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

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

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻

口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室

森 田　　有 美 子

はじめに

Streptococcus mutans は、ヒトのう蝕の主要な病原性細菌として知られるグラム陽性通性嫌気性レンサ球菌である（Hamada と Slade, 1980）。これまでに、*S. mutans* によるう蝕発症のメカニズムおよび予防法に関する研究が数多くなされており、多くの先進国においてう蝕は減少傾向にあるもののいまだ撲滅には至っていない（Touger-Decker と van Loveren, 2003）。そのため、う蝕のさらなる減少のためには、従来よりもさらに優れたう蝕予防製品の開発が望まれる。

Surface pre-reacted glass-ionomer（S-PRG）フィラーは、酸反応性フッ化物含有ガラスとポリアクリル酸水溶液の反応により、多機能性ガラスコアの外側に安定したグラスアイオノマー相が形成され、その表層を強固なシリカ層で覆われた 3 層構造からなっている（Ikemura ら, 2003)。表層のガラス層と最深部の多機能性ガラスコアにより、S-PRG フィラーは高い物理的強度を有する上に、グラスアイオノマー相からはフッ化物イオン（F^-）、ナトリウムイオン（Na^+）、ホウ酸イオン（BO_3^{3-}）、アルミニウムイオン（Al^{3+}）、ケイ酸イオン（SiO_3^{2-}）、ストロンチウムイオン（Sr^{2+}）の 6 種類のイオンを徐放することを可能としている（Ito ら, 2011）。これらのイオンの働きにより S-PRG フィラーは、口腔内細菌に対する抗菌性、酸中和能、エナメル質の脱灰抑制などのう蝕予防のための効果を有する（Ito ら, 2011）。これまでに、S-PRG フィラーはコンポジットレジン、セメントおよびシーラントなどの様々な歯科材料に応用されている（Ma ら, 2012; Shimazu ら, 2012）。

近年の分子生物学の発展により、様々な生物に対するゲノムプロジェクトが進められてきた。*S. mutans* においては 2002 年に米国人の口腔より分離された UA159 株の全ゲノムの解読が完了し、*S. mutans* は約 200 万の塩基配列からなる約 2,000 の遺伝子により構成されていることが明らかにされている（Ajdić ら, 2002）。その後、米国人由来の口腔分離株である GS5 株、日本人由来の口腔分離株である NN2025 株および LJ23 株の全ゲノムの解析も完了している（Maruyama ら, 2009; Aikawa ら, 2012; Biswas と Biswas, 2012）。全ゲノムの解読に伴い、遺伝子の発現変化を網羅的に解析することのできる DNA マイクロアレイ法が発展してきた。*S. mutans* においても、UA159 株の全ゲノムをもとに設計されたマイクロアレイ用プローブが開発されており、*S. mutans* 菌株の全ての遺

伝子の発現変化を詳細に分析することが可能となっている。

う蝕発症のメカニズムにおいて、*S. mutans* によるスクロース代謝が関与することが明らかにされており、この代謝は *S. mutans* の細胞内の代謝と細胞外の代謝に大別される（Sato ら, 2015）。*S. mutans* において、細胞内におけるスクロース代謝は、増殖や生存のために必須の因子であり、エムデン・マイヤーホフ経路を中心とした解糖系で主に増殖期に観察される（Renye ら, 2004; Busuioc ら, 2010; Sato ら, 2015）。

S. mutans がう蝕を誘発するためには、歯面への付着能が重要である（Hamada と Slade, 1980）。エナメル質の表面には、ペリクルあるいは獲得被膜と呼ばれる厚さ約 1μm の無色透明な有機質の膜が存在し、歯面清掃を行いペリクルを除去したとしてもその数分後には再び形成される（Chase, 1926）。*S. mutans* は細胞壁に局在している菌体表層タンパクとペリクル中の糖やタンパク質との結合を介して歯面への初期付着を生じる（Koga ら, 1990）。*S. mutans* による歯面への初期付着が生じるメカニズムの一つとして、*S. mutans* の菌体表層に存在する分子量約 190 kDa のタンパク抗原である PA の疎水基とペリクル中の疎水基による疎水結合が知られている（Koga ら, 1990）。*S. mutans* による疎水結合による初期付着能は、*in-vitro* 系の分析においても菌体疎水性の実験として評価することが可能である。

S. mutans は、細胞外のスクロース代謝によって、ペリクルを介した初期付着よりも強固に歯面に付着することが可能となる（Sato ら, 2015）。このようなスクロース依存性の付着は、*S. mutans* がスクロースをグルコースとフルクトースに分解後、グルコース部分を結合させグルカンと呼ばれる粘着性で不溶性の重合体を合成することにより生じる（Colby と Russell, 1997）。このグルカン合成においてグルコシルトランスフェラーゼ（Glucosyltransferase ; GTF）が主要な病原因子と考えられており、GTFB, GTFC, GTFD の 3 種が同定されている（Aoki ら, 1986; Pucci ら, 1987; Hanada と Kuramitsu, 1989）。そして、GTF に着目した研究から、*S. mutans* のスクロース依存性付着能や、付着後のバイオフィルム形成能を評価するような *in-vitro* 系の分析法が構築されている（Kawabata と Hamada, 1999; Matsumoto-Nakano と Kuramitsu, 2006）。GTF などの働きにより、スクロースの代謝産物として粘着性グルカンに加えて酸が産生され、歯質が脱灰されう蝕は進行していくとされている（Ooshima ら, 2001）。

これまでに、S-PRG フィラー含有コンポジットレジンの表面では、S-PRG フ

ィラーから溶出するホウ酸イオン（BO_3^{3-}）とフッ化物イオン（F^-）の存在により、*S. mutans* の増殖を有意に抑制することが明らかにされている（Miki ら, 2016）。このように、S-PRG フィラーによる *S. mutans* に対する抗菌効果は示されているが、その詳細については未だ不明な点が多い。そこで、S-PRG フィラーの菌の増殖抑制効果において詳細なメカニズムを検討する必要があると考えられた。

本研究の目的は、S-PRG フィラーと滅菌蒸留水を混合し上清を採取することにより調製された S-PRG フィラー溶出液が、*S. mutans* のう蝕病原性にどのような影響を及ぼすか詳細に検討することである。そのために、S-PRG フィラー溶出液の *S. mutans* に対する増殖抑制効果を評価するとともに、マイクロアレイ用プローブを用いて S-PRG フィラー溶出液存在下での *S. mutans* の遺伝子発現変化に関する網羅的解析を行うことにした。また、*S. mutans* の菌体疎水性、スクロース依存性付着およびバイオフィルム形成能に及ぼす影響を分析することにより、S-PRG フィラー溶出液のう蝕病原性に対する抑制効果についても検討を行うことにした。

材料および方法

1. S-PRGフィラー溶出液の調製方法

S-PRGフィラー溶出液は、Fujimoto ら（2010）の方法に準じて調製され、株式会社松風（京都）より提供された。まず、S-PRGフィラーと等量の蒸留水を24時間室温で混合した後、23℃、3,000×rpmで6時間遠心分離しフィラーと水層を分離した。採取した上清は、 孔径0.45μmのフィルターを用いてろ過し、得られたろ液をS-PRGフィラー溶出液として使用した。S-PRGフィラー溶出液から放出されたイオンの濃度は、Al^{3+}、BO_3^{3-}、Na^+、SiO_3^{2-}および Sr^{2+}については誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICPS-8000，島津製作所 ，京都）を用いて測定し、F^-の濃度はイオン選択性電極メーター（Model 720A，Orion Research Inc., Beverly, MA, USA）を用いてF^-電極（Model 9609BNWP, Orion Research Inc.）により測定した。S-PRGフィラー溶出液に含まれている各々のイオン濃度は、Al^{3+}=19.6 ppm、BO_3^{3-}=1,656.5 ppm、Na^+= 618.5 ppm、SiO_3^{2-}=13.9 ppm、Sr^{2+}=126.8 ppmおよびF^-=141.0 ppmであった。S-PRGフィラー溶出液は、Brain Heart Infusion（BHI ; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA）を用いて0%、6.3%、12.5%、25.0%の濃度に希釈調整し実験に使用した。

2. *S. mutans*菌株と培養条件

S. mutans MT8148 株（血清型：*c*）および UA159 株（血清型：*c*）は、当教室で保有する実験室株（Ooshima ら, 1983; Ajdić ら, 2002）を使用した。また、*Streptococcus sobrinus* B13 株と *Streptococcus gordonii* ATCC 10558 株も当教室で保有する株（Kobayashi ら， 1989； Nagata ら， 2011）を使用した。これらの菌株は BHI 液体培地中では 37℃で 18 時間培養し、実験に使用した。また、*S. mutans* および *S. sobrinus* の培養には、Mitis-salivarius（MS）寒天培地（Becton Dickinson）にバシトラシン（100 unit/ml ; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA）と 15%スクロース（和光純薬, 大阪）を添加した MSB 寒天培地を用い、*S. gordonii* の培養には MS 寒天培地を用いた。

3. S-PRGフィラー溶出液による細菌の生存率に関する分析

増殖抑制効果の分析は、Sasakiら（2004）の方法に修正を加えて実施した。まず、10mlのBHI液体培地を用いて37℃で18時間培養した*S. mutans* MT8148株を3,000 rpmで10分間遠心分離することにより菌体を回収した後、OD_{550}=1.0に調節することにより1.0×10^9 CFU/ml相当の菌液を準備した。この菌液を用いて1.0×10^3～1.0×10^8 CFU/ml相当の菌数となるよう希釈したものに、各濃度のS-PRGフィラー溶出液を添加し37℃で18時間培養後、菌液の濁度を吸光度計（ベルトールドジャパン株式会社, 東京）を用いて測定した。また、この菌液を段階希釈したものをMSB寒天培地に播種し37℃で48時間培養後コロニー数を計測した。次に、増殖能の経時的変化を調べるために、各濃度のS-PRGフィラー溶出液存在下において、MT8148株を対数増殖期前の1.0×10^7 CFU/mlもしくは静止期前の1.0×10^9 CFU/mlに調整し、菌液が静止期に達するまでの時間を1時間ごとに吸光度計を用いて測定した。さらに、各濃度のS-PRGフィラー溶出液存在下において1.0×10^7 CFU/mlに調整した細菌の生存率を、48時間ごとに菌液をMSB寒天培地に播種することにより測定した。*S. sobrinus* B13株と*S. gordonii* ATCC 10558株に関しては、BHI液体培地中の1.0×10^5CFU/mlの菌液を対数増殖期前、1.0×10^9CFU/mlの菌液を静止期前の菌液として、菌液をMSB培地もしくはMS培地に播種し37℃で48時間培養後に菌数を測定することにより、S-PRGフィラー溶出液による増殖抑制効果を分析した。全ての分析は、５回の実験の平均値と標準偏差を求めることにより分析結果とした。

