

---

## 学位論文

---

### 人工齲蝕象牙質における *Streptococcus mutans* の動態に関する研究

末延 慎司

キーワード : *Streptococcus mutans*, グルコシルトランスフェラーゼ, デキストラナーゼ, 象牙細管内細菌動態

### Study on the Ecology of *Streptococcus mutans* in Artificial Caries Dentin.

Shinji SUENOBU

**Abstract :** When *Streptococcus mutans* adheres to the surface of teeth, it begins to proliferate and form biofilm by synthesizing the water-soluble (WSG) and -insoluble glucan (WIG) from sucrose. It is well known that these glucans are synthesized by three kinds of glucosyltransferases, GTFB/C/D, coded by *gtfB/C/D* gene, and are degraded by dextranase (DexA) coded by *dexA* gene. *S. mutans* in carious lesions may modulate glucan metabolism to adapt to the micro-environment surrounding cells. However, little is known about the ecology of *S. mutans* in carious lesions. The purpose of this study was to investigate the ecological changes of *S. mutans* in biofilm or dentinal tubules when the environmental changes occur. We developed an *in vitro* artificial carious model composed of bovine dentin slices and *S. mutans* MT8148. Dentin slices and *S. mutans* MT8148 were incubated in brain heart infusion broth at 37°C, pH 7.5 for 14 days, and subsequently, the culture condition was changed to 42°C or to pH 5.5 as environmental changes. Number of recovered viable cells was determined by colony forming units. Also the expression of heat shock protein 70, *gtf* genes, and *dexA* gene were examined using RT-PCR method. The growth rate of *S. mutans* MT8148 adhered to a dentin plate was not reduced by the environmental changes, while that of non-adhered cells decreased. The levels of *gtf* gene expression of adhered cells were higher than those of non-adhered cells. Moreover, *gtfC* gene showed the highest expression level in adhered cells. TEM observation revealed that *S. mutans* invaded most of dentinal tubules of bovine dentin in this model. When the culture condition was changed, the cells began to synthesize the intra-cellular polysaccharide. Especially changing to pH 5.5, more intra-cellular polysaccharide positive cells were observed, although the cell density in the tubules decreased. The *gtfC* deficient mutant strain produced lower amount of WIG that was adhered to the dentin plate compared with other gene deficient mutants. These results suggest that *S. mutans* adhered to the tooth surface changes the amount of GTFs and DexA, by synthesizing the glucan, or by adapting to the environmental changes. Furthermore, synthesis of intracellular polysaccharides may be important to resist to physical and chemical stresses.

## 結 言

口腔内には多種多様な細菌が常在しており、その一部は歯面へ付着し定着する。定着した細菌は唾液成分や、摂食による栄養分などを取り込みバイオフィームであるプラークを形成する。プラークは口腔内においていくつかの疾患を引き起こすが、代表的なものの一つが齲蝕である。齲蝕は歯の表面に形成されたプラーク中に細菌の産生する酸が貯留し、歯の表面を脱灰することで形成される<sup>1)</sup>。プラークを構成する細菌の一つである *Streptococcus mutans* は齲蝕誘発能が高く<sup>1)</sup>、急激な pH 低下に対して ATP を利用したプロトンポンプによる耐酸性を有することが知られている<sup>2)</sup>。*S. mutans* UA159 株の全遺伝子配列は2002年に解読され、多様な糖の代謝に関連する遺伝子、平滑面付着に関連する遺伝子、あるいは耐酸性に関連する遺伝子など、齲蝕形成において重要な役割を果たす遺伝子が多いのが特徴的とされている<sup>3)</sup>。

*S. mutans* はスクロースを基質として非水溶性グルカン (WIG) および水溶性グルカン (WSG) を合成して歯の表面に強く付着し、酸を産生し続けながら増殖する。*S. mutans* のプラーク形成過程においてはグルコシルトランスフェラーゼ (以下 GTF と略す) によるグルカンの合成、およびデキストラナーゼ (以下 DexA と略す) によるグルカンの分解が行われている。GTF には GTFB, GTFC および GTFD の三種類が知られており、GTFB は  $\alpha$ -1,3 結合が主で少量の  $\alpha$ -1,6 結合を含む WIG を、GTFD は  $\alpha$ -1,6 結合が主で少量の  $\alpha$ -1,3 結合を含む WSG を、また GTFC は本質的には GTFB のグルカンと類似しているが、数パーセントほど  $\alpha$ -1,6 結合の多い WIG を合成する<sup>4,5)</sup>。また DexA はグルカンを加水分解し<sup>6)</sup>、イソマルトサッカライド (以下 IMS と略す) を産生する。IMS は *S. mutans* を含むプラーク細菌の栄養源 (炭素源) として供給されているという報告もある<sup>7)</sup>。これら *S. mutans* のグルカンの合成・分解に関する酵素の動態に着目することは齲蝕形成の過程を解析する上で重要なことと考えられる。プラーク形成過程においては、種々の酵素が協調し合っていることが推測されるため、歯面への付着の過程、グルカン組成維持の過程などにおいて、どの酵素が重要な役割を果たすかを解析することは、齲蝕形成過程における *S. mutans* の動態解明につながるるとともに、今後その酵素を阻害する研究により臨床応用へとつながる可能性も考えられる。

*S. mutans* によるグルカンの合成と分解は歯面および齲蝕象牙質内のバイオフィームにおいて行われていると考えられる。その過程において、口腔内の環境の変化、例えば摂食による温度変化、栄養状態の変化、スクロース摂取による pH 変化<sup>8)</sup>、浸透圧の変化などの影響を受けることは避けられない。バイオフィームに棲息する細菌はこれらの変化に対して適応し生存し続けていると推察され、これらの環境の変化が *S. mutans* の酵素合成に

どのような影響を及ぼすかは、遺伝子の発現も含めその詳細は不明な点が多い。また、これまでの GTF 群あるいは DexA の遺伝子発現の動態に関する研究は、細菌培養液を用いて行われており、齲蝕象牙質などの歯質表面に形成されたバイオフィームにおけるこれら遺伝子発現の動態に関しても明らかにされていない。

そこで本研究では、象牙質齲蝕における *S. mutans* の環境変化に対する動態をより *in vivo* に近い形で検索するため、象牙細管に *S. mutans* を侵入させた人工象牙質齲蝕モデルを作製し、その培養条件を変化させることにより研究を行った。培養条件の変化としては、口腔内における温度変化として考えられ、かつ *S. mutans* のタンパク合成が阻害されない 42°C<sup>9)</sup> を、また pH 変化として歯質の脱灰が起こる臨界 pH<sup>10)</sup> であり、齲蝕病巣内における pH 変化として考えられる pH 5.5 を環境変化として設定した。そして培養条件を変化させた後、グルカン合成・分解酵素に関する遺伝子発現の変動を解析するため、象牙質表面および象牙細管内に侵入した *S. mutans* の *gtfB/C/D* 遺伝子と *dexA* 遺伝子の発現を定量分析するとともに、培養条件の変化による象牙細管内における *S. mutans* の菌体内多糖の合成、ならびに超微細形態的变化を明らかにするために、透過型電子顕微鏡による形態学的観察を行い、その動態を定量的に分析した。さらに、各々のグルカン合成酵素の培養条件変化に対する役割を明らかにするために、合成されたグルカン量に着目し *S. mutans* の GTFB/C/D をコードする遺伝子 (*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*) の欠失株を用いて、ウシ人工齲蝕象牙質モデルにおけるグルカン合成量の定量分析を行った。

## 材料と方法

### 1. 使用菌種および培地

臨床分離株 *S. mutans* MT8148 (以下 *S. mutans* MT と略す) および、GTFB/C/D をコードする遺伝子 (*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*) を欠失させた遺伝子改変株、S2 (*gtfB* gene 欠失株), R4 (*gtfC* gene 欠失株), DE1 (*gtfD* gene 欠失株) (いずれも大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室大嶋隆博士より恵与) を用い、*S. mutans* MT はブレインハートインフュージョン (以下 BHI と略す; DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) 液体培地にて、また各種欠失株においてはエリスロマイシン (和光純薬, 大阪) 0.01 mg/ml を含む BHI 液体培地にてそれぞれ前培養 (37°C, 8 時間) した後、その菌液 50  $\mu$ l を 5 ml BHI 培地中にてさらに 8 時間培養したものを使用菌液とした。培養および培養条件変化に用いた培地である pH 7.5 の BHI 培地は NaOH で調製し、また pH 5.5 の BHI 培地は 0.5 M リン酸-1.0 M クエン酸緩衝液で調製した。

### 2. 各試料の調製

#### (1) 浮遊細菌の調製

*S. mutans* MT 菌液 2 ml を 100 ml BHI 培地中にて

37°C, 3時間培養し, 対数増殖期に入った菌懸濁液を対数増殖期における浮遊細菌として使用した。また8時間培養し定常期に入った菌懸濁液を定常期における浮遊細菌として使用した。

## (2) ウシ人工齲蝕象牙質試料の調製

自然解凍した凍結ウシ前歯の解剖学的歯頸線付近よりその歯根部を切断し, 軟組織と歯髄を除去した後, 歯冠部において唇側より歯軸方向に垂直に約500 µmの厚さの象牙質試料を ISOMET™ 低速切断機 (以下 ISOMET と略す; Buehler Co.Ltd., LakeBluff, IL, USA) を用いて作製した。注水下にて#600, #800, #1000, #1500の耐水研磨紙を用い, さらに粒度3 µm, 1 µmの研磨紙を使用し, 厚さ300 µmの厚さまで手研磨した。その試料を17% EDTA水溶液中で4分間の超音波処理を行った後, 滅菌水中で10分間超音波洗浄し, さらに滅菌水で12時間, 室温で振盪させながら水洗し, 引き続き20ml試験管中にワイヤーで懸垂してエチレンオキサイドでガス滅菌した。滅菌の終わったウシ象牙質板を対数増殖期の *S. mutans* MT 培養液中に浸漬し, BHIのみで2日ごとに培地を交換させながら14日間培養を行うことによりウシ人工齲蝕象牙質試料を調製した。

