

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463270

研究課題名(和文)動物種比較によるミュータンスレンサ球菌のヒト口腔定着因子の解明

研究課題名(英文)Studies on the adherence factors of mutans streptococci to human oral cavity by comparative investigation among primates

研究代表者

今井 奨 (Imai, Susumu)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：80072958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕細菌ミュータンスレンサ球菌のヒト口腔定着因子について、ヒトを含む動物間比較によって解析した。人工口腔装置による検討で、チンパンジー由来*S. troglodytae*と*S. dentirosetti*はスクロース存在下でヒト由来*S. mutans*、*S. sobrinus*同様、エナメル歯片上にバイオフィルムを形成し、バイオフィルム直下のpHを低下させ、エナメル歯片を脱灰した。両菌のグルカン合成酵素(GTF)遺伝子の系統解析の結果、*S. troglodytae*と*S. dentirosetti*は、それぞれ*S. mutans*、*S. sobrinus*と類似した定着因子のGTFを有することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Adherence factors of cariogenic bacteria, mutans streptococci, to human oral cavity were investigated by comparison among animals including humans. *Streptococcus troglodytae* and *Streptococcus dentirosetti* derived from chimpanzee formed biofilm on enamel slabs, decreased pH values underneath the biofilm and demineralized enamel like *S. mutans* and *S. sobrinus* from humans suggesting that both strains might be cariogenic. Phylogenetic analysis of glucosyltransferase (GTF) genes of *S. troglodytae* and *S. dentirosetti* showed that both strains possessed GTF genes as adherence factors similar to *S. mutans* and *S. sobrinus*, respectively.

研究分野：口腔細菌学、口腔生化学

 キーワード：ミュータンスレンサ球菌 バイオフィルム *S. mutans* *S. sobrinus* *S. troglodyte* *S. dentirosetti* う蝕 グルコシルトランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

染色体の配列がヒトに近いチンパンジーには、ヒトとは異なるミュータンスレンサ球菌が定着している。これまで申請者らはチンパンジーの口腔から新菌種 (*Streptococcus troglodytae*)¹⁾やヒトには存在しない *Streptococcus dentirosetti* の分離に成功した。ミュータンスレンサ球菌のう蝕原性は単一の因子によって決定されるのではなく、複数の因子によって惹起されることが知られている²⁾。(1) 菌体内への糖質の輸送・代謝・酸産生、(2) スクロースおよびグルコシルトランフェラーゼに依存したグルカン合成・バイオフィーム形成、(3) 耐酸性機構などである。

一方、ミュータンスレンサ球菌はヒトのみならずラット、ハムスター、コウモリ、ブタ、サルなど種々の哺乳類の口腔より分離されている。そこで、ヒトを含む動物間比較によって、唾液内およびミュータンスレンサ球菌のもつヒト口腔定着因子を解明することは重要である。

2. 研究の目的

細菌がヒト口腔に定着し、常在菌化するためには口腔定着因子との特異的な結合が必要である。ミュータンスレンサ球菌の早期定着・感染を防ぐことは小児う蝕の発症防止に大きく貢献する。ミュータンスレンサ球菌の口腔への定着には、砂糖に依存する系と砂糖に依存しない系の2種類がある。ミュータンスレンサ球菌の菌種や比率は動物種によって異なる点に着目し、唾液内およびミュータンスレンサ球菌のもつヒト口腔定着因子をヒトを含む動物間比較によって解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用ミュータンスレンサ球菌株

ヒト由来ミュータンスレンサ球菌7株、チンパンジー由来2株、コウモリ由来1株を用いた。

(2) ミュータンスレンサ球菌の培養

Trypticase Soy (TS) 培地 (BD 社)、グルコース不含 TS 培地に 0.1%、ないし 1% スクロース添加培地 (TSS 培地) で 37、16 時間静置培養した。