4. DNAマイクロアレイを用いた*S. mutans*の遺伝子に対する網羅的解析

S-PRG フィラー溶出液存在下における *S. mutans* の遺伝子発現変化を明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いて *S. mutans* における遺伝子の発現変化の網羅的解析を行った。まず、1.0×10^7 CFU/ml の *S. mutans* MT8148 株および UA159 株を含む BHI 液体培地に、各濃度の S-PRG フィラー溶出液を添加し 37℃で 18 時間培養後、Amino-allyl MessageAmp aRNA キット（Ambion, Inc., Austin, TX, USA）を用いて RNA 抽出を行った。RNA サンプルの純度および濃度は、NanoDrop One（Thermo Fisher Scientific）および Agilent 2100 バイオアナライザー（Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA）を用いて各サンプルの A_{260}/A_{230} 値および A_{260}/A_{280} 値がそれぞれ 2.0 を超えていることを確認するとともに、50～440 ng/μl

の濃度であることを確認した上で最小濃度である 50 ng/μl に調節しマイクロアレイ解析に使用した。

マイクロアレイ解析は、Agilent Technologies により製造されたマイクロアレイ解析用の製品を用いて、メーカーのプロトコールに従ってタカラバイオ株式会社（大阪）により実施された。まず、Cy3 相補的 RNA を Low Input Quick Amp Labeling Kit（Agilent Technologies）を用いて、RNA を鋳型として生成した cDNA を Cy３により標識し、Agilent Expression Array キット上の *S. mutans* UA159 株の全ゲノムとハイブリダイゼーションを行った。次に、Gene Expression Wash Buffers Pack（Agilent Technologies）によりサンプルを洗浄した後、ハイブリダイゼーション画像を Agilent Microarray Scanner（G2565CA）（Agilent Technologies）を使用して解析し、Agilent Feature Extraction software（Agilent Technologies）を使用して定量的データを取得した。得られたデータから、S-PRG フィラー溶出液非添加時と比較して 6.3%、12.5%および 25.0%の S-PRG フィラー溶出液存在下において発現増加もしくは減少の認められた遺伝子のうち、2 倍以上の変化の認められた遺伝子を抽出した。

5. スクロース依存性付着能の分析

スクロース依存性付着能の分析は、Kawabata と Hamada（1999）の方法を修正して行った。対数増殖期前の *S. mutans* MT8148 株と *S. sobrinus* B13 株によるスクロース依存性付着能の分析では、10ml の BHI 液体培地に 37℃で 18 時間培養した供試菌を遠心分離後、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 液体培地を用いて 1.0×10^{7} CFU/ml となるよう調整し、30°に傾けた状態で 37℃で 18 時間培養した。まず、S-PRG フィラー溶出液が培養液中の菌数に影響していないことを確認するために、培養した菌液を剥離し超音波処理を行った後に OD_{550} 値を測定するとともに、菌液を MSB 寒天培地上に播種し培養することによりコロニー数を測定した。スクロース依存性付着能の実験では、菌数測定用とは別に準備しておいた 37℃で 18 時間培養後の菌液をボルテックスミキサーを用いて 3 秒間攪拌させ、ガラス壁から剥離した非付着菌を新しい試験管に移した。その後、ガラス壁に残存した付着菌はラバースクレーパーを用いて除去した。付着菌液と非付着菌液のそれぞれを含む試験管を超音波処理し、菌液の濁度を吸光度計を用いて測定した。全菌数は、OD_{550}（付着菌+非付着菌）として計算し、付着率（%）は（付着細菌の OD_{550} 値）/（全菌数の OD_{550} 値）の百分率を

計算することにより求め、5 回の実験の平均値と標準偏差を分析結果とした。静止期前の *S. mutans* MT8148 株と *S. sobrinus* B13 株のスクロース依存性付着能の分析は、Ooshima ら（2001）の方法に従って行った。供試菌を培養後、S-PRG フィラー溶出液存在下で 1%スクロース含有 BHI 液体培地を用いて 1.0×10^9CFU/ml に調整し、試験管を 30°の角度に傾けた状態で、37℃で 18 時間培養した。菌数の確認と付着率の測定は前述の対数増殖期前の菌を用いた場合と同様の方法により行った。

6. バイオフィルム形成能の分析

バイオフィルム形成能の分析は、Ardinら（2014）の方法に修正を加えて実施した。健康なヒトより採取した唾液を12,000 rpmで10分間遠心分離した後、上清を孔径0.45μmのフィルターを用いてろ過した。この唾液を滅菌蒸留水を用いて25%となるよう調整し、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに200μlずつ加え37℃で2時間静置した。対数増殖期前の*S. mutans* MT8148株と*S. sobrinus* B13株によるバイオフィルム形成能の分析では、10mlのBHI液体培地で37℃で18時間培養した供試菌を遠心分離した後に、S-PRGフィラー溶出液を含む0%、0.25%または1%のスクロース含有BHI液体培地中を用いて1.0×10^7 CFU/mlとなるよう調整した。次に、ヒトの唾液を添加した96穴マイクロタイタープレートをPBSで洗浄後、200μlの菌液を加え37℃で24時間培養した。培養後、プレートをPBSで3回洗浄することにより浮遊した菌液を除去し、形成されたバイオフィルムを25%ホルムアルデヒドにより10分間固定後、0.05%のクリスタルバイオレット水溶液（Sigma-Aldrich）を用いて5分間室温で染色した。PBSで3回洗浄後、95%エタノールを用いて溶解させたバイオフィルムのOD_{595}値を、マイクロプレートリーダー（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を用いて測定し、5回の実験の平均値と標準偏差を分析結果とした。また、静止期前の*S. mutans* MT8148株と*S. sobrinus* B13株によるバイオフィルム形成能の分析は、培養した菌液を遠心後、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液体培地で1.0×10^9 CFU/mlとなるように調整した菌液を用いて、前述の対数増殖期前の分析と同様にして形成されたバイオフィルム形成量の解析を実施した。

共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルムの解析は、Kuboniwa ら（2006）の方法に修正を加えて実施した。一晩培養した *S. mutans* MT8148 株を 3,000× rpm で 10 分間遠心分離後、5μl の 10 mM hexidium iodide（Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA）を含む 1 ml の蒸留水に菌体を懸濁し、暗所室温で 15 分間静置した。この供試菌液は、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 液体培地で 1.0×10^7 CFU/ml となるように調整した。次に、ろ過したヒトの唾液を滅菌蒸留水で 25％に希釈したものを塗布したチャンバースライド（CultureWell^{TM}, Grace Bio Labs, Bend, OR, USA）に 200 µl の菌液を加え 37℃で 18 時間培養した。培養後、形成されたバイオフイルムを PBS により洗浄し、TCS-SP5 顕微鏡 （Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany）の 63×油浸対物レンズを用いて、488nm の波長におけるバイオフィルムを観察した。バイオフィルムの厚さは、取り込まれた画像を Z 軸において等間隔に 10 分割し、それぞれの厚みを測定することにより、厚みの平均値と標準偏差を計算した。

7. 菌体疎水性の分析

菌体疎水性は、Rosenbergら（1983）の方法に修正を加えて実施した。10mlのBHI液体培地にて37℃で18時間培養した*S. mutans* MT8148株を遠心分離した後、S-PRGフィラー溶出液存在下でOD_{550}=0.6となるよう調整した。この菌液は、S-PRGフィラー溶出液と菌液との反応時間を設けず菌体疎水性の分析を行う群と、S-PRGフィラー溶出液と菌液を18時間反応させてから菌体疎水性を調べる群のそれぞれについて準備した。18時間反応させた群については、反応後菌数に影響が及んでいないことを確認するために菌液をMSB寒天培地に播種した。菌体疎水性の分析は、3mlの菌液に200µlのn-ヘキサデカン（和光純薬）を添加したものを、ボルテックスミキサーで1分間撹拌した後10分間室温で静置し、水相のOD_{550}値を測定することにより行った。菌体疎水性は、［1 −(n−ヘキサデカンを添加した菌液を含む試験管の水相のOD_{550} 値)/(菌液のみを含む試験管の水相のOD_{550} 値)］の百分率を計算することにより求め、5回の実験の平均値と標準偏差を分析結果とした。

8. 統計分析

統計分析は GraphPad Prism 6（GraphPad Softwave Inc., La Jolla, CA, USA）を用いた。統計学的有意差の検定には、ANOVAの後、post-hoc解析としてBonferroni法により有意水準5%以下を有意差ありとした。

結果

1. S-PRG フィラー溶出液による *S. mutans* に対する増殖抑制効果

S-PRGフィラー溶出液は、37℃、18時間の反応において、対数増殖期前の1.0×10^3～1.0×10^5 CFU/mlの菌液による細菌増殖を著しく抑制した（図1、2）。この抑制は、菌液のOD_{550}値とMSB寒天培地上の菌数の両方に関して、S-PRGフィラー溶出液の濃度依存的に認められた。一方、濃度が1.0×10^6～1.0×10^8 CFU/mlの菌液を加えた場合においては、S-PRGフィラー溶出液の濃度依存的にOD_{550}値がやや低下する傾向が認められたものの、MSB寒天培地上の細菌数の著しい低下は見られなかった。そこで、S-PRGフィラー溶出液存在下において増殖抑制が認められなかった1.0×10^7 CFU/mlに調製した菌液を、以降の実験で主として使用することとした。まず、各濃度のS-PRGフィラー溶出液存在下における1.0×10^7 CFU/mlの*S. mutans*の増殖能の経時的変化を調べたところ、S-PRGフィラー溶出液非存在下では、*S. mutans*は培養7時間で静止期に至った（図3）。一方で、*S. mutans*が静止期に至るまでの時間は、S-PRGフィラー溶出液の濃度依存的に延長し、25%のS-PRGフィラー溶出液存在下ではS-PRGフィラー溶出液非存在下の約2倍の時間を要した。また、各濃度のS-PRGフィラー溶出液存在下において、1.0×10^7 CFU/mlの*S. mutans*が静止期に至った後の生存率を長期的に観察したところ、2日間培養後には、各濃度のS-PRGフィラー溶出液存在下において*S. mutans*のコロニー数に差は認められなかった（図4）。その後、*S. mutans*のコロニー数はS-PRGフィラー溶出液の濃度依存的に減少し、25%のS-PRGフィラー溶出液存在下においては、10日間培養後に菌は完全に死滅した。

2. DNA マイクロアレイを用いた *S. mutans* の遺伝子に対する網羅的解析

BHI 液体培地中の 1.0×10^7 CFU/ml の *S. mutans* MT8148 株および UA159 株に、0%、6.3%、12.5%、25.0%の各濃度の S-PRG フィラー溶出液を添加し 37℃、18 時間培養したものを用いて、マイクロアレイ解析を行った。まず、S-PRG フィラー溶出液非添加時と比較して 6.3%、12.5%および 25%の S-PRG フィラー溶出液

を添加した菌液全てにおいて、MT8148 株と UA159 株の両方で発現抑制が認められた遺伝子をピックアップしたところ、8 種類の遺伝子が抽出された（図 5、6）。これらの遺伝子のうち、*S. mutans* の生存に重要な役割を果たし、糖代謝と密接に関与するピルビン酸脱水素酵素（PDH）複合体をコードする遺伝子である *pdhA*、*pdhB*、*pdhC* および *pdhD* において、著しくその発現抑制が認められた（図 7）。

