有培養液を用いて、96時間培養を行った後、スクロース非含有培養液でそれぞれ192および288時間まで培養を行った。D群は、スクロース含有培養液を用いて96時間培養を行った後、スクロース非含有培養液で192時間まで、さらに288時間まではスクロース含有培養液で培養を行った（表1）。なお、本研究の計画書は神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の承認（No. 496）を得た。

### 3. 培養液のpH測定

各群において交換時に回収した使用済み培養液のpHを測定した（9618-10D, F-71, Horiba, Kyoto, Japan）した。

### 4. Real-time QPCR法

円板状ガラス試片に付着しているバイオフィームからDNA抽出後（Mora-Extract kit, Kyokuto Pharmaceutical Industrial, Tokyo, Japan）、DNA濃度を10 ng/μlに調整し、Rotor-Gene Q（Qiagen, Hilden, Germany）を用いたreal-time QPCR法（SYBR Premix Ex Taq II（Tli RNaseH Plus）を用いたインターカレーター法）により、形成されたポリマイクロバイアルバイオフィ



ルムの全細菌数, *S. mutans* および *Veillonella* 属の遺伝子コピー数を推定し, 各群のデータを比較, 検討した (n = 1). インターカレーター法は, SYBR Premix Ex Taq II などの蛍光物質が二本鎖 DNA に入り込み励起, 光の照射により蛍光を発する特性を利用して DNA 量を測定する方法である<sup>8)</sup>.

## 5. 次世代シーケンス解析

次世代シーケンサー (MiSeq™, Illumina, San Diego, USA) を用いて, 各サンプル由来の 16S rDNA からシーケンスデータを得て, 部分塩基配列を決定し, 次世代シーケンス・アンプリコン解析を行なうことにより, PM バイオフィルムサンプルに由来する菌群の帰属分類群を推定した<sup>9)</sup>. サンプル間の比較解析は, 主成分分析およびクラスター解析により (Metagenome@KIN (ver 2.2.1), World Fusion, Tokyo, Japan), 各群の PM バイオフィルム構造に生じている変動を比較, 検討した.

## 結 果

### 1. 各群 pH の変動

各群において交換した培養液の pH を測定したところ, cont, A および C 群では 4.1~4.4 で推移し, 培養時間の経過による変動は認められなかった. スクロース非含有の培養液に交換した B 群では pH は速やかに応答し, 6.2~6.5 で

推移した。D 群においてはスクロースの供給を再開させたことにより、4.1～4.4 となり、E 群ではスクロースの供給を絶ち続けたことにより 6.2～6.5 で推移した (図 1)。

## 2. Real-time QPCR 法による細菌数の定量解析

全細菌数は C, D および A 群は他群に比較して高く、E 群は顕著に低かった。 *S. mutans* は cont 群のみで認められ ( $2.42 \times 10^6$ )、その他の群では検出限界以下であった。 *Veillonella* 属は B 群 ( $2.18 \times 10^4$ ) および D 群 ( $1.06 \times 10^9$ ) のみに認められ、D 群で顕著に高かった (表 2)。

## 3. 次世代シーケンスによる各群の菌叢の網羅的解析 (図 2)

cont, A および C 群において菌叢の 90%以上を *S. salivarius* が占めた。 B, D および E 群において *S. parasanguinis* が顕著に増加した。特に E 群では構成している菌叢の 90%以上を占めた。 B 群では *G. adiacens*, D 群では *Veillonella* 属 (*V. dispar*, *V. tobetsuensis*) の割合が顕著に増加した。また、この 2 群では cont, A, C および E 群と比較して菌叢の *Streptococcus* 属が占める割合が減少していたものの、それらを除くすべての群において *Streptococcus* 属が主な菌叢を構成していた。主成分解析及びクラスター解析 (図 3, 4) において B, D, および E 群 は他群と比較して異なる細菌叢を示した。