## 3. 培養条件の変化による生菌数変化の解析

培養条件の変化としての42°C, pH 5.5への変化が, *S. mutans* MT にとって致命的条件変化でないことを確認するため, 生菌数変化の解析を行った。対数増殖期における *S. mutans* MT の培養液15mlを900×gで10分間の遠心により集菌後, 温度変化として42°C, pH 7.5のBHIにて懸濁し, あるいはpH変化として37°C, pH 5.5のBHI培地にて懸濁し, 各培養条件にて0, 5, 10, 20, 30, 60分間培養した (表1)。その後, CFU測定のため菌液の一部を生理食塩水にて希釈し, 0.001%亜テルル酸カリウム含有 Mitis-Salivarius Agar (DIFCO Laboratories) プレート (以下 MS Agar プレートと略す) を用いて *S. mutans* MT 生菌数を測定した。一方, 付着細菌は培養調製したウシ人工齲蝕象牙質試料を用いて同様の培養条件変化を行った後, vortexにて30秒攪拌後, 超音波処理 (70W, 10秒) にて象牙質板より *S. mutans* MT を剥離し, 希釈菌液を MS Agar プレートを用いて生菌数を測定した。

## 4. タンパク質抽出ならびに Western Blotting

培養条件の変化としての42°Cへの変化が, *S. mutans* MT にとってストレスのかかる条件であるかを確認するため, 熱に対するストレスタンパクとして知られる Heat Shock Protein 70 (以下 HSP70 と略す) の発現を Western blotting 法で検索した。培養条件を42°Cへ変化させた浮遊細菌, および齲蝕象牙質板に付着した *S. mutans* MT より, 超音波細胞破碎装置 (UCD-200TM, 東湘電気) を用いて4°C, 85分間 (30秒超音波処理, 1分休止) 粉碎することでタンパクを抽出した後, DC Protein Assay

表1 *S. mutans* MT の培養条件

| 温度変化    |     |             | pH変化    |     |             |
|---------|-----|-------------|---------|-----|-------------|
| 温度 (°C) | pH  | 時間 (分)      | 温度 (°C) | pH  | 時間 (分)      |
| 37      | 7.5 | 0 (control) | 37      | 7.5 | 0 (control) |
| 42      | 7.5 | 5           | 37      | 5.5 | 5           |
| 42      | 7.5 | 10          | 37      | 5.5 | 10          |
| 42      | 7.5 | 20          | 37      | 5.5 | 20          |
| 42      | 7.5 | 30          | 37      | 5.5 | 30          |
| 42      | 7.5 | 60          | 37      | 5.5 | 60          |

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて定量し, PBSにて濃度を5 µg/µlに統一した。その後 PAGEL® SPG-520L (ATTO Corporation, 東京) を用いて電気泳動を行い, 分離したタンパクを Immobilon™ Transfer Membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) にトランスファーした。HSP70の発現の解析は, 抗HSP70ウサギポリクロナール抗体 (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) を用いた Western Blot にて行った。

## 5. mRNA 発現分析

*S. mutans* MT の対数増殖期あるいは定常期における菌懸濁液15mlを取り, 遠心 (900×g, 10分間) して集菌した後, 各条件の培地を添加し0, 5, 10, 20, 30, 60分間培養した。また, 同培養液にウシ象牙質板を浸漬し同様に培養して象牙質齲蝕板とした。培養終了後, 浮遊細菌は遠心 (900×g, 10分間) により集菌し, 10 mg/ml Lysozyme (和光純薬, 大阪) を350 µl添加して細胞を溶解後, TRIzol® Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) を用いた AGPC 法により上清から total RNA を回収した。一方, 齲蝕象牙質板は条件変化が同じ5枚をマイクロチューブに回収し, 同様に total RNA を回収した。抽出した total RNA は DNase I (宝酒造, 滋賀) にて37°C, 60分間処理した後, Gene Quant (Pharmacia Biotech) で濃度を調整し, Thermo Script™ RT-PCR System (Invitrogen) による逆転写反応を行うことにより cDNA を得た。

Semiquantitative RT-PCR<sup>11, 12)</sup> は, TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (宝酒造) を用いて行った。すなわち, *S. mutans* 16S rRNA (GenBank accession number X58303: 以下 X58303と略す)<sup>13)</sup> に対する特異的プライマーを用いて, 異なるサイクル数 (20, 24, 28, 32, 36回) にて PCR を行い, その後 GelStar® nucleic acid gel stain (FMC Bio Products, ME04841, USA)<sup>14)</sup> を含む2.5%アガロースゲル上で電気泳動を行い, UV トランスイルミネーター (コスモバイオ, 東京) を用いてバンドを検出した後, Polaroid Type 667 (Polaroid Corporation, Waltham, MA02451, USA) にて可視化されたバンドを撮影した。次に NIH Image (National Institutes of Health, USA) を用いてバンドの発現量を数値化し, 増幅生成物が直線的に

増加する反応サイクル数を決定した。さらに cDNA 濃度の統一を行うため、X58303 プライマーを含む PCR 反応液を 1/2 ずつ段階希釈し、決定された反応サイクル数にて PCR を行い、電気泳動した後 X58303 の増幅生成物が各条件で等量となるように各々の cDNA の希釈率を決定し、cDNA テンプレートとした。このテンプレートをもとに、*gtfB*, *gtfC*, *gtfD* に対する特異的プライマーによる PCR 反応を行い (表 2), 得られた PCR 産物を先述同様に電気泳動した後、バンドの発現量を測定した。なお、各種遺伝子の発現量は各試料における X58303 の発現量を 1 とした相対値を求めて比較した。

## 6. 透過型電子顕微鏡による観察

### (1) 培養終了後における齶蝕象牙質板の処理

ウシ人工齶蝕象牙質試料は 0.1 mol/l カコジル酸緩衝 2% パラホルムアルデヒド-2.5% グルタルアルデヒド (pH 7.4) 溶液中で前固定した後、1.33% 四酸化オスミウム酸水溶液にて後固定を行い、上昇エタノール系列で脱水後、エポキシ樹脂 (Quetol 653, 日新 EM 社, 東京) で包埋した。得られた包埋ブロックから象牙質が可及的に縦断されるような超薄切片を作製した後、フォルムバル膜を張った金メッシュ (#100) にその超薄切片を載せ、periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate 染色 (以下 PTS 染色と略す) を施した。すなわち、1% オルト過ヨウ素酸溶液にて 30 分間室温処理した後、蒸留水で洗浄し、1% チオカルボヒドラジド (20% 氷酢酸水溶液) 中で 120 分間、室温で反応させ、次に 10% 氷酢酸水溶液および蒸留水で洗浄した後、暗黒下にて 1% Silver proteinate (Merck, Darmstadt, Germany) 中で 30 分間の室温処理の後、水洗および乾燥し、透過型電子顕微鏡 (H-800, 日立, 東京) 観察 (以下 TEM と略す) を行った。

### (2) 象牙細管内へ侵入させた細菌の糖代謝に関する定量的評価

TEM 観察像において、観察視野中の象牙質板を 3 等分し、その内部 3 分の 1 を倍率 4000 倍に拡大し、象牙細管内に残存する細菌の詳細な観察を行った。次にその観察範囲内で観察できた一本の象牙細管中で観察できる全細菌数、およびその象牙細管中に存在する菌体内多糖を保有する細菌数を計測し、PTS 陽性細菌率を次の式により算出した。

$$\text{PTS 陽性細菌率 (\%)} = \frac{\text{同一の細管内に存在する菌体内多糖を保有する細菌数}}{\text{一本の象牙細管中で観察できる全細菌数}} \times 100$$

## 7. グルカン合成量測定

### (1) ウシ象牙質試料の調製

自然解凍したウシ前歯の解剖学的歯頸線付近よりその歯冠部を切断し、軟組織と歯髄を除去した後、歯根部において歯軸方向に平行に約 500  $\mu\text{m}$  の厚さの象牙質試料

表 2 プライマーの塩基配列および PCR 条件

| 増幅遺伝子       | 塩基配列  | アニーリング温度 (°C) | 増幅産物 (bp) |
|-------------|---|---------------|-----------|
| <i>gtfB</i> | 5'-GGTGTATGGCGTCACTTCAA-3'<br>5'-GAACCACTGACCCGTGAGCAT-3' | 62            | 399       |
| <i>gtfC</i> | 5'-TTTTGATGCTTCTGGGTTCC-3'<br>5'-AATAGAGCGCTGTCCGTTA-3'   | 60            | 392       |
| <i>gtfD</i> | 5'-ATCCTTAAACCGCAGGAAAT-3'<br>5'-ATTCACGCAATTGAACACCA-3'  | 56            | 400       |
| <i>dexA</i> | 5'-TATGCTGCTATTGGAGGTTCC-3'<br>5'-AAGGTTGAGCAATTGAATCG-3' | 56            | 1272      |

を ISOMET にて作製し、タービンにてダイヤモンドポイントを用いて 3 × 10 mm にトリミングし、2. (2) と同様な方法で研磨および水洗し、ウシ象牙質試料を作製した。それらを 48 穴プレートへ一枚ずつ約 20° に傾斜させて入れエチレンオキシドガス滅菌後、各プレートに BHI 600  $\mu\text{l}$  および対数増殖期における *S. mutans* MT あるいは遺伝子欠失株菌液を 100  $\mu\text{l}$  加え 37°C にて 48 時間培養した。

### (2) グルカン合成量の測定

培養後、一部プレートより象牙質板を取り出し、滅菌水にて洗浄し、象牙質板へ付着した付着非水溶性グルカンを 0.5N NaOH で溶解させた。一方、培養液は遠心 (6500 × g, 20 分間) することにより、培養液中の不溶性グルカンおよび水溶性グルカンに分離した。不溶性グルカンは滅菌水で 2 回洗浄し、0.5N NaOH 500  $\mu\text{l}$  で溶解させた。また水溶性グルカンは 50% エタノールを加え遠心 (6500 × g, 20 分間) により沈殿させた後、0.5N NaOH 500  $\mu\text{l}$  で溶解させた。NaOH で溶解させた各試料は遠心 (6500 × g, 20 分間) 後、上清をフェノール硫酸法<sup>15,16)</sup>にてグルカン量の測定を行った。すなわち、合成グルカンを 0.5N NaOH 500  $\mu\text{l}$  にて溶解後、グルカン溶液 30  $\mu\text{l}$  に 10% フェノール水溶液を 30  $\mu\text{l}$  添加、その後濃硫酸を 100  $\mu\text{l}$  添加し、波長 490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて測定した。

残りの象牙質板は培地条件を 37°C より 42°C へ、あるいは pH 7.5 より pH 5.5 に培養条件を変化させ 10, 20, 30, 60, 90 分間係留した後、象牙質板を取り出し、先述同様に象牙質板に付着した非水溶性グルカンの合成量を測定した。

