博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏　　名　鈴木　裕希
学　　位　博　士（歯学）
学位記番号　新大院博（歯）第445号
学位授与の日付　令和2年3月23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　Effect of sub-minimum inhibitory concentration of chlorxihexidine gluconate on development of *in vitro* multi-species biofilms

論文審査委員　主査　教　授　野杁　由一郎
副査　教　授　寺尾　豊
副査　教　授　多部田　康一

『博士論文の要旨』
学位申請者鈴木裕希氏より提出のあった主論文（英文）の要旨（和訳）は、以下の通りである。

【背景および目的】
口腔において洗口液をはじめとする抗菌成分の濃度は、唾液により希釈され時間経過とともに最小発育阻止濃度以下（sub-MIC)となるため、バイオフィルム形成が促進されるという報告が散見される。そこで、う蝕病原細菌である *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* 及び *Actinomyces naeslundii* の 3 菌種から成る複合バイオフィルムモデル(Multi-species Biofilm: MB)を確立し、sub-MIC のグルコン酸クロルヘキシジン(CHG)を作用させた際の MB に及ぼす影響(*S. mutans* の局在と、MB 形成関連やクオラムセンシング関連遺伝子の発現量の変化)について検討した。
S. mutans は UA159 株と緑色蛍光タンパク発現株 (ZsGreen 株; 筑波大学 野村暢彦博士より分与) の 2 種類を用いた。*S. oralis* は ATCC35037 株を、*A. naeslundii* は ATCC12104 株を用いた。

【方法と結果】
Tryptone-yeast extract(TYE)培地にて培養し調製した菌液(OD_{600}=0.6)を 1:1:10^3 [*S. mutans*: *S. oralis*: *A. naeslundii*] の割合で混合した。調整した菌液を Calgary Biofilm Device に 200µl 分注し、12 時間嫌気培養 (N_2: CO_2: O_2=85: 10: 5%) し初期付着させたのち、0.05% sucrose 含有 TYE 培地に移し 4 日間嫌気培養し MB を形成した。培地は 12 時間毎に交換した。4 日後、sub-MIC (0.06µg/ml, 0.24µg/ml) の CHG 添加 TYE 液体培地 (0.05% sucrose 含有) 中に 2 日間作用させた。CHG 非添加 TYE 液体培地中に 2 日間作用させたものをコントロール群とした。
MB 形態は、走査型電子顕微鏡(SEM)及び Calcein-AM と Rhodamine-B で蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)で観察した。*S. mutans* (ZsGreen 株) の MB 中での局在は、凍結切片断層像を CLSM で解析した。MB の細菌の生死の割合は、Live/Dead 染色後、CLSM 観察と生菌数のコロニーカウント法で評価した。MB 中の各細菌の構成比は定量 PCR 法により算出した。さらに、*S. mutans* の MB 形成関連遺伝子の発現動態を解析するため、Direct-zol RNA MiniPrep Kit (ZY-MO RESEARCH 社製)を用いて mRNA を抽出後、逆して cDNA を作製した。次いで、16S rRNA を内部標準とし、*gtfB, gtfC, gtfD, comD* 並びに *LuxS* の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で解析した。統計学的有意差は、Kruskal-Wallis 及び Mann-Whitney U test を用いて行った。
SEM 像では、両群とも球菌を主体とする MB が観察された。CLSM 像では、CHG 作用群はコントロール群と比較して MB の厚みが増していた。FISH 法を用いて構成細菌の局在を観察したところ、初期付着菌群である *S. oralis* と *A.naesulundii* は MB 深部に局在し、*S. mutans* (ZsGreen 株) は MB 中の表層部に局在していた。CHG の有無による局在の差は認められなかった。MB 中の生菌数は、7.4×10^7 CFU（CHG 群）および 7.0×10^7 CFU（コントロール群）で有意差はなかった。

MB 中の各菌の割合は、9 割以上を *Streptococcus* 属が占めていた。
CHG 作用群の *S. mutans* は、すべての MB 形成関連遺伝子の発現が増加傾向にあった。特に、0.24μg/ml CHG 作用群の *gtfC* および *comD* の発現は、コントロール群と比較し有意に増加していた（各々1.7 および 2.4 倍)。