## 考 察

我々は初期齲蝕が発症する直前の環境に近いバイオフィルムを *ex vivo* で再現することのできるモデルを作製することを目指している。現在報告されている齲蝕モデルは *S. mutans* などの単一菌で行っているものが多い<sup>10,11)</sup>。 *S. mutans* はグルコースやスクロースなどの糖を解糖系で代謝して ATP を合成し、代謝産物として酸を産生する。こうして酸性環境が強化されたバイオフィルム内で *S. mutans* は F-ATPase により H<sup>+</sup> を細胞外に排出し、菌体内外の pH を調節できることから酸性環境が長く続いても生存することができ、主要な齲蝕原因菌であると考えられている<sup>12)</sup>。一方、口腔内には 700 種類以上もの菌種が存在しており<sup>13)</sup>、そのような環境を再現すべく多菌種入りのバイオフィルムを用いてバイオフィルムの酸産生および耐酸性ならびに周囲環境の pH の変動を菌叢の変化と比較検討した研究は、これまでに報告されていない。本実験の real-time QPCR 法による全細菌数の測定結果では、スクロース非含有培養液で培養した群、すなわち B および E 群では cont 群と比較して菌数が減少している。これはスクロースの供給を絶つことで菌叢に変化が認められたことを示唆している。一方 A, C および D 群においては cont 群と比較して全細菌数が増加した。スクロースが持続的に供給、または一旦供給を絶たれても供給を再開することにより細菌の増殖が促されたものと考えられた。各群の交換した

試験培養液の pH を測定したところスクロース含有培養液は 4.1~4.4 であり、酸産生菌である *Streptococcus* 属が増加あるいは酸産性能が活性化していることが推察された。一方、スクロース非含有培養液の pH は 6.2~6.5 であり、バイオフィルムの酸産性能が低下していることが考えられた。次世代シーケンスによる菌叢の解析では各群の細菌叢が変化していることが確認できた。すなわち、*S. salivarius* の分布が cont, A, および C 群では菌叢の 90 %を占めていたがその他の群ではより低い値を示した。*S. salivarius* が産生する物質は、齲蝕原因菌として知られている *S. mutans* のクオラムセンシングを抑制することが明らかにされている<sup>14)</sup>。またバイオフィルム初期形成段階では *S. mutans* が優位ではないと報告されている<sup>15)</sup>。これらのことからスクロースが持続的に供給された群で *S. salivarius* が優位になったものと考えられた。B, D および E 群のように一回以上スクロースの供給を絶った群においては *S. parasanguinis*, *S. gordonii* および *Veillonella* 属の増加傾向が認められた。*S. gordonii* は *P. gingivalis* の歯周ポケット内への定着に深く関わるという報告がある<sup>16)</sup>。また、*Veillonella* 属は口臭の原因菌としても知られている<sup>17)</sup>。さらには、*S. parasanguinis* はまず歯の表面に定着し、他の細菌の付着する基礎となり、バイオフィルム形成を促すことが報告されている<sup>18)</sup>。また、バイオフィルムが成熟し嫌気度が増してくると、歯周病原細菌の優位性が高まることも報告されていること<sup>19)</sup> から、一旦スク

ロースを絶つことにより，*S. salivarius* の優位性が減弱し，かわって歯周病原細菌の増加を促す細菌の増殖が生じたものと思われる．また，この後，スクロースの供給を再開した場合でも *S. salivarius* の優位性は回復しなかったという結果は興味ある知見であり，今後，さらなる研究が必要と考えられた．

多菌種培養のバイオフィルムモデルを使用して初期齲蝕誘発環境をシミュレートした実験系においてスクロースの添加・非添加により齲蝕関連細菌と歯周病関連細菌の優位性が細かく変化することが確認されたことから，今後は，本モデルの基質にエナメル質や象牙質を使用して実際の脱灰現象を再現し，齲蝕予防材料の効果や使用するタイミングの検討，ならびに効果的な再石灰化療法の開発を推進できると考えられた．