(3) バイオフィーム形成に及ぼす唾液の影響

ヒトの 5 分間刺激唾液を 0.2 μm フィルターで濾過滅菌し、96 穴プレートにコートした。対照にはコートしないプレートを用いた。0.1% TSS 培地 200 μl に 10 種のミュータンスレンサ球菌 (ヒト由来 *Streptococcus mutans* ATCC 25175、*S. mutans* GS5、*S. mutans* LM7、*S. mutans* UA159、*Streptococcus sobrinus* ATCC

33478、*S. sobrinus* 6715、チンパンジー由来 *Streptococcus troglodytae* TKU31、*Streptococcus dentirosetti* TKU32 およびコウモリ由来 *Streptococcus dentirosetti* JCM14596) を播種し、37、16 時間静置培養した。培養後、540nm にて濁度を測定し、10 秒間プレートごと振動させて非付着性のバイオフィームを別のプレートに移した。付着性バイオフィームの残ったウェルを 200 μl のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、200 μl の PBS を加えて 540nm にて濁度を測定した (Adherent fraction)。非付着性の培養液も 540nm にて濁度を測定した (Non-adherent fraction)。

(4) 人工口腔装置によるバイオフィーム形成能、エナメル質脱灰能の検討

チンパンジー由来 *S. troglodytae* TKU31、*S. dentirosetti* TKU32 がヒト由来のミュータンスレンサ球菌のように、エナメル歯片にバイオフィームを形成し、バイオフィーム直下の pH を低下させ、エナメル質の脱灰を引き起こす能力があるかを調べるために人工口腔装置 (図 1) を用いて検討した。



図 1. 人工口腔装置全体図

本装置はエナメル質表面のバイオフィーム形成量、バイオフィーム直下の pH 値およびエナメル質脱灰度を定量するための装置で、ウォータージャケット付きの 3 個の人工口腔チャンバー、送液ポンプ、レコーダー、温水循環装置から成る。人工口腔チャンバーの下部から逆さに固定した平面電極をセットし、上部からは培地、細菌懸濁液を供給するチューブをセットした。平面電極の周囲にはアダプターを介してウシ・エナメル歯片を固定した。送液ポンプにより 2.5% TSS 培地、ミュータンスレンサ球菌懸濁液 (OD_{540nm}=1.0) を連続的に滴下した。平面電極上に形成されたバイオフィームの直下の pH はレコーダーに連続的に記録された。

(5) GTF 遺伝子の解析

チンパンジー由来 *S. troglodytae* TKU31、*S. dentirosetti* TKU32 の GTF 遺伝子をヒト由来 *S. mutans*、*S. sobrinus* の GTF 遺伝子と比較するため、コンピュータソフトによる系統樹解析を行った。

4. 研究成果

(1) ガラス管壁へのバイオフィーム形成

S. mutans ATCC 25175, *S. mutans* GS5, *S. mutans* LM7, *S. mutans* UA159, *S. sobrinus* ATCC 33478, *S. sobrinus* 6715, *S. troglodytae* TKU31, *S. dentirosetti* TKU32, および *S. dentirosetti* JCM14596 はいずれも 1% TSS 培地でガラス管壁に強固(4+)なバイオフィームを形成した。

(2) 唾液コート壁へのバイオフィーム形成

S. mutans ATCC 25175, *S. mutans* GS5, *S. mutans* LM7, *S. mutans* UA159, *S. sobrinus* ATCC 33478, *S. sobrinus* 6715, *S. troglodytae* TKU31, *S. dentirosetti* TKU32 について、0.1% TSS 培地で 96 well プレート壁へのバイオフィーム形成を調べた。唾液コートなしの Adherent fraction (図 2)、唾液コートありの Adherent fraction (図 3) を以下に示す。*S. sobrinus* 6715 で唾液コートにより Adherent fraction がわずかに増加の傾向を示したが、いずれの菌株でも唾液コートの影響はみられなかった。

