

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 大墨 竜也
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第289号
学位授与の日付 平成26年3月24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 Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development
(殺菌処理後の残存バイオフィーム構造は二次的な細菌付着とバイオフィームの再形成を促進する)

論文審査委員 主査 教授 寺尾 豊
副査 教授 興地 隆史
副査 教授 佐伯 万騎男

博士論文の要旨

学位申請者 大墨竜也氏より提出のあった主論文(英語)の要旨(和訳)は、以下の通りである。

【目的】

口腔バイオフィームへの対応として、ブラッシングに代表される機械的コントロール法の効果増強を期待して抗菌成分による化学的コントロール法が応用されている。しかし近年、化学的コントロール法の限界として、バイオフィーム内への薬剤浸透の遅延等に加えて、バイオフィーム中の細菌が死滅しても、その構造が付着界面に残存することが報告されており、残存構造体を起点としたバイオフィーム再形成の可能性が指摘されている。そこで本論文では、*in vitro*口腔バイオフィームモデルを用いて、殺菌処理を施された残存バイオフィーム構造体への細菌再付着の様相を解析した。

【材料及び方法】

人工唾液処理を施した直径6 mm、厚み1.5 mmのレジンディスク表面に*Streptococcus mutans* ATCC 25175株を付着させた後、ディスクをRotating Disc Reactor (RDR)に装填し、毎分4.6 mlの速度で0.05%スクロースを含む1/10濃度のBHI液体培地を灌流させ1日または3日間好気培養することによりバイオフィームを形成させた。その後、70%イソプロピルアルコールに120分浸漬することにより死菌構造体とした。次いで、レジンディスクを再度RDRに戻し、対数増殖期の同一株培養液を再度15分もしくは4時間灌流させた。バイオフィーム未形成のレジンディスクを対照群とした。

二次付着菌の観察は共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)にて行った。すなわち、試料に蛍光染色(Calcein-AMおよびRhodamine-B)を施した後、CLSMを用いて三次元構築画像を作成した。さらに、厚さ8mmの凍結縦断切片を各試料(n=6)について10 mmおきに20枚作製し、CLSM像の画像解析により、死菌構造体に対する二次付着菌の割合(% ; Calcein-AM/ Rhodamine-B)を算出した。

また、生菌数をColony count法、総菌数をPCR-Invader法により計測した後、両者の関連を線形回帰分析で解析した。

【結果】

三次元構築像では、殺菌処理後のバイオフィーム構造の上流側辺縁に沿って引っかかるように堆積する二次付着菌が観察された。凍結切片断層像のCLSM解析から算出された二次付着菌の割合は、 $20.1 \pm 14.4\%$ であった。一方、15分灌流後の二次付着生菌数および総菌数は、3日培養群が1日培養群および対照群と比較して有意に多かった($p < 0.05$, Kruskal-Wallis testおよびSteel-Dwass test)。4時間灌流後の生菌数および総菌数も、3日培養群が対照群と比較して有意に多かった($p < 0.05$)。対照群、実験群とも生菌数と総菌数との間には正の相関関係があり、回帰方程式と決定係数はそれぞれ $y = 1.024x$, $R^2 = 0.992$ (対照群) および $y = 0.819x$, $r^2 = 0.997$ (実験群) であった。

【考察】

死菌構造体への二次付着がCLSMで明瞭に観察されたこと、および死菌構造体の増加とともに二次付着した生菌数が増加したことから、殺菌処理後も付着界面に残存したバイオフィーム構造体には細菌二次付着およびバイオフィーム再形成が生じやすいことが示唆された。このような二次付着は、*S. mutans*に限らず多種多様な細菌に見られる現象と考えられ、グルカン結合タンパクなどの*S. mutans*特異的分子を介した凝集や非特異的結合が関与すると推定される。また、残存する死菌構造体はそれ自体がさまざまな病原性を示す可能性もある。さらに、今回の研究では完全に殺菌したバイオフィームを用いたが、抗菌物質作用後にバイオフィーム内で生存する細菌の病原性や耐性にも注目すべきである。

