

学位論文

小児口腔より分離されたラクトバシラス属細菌の
バイオフィルム形成能の検討

Biofilm formation of *Lactobacillus* strains
isolated from Japanese children

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻

小児歯科学分野

森本 節代

Setsuyo MORIMOTO

(平成 30 年 2 月 27 日受付)

緒言

ヒト口腔には少なくとも300種類の細菌および真菌が常在菌として存在し、口腔の恒常性を維持している一方、口腔内疾患の発症に関与していると考えられている¹⁾。グラム陽性細菌である*Streptococcus mutans* は齲蝕の主要な病原性細菌であり、口腔内のバイオフィーム形成において重要な役割を担っている²⁾。バイオフィームは段階的に形成されるが、歯面における初期バイオフィームの形成は*Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* などの早期定着菌が歯の表面のペリクルに付着することが端緒となり、それに続いて*S. mutans* が結合することにより開始される³⁾。*S. mutans* は自身の産生するグルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase; GTF) の働きによりスクロースを基質として産生した水溶性および非水溶性グルカンを介して、歯面に強固に付着する能力を持つ⁴⁾。歯面に付着した菌がグルカンを産生し続けることによりバイオフィームの構造は成熟し、齲蝕発生の端緒となる⁵⁾。

バイオフィームには、菌体自体に加えて、菌体外多糖、タンパク、細胞の破片などが一体となって含まれ、それらにより外界からの栄養分の吸収や異種細菌間での栄養学的共生が可能になるため、成熟したバイオフィームの病原性は増悪し、宿主

の防御機構や抗菌物質に対して抵抗性を示すようになる⁶⁾。*S. mutans* の菌体表層に存在する GTF 以外の主要なタンパクとして、高分子タンパク抗原 c (protein antigen c; PAc)⁷⁾およびグルカン結合タンパク (glucan-binding protein; Gbp)⁸⁾ が存在する。*S. mutans* の GTF において、GTFB, GTFC, および GTFD の生合成が報告されており、各々をコードする遺伝子 *gtfB*, *gtfC*, および *gtfD* の塩基配列がすでに明らかになっている⁹⁾。GTFB は菌体に結合する形で存在し、スクロースを基質としてグルコースが α -1,3 結合した非水溶性のグルカン进行合成する。また GTFC は同様に大部分が菌体に結合し、非水溶性グルカンの他にグルコースが α -1,6 結合した水溶性のグルカン进行合成する⁹⁾。一方、GTFD はそのほとんどが菌体外に分泌され、スクロースからグルコースが α -1,6 結合した水溶性のグルカン进行合成する¹⁰⁾。Gbp は、GTF によって合成されたグルカンとの結合能を有し、*S. mutans* によって産生される代謝産物の堆積に深く関与すると考えられている¹⁰⁾。Gbp に関しては、これまでに GbpA, GbpB, GbpC および GbpD の 4 種類が報告されており、各々をコードする遺伝子 *gbpA*, *gbpB*, *gbpC* および *gbpD* の塩基配列がすでに明らかになっている¹⁰⁾。GbpA は最初に発見されたグルカン結合タンパクであり、GTF のグルカン結合ドメインと相同性の高い繰り返し構造を含んでいる¹¹⁾。GbpB は菌体

結合型であり，細胞の維持や分裂に関わり，細胞壁の構成成分と考えられている¹¹⁾。

GbpC は菌体結合型であり，菌の凝集に関与することやスクロース依存性付着において重要な役割を果たしていることが明らかにされている¹²⁾。さらに，GpbD は GbpA と同様に菌体遊離型であり，デキストラン結合能を有し *S. mutans* の疎水性に関与していることが明らかにされている¹³⁾。

ラクトバシラス属は糖質を代謝し乳酸を産生する乳酸菌の一種であり，ヒトにおいては消化管，女性生殖器，そして口腔内に多く生息している¹⁴⁾。口腔内においては，これまでに常在菌として 153 種類のラクトバシラス属細菌の生息が明らかとされており，唾液，舌，頬粘膜，歯肉より分離されることが報告されている¹⁵⁾。ラクトバシラス属細菌は，適正量を摂取した場合に宿主に健康上の有益な効果をもたらす生菌と定義されるプロバイオティクスの一種でもある¹⁶⁾。

Lactobacillus pentosus が，他の腸内細菌の刺激によって宿主から産生される炎症性サイトカインの発現を抑制することにより，大腸炎に対する抗炎症作用を有する¹⁷⁾など，ラクトバシラス属細菌は，消化管における善玉菌として広く注目されるようになり，ラクトバシラス属細菌の生菌を多く含むヨーグルトやチーズといった乳製品を始めとする食品が健康増進の目的で消費されてきた。近年は，プロ