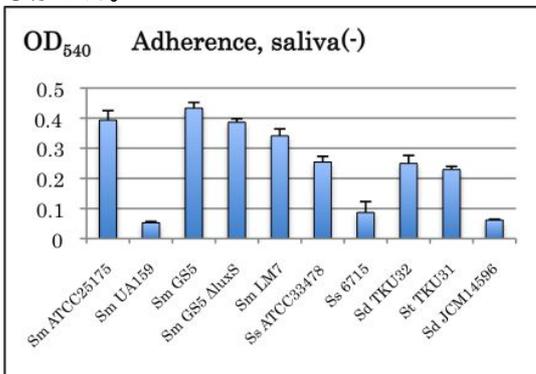


図 2 . 96 well へのバイオフィーム形成 (Adherent fraction、唾液コートなし)

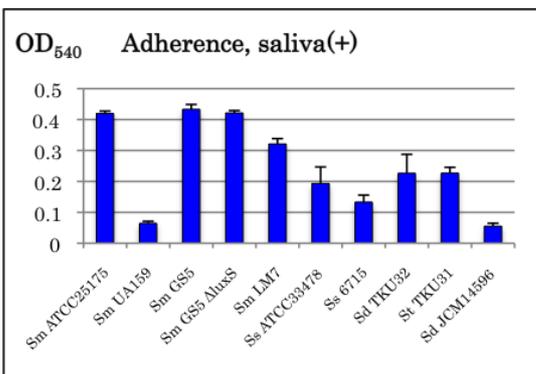


図 3 . 96 well へのバイオフィーム形成 (Adherent fraction、唾液コートあり)

(3) 人工口腔装置によるバイオフィーム形成能、エナメル質脱灰能の検討

チンパンジー由来の *S. troglodytae* TKU31, *S. dentirosetti* TKU32 にヒト由来 *S. mutans*, *S. sobrinus* 同様の管壁への付着性、バイオフィーム形成能が存在することがわかったので、*S. troglodytae*, *S. dentirosetti* いう蝕原性の指標であるエナメル質脱灰性があるかどうかを人工口腔装置を用いて調べた。

図 4 は *S. mutans* ATCC 25175, *S. troglodytae* TKU31, *S. dentirosetti* TKU32 のバイオフィーム直下の pH 曲線を示す。*S. mutans* および *S. dentirosetti* の場合、人工口腔装置稼働 4 時間でバイオフィーム直下 pH が低下し始め、16 時間後にそれぞれ pH4.1 および 4.4 に低下した。*S. troglodytae* の場合は遅れて 12 時間後に pH が下がり始め、24 時間後に pH4.6 まで低下した。

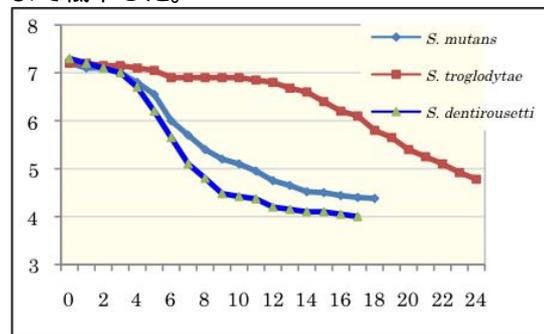


図 4 . バイオフィーム直下の pH 推移 (縦軸 : pH、横軸 : 時間(hour))

図 5 はエナメル歯片上に形成されたバイオフィーム量を菌体量で表している。*S. troglodytae*, *S. dentirosetti* は *S. mutans* よりも多量のバイオフィームを形成した。

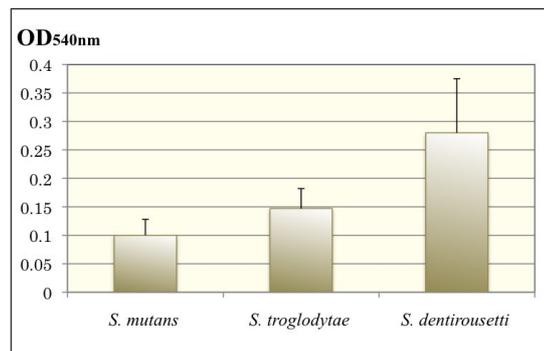


図 5 . エナメル歯片上のバイオフィーム量

図 6 は実験前後のエナメル歯片の硬度差を示している。いずれの場合も明らかなエナメル質脱灰が認められ、*S. troglodytae*, *S. dentirosetti* が蝕原性を有することが示唆された。