## 結 論

ポリマイクロバイアルバイオフィルムを使用し、培養期間や糖供給のタイミングを変化させることで、pH や細菌叢への応答を確認できた．

## 謝 辞

稿を終えるにあたり，終始ご懇篤な指導を賜りました口腔統合医療学講座向井義晴教授，ならびにバイオフィルムモデルのご指導をいただきました

Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA) Cariology 教室の ten Cate 教授  
および Exterkate 先生に感謝致します。本研究は、バイオフィルム細菌叢の分析  
に関して株式会社テクノスルガ・ラボの協力を得て遂行致した。なお、本研究  
の一部は科学研究費補助金基盤研究 C (16K011567) の補助を受けて行われ  
た。

#### 利益相反

研究に関連して、申告すべき利益相反はない。

#### 文 献

- 1) Tan H P, Lo E C, Dyson J E, et al. A randomized trial on root caries prevention in  
elders. *J Dent Res.* 89: 1086-1090, 2010.
- 2) Price R, MacLennan G, Glen J; SuDDICU Collaboration. Selective digestive or  
oropharyngeal decontamination and topical oropharyngeal chlorhexidine for  
prevention of death in general intensive care: systematic review and network meta-  
analysis. *BMJ.* 348:g2197, 2014.

- 3) Nyvad B, Baelum V. Nyvad criteria for caries lesion activity and severity assessment: A validated approach for clinical management and research. *Caries Res.* 52: 397-405, 2018.
- 4) Exterkate RAM, Crielaard W, ten Cate JM. Different response of amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res.* 44:372-379, 2010.
- 5) Tomiyama, K, Mukai Y, Kumada H, et al. Formation of subsurface dentin lesions using a polymicrobial biofilm model. *Am J Dent.* 28: 13-17, 2015.
- 6) Hasegawa H, Tomiyama K, Kumada H, et al. Antimicrobial effects of carbamide peroxide against a polymicrobial biofilm model. *Am J Dent.* 28: 57-60, 2015.
- 7) McBain AJ, Sissons C, Ledger RG, et al. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol.* 98: 624-634, 2005.
- 8) Morisson TM, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous sybr green I monitoring during amplification. *Biotech.* 24: 954-962,

1998.

- 9) Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, et al. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE*. 9: e105592, 2014.
- 10) Giacaman RA, Pailahual V, Díaz-Garrido N. Cariogenicity induced by commercial carbonated beverages in an experimental biofilm-caries model. *Eur J Dent*. 12: 27-35, 2018.
- 11) Garcia SS, Blackledge MS, Michalek S, et al. Targeting of *streptococcus mutans* biofilms by a novel small molecule prevents dental caries and preserves the oral microbiome. *J Dent Res*. 96: 807-814, 2017.
- 12) Kuhnert WL, Zheng G, Faustoferri RC, et al. The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *J Bacteriol*. 186: 8524-8528, 2004.
- 13) Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, et al. Bacterial interactions and



successions during plaque development. *Periodontol 2000*. 42: 47-79, 2006.

- 14) Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Appl Environ Microbiol*. 77: 1572-1580, 2011.
- 15) Rickard AH, Gilbert P, High NJ, et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol*. 11: 94-100, 2003.
- 16) Park Y, Simionato MR, Sekiya K, et al. Short fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and their role in coadhesion with *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun*. 73: 3983-3989, 2005.
- 17) Washio J, Sato T, Koseki T, et al. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. *J Med Microbiol Sep*. 54(Pt 9): 889-95, 2005.
- 18) Gibbons RJ, Houte JV. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu Rev*

*Microbiol.* 29: 19-44, 1975.

- 19) Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* 5: e307, 2007.