バイオティクスが齲蝕や歯周病の発病および進行を予防する可能性についても研究されている。*Lactobacillus casei* を投与されたヒトでは歯周状態が改善したことや、*Lactobacillus paracasei* を投与されたマウスでは、普通食を投与されたマウスと比較して齲蝕スコアが有意に低下していたことが報告されている^{18,19,21)}。これらのメカニズムとして、*L. casei* の刺激によって宿主から産生される炎症性サイトカインの発現の抑制および歯周組織におけるコラーゲン分解酵素の活性の抑制や、*L. paracasei* が *S. mutans* と共凝集することで *S. mutans* の歯面への親和性を低下させることが推測されている^{20, 21)}。これまで、*S. mutans* と比較した場合、*Lactobacillus salivarius* および *Lactobacillus fermentum* のスクロース依存性付着能が低いことから、これらのラクトバシラス属細菌は齲蝕病原性が低いとされてきた²²⁾。一方、*S. mutans* の齲蝕病原性が明らかになる以前は、ラクトバシラス属細菌がその耐酸性や糖質代謝により乳酸に代表される各種の酸産生能を有することから齲蝕発生に関連していることも推測されていた²³⁾。生後3 か月から24 か月のタイ人小児を対象とした縦断研究では、唾液中に *S. mutans* およびラクトバシラス属細菌が早期に検出された小児では齲蝕歯数が多いことが明らかとなった²⁴⁾。また、3 歳から5 歳の哺乳瓶齲蝕経験を有するイギリス人小児におい

ては、*S. mutans* が齲蝕部位および健全部位から検出されるのに対して、ラクトバシラス属細菌は齲蝕部位からのみ検出されたため、ラクトバシラス属細菌と哺乳瓶齲蝕との関係が示唆された²⁵⁾。さらに、ラット齲蝕モデル実験によって、*L. salivarius* の単独感染によってラットの裂溝部に齲蝕が誘発され、*L. salivarius* と *S. mutans* を混合感染させると *S. mutans* の単独感染よりも有意に強い齲蝕を誘発するという報告がある²⁶⁾。以上のことから、ラクトバシラス属細菌の種類や成育場所によっては齲蝕病原性を持ち、*S. mutans* の齲蝕病原性にも影響を与えている可能性が示唆される。しかしながら、*S. mutans* および齲蝕原性バイオフィルムに対するラクトバシラス属細菌の働きについては未だ不明な点が多い。

本研究の目的は、小児口腔の齲蝕部位および健全部位からラクトバシラス属細菌を分離し、その齲蝕病原性について検討を加えるとともに、ラクトバシラス属細菌が *S. mutans* の形成するバイオフィルムに与える影響を検討することである。

材料ならびに方法

1) 供試菌株と培養条件

本研究に使用した菌株を表 1 に示す。ミュータンスレンサ球菌は、日本人小児の口腔より分離された *S. mutans* MT8148 株を使用した²⁷⁾。*S. mutans* の培養には、Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), Todd Hewitt (TH) 液体培地 (Becton Dickinson and Company) および Mitis-salivarius (MS) 寒天培地 (Becton Dickinson and Company) を用い、37℃で静置培養した。特に記載のない場合は、すべて好気培養とした。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を受診した患児 10 人 (平均年齢 4 歳 6 か月) の口腔内より、齲蝕部位あるいは健全部位からプラークをスプーンエキスカバーターによって採取した。採取したプラークを 1 mL の滅菌生理食塩水に懸濁し、ラクトバシラス選択培地である Lactobacillus Selective (LBS) 寒天培地 (Becton Dickinson and Company) に播種し、嫌気下で 37℃で 48 時間培養した。培養後、得られたコロニーをランダムに抽出しラクトバシラス属細菌株として使用した。

ラクトバシラス属細菌の培養には de Man Rogosa Sharp (MRS) 培地 (Becton

Dickinson and Company) および LBS 寒天培地を用い、37°Cで静置培養した。

2) ラクトバシラス属細菌の同定

はじめに、各培養菌体から染色体 DNA の抽出を行った。10 mL の MRS 液体培地にて 37°Cで 18 時間培養した菌液を遠心分離 (3,000 rpm, 10 分, 4°C) により集菌し、250 μ L の Glu-TE 緩衝液 (1 M Glucose, 10 mM tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1 mM EDTA) に懸濁した。この懸濁菌液に 62.5 μ L の N-acetylmuramidase SG (2.0 mg/mL ; MP Biomedicals) を加え、37°Cで 90 分間反応させた。さらに、Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN Sciences, Germantown, MD, USA) を添付指示書に従い反応させ、得られた反応液を遠心分離 (15,000 rpm, 3 分, 4°C) して得た上清に、600 μ L の Isopropyl alcohol (ナカライテスク, 京都) を添加して再度遠心分離 (15,000 rpm, 1 分, 4°C) を行った。得られた沈殿を 70% Ethanol (和光純薬, 大阪) にて洗浄して乾燥後、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7.5) 100 μ L に溶解させた。DNA 溶液は吸光度計 (SmartspecTMplus, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて波長 260 nm で測定し、濃度調整を行った。

ラクトバシラス属細菌の染色体 DNA を分離した後, Shimada²⁸⁾らの方法に従って, Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を利用した菌種の同定を行った。PCR による DNA の増幅には, 表 3 に示す *Lactobacillus* 16s-F および *Lactobacillus* 16s-R プライマーを用い, TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ, 滋賀) および S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) を使用して反応を行った。増幅産物の塩基配列の決定は FASMAC (神奈川県) に委託した。なお, この反応には表 3 に示す r2L プライマーを用いた。決定されたラクトバシラス属細菌の V1-V3 領域は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されている既知のラクトバシラス属細菌のものと比較し, Clustal W プログラムを用いてシークエンス配列を比較解析して決定した。

3) スクロース依存性平滑面付着能

Hamada²⁹⁾らの方法に従い, 各供試菌のスクロース依存性平滑面付着能を測定した。*S. mutans* MT8148 株および各ラクトバシラス属細菌株を BHI 液体培地で 18 時間培養後, その 15 μ L を 1% Sucrose 含有 BHI 液体培地 3 mL 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ボルテックスミキサー (Scientific Industries, Bohemia,