次に、6.3%を除いた 12.5%と 25.0%の S-PRG フィラー溶出液存在下において、MT8148 株と UA159 株の両方で発現が抑制される遺伝子をピックアップしたところ、9 個の遺伝子が抽出された（図 8、9）。これらの遺伝子のうち、グリコーゲン合成酵素と推定される酵素をコードする 4 個の遺伝子である *glgA*、*glgB*、*glgC*、*glg*D は、S-PRG フィラー溶出液の濃度依存的に発現の低下が認められた（図 10）。さらに、S-PRG フィラー溶出液非添加時と比較して、6.3%、12.5%、25.0%の S-PRG フィラー溶出液を添加した菌液において、MT8148 株または UA159 株のいずれかで発現抑制が認められた遺伝子をピックアップしたところ、40 個の遺伝子（MT8148 株と UA159 株において同定されたそれぞれ 8 個と 32 個の遺伝子）が抽出された（図 11、12）。これらの遺伝子のうち、*S. mutans* におけるガラクトースとラクトースの代謝に関与し *lac* オペロンを形成する *lacA*、*lacB*、*lacC*、*lacD*、*lacE*、*lacF*、*lacG*、*lacX* は、UA159 株において濃度依存的に発現抑制が認められた（図 13）。一方で、S-PRG 非添加時と比較して、6.3%、12.5%および 25.0%の S-PRG フィラー溶出液を添加した条件全てにおいて、MT8148 株と UA159 株の両方で発現が増加した遺伝子は存在しなかった。6.3%を除いた 12.5%と 25.0%の S-PRG フィラー溶出液を添加した菌液において、MT8148 株と UA159 株の両方で発現の増加している遺伝子をピックアップしたところ、3 個の遺伝子がピックアップされた（図 14、15）。しかしながら、これらの遺伝子における発現増加量は、高濃度の S-PRG フィラー溶出液存在下においても低い値を示した。さらに、6.3%、12.5%および 25.0%の全ての S-PRG フィラー溶出液を添加した条件において、MT8148 株または UA159 株のいずれかで発現の増加が認められた遺伝子をピックアップしたところ、10 個の遺伝子（MT8148 株と UA159 株において同定されたそれぞれ 6 個と 4 個の遺伝子）が同定されたが（図 16）、これら全ての遺伝子の発現の増加量は小さく、S-PRG フィラー溶出液による濃度依存性も認められなかった（図 17）。

3. S-PRGフィラー溶出液による*S. mutans*の主要なう蝕病原性に対する影響

1）スクロース依存性付着能の分析

スクロース依存性付着能の分析を行うにあたり、各濃度の S-PRG フィラー溶出液および 1×10^7CFU/ml の MT8148 株を含む培地において、37℃で 18 時間培養後に細菌数に差が無いことを菌液の濁度および菌液を播種したMSB寒天培地上のコロニー数により確認した（図 18、19）。*S. mutans* のスクロース依存性付着は、S-PRG フィラー溶出液非添加群と比較して S-PRG フィラー溶出液の濃度依存的に有意に抑制された（$P<0.05$）（図 20）。

2）バイオフィルム形成能の分析

バイオフィルムの形成量は、1×10^7CFU/ml の MT8148 株を加え 37℃で 18 時間培養した 0.25%スクロース含有 BHI 液体培地で S-PRG フィラー溶出液の濃度依存的に有意に抑制された（$P<0.001$）（図 21、22）。また、バイオフィルムの厚さにおいても、S-PRG フィラー溶出液の濃度依存的に有意な抑制が認められた（$P<0.001$）（図 23、24）。S-PRG フィラー溶出液による同様の抑制が、1%スクロース含有 BHI 液体培地を用いて菌を培養した場合においても確認された（図 25）。一方、S-PRG フィラー溶出液の有無にかかわらず、スクロースの非存在下ではバイオフィルムの形成能はほとんど認められず有意差はなかった（図 26）。

3）菌体疎水性の分析

各濃度の S-PRG フィラー溶出液を添加した直後における *S. mutans* の菌体疎水性を評価したところ、S-PRG フィラー溶出液による菌体疎水性への影響は認められなかった（図 27）。次に、S-PRG フィラー溶出液を *S. mutans* の菌液に添加し 18 時間反応させた後に菌体疎水性を評価したところ、S-PRG フィラー溶出液は細菌数に影響を及ぼさず（図 28）、S-PRG フィラー溶出液の濃度依存的に菌体疎水性の有意な抑制が認められた（$P<0.05$）（図 29）。

4. 静止期前の *S. mutans* に対する S-PRG フィラー溶出液の抑制効果

静止期前の 1.0×10^9 CFU/ml に調整した *S. mutans* を用いて増殖能の分析を行ったところ、S-PRG フィラー溶出液の濃度依存的に菌液の濁度が低下する傾向が認められたが、菌液中に含まれる細菌数に影響は認めらなかった（図 30、31）。また、各 S-PRG フィラー溶出液の存在下における菌の増殖能の経時的変化を調べたところ、いずれの菌液も培養後 2～3 時間後に静止期に到達した（図 32）。静止期前の *S. mutans* によるスクロース依存性付着とバイオフィルム形成能は、

S-PRG フィラー溶出液の存在下において抑制されたが、対数増殖期前の 1.0×10^7 CFU/ml の *S. mutans* を使用した場合に認められた抑制効果ほど著しくはなかった（図 33、34）。

5. 他の口腔レンサ球菌に対する S-PRG フィラー溶出液の抑制効果

S-PRG フィラー溶出液は、う蝕原性細菌である *S. sobrinus* B13 株に対して、対数増殖期前の菌に対する増殖抑制を認めたが、静止期前の菌に対しては抑制を認めなかった（図 35、36）。また、非う蝕原性細菌である *S. gordonii* ATCC 10558 に対しては、対数増殖期前の菌に対してのみわずかに抑制を認めた（図 37、38）。また、S-PRG フィラー溶出液は、対数増殖期および静止期前の *S. sobrinus* によるスクロース依存性付着を抑制したが、その抑制は対数増殖期前の菌に対してより顕著であった（$P<0.05$）（図 39、40）。さらに、S-PRG フィラー溶出液は、6.3% の低濃度条件下においても *S. sobrinus* によるバイオフィルム形成能を有意に抑制したが、その抑制は対数増殖期前の菌に対してより顕著であった（$P<0.001$）（図 41、42）。

考察

最近の研究において、S-PRG フィラーが *S. mutans* におけるう蝕原性の抑制効果を示すことが明らかにされている（Hotta ら, 2014; Miki ら, 2016）。しかしながら、これらの研究は S-PRG フィラーを含有する歯科材料の性質を分析することを主な目的として行われたものであり、S-PRG フィラーが *S. mutans* に及ぼす影響の詳細については明らかとなっていない。本研究では、S-PRG フィラー溶出液の *S. mutans* に対する増殖抑制効果に加え、S-PRG フィラー溶出液存在下における *S. mutans* の全ゲノムの網羅的解析、および *S. mutans* の主要なう蝕病原性に対する影響に焦点を当てて検討を行った。

S-PRG フィラーは、シーラント、コンポジットレジン、セメント、ボンディング材および歯面研磨剤などの歯科材料に広く応用されている（Ma ら，2012；Shimazu ら，2012）。これらの歯科材料には、約 10%から 40%ほどの S-PRG フィラーが配合されている（Ma ら，2012 ; Shimazu ら，2012）。それぞれの歯科材料の材質や、配合されている S-PRG フィラーの粒子径などによって、徐放されるイオンの量に違いはあるものの、本研究において使用した 6.3%、12.5%、25.0%の S-PRG フィラー溶出液濃度は、歯科材料に含まれる S-PRG フィラー濃度と類似していることから、本研究で認められた S-PRG フィラー溶出液による *S. mutans* に対する抑制効果は、臨床的に用いられている歯科材料においても期待できるものと考えられる。

S-PRG フィラーから徐放される 6 種類のイオンは、市販されている S-PRG フィラー含有のコンポジットレジンにおいて、互いに干渉することなく徐放されることが確認されている（Miki ら, 2016）。また、レジンブロックを被覆した唾液中においても、全てのイオンが徐放されていることが確認されている（Hotta ら, 2014）。S-PRG フィラー含有のコンポジットレジンから徐放されるイオンのうち、BO_3^{3-}および F^-が *S. mutans* の糖代謝による酸産生を抑制することが示されていることから（Kitagawa ら, 2018）、本研究においても BO_3^{3-}や F^-が *S. mutans* によるう蝕原性の抑制に関与している可能性が高いと考えられる。

S-PRG フィラー溶出液が、*S. mutans* の増殖能や生存率を抑制する際に影響を及ぼしている *S. mutans* の遺伝子を同定するために、DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、S-PRG フィラー溶出液存在下において *S. mutans* の複数の遺伝子

の発現変化が認められた。それらの遺伝子の多くは、S-PRG フィラー溶出液が存在することにより発現が抑制され、100 倍以上の発現抑制が生じる遺伝子も存在した。一方で、S-PRG フィラー溶出液が存在することにより発現が増加した遺伝子はほとんど認められなかった。これらの結果から、S-PRG フィラー溶出液存在下での *S. mutans* の増殖や生存に対する抑制効果は、主として *S. mutans* の複数の遺伝子の発現低下により誘導されることが示された。

S-PRG フィラー溶出液存在下で発現の抑制が認められた遺伝子のうち、*pdh* オペロン、*glg* オペロンおよび *lac* オペロンにおいて濃度依存的な発現低下が認められた。これらの 3 種類のオペロンは、*S. mutans* の糖代謝において重要な役割を担っていることが知られている（Busuioc ら, 2010; Zeng ら, 2010）。このことから、S-PRG フィラー溶出液存在下では、これらのオペロンの発現が抑制されることにより *S. mutans* の糖代謝が抑制され、増殖能や生存率が抑制されていると考えられる。

PDH 複合体は、*pdhD*、 *pdhA*、 *pdhB* および *pdhC* の遺伝子からなるオペロンにコードされており、エムデン・マイヤーホフ経路による解糖系を介した糖代謝により産生されるピルビン酸をアセチル CoA と CO_2 に変換する（Carlsson ら, 1985）。そして、*pdhD* 遺伝子を欠失させた変異株は親株と比較して著しく生存率が低下することが示されていることから（Busuioc ら, 2010）、S-PRG フィラー溶出液が *pdhD* 遺伝子の発現を低下させることにより *S. mutans* の生存率を低下させていると考えられる。また、*glgB*、*glgC*、*glgD*、*glgA* および *glgP* からなる *glg* オペロンは、高濃度の S-PRG フィラー溶出液の存在下において発現抑制を示した。*glg* オペロンは、エムデン・マイヤーホフ経路の上流においてグルコースから産生されたグルコース-リン酸から ADP グルコースを経てグリコーゲン合成に関与することから（Carlsson ら, 1985; Zeng ら, 2010）、高濃度の S-PRG フィラー溶出液の存在下では菌体内におけるグリコーゲンの貯蔵が阻害されていると考えられる。さらに、UA159 株においてのみ抑制が認められた *lacA*、*lacB*、*lacC*、*lacD*、*lacF*、*lacE*、*lacG* および *lacX* からなる *lac* オペロンは、ガラクトースとラクトースの代謝経路に関与することから（Zeng ら, 2010）、S-PRG フィラー溶出液が存在すると特定の *S. mutans* においてガラクトースとラクトースの代謝が阻害されると考えられた。