表1:スクロース添加・非添加により設定した対照群及び実験群

code	medium	bacterial growth period (h)
cont	+	96 h
A	++	96 h + 96 h
B	+ -	96 h + 96 h
C	+++	96 h + 96 h + 96 h
D	+ - +	96 h + 96 h + 96 h
E	+ - -	96 h + 96 h + 96 h

+: unbuffered Mcbain medium with 0.2 % sucrose

-: unbuffered Mcbain medium without 0.2 % sucrose

表2: real-time QPCR法による細菌数の定量解析

Analysis of bacteria by real-time QPCR (16S rDNA)					
	total bacteria	<i>S. mutans</i>	<i>F. nucleatum</i>	Veillonella属	<i>P. gingivalis</i>
cont	$3.2 \times 10^9$	$2.42 \times 10^6$	—	—	—
A	$1.06 \times 10^{10}$	—	—	—	—
B	$2.53 \times 10^9$	—	—	$2.18 \times 10^4$	—
C	$1.69 \times 10^{10}$	—	—	—	—
D	$1.35 \times 10^{10}$	—	—	$1.06 \times 10^9$	—
E	$3.71 \times 10^8$	—	—	—	—

—: 定量下限値以下

全細菌数はC, D およびA群は他群に比較して高く, E群は顕著に低かった.  
*S. mutans* はcont群のみで認められ, その他の群では検出限界以下であった.  
 Veillonella属はBおよびD群のみに認められ, D群で顕著に高かった.

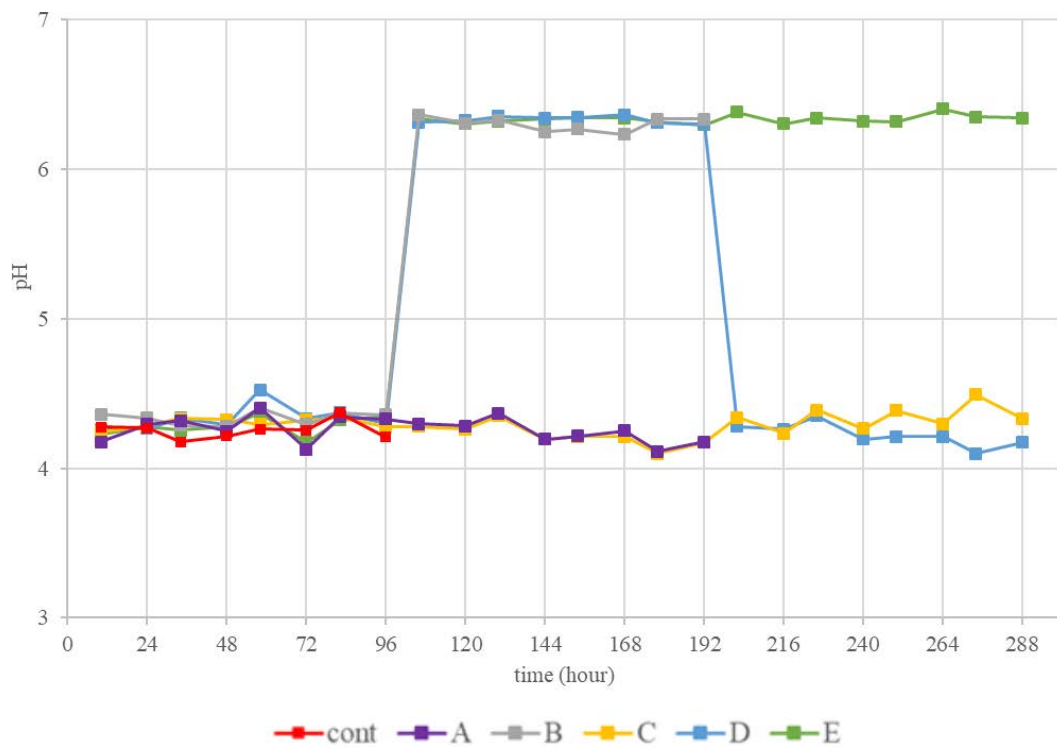


図 1: 使用済み培養液の pH

cont, A, C群では4.1~4.4で推移した. スクロース非含有の培養液に交換したB群は速やかに応答し6.2~6.5で推移した. D群においてはスクロースの供給を再開させたことにより4.1~4.4となり, E群ではスクロースの供給を絶ち続けることにより6.2~6.5で推移した.

