

氏名	森本 節代
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5715号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	小児口腔より分離されたラクトバシラス属細菌のバイオフィーム形成能の検討
論文審査委員	大原 直也 教授 森田 学 教授 島田 康史 准教授

学位論文内容の要旨

【目的】

齲蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層には、その病原性に深く関与するタンパク構成成分が存在し、グルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase; GTF) およびグルカン結合タンパク (Glucan binding protein; Gbp) が知られている。

ラクトバシラス属細菌は、口腔内および消化管の常在菌で糖を代謝し、乳酸を産生する代表的な乳酸菌であり、抗炎症作用や他の腸内細菌に対する拮抗作用が知られている。これまで、ラクトバシラス属細菌は、口腔内では菌面への付着能が低いため、齲蝕の発生に関与していないと考えられてきた。しかしながら、近年では、ラクトバシラス属細菌の種類によっては齲蝕原性を持つ可能性も報告されている。

本研究では小児の口腔内よりラクトバシラス属細菌を分離し、その齲蝕原性能および *S. mutans* のバイオフィーム形成との関連について検討したのでこれを報告する。

【方法】

(1) 供試菌株

供試菌として *S. mutans* MT8148 株を用いた。岡山大学生命倫理審査委員会承認のもと、岡山大学病院小児歯科を受診された患児 10 人の口腔内より、齲蝕部位あるいは健全部位からラクトバシラス属細菌を分離した。これらの菌の染色体 DNA を抽出し、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法および Clustal W プログラムを用いて菌種の同定を行った。

(2) スクロース依存性平滑面付着能

MT8148 株を Brain Heart Infusion 液体培地にて、ラクトバシラス属細菌株を de Man Rogosa Sharp 培地にて培養後、1%スクロースを含有した各培地に播種し、37°Cで18時間水平面から30°に傾けて培養した。培養後、試験管壁に付着した菌体を懸濁した後、全菌体に対する付着菌体の量を百分率で示し、スクロース依存性平滑面付着能とした。

(3) バイオフィーム形成量の測定

供試菌を各培地にて培養後、0.5%スクロースを添加した Todd Hewitt 培地に希釈し、96穴平底マイクロタイタープレートに分注して37°Cで2日間嫌氣的に培養した。浮遊菌液を取り除き、底面に付着した菌体をクリスタルバイオレット溶液にて染色し、波長570nmにおける吸光度を測定した。

(4) 2-コンパートメントシステムを用いたバイオフィーム形成能の分析

本システムでは24穴ウェル付あるいは6穴ウェル付プレートおよびセルカルチャーインサートを用いており、インサートの底面に0.4µm径のメンブレンが存在するため、インサートとウェルの間で物質の透過が可能である。MT8148株をウェルに、ラクトバシラス属細菌をインサート内に播種した後、37°C、18時間、毎分31~35回の速度で震盪培養を行った。浮遊菌液を取り除き、底面に付着した菌体をクリスタルバイオレット溶液にて染色し、波長570nmにおける吸光度を測定した。

(5) 2-コンパートメントシステムを用いて形成されたMT8148株のバイオフィーム構造の観察

ヘキシジウムアイオダイドによりMT8148株菌体を染色し、MT8148株をウェルに、ラクトバシ

ラス属細菌をインサート内に播種した後、振盪培養を行った。底面に形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡で観察するとともに、形成されたバイオフィルムの密度を Image J® にて数値化し評価した。

(6) 2-コンパートメントシステムを用いて形成された MT8148 株の *gtf* 遺伝子の発現

MT8148 株をウェルに、ラクトバシラス属細菌をインサート内に播種した後、振盪培養を行った。底面に形成されたバイオフィルムに存在する菌体より全 RNA 抽出を行った後、cDNA を作製した。作製した cDNA を用いて、各遺伝子の発現を Real-time Reverse transcription-PCR (Real-time RT-PCR) 法により調べた。

【結果および考察】

齧蝕部位から採取した全てのプラークから 7 種類のラクトバシラス属細菌が分離されたが、健全部位からの検出率は低かった。ラクトバシラス属細菌の種類としては *Lactobacillus salivarius* が最も多く検出された。ラクトバシラス属細菌単独では、MT8148 株と比較して、スクロース依存性平滑面付着能およびバイオフィルム形成能が低い値を示した。また、齧蝕部位から分離されたラクトバシラス属細菌は、健全部位より分離されたものと比較して高い齧蝕病原性を示した。