S. mutans は、唾液中の有機成分が菌の表面に接触することにより形成されるペリクルに付着することにより、歯面へのスクロース非依存性の初期付着を成

立するとされている（Koga ら, 1990）。この初期付着において、*S. mutans* の菌体表層成分の 1 つである分子量 190 kDa のタンパク抗原である PA が、ペリクルと疎水結合を生じることが明らかとなっている（Koga ら, 1990）。S-PRG フィラーは、添加直後には、*S. mutans* の菌体疎水性に影響を及ぼさなかったものの、S-PRG フィラー溶出液添加 18 時間後においては菌体疎水性の有意な抑制効果を示した。このことから、S-PRG フィラー溶出液は、効果を発揮するのに一定の時間を要するものの、*S. mutans* のスクロース非依存性の初期付着を抑制することが示された。

S-PRG フィラーは、口腔レンサ球菌によるバイオフィルムの形成を抑制する（Yoneda ら, 2012; Suzuki ら, 2014）。本研究結果から、S-PRG フィラー溶出液は増殖期前の *S. mutans* においてスクロースに依存した付着能やバイオフィルム形成能といった主要なう蝕病原性を抑制した。一方で、静止期前の *S. mutans* に対する S-PRG フィラー溶出液の抑制効果は増殖期前の *S. mutans* におけるほど顕著ではなかったことから、S-PRG フィラー溶出液は主として増殖期前の *S. mutans* のう蝕病原性を低下させていることが明らかとなった。S-PRG フィラー溶出液存在下において増殖期前の *S. mutans* で顕著な抑制が認められたことから、糖代謝が活発な増殖期前後に発現が増加する *pdh* オペロンや *glg* オペロンなどの遺伝子の発現抑制が、う蝕病原性に何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられる。

S. mutans の全ゲノムの解読により（Ajdić ら, 2002）、*S. mutans* の遺伝子を網羅した DNA プローブが作製されるようになり、この DNA プローブを用いた DNA マイクロアレイ解析による *S. mutans* の遺伝子発現量の網羅的解析が可能となった（Park ら, 2018）。本研究において、S-PRG フィラー溶出液の *S. mutans* に対する増殖抑制効果および DNA マイクロアレイ解析はスクロース非存在下での培養条件下において実施されたのに対し、スクロース依存性のう蝕病原性の評価はスクロース存在下で実施された。このことから、スクロース依存性のう蝕病原性においては、 S-PRG フィラー溶出液は DNA マイクロアレイ解析で抽出された遺伝子とは異なる病原性遺伝子に影響を及ぼした可能性がある。今後は、*S. mutans* のスクロース依存性のう蝕病原性に対する S-PRG フィラー溶出液による抑制メカニズムを明らかにするために、スクロース存在下において培養した *S. mutans* に S-PRG フィラーを添加し DNA マイクロアレイ解析を行う必要があると考えられる。

DNA マイクロアレイ解析において、S-PRG フィラー溶出液が最も著しく発現を抑制した PDH 複合体をコードする遺伝子は、*Mycobacterium tuberculosis* や *Escherichia coli* などの種々の細菌種にも存在しており（Chen ら, 2003; Xu ら, 2006）、これらの細菌の増殖や生存においても重要であることが知られている（Rosenberg ら, 1980）。そこで、*S. mutans* 以外の口腔レンサ球菌種として、*S. mutans* と同様にう蝕病原性細菌として知られる *S. sobrinus* とう蝕誘発能をほとんど持たないとされる口腔レンサ球菌である *S. gordonii* を用いて、S-PRG フィラー溶出液による増殖能への影響を分析した。その結果、いずれの菌株も S-PRG フィラー溶出液の存在下において、主として増殖期前に抑制が認められた。また、*S. sobrinus* によるスクロース依存性のう蝕病原性は、*S. mutans* において認められたのと同様に主として増殖期において顕著な抑制が認められた。これらの結果から、S-PRG フィラー溶出液が *S. mutans* 以外の口腔レンサ球菌に対しても抑制効果を示すことが明らかとなった。

本研究結果から、S-PRG フィラー溶出液は、*S. mutans* の糖代謝に関与する遺伝子の発現を低下させることにより、*S. mutans* が対数増殖期に至る前に増殖を抑制することが示された。また、S-PRG フィラー溶出液は、*S. mutans* のスクロース依存性の付着能やバイオフィルム形成能などの主要なう蝕病原性を抑制した。これらのことから、S-PRG フィラーを配合した歯科材料は、*S. mutans* の増殖能および主要なう蝕病原性に対する抑制効果を示し、う蝕を減少させる有効な手段であることが示唆された。

結論

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解析を行なったところ、以下のことが示された。

1. S-PRG フィラー溶出液は、*S. mutans* の増殖を抑制するとともに生存率を低下させた。
2. S-PRG フィラー溶出液は、*S. mutans* の全遺伝子のうち、糖の代謝に関わるとされる *pdh* オペロン、*glg* オペロンおよび *lac* オペロンの遺伝子発現を低下させた。
3. S-PRG フィラー溶出液は、*S. mutans* のスクロース依存性付着能およびバイオフィルム形成能を抑制した。

以上の結果から、S-PRG フィラー溶出液は、*S. mutans* の糖代謝に関わる遺伝子の発現を抑制することにより増殖能や生存率を低下させるとともに、主要なう蝕病原性を抑制したことから、*S. mutans* によって生じるう蝕の抑制に有効であることが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇意なる御指導および御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室 仲野 和彦 教授に心から謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、終始様々な御指導および御校閲を頂いた大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室 野村 良太 准教授に厚く御礼申し上げます。また、S-PRG フィラー溶出液をご提供頂いた株式会社松風に厚く御礼申し上げます。

最後に、終始研究に対し、御援助、御助力頂いた大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

Aikawa, C., N. Furukawa , T. Watanabe , K. Minegishi , A. Furukawa , Y. Eishi , K. Oshima, K. Kurokawa, M. Hattori, K. Nakano, F. Maruyama, I . Nakagawa and T. Ooshima. 2012. Complete genome sequence of the serotype *k* *Streptococcus mutans* strain LJ23. J Bacteriol. 194, 2754-2755.

Ajdić, D., M. W. McShan, E. R. McLaughlin, S. Gorana, C. Jin, B. M. Carson, P. Charles, T. Runying, K. Steve, J. Honggui, L. Shaoping, Qi. Yudong, L. Shuling, Z. Hua, N. Fares, L. Hongshing, W. Jim, A. B. Roe and J. J. Ferretti. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dentalpathogen. Proc Natl Acad Sci USA. 99, 14434-14439.

Aoki, H., T. Shiroza, M. Hayakawa, S. Sato and H. K. Kuramitsu. 1986. Clonimg of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. Infect Immun. 53, 587-594.

Ardin, A. C., K. Fujita, K. Nagayama, Y. Takashima, R. Nomura and K. Nakano. 2014. Identification and functional analysis of an ammonium transporter in *Streptococcus mutans*. PLoS One. 9, e107569.

Biswas, S. and I. Biswas. 2012. Complete genome sequence of *Streptococcus mutans* GS-5, a serotype *c* strain. J Bacteriol. 4787-4788.

Busuioc, M., B. A. Buttaro and P. J. Piggot. 2010. The *pdh* operon is expressed in a subpopulation of stationary-phase bacteria and is important for survival of sugar-starved *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 192, 4395-4402.

Carlsson, J., U. Kujala and M. B. Edlund. 1985. Pyruvate dehydrogenase activity in *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 49, 674-678 .

Chase, W. B. 1926. The origin, structure, and duration of Nasmyth's membrane. Anat Rec. 33, 357-376.

Chen, S., S. Vincent, D. B. Wilson and B. Ganem. 2003. Mapping of chorismate mutaseand prephenate dehydrogenase domains in the *Escherichia coli* T-protein. Eur J Biochem. 270, 757-763.

Colby, S. M. and R. R. B. Russell. 1997. Sugar metabolism by mutans streptococci. J Appl Microbiol. 83(S1), 80S-88S.

Fujimoto, Y., M. Iwasa, R. Murayama, M. Miyazaki, A. Nagafuji and T. Nakatsuka. 2010. Detection of ions released from S-PRG fillers and their modulation effect.

Hamada, S. and H. D. Slade. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 44, 331-384.

Hanada, N. and H. K. Kuramitsu. 1989. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. Infect Immun. 57, 2079-2085.

Hotta, M., T. Morikawa, D. Tamura and S. Kusakabe. 2014. Adherence of *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus mutans* to saliva-coated S-PRG resin blocks. Dent Mater J. 33, 261-267.

Ikemura, K., F. R. Tay, Y. Kouro, T. Endo, M. Yoshiyama, K. Miyai. and D. H. Pashiey. 2003. Optimizing filler content in an adhesive system containing pre-reacted glass-ionomer fillers. Dent Mater. 19, 137-146.

Ito, S., M. Iijima, M. Hashimoto, N. Tsukamoto, I. Mizoguchi and T. Saito. 2011. Effects of surface pre-reacted glass-ionomer fillers on mineralinduction by phosphoprotein. J Dent. 39, 72-79.

Kawabata, S. and S. Hamada. 1999. Studying biofilm formation of mutans streptococci. Methods Enzymol. 310, 513-523 .

Kitagawa, H., S. Miki-Oka, G. Mayanagi, Y. Abiko, N. Takahashi and S. Imazato. 2018. Inhibitory effect of resin composite S-PRG filler on *Streptococcus mutans* glucose metabolism. J Dent. 70, 92-96.

Kobayashi, S., K. Koga, O. Hayashida, Y. Nakano and Y. Hasegawa. 1989. Glucan-binding domain of a glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: isolation of a 55-kilodalton peptide from a trypsin digest of glucosyltransferase prebound to insoluble glucan. Infect Immun. 57, 2210-2213.

Koga, T., N. Okahashi, I. Takahashi, T. Kanamoto, H. Asakawa and M. Iwaki. 1990. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutans of *Streptococcus mutans* serotype *c*. Infect Immun. 58, 289-296.

Kuboniwa, M., G. D. Tribble, C. E. James, A. O. Killic, L. Tao, M. C. Herzberg, S. Shizukuishi and R. J. Lamont. 2006. *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. Mol Microbiol. 60, 121-139.