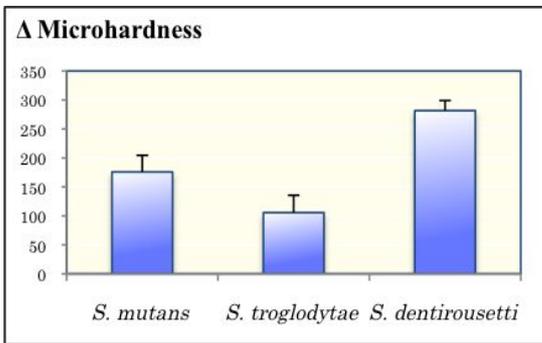


図6 . エナメル歯片の脱灰度

上記人工口腔装置での検討で、*S. troglodytae* のバイオフィーム形成の初期速度が遅く、そのため pH 低下も大幅に遅れた。この現象の理由は分からないが、再現性を確かめるために再度 *S. troglodytae* TKU31、*S. sobrinus* ATCC 33478(1)、*S. sobrinus* ATCC 33478(2)について人工口腔装置で検討した。

S. troglodytae によるエナメル歯片上へのバイオフィーム形成は *S. sobrinus* に比べて大幅に遅れた。バイオフィーム直下の pH が 5.5 に達するまでの時間は、*S. sobrinus* で装置稼働 9 時間後であったのに対して *S. troglodytae* では 30 時間後であった。*S. troglodytae* のバイオフィーム形成遅延に再現性のあることが確認された (図7)。

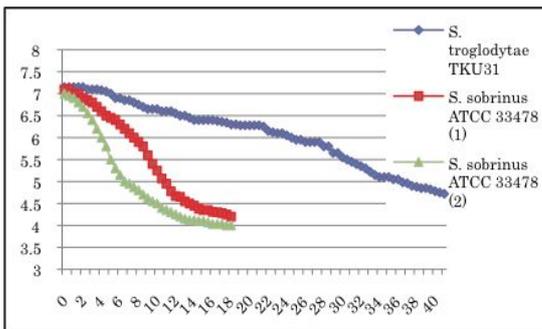


図7. バイオフィーム直下の pH 推移 (縦軸：pH、横軸：時間(hour))

図8はエナメル歯片上に形成されたバイオフィーム量を WIG 量として表している。いずれも顕著なバイオフィーム形成能を示している。

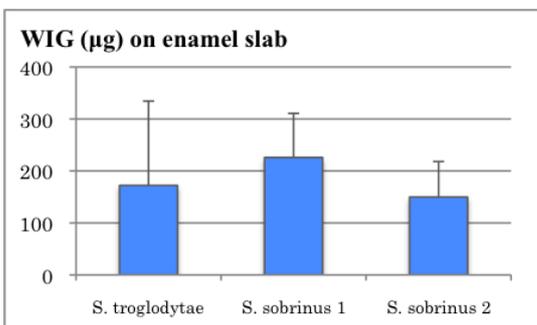


図8 . エナメル歯片上のバイオフィーム量

図9はエナメル歯片の脱灰度を示している。*S. troglodytae*、*S. sobrinus* とともに実験前後のエナメル質硬度の差が大きく、両菌株とも高いエナメル質脱灰能を有することが分かった。*S. troglodytae* によるエナメル歯片の脱灰にも再現性のあることが確認された。

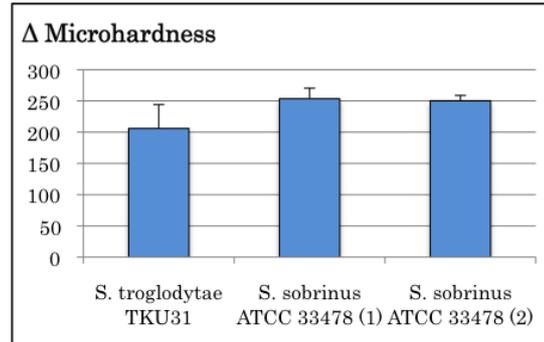


図9 . エナメル歯片の脱灰度

(4) GTF 遺伝子の比較

スクロース存在下での *S. troglodytae* の人工口腔装置におけるエナメル歯片へのバイオフィーム形成能が他のミュータンスレンサ球菌よりも弱い理由は不明であるが、ミュータンスレンサ球菌のバイオフィーム形成に与ることが知られているグルコシルトランスフェラーゼ(GTF)に何らかの違いがあるかを調べるために GTF 遺伝子の系統樹解析を行った (図10)。