以上の研究結果は抗菌物質による口腔バイオフィーム制御の限界を示すとともに、バイオフィームマトリックスを分散・剥離する戦略開発の必要性を示唆している。

【結論】

殺菌処理後に残存するバイオフィーム構造体は、細菌の二次付着を促進した。したがって、残存バイオフィーム構造がバイオフィーム再形成の足場となることが示唆された。

審査結果の要旨

学位申請者 大墨竜也氏より提出のあった主論文をもとに、下記の事項について試問を実施し、申請研究に対し十分な知識、先行研究との客観的な比較能力、さらには新規発展研究への明確な展望を有すると判断しましたので合格と判定いたしました。

1) 研究テーマである「デンタルプラーク」と「バイオフィーム」の概念と定義について

バイオフィームは、対象物の表面または境界面に付着して薄い膜状に覆われた細菌集団と定義される (Costerton JW. *J Bacteriol* 176: 2137-2142. 1994)。また、デンタルプラークは、歯や口腔内の固形構造物上に付着または固着した細菌集塊で、細菌産生物や剥離上皮、好中球なども含む、と定義される (歯周病専門用語集: 日本歯周病学会編, 2007)。二つは類義であるが、バイオフィームは単に構造としての特徴だけでなく、クオラムセンシングや遺伝子調節機構を有し、各種免疫細胞に対して抵抗性を持ち、かつ抗菌成分が浸透しにくいといった特性をもつ。近年、デンタルプラークも以上のようなバイオフィームとしての特性を備えていることが明らかとなり、デンタルプラークをバイオフィームとして理解されるようになってきている。本論文では、デンタルプラークをバイオフィームと同義として捉えている。

2) 各種口腔バイオフィームの組成差異に基づく治療戦略の特異性について。

P. gingivalis のバイオフィーム構成成分には、アミノ酸やタンパク質の代謝産物である菌体外多糖、LPS や脂質が含まれる。*P. gingivalis* は糖類を代謝とできないため、*S. mutans* のように粘着性のグルカンによる凝集は起こさないものの、線毛に口腔レンサ球菌が特異的に結合すると報告されている。他の口腔内常在菌とも共凝集することからも二次付着が起こることが推察される。

P. gingivalis のバイオフィームに対するグルコン酸クロルヘキシジン処理の知見では、その表面構造を分解することはなく、タンパク質量と糖質成分量を減少させないという報告がある。したがって、残存した構造は、歯周病の原因となる LPS などの病原因子を保持する可能性もあるため、バイオフィーム構造体の除去が必要と思われる (Yamaguchi M et al., *Eur J Oral Sci* 121: 162-168. 2013)。

3) 研究試料ならびに実験系の適切性について。

ATCC 25175 株は、主要なう蝕病原菌である *Streptococcus mutans* のヒト蝕象牙質由来の臨床分離株であり、かつ国際的な実験標準株であるから、本研究で披検株として選択した。また、スクロース存在下で、粘着性のグルカンを主体としたバイオフィームを形成するため、本研究で焦点を当てたバイオフィーム構造体への二次付着実験に適している。今後、二次付着様式の詳細な解析のためには、UA159株などの全ゲノム明らかとなっている菌株への変更が必要である。そのため、将来的な研究発展を期して、本菌株を選んだ。15分は短時間での初期付着 (臨床でのプロフェッショナルクリーニング後の状態からの初期付着) を想定した。4時間は付着した後の増殖も含めて (口腔内では食事摂取の間隔)、バイオフィームの再形成の動態を共焦点レーザー顕微鏡にて観察するために設定した。蛍光プローブを用いた細菌の生死判別法のための標準曲線を作製する際に、死菌の作製に70%イソプロピルアルコールが用いられており、本実験でも死菌構造体を作製するために70%イソプロピルアルコールを用いた。しかし、70%イソプロピルアルコールや70%エタノールなどのアルコール製剤は、脱水によりバイオフィーム構造が収縮することが予想さ

れ、抗菌成分作用後の形態と相違がある可能性が推察される。

本研究で用いた蛍光染色は Calcein-AM/Rhodamine-B は、酵素活性による生菌判別に対比染色の Rhodamine-B を組み合わせたものである。Calcein-AM は、生菌の細胞膜を透過し、エステラーゼによる加水分解で膜不透過性の Calcein となり緑色の蛍光を示す。一方、抗菌剤などの作用で、細菌が膜に傷害を受けたとき、Calcein が細胞外に流出するため蛍光の消失を指標として殺菌効果の判定も可能である (Takenaka et al., Appl Environ Microbiol 74: 1869-1875, 2008)。