Maruyama, F., M. Kobata, K. Kurokawa, K. Nishida, A. Sakurai, K. Nakano, R. Nomura, S. Kawabata, T. Ooshima, K. Nakai, M. Hattori, S. Hamada and I. Nakagawa. 2009. Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans*

provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. BMC Genomic. 10, 358.

Matsumoto-Nakano, M. and H. K. Kuramitsu. 2006. Role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2006.188, 8095-8102.

Miki, S., H. Kitagawa, R. Kitagawa, W. Kibe, M. Hayashi and S. Imazato. 2016. Antibacterial activity of resin composites containing surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler. Dent Mater. 32, 1095-1102.

Nagata, E., A. de Toledo and T. Oho. 2011. Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production. Mol Oral Microbiol. 26, 78-88.

Ooshima, T., M. Matsumura and T. Hoshino. 2001. Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. J Dent Res. 80, 1672-1677.

Ooshima, T., A. Izumitani, S. Sobue and S. Hamada. 1983. Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. Jpn J Med Sci Biol. 36, 219-223.

Park, S. N., Lim, Y. K., Choi, M. H., Cho, E., Bang, IS., Kim, J. M., Ahn, S. J. & Kook, J. K. 2018. Antimicrobial mechanism of oleanolic and ursolic acids on *Streptococcus mutans* UA159. Curr Microbiol. 75, 11-19.

Pucci, M. J., K. R. Jones, H. K. Kuramitsu and F. L. Macrina. 1987. Molecular cloning and characterization of the glucosyltransferase C gene (*gtfC*) from *Streptococcus mutans* LM7. Infect Immun. 55, 2176-2182.

Renye, J. A. Jr., P. J. Piggot, L. Daneo-Moore and B. A. Buttaro. 2004. Persistence of *Streptococcus mutans* in stationary-phase batch cultures and biofilms. Appl Environ Microbiol. 70, 6181-6187.

Rosenberg, M., D. Gutnick and E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett. 9, 29-33.

Rosenberg, M., H. Judes and E. Weiss. 1983. Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. Infect Immun. 42, 831-834.

Sasaki, H., M. Matsumoto, T. Tanaka, M. Maeda, M. Nakai, S. Hamada and T. Ooshima. 2004. Antibacterial activity of polyphenol components in oolong tea extract against *Streptococcus mutans*. Caries Res. 38, 2-8.

Sato, Y., K. Okamoto-Shibayama and T. Azuma. 2015. Glucose-PTS Involvement in Maltose Metabolism by *Streptococcus mutans*. Bull Tokyo Dent Coll. 56, 93-103.

Shimazu, K., K. Ogata and H. Karibe. 2012. Caries-preventive effect of fissure sealant containing surface reaction-type pre-reacted glass ionomer filler and bonded by self-etching primer. J Clin Pediatr Dent. 36, 343-347.

Suzuki, N., M. Yoneda, K. Haruna, Y. Masuo, T. Nishihara, K. Nakanishi, K. Yamada, A. Fujimoto, T. Hirofuji. 2014. Effects of S-PRG eluate on oral biofilm and oral malodor. Arch Oral Biol. 59, 407-413.

Touger-Decker, R. and C. van Loveren. 2003. Sugars and dental caries. Am J Clin Nutr. 78, 881-892.

Xu, S., Y. Yang, R. Jin, M. Zhang and H. Wang. 2006. Purification and characterization of a functionally active *Mycobacterium tuberculosis* prephenate dehydrogenase. Protein Expr Purif. 49, 151-158.

Yoneda, M., N. Suzuki, Y. Masuo, A. Fujimoto, K. Iha, K. Yamada, T. Iwamoto and T. Hirofuji. 2012. Effect of S-PRG eluate on biofilm formation and enzyme actibity of oral bacteria. Int J Dent. Article ID 814913.

Zeng, L., S. Das and R. A. Burne. 2010. Utilization of lactose and galactose by *Streptococcus mutans*: transport, toxicity, and carbon catabolite repression. J Bacteriol. 192, 2434-2444.

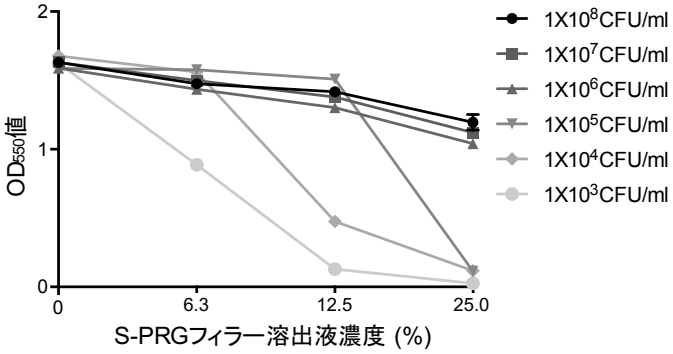

図1 各菌量の*S. mutans* MT8148株における増殖能（BHI液体培地中のOD_{550}値）

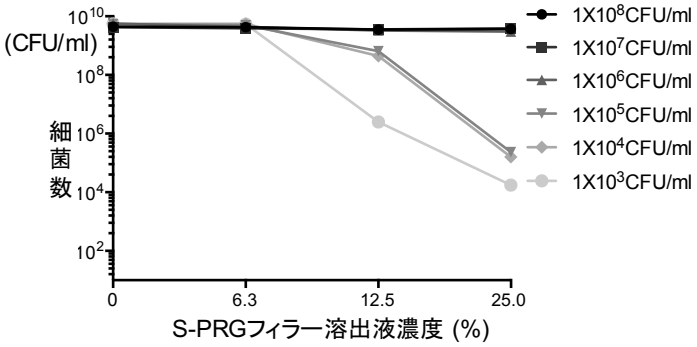

図2 各菌量の*S. mutans* MT8148株における増殖能（MSB寒天培地における細菌数）

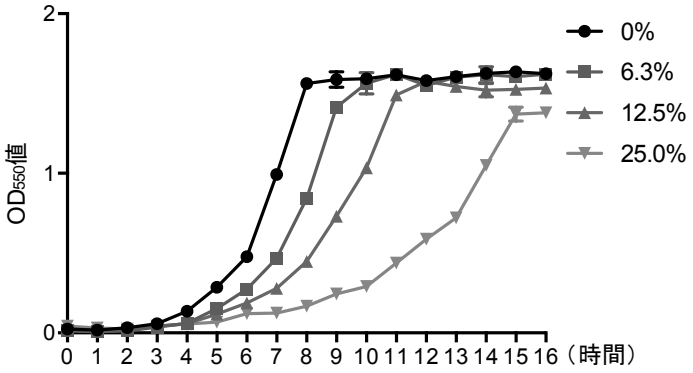

図3 1×10^{7}CFU/mlの*S. mutans* MT8148株における増殖能（BHI液体培地中のOD$_{550}$値）

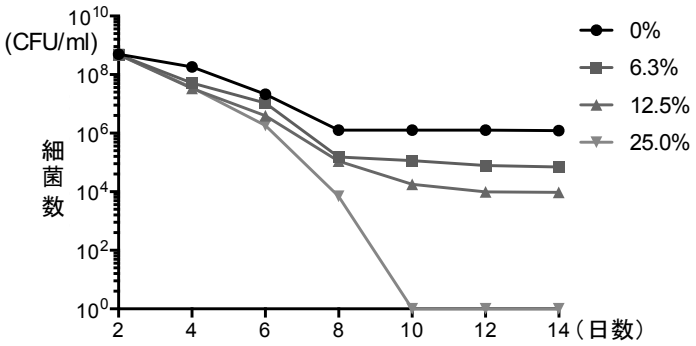

図4 1×10^{7}CFU/mlの*S. mutans* MT8148株における増殖能（MSB寒天培地における細菌数）

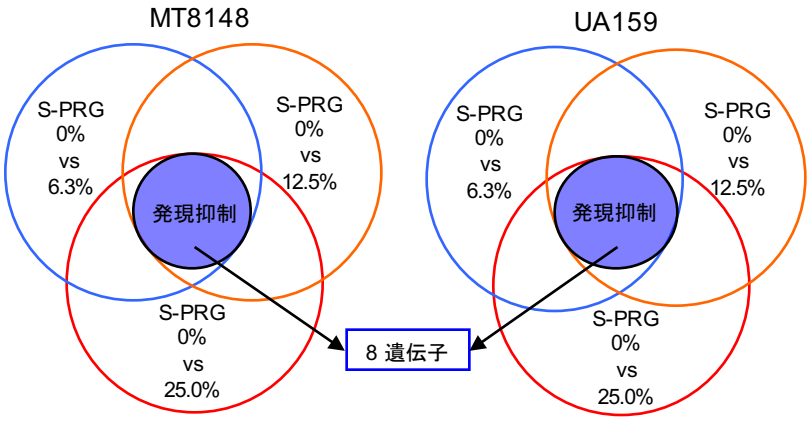

図5 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化の検出方法

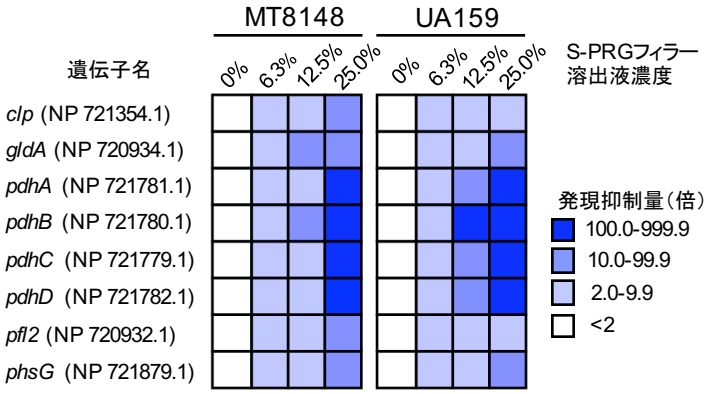

図6 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化（検出された8遺伝子の発現抑制量）

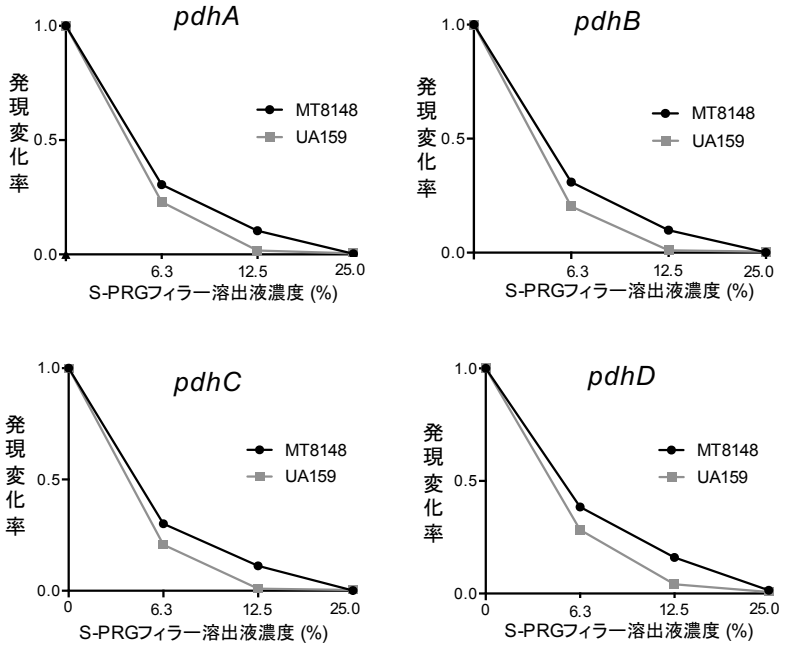

図7 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化（*pdh*遺伝子群における遺伝子の発現抑制量）

