OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	S-PRGフィラー溶出液のStreptococcus mutans におけるう蝕原性抑制メカニズムの解析
Author(s)	森田, 有美子
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72251
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　森田 有美子　　）	
論文題名	S-PRGフィラー溶出液の *Streptococcus mutans* におけるう蝕原性抑制メカニズムの解析

論文内容の要旨

【はじめに】

S-PRGフィラーは、6種類のイオン（Na^+, BO_3^{3-}, Al^{3+}, SiO_3^{2-}, F^-, Sr^{2+}）を徐放するバイオアクティブ機能性ガラスであり、様々な歯科材料に応用されてきている。近年、S-PRGフィラーに対する歯科材料学的な研究が進んできているが、う蝕病原性細菌への影響に関する研究はあまり進展していない。本研究では、S-PRGフィラー溶出液存在下における*Streptococcus mutans*の増殖や遺伝子発現およびう蝕病原性に及ぼす影響について分析することにした。

【材料および方法】

１. S-PRGフィラー溶出液および供試菌の調整

S-PRGフィラーと蒸留水を混合・撹拌しフィラーを除去することにより、6種類のイオンを徐放するS-PRGフィラー溶出液を調整した。このS-PRGフィラー溶出液は、0%、6.3%、12.5%、25.0%の各濃度に調整し分析に用いた。供試菌として、日本人小児口腔由来の*S. mutans* MT8148株（血清型*c*）を用いた。また、マイクロアレイ法による分析には、MT8148株に加え米国人口腔由来の標準株であるUA159株（血清型*c*）を使用した。

２. *S. mutans*の増殖能の分析

各濃度のS-PRGフィラー溶出液を加えたBrain Heart Infusion（BHI）液体培地に、1×10^3～1×10^8 CFU/mlに調整した*S. mutans* MT8148株をそれぞれ添加し、37℃で18時間培養した。培養後S-PRGフィラーによる*S. mutans*に対する増殖抑制効果をMitis-Salivarius-Bacitracin（MSB）寒天培地に播種するとともに、菌液の濁度を測定することにより評価した。次に、供試菌を1.0×10^7 CFU/mlに調整し、各濃度のS-PRGフィラー溶出液を添加したBHI液体培地に播種した。これらの供試菌が対数増殖期を経て静止期に到達するまでの時間を1時間ごとに計測するとともに、供試菌液を2日ごとにMSB寒天培地に播種することにより、培養液中に存在する菌数を測定した。

３. *S. mutans*の遺伝子発現変化についての網羅的解析

各濃度のS-PRGフィラー溶出液を添加したBHI液体培地に1.0×10^7 CFU/mlの供試菌を播種し、37℃で18時間培養後RNA抽出を行なった。その後、UA159株の全ゲノムを基に設計されたDNAマイクロアレイ用プローブと反応させハイブリダイゼーションを行い、S-PRGフィラー溶出液を添加することにより発現変化を認めた遺伝子の抽出を行った。

４. *S. mutans*のスクロース依存性付着能の分析

各濃度のS-PRGフィラー溶出液を添加した1%スクロース含有BHI液体培地に、対数増殖期前（1.0×10^7 CFU/ml）および静止期前（1.0×10^9 CFU/ml）の供試菌をそれぞれ播種し37℃、18時間水平から30°に傾けて培養を行った。培養後、3秒間撹拌し浮遊した菌液を別の試験管へと移動させ、もとの試験管に残存した菌に滅菌蒸留水を添加した。その後、OD_{550} 値を測定し、総菌量に対する残存した菌の割合を付着率として算出した。

５. *S. mutans*のバイオフィルム形成能の分析

各濃度のS-PRGフィラー溶出液を添加した0.25%スクロース含有BHI液体培地に、対数増殖期前（1.0×10^7 CFU/ml）および静止期前（1.0×10^9 CFU/ml）の供試菌をそれぞれ播種したものを唾液でコーティングした96穴プレートに加え、37℃で18時間培養した。培養後、形成されたバイオフィルムをクリスタルバイレットで染色しOD_{550}値を測定した。

