

Title	ラテックス凝集反応を用いたミュータンスレンサ球菌の特異的検出と齲蝕活動性試験への応用
Author(s)	武井, 勉
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37083
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	たけ 武	い 井	つとむ 勉
学位の種類	歯	学	博 士
学位記番号	第	9 1 3 2	号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学臨床系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	ラテックス凝集反応を用いたミュータンスレンサ球菌の特異 的検出と齲蝕活動性試験への応用		
論文審査委員	(主査) 教授 祖父江鎮雄		
	(副査) 教授 浜田 茂幸 助教授 鳥居 光男 助教授 森崎市治郎		

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト口腔のミュータンスレンサ球菌数と齲蝕の現症、既往あるいは新たな発生との間には、多くの研究者により病因論的な因果関係が認められている。逆にミュータンスレンサ球菌の多寡を定量的に測定すれば、齲蝕の罹患に対する危険度を予測するいわゆる齲蝕活動性試験の一つとして用いることが理論的に可能となる。しかし、ミュータンスレンサ球菌数を調べるには、細菌学的に複雑な操作と作業時間および特殊な設備を必要とする。この点を克服するため、ミュータンスレンサ球菌に対する特異抗体を感作したラテックス粒子と同菌の菌体抗原との凝集反応を利用して、その存否を高感度かつ迅速・簡便に検出する方法の開発を試みた。併せて、この方法によって得られた実験結果と小児の口腔内ミュータンスレンサ球菌数、齲蝕の現症あるいは既往との相関関係を調べた。

数種のミュータンスレンサ球菌のうち、ヒト口腔には *Streptococcus mutans* (血清型 *c/e/f* 型) と *S. sobrinus* (*d/g* 型) が分布している。そこで以下の研究では、*S. mutans* MT8148(*c*)、MT703 R(*e*)、OMZ 175(*f*)株ならびに *S. sobrinus* の B13(*d*)、6715(*g*)株を使用した。各菌株の家兎免疫抗血清を 1/3 飽和硫酸アンモニウム沈殿を繰り返して各血清型に対応する抗 *c*、抗 *e*、抗 *f*、抗 *d* および抗 *g* 型 IgG 抗体を得た。これらの抗体をラテックス粒子 (イムテックス G 2801、粒径 0.876 μm、日本合成ゴム) に吸着後、リン酸緩衝生理食塩水に浮遊させて抗体感作ラテックス粒子を調製した。抗原としては、ミュータンスレンサ球菌のほか、各種のレンサ球菌の全菌浮遊液および熱生理食塩水、亜硝酸、アルカリ、塩、キレート剤、界面活性剤等による抽出液を用いた。これらの抗原抽出液と抗体感作ラテックス粒子 (各 20 μl) とをスライドガラス上で室温 10 分間反応させた後、凝集活性として肉眼的に 3 段階で判定した。その結果、抗 *c*、抗 *e*、抗 *f*、抗 *d* および抗 *g* 型抗体感作ラテックス粒子は純培養した同

一血清型のミュータンスレンサ球菌の全菌浮遊液と凝集反応を示した。種々の抗原抽出法のうち8M亜硝酸ナトリウムと2M酢酸の等量混合による抽出抗原の検出感度が最も高く、*S. mutans* の血清型 *c/e* 型間、血清型 *e/f* 型間あるいは *S. sobrinus* 血清型 *d/g* 型間で交叉反応を生じるものの、その他のレンサ球菌とは反応せず、反応特異性も優れていることが明らかにされた。

