

氏名	浅海 春華		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第6614号		
学位授与の日付	令和4年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	<i>Streptococcus mutans</i> におけるサイクロデキストランの齲蝕抑制機能とその役割の 解明		
論文審査委員	吉山 昌宏 教授	大原 直也 教授	江國 大輔 准教授

学位論文内容の要旨

【目的】

環状イソマルトオリゴ糖であるサイクロデキストラン (Cycloisomaltooligosaccharide ; CI) は、7～12個のグルコースが α -1,6 結合で環状に連結した構造を示す。

本研究では、CI の齲蝕抑制作用を明らかにすることを目的とし、CI が *Streptococcus mutans* の表層タンパクであるグルカン合成酵素 (Glucosyltransferase ; GTF) の機能ドメインに与える影響とバイオフィーム形成に与える影響を検討した。さらにラット齲蝕モデルにて、CI が齲蝕の発症に与える影響を検討した。

【方法】

(1) 供試菌

日本人小児の口腔より分離された *S. mutans* MT8148 株を用いた。

(2) 組換え GTFB (recombinant GTFB: rGTFB) を用いた CI の阻害効果の検討

CI を終濃度 0～1% 添加した 1% スクロース含有リン酸緩衝液 (NaPB) に rGTFB を添加し、37°C で 16 時間培養した後、培養物の波長 550nm における吸光度を測定した。

(3) 酵素活性阻害様式の検討

スクロース濃度を 1～25mM に変化させた NaPB に CI を終濃度 0% あるいは 0.25% 添加し、さらに rGTFB を添加して、37°C で 16 時間培養した。その後、波長 550nm における吸光度を測定した。

(4) Somogyi-Nelson 法を用いたグルコースの定量

GTFB のスクロース活性部位である Catalytic domain (CAT) の組換えタンパク (rCAT) を作製した。rCAT と 2.5% スクロースを添加した滅菌精製水に、CI を終濃度 0～1.25% 添加した。Somogyi 銅液を添加して 20 分煮沸した後に、さらに Nelson 液を添加し、15 分静置した後に波長 500nm の吸光度を測定した。

(5) バイオフィーム形成量の測定

供試菌を、CI を終濃度 0～10% 添加した 1% スクロース含有化学合成培地に播種し、96 穴平底細胞培養用マイクロタイタープレートの各ウェルに 100 μ l ずつ分注して、37°C で 2 日間嫌氣的に培養した。底面に形成されたバイオフィームを、1% クリスタルバイオレット溶液にて染色し、波長 570nm の吸光度を測定した。

(6) バイオフィルム構造の観察

ヨウ化ヘキシジウムを用いて標識した供試菌を、CI を終濃度 0~10% 添加した 1% スクロース含有化学合成培地に懸濁し、チャンバースライドに分注した後、37°C で 24 時間培養した。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にて観察した。

(7) バイオフィルム中の菌および菌体外多糖の観察

SYTO 9 green fluorescent nucleic acid stain を用いて標識した供試菌を、CI を終濃度 0~10% 添加した 1 mM Alexa Fluor 647-labeled dextran と 1% スクロースを含有した化学合成培地に懸濁し、チャンバースライドに分注した後、37°C で 24 時間培養した。そして、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にて観察した。さらに、ImageJ (Version 10.2) を用いて形成されたバイオフィルムの密度と厚みを数値化した。

(8) バイオフィルム破碎試験

CI を 0~10% 添加した 1% スクロース含有 Todd Hewitt 液体培地に供試菌を播種し、6 穴細胞培養用マルチウェルプレートに分注した後、嫌気下で 37°C、24 時間培養した。形成されたバイオフィルムを超音波で破碎した後、浮遊した菌体を取り除き、残存した菌体を Trypticase Soy 寒天培地に播種して培養し、培地上のコロニー数を測定した。

(9) ラット動物齲蝕モデルを用いた CI の阻害効果

生後 15 日目に強制離乳させた Specific pathogen-free (SPF) の Sprague Dawley 系ラットの雄を使用し、生後 18 日目から 22 日までの 5 日間に供試菌の定着を行なった。生後 18 日目から 56% スクロース含有齲蝕誘発性飼料 Diet 2000 を与え、実験が終了するまで自由に摂取させた。飲料水として蒸留水を自由に摂取させた。飼料または飲料水に CI を最終濃度が 0~5% となるように添加した。生後 72 日目にイソフルラン麻酔下でラットを屠殺し、顎骨を無菌的に摘出した。歯垢染色液を用いて上顎の歯牙を染色し、プラークスコアを算出した。また、齲蝕を実体顕微鏡下で観察し、齲蝕スコアを算出した。

