

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 長谷川 泰輔
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第416号
学位授与の日付 平成31年3月25日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Sulfated vizantin causes the detachment of biofilms composed mainly of the genus *Streptococcus* by modulating microbial adhesion
(硫酸化体ビザンチンは *Streptococcus* 属の付着関連遺伝子群の発現を低下することでバイオフィーム構造を減少させる)

論文審査委員 主査 教授 寺尾 豊
副査 教授 野杵 由一郎
副査 教授 大島 勇人

『博士論文の要旨』

【目的】: バイオフィーム制御において、抗菌剤等による化学的コントロール法は、バイオフィーム内への薬剤浸透を遅延したり、バイオフィーム中の細菌を死滅してもバイオフィーム構造を残存させることが報告されている。残存した構造体には細菌が付着し易く、バイオフィームの再形成の足場となる。よって、バイオフィームを丸ごと剥離する制御法の開発が必要である。機能的糖脂質であるビザンチン (Viz-S)を含む培地で形成した *Streptococcus mutans* バイオフィームは、緩衝液の洗浄でバイオフィームの体積が減少することが報告されたが、抗バイオフィーム作用が菌種特異的であるか否かや、その作用機序に関しては未解明である。そこで本研究論文では、細菌叢が異なる *ex vivo* バイオフィームモデルを用いて、Viz-S の抗バイオフィーム効果が細菌叢の相違によって異なるかを検索した。

【方法と結果】

全顎的におおむね歯周炎がない健常者のうち、同意が得られた5名を被験者とした (承認番号 25-R16-08-15)。同意の得られた被験者から無刺激唾液を採取し、実験開始直前に等量を混合した。培地の容量の2%量を試料とした。口腔粘膜に対する為害作用がない Viz-S 濃度を決定するために、ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 に最大 500 μ M の Viz-S を3時間作用させ、細胞生存率を MTT 試験にて評価した。その結果、50 μ M 以下の Viz-S 存在下では細胞生存率の有意な減少はなかった ($p > 0.01$, Dunnett's post-hoc test)。この結果より、以下の実験では 50 μ M の Viz-S を用いた。次に、培養条件が異なる *ex vivo* モデルを用いて、バイオフィームの剥離効果を解析した。6 穴プレートを用いて、0.2%スクロース含有 1/4 濃度 Brain Heart Infusion (BHI)培地に試料を添加し、24 時間培養することで作製したバイオフィームは Cariogenic Biofilm (CB)群とした。他方で、10%ウシ胎児血清含有 1/4 濃度 BHI 培地を用いて作製したバイオフィームは Gingivitis Biofilm (GB)群とした。24 時間後、500rpm で 15 秒間振盪し、残存したバイオフィーム量をクリスタルバイオレット法により定量した。その結果、50 μ M の Viz-S 存在下において、CB 群のバイオフィームの体積は有意に減少したが ($p < 0.05$, 同)、GB 群においては、その体積に変化がなかった ($p > 0.05$, 同)。しかし、振盪時間を1分に延長したところ、GB 群のバイオフィームの体積も有意に減少した ($p < 0.05$, 同)。CB 群のバイオフィームの体積が短時間で減少した原因を解明するために、V1-V2 可変領域を用いた 16s rRNA シーケンス解析を行い、構成細菌属の差異を比較した。その結果、CB 群のバイオフィーム構成細菌は GB 群と比較して多様性が低く、90%以上が *Streptococcus* 属であった。

そこで、CB 群のバイオフィルム中に存在した *Streptococcus* 属のうち、付着への関与が想定される遺伝子の発現動態の変化を解析した。50 μ M の Viz-S 存在下で 4 時間培養後の CB 群のバイオフィルム構成細菌について、遺伝子発現量を real-time PCR 法で解析した。Viz-S を添加せず 4 時間培養した CB 群をコントロール群とした。その結果、50 μ M の Viz-S 存在下では *gtf* 群の発現が有意に減少した。表層タンパク抗原のうち、*Streptococcus mitis* の *cspA* および *Streptococcus gordonii* の *cshA* の発現は有意に減少したが、*S. mutans* および *Streptococcus oralis* の *pac* の発現は有意に増加した ($p < 0.01$, paired t-test)。さらに、50 μ M Viz-S 存在下で形成した GB 群においても、1 分間の振盪でバイオフィルムの体積が有意に減少したことから、菌種非特異的な付着減弱効果の有無について解析を行った。50 μ M の Viz-S を唾液由来細菌に 10 分間作用させた後、表面性状の変化を Microbial Adhesion to Hydrocarbons test により評価した。その結果、菌体表層の疎水性は有意に減少していた。さらに、フローセルシステムを用いて、Viz-S 処理後の唾液由来細菌のヒドロキシアパタイトディスクへの付着抑制効果を解析したところ、コントロール群と比較して付着菌数が有意に減少した ($p < 0.01$, paired t-test)。