2-コンパートメントシステムを用い MT8148 株と各ラクトバシラスを同時に培養したところ、MT8148 株のみ培養した場合と比較してバイオフィルム形成量が上昇し、バイオフィルムの構造は密になった。さらに、表層タンパクである *gtf* 遺伝子の発現の上昇が認められた。

以上の結果より、ラクトバシラス属細菌が齧蝕原性を持つ可能性が示された。また、ラクトバシラス属細菌の存在が MT8148 株のバイオフィルム形成能に影響していることが明らかとなり、その機序として 2 つの菌株間で伝達された何らかのシグナルが MT8148 株の表層タンパクの発現に関連していることが示唆された。

論文審査結果の要旨

齲蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層には、その病原性に深く関与するタンパク成分が存在し、グルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase; GTF) およびグルカン結合タンパク (Glucan binding protein; Gbp) が知られている。ラクトバシラス属細菌は、口腔内および消化管の常在菌で糖を代謝し、乳酸を産生する代表的な乳酸菌であり、抗炎症作用や他の腸内細菌に対する拮抗作用を有することが知られている。これまで、ラクトバシラス属細菌は口腔内では歯面への付着能が低いために、齲蝕の発生に関与していないと考えられてきた。しかし、近年では、ラクトバシラス属細菌の一部菌種は齲蝕病原性を持つ可能性が報告されている。本研究では小児の口腔内よりラクトバシラス属細菌を分離し、齲蝕病原性に関係する付着能および *S. mutans* のバイオフィーム形成に与える影響について検討した。

供試菌として *S. mutans* MT8148 株を用いた。また、岡山大学生命倫理審査委員会承認のもと、岡山大学病院小児歯科診療室を受診した患児 10 人の口腔内齲蝕部位と健全部位からラクトバシラス属細菌を採取・分離した。分離菌の染色体 DNA を抽出し、Polymerase Chain Reaction 法および Clustal W プログラムを利用した菌種の同定を行った後、実験に供試した。齲蝕部位から採取した全てのプラークからラクトバシラス属細菌が分離され、種としては 7 菌種であった。健全部位における検出率は低かった。検出頻度は *Lactobacillus salivarius* が最も高かった。スクロース依存性平滑面付着能およびバイオフィーム形成量を測定した結果、ラクトバシラス属細菌単独では MT8148 株と比較して、両者とも低い値を示した。これらの性状を齲蝕部位分離菌と健全部位分離菌で比較したところ、前者で高い値を示し、その齲蝕病原性が高いことが示唆された。次に、ラクトバシラス属細菌の存在が MT8148 株のバイオフィーム形成に与える影響を 2-コンパートメントシステムを用いて検討した。本システムを用い、ろ過膜を隔てて MT8148 株と各ラクトバシラス属細菌を共培養した後、両者のバイオフィーム形成能を評価したところ、すべてのラクトバシラス属細菌および MT8148 株において、単独培養の場合よりも有意に高いバイオフィームの形成を認めた。また、単独培養の場合と比較すると、共培養後に形成された MT8148 株のバイオフィームの密度は、いずれのラクトバシラス属細菌の存在下においても有意に上昇し、緊密なバイオフィームが形成されていた。さらに、MT8148 株の *gtf* の発現を Real-time RT-PCR 法により評価したところ、ラクトバシラス属細菌の存在によりその有意な上昇が認められた。

以上の結果より、小児口腔から分離されたラクトバシラス属細菌にバイオフィーム形成能があることが示唆された。そして、ラクトバシラス属細菌と MT8148 株が同時に存在した場合、それぞれのバイオフィーム形成能が上昇することが示唆された。さらに、これらの 2 つの菌株間で伝達された液性因子を介して、ラクトバシラス属細菌が *S. mutans* のバイオフィームの構造に影響を与えている可能性が示唆された。

本論文で得られた結果は、口腔内のバイオフィーム形成のメカニズムを解明する上で、重要な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。