NY, USA) で攪拌・剥離した後, 付着した菌体を Handy Sonic model UR-20P (トミー精工, LTD, 東京) を用いて超音波で懸濁し, 全菌体の波長 600 nm における吸光度に対する付着菌体の波長 600 nm における吸光度を百分率で示し, スクロース依存性平滑面付着能とした。

4) バイオフィーム形成量の測定

S. mutans MT8148 株を 10 mL の BHI 液体培地にて, ラクトバシラス属細菌を 10 mL の MRS 液体培地にて 37°C で 18 時間培養した。培養した供試菌液を 0.5% Sucrose 添加 TH 液体培地に希釈し, 96 ウェル平底細胞培養用マイクロタイタープレート (FALCON, Franklin Lakes, NJ, USA) の各ウェルに対数増殖期にある各供試菌を 100 μ L ずつ分注して, 37°C で 2 日間嫌氣的に培養した。各ウェルの浮遊菌液を取り除いた後, 25 μ L の 1% Crystal violet 溶液 (ナカライテスク, 京都) を加えて 15 分間室温に静置することにより底面に付着した菌体を染色し, 蒸留水で 6 回洗浄を行った。その後, 95% Ethanol (和光純薬) を加えて洗浄し, 乾燥後, 蒸留水を加えて波長 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たバイオフィーム形成能の分析

S. mutans MT8148 株のバイオフィーム形成に対してラクトバシラス属細菌が与える影響を検討するために、Wu¹⁸⁾らの方法に準じて、24 ウェルあるいは 6 ウェルプレート低蒸発タイプフタ付 (Becton Dickinson and Company) と 24 ウェル用あるいは 6 ウェル用セルカルチャーインサート 0.4 μm メンブレン付 (Becton Dickinson and Company) を用いた 2-コンパートメントシステムによる分析を行った (図 1)。 *S. mutans* MT8148 株をコンパニオンプレートに、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 回の速度で嫌氣的に振盪培養を行った。また、ラクトバシラス属細菌をコンパニオンプレートに、 *S. mutans* MT8148 株をインサート内に播種した場合も同様に行った。なお、陰性コントロールとして、 *S. mutans* MT8148 をコンパニオンプレートに、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS; 137mM NaCl, 8.1mM KH_2PO_4 ; 和光純薬) をインサート内に入れて同様に培養した。培養後は、インサートを回収し、ウェルに残った *S. mutans* MT8148 株を用いた分析を行った。

6) 2-コンパートメントシステムを用いて形成されたラクトバシラス属細菌のバイオフィーム形成量の測定

ラクトバシラス属細菌のバイオフィルム形成量の測定は 2-コンパートメントシステムを用いて行った。24 ウェルプレート各ウェルに、BHI 液体培地に懸濁し対数増殖期になるまで培養した *S. mutans* MT8148 株を 900 μ L ずつ播種し、インサート内に MRS 液体培地で培養したラクトバシラス属細菌を 300 μ L ずつ播種し、嫌気下で、37°C で 18 時間振盪培養を行うことにより、バイオフィルムを形成させた。各ウェルの浮遊菌液を取り除いた後に、各ウェルに 300 μ L の 1% Crystal violet 溶液を加えて 2 時間室温に静置することにより底面に付着した菌体を染色し、蒸留水で 6 回洗浄を行った。その後、95% Ethanol を加えて洗浄し、乾燥後、蒸留水を加えて波長 570 nm における吸光度を測定した。

7) 2-コンパートメントシステムを用いて形成された *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルム構造の観察

バイオフィルム構造の変化の観察を、Koo ら³⁰⁾の方法に準じて行った。*S. mutans* MT8148 株を TH 液体培地にて 37°C、18 時間培養後、遠心分離により菌体を回収した。その後、2.5 mM の Hexidium Iodide (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) により菌体を染色し、0.5% Sucrose 含有化学合成培地 (CDM; 58 mM K_2HPO_4 ,

15mM KH₂PO₄, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 35 mM NaCl, 0.2% Casamino acids, 100 μM MnCl₂ · 4H₂O (pH7.4), 20 mM Nicotinic acid, 50 mM Pyridoxine HCl, 5 mM Pantothenic acid, 0.5 mM Riboflavin, 0.15 mM Thiamin HCl, 0.015 mM D-biotin, 50 mM L-glutamic acid, 12.5 mM L-arginine HCl, 16.25 mM L-cysteine HCl, 1.25 mM L-tryptophan, 1 M MgSO₄ · 7H₂O) にて, 菌液を波長 600 nm が 0.1 になるように調整した。この菌液を 24 ウェルプレート内の各ウェルに 800 μL ずつ播種し, セルカルチャーインサート内に MRS 液体培地で培養したラクトバシラス属細菌を播種した 2-コンパートメントシステムを用いて, 嫌気下で, 37℃で 18 時間振盪培養を行った。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 LSM 510 (Version 4.2, Carl Zeiss MicroImaging Co.) にて観察し, ImageJ (Version 10.2, Bethesda, MD, USA) により, バイオフィルムの性状を検討した。さらに, 形成されたバイオフィルムの密度を ImageJ (Version 10.2) を用いて数値化し評価した。数値化は, バイオフィルム 1 画像につき各 3 箇所を無作為に抽出して行った。