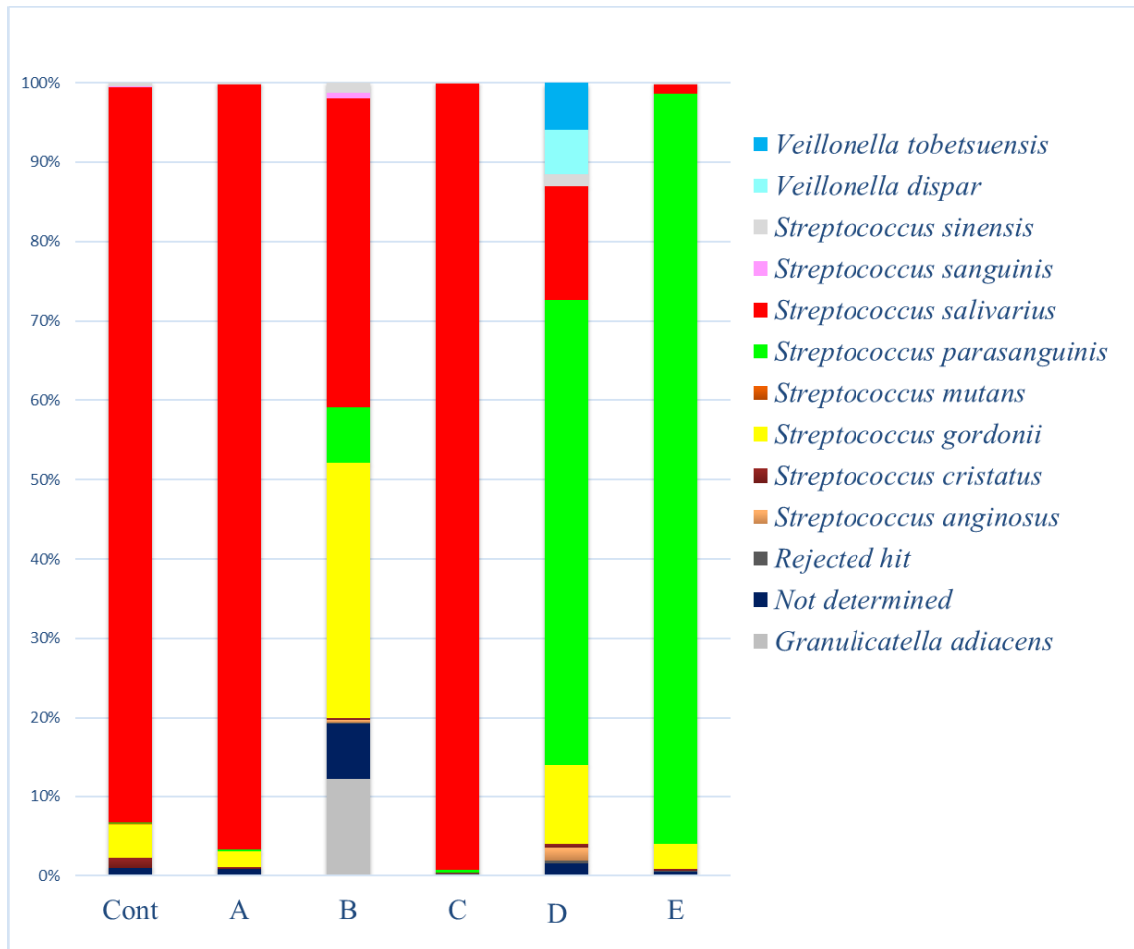


図 2: 次世代シーケンスを用いたバイオフィルム細菌叢のスクロース供給条件の違いによる影響の解析

cont, A, および C 群において菌叢の 90%以上を *S. salivarius* が占めた. B, D, および E 群において *S. parasanguinis* が顕著に増加した. 特に E 群では構成している菌叢の 90%以上を占めた. B 群では *G. adiacens*, D 群では *Veillonella* 属の割合が顕著に増加した.