つぎに、日本人小児（平均年齢5.7歳、168名）からプラークを採取し、その0.1mgを亜硝酸抽出法により抗原液を調製した。各抗原液を抗*c*、抗*e*、抗*f*、抗*d*および抗*g*抗体感作ラテックス粒子とそれぞれ反応させ、最大の凝集活性を示した試験結果とMSB寒天平板培地を用いて算出したプラーク中のミュータンスレンサ球菌数との間には推計学的に有意の正の相関（ χ^2 -検定、 $p < 0.0001$ ）が示された。また、*S. sobrinus d*型菌のみが検出された検体（1名）は抗*d*型抗体感作ラテックス粒子とのみ反応した。同検体を除き、5つの血清型に対する抗体感作ラテックス粒子のいずれかに陽性反応を示した検体（116名）はすべて抗*c*および抗*e*型抗体感作ラテックス粒子のいずれかとも反応した。この結果から、日本人小児のプラーク中のミュータンスレンサ球菌は、抗*c*および抗*e*型抗体感作ラテックス粒子を組み合わせた凝集試験で十分検出できることが明らかになった。また、培養法によってミュータンスレンサ球菌の検出された142検体のうちの116検体の抽出抗原は、抗*c*あるいは抗*e*型抗体感作ラテックス粒子のいずれかと反応し、この2種のラテックス凝集試験を用いたときの感度は81.7%で、ミュータンスレンサ球菌の検出されなかった26検体はすべてこれらの感作ラテックス粒子とは反応せず、特異度は100%と算出された。また、抗*c*、抗*e*あるいは抗*f*型抗体感作ラテックス粒子のいずれかと反応したプラーク中には血清型 *c/e/f* のうち少なくとも1種以上の血清型の *S. mutans* が培養法によって検出され、また抗*d*あるいは抗*g*型抗体感作ラテックス粒子と反応した検体中には *S. sobrinus d* あるいは *g* 型菌のいずれかが検出された。さらに、上記被験者中91名について、プラークの抽出抗原と抗*c*あるいは抗*e*型抗体感作ラテックス粒子との凝集活性は齲蝕歯面数および齲蝕経験歯面数との間に有意の正の相関（ $p < 0.0001$ ）を示した。一方、唾液中のミュータンスレンサ球菌数も、齲蝕歯面数や齲蝕経験歯面数との間に有意の正の相関（ $p < 0.005$ ）を認めた。

以上の結果は抗*c*および抗*e*型抗体感作ラテックス粒子とプラークの亜硝酸抽出抗原との間の凝集試験は日本人小児のプラーク中のミュータンスレンサ球菌を迅速・簡便かつ高感度に検出するだけでなく、齲蝕の病因論に基づく齲蝕活動性試験として臨床応用できることを示唆している。

論文の審査結果の要旨

本研究は、病原性細菌やウィルスの迅速・簡便な検出・同定法として近年注目されているラテックス凝集試験法をミュータンスレンサ球菌に応用して、同菌の存否あるいは多寡を診断する方法を確立し、齲蝕の現症あるいは既往との相関関係を調べることによって、齲蝕活動性試験としての応用の可能性を検討したものである。

その結果、血清型 *c, e, f, d* および *g* 型のミュータンスレンサ球菌の全菌体に対するウサギ IgG 抗

体を吸着させたラテックス粒子が、純培養した同一血清型のミュータンスレンサ球菌の亜硝酸抽出抗原と凝集反応を示し、血清型 *c/e/f* 型の *S. mutans* 間あるいは血清型 *d/g* 型の *S. sobrinus* 間で交叉反応を示すものの、両菌種間あるいはその他のレンサ球菌を明確に識別できることを明らかにした。また、デンタルプラークから直接亜硝酸抽出して得た抗原液と各血清型に対する抗体感作ラテックス粒子との凝集反応の活性に応じて、プラーク中のミュータンスレンサ球菌の存否、多寡および菌種を評価することも明らかにした。さらに、プラークを用いたラテックス凝集試験の判定結果が、被験小児の齲蝕経験歯面数と強く相関していることも示した。これらの結果は本試験法が齲蝕原性細菌であるミュータンスレンサ球菌を直接指標とした齲蝕活動性試験として応用できることを示している。

以上のように、その成果が小児歯科における齲蝕の治療と予防の両面で将来大きく役立つことが期待されるこの研究は、歯学博士の学位請求に値するものであると認める。