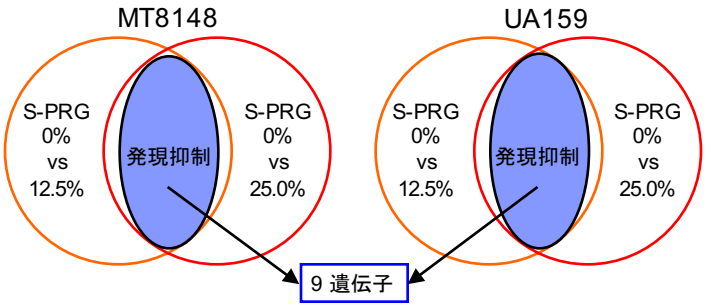

図8 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化の検出方法

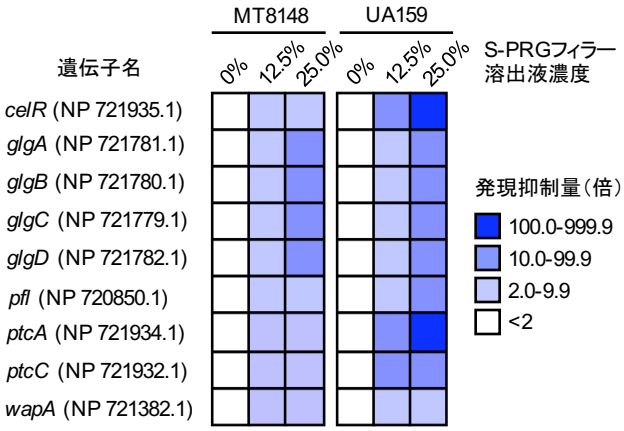

図9 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化（検出された9遺伝子の発現抑制量）

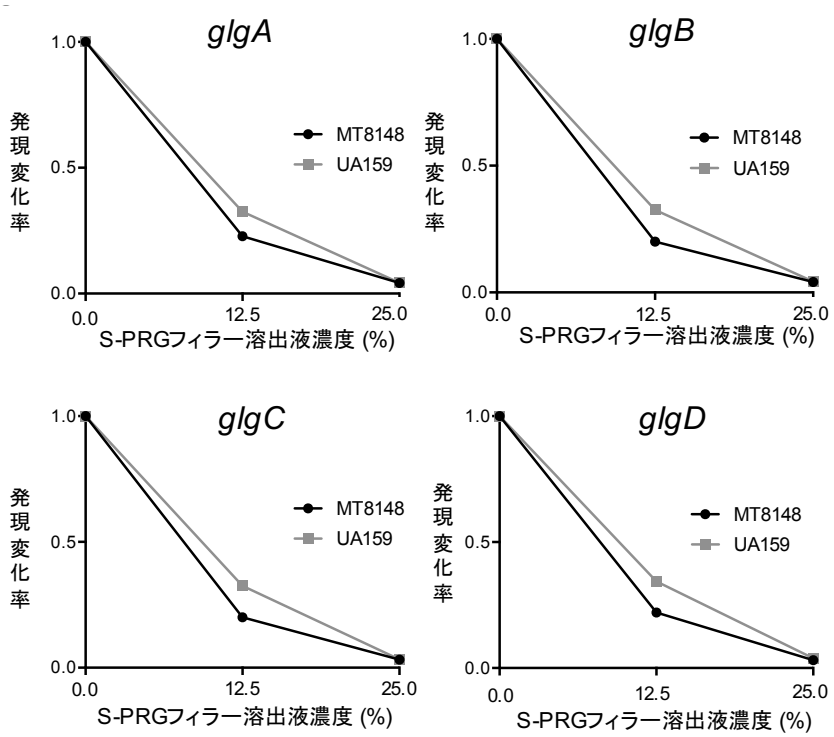

図10 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化（*glg*遺伝子群における遺伝子の発現抑制量）

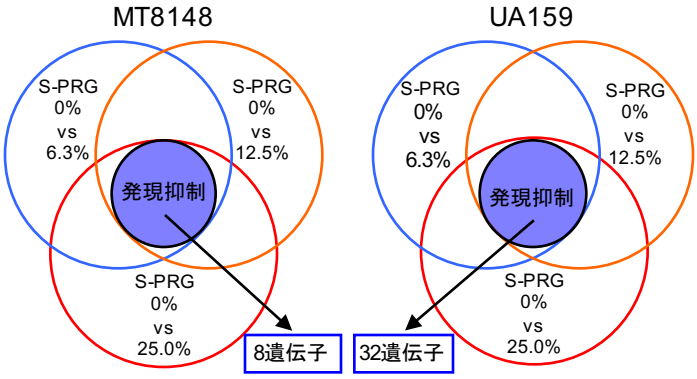

図11 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化の検出方法

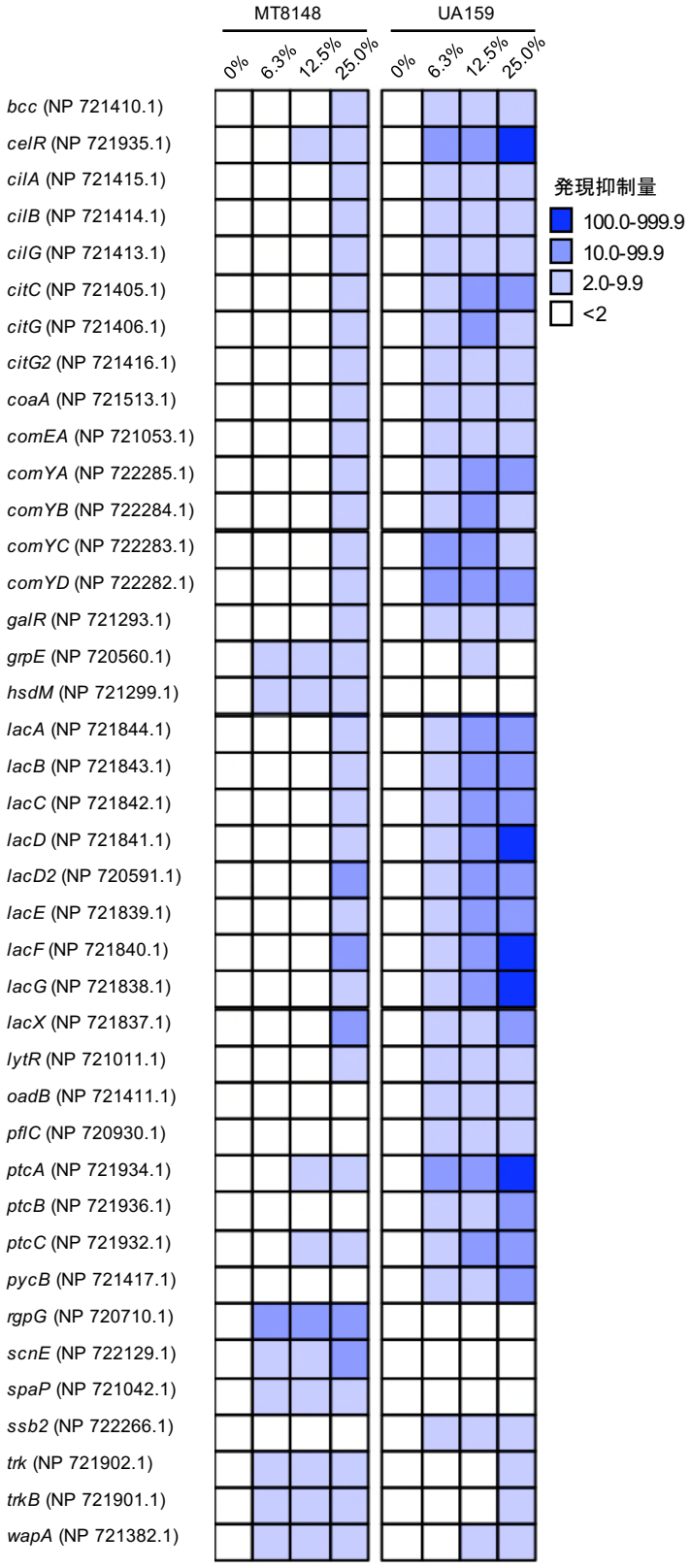

図12 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化（*lac*遺伝子群における遺伝子の発現抑制量）