8) 2-コンパートメントシステムを用いて共培養した *S. mutans* MT8148 株の *gtfB*, *gtfC*, および *gtfD* の発現

6 ウェルプレート内の各ウェルに BHI 液体培地で培養した対数増殖期の *S. mutans* MT8148 株を 4.5 mL ずつ播種し、セルカルチャーインサート内に MRS 液体培地で培養した対数増殖期のラクトバシラス属細菌を 2.5 mL ずつ播種した 2-コンパートメントシステムを用いて、嫌気下で、37°C で 18 時間振盪培養を行うことにより、バイオフィルムを形成させた。各ウェルの培養液を、5,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心し、菌体を回収した。ウェルの底面に付着した菌体もセルスクレーパーS (住友ベークライト株式会社, 東京) で剥ぎ取ることにより回収した。Cury ら³¹⁾の方法に準じて、このバイオフィルム中の菌体から全 RNA を抽出した。まず菌体を 300 μ L の UltraPure™ Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水 (Invitrogen) に懸濁し、Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) に菌液を移した。そして、TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 900 μ L 添加した後、FastPrep (Bio-Rad) を用いて菌体を破碎した。破碎菌体を含む懸濁液を遠心し、500 μ L の Chloroform を混和させた後、水層中の全 RNA を 300 μ L の Isopropyl alcohol を用いて沈殿させた。その後、得られた沈殿を 75% Ethanol にて洗浄して乾燥後、20 μ L の DEPC 処理水に溶解させた。次に、回収した全 RNA から染色体 DNA を除去するため、RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) を 37°C で 30 分

間反応させた。Random hexamer primers (Promega) および SuperScriptIII (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。作製した cDNA を鋳型として、各遺伝子の発現を SYBR green (Bio-Rad) を用いた real-time reverse transcription-PCR (real-time RT-PCR) 法により調べた。遺伝子増幅反応ならびに蛍光強度の測定には iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) を使用した。RT-PCR の条件は添付の指示書に従い設定した。*gtfB*, *gtfC*, および *gtfD* の増幅には、表 3 に示す GTFB-F, GTFB-R, GTFC-F, GTFC-R, GTFD-F および GTFD-R プライマーを用いた。また、内部標準として 16S rDNA の増幅および定量を、表 3 に示す *Lactobacillus* 16s-F および *Lactobacillus* 16s-R プライマーを用いて行った。

9) 統計処理

実験は独立して各 3 回行い、得られた結果は平均 \pm 標準偏差で示し、統計学的有意差の検定は Fisher's PLSD を用いて行った。

結果

1) 検出されたラクトバシラス属細菌の同定

齶蝕部位より採取されたすべてのプラークからラクトバシラス属細菌が分離された。一方、健全部位より採取されたプラークからは、被験者 10 人中 3 人の患児からのみラクトバシラス属細菌が分離された。齶蝕および健全の両部位から検出されたラクトバシラス属細菌のうち最も検出頻度の高かったのは *L. salivarius* であり、*L. rhamnosus* および *L. gasseri* がそれに続いた。齶蝕部位からのみ検出されたものでは *L. salivarius* が最も検出頻度が高く、続いて *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* の順であった。一方、健全部位からのみ検出されたものは *Lactobacillus acidophilus* のみであった (表 2)。

以降の実験においては、齶蝕部位から検出されたラクトバシラス属細菌の代表として *L. rhamnosus* ST1 株, *L. rhamnosus* ST2 株, *L. salivarius* ST3 株, *L. gasseri* ST1 株, *L. fermentum* ST1 株および *L. plantarum* ST1 株を実験に供試した。また、健全部位から検出されたラクトバシラス属細菌の代表として *L. rhamnosus* ST3 株を実験に供試した (表 1)。

2) スクロース依存性平滑面付着能

齧蝕部位から分離されたラクトバシラス属細菌の中で、今回供試したすべての菌株のスクロース依存性平滑面付着能は、*S. mutans* MT8148 株と比較して低かった (図 2)。しかしながら、ラクトバシラス属細菌においても付着能が認められ、その中では *L. fermentum* ST1 株が最も高い付着能を示し、続いて *L. salivarius* ST3 株、*L. plantarum* ST1 株の順に付着能が高かった (図 2)。また、齧蝕部位および健全部位から分離された *L. rhamnosus* 株のスクロース依存性平滑面付着能の比較を行ったところ、齧蝕部位から検出された *L. rhamnosus* ST2 株は、健全部位から検出された *L. rhamnosus* ST3 株と比較して、有意に高い付着能を示した (図 3)。

3) バイオフィルム形成量

各供試菌のバイオフィルム形成量を測定したところ、齧蝕部位から分離されたすべてのラクトバシラス属細菌は、*S. mutans* MT8148 株より低いバイオフィルム形成能を示した (図 4)。しかしながら、ラクトバシラス属細菌においてもバイオフィルムの形成が認められ、その中でスクロース依存性平滑面付着能が最も高かった *L. fermentum* ST1 株が、最も高いバイオフィルム形成量を示した (図 4)。ま

た、齧蝕部位および健全部位から分離された *L. rhamnosus* 株のバイオフィルム形成能を比較したところ、齧蝕部位から検出された *L. rhamnosus* ST2 株は、健全部位から検出された *L. rhamnosus* ST3 株と比較して、有意に高いバイオフィルム形成能を示した (図 5)。