その結果、*S. troglodytae* の GTF 遺伝子はヒト由来の *S. mutans* と類似していることがわかった。即ち、*S. troglodytae* は *S. mutans* と同様の GTF-B,C と GTF-D を有しており、系統樹的にもそれぞれ *S. mutans* の GTF-B, C と GTF-D に非常に近かった。

一方、*S. dentirousetti* の GTF 遺伝子は *S. downei*、*S. sobrinus* と類似していることが分かった。即ち、*S. dentirousetti* は GTF-I、GTF-S、GTF-T、GTF-U を有しており、系統樹的にもそれぞれ *S. downei*、*S. sobrinus* の GTF-I、GTF-S、GTF-T、GTF-U に非常に近かった。

以上のように、チンパンジー由来 *S. troglodytae*、*S. dentirousetti* の GTF 遺伝子は、ヒト由来の *S. mutans*、*S. sobrinus* とそれぞれ類似していることが分かった。しかし、人工口腔装置で見られた *S. troglodytae* のバイオフィーム形成遅延の理由は現時点では不明である。ミュータンスレンサ球菌の定着因子の一つである GTF 遺伝子のさらなる詳細な解析によって明らかになるものと思われる。

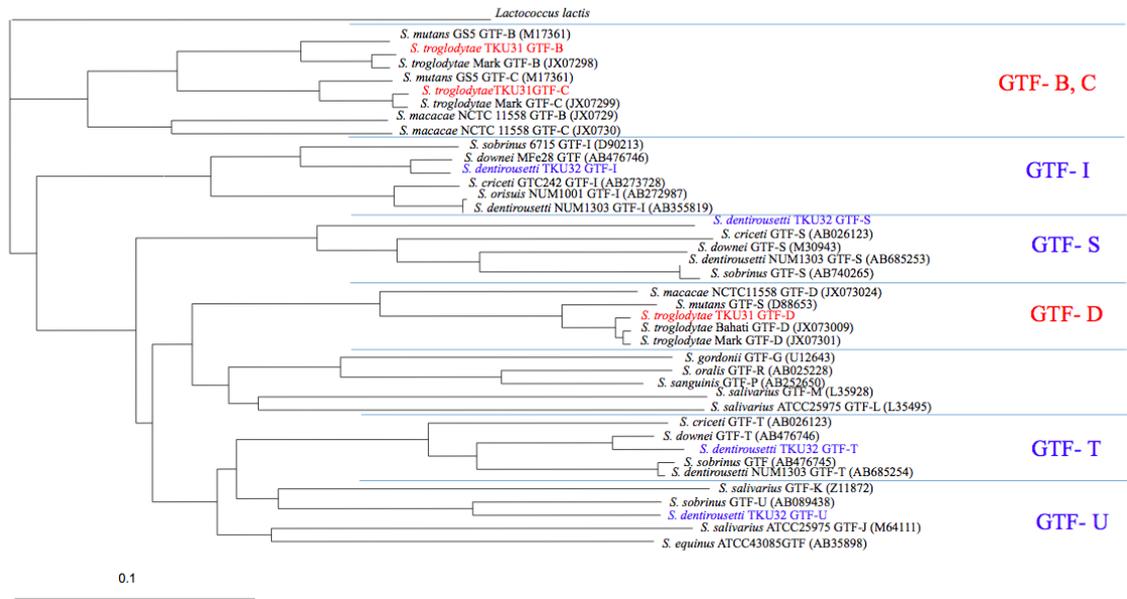


図 10 . GTF 遺伝子の系統樹

< 引用文献 >

- ① Int J Syst Evol Microbiol. Mar 23, 2012.
- ② Loesche WJ, Microbiol Rev 50:353-380, 1986.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Terai T, Okumura T, Imai S, Nakao M, Yamaji K, Ito M, Nagata T, Kaneko K, Miyazaki K, Okada A, Nomura Y, Hanada N. Screening of Probiotic Candidates in Human Oral Bacteria for the Prevention of Dental Disease. PLoS One. 査読有、2015;10: e0128657.doi:10.1371/journal.pone.0128657. eCollection 2015. (3.234)
- ② Kaoru Sogabe-Ashigaki, Susumu Imai, Ayako Okada, Khairul Matin, Tomohiko Terai, Takekazu Okumura, Nobuhiro Hanada, Hiroshi Kawahara. Effects of Lactobacillus crispatus as a candidate for oral probiotic bacteria on Haemophilus influenzae. Asian Pacific Journal of Dentistry 査読有、2015;15:3-11.
- ③ Otsuka R. Imai S, Murata T, Nomura Y, Okamoto M, Tsumori H, Kakuta E, Hanada N, Momoi Y. Application of chimeric glucanase comprising mutanase and dextranase for prevention of dental biofilm formation. Microbiol. Immunol., 査読有、59: 28-36, 2015. DOI 10.1111/1348-0421.12214.
- ④ Miyahara M, Imai S, Okamoto M, Saito W, Nomura Y, Momoi Y, Tomonaga M, Hanada N: Distribution of *Streptococcus troglodytae*

and *Streptococcus dentirousetti* in chimpanzee oral cavities. Microbiol Immunol. 査読有、57(5): 359-365 (2013)