## 8. 統計学的解析

mRNA 発現量, PTS 陽性細菌率, グルカン量の測定における実験結果は、平均 ± 標準偏差で表し、Student's-t

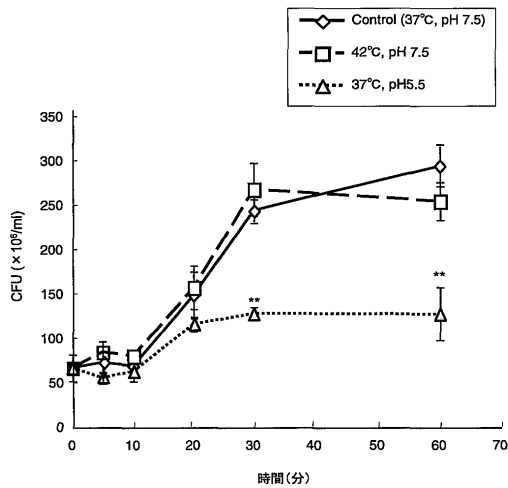


図1 培養条件を変化させた場合の浮遊状態における *S. mutans* MT の生菌数の変化  
*S. mutans* MT の培養条件を42°Cに変化させた場合、生菌数はcontrolと比較して差はみられなかった。一方培養条件をpH 5.5へ変化させた場合、生菌数はcontrolと比較して有意に生菌数の増加が抑制された。(\*\*:  $p < 0.01$ )

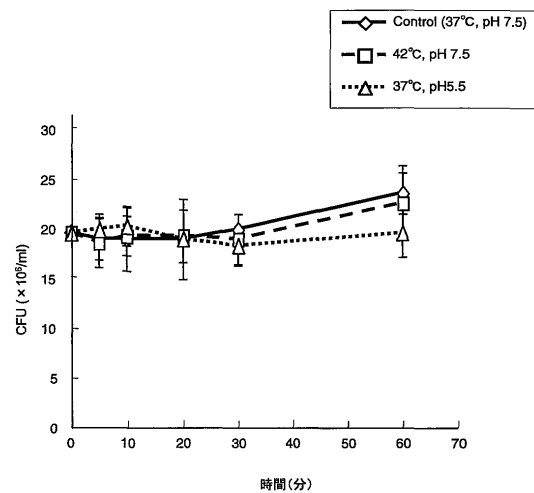


図2 培養条件を変化させた場合の象牙質板へ付着した状態における *S. mutans* MT の生菌数の変化  
*S. mutans* MT は象牙質板に付着した状態では培養条件を42°C, pH 5.5へ変化させても生菌数の低下はみられなかった。

test を用いて統計学的処理を行った。

## 結 果

### 1. 培養条件変化が浮遊および付着状態の *S. mutans* MT に及ぼす影響の解析

#### (1) 培養条件を変化させた場合の生存菌数

培養条件の変化が *S. mutans* MT の生菌数へ及ぼす影響を解析するため、浮遊状態ならびに象牙質板に付着した状態の細菌の培養条件を42°CあるいはpH 5.5に変化させ、生菌数をコロニーカウントにより解析した。浮遊状態の *S. mutans* MT は培養条件をpH 5.5へ変化させると菌数の増加が有意に抑制されたが ( $p < 0.01$ ), 42°Cへ変化させた場合には、コントロールと比較して差はみられなかった (図1)。象牙質板に付着した細菌数は42°C, pH 5.5 への培養条件変化によって低下はみられなかった (図2)。

#### (2) 培養温度を42°Cに変化させた場合の HSP70 発現

培養液温度が42°Cへ変化することによって、*S. mutans* MT にストレスとなるか否かを検討するため、HSP70の発現量を Western Blotting 法にて解析した。*S. mutans* MT が合成する HSP70は浮遊状態および象牙質板に付着した状態において温度変化により明らかに増加した (図3)。なお、浮遊細菌では60分後、象牙質板付着細菌では30分後に最大の発現量を示し、象牙質板に付着した状態の方が早期に HSP70 の合成上昇が起きていることが示された (図3)。

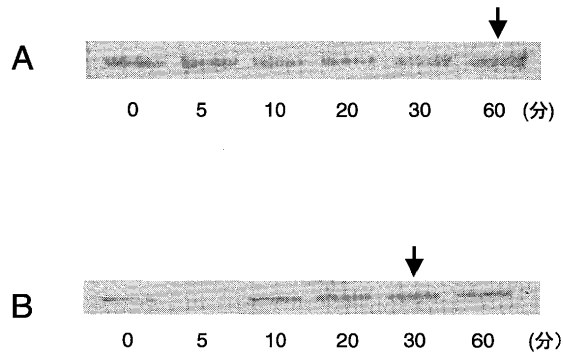


図3 *S. mutans* MT の HSP70 の発現に及ぼす培養温度変化の影響

*S. mutans* MT の培養条件を37°Cから42°Cへ変化させると、HSP70の発現は、浮遊培養 (A) においては60分後に最大となった (矢印)。一方、象牙質板付着培養 (B) においては30分後に最大となった (矢印)。

### 2. 培養条件を変化させた場合の各種 mRNA 遺伝子発現の動態

浮遊状態 (対数増殖期, 定常期) および14日間の培養により作製した象牙質齲蝕状態の *S. mutans* MT におけるグルカンの合成, 分解に関与する酵素の遺伝子発現の解析を行うため、各種 *gtf*, *dexA* 発現量の比較を行った。

各種 *gtf* 遺伝子の発現に関しては浮遊状態の対数増殖期においては、*gtfB*, *gtfD*, *gtfC* の順にその発現が高かったのに対し、定常期および象牙質板に付着した状態においては *gtfC*, *gtfB*, *gtfD* の順でその発現量は高かった (図4, 5, 6)。また *S. mutans* MT の培養状態の違いによる

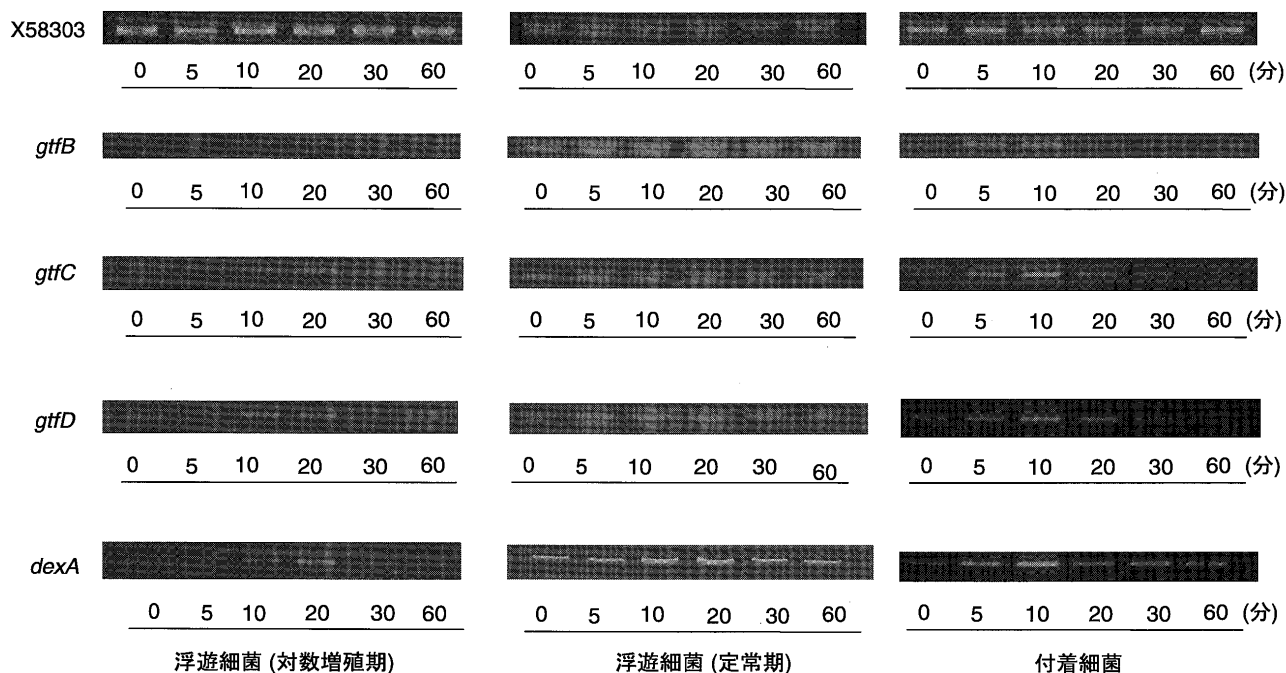


図4 培養温度を42℃に変化させた場合の *S. mutans* MT における *gtfs*, *dexA* mRNA の発現  
37℃, pH 7.5 で培養した浮遊細菌 (対数増殖期, 定常期), 象牙質板付着細菌をさらに42℃, pH 7.5で0, 5, 10, 20, 30, 60分間培養した後, 細菌から total RNA を抽出し, X58303, *gtfs*, *dexA* の mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。

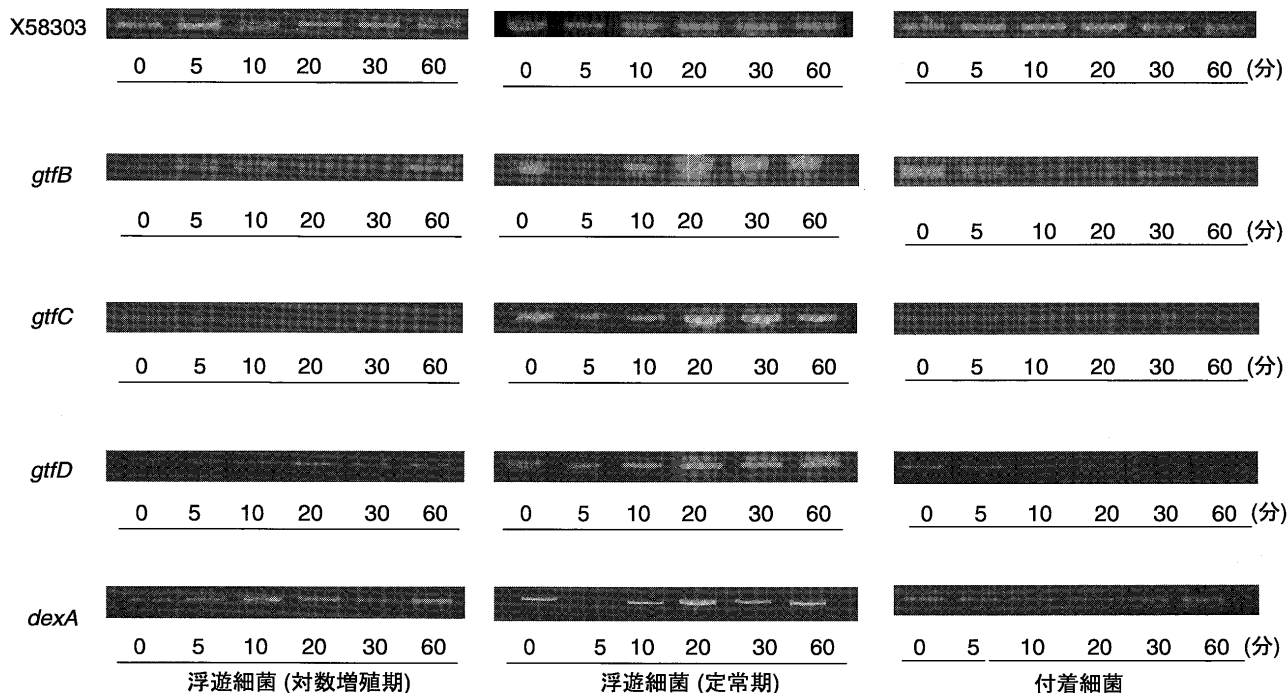


図5 培養 pH を pH 5.5 に変化させた場合の *S. mutans* MT における *gtfs*, *dexA* mRNA の発現  
37℃, pH 7.5 で培養した浮遊細菌 (対数増殖期, 定常期), 象牙質板付着細菌をさらに37℃, pH 5.5で0, 5, 10, 20, 30, 60分間培養した後, totalRNA を抽出し, X58303, *gtfs*, *dexA* mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。