【考察】
今回確立したしたモデルは、う蝕原性バイオフィルムのモデルとして開発されたものであるが、ヒトの口腔のう蝕原性バイオフィルムとは実質的には全く異なり、本実験結果がどの程度臨床現場での状況を反映しているかについては、議論に値しないと考えられる。しかしながら、sub-MIC の薬剤のバイオフィルムへの応用が議論させ始めた昨今、う蝕原性バイオフィルムに化学的コントロールを適応する際に、大きさ示唆を与える実験結果であったと考察される。Sub-MIC の CHG については近年細菌の増殖を促進したり、菌体外マトリックス中の構成糖を増加させるといった報告があり、CHG の抗菌効果よりもバイオフィルムに作用した場合には薬害・副反応を危惧する声が出始めている。本研究においても、細菌の増殖には影響しなかったものの、*S. mutans* のグルカン形成関連遺伝子の発現量を活性化しており、本濃度でのバイオフィルムへの適応には、十分な検証と細心の注意であると考えられた。

【結論】
Sub-MIC の CHG は、今回確立した MB モデルにおいては、細菌増殖ではなく、細胞外マトリックスの産生に影響を与えることで MB 形成を促進させることが示唆された。

『審査結果の要旨』
学位申請者鈴木裕希　氏より提出のあった主論文をもとに、寺尾教授は令和2年2月10日に、多部田教授は令和2年2月14日に、野杁は令和2年2月12日に各々7項目、9項目、10項目について諮問を実施した。口頭ならびに後日文章にて適切かつ十分な回答を得たので合格と判定いたしました。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。
本研究は、先行研究より複合系バイオフィルムモデルにおいて、低濃度の抗菌成分を作用させ際は、さらにバイオフィルム形成量が増加すると推察される事と、従来 sub-MIC の抗菌成分が、口腔複合バイオフィルムに与える影響について報告した研究はほとんどないという経緯を踏まえて立案されたもので、歯科臨床：デンタルバイオフィルム制御戦略の一端を担う重要研究と意義付けられる研究である。バイオフィルムの病原性や抗菌成分の作用などを解析する目的で、様々な *in vitro* バイオフィルムモデルが開発されてきた。*In vitro* バイオフィルムモデルは、口腔内装置を用いた *in situ* バイオフィルムモデルに比べると、口内環境の再現性に乏しいという欠点があるが、一度に多くのサンプルを採取することができ、効率よく各種解析を行うことができる。本研究で用いられた、Calgary Biofilm Device (CBD)は静置系のバイオフィルム作成装置で、*in vitro* バイオフィルムが形成された。本装置は、96 個の Peg と呼ばれるポリスチレン製で加工された突起物が、マイクロタイタープレートの内側に設置されている。Peg に形成されたバイオフィルムは、その構造上、重力に逆らって付着する。そのため、口腔内での強固な付着のバイオフィルムを想定することができる。また、Peg はプレートの蓋から切断できるため、バイオフィルム構造を機械的に壊すことなく、そのまま各種解析を行うことができる点で極めて有用と考察される。本実験で使用した 3 菌種はいずれもヒト歯肉縁上プラーク中に検出される細菌種である。*S. mutans* は、主要なう蝕病原菌であり、UA159 株はヒト口腔由来の標準株で全ゲノム配列が解明されている。また、*S. oralis* は、最も代表的な初期定着菌群の一つであり、ATCC 35037 株はヒト口腔由来で、水溶性グルカンを産生し、かつ高い耐産生能をもつ。*A. naeslundii* も初期定着菌群の一つで、根面カリエスにも関与しており ATCC 12104 株はヒト副鼻腔由来であり、酸産生能とフルクタンを含む菌体外多糖を産生する特徴があり、実験モデルや検定系にも何ら問題はなく、得られた成果の科学的根拠のグレードは *in vitro* 実験結果としては最高レベルにある上、*in vivo, in situ* 実験への発展も期待できる。