- ⑤ Yoshida E, Imai S, Hanada N. Hayakawa T. Biofilm formation on titanium and hydroxyapatite surface using artificial mouth system. J Hard Tissue Biology 査読有、22(4):417-422 (2013)
- ⑥ Okamoto M, Imai S, Miyahara M, Saito W, Momoi Y, Abo T, Nomura Y, Tomoko Ikawa T, Takumi Ogawa T, Takako Miyabe-Nishiwaki T, Kaneko A, Watanabe A, Shohei Watanabe S, Hayashi M, Masaki Tomonaga M and Nobuhiro Hanada N. *Streptococcus troglodytae* sp. nov., from the chimpanzee oral cavity. Int J Syst and Evol Microbiol., 査読有、63: 418-422, 2013. DOI 10.1099/ijs.0.039388-0

[学会発表] (計 16 件)

Susumu Imai, Ayako Okada, Masaaki Okamoto, Mayu Miyahara, Kazumasa Oota, Yoshiaki Nomura, Yasuko Momoi, Masaki Tomonaga and Nobuhiro Hanada. Biofilm formation and demineralization by mutans streptococci from humans and chimpanzees. the 63rd Annual meeting of JADR, October 30-31, 2015, FUKUOKA INTERNATIONAL CONGRESS CENTER, Fukuoka.

A. Okada, K. Matin, S. Imai, T. Kikuchi and N. Hanada, Cytotoxicity of Reactive Oxygen Species Based Disinfectants on Epithelial Cell, 93rd General Session & Exhibition of the IADR, March 11-14, 2015. Hynes Convention

Center, Boston, USA.

R. OTSUKA, S. IMAI, T. MURATA, Y. NOMURA, M. OKAMOTO, H. TSUMORI, M. MIYANOHARA, A. OKADA, E. KAKUTA, N. HANADA and Y. MOMOI, Application of Chimeric Glucanase of Mutanase and Dextranase for the Prevention of Dental Biofilm Formation. the 62nd Annual meeting of JADR, December 4-5, 2014. KKR HOTEL OSAKA, Osaka.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

今井 奨 (IMAI, Susumu)
鶴見大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号 : 80072958

(2) 分担研究者

花田 信弘 (HANADA, Nobuhiro)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号 : 70180916

(3) 野村 義明 (NOMURA, Yoshiaki)

鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号 : 90350587

(4) 太田 一正 (OOTA, Kazumasa)

東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 30307376