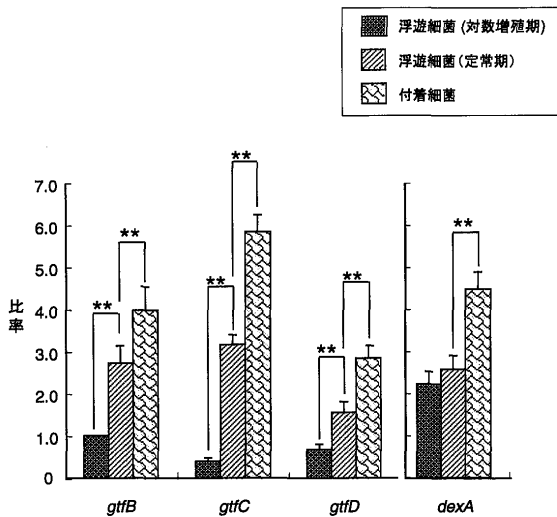


図6 37°C, pH 7.5 で培養した *S. mutans* MT における *gtfs*, *dexA* mRNA 発現量の比較

浮遊細菌の対数増殖期における *gtfB* mRNA 発現量を1として換算し、比較した。*S. mutans* の培養状態の違いによる各種遺伝子の発現量は象牙質板付着細菌、定常期における浮遊細菌、対数増殖期における浮遊細菌の順で高かった。対数増殖期における浮遊細菌においては、*gtfB*, *gtfD*, *gtfC* の順にその mRNA の発現が高かったのに対し、定常期における浮遊細菌および象牙質板付着細菌においては *gtfC*, *gtfB*, *gtfD* の順でその発現量は高かった。(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )

各種遺伝子の発現量は象牙質板付着細菌、定常期における浮遊細菌、対数増殖期における浮遊細菌の順で高かった。

次に培養条件の変化が各種 *gtfs*, *dexA* 遺伝子の発現に及ぼす影響の解析を行うため、各種 *gtfs*, *dexA* 発現量の比較を行った。42°Cにて保持した場合、対数増殖期における浮遊細菌では20分後、象牙質板付着細菌では10分後に最大の発現を示す傾向がみられた。対数増殖期における浮遊細菌では *gtfB* 遺伝子の発現において象牙質板付着細菌と比較して培養条件による増加がみられ、象牙質板に付着した状態においては *gtfC* および *dexA* における発現において浮遊細菌と比較して大きく増加する傾向がみられた(図7)。また、定常期における各種遺伝子発現の培養条件変化による影響は少なかった。

pH5.5にて保持した場合、対数増殖期における浮遊細菌においては *gtfB* および *gtfD* 遺伝子の発現量が増加したのに対し、*gtfC* は減少する傾向がみられた(図8)。また定常期においては、*gtfB*, *gtfC*, *gtfD* の各種遺伝子の発現は減少する傾向がみられた。一方、象牙質板付着細菌においては、*gtfC* の発現量が増加したのに対し、*gtfB* および *gtfD* は減少する傾向がみられた。象牙質板に付着した細菌における *dexA* に関しては時間とともにその発現量の増加を認めた。

### 3. 培養条件変化による象牙細管内における *S. mutans* MT の動態

#### (1) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

象牙細管内における *S. mutans* MT の動態を観察するため、培養を終了した試料から作製した超薄切片に PTS 染色を施し TEM で観察した。培養条件の変化に伴う TEM 像を図9~11に示す。37°C, pH 7.5にて14日間培養した象牙質齲蝕板の細管内には多数の *S. mutans* MT の侵入が認められた(図9A)。菌体内において PTS 染色により染まる、電子密度の高い顆粒様構造物が存在す

る菌体内多糖を合成した細菌はほとんど認められなかった(図9B)。42°Cで60分間保持した場合、細管内には多数の *S. mutans* MT の侵入が見られた(図10A)。また一部の菌体内において、PTS 染色により染まる菌体内多糖を合成した細菌が認められた(図10B)。pH 5.5で60分間保持した場合、細管内には多数の *S. mutans* MT の侵入が認められたが、一部の細管内においては細菌の密度が疎な部位を認めた(図11A)。菌体内多糖を有する細菌が、42°Cへ環境変化させた場合よりも多く認められた(図11B)。一方で細菌の集合密度が高い部位においては細胞壁の破壊像を認めた(図11C)。

#### (2) 菌体内多糖保有細菌数の定量的解析

観察範囲の細菌の侵入が認められる細管内において、どれだけの *S. mutans* MT が菌体内多糖を保有したかを評価するために、菌体内多糖を保有する細菌数の細管内における全菌数に対する割合を PTS 陽性細菌率として算出した。その結果を図12に示す。

培養条件の変化に伴い、菌体内多糖を合成した細菌数は増加し、control と比較し有意差を認めた。その増加量は pH 5.5 への条件変化において最も多く認められた。

### 4. 人工齲蝕象牙質板を培養条件変化させた場合のグルカン合成量の解析

各酵素がグルカンの合成・分解にどのように影響するかを解析するために、各種 *gtf* 遺伝子欠失株を用いて、48時間培養後の培養液中の水溶性グルカンの合成量、不溶性グルカンの合成量、象牙質板に付着したグルカンの合成量を測定した。

培養液中における水溶性グルカンの合成量は、親株と比較すると欠失株ではその合成量は低下する傾向がみられたが、各菌株において有意差は認められなかった(図13)。培養液中における不溶性グルカン量は *gtfC* 欠失株の方が親株よりも多かったが、*gtfB* 欠失株、および *gtfD* 欠失株ではその低下がみられた(図14)。象牙質板に付

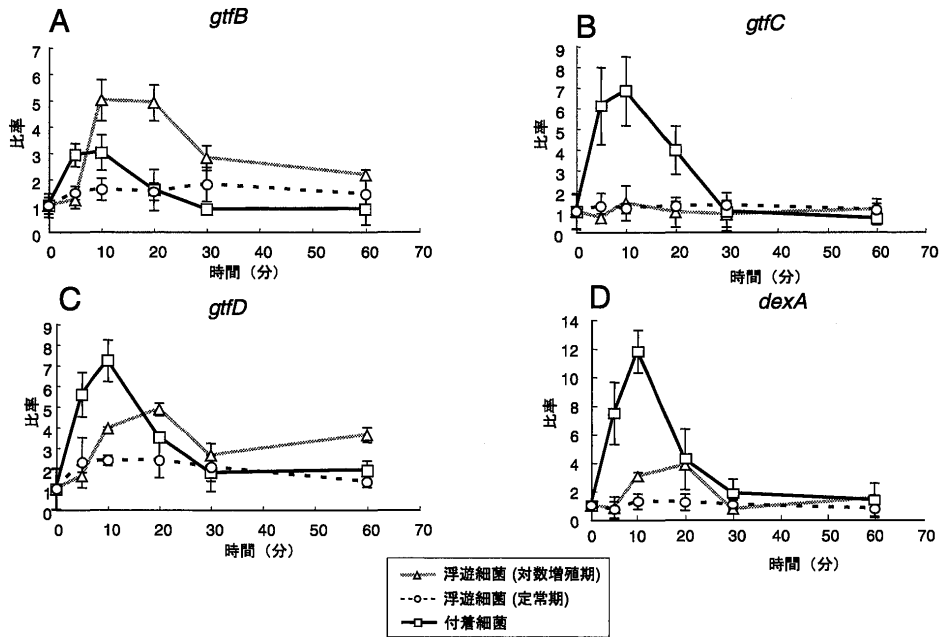


図7 培養温度を42℃へ変化させた場合の *S. mutans* MT における *gtfs*, *dexA* mRNA 発現量の比較  
 培養条件を変化させる前の浮遊細菌, および象牙質板付着細菌における各種遺伝子の発現量を1として換算し, 比較した。42℃にて培養した場合, 対数増殖期における浮遊細菌では20分後, 象牙質板付着細菌では10分後に最大の発現を示す傾向がみられた。対数増殖期における浮遊細菌では *gtfB* 遺伝子の発現が象牙質板付着細菌と比較して培養10分以降は増加した。培養30分までは象牙質板付着細菌における *gtfC*, *gtfD* および *dexA* の発現は浮遊細菌のそれらと比較して大きく増加する傾向がみられた。また, 定常期における浮遊細菌の各種遺伝子発現に対する培養条件変化による影響は少なかった。