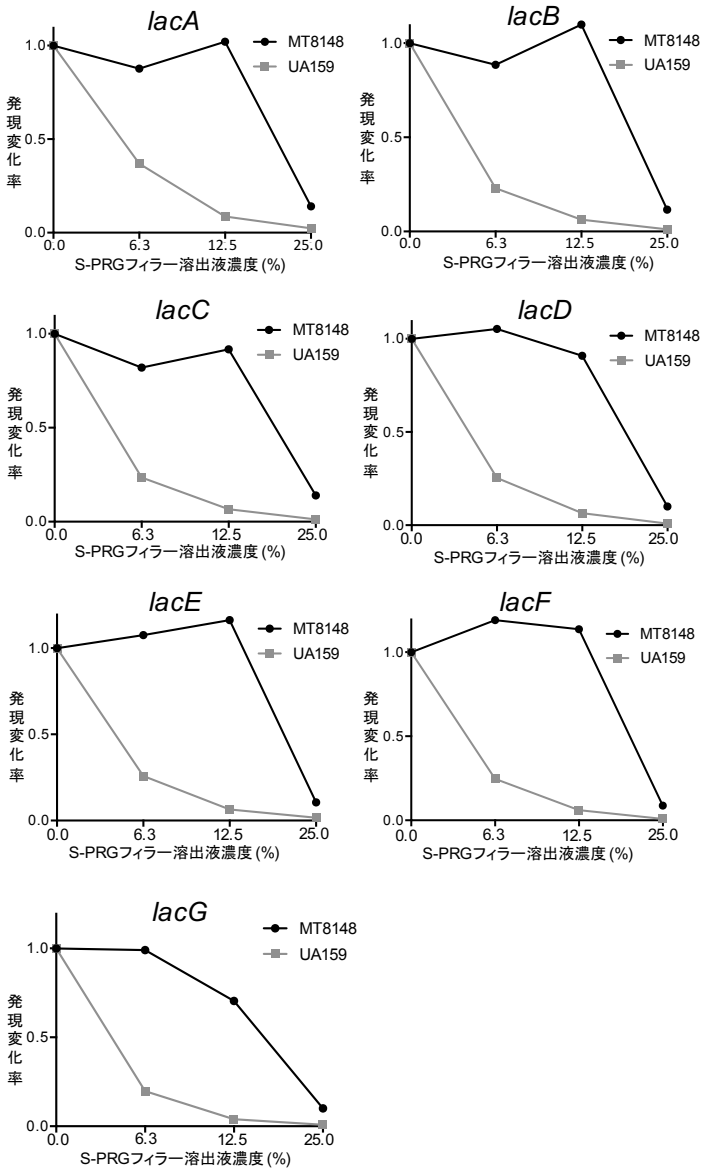

図13 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化（検出された40遺伝子の発現抑制量）

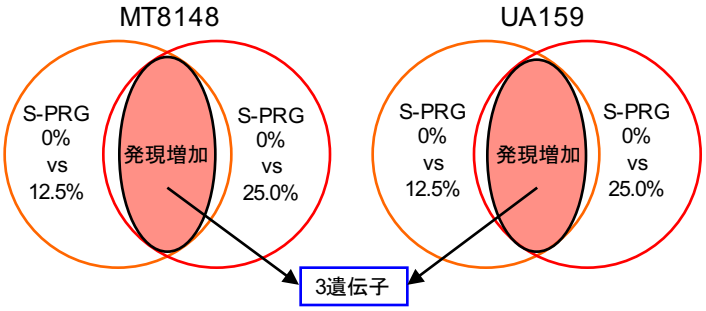

図14 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化の検出方法

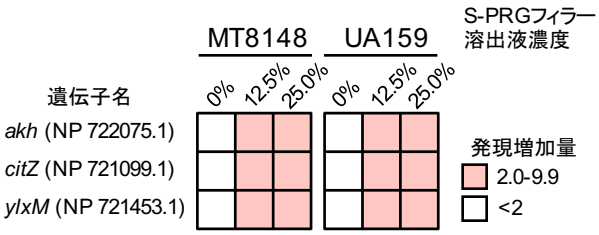

図15 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化（検出された3遺伝子の発現増加量）

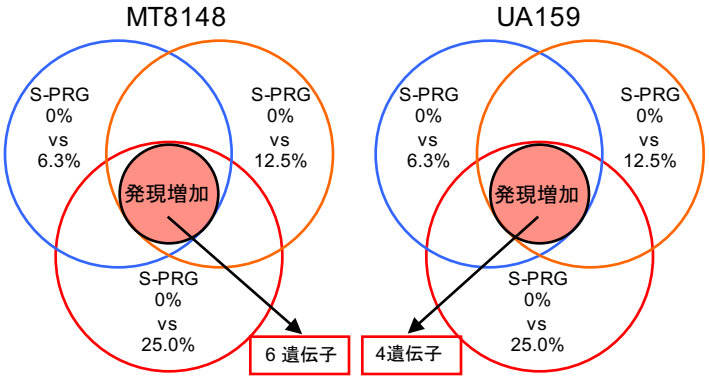

図16 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化の検出方法

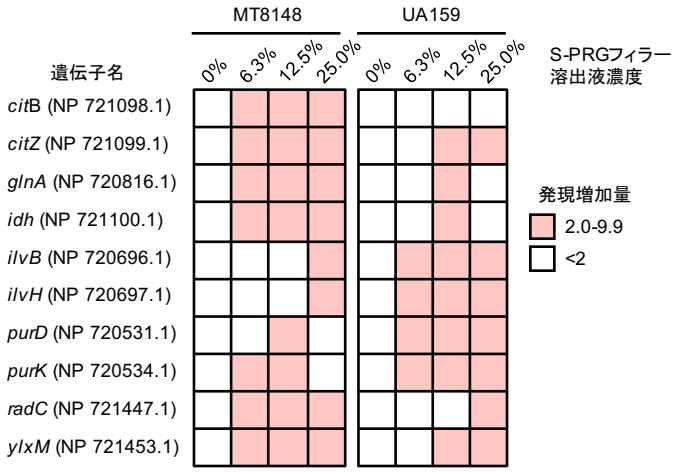

図17 DNAマイクロアレイ分析による*S. mutans* MT8148株とUA159株の遺伝子の発現変化（検出された10遺伝子の発現増加量）

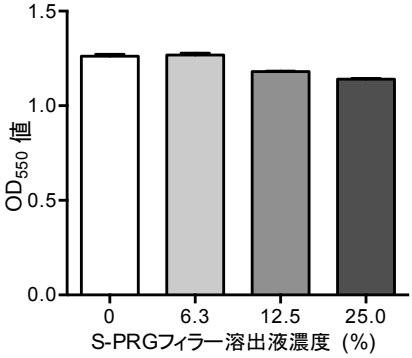

図18 *S. mutans* MT8148株のスクロース依存性付着能に用いた細菌数
（1%スクロース含有BHI液体培地中のOD_{550}値）

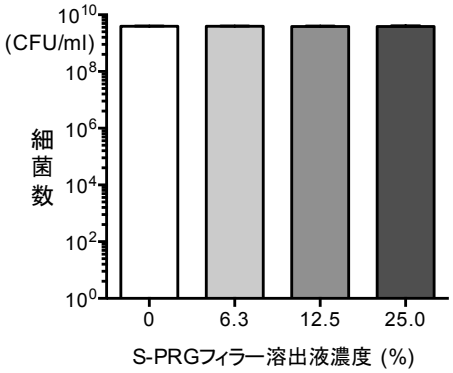

図19 *S. mutans* MT8148株のスクロース依存性付着能に用いた細菌数
（MSB寒天培地における細菌数）

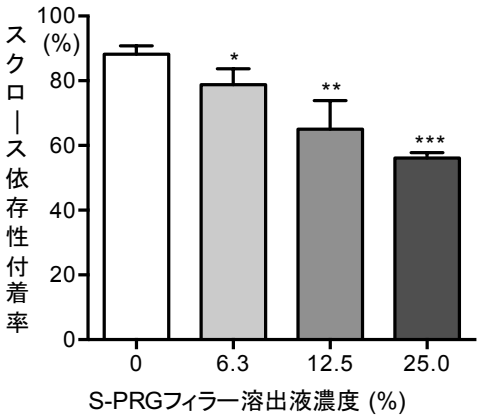

図20 *S. mutans* MT8148株のスクロース依存性付着能
（*P＜0.05, **P＜0.01, ***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

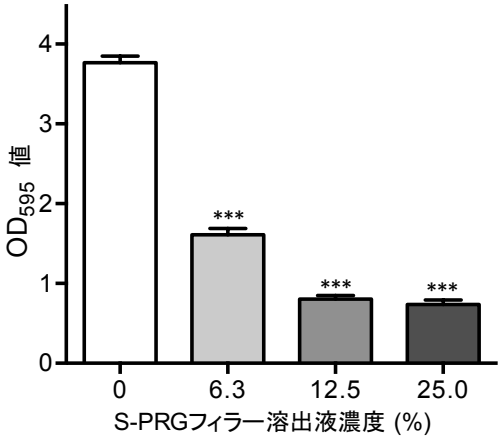

図21 0.25%スクロース含有BHI液体培地における*S. mutans* MT8148株によるバイオフィルム形成量
（***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

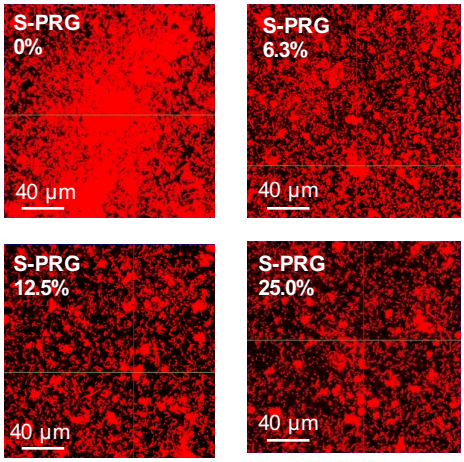

図22 0.25%スクロース含有BHI液体培地における *S. mutans* MT8148株によるバイオフィルム形成能
（共焦点走査型レーザー顕微鏡像（上部より観察））

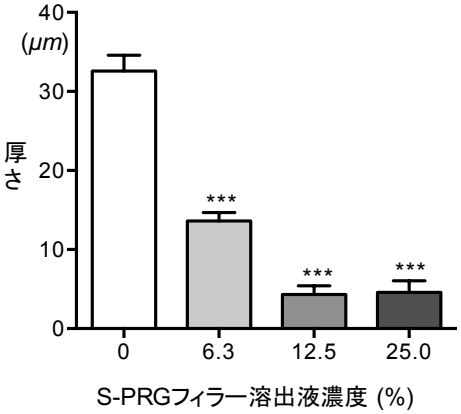

図23 0.25%スクロース含有BHI液体培地における*S. mutans* MT8148株によるバイオフィルムの厚み
（***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

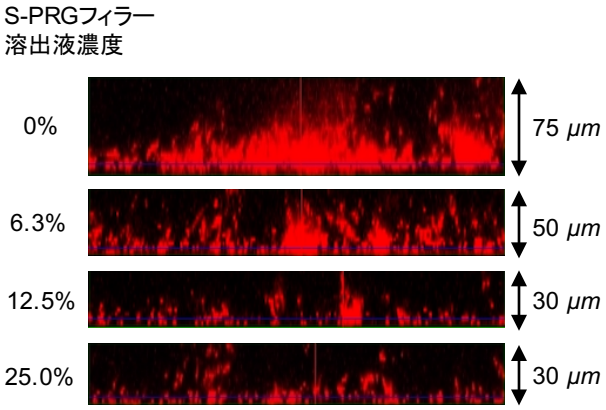

図24 0.25%スクロース含有BHI液体培地における *S. mutans* MT8148株によるバイオフィルムの厚み
（共焦点走査型レーザー顕微鏡像（側面より観察））

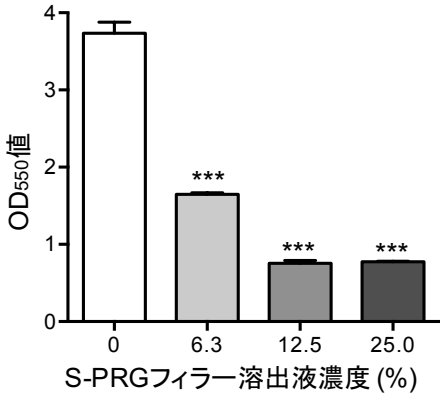

図25 1%スクロース含有BHI液体培地における*S. mutans* MT8148株によるバイオフィルム形成能
（***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