【考察】：CB 群においては、*Streptococcus* 属が優位であり、50 μ M の Viz-S 存在下で形成したバイオフィルムは、15 秒の振盪により体積が有意に減少した。この結果は、主に、Viz-S がスクロース依存性の付着に関与する *gtf* 群の遺伝子発現に影響を与えることによるものであると推察された。しかし、歯面への初期付着に深く関与している *pac* の発現は上昇しており、今回解析しなかった細菌付着や凝集に関与する菌体表層タンパクも多数存在するため、作用機序の全容解明に関しては更なる解析が必要である。また、Viz-S は細菌壁に結合し表面性状を親水性に変化させていたことから、菌種非特異的に細菌付着を減弱させた可能性が考えられた。

【結論】

50 μ M 以下の Viz-S は口腔粘膜への為害性が低く、特に、*Streptococcus* 属によるバイオフィルムの初期形成を抑制する新しい制御剤として有用である可能性が示された。

『審査結果の要旨』

平成 31 年 2 月 12 日、学位申請者 長谷川泰輔 氏より提出のあった主論文をもとに、寺尾教授 (9:00-10:00)、と野村平成 31 年 2 月 12 日 (13:00-14:00) は各々 8 事項と 10 項目について試問を実施した。口頭ならびに文書にて、適切かつ十分な回答を得ましたので合格と判定いたしました。また、大島教授は、平成 31 年 2 月 20 日 (13:00-14:00) に諮問を実施し、口頭と書面にて適切な回答を得、合格と判断した。これらより、主論文の成果は、新潟大学博士 (歯学) の学位に相応しいと評価した。

ビザンチンのバイオフィルム制御研究について *Streptococcus mutans* を対象とした *in vitro* 研究論文が 1 編存在する。すなわち、50 μ M の硫酸化ビザンチン存在下で *S. mutans* を 24 時間培養すると、バイオフィルムの形成は抑制されないものの、バイオフィルム構造体が 3 回の洗浄操作により容易に崩壊することを報告している。著者らは、その要因として、*gtfB*、*gtfC* および *gtfD* の転写が変化することで構造安定性が低下するためではないかと考察している。また、バイオフィルムの制御に関する報告ではないが、硫酸化ビザンチンは緑膿菌の増殖を抑制しないが、鞭毛の運動性を低下させるという報告がある。本研究の新規性は、*Streptococcus* 属が優位な *ex vivo* バイオフィルムは、硫酸化ビザンチンに感受性が高く、50 μ M においてバイオフィルム構造が容易に崩壊することを明らかにしたことである。さらに、今回用いた解析手技で、想定しうる 2 つのバイオフィルム制御の機序を示唆したことである。ひとつは、唾液由来細菌の細胞壁に結合し、細菌の表面性状を親水性化する非特異的付着抑制効果によるバイオフィルム制御機序である。他の機序は、デンタルバイオフィルムの初期定着菌群中で優位な *Streptococcus* 属の *gtf* 遺伝子群の転写を抑制する特異的作用による制御機構の可能性である。今後、各種の割合で *S. mutans* と *S. sobrinus* を含む唾液試料を用いた、う蝕に関連性の強い細菌のバイオフィルムを対象とした効果の検証が必要である。従来、バイオフィルムの分散・剥離能を有する物質 (酵素や界面活性剤)

の開発を目指した多くの報告があるが、バイオフィルムへの浸透性に課題があった。他方で、特定細菌が産生する菌体外マトリックス成分をターゲットにした制御剤の開発研究もあるが、その作用機序は特異的でデンタルバイオフィルム制御には不透明性があり、臨床的有用性が示された物質はほぼ皆無である。異なる2つの付着抑制機序の一部解明は、デンタルバイオフィルム制御のターゲットを形成過程のいずれに絞るかを明確にし、臨床応用に向けた製剤化の戦略を検討する上で極めて重要である。硫酸化ビザンチンは、バイオフィルムの初期形成段階において、重要視される *Streptococcus* 属の付着を抑制する製剤として、今後の展開が期待できる。