4) 2-コンパートメントシステムを用いて形成されたラクトバシラス属細菌のバイオフィルム形成能

ラクトバシラス属細菌と *S. mutans* MT8148 株を共培養した場合、単独の場合よりもバイオフィルム形成能が上昇した。ラクトバシラス属細菌をウェルで、*S. mutans* MT8148 株をインサートで培養した場合、すべてのラクトバシラスにおいて単独培養の場合よりも有意に高いバイオフィルム形成能を認めた。また *S. mutans* MT8148 株をウェルで、ラクトバシラス属細菌をインサートで培養した場合においても、バイオフィルム形成能が上昇し、特に *L. rhamnosus* ST2 株、*L. salivarius* ST3 株、*L. fermentum* ST1 株、および *L. plantarum* ST1 株において有意に高いバイオフィルム形成能を認めた(図 6)。

5) 2-コンパートメントシステムを用いて形成された *S. mutans* MT8148 株のバ

イオフィルムの構造

形成されたバイオフィルムの構造を共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察したところ、*S. mutans* MT8148 株単独培養の場合では、菌が底面に均一に付着しており、緊密なバイオフィルムの形成が認められた。一方、*S. mutans* MT8148 株をウェルで、*L. gasseri* ST1 株、*L. fermentum* ST1 株、*L. plantarum* ST1 株、*L. salivarius* ST3 株、および *L. rhamnosus* ST2 株の各ラクトバシラス属細菌をインサート内で共培養した場合、バイオフィルム内に細菌の凝集塊が多く認められ、バイオフィルムの密度が上昇した (図 7)。

6) 2-コンパートメントシステムを用いて形成された *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルムの密度

ラクトバシラス属細菌をウェルで、*S. mutans* MT8148 株をインサート内で培養した 2-コンパートメントシステムを用いた場合、単独培養の場合と比較して、全てのラクトバシラス属細菌でバイオフィルムの密度が有意に上昇し、緊密なバイオフィルムが形成された (図 8)。

7) *S. mutans* MT8148 株の *gtfB*, *gtfC*, および *gtfD* の発現解析

S. mutans MT8148 株 *gtfB* の発現は *L. gasseri* ST1 株と共培養した場合に発現の上昇が認められた。*gtfC* の発現量は *S. mutans* MT8148 株単独の場合と比較して、いずれのラクトバシラス属細菌と共に培養した場合においても、発現の上昇が認められた。特に *L. salivarius* ST3 株と培養した場合に、最も高い発現量を示した。*gtfD* の発現量も、同様にいずれのラクトバシラス属細菌と共に培養した場合においても、発現の上昇が認められた (図 9)。

考察

ラクトバシラス属細菌は、グラム陽性桿菌で、カタラーゼ活性陰性の芽胞非形成菌であり、食品、野菜、発酵食品などに含まれている³²⁾。ラクトバシラス属細菌は、糖質を代謝することにより乳酸に代表される各種の酸産生能を有する³³⁾。

齲蝕の発生はエナメル質に *S. mutans* をはじめとする口腔レンサ球菌が付着することで開始するが、ラクトバシラス属細菌は歯面への付着能が低いため、この付着期にはほぼ検出されない一方、齲窩が形成されバイオフィルムが耐酸性を増して成熟する時期においては多く検出されることが報告されている³⁴⁾。また、酸性環境下における細胞生存率が *S. mutans* と同等であり、低い pH 下においても自身の性状を維持することができる³⁵⁾。これらの性質から、ラクトバシラス属細菌は齲蝕の開始よりも象牙質における齲蝕の進行に、より深く関与していることが考えられる。

本研究において、ラクトバシラス属細菌のスクロース依存性平滑面付着能は *S. mutans* MT8148 株と比較して低かった一方で、ラクトバシラス属細菌においてもバイオフィルム形成能を認めたことから、口腔内においてはラクトバシラス属細菌はバイオフィルムの形成初期よりも成熟期において大きな影響を持つこと

が示唆された。

また、本研究においては供試した各ラクトバシラス属細菌単独でのバイオフィルム形成能は、*S. mutans* MT8148 株と比較して低いことが示された。これらの結果は、*S. mutans* ATCC25175 株と *L. salivarius* K35 株、*L. salivarius* K43 株、および *L. rhamnosus* GG 株の 3 菌株のバイオフィルム形成能を比較した Wu ら¹⁸⁾ の報告と一致する。彼らは *L. salivarius* の 2 菌株では *S. mutans* の約 10% 程度のバイオフィルム形成能を認め、また *L. rhamnosus* GG 株では *S. mutans* の約 35% 程度のバイオフィルム形成能を認めたことを報告している。

口腔バイオフィルムは、これまで、*S. mutans* あるいは *Candida albicans* を始めとする複数の病原性の強い細菌あるいは真菌が細胞間情報伝達を行うことでその構造が複雑化し、化学物質に対する耐性を持つことで宿主環境において生存し続け、病原性を持つと報告されてきた³⁵⁾。自然界や人体においては、単一の細菌種のみがひとつの空間に定住していることはほぼなく、多種の細菌種が共存していることが一般的である。齲蝕患者の口腔内のバイオフィルムも同様に多種の菌によって構成されており、好気性菌である *Neisseria* 属、*Nocardia* 属、通性嫌気性菌である *Streptococcus* 属、*Actinomyces* 属、*Lactobacillus* 属、偏性嫌気性菌である