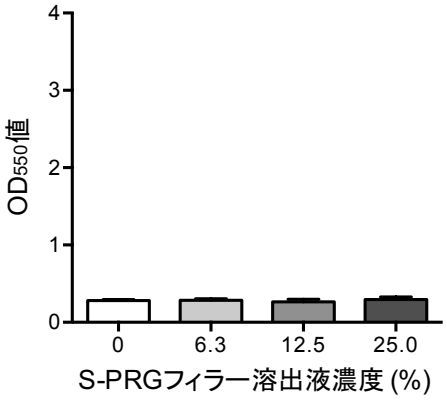

図26 スクロース非含有BHI液体培地における*S. mutans* MT8148株によるバイオフィルム形成能

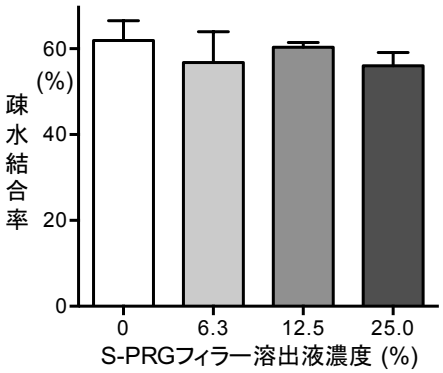

図27 *S. mutans* MT8148株の菌体疎水性（S-PRGフィラー溶出液添加直後）

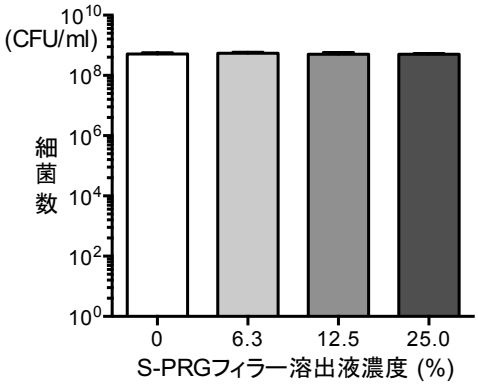

図28 *S. mutans* MT8148株の菌体疎水性に用いた細菌数（S-PRGフィラー溶出液添加18時間後）

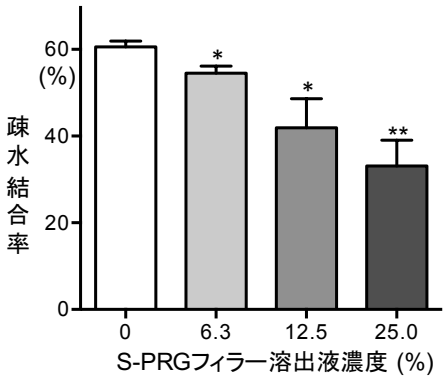

図29 *S. mutans* MT8148株の菌体疎水性（S-PRGフィラー溶出液添加18時間後）
（*P＜0.05, **P＜0.01 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

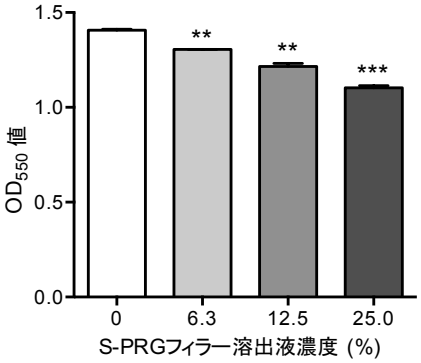

図30 静止期前（1×10⁹CFU/ml）の*S. mutans* MT8148株における増殖能
（18時間培養後のBHI液体培地中のOD_{550}値）
（**P＜0.01, ***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

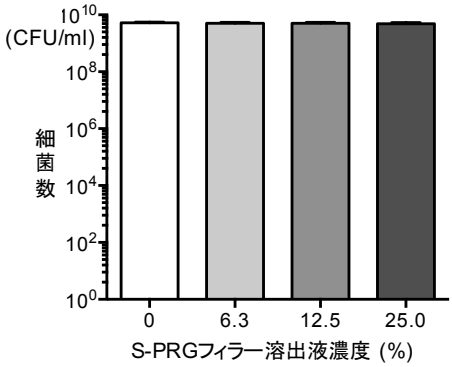

図31 静止期前（1×10^9CFU/ml）の*S. mutans* MT8148株における増殖能
（18時間培養後のMSB寒天培地における細菌数）

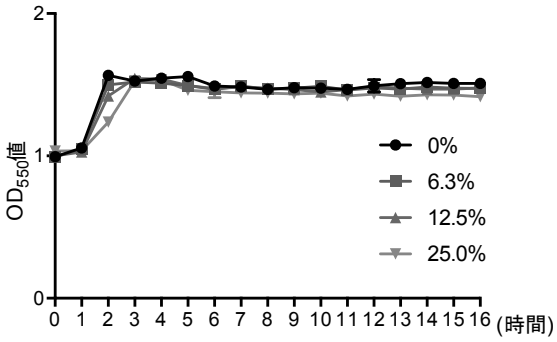

図32 静止期前（1×10⁹CFU/ml）の*S. mutans* MT8148株における増殖能
（BHI液体培地中のOD_{550}値）

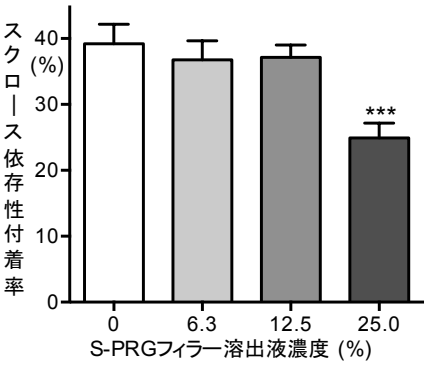

図33 静止期前（1.0×10^{9}CFU/ml）の *S. mutans* MT8148株のスクロース依存性付着能
（***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

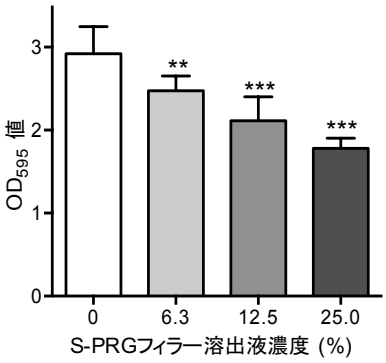

図34 静止期前（1.0×10⁹CFU/ml）の *S. mutans* MT8148株のバイオフィルム形成量
（**P＜0.01, ***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

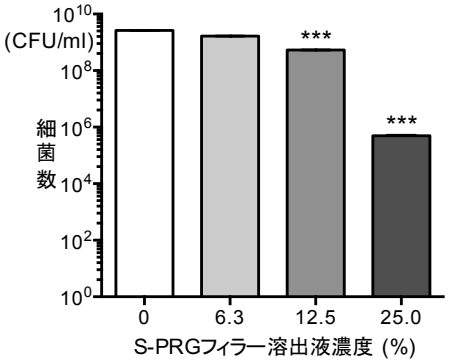

図35 対数増殖期前（1×10^5CFU/ml）の*S. sobrinus* B13株における増殖能
（***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

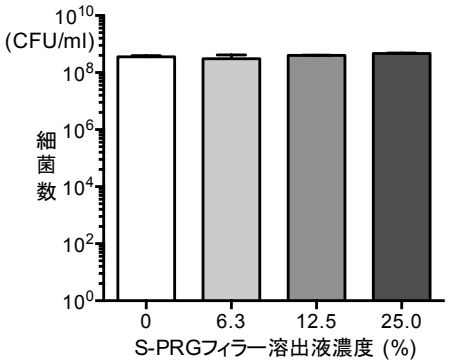

図36 静止期前（1×10^9CFU/ml）の*S. sobrinus* B13株における増殖能

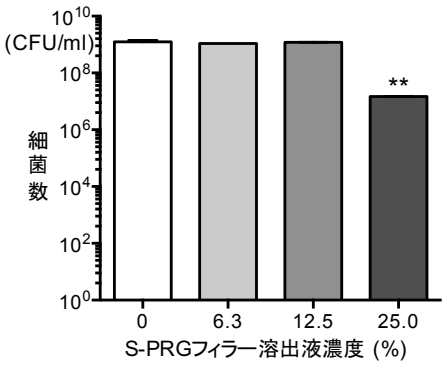

図37 対数増殖期前(1×10^{5}CFU/ml)の*S. gordonii* ATCC 10558株における増殖能
（**P＜0.01 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

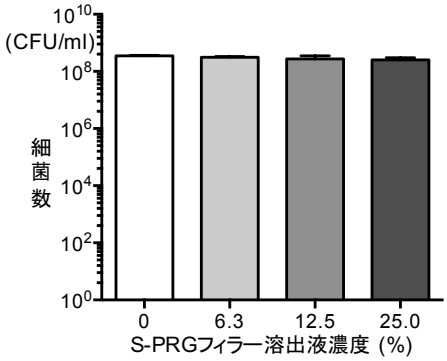

図38 静止期前の*S. gordonii* ATCC 10558株における増殖能

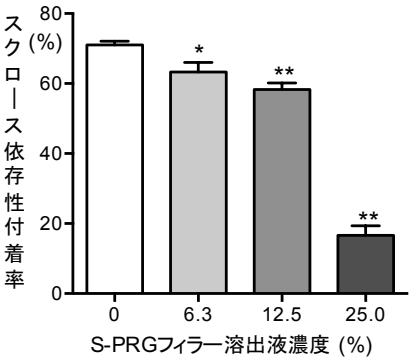

図39 対数増殖期前（1×10^{7}CFU/ml）の*S. sobrinus* B13株のスクロース依存性付着能
（*P＜0.05, **P＜0.01 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

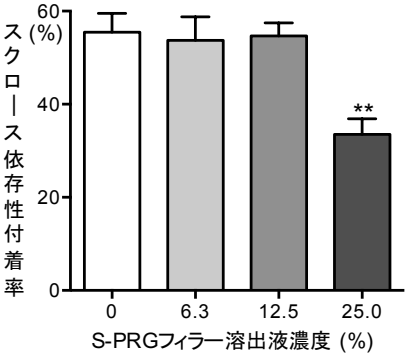

図40 静止期前（1×10⁹CFU/ml）の*S. sobrinus* B13株のスクロース依存性付着能
（**P＜0.01 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

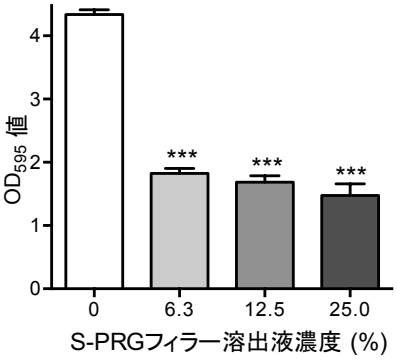

図41 対数増殖期前（1×10^{7}CFU/ml）の*S. sobrinus* B13株のバイオフィルム形成能
（***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）

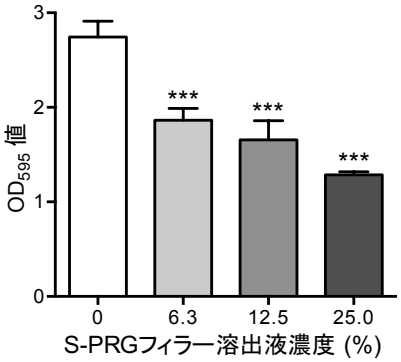

図42 静止期前（1×10⁹CFU/ml）の*S. sobrinus* B13株のバイオフィルム形成能
（***P＜0.001 ANOVAの後post-hoc解析としてBonferroni法により検定）