

研究者：小口 莉代（所属：日本歯科大学大学院生命歯学研究科歯科臨床系専攻・小児歯科学講座）

研究題目：バイオフィーム形成における口腔レンサ球菌宿主定着因子の機能解析

目的：

Streptococcus gordonii は口腔におけるバイオフィーム（歯垢）形成や、それに続く齲蝕、歯肉炎の発症に関与しているのみならず、感染性心内膜炎の原因菌としても考えられている [高橋ら, 2013]。口腔バイオフィーム形成は、*S. gordonii* などの口腔レンサ球菌がペリクルを介して歯に付着し定着することで開始する [Kolenbrander *et al.* 2002]。*S. gordonii* の菌面への付着には、アドヘジンの1つである Hsa が重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では Hsa のバイオフィーム形成における役割を明らかにするため、*S. gordonii* DL1 株（野生型）とその *hsa* 変異株との比較を行った。ポリスチレン表面へのバイオフィーム形成量を比較するにあたり、バイオフィーム形成量の検出方法について検討し、様々な培養条件における *S. gordonii* DL1 株（野生型）と *hsa* 変異株との比較を行った。

対象および方法：

1. 使用菌株

S. gordonii DL1 株（野生型）および *S. gordonii* EM230 株（DL1 *hsa::erm*, (*hsa* 変異株)) を用いた。*S. gordonii* は Brain Heart Infusion (BHI) 培地 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) にて 37°C 好気下で一晩培養した。EM230 株の培養では、10 µg/ml エリスロマイシンを培地に加えた。

2. Biofilm assay

バイオフィーム形成は Loo ら [Loo *et al.* 2000] の方法に従った。培地には Biofilm medium (BM), グルコースの代わりに 0.8% スクロースを含有した BM (0.8% スクロース含有 BM), 0.1M NaCl 含有 BM, 1% スクロース含有 BHI を用いた。培地を 200 µl ずつ 96 穴丸底または平底のポリスチレン製マイクロタイタープレートに分注し、一晩培養した *S. gordonii* 野生型 (DL1 株) または *hsa* 変異株を $A_{620nm}=0.01$ となるようにそれぞれ植菌した。その後、37°C 好気下または嫌気下で一晩培養した。バイオフィーム形成量を評価するため、25 µl の 1% または 0.2% クリスタルバイオレットを加え 15 分間染色した。菌体が浮遊した培地を捨て、200 µl の蒸留水で 3 回洗浄後、室温にて乾燥し、200 µl の 100% または 70% エタノールで 15 分間、30 分間、または 1 時間脱色し、吸光度 (575 nm) を測定した。

3. 統計学的解析

野生型と *hsa* 変異株のバイオフィーム形成量の比較には対応のない *t* 検定を用いた ($n = 6$)。

結果：

1. 実験条件の検討

① バイオフィーム形成量の検出方法についての検討

形成されたバイオフィームを染色するために用いたクリスタルバイオレットの濃度，クリスタルバイオレットを抽出するために用いたエタノールの濃度および抽出時間について検討した。その結果，0.2%のクリスタルバイオレットでバイオフィームを染色し，70%のエタノールにて30分間クリスタルバイオレットの抽出を行った場合に，誤差が少なく，再現性のある安定した結果が得られた。

② 培地の検討

BM，0.8%スクロース含有BM，0.1M NaCl含有BM，あるいは1%スクロース含有BHI培地をもちいてバイオフィーム形成を観察した。その結果，BMを培地として用いた際に最も野生型と *hsa* 変異株の比較に差がみられ，再現性があった。

以上①，②の結果より，以降の実験は上記の条件で行った。

2. 培養条件の検討

バイオフィーム形成における培養条件について野生型と *hsa* 変異株で比較した。培地をBMとした好氣的培養においては野生型と *hsa* 変異株にはバイオフィーム形成量に有意な差が認められなかったが，培地をBMとした嫌氣的培養では野生型と *hsa* 変異株に有意な差が認められた（図1）。

また，培地をBMとした嫌氣的培養で96穴マイクロタイタープレートの底の形状を比較した場合には，形状が丸底，平底ともに野生型と *hsa* 変異株に有意な差が認められた（図2）。