Fusobacterium 属, *Veillonella* 属 などの異なる病原性をもつ細菌が定着, 凝集し相互作用を行っている³⁶⁾。

近年, 口腔バイオフィルムにおける, 異なる細菌種同士の相互作用としてクオラムセンシング機構が研究されている。これは, 菌体から分泌されたオートインデューサーと呼ばれる物質を通したシグナル伝達を行い, 同じ細菌種あるいは異なる細菌種が影響を及ぼし合う現象のことである³⁷⁾。*S. mutans* は autoinducer (AI)-2 を産生・分泌し, AI-2 によって他の細菌の遺伝子発現を調節することにより細胞形態やバイオフィルム形成能などを制御していることが知られている³⁸⁾。そして, AI-2 の合成を制御する遺伝子のひとつである *luxS* は *S. mutans* を始めとしたグラム陽性細菌のクオラムセンシング機構に関与することが報告されている³⁹⁾。*S. mutans* においては, 野生株の *S. mutans* が均一なバイオフィルムを形成するのに対し, 本遺伝子を欠失した変異株は薄く粗造なバイオフィルムを形成し, さらにバイオフィルム内の菌体の増殖が抑制されたことから, *luxS* がバイオフィルム形成に関与している可能性が示唆された⁴⁰⁾。一方, グラム陰性細菌である *Pseudomonas aeruginosa* においては, アシルホモセリンラクトン型の AI がシグナル伝達を促進し, 菌の病原性因子に関する遺伝子の発現が制御されることが報告

されている⁴¹⁾。ラクトバシラス属細菌においても、消化管上皮におけるオートインデューサーの存在が報告されており、*L. acidophilus* NCFM 株が AI-2 を分泌することで、消化管における他の複数の病原性細菌の DNA 生合成や毒素産生能を制御することで、消化管の免疫系の保持に寄与している⁴²⁾。また、ラクトバシラス属細菌では、*L. acidophilus* NCFM 株、*L. acidophilus* ATCC11842 株、*L. delbrueckii* NCC533 株、*L. johnsonii* ATCC 33323 株、*L. gasseri* F275 株、*L. reuteri* 100-23 株および、*L. reuteri* ATCC 25745 株において、*luxS* の塩基配列の高い相同性 (88~96%) が認められており、口腔内に存在するラクトバシラス属細菌種においてもオートインデューサーが機能していることが推測されている⁴³⁾。

本研究において、*S. mutans* MT8148 株単独で培養した場合と比較して、2-コンパートメントシステムを利用してラクトバシラス属細菌を共培養させることにより、*S. mutans* MT8148 株のバイオフィルム形成能が上昇しその構造が密になった。特に *S. mutans* MT8148 株に *L. gasseri* ST1 株や *L. salivarius* ST3 株を作用させた場合、表層タンパクである GTF をコードする *gtf* の発現レベルが上昇していた。これらの結果より、ラクトバシラス属細菌の存在が *S. mutans* MT8148 株の表層タンパクの発現に影響していることが示唆された。さらに、本研究では 2-コンパー

トメントシステムを用いているため、2 菌株間では直接的な細胞接触による作用は無いと考えられ、オートインデューサーを含む液性因子を介してラクトバシラス属細菌の存在が *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルムの構造に大きな影響を与えている可能性が示唆された。しかし、ラクトバシラス属細菌あるいは *S. mutans* MT8148 株が口腔内で産生するオートインデューサーの種類や動態については今回の実験では明らかにされていない。ラクトバシラス属細菌の齲蝕病原性ならびに *S. mutans* のバイオフィルム形成に影響を与える因子について今後のさらなる検討が必要である。

結論

本研究より、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ルム形成能があることが明らかになった。また、今回供試した分離株においては齲蝕部位から分離されたラクトバシラス属細菌の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は、健全部位分離菌と比較して有意に高いことが示された。さらに、ラクトバシラス属細菌の存在により *S. mutans* MT8148 株 のバイオフィルム形成能が上昇するとともに *S. mutans* MT8148 株が形成するバイオフィルムの構造が変化することが示された。これらの現象にはラクトバシラス属細菌が産生する液性因子が関与している可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の仲野道代教授に心から感謝致します。また、様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の諸先生、ならびに大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室の諸先生に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Anne, C. R. Tanner., Wa-Han Yu, Lakshmanan, A. and Wade, G. W.: The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* ,**192**, 5002–5017, 2010.
- 2) Hamada, S. and Slade, H. D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, **44**, 331-384, 1980.
- 3) Sung-Hoon, L. and Young-Jae, K.: A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Arch. Microbiol.* ,**196**, 601-609, 2014.
- 4) Kuramitsu, H. K.: Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **4**, 159-176, 1993.
- 5) Schilling, K. M. and Bowen, W. H.: Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **60**, 284–295,1992.
- 6) Soransky, S. S. and Haffajee, A. D.: Dental biofilms: difficult therapeutic targets.

Periodontology., **28**, 12-55, 2002.

- 7) Okahashi, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Hamada, S. and Koga, T.: Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype *c* *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. *Mol. Microbiol.*, **3**, 673-678, 1989.
- 8) Banas, J. A. and Vickerman, M. M.: Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **14**, 89-99, 2003.
- 9) Fukushima, K., Ikeda, T. and Kuramitsu, H. K.: Expression of *Streptococcus mutans* *gtf* genes in *Streptococcus milleri*. *Infect. Immun.*, **60**, 2815-2822, 1992.
- 10) Mukasa, H., Shimamura, A., and Tsumori, H.: Purification and characterization of basic glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* serotype *c*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **719**, 81-89, 1982.
- 11) Banas, J. A., Russell, R. R. B. and Ferretti, J. J.: Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect. Immun.*, **58**, 667-673, 1990.

