原	著
---	---

Streptococcus mutans のバイオフィーム形成における 推定遺伝子の評価

茂 木 瑞 穂

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学系専攻

口腔機能発育学講座 小児歯科学分野

(主任・指導：高木裕三教授)

(2005 年 12 月 8 日 受付)

Assessment of Gene Associated with *Streptococcus mutans* Biofilm Formation

MOTEGI Mizuho

Developmental Oral Health Science, Department of Orofacial Development and Function,

Division of Oral Health Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. TAKAGI Yuzo)

Streptococcus mutans, the primary etiological agent of human dental caries and an obligate biofilm-forming bacterium, has developed a variety of mechanisms to colonize the tooth surface. Oral transmission of *S. mutans* through contact between mother and child is thought to be one of the risks of developing dental caries. In this study, I surveyed oral transmission frequency of *S. mutans* from mother to a 3-year-old child. In 19 (10.9%) of 174 mother-child pairs, *S. mutans* was isolated from both mother and child. The identities of genomic DNA from *S. mutans* in 5 (45.5%) of the 11 mother-child pairs were presented. Among those, the biofilms formed by *S. mutans* 3c and 4c, respectively, which had high and low ability of biofilm formation, were examined by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Microscopic analysis revealed that the volume of biofilm formation in 3c was higher than that in 4c biofilm in the bottom. Furthermore, DNA microarrays were used to study the gene expression profiles of 3c and 4c biofilms. In this paper we describe that about 3.8% of genes showed differential expression; about 2.2% of genes were activated and about 1.6% were repressed in 3c biofilm compared with 4c biofilm. The present study suggests that biofilm gene expression is strongly associated with differential biofilm formation. Our identification of biofilm-involved genes points to mechanisms of the virulence of *S. mutans* and provides a first foothold for studying the natural history of *S. mutans* infections in mother and child.

I. 緒 言

Streptococcus mutans は齲蝕の主な原因菌であり、歯表面にバイオフィームを形成する細菌である¹⁾。この細菌は乳歯萌出後に初めて口腔内より検出され²⁾、さまざまなメカニズムにより歯表面へ定着していくと考えられている。この細菌は、血清型³⁾やバクテリオシン型⁴⁾、遺伝子型^{5,6)}など、さまざまな特質で分類されており、それらを駆使することで感染経路を追跡することが可能である。齲蝕予防や治療を行ううえで、小児口腔内への *S. mutans* の感染経路を調べることはきわめて重要であり、このような観点で行われた多くの研究で、mutans

streptococci (MS) は乳幼児期に母親から子へ伝播することが多いと報告されている。日本における MS 菌伝播の研究では、地方都市である広島において 51.4% の子供の *S. mutans* が母親のものと一致したという報告がある⁶⁾が、旧 6 大都市での報告はない。

近年のバイオフィーム研究は、顕微鏡を用いた表層のバイオフィーム構造の観察がほとんどである。ところが以前の研究で、デンタルバイオフィームは死菌層に包まれた生菌層の内側に空洞や溝が存在することが報告⁷⁾されており、バイオフィームの内部構造は多様性があることが示唆されている。しかし、内部構造の違いを定量化した報告はこれまでほとんどない。

表1 PCR プライマー

Primer	Sequence (5'to 3')	Product size (bp)
GTFB-F	ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG	517
GTFB-R	CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC	
GTFI-F	GATAACTACCTGACAGCTGACT	712
GTFI-R	AAGCTGCCTTAAGGTAATCACT	

近年、バイオフィルムを形成する細菌について浮遊菌からバイオフィルムを形成する菌へ変化した際の細胞内遺伝子変遷の研究がなされるようになった。以前の研究⁸⁾では、*S. mutans* のバイオフィルム形成では非水溶性グルカンの合成に関与する glucosyltransferase (Gtfs) の役割を重要視していた。しかし、近年では、*ccpA* や *brpA* (*lyt R*) genes⁹⁾, *com* genes^{10,11)}, *luxS* genes¹²⁾ に加え、response regulator¹³⁾ などバイオフィルム形成にかかわる遺伝子が次々に報告され、新たな病原因子の検討およびバイオフィルム形成メカニズムの研究が始まっている。DNA マイクロアレイは、熱やストレスなどのさまざまな刺激¹⁴⁾ やクオラムセンシング¹⁵⁾、バイオフィルム形成時¹⁴⁾ における遺伝子発現の変化を全体的に観察するなどに適している。たとえば、DNA マイクロアレイを用いた *Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィルム研究で、浮遊菌と比べてバイオフィルムを形成した状態の菌では、検討した全遺伝子の約 1% にしか変化が認められなかったと報告¹⁴⁾ されている。これまで、さまざまな菌に関して、DNA マイクロアレイを用いた研究が行われているが、*S. mutans* のバイオフィルムについてはまだ報告されていない。さらに、浮遊菌とバイオフィルム形成菌を比べた報告¹⁴⁾ はあるが、バイオフィルム形成能およびその内部構造の異なりに着目して遺伝子発現の比較を行った報告はほとんどない。