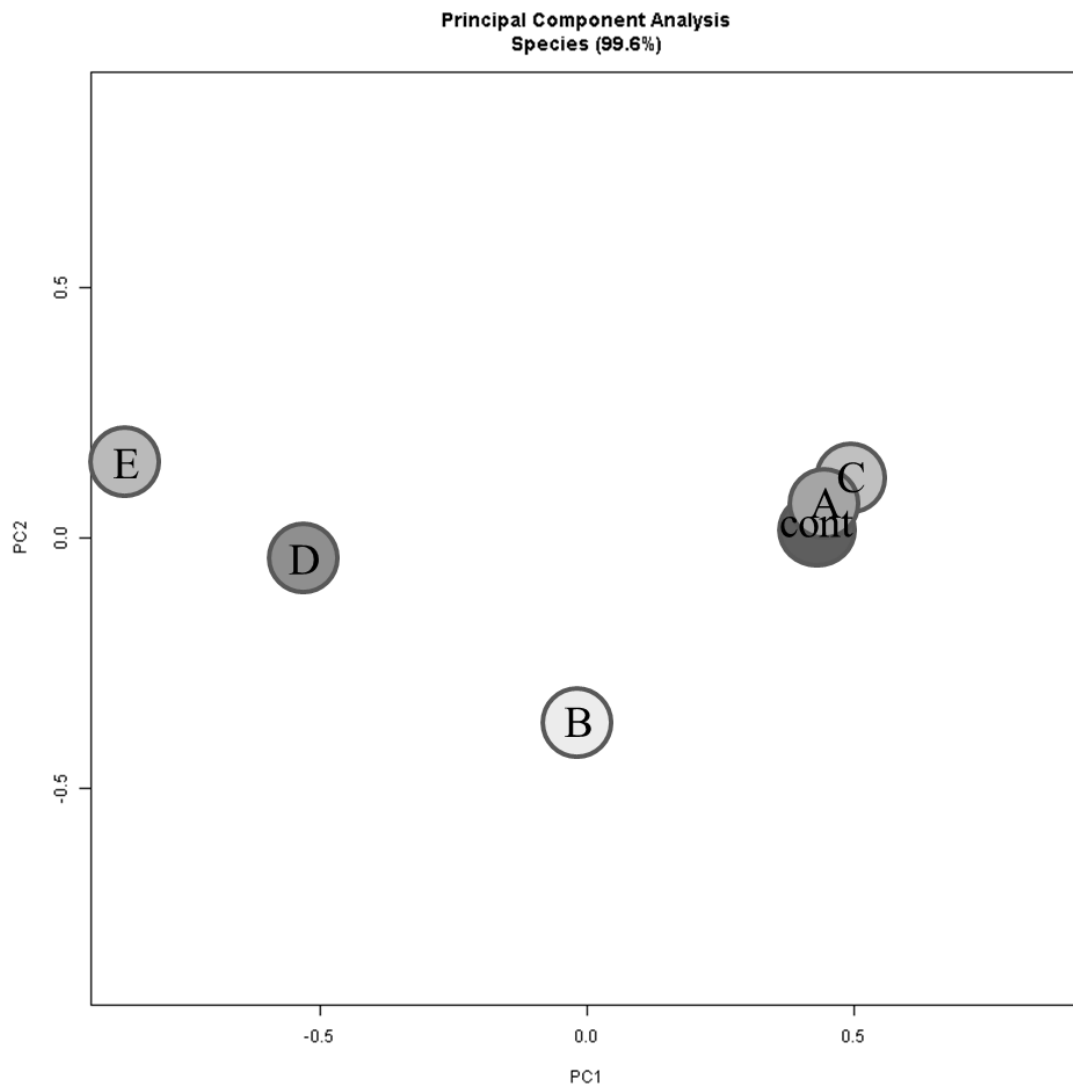


図 3: 主成分分析

B, D, およびE群 はcont, A, C群と比較して異なる細菌叢を示した.