- 12) Matsumoto, M., Fujita, K. and Ooshima, T.: Binding of glucan-binding protein C to GTFD-synthesized soluble glucan in sucrose-dependent adhesion of *Streptococcus mutans*. *Oral. Microbiol. Immunol.*, **21**, 42-46, 2006.
- 13) Shah, D. S. H. and Russell, R. R. B.: A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. *Microbiology.*, **150**, 1947-1956, 2004.
- 14) Wickstrom, C., Chavez de Paz L., Davies J. R. and Svensater, G.: Surface-associated MUC5B mucins promote protease activity in *Lactobacillus fermentum* biofilms. *BMC Oral Health.*, **13**, 43, 2013.
- 15) Colloca, M. E., Ahumada, M. C., Lopez, M. E. and Nader- Macias, M. E.: Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects. *Oral. Dis.*, **6**, 227–233, 2000
- 16) Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M. and Raffatellu, M.: Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.*, **3**, a010074, 2013.
- 17) Jeong, J. J., Kim, K. A., Jang, S. E., Woo, J. Y., Han, M. J. and Kim, D. H.: Orally administrated *Lactobacillus pentosus var. plantarum* C29 ameliorates age-dependent

- colitis by inhibiting the nuclear factor-kappa B signaling pathway via the regulation of lipopolysaccharide production by gut microbiota. *PLoS One.*, **12**, e0142521, 2015.
- 18) Wu, C. C., Lin, C. T., Wu, C.Y., Peng, W. S., Lee, M. J. and Tsai, Y. C.: Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol. Oral. Microbiol.*, **30** , 16–26, 2015.
- 19) Testa, M. M., ruiz de Valladares, R. and Benito de Cardenas, Il.: Antagonistic interactions among *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* with oral lactobacilli. *Res. Microbiol.*, **154**, 669–675, 2003.
- 20) Staab, B., Eick, S., Knofler, G. and Jentsch, H.: The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J. Clin. Periodontal.*, **36**, 850-856, 2009.
- 21) Tanzer, J. M., Thompson, A., Lang. C., Cooper, B., Hareng, L. and Gamer, A.: Caries inhibition by and safety of *Lactobaicllus paracasei* DSMZ16671. *J. Dent. Res.*, **89**, 921-926, 2010.
- 22) Fitzgerald, R. J., Fitzgerald, D. B., Adams, B. O. and Duany, L. F.: Cariogenicity of human oral lactobacilli in hamsters. *J. Dent. Res.*, **59**, 832-837, 1980.

- 23) Seow, W. K.: Biological mechanisms of early childhood caries. *Oral. Epidemiol.*, **26**, 8-27, 1998.
- 24) Teanpaisan, R., Thitasomakul, S., Piwat, S., Thearmontree, A., Pithpornchaiyalul, W. and Chankanka, O.: Longitudinal study of the presence of mutans streptococci and lactobacilli in relation to dental caies development in 3-24 month old Thai children. *Int. Dent. J.*, **57**, 445-451, 2007.
- 25) Marchant, S., Brailsford, S. R., Twomey, A. C., Roberts, G. J. and Beighton, D.: The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res.*, **35**, 397-406, 2001.
- 26) Matsumoto, M., Tsuji, M., Sasaki, H., Fujita, K., Nomura, R. and Nakano, K.: Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rats. *Caries Res.*, **39**, 479-483, 2005.
- 27) Ooshima, T., Izumitani, A., Sobue, S. and Hamada, S.: Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **36**, 219-223, 1983.
- 28) Shimada, A., Noda, M., Matoba, Y., Kumagai, T., Kozai, K. and Sugiyama, M.: Oral lactic acid bacteria related to the occurrence and/ or progression of dental caries in Japanese preschool children. *Biosci. Microbiota. Food. Health.*, **34**, 29-36, 2015.

- 29) Hamada, S., Torii, M., Kotani, S. and Tsuchitani, Y.: Adherence of *Streptococcus sanguinis* clinical isolates to smooth surfaces and interaction of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Infect. Immun.*, **32**, 364-372, 1981.
- 30) Koo, H., Xiao, J., Klein, M. I. and Jeon, J. G.: Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J. Bacteriol.*, **192**, 3024–3032, 2010.
- 31) Cury, J. A. and Koo, H.: Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. *Anal Biochem.*, **365**, 208-214, 2007.
- 32) McDarland, L. V.: Normal Flora: diversity and functions. *Microb. Ecol. Health. Dis.*, **12**, 193-207, 2000.
- 33) Takahashi, N. and Nyvad, B.: The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J. Dent. Res.*, **90**, 294-303, 2011.
- 34) Walter, J. L.: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, **50**, 353-380, 1986.
- 35) Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P.: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.*, **284**, 1318-1322, 1999.