【結果】

1. *S. mutans*の増殖能の分析

1×10^5 CFU/ml以下の供試菌は37℃で18時間培養した際には、S-PRGフィラー溶出液の濃度依存的に増殖が抑制された。一方で、1×10^6 CFU/mlから1×10^8 CFU/mlの菌数を用いた場合においては、S-PRGフィラー溶出液存在下における明らかな抑制は認められなかった。次に、1.0×10^7 CFU/mlの供試菌を播種し1時間ごとにOD値を測定したところ、S-PRGフィラー溶出液存在下において濃度依存的に供試菌の増殖は遅延した。この後、培養開始10日目にはS-PRGフィラー溶出液非存在下では1.0×10^6 CFU/ml以上の供試菌が認められたのに対し、25.0%S-PRGフィラー溶出液存在下においては菌は全く認められなかった。

2. *S. mutans*の遺伝子発現変化についての網羅的解析

マイクロアレイ法による分析から、菌の増殖や生存に関与するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体をコードする*pdh*オペロン(*pdhA*、*pdhB*、*pdhC*、*pdhD*)、グリコーゲン合成酵素と推定されるタンパクをコードする*glg*オペロン(*glgA*、*glgB*、*glgC*、*glgD*)およびガラクトースとラクトースの代謝に関与する*lac*オペロン(*lacA*、*lacB*、*lacC*、*lacD*、*lacE*、*lacF*、*lacG*)においてS-PRGフィラー溶出液濃度依存的な発現抑制が認められた。一方で、S-PRGフィラー溶出液存在下において発現が増加する遺伝子はほとんど認められなかった。

3. *S. mutans*のスクロース依存性付着能の分析

対数増殖期前の菌を添加した群では、6.3%以上のS-PRGフィラー溶出液を加えた場合においてS-PRGフィラー溶出液非添加群と比較して付着率の有意な低下が認められた。一方で、静止期前の菌においては、25.0%のS-PRGフィラー溶出液を加えた場合においてのみ付着率の有意な低下が認められた。

4. *S. mutans*のバイオフィルム形成能の分析

対数増殖期前の菌を添加した群および静止期前の菌を添加した群の両方において、6.3%以上のS-PRGフィラー溶出液存在下で有意な抑制を認めた。特に、対数増殖期前の菌を用いた群において、より強い抑制効果が認められた。

【考察】

S-PRGフィラーは、*S. mutans*の*pdh*遺伝子群、*glg*遺伝子群および*lac*遺伝子群といった糖代謝に関わる遺伝子群の発現を抑制し、*S. mutans*の増殖抑制および生存率の低下を引き起こすことが分かった。さらに、S-PRGフィラーは、*S. mutans*のスクロースを基質とするグルカンを介した付着やバイオフィルムの形成を抑制し、その抑制は*S. mutans*の代謝が低下していく静止期前の状態よりも代謝が活発な対数増殖期前の状態において顕著であることが明らかとなった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　森田　有美子　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教　授	仲野　和彦
	副査　教　授	今里　聡
	副査　准教授	久保庭　雅恵
	副査　講　師	高橋　雄介

論文審査の結果の要旨

本研究は、機能性ガラスとして歯科材料に用いられている S-PRG フィラーの溶出液を用いて、*Streptococcus mutans* のう蝕原性を抑制するメカニズムに関して検討を行ったものである。その結果、S-PRG フィラー溶出液によって、*S. mutans* の糖代謝に関わる複数の遺伝子の発現が抑制されることで、*S. mutans* の増殖能や生存率を低下させるとともに、スクロース依存性付着能やバイオフィルム形成能を抑制することが示された。

本研究の結果は、S-PRG フィラー溶出液の *S. mutans* におけるう蝕原性抑制メカニズムの一端を解明したものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。