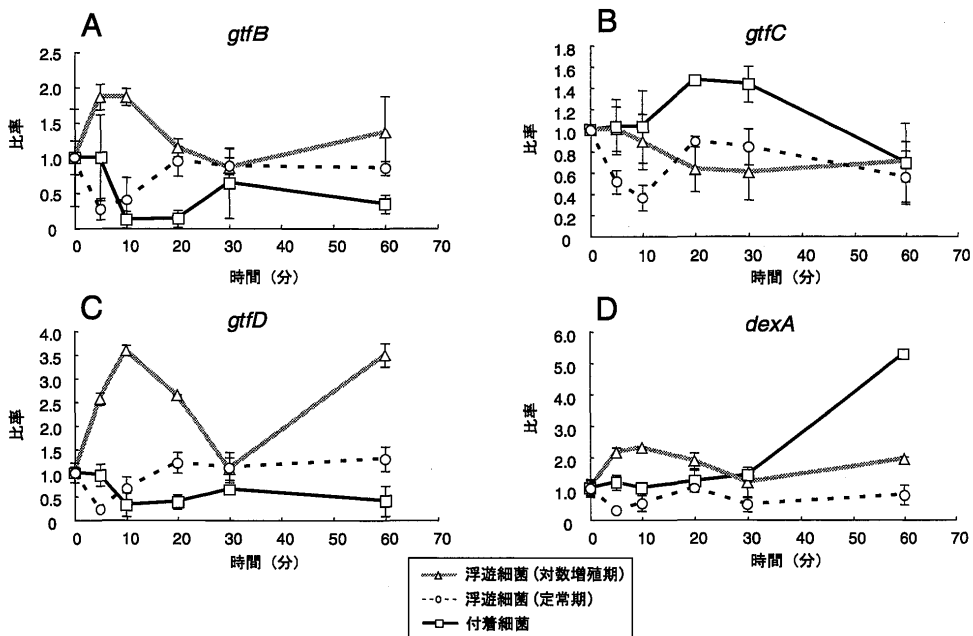


図8. pH5.5 へ培養条件を変化させた場合の *S. mutans* MT における *gtfs*, *dexA* mRNA の発現量の比較  
 培養条件を変化させる前の浮遊細菌, および象牙質板付着細菌における各種遺伝子の発現量を1として換算し, 比較した。PH5.5に変化させた場合, 対数増殖期における浮遊細菌においては *gtfB* および *gtfD* 遺伝子の発現量が増加したのに対し, *gtfC* は減少する傾向がみられた。また定常期における浮遊細菌においては, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* の各種遺伝子の発現は減少する傾向がみられた。一方, 象牙質板付着細菌においては, *gtfC* の発現量が増加したのに対し, *gtfB* および *gtfD* は減少する傾向がみられた。象牙質板付着細菌における *dexA* に関しては時間とともにその発現量の増加を認めた。



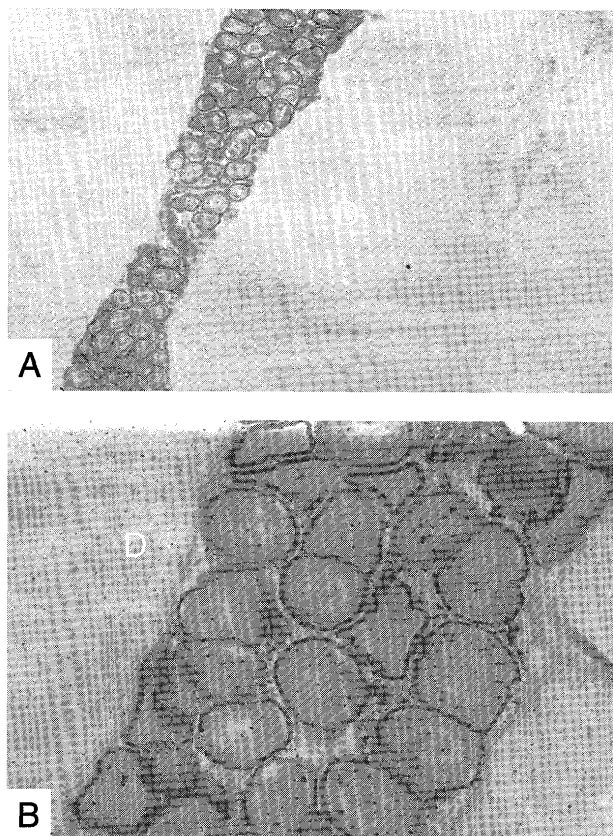


図9 培養条件を変化させる前の象牙質試料内部の細管内における侵入細菌のTEM像 (37°C, pH 7.5にて14日間培養後)  
 (A) 細管内には多数の *S. mutans* MT の侵入が認められた。(写真倍率: ×7,000倍)  
 (B) (A) の強拡大像を示す。菌体内においてPTS染色により染まる電子密度の高い顆粒状構造物はほとんど認められなかった。  
 (D: 象牙質) (写真倍率: ×20,000倍)

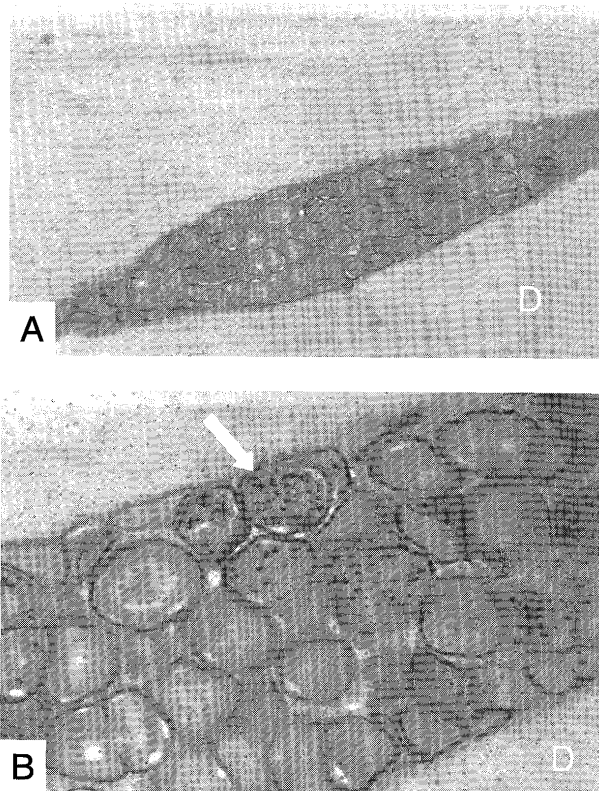


図10 42°Cにて60分間培養した象牙細管内の *S. mutans* MT のTEM像  
 (A) 培養温度を42°Cへ変化させた場合のTEM観察像を示す。細管内には多数の *S. mutans* の侵入が認められた。(写真倍率: ×7,000倍)  
 (B) (A) の強拡大像を示す。一部の菌体内にPTS染色により染まる電子密度の高い顆粒状構造物が認められた(矢印)。  
 (D: 象牙質) (写真倍率: ×20,000倍)

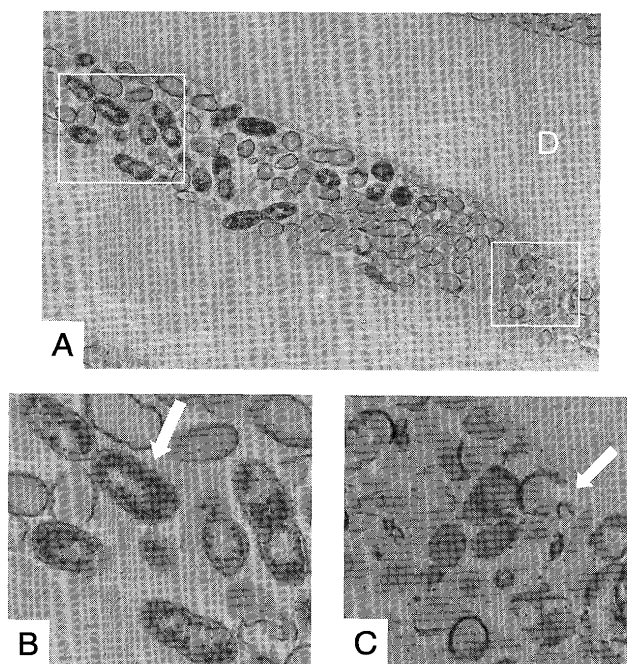


図11 pH 5.5にて60分培養した象牙細管内の *S. mutans* MT のTEM像  
 (A) 細管内へ多数の *S. mutans* MT の侵入が認められるが、*S. mutans* MT の密度が疎な部位が認められた。(写真倍率: ×7,000倍)  
 (B) *S. mutans* MT の菌体内にはPTS染色により染色される電子密度の高い顆粒状構造物が認められ、その割合は培養条件を42°Cへ変化させた場合よりも多く認められた(矢印)。(写真倍率: ×20,000倍)  
 (C) 細胞壁の破壊した *S. mutans* の拡大像を示す。細菌の集合密度が高い部位においては細胞壁の破壊像が認められた(矢印)。  
 (D: 象牙質) (写真倍率: ×20,000倍)

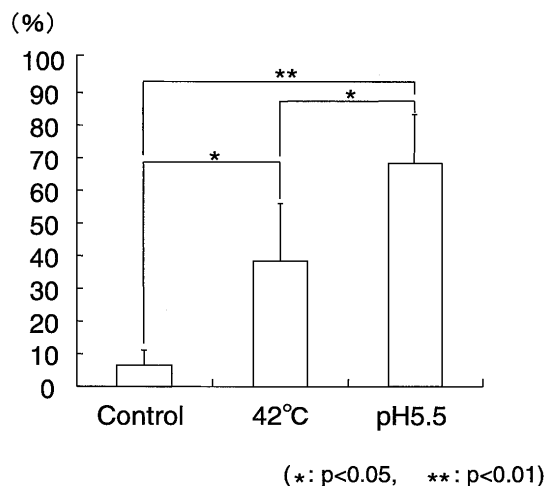


図12 象牙細管に侵入した *S. mutans* MT の PTS 陽性細菌率

培養条件変化を42℃あるいは pH 5.5 へと変化させると、菌体内多糖を合成した細菌数はコントロールに比べて有意に増加した。また、pH 5.5 への培養条件の変化の方が42℃への変化におけるよりも有意に PTS 陽性細菌率が増加した。(\*: p<0.05, \*\*: p<0.01)