- 36) Elias, S. and Ehud, B.: Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.*, **36**, 990-1004, 2012.
- 37) Ng, W. L. and Bassler, B. L.: Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 197-222, 2009.
- 38) Sztajer, H., Lemme, A., Vilchez, R., Schulz, S., Geffers, R., Yip, C., Levesque, C.M. and Cvitkovitch, D. G.: Autoinducer-2 regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the *luxS* mutation. *J. Bacteriol.*, **190**, 401–415, 2008.
- 39) Meritt, J., Qi, Fengxia., Goodman, S. D., Anderson, M. H. and Shi, W.: Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **71**, 1972-1979, 2003.
- 40) Yoshida, A., Ansai, T. Takehara, T. and Kuramitsu, K.: LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2372-2380, 2005.
- 41) Li, H., Li, X., Wang, Z., Fu, Y., Ai, Q., Dong, Y. and Yu, J.: Autoinducer-2 regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation and virulence production in a

- dose-dependent manner. *BMC Microbiology.*, **15**, 192, 2015.
- 42) Yeo, S., Park, H., Ji, Y., Park, S., Yang, J., Lee, J., Mathara, J. M., Shin, H. and Holzapfel, W.: Influence of gastrointestinal stress on autoinducer-2 activity of two *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **91**, 708-718, 2015.
- 43) Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A. and Klaenhammer, T. R.: Role of autoinducer-2 on the adhesion of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 269-279, 2009.
- 44) Inagaki, S., Fujita, K., Takashima, Y., Nagayama, K., Ardin, A. C., Matsumi, Y and Matsumoto-Nakano, M.; Regulation of recombination between *gtfB/gtfC* genes in *Streptococcus mutans* by recombinase A *Sci. World J.*, **10**, 1155, 2013.
- 45) Matsumi, Y., Fujita, K., Takashima, Y., Yanagida, K., Morikawa, Y. and Matsumoto-Nakano, M.: Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral. Microbiol.*, **30** , 217–226, 2015.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 小児歯科学分野

(指導：仲野道代教授)

図の説明

図 1. 2-コンパートメントシステム

24 穴ウェル付プレートあるいは 6 穴ウェル付プレートと各々に該当するセルカルチャーインサートを用いて 2-コンパートメントシステムを用いた分析を行った。セルカルチャーインサートの底面に 0.4 μm 径のメンブレンが存在することにより、インサートとウェルの間で物質が透過する。*S. mutans* MT8148 株をコンパニオンプレートに、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。また、ラクトバシラス属細菌をコンパニオンプレートに、*S. mutans* MT8148 株をインサートに播種した場合も同様に培養した。

図 2. *S. mutans* MT8148 株および各ラクトバシラス属細菌のスクロース依存性平滑面付着能

S. mutans MT8148 株と各ラクトバシラス属細菌との間で有意差検定を行った (Fisher's PLSD 検定 ** $P < 0.001$)。

図 3. 齧蝕部位より分離された *L. rhamnosus* ST2 株および健全部位より分離された *L. rhamnosus* ST3 株のスクロース依存性平滑面付着能

L. rhamnosus ST2 株および *L. rhamnosus* ST3 株との間で有意差検定を行った (Fisher's PLSD 検定 ** $P < 0.001$)。

図 4. *S. mutans* MT8148 株および各ラクトバシラス属細菌のバイオフィルム形成量

S. mutans MT8148 株と各ラクトバシラス属細菌との間で有意差検定を行った (Fisher's PLSD 検定 ** $P < 0.001$)。

図 5. 齧蝕部位より分離された *L. rhamnosus* ST2 株および健全部位より分離された *L. rhamnosus* ST3 株のバイオフィルム形成能

L. rhamnosus ST2 株および *L. rhamnosus* ST3 株との間で有意差検定を行った (Fisher's PLSD 検定 * $P < 0.01$)。

図6. 2-コンパートメントシステムを用いて形成された *S. mutans* MT8148 株およびラクトバシラス属細菌のバイオフィルム形成量

(A) *S. mutans* MT8148 株あるいはラクトバシラス属細菌のみを培養した場合, (B) ラクトバシラス属細菌をウェルで *S. mutans*_MT8148 株をインサートで培養した場合, および(C) *S. mutans* MT8148 株をウェルでラクトバシラス属細菌をインサートで培養した場合との間で有意差検定を行った (Fisher's PLSD 検定 * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$)。

図7. 2-コンパートメントシステムを用いて形成された *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルム構造

(a) *S. mutans* MT8148 株をウェルで, インサートには PBS を入れて培養, (b) *S. mutans* MT8148 株をウェルで, *L. rhamnosus* ST2 株をインサートで培養, (c) *S. mutans* MT8148 株をウェルで, *L. salivarius* ST3 株をインサートで培養, (d) *S. mutans* MT8148 株をウェルで, *L. gasseri* ST1 株をインサートで培養, (e) *S. mutans* MT8148 株をウェルで, *L. fermentum* ST1 株をインサートで培養, (f) *S. mutans* MT8148 株をウェルで, *L. plantarum* ST1 株をインサートで培養。

図 8. 2-コンパートメントシステムを用いて形成された *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルム構造の比較

共焦点レーザー顕微鏡により得られた画像からバイオフィルムの密度を ImageJ を用いて数値化した。*S. mutans* MT8148 株のみでバイオフィルムを形成させた場合と各ラクトバシラス属細菌の存在下で *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルムを形成させた場合との間で有意差検定を行った (Fisher's PLSD 検定 ** $P < 0.001$)。

図9. 2-コンパートメントシステムを用いて形成された *S. mutans* MT8148 株の *gtfB*, *gtfC* および *gtfD* の発現

S. mutans MT8148 株の発現量を 1 とした相対値で示す。*S. mutans* MT8148 株のみでバイオフィルムを形成させた場合と各ラクトバシラス属細菌の存在下で *S. mutans* MT8148 株のバイオフィルムを形成させた場合との間で有意差検定を行った (Fisher's PLSD 検定 * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$)。

