

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19791566

研究課題名（和文） 齲蝕病原性細菌の母子感染とバイオフィルムの関係に関する研究

研究課題名（英文） The relation between transmission from mothers to their infants and biofilm in the major pathogen of human dental caries

研究代表者

茂木 瑞穂（MOTEGI MIZUHO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60422474

研究成果の概要（和文）：

ミュータンス菌は、う蝕（虫歯）の主な原因菌であり、歯の表面にバイオフィルム（細菌の集合体、歯垢）を形成する。このミュータンス菌の数ある遺伝子の中でも、SMU832, 833 遺伝子については、子が母親などの養育者からミュータンス菌を獲得する際に関与している可能性が示唆された。また、バイオフィルム形成にも関係していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

*Streptococcus mutans*, the major pathogen responsible for dental caries in humans, is a biofilm-forming bacterium. In this study, SMU832 and 833 of *S. mutans* genes may be related to acquirement of *S. mutans* from rearers such as mother. Moreover, the genes may be associated with biofilm development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	0	0	0
2010 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：*Streptococcus mutans*、う蝕、バイオフィルム、母子感染、細菌

## 1. 研究開始当初の背景

*Streptococcus mutans* は歯科領域における 2 大疾患の 1 つである齲蝕の主な原因菌であり、歯表面にバイオフィルムを形成する細菌である。*S. mutans* が齲蝕の原因菌の一つである因子として、グルコシルトランスフェラーゼ（ブドウ糖転移酵素：*gtf*）を菌体外に分泌し、ショ糖を基質として不溶性グルカ

ンを合成する性質が特に重要視されてきた。この不溶性グルカンは粘着性があり、歯垢（プラーク）を形成するため、昔から *gtf* の研究が盛んに行われている。しかし、*gtf* のみで *S. mutans* の病原性を示すことは難しく、*gtf* を指標とした検査方法も確立しているわけではない。したがって、*gtf* 以外の病原性を調べる必要があると我々は考えた。

さらに、口腔内における *S. mutans* 数が多くても齲蝕になる人もいれば、ならない人もいることを考えると、歯垢を形成する細菌の質、歯垢の質を評価する必要があると考える。また、*S. mutans* は乳歯萌出後に初めて口腔内より検出され、様々なメカニズムにより歯表面へと定着していくと考えられており、国内外において、mutans streptococci (MS) は乳幼児期に母親から子へ伝播することが多いと報告されている。そこで、我々は *S. mutans* の病原性の指標として、バイオフィーム形成能とバイオフィームの構造に着目し、母子感染との関連について研究することとした。

日本における MS 菌伝播の研究は、地方都市である広島における報告があるが、大都市での報告がない。本研究において、大都市である横浜市の母子間（174 組の母子、子供は 3 歳児）での *S. mutans* の伝播について、現在、フィンガープリント法（パルスフィールドゲル電気泳動法）を用いて調べたところ、45.5% の母子において遺伝子型が同じ *S. mutans* を保菌していることがわかった。またこの際、遺伝子型が異なる 17 種類の *S. mutans* を分離することができた。

近年のバイオフィーム研究のほとんどは、様々な顕微鏡を用いて表層のバイオフィーム構造を観察することがほとんどである。遺伝子を取り込み、また変異の起こりやすいレンサ球菌であることを考えれば、性質の異なるバイオフィームがそれぞれの口腔内で発生していることが考えられる。以前の研究において、デンタルバイオフィームは生菌の層に囲まれた空洞や溝が存在することが報告されている。このようにバイオフィームの内部構造は、表層構造とは異なり、多様性を示す可能性があるが、その内部構造の違いを定量化した報告はほとんどない。一見では異な

