

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862020

研究課題名(和文) 小児齲蝕の新たな予防法開発へ向けたリスク増悪因子の解明

研究課題名(英文) The elucidation of a risk precipitating factor of dental caries and development of new preventive method for children.

研究代表者

大原 紫(OHARA, YUKARI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：80634469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Brain Heart Infusion (BHI)液体培地を用い、37℃の嫌気条件下培で対数増殖期まで養った臨床分離臨床分離Streptococcus mutans(S. mutans)を用いてフローセルシステム内でバイオフィルムを形成させ、齲蝕関連遺伝子gtfBとatpDのmRNA発現量を測定した。pH7.0とpH5.5のBHIでバイオフィルムを形成させ高齲蝕群と低齲蝕群で比較したところ、酸性環境下で両群とも発現量が増加したが、高齲蝕群の増加率のほうが大きかった。S. mutansの酸性環境への適応と齲蝕重症度との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, clinical isolated Streptococcus mutans (S. mutans) were used. Biofilm samples were cultivated at 37℃ in three-channel flow cells with a flow of Brain Heart Infusion(BHI). After extracted RNA from biofilm samples, the expression levels of gtfB and atpD that dental caries related genes were quantitated by real-time RT-PCR. Compare with caries high risk group and low risk group, the expression levels of gtfB and atpD were increased at pH5.5 of BHI than pH7.0. And the increase level of caries high risk group was higher than low risk group. These results suggested that the severity of dental caries is related the ability of S. mutans to adapt the acidic environment.

研究分野：小児歯科学

キーワード：小児齲蝕 Streptococcus mutans

1. 研究開始当初の背景

本邦において小児の齲蝕経験者率は減少しているが、一方で重症齲蝕の小児も散見されており、齲蝕罹患の二極化傾向が認められる。齲蝕原因菌の一つである *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) は、glucosyltransferase を介して sucrose から粘着性の不溶性グルカンを合成して歯面に強固に付着する。*S. mutans* は、生存に必要な ATP を合成する過程で代謝産物として酸を産生するが、不溶性グルカンが多量に含まれるバイオフィームは、内部で産生された酸の拡散を防ぐとともに、緩衝能を持つ唾液の侵入を妨げるためバイオフィーム内の酸性環境が長時間保持される。*S. mutans* は、酸が蓄積されたバイオフィーム内で生息するため、高い耐酸性能を有することが報告されている。申請者は、これまでに小児口腔内より分離した *S. mutans* を用いて、酸性環境下における glucosyltransferase B 遺伝子 (*gtfB*) および耐酸性能に関与する F-ATPase の α -subunit である *atpD* の mRNA 発現量を浮遊状態において検討し、齲蝕重症度が高い小児においてその発現量が増加することを明らかにした (図 1)。

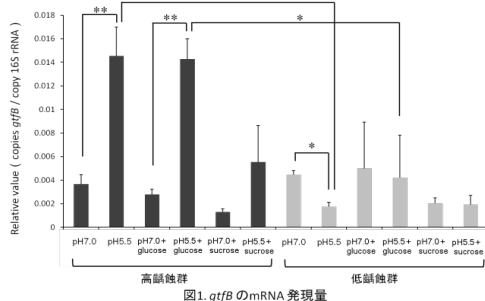


図1. *gtfB* の mRNA 発現量

S. mutans は口腔内でバイオフィームを形成しており、その生態はバイオフィーム内と浮遊状態では異なることが報告されている。バイオフィーム内での遺伝子発現制御機構を解明することが、より個人に適した齲蝕予防法を模索する上で重要だと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、小児口腔内より分離した *S. mutans* を用いて in vitro でバイオフィームを形成させ、その状態で周期的に酸性環境下に曝露するなど口腔内で起こると想定される環境変化を与える。そして、不溶性グルカン合成能や耐酸性能の変化を検討し、*S. mutans* の齲蝕原性を高めることになる環境因子を明らかにする。齲蝕原性が低いと考えられる *S. mutans* が高い齲蝕原性を獲得する過程を明らかにすることで、実際に口腔内で齲蝕重症度に大きく影響するであろう環境因子が決定される。その結果、齲蝕重症度が低い小児に対しては、今後齲蝕リスクレベルを上昇させる可能性がある環境因子と

の接触を避けることで齲蝕予防が可能になる。また、*S. mutans* の齲蝕原性を低減させる抗菌物質や齲蝕抑制作用を有する物質などを見出すことにより、すでに重症齲蝕が認められる小児に対して、より個人に適した齲蝕予防法を提案することができる。確立する上で臨床的に非常に重要だと考えられる。

3. 研究の方法

S. mutans の性状に変化を与える環境因子を明らかにし、効果的な齲蝕予防法の確立を目指すことを目的として以下について検討する。

(1) 小児口腔内より分離した *S. mutans* を用いてフローセルシステム内でバイオフィームを形成させ、バイオフィーム内における *gtfB*, *atpD* の mRNA 発現量を測定し、齲蝕重症度との関連を明らかにする。

Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地を用い、37 °C の嫌気条件下で対数増殖期まで培養した臨床分離 *S. mutans* を用いた。菌液を 2 ml / min の流速でフローセルシステム内を流動させバイオフィームを形成させ、形成されたバイオフィームから mRNA を抽出した。*S. mutans* の 16S rRNA を内部コントロールとし、*gtfB* および *atpD* の mRNA 発現量を、Real-time RT-PCR 法により検討した。BHI 液体培地の pH は 7.0 とした。

(2) 酸性環境下で形成させたバイオフィーム内での *gtfB*, *atpD* の mRNA 発現量を測定し、齲蝕重症度との関連を明らかにする。

BHI 液体培地を、酸性環境下として pH5.5 に調整し、(1) と同様の方法でフローセルシステム内を流動させ、形成されたバイオフィームから mRNA を抽出した。*S. mutans* の 16S rRNA を内部コントロールとし、*gtfB* および *atpD* の mRNA 発現量を、Real-time RT-PCR 法により検討した。

臨床分離 *S. mutans* は、小児の齲蝕重症度から高齲蝕群と低齲蝕群とに分類し、二つの群での mRNA 発現量の違いを検討した。

4. 研究成果

pH7.0 の BHI 液体培地で培養し、バイオフィームを形成させたところ、齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量は高齲蝕群で低齲蝕群より多く認められたが、有意な差は認められなかった。pH5.5 の BHI 液体培地では、両群とも齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量は増加した。発現量に有意差は認められなかったものの、高齲蝕群において低齲蝕群よりも増加率は大きかった (図 2)。

周辺環境の酸性度が高くなった状態でも、バイオフィーム内においてより多くの齲蝕関連遺伝子を発現することができるかどうか、齲蝕重症度に影響していることが示唆

された。

申請者がこれまでに検討した浮遊状態における *S. mutans* の齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量は、低齲蝕群は酸性環境下において有意に減少していた。しかし、本研究で検討したバイオフィーム内では、低齲蝕群でも酸性環境下において齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量は増加した。

本研究の結果より、*S. mutans* の性状は浮遊状態とバイオフィーム内とで異なっていることが示された。

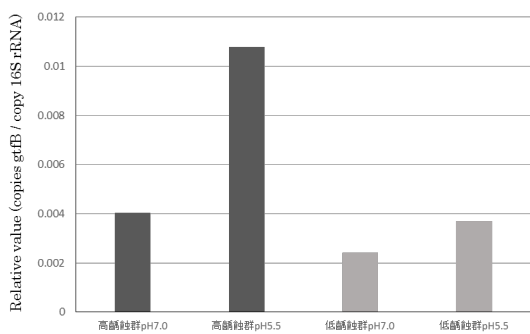


図2. *gtfB* の mRNA 発現量

S. mutans は口腔内においてバイオフィームを形成しており、口腔内で形成されたバイオフィーム内においても本研究で得られたものと同様の現象が起こっていることが考えられる。今後、*S. mutans* の性状変化を検討するうえで、バイオフィームを形成させてその変化を検討することが重要であるとの示唆が得られた。

口腔内において *S. mutans* は、食物を摂取する毎に酸性環境に暴露されている。*S. mutans* を繰り返し酸性環境に暴露することによりバイオフィーム内での mRNA 発現量に変化が認められるのか、また、齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量が少なかった *S. mutans* に変化をきたし、齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量が多くなるような環境変化を明らかにすることは、齲蝕予防を考えるうえで重要である。また、齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量が多い *S. mutans* に作用し、その発現量を減少させるような抗菌ペプチドやバクテリオシンを見出すことも齲蝕予防の観点から重要である。

本研究では、酸性環境下以外の培養条件下での齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量は検討できていないが、酸性環境下において浮遊状態とバイオフィーム内での mRNA 発現量に違いが認められたことから、培養液に glucose や sucrose を添加することでも違いが認められる可能性は考えられる。また、これらの糖を添加し、さらに酸性環境に調整した培養条件下でも *S. mutans* の齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量に変化が生じることが考えられる。酸性環境や糖の添加など、口腔内で受けると考えられる環境変化を *S. mutans* に

与え、その変化に対してどのような性状変化が認められるか、それらと齲蝕重症度との関連性を検討することは重要である。

また、*S. mutans* の遺伝子発現状況を制御する機構のひとつとして、quorum sensing システムが報告されている。quorum sensing システムは、菌密度を感知することで機能している。単一の *S. mutans* で形成されたバイオフィーム内で、quorum sensing システムの働きにより齲蝕関連遺伝子の mRNA 発現量に変化が認められるかを検討することは重要である。しかし、口腔内のバイオフィームは、さまざまな口腔細菌によって構成されている。*S. mutans* だけではなく、その他の口腔細菌で構成されるバイオフィームを形成させ、そのバイオフィーム内で、quorum sensing システムの制御を受け、齲蝕関連遺伝子の発現量にどのような変化が生じているかということも、個人の齲蝕重症度に影響していると考えられる。遺伝子発現制御機構を解明することが、より個人に適した齲蝕予防法を模索する上で重要だと考えられる

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大原 紫 (OHARA YUKARI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(歯)・助教
研究者番号：80634469