指　導　教　授　氏　名	指　　導　　役　　割
仲野　道代　　印	研究の総括指導
印	
印	

学　位　論　文　要　旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野　小児歯科学分野	身分　大学院生	氏名　浅海　春華

論　文　題　名　*Streptococcus mutans* 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

論文内容の要旨（2000字程度）

【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ル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℃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℃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）バイオフィルム形成量の測定

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 100μl ずつ分注して，37℃で 2 日間嫌気的に培養した。底面に形成されたバイオフィルムを，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℃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℃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）バイオフィルム破砕試験

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℃，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砕した後，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変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。