

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
仲野 道代 印	研究の総括指導
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 小児歯科学分野	身分 大学院生	氏名 森本 節代
論 文 題 名 小児口腔より分離されたラクトバシラス属細菌の齲蝕原性能の検討		
論文内容の要旨（2000字程度）		
<p>【目的】 齲蝕病原性細菌 <i>Streptococcus mutans</i> 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 <i>S. mutans</i> 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。</p> <p>【方法】</p> <p>(1) 供試菌株 供試菌として <i>S. mutans</i> 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。</p> <p>(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。</p> <p>(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 570 nm における吸光度を測定した。</p> <p>(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 0.4 μm 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。</p>		

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 570 nm 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ー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ームの密度を 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 *gjf* 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ー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ー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ーム形成量が上昇し、バイオフィームの構造は密になった。さらに、表層タンパクである *gjf* 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 株のバイオフィー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。