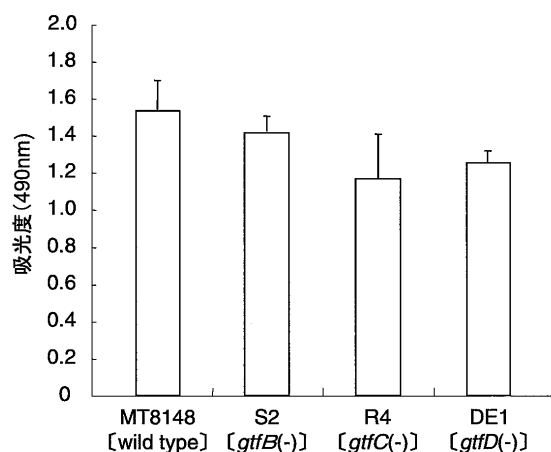


図13 *gtf* 欠失株の培養液中における水溶性グルカン合成量の比較

親株と比較すると欠失株では水溶性グルカンの合成量は低下する傾向がみられたが、各菌株間において有意差は認められなかった。

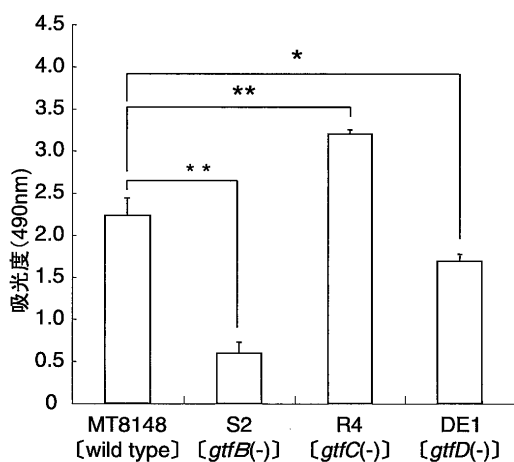


図14 *gtf* 欠失株の培養液中における不溶性グルカン合成量の比較

*gtfC* 欠失株は親株よりも有意に多い不溶性グルカン合成がみられた。一方、*gtfB* 欠失株、および *gtfD* 欠失株においては親株よりグルカン合成量が有意に低下した。(\*: p<0.05, \*\*: p<0.01)

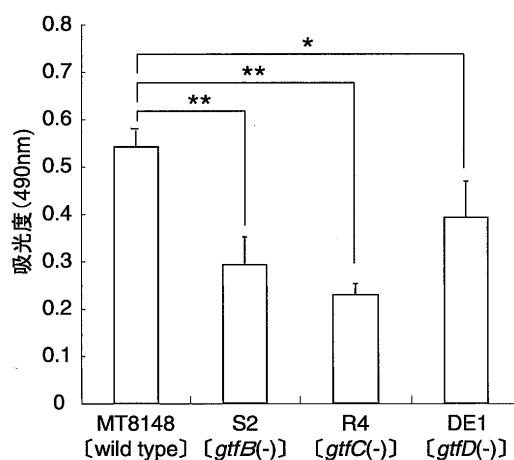


図15 *gtf* 欠失株の象牙質板に付着した不溶性グルカン合成量の比較

親株と比較して各種欠失株はともに有意に不溶性グルカン合成量の低下がみられ、*gtfC* 欠失株においては最大の低下がみられた。(\*: p<0.05, \*\*: p<0.01)

着した不溶性グルカン量は親株と比較して各種欠失株はともに低下し、*gtfC* 欠失株において最大の低下が認められた (図15)。

次に培養条件の変化が象牙質板に付着したグルカン合成量の変化にどの影響するかを解析するために、培養条

件を経時的に変化させた場合の象牙質板に付着したグルカンの合成量を測定した。

42℃に培養条件を変化させた場合の象牙質板に付着したグルカンの合成量は、20分後に増加しその後減少する傾向がみられた。また *gtfB* 欠失株においてのみその有

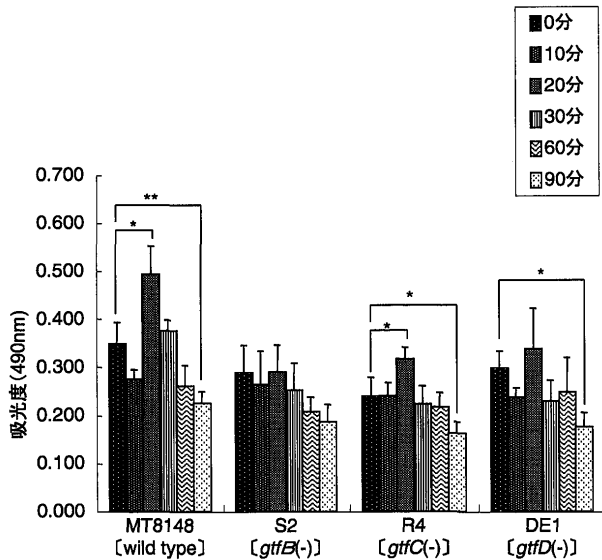


図16 *gtf* 欠失株の培養温度の変化が付着不溶性グルカンの合成量に及ぼす影響

培養温度を42℃に変化させると親株、各種欠失株における不溶性グルカン合成量はともに20分後に増加し、その後減少する傾向がみられた。また *gtfB* 欠失株においてのみその有意差はみられなかった。(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )

意差はみられなかった (図16)。

pH 5.5に培養条件を変化させた場合の象牙質板に付着したグルカンの合成量は低下し、遺伝子欠失株においてその低下は顕著にみられた (図17)。

## 考 察

これまで *S. mutans* の付着率に関する研究においては、ガラス板が頻繁に用いられてきた。しかしながら、ガラス板やプラスチック板など、材質により *S. mutans* の付着率に違いがみられると報告<sup>17)</sup> されており、*S. mutans* の付着の過程には対象となる材質の違いが影響するものと思われる。そこで本研究においては、ウシ象牙質板を用いた人工齲蝕象牙質モデルを作製した。ウシの歯は象牙細管の幅径がヒト象牙質に近く、ヒト象牙質板と代替できるといわれており<sup>18)</sup>、これを使用することにより *in vivo* における象牙質齲蝕病巣に近い条件での実験が可能と考えられる。今回、この人工齲蝕象牙質モデルを用いて、齲蝕病巣における *S. mutans* が、口腔内の環境変化によりどのような動態を示すのかを解析した。すなわち、*S. mutans* MT の培養条件を変化させることにより、その動態を解析した。

浮遊状態の *S. mutans* MT においては、42℃への温度変化に対しては control との有意差を認めなかったが、pH 5.5への培養条件変化により、その増殖は有意 ( $p <$

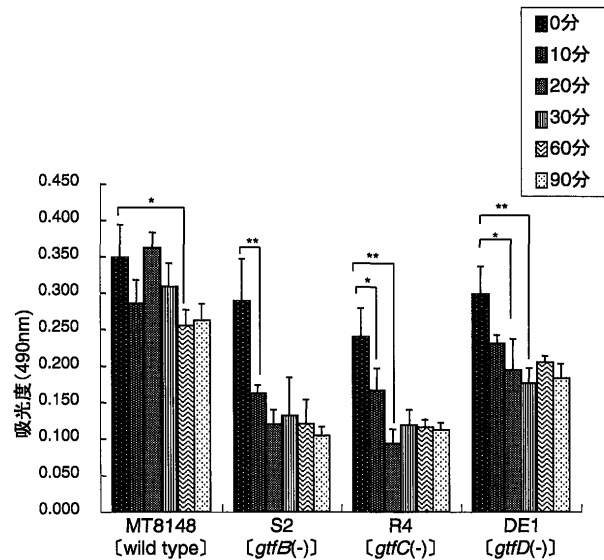


図17 *gtf* 欠失株の培養pHの変化が付着不溶性グルカンの合成量に及ぼす影響

培養pHを7.5から5.5に変化させると親株、各種欠失株ともにグルカン合成量は経時的に低下し、欠失株においてその低下は顕著にみられた。親株においては60分後に有意に低下が見られたが、*gtfB*、*gtfC* 欠失株においては10分後に、*gtfD* 欠失株においては20分後にそれぞれ有意な付着不溶性グルカン量の低下が認められた。

(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )

0.01) に抑制された。一方、象牙質板に付着した状態における *S. mutans* MT では温度変化、pH 変化による生菌数への影響は認められず、象牙質板に付着した状態は浮遊状態に比べ環境変化の影響を受けにくいと推察された。42℃へ環境変化させた場合の HSP70 の発現においても、その最大の発現量を示したのは、浮遊状態において60分後であったのに対し、象牙質板に付着した状態においては30分後であり、象牙質板に付着した状態においてはより早くストレスタンパクが発現し、培養条件変化に対してより早期に反応していることが示された。これらの事実は、象牙質齲蝕病巣の *S. mutans* が、環境の変化に対してより早く反応し、適応できることを示している。

細菌の持つ環境適応機構の一つとしてクオラムセンシング機構が考えられる。クオラムセンシング機構を有する菌では、クオラムセンシングシグナル分子を分泌しており、菌濃度が高まりこの分子の濃度が閾値を越えることにより、高菌濃度という環境ストレスに適応するように標的遺伝子が活性化される<sup>19)</sup>。*S. mutans* においてもこのクオラムセンシング機構は知られており、バイオフィルムの形成過程<sup>20)</sup>、酸や酸化に対する環境変化への適応機構として報告されている<sup>21)</sup>。特に酸耐性機構につ

いては詳細に研究されており、pH5.0の培養液に高濃度またはバイオフィーム状の菌体を加えて増殖させると、*comC*産物の蓄積によるクオラムセンシング機構が発動し<sup>22)</sup>、さらに低pH状態で誘導されて<sup>23,24)</sup>、酸性環境に対して適応状態となり、培養液のpHが3近くにまで増殖し続けられるようになる<sup>25)</sup>とされる。今回の実験において象牙質板に付着した状態における*S. mutans* MTの生菌数が環境変化を受けにくかったのは象牙質板に付着した状態における細菌密度が高く、クオラムセンシング機構が発動して、環境変化に対し早期に適応したためと考えられる。

次に、齶蝕象牙質病巣における*S. mutans*のグルカンの合成および分解の動態を明らかにするため、MT8148株(親株)のGTFおよびDexAに関する遺伝子の発現に着目して検討した。すなわち浮遊状態あるいは象牙質齶蝕における各種*gtf*群、および*dexA*のmRNA発現の量を比較した。その結果、象牙質板に付着した状態の細菌は対数増殖期における浮遊状態のものと比較して、*gtfB*においては約4倍、*gtfC*においては約12倍、*gtfD*においては約4倍、*dexA*においては約2倍の発現量の増加を認めた(図6)。また、定常期のものと比較すると、*gtfB*においては約1.5倍、*gtfC*、*gtfD*、*dexA*においては約2倍の発現量の増加を認めた。このことより齶蝕象牙質内における*S. mutans*はグルカンの合成、及び分解に関与する遺伝子をより多く発現し、盛んにグルカンのリモデリングを行っていることが示唆された。