りのないバイオフィームであっても、内部の密度が濃く粘着力がより高く形成されていれば、口腔清掃だけでは容易に除去されにくいと考えられる。本研究において、前述した 17 種類の *S. mutans* について 96 穴プレートを用いた簡便な方法でバイオフィーム形成能を解析したところ、各々のバイオフィーム形成能が異なることがわかった。またそのうち、バイオフィーム形成能が最も高い株と低い株について共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いた画像解析を行ったところ、後者については内部に空洞が存在し、その構造の違いを定量化することができた。つまり、バイオフィーム形成能が高い程バイオフィーム構造が蜜であることが示唆された。

近年、浮遊菌からバイオフィームを形成する菌へ変化した際の細胞内遺伝子変遷については、研究が始まったばかりである。内部構造の異なるバイオフィームの形成時における遺伝子発現の変遷を解明できれば、口腔内で MS 菌がどのように環境変化に反応して定着しているのかがわかるかもしれない。DNA マイクロアレイは、遺伝子発現の変化を全体的に観察するのに適している。例えば、DNA マイクロアレイを用いた *Pseudomonas aeruginosa* の近年のバイオフィーム研究において、浮遊菌と比べてバイオフィームを形成した状態の菌では検討した全遺伝子の約 1% にしか変化が認められなかったと報告している。様々な菌において、DNA マイクロアレイを用いた研究が行われているが、*S. mutans* についてはまだ報告されていない。本研究では、すでに DNA マイクロアレイを用いて *S. mutans* 臨床分離株のバイオフィーム形成能の異なりと遺伝子発現の差について研究しており、*S. mutans* バイオフィームの調節に関わる遺伝子をスクリーニングできた。

## 2. 研究の目的

我々は MS 菌の初期獲得におけるバイオフィルム形成能と母子伝播の関係について研究を行ってきたが、DNA マイクロアレイを用いて解析された *S. mutans* のバイオフィルムの調節に関わる遺伝子がどのように母子間の伝播に影響を及ぼしているのか、また MS 菌はバイオフィルム形成能が高いほど子供へ伝播する確率が本当に高くなるのか、を解明することを目的とした。具体的には、スクリーニングできたバイオフィルムに関連すると考えられる遺伝子のうち、母子感染にも関与している可能性がある遺伝子の機能を明らかにすることを目的として、それら遺伝子の欠損変異株を利用して解析を行った

本研究において、*S. mutans* のバイオフィルム形成に関連する有力な遺伝子を解明することにより、*S. mutans* の感染のメカニズムが解明できたならば、齲蝕発症を根本的に予防することができるだろう。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子の保有率

バイオフィルム形成能が異なる17種類の *S. mutans* 臨床分離株において、DNA マイクロアレイにより明らかとなった74個のバイオフィルム関連遺伝子がどのように存在し、分布しているのかをPCR法により検討した。

### (2) 遺伝子欠損株の作製

*S. mutans* UA159 株において、母子間で遺伝子型 (PFGEパターン) が一致せず子のみより分離された臨床分離株 *S. mutans* 6 株がほとんど保有していた遺伝子 SMU832, 833, 1912 の欠損変異株を作製した。

### (3) バイオフィルム形成能

培地 {Tryptic Soy Broth without Dextrose (TSB w/o Dex.)} もしくは TSB w/o Dex. + 0.25% Sucrose} が 入った 96-well plate に各細菌懸

濁液を入れ、37 °C CO<sub>2</sub> 下にて 6 時間培養した後、形成されたバイオフィルムをサフラニン溶液にて染色し、吸光度 (492nm) を測定することにより定量化した。

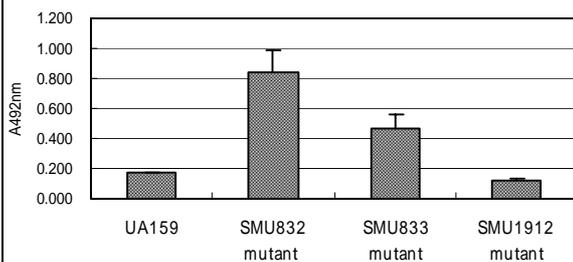
## 4. 研究成果

SMU832, 833 遺伝子については、一致しない子供の *S. mutans* からは 100% に近い値で検出されているのに対して、他の *S. mutans* では 60% 以下である (表 1)。このことから、これら遺伝子は、子が母親以外の者から *S. mutans* を獲得する際の何らかの指標となる可能性が示唆された。また、SMU832, 833 遺伝子欠損株においては、6 時間培養において、培地中の sucrose の有無に関わらず、バイオフィルム形成能が親株 (UA159) よりも高くなった (図 1)。このことから、これら遺伝子がバイオフィルム形成にも関与している可能性が示唆された。