本研究では、第一に、分子疫学的検査方法のなかでも最も確実とされているフィンガープリント法（パルスフィールドゲル電気泳動法：PFGE）を用いて、旧 6 大都市である横浜市における母子間での *S. mutans* の伝播率について研究を行った。また、ここで分離できた臨床分離株 17 株を用いて、バイオフィルム形成能と dmft との関連を検討した。次に、母子より分離することができたバイオフィルム形成能が異なる 2 株の *S. mutans* を用いて、バイオフィルム内部の構造を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により観察するとともに、画像解析を行って内部構造の違いを定量化した。そして最後に、バイオフィルム形成能の違いの原因となる遺伝子を明らかにするために、バイオフィルム形成能が異なる 2 株の *S. mutans* を用いて、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の差を検討した。

II. 方 法

1. 対象

本研究の対象者は、横浜市の 3 歳児健診を受けた小児とその母親 174 組である。唾液と血液採取および口腔検査に関しては、旭川医科大学倫理指針に沿って実施された。すなわち、対象者には事前に研究の趣旨と研究参加の自由などの人権擁護に関する項目、および研究参加の安全性を口頭および文書で説明し、同意を得た。また未成年者については親権者の同意書を得た。これらの手順によって取得した試料および情報について旭川医科大学研究班より供与を受け、本研究を実施した。

2. ヒトの唾液収集と細菌学的検査

被験者にパラフィンガムを 5 分間咬ませ、その間に分泌された全唾液を滅菌済みのボトルに収集させ、唾液試料とした。滅菌綿棒をその唾液に浸漬し十分に染み込ませた後、輸送用のゲルに浸し解析に用いた。おのおの 50 μ l の唾液を 10 倍に段階希釈し、スパイラルマシーン (EDDY JET, IUL, Spain) により *S. mutans* の選択培地である改良 MSB 培地¹⁶⁾ に均一に塗布後、37°C 嫌気下にて 48 時間培養した。この培養後のプレートの供与を受け、以下の細菌学的検査を行った。まず、プレート上の 1 コロニーを無作為に抽出し、brain heart infusion broth (BHI, Difco Laboratories, USA) 中で 37°C にて液体培養した。培養後、6,000 $\times$ g 遠心により菌体を回収し、細菌の DNA を DNeasy tissue Kit (QIAGEN GmbH, Germany) で抽出した。得られた DNA を用いて、Polymerase chain reaction (PCR)¹⁷⁾ により、コロニーが *S. mutans* か *Streptococcus sobrinus* であるかを判別した。この際、非水溶性グルカン合成酵素をコードする遺伝子を標的とすることで GTF-B を産生する *S. mutans* と GTF-I を産生する *S. sobrinus* を識別するように設計されているプライマー（表 1）を用いた。分離した *S. mutans* は、BHI 中で一晩培養し、25% のグリセロールを加え、後の PFGE を行うまで -80°C にて保存した。

3. 血清中の *S. mutans* に対する特異的抗体の測定

PAC ペプチドに対する血清抗体価は、以前の研究にて記述されている enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法¹⁸⁾ を用いて検出した。すなわち、マイクロタ

イタープレート (96-well H type, Sumitomo Bakelite, Japan) に、炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解した PAc (361-377) ペプチド (濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) およびウシ血清アルブミン (BSA) (同濃度) の溶液をおおの 100 μl ずつ加え、4°C にて一晩放置し、固着させる。次いで、0.05% (vol/vol) の Tween 20 を加えたリン酸緩衝生理食塩水 (PBST) でプレートを洗浄し、PBST に溶解させた 1% (wt/vol) BSA にてブロッキングを行う (100 分間、37°C 下)。余剰な BSA を PBST にて 4 回洗浄して除去した後、一次抗体であるヒト血清を 0.5% BSA PBST で 20 倍希釈したものを 100 μl ずつウェルに加え、37°C にて 1 時間放置する。再びウェルを PBST にて 4 回洗浄し、100 μl のアルカリフォスファターゼ結合抗 IgG ヤギ抗体溶液 (1,000 倍希釈, Zymed Laboratories, USA) を加え、37°C にて 1 時間放置する。次いで、PBST にて 4 回洗浄後、100 μl の 3 mg/ml p-ニトロフェニルリン酸溶液をおおののウェルに加え、37°C にて 1 時間反応させて、発光をマイクロプレートリーダー (Multiscan Bi-chromatic, Lobsystems, Finland) により、吸光度 405 nm (A_{405}) の波長で測定した。すなわち、各抗体価は基質反応開始後 60 分時の A_{405} で評価し、PAc (361-386) ペプチドへの抗体の反応値から BSA への抗体の反応値 (コントロール) を引算したものを PAc (361-386) ペプチドに対する特異的な血清中ヒト IgG 抗体価とした。

4. PFGE

母子がもつ *S. mutans* の相同性を分子疫学的に解析するため、PFGE を行った。*S. mutans* DNA を用いた PFGE は、ほかで報告された方法¹⁹⁾を改良して行った。まず、凍結保存菌株を BHI 寒天プレートに均一に塗布後、37°C 嫌気下にて培養した。1 コロニーを採取し、それを再び BHI 寒天プレートに植菌し、培養後のプレート上のコロニーを滅菌ずみのスプーンでかき集め、200 μl の蒸留水に懸濁した (O. D.=0.2)。この懸濁液を同量の 1% 低融点アガロース (Bio-Rad, USA) と混合し、ピペットを用いて直方体のゲルを作製するための鋳型である Bio-Rad プラグモールドへ挿入した (1 菌体当たり 2 つ)。作製した菌体が含まれた 2 つのゲル (プラグ) を 20 分間水の上で冷却した。その後、固まったプラグをモールドから出し、1 ml の溶解緩衝液 1 [0.5 M EDTA (pH 8.0), 1 mg/ml lysozyme] に入れ 37°C の恒温槽中で一晩振盪した。上清をピペットにて取り除き、同量の溶解緩衝液 2 [0.5 M EDTA (pH 8.0), 1% N-lauroylsarcosine, 1 mg/ml Proteinase K] に置き換え、50°C の恒温槽中で一晩振盪した。再び、上清をピペットにて取り除き、プラグを 40 分間 50°C で TE 緩衝液 (1 M Tris, 0.5 M EDTA, pH 7.6) にて溶解した 4 mM Pefabloc SC (AEBSF, Roche Diagnostics, Switzerland) に浸漬後、

また上清を取り除いた。この操作を 2 回行った。その後、上清を取り除いたプラグを TE 緩衝液に浸漬し、30 分間水上で振盪した。上清を再び取り除き、プラグを H 緩衝液もしくは T 緩衝液 (Takara, Japan) に浸漬し、30 分間水上で振盪した。次に制限酵素で DNA を切断するために、おおののプラグ 1/2 を混合液 (3 μl Not I と 10 μl H 緩衝液か 3 μl Sma I と 10 μl T 緩衝液に 10 μl 0.1% BSA を加え、さらに 100 μl になるまで蒸留水を加える) に 37°C にて一晩浸漬した。以上の手順で用意したプラグを 1% パルスフィールドアガロースゲルのウェルに挿入し、PFGE を行った。PFGE は泳動装置 CHEF-DR II (Bio-Rad) を用いて 10~12°C、0.5×TBE 緩衝液中で行った。泳動条件は Not I ではパルスタイム (電場の方向転換の周期) 40 秒、泳動時間 20 時間、電圧 180 V/cm にて、Sma I ではパルスタイム 1~30 秒、泳動時間 20 時間、200 V/cm にて行った。分子量マーカーとして Lamda liner DNA ladder (48.5~970 kbp, Bio-Rad) を使用した。PFGE 後のゲルはエチジウムブロマイド (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で染色し、紫外線照射下にて DNA の泳動像を撮影した。

5. 96 穴プレートを用いたバイオフィーム形成実験

バイオフィーム形成実験は、以前に報告²⁰⁾された方法を改良して行った。分離した *S. mutans* のバイオフィーム形成を評価するために、40 μl の細菌懸濁液 (8×10^6 CFU) と 160 μl の semi-defined minimal (SDM) 培地¹⁰⁾を 96 穴のプレート (flat bottom, Sumitomo Bakelite) に入れた。この培地は表 2 に挙げた物質で構成されている。菌液を入れたプレートを 37°C 嫌気下にて 16 時間培養した後、ウェル底面および壁面に形成されたバイオフィーム以外の液体成分は取り除き、滅菌蒸留水にて 2 回洗浄した。その後、プレートを乾燥させ、0.25% のサフラニン溶液を 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、15 分間室温にてバイオフィームを染色した。余剰の染色液を取り除き、滅菌蒸留水にて洗浄後、乾燥した。染色後のバイオフィームは、ELISA リーダーを使って 492 nm にて吸光度を測定することにより定量化した。

6. フローセルシステムを用いたバイオフィーム形成実験

フローセルシステム (The Stovall Flowcell, Stovall Life Science Inc., USA) は、Christensen らの報告²¹⁾を参考にして行った。このフローセル²²⁾は 1×4×40 mm の容積で流路のあるセルが 3 つあり、おおののセルの基底部分は顕微鏡用のカバーガラスでできている (図 1)。まず、フローセルをフィルター滅菌したヒトの全唾液で覆い、30 分間 37°C にて放置した。唾液をペリスタリックポンプ (Ismatec, IDEX Corp., Switzerland) にて排出後、おおのの菌液 500 μl [$1 \sim 10 \times 10^6$ CFU/ml, 0.25% スクロースを添加した tryptic soy broth without dex-

表2 SDM 培地の組成

58 mM	リン酸水素二カリウム	ビタミン類
15 mM	リン酸二水素カリウム	(0.04 mM ニコチン酸, 0.1 mM ピリド