また、3次元構築画像により、二次付着動態の視覚化が可能となったが、共焦点レーザー顕微鏡は厚みのあるバイオフィームの場合、レーザーの到達深度が不十分なため深層部まで透過せず観察できない欠点がある。凍結縦断切片の蛍光画像では、バイオフィーム構造体に堆積するように付着した二次付着菌を含めて断層面の深層部の情報を得るために有用であった。

4) 国内外の同領域の研究と比較した本研究の新規性について。

これまで、成熟したバイオフィームへの対応は、細菌をターゲットとしていかに迅速に殺菌するかが重要視されてきた (Tenover, Am J Infect Control 34: S3-S10, 2006)。しかし、我々のグループの実験結果もふまえた先行研究では、バイオフィーム中の細菌が死滅してもそのバイオフィーム構造が付着界面に残存することが報告されている (Wakamatsu et al., Clin Oral investing: DOI 10.1007/s00784-013-1002-7.2013; Davison et al., Antimicrob Agents Chemother 54: 2920-2927, 2010)。以上より、口腔内バイオフィームに対する抗菌成分による化学的コントロール法の限界として、バイオフィーム中の細菌が死滅してもその構造が付着界面に残存することは既に証明されている。しかし、そのバイオフィーム残存構造に対して細菌の再付着の様相を解析した知見はまだ明らかではなかった。そこで我々は、残存構造体を起点としたバイオフィーム再形成の可能性を科学的に検証するために本研究に着手した。その結果、フローセル培養系を用いて人工バイオフィームモデルを構築し、殺菌処理後に残存するバイオフィーム構造体に対する細菌の二次付着を三次元的にイメージング化することに成功した。

5) 将来的な発展研究を推進するための実験計画について。

glucan-dependent aggregation: *S. mutans* がもつグルカン合成酵素をコードする遺伝子 *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* の欠損株を用いて二次付着の動態を観察する。

単離した GTF-B, GTF-C, GTF-D を単独、または共同でのグルカン合成系を用いて、加熱死菌体など代謝活性を失った菌体を用いてのグルカンへの付着菌体量を算定する。水溶性、非水溶性グルカンの構成割合の違い等による付着菌量を評価する。

cell-cell aggregation: 二次付着させる菌体表面の線毛を欠失した菌株を用いる。

本実験で殺菌に用いた 70% イソプロパノールで処理した菌体と生菌を混合培養し、凝集塊の生菌と死菌の割合を調べる。

PAC: 抗 PAC モノクローナル抗体を用いて菌体の表層タンパク質である PAC をブロックしたものと付着量を比較する。または、細胞壁結合 PAC を産生できない菌株 (遺伝子欠失変異株) と菌体表層に PAC が局在している菌株との凝集を比較する。

本研究では、残存したバイオフィーム構造体によって二次付着が促進されるかに焦点を当てている。そのため、コントロールとして、構造体のないディスク表面への浮遊菌の付着を Colony count 法、PCR-invader 法にて算出した。また、死菌構造体の量の増加とともに、二次付着量も増加し続けるかどうかを検証するためには、多変量の残存バイオフィーム構造体を作製し、検討する必要がある。しかし、本研究で用いたフローセル培養系では、培養時間が 3 日を過ぎるとバイオフィーム量の増加に変化がなくなることを確認している (若松他, 第 133 回日本歯科保存学会, 2010)。したがって、培養時間を延長しても付着界面に形成するバイオフィームには変化がないと推察される。さらに、信頼性の高い回帰分析を行う方法として、3 日未満の時間軸を段階的に設定したバイオフィーム構造体への二次付着様式の観察が考えられる。

Fig. 3 または 4 において、Colony count 法による生菌数と PCR-invader 法による総菌数は算出法が異なるため単純な比較は出来ない。しかし、24 時間、72 時間構造体のみと、二次付着後の総菌数を提示し、比較することで構造体の量に相関して二次付着菌量が増加することがより明確になるとと思われる。

以上