《表 1》各遺伝子の保有率

Gene No.	母子一致 の <i>S.</i> <i>mutans</i> (5株)	一致しない 母の <i>S. mutans</i> (6株)	一致しない 子の <i>S. mutans</i> (6株)
	SMU832	3/5(60%)	2/6(33%)
SMU833	3/5(60%)	2/6(33%)	6/6(100%)
SMU1912	2/5(40%)	3/6(50%)	5/6(83%)

《図 1》バイオフィルム形成能 (TSB w/o Dex.)



5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol. 2009

Apr;24(2):152-161. (査読有)

Kumada M, Motegi M, Nakao R, Yonezawa H, Yamamura H, Tagami J, Senpuku H. Inhibiting effects of *Enterococcus faecium* non-biofilm strain on *Streptococcus mutans* biofilm formation. J Microbiol Immunol Infect. 2009

Jun;42(3):188-196. (査読有)

Yonezawa H, Kuramitsu HK, Nakayama S, Mitobe J, Motegi M, Nakao R, Watanabe H, Senpuku H. Differential expression of the Smb bacteriocin in *Streptococcus mutans* isolates.

Antimicrob Agents Chemother. 2008 Aug;52(8):2742-2749. (査読有)

Kumada M, Senpuku H, Motegi M, Nakao R, Yonezawa H, Yamamura H, Watanabe H, Tagami J. Effects of *Enterococcus faecium* on *Streptococcus mutans* biofilm formation using flow cell system. J Oral Biosci. 50(1):68-76, 2008. (査読有)

[学会発表](計6件)

M. Motegi, H. Yonezawa, R. Nakao, S. Yoneda, Y. Takagi, H. Senpuku, Roles of genes to biofilm formation in the *Streptococcus mutans*. International

Association of Dental Research, 2008年7月3日, Canada・Toronto

茂木瑞穂、高木裕三, *Streptococcus mutans* バイオフィーム形成に関する遺伝子の検討, 日本小児歯科学会【第46回大会優秀発表賞受賞】2008年6月12日, 埼玉・大宮

茂木瑞穂, 齲蝕病原性細菌の母子感染とバイオフィームの関係に関する研究, 日本小児歯科学会【平成20年度奨励賞受賞講演】2008年6月13日, 埼玉・大宮

米澤英雄、中尾龍馬、茂木瑞穂、泉福英信, *Streptococcus mutans* 臨床分離株における Bacteriocin Smb の遺伝子パターンとその抗菌性への関与, 2007年7月22日, 東京

泉福英信、茂木瑞穂、田村昌平, *S. mutans* とほかの Streptococci との混合バイオフィームにおける G1rA の役割, 歯科基礎医学会, 2007年8月31日, 北海道

米田早織、茂木瑞穂、泉福英信, *Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成中期と後期に発現する遺伝子の検討, 2007年8月30日, 北海道

[図書](計2件)

茂木瑞穂, 財団法人 母子衛生研究会, 月刊 母子保健 6月号, 2008年, P2-6

茂木瑞穂. むし歯予防プログラム. チヤイルドヘルス. 2009;12(4):266-270.

6. 研究組織

(1)研究代表者

茂木 瑞穂 (MOTEGI MIZUHO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 60422474

(2)連携研究者

高木 裕三 (TAKAGI YUZO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 30124697

泉福 英信 (SENPUKU HIDENOBU)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号: 20250186

米澤 英雄 (YONEZAWA HIDEO)

杏林大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 60453528