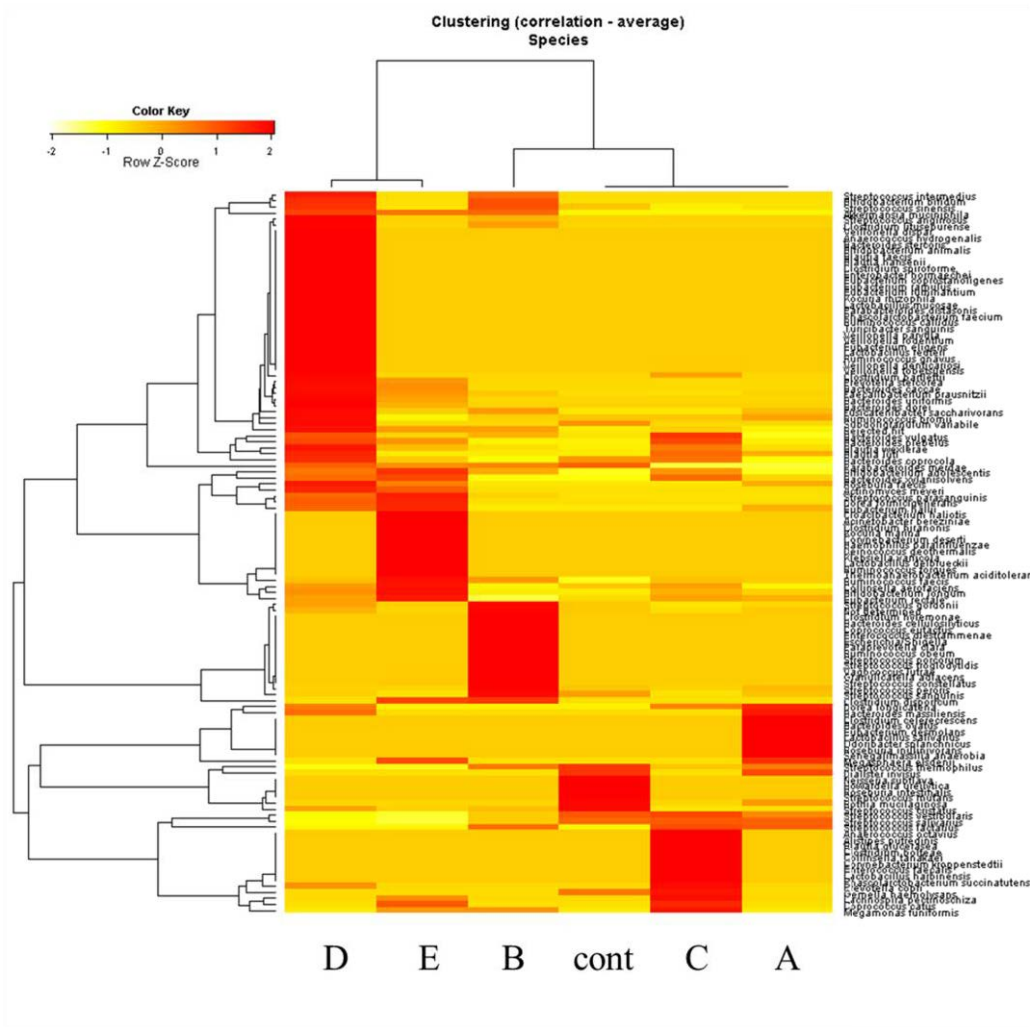


図 4： クラスタ解析

B, D, およびE群 はcont, A, C群と比較して異なる細菌叢を示した.