

研究者：大原 紫

(所属:広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 統合健康科学部門 小児歯科学)

研究題目：小児齲蝕の新たな予防法開発へ向けたリスク憎悪因子の解明

目 的：

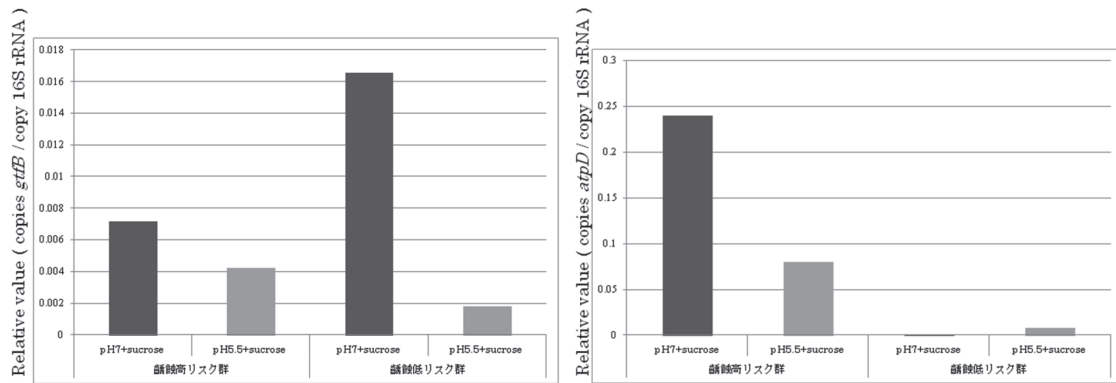
齲蝕は、小児歯科臨床において最も多く遭遇する疾患であり、齲蝕予防法を確立するうえで、個人が保有する齲蝕原因菌の病原性を把握することは重要である。主要な齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) は、口腔内の様々な環境変化による影響を受けている。申請者はこれまでに、酸性環境と糖を添加した条件下で小児が保有する *S. mutans* の浮遊状態での不溶性グルカン合成能や耐酸性能に関与する遺伝子の mRNA 発現について検討し齲蝕重症度との関係を明らかにした。今回の研究では、小児から分離した *S. mutans* にバイオフィルムを形成させ、バイオフィルム内での齲蝕関連遺伝子の発現量と齲蝕重症度との関連を明らかにするとともに、環境変化が *S. mutans* の性状に与える影響を解明することを目的とする。

対象および方法：

小児口腔内より分離した *S. mutans* (齲蝕高リスク群 3 株, 齲蝕低リスク群 3 株) を、pH7.0 および pH5.5 に調整し 30 mM sucrose を添加した Brain Heart Infusion (BHI, Becton Dickinson and company) 液体培地を用い、37℃で 48 時間嫌気培養した。培養にはガラス試験管を使用し、水平面に対して 30 度に傾斜させた。培養後、vortex mixer で 10 秒間振盪して上清を捨て、Tris-EDTA 5 ml を加え、試験管壁に付着したバイオフィルムを cell scraper にて回収した。得られたバイオフィルムから RNA を抽出し、*S. mutans* の *dexA* を標的としたプライマーを用いて PCR 反応を行い、DNA の混入がないことを確認した。*S. mutans* の不溶性グルカン合成能に関与する glucosyltransferase B 遺伝子 (*gtfB*) および耐酸性機構に関与する F-ATPase の、 β -subunit である *atpD* を標的とした既知の配列を用いて One Step SYBR Primescript RT-PCR kit II (TaKaRa) を使用して Chromo 4 (Bio-Rad Laboratories) にて Real-Time RT-PCR 反応を行い、検量線法にて mRNA 発現量を測定した。検量線作成には *S. mutans* 標準株 C67-1 より抽出した RNA から合成した cDNA を使用し、内部コントロールとして *S. mutans* の 16S rRNA を標的とした既知の配列を用いた。反応条件は、42℃ 1 min, 95℃ 10 sec, (95℃ 5 sec, 55℃ 30 sec) を 40 cycle, 60℃ 1 min とした。

結果および考察：

pH7.0 の BHI で形成されたバイオフィルム内での *gtfB* の mRNA 発現量は、齲蝕低リスク群から得られた *S. mutans* の方が齲蝕高リスク群より多かった。酸性環境である pH5.5 の BHI での発現量は両群ともに減少したが、齲蝕高リスク群では pH7.0 での約 6 割の発現量であったのに対して、齲蝕低リスク群では約 1 割まで減少していた。*atpD* の mRNA 発現量は、齲蝕高リス



ク群で pH5.5 での発現量は減少しているが、齲蝕低リスク群と比較すると酸性環境下でも多く発現している傾向が認められた。

口腔内において齲蝕原因菌の一つである *S. mutans* はバイオフィルムを形成し、その中で代謝産物である酸を産生し、その酸により歯質は脱灰する。バイオフィルムにより多くの不溶性グルカンが含まれることで、内部で産生された酸はバイオフィルム外へ拡散されにくくなり、また、緩衝能を持つ唾液の侵入を妨げることで長時間バイオフィルム内の酸性環境が保たれる。今回用いた齲蝕高リスク群の *S. mutans* は、酸性環境となるバイオフィルム内でも *atpD* を発現することで耐酸性能を持ち、さらに *gtfB* により不溶性グルカンを合成し続けることで、より酸性のバイオフィルムを形成することができるのではないかと示唆される。それによって、より重症の齲蝕が臨床症状として認められるようになるのではないかと考える。

今回の実験では、酸性条件での培養を行って mRNA 発現量を検討したが、今後は、繰り返し酸性環境に曝露することによって齲蝕に関連する遺伝子発現に影響が認められるかどうかを検討課題とする。

成果発表：(予定を含めて口頭発表，学術雑誌など)

国内学会発表後，論文投稿予定である。