また、GTFB/C/D、各々の*gtf*遺伝子の欠失株を用いて、グルカン合成量の変化を検索したところ、どの酵素遺伝子が欠失した株においても、親株と比較して有意に象牙質板へ付着した不溶性グルカン量は低下した。この事実はすべての酵素が存在することが付着不溶性グルカンを合成する過程において重要であることを示唆している。大腸菌に発現させたりコンビナントGTF(rGTF)を用いた実験では、グルカン付着に最適な各種酵素の量としてはGTFBの量が最も多いが、付着に関わる粘着性のグルカンの合成にはGTFCおよびGTFDも必要であることが示されている<sup>26)</sup>。このようにグルカン合成の過程においては3種類すべての酵素が必要であると考えられるが、どの酵素が齶蝕象牙質内で重要な働きをしているかは不明である。GTFの個々の酵素についての役割に関する報告として、バイオフィーム形成に最も重要なものはGTFBという報告<sup>27)</sup>や、高齶蝕者の*S. mutans*株はGTFB産生能が高いとの報告<sup>28,29)</sup>など齶蝕形成過程におけるGTFBの重要性が報告される一方、GTFCがグルカンの合成過程において必要という報告<sup>30)</sup>や、GTFCはペリクル面への初期付着に関与するという報告<sup>31)</sup>などGTFCを重要視した報告もある。このように、グルカン合成における各種GTFの重要性については見解が異なっている。今回の実験において、象牙質板に付着した細菌における*gtfC*発現は対数増殖期の細菌と比較して

その発現量は12倍と最も高く(図6)、またグルカン合成量の解析においても、*gtfC*欠失株において象牙質板に付着したグルカン量は最も少ない結果(図15)であった。この事実は、GTFCが特にグルカンの象牙質への付着過程、ならびにバイオフィームの形成など齶蝕病巣の形成過程において重要な役割を果たしていることを示している。

続いて、環境変化に対して齶蝕病巣における*S. mutans*のグルカンの合成および分解の過程がどのような変化を示すかについて明らかにするため、MT8148株(親株)のGTF、DexAに関する遺伝子の発現に着目して解析した。すなわち*gtfs*、*dexA*遺伝子の発現変化を解析したところ、42℃に変化させた場合、浮遊細菌においては約20分後に各遺伝子の発現が最大を示したのに対し、付着細菌においては10分後に最大を示した(図7)。従って、HSP70における発現のみならず、各種*gtf*、*dexA*発現においても、付着状態のほうがより早く条件変化に対して反応を示すことが示唆された。また、pH5.5へ培養条件変化させた場合にも、対数増殖期および定常期における浮遊細菌では*gtfC*発現が低下したのに対し、象牙質板に付着した状態では*gtfC*の発現が増加した(図8)。GTFCは低栄養環境において重要な役割を果たすという報告もあり<sup>27)</sup>、*gtfC*は象牙質齶蝕の形成過程のみならず、環境変化に対するグルカン組成の維持においても重要な役割を担っていることが示唆された。

今回、浮遊状態における*S. mutans* MTとして、対数増殖期および定常期の細胞を用いて実験を行うことにより、これら細胞周期の違いによって各種遺伝子の発現量に違いがあることが判明した(図6, 7, 8)。しかし*S. mutans*に関して、細胞周期の影響についての過去の報告はあまりない。*Escherichia coli*に関しては、対数増殖期と定常期では、それぞれ発現する遺伝子が異なり<sup>32-34)</sup>、定常期においては転写装置の構造・機能の変化や、細胞内の水素イオン濃度の変化がRNAポリメラーゼの構造機能に影響し、ストレスに適応する機構が働く<sup>34)</sup>とされている。今回の実験においてもこれらの機構が働き、対数増殖期と定常期における各種遺伝子の発現パターンが一部異なり、定常期においてはより環境変化に適応した遺伝子の発現を行ったと考えられる。

さらに今回、浮遊状態における定常期の*S. mutans* MTと、象牙質板に付着した状態における*S. mutans* MTにおいても各*gtf*、*dexA*遺伝子発現のパターンは異なる結果となった。歯面に付着後1時間経過した*S. mutans*が対数増殖期に相当するのに対し、3~6日経過した*S. mutans*は定常期に相当するとされており<sup>35)</sup>、本実験において用いた人工象牙質齶蝕モデルにおいては、14日間の長期培養を行ったため、様々な細胞周期の細菌が含まれると考えられるものの定常期の細菌が多いと考えられる。つまり、象牙質板に付着した状態の*S. mutans* MTを定常期における細胞とみなした場合、同じ定常期の*S.*

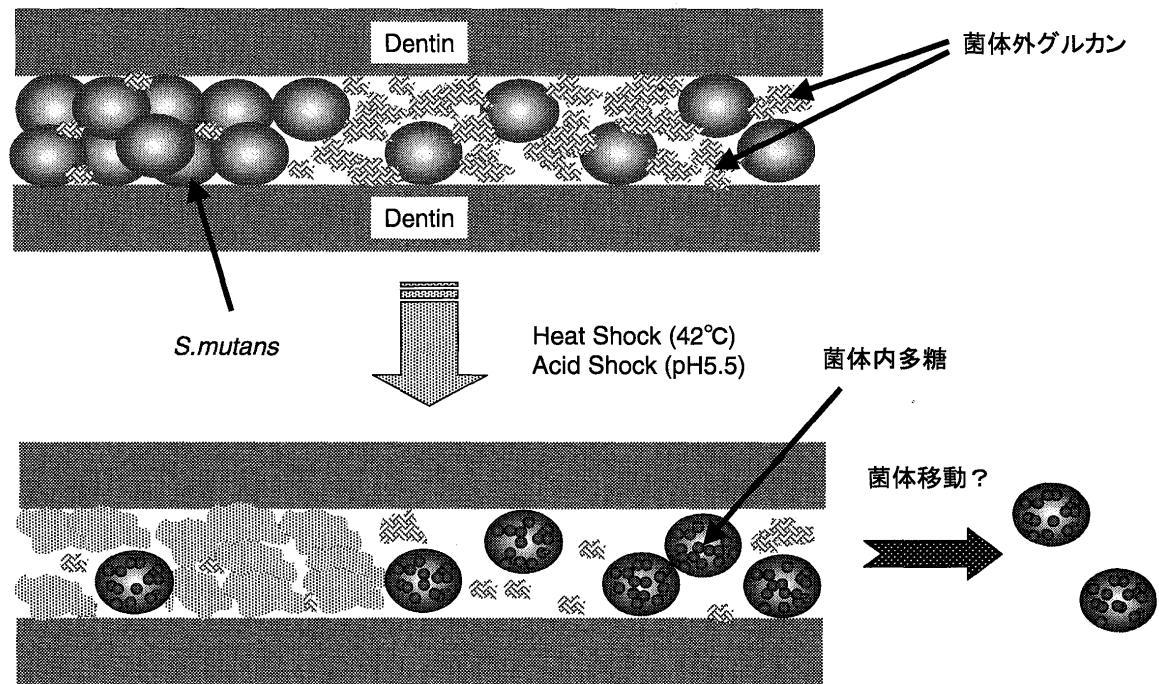


図18

*mutans* MT であっても浮遊状態あるいは象牙質板に付着した状態という条件の違いにより、各種遺伝子発現のパターンが異なるといえる。従って、細胞周期の影響以外に付着による何らかのシグナルにより齲蝕象牙質において遺伝子発現の変化が生じた可能性が考えられ、その一つの要因として先述のクオラムセンシング機構が考えられる。すなわち、浮遊状態あるいは付着状態の違いによるクオラムセンシングの発動に違いが生じ、環境変化に対する遺伝子発現パターンに違いを生じた可能性が考えられる。今後の検討課題であろう。

齲蝕象牙質板における遺伝子発現の検索の結果、*dexA* 遺伝子は pH 変化に対して経時的にその発現を増加したことより、グルカンの分解を促進させ、IMS を産生し菌体内に取り込んでいる可能性が示唆された。そこで、象牙細管内における *S. mutans* MT の菌体内多糖合成、ならびに超微細形態的变化を検索するために TEM による形態的観察を行った。TEM 観察により人工齲蝕象牙質板においては、培養条件変化に伴い PTS 染色により染まる顆粒様構造物が菌体内に多く認められ、多糖の合成を促進していることが示唆された (図10, 11)。菌体内多糖の合成はスクロースを添加した際に、象牙細管内においてその合成の促進を認めた報告<sup>36-40)</sup>はあるが、本研究により栄養状態の変化のみならず、温度変化や pH 変化など、*S. mutans* にとってストレスとなるような環境変化に対しても、菌体内多糖の合成が変動することが初めて明らかとなった。とくに pH 5.5 への変化に対しては有意 ( $p < 0.01$ ) にその合成の増加を認め (図12)、菌体内多糖は pH 低下という環境変化において重要な役

割を担っている可能性が考えられる。*S. mutans* は低い pH 環境においても生存し、増殖し続けることができるが、その適応機構として、 $H^+$ -ATPase が能動的に  $H^+$  イオンに続いて乳酸イオンを排出し、菌体内の pH を菌体外の pH の値より約 2 も高く保持する耐酸性機構を有する<sup>41)</sup>ことが知られている。この機構においては ATP が必要となり、今回の実験において観察された菌体内多糖が、 $H^+$ -ATPase を活性化させるための ATP 産生に利用されている可能性が考えられる。この耐酸性機構により *S. mutans* は齲蝕象牙質内のさらなる厳しい環境変化へ備えていると考えられる。

さらに、pH 低下させた場合の TEM 観察像においては、細菌の集合密度は疎になり、DexA による菌体外グルカンの分解により生じたと推察される物理的空間の形成が確認された (図11B)。これは環境変化に対して外部環境との交通を遮断するのではなく、逆に交通するような集合形態を示している。バイオフィーム形成過程においては水路を発達させた構築体を形成する<sup>42)</sup>とされ、これら水路が微生物にとって様々なストレスに対して抵抗できる生息の場となっている<sup>43)</sup>と考えられている。従って、微生物はストレスの影響を直接的に受けることにより適応していると考えられ、今回確認された空間も、結果的に環境変化に対して適応しやすい細菌の集合形態となっている可能性が考えられる。

また、この現象により作られた物理的空間により菌体移動が起こる可能性も考えられる。*S. mutans* は、生息環境としては厳しいと考えられる象牙細管の深部へと侵入し、生活菌においては歯髄圧に対しても侵入するとき

れる<sup>44, 45)</sup>。その侵入過程は不明であるが、*S. mutans* のタンパク抗原が細管内への侵入に重要な役割を果たすことが示唆されている<sup>46, 47)</sup>。さらに侵入機構として、本研究により認められた物理的空間を利用している可能性が考えられる。つまり環境変化に伴い DexA の産生を増加させ、菌体外グルカンを加水分解し IMS を産生した結果、物理的空間が形成され、菌体内多糖を合成した細菌が形成された空間を利用して移動していくというものである(図18)。また移動した細菌は、菌体内多糖を保有するため、低栄養状態においても生存し続ける可能性が考えられる。