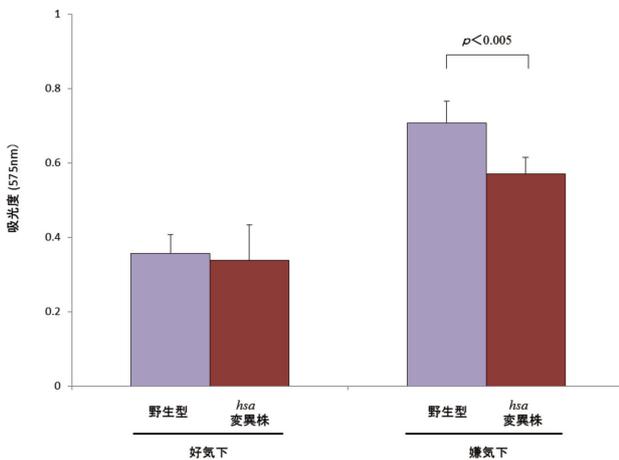


図1 *S. gordonii* の好気性または嫌気性条件におけるバイオフィーム形成

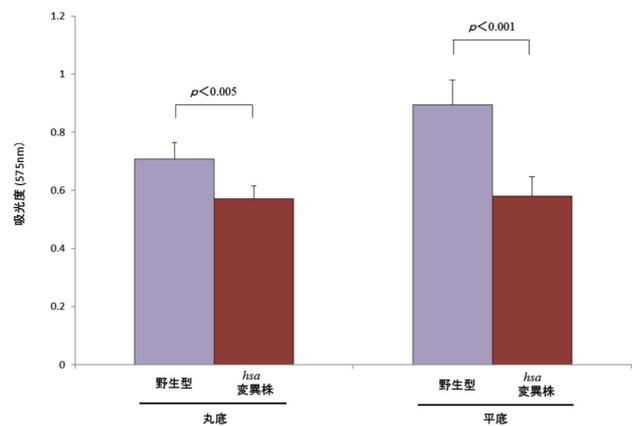


図2 *S. gordonii* の丸底または平底の96穴マイクロタイタープレートにおけるバイオフィーム形成
*比較のため，図1の嫌気下のデータも示した。

考 察：

本研究では、口腔バイオフィルム形成における Hsa の役割を明確にするため、ポリスチレン製マイクロタイタープレートを用いた *S. gordonii* DL1 株（野生型）とその *hsa* 変異株のバイオフィルム形成量の比較を行った。現時点では、*hsa* 変異株と比較して、野生型においてより多くのバイオフィルム形成が認められた。

マイクロタイタープレートを用いたバイオフィルムアッセイでは、O'Toole [O'Toole 2011] を初めとして非常に多くの報告があるが、検出方法について詳細な検討を行っている研究、および、詳細な記述がなされている研究は少ない。そのため、まず始めにバイオフィルム形成量の検出方法および培地の検討を行った。その結果、培地は BM を用い、クリスタルバイオレットの濃度は 0.2%、抽出エタノールの濃度は 70%、抽出時間は 30 分でより再現性のある結果が得られた。

Hsa については、分子生物学的性質、感染性心内膜炎における病原性、宿主レセプター、細胞分化との関連性が明らかにされている。しかしながら、Hsa など口腔レンサ球菌のアドヘジンの口腔への付着・定着についての報告は少ない [Nobbs 2007, Rogers 2001]。今回の実験では *S. gordonii* DL1 株（野生型）と *hsa* 変異株とを比較し、バイオフィルム形成における培養条件を検討した結果、嫌気性における培養で明確な差が認められた。今後さらにこのアッセイ系を用いて、*S. gordonii* のペリクル成分への付着における Hsa の役割について、より詳細に検討する予定である。

参考文献：

- 1) Kolenbrander, P. E *et al.* 2002. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66 : 486
- 2) Loo, C. Y *et al.* 2000. *J Bacteriol.* 182 : 1374
- 3) Nobbs, A. H *et al.* 2007. *J. Bacteriol.* 189 : 3106
- 4) O'Toole, G. A. 2011. *J Vis Exp.* 30 : pii : 2437
- 5) Rogers, J.D *et al.* 2001. *Infect Immun.* 69 : 7046
- 6) 高橋ら. 2013. *日細菌誌.* 68 : 283

成果発表：（予定を含めて口頭発表，学術雑誌など）

- 1) 第 88 回日本細菌学会総会（岐阜），2015 年 3 月，ポスター発表