【結果および考察】

本研究では次の結果が得られた。i) rGTFB が産生するグルカン量は CI の添加に伴い減少した。ii) CI 濃度を 0.25% に固定してスクロース濃度を变化させた酵素基質反応のデータを基に、Lineweaver-Burk plot を作成したところ、Vmax 値は変化しなかったが、Km 値は上昇した。iii) CI の添加に伴い、rCAT から生成されるグルコース量は減少した。iv) バイオフィルム形成量は CI の濃度依存的に減少し、その構造の変化が認められた。v) ラット動物齲蝕モデルでは、飲料水あるいは餌に添加したいずれの実験系においても、CI 添加群では非添加群に比較して歯面へのプラーク付着量および齲蝕スコアが低下していた。

以上の結果から、CI は、スクロースが GTFB の CAT 領域に結合することを拮抗阻害することで GTFB の働きを阻止することが明らかとなった。そのため、グルカンの生成量と菌体間の結合力の低下が認められ、それらの結果として、バイオフィルムの構造が脆弱化されることが示唆された。

論文審査結果の要旨

環状イソマルトオリゴ糖であるサイクロデキストラン (Cycloisomaltooligosaccharide ; CI) は、7~12 個のグルコースが α -1,6 結合で環状に連結した構造を示す。齧蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* が産生するグルカン合成酵素 (Glucosyltransferase; GTF) には、GTFB、GTFC、および GTFD の 3 種類が存在し、それぞれ合成されるグルカンの性状が異なる。これまでに CI は、GTFB がスクロースから不溶性グルカンを合成する反応を阻害することが示唆されている。本研究では、CI が GTFB の酵素活性を阻害する様式、CI の存在がバイオフィーム形成に与える影響、およびラット齧蝕モデルにおいて CI の投与が齧蝕発症を阻害する効果を検討した。

供試菌として *Streptococcus mutans* MT8148 株を用いて実験を行った。スクロース含有リン酸緩衝液 (NaPB) に、CI と組換え GTFB (rGTFB) を添加し、酵素活性阻害様式を検討した。スクロース濃度を変化させた NaPB に CI と rGTFB を添加し、酵素基質反応速度を調べた。結果を用いて Lineweaver-Burk plot を作成した。また、GTFB のスクロース触媒部位である Catalytic domain (CAT) の組み換えタンパク (rCAT) を作製し、Somogyi-Nelson 法を用いて rCAT に結合したグルコースの定量を行った。共焦点走査型レーザー顕微鏡を使用し、CI の存在が *S. mutans* のバイオフィーム形成に与える影響を観察した。一方、形成されたバイオフィームに超音波処理を行い、菌体間の結合力を検討した。最後に、ラット動物齧蝕モデルにおいて飼料または飲料水に CI を添加し、CI の齧蝕抑制効果を検討した。

(1) 生成されたグルカン量は、添加した CI の濃度の上昇に伴い減少し、Lineweaver-Burk plot では最大反応速 (V_{max}) は変化しなかったが、反応速度が V_{max} の 1/2 のときの基質濃度 (K_m 値) は上昇した。また、CI の添加に伴い、rCAT から生成されるグルコース量は減少した。

(2) CI の濃度が上昇するにつれ、バイオフィーム形成量が低下し、密度は疎になり、厚みも減少し、グルカン合成量も減少した。

(3) ラット齧蝕モデルにおいて、CI を食餌あるいは飲料水に添加したいずれの群においても、歯面へのプラーク付着量は、CI を添加しない群に比べて低下していた。また齧蝕スコアは、CI を添加したいずれの群においても、CI を添加しない群に比べて低下していた。

以上の結果より、CI は、スクロース触媒部位へのスクロースの結合を拮抗阻害することで、グルカンの合成を抑制し、その結果、バイオフィームの形成が抑制されることが明らかとなった。さらに CI は、*S. mutans* の菌体間結合を脆弱化させることで、齧蝕の発症を抑制することが示された。

本論文において、CI の齧蝕抑制メカニズムの一端を明らかにしたことは、科学的にも、また臨床応用に向けても、重要な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。