以上より、象牙細管内で生息する細菌は、環境変化に対して、クオラムセンシング機構が発動している可能性以外に、GTF 及び DexA による菌体外グルカンの合成、分解を行いグルカンの組成及び細菌の集合形態を変化させることにより環境変化に適応し、また菌体内多糖を合成しながら細管深部へと侵入し、生存し続けている可能性が考えられる。

本研究により、象牙質齲蝕の形成の過程および、環境変化に対するグルカン組成の維持の過程において *S. mutans* の GTFC が重要な役割を担っていることが示唆された。今後 GTFC の合成あるいは活性を阻害する要因を検索することにより、象牙質齲蝕病巣の形成を抑制できる可能性が考えられる。また、環境変化に対して菌体内多糖の合成を認めたことより、その菌体内多糖の合成を阻害する機構を検索することは、*S. mutans* の象牙細管中における致死機構の検索につながるとも考えられる。さらに、*S. mutans* の象牙細管の侵入機構の一つとして DexA による菌体外グルカンの分解の可能性も示唆され、今後 DexA に着目することにより *S. mutans* の象牙細管内における侵入機構について検索していく必要があると思われる。

## 結 論

象牙質齲蝕病巣における *S. mutans* が口腔内の環境変化によりどのような影響を受けるのかを検討する目的で、ウシ象牙質板を用いた齲蝕モデルを作製し解析した。すなわちグルカン合成・分解に関与する酵素の GTF 群および DexA に着目し、浮遊状態の *S. mutans* MT および *S. mutans* MT による人工齲蝕象牙質モデルの培養条件を変化させることにより解析を行った。その結果、以下のような結論を得た。

1. 環境変化として42℃または pH 5.5 へ培養条件を変化させると、象牙質板に付着した状態の *S. mutans* MT はより浮遊状態に比較して早く反応を示し、環境変化の影響を受けにくいことが示された。
2. 齲蝕象牙質内における *gtfs*, *dexA* 遺伝子の発現量は、浮遊細菌のそれと比較して高く、その中でも *gtfC* の発現が最大であった。培養条件を変化させた場合、齲蝕象牙質内の *S. mutans* MT は浮遊状態に比

べ早期に変化を示し、特に pH 5.5 への培養条件変化に対して、*gtfC*, *dexA* 遺伝子の発現増加を認めた。

3. 象牙細管内の *S. mutans* MT を TEM 観察したところ、培養条件変化に伴い菌体内多糖を合成することが明らかとなり、また pH5.5 への培養条件変化では、細管内細菌の集合密度が疎になった部位が認められた。
4. 各種 *gtf* 遺伝子の欠失株を用いてグルカン合成量の変化を検索したところ、*gtfC* 欠失株において培養液中の不溶性グルカン量は最大であったが、象牙質板に付着した不溶性グルカン量は最も少なかった。

以上の結果より、*S. mutans* は歯面付着、グルカンの合成、環境変化などの過程において GTFs および DexA の産生量を変化させることが明らかとなった。また、齲蝕象牙質内においては、環境変化に対して菌体外グルカンの合成・分解を行うとともに、菌体内多糖を合成し様々な適応を示すことが明らかとなった。またその過程においては GTFC が重要な役割を果たすことが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導御高聞を賜った歯科保存学分野 松尾敬志教授に深甚なる謝辞を表しますとともに、御高聞御助言を戴いた歯周歯内治療学分野 永田俊彦教授、口腔感染症学分野 三宅洋一郎教授に深謝致します。また、*S. mutans* MT8148株及び同遺伝子改変株の供与を賜った大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室 大嶋隆教授、ならびに直接御指導と御助言を戴いた、歯科保存学分野 尾崎和美講師に厚く御礼申し上げます。最後に数々の御教示と御援助を戴いた歯科保存学分野の諸先生方に深謝致します。

## 文 献

- 1) Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50, 353-380 (1986)
- 2) Bender GR, Sutton SV and Marquis RE: Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun* 53, 331-338 (1986)
- 3) Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najar F, Lai H, White J, Roe BA and Ferretti JJ: Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14434-14439 (2002)
- 4) Hanada N and Kuramitsu HK: Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene, coding for primer-dependent glucan synthesis. *Infect Immun* 57, 2079-2085 (1989)
- 5) Hanada N and Kuramitsu HK: Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfC* gene,

- coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect Immun* 56, 1999-2005 (1988)
- 6) Hamada S and Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44, 331-384 (1980)
- 7) Parker RB and Creamer HR: Contribution of plaque polysaccharides to growth of cariogenic microorganisms. *Arch Oral Biol* 16, 855-862 (1971)
- 8) Hojo S, Takahashi N and Yamada T: Acid profile in carious dentin. *J Dent Res* 70, 182-186 (1991)
- 9) Jayaraman GC and Burne RA: DnaK expression in response to heat shock of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 131, 255-261 (1995)
- 10) Hoppenbrouwers PM, Driessens FC and Borggreven JM: The demineralization of human dental roots in the presence of fluoride. *J Dent Res* 66, 1370-1374 (1987)
- 11) Kinoshita T, Imamura J, Nagai H and Shimotohno K: Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 206, 231-235 (1992)
- 12) Becker A, Reith A, Napiwotzki J and Kadenbach B: A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Anal Biochem* 237, 204-207 (1996)
- 13) Bentley RW, Leigh JA and Collins MD: Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 41, 487-494 (1991)
- 14) White HW, Vartak NB, Burland TG, Curtis FP and Kusukawa N: GelStar nucleic acid gel stain: high sensitivity detection in gels. *Biotech* 26, 984-988 (1999)
- 15) Nisizawa T, Imai S, Akada H, Hinoide M and Araya S: Extracellular glucans produced by oral streptococci. *Arch Oral Biol* 21, 207-213 (1976)
- 16) Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F: A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168, 167 (1951).
- 17) Yoshida A and Kuramitsu HK: Multiple *Streptococcus mutans* Genes Are Involved in Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* 68, 6283-6291 (2002).
- 18) Schilke R, Lisson JA, Bauss O and Geurtsen W: Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 45, 355-361 (2000)
- 19) de Kievit TR and Iglewski BH: Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68, 4839-4849 (2000)
- 20) Wen ZT and Burne RA: Functional genomics approach to identifying gene required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 68, 1196-1203 (2002)
- 21) Wen ZT and Burne RA: LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *J Bacteriol* 186, 2682-2691 (2004)
- 22) Li YH, Hanna MN, Svensater G, Ellen RP and Cvitkovitch DG: Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J Bacteriol* 183, 6875-6884 (2001)
- 23) Belli WA and Marquis RE: Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 57, 1134-1138 (1991)
- 24) Dashper SG and Reynolds EC: pH regulation by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 71, 1159-1165 (1992)
- 25) 花田信弘: ミュータンス連鎖球菌の臨床生物学. 東京, クインテッセンス出版, 28-46 (2003)
- 26) Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, Kawabata S, Sobue S and Fujiwara T: Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 80, 1672-1677 (2001)
- 27) Alaluusua S, Gronroos L, Zhu X, Saarela M, Matto J, Asikainen S and Fukushima K: Production of glucosyltransferases by clinical mutans streptococcal isolates as determined by semiquantitative cross-dot assay. *Arch Oral Biol* 42, 417-422 (1997)
- 28) 富田行秀: 高う蝕経験者と無う蝕経験者から分離される *Streptococcus mutans* の Glucosyltransferase-SI 産生性. *日大口誌* 23, 127-136 (1997)
- 29) 芳野素子: ミューカウントを用いて分離した小児の *Streptococcus mutans* の多糖体合成能とう蝕罹患状況との関係. *小児歯誌* 40, 500-515 (2002)
- 30) Tsumori H and Kuramitsu H: The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GtfC enzyme. *Oral Microbiol Immunol* 12, 274-280 (1997)
- 31) 福島和雄: GTF 遺伝子組み換え体を用いたう蝕誘発性バイオフィルム形成機序の解析. *日細菌誌* 56, 114 (2000)
- 32) Ishihama A: Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. *Curr Opin Genet Dev* 7, 582-588 (1997)
- 33) Ishihama A: Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes Cells* 4, 135-143 (1999)
- 34) Ishihama A: Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* 54, 499-518 (2000)

- 35) Beckers HJ and van der Hoeven JS: Growth rates of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* during early colonization of tooth surfaces in gnotobiotic rats. *Infect Immun* 35, 583-587 (1982)
- 36) 木持 健: シールド・トリートメントと象牙質内残存細菌の関係について. 四国歯誌15, 123-138 (2002)
- 37) Berman KS, Gibbons RJ and Nalbandian J: Localization of intracellular polysaccharide granules in *Streptococcus mitis*. *Arch Oral Biol* 12, 1133-1138 (1967)
- 38) Gibbons RJ and Kapsimalis B: Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by *Streptococcus mitis*. *Arch Oral Biol* 8, 319-329 (1963)
- 39) Hammond BF: Intracellular polysaccharide production by human oral strains of *Lactobacillus casei*. *Arch Oral Biol* 16, 323-338 (1971)
- 40) 岡田珠美, 富田行秀, 田中秀雄, 藤崎宜子, 河野善治, 池見宅司, 竹内武男, 福島和雄: 高齢者と無う蝕者から分離した *Streptococcus mutans* の in vitro う蝕原性試験. 日歯保存誌43, 1113-1120 (2000)
- 41) Suzuki T, Tagami J and Hanada N: Role of F1F0-ATPase in the growth of *Streptococcus mutans* GS5. *J Appl Microbiol* 88, 555-562 (2000)
- 42) Costerton JW and Stewart PS: Battling biofilms. *Sci Am* 285, 60-67 (2001)
- 43) 花田信弘: ミュータンス連鎖球菌の臨床生物学. 東京, クインテッセンス出版, 22-25 (2003)
- 44) 向 宣男, 畑 好昭, 斉藤 和子: ウシ象牙細管における細菌通過性 第1報. 補綴誌 34, 167-174 (1990)
- 45) 向 宣男, 畑 好昭, 斉藤 和子: ウシ象牙細管における細菌通過性 第2報. 補綴誌35, 1229-1235 (1991)
- 46) Love RM, McMillan MD and Jenkinson HF: Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun* 65, 5157-5164 (1997)
- 47) Love RM and Jenkinson HF: Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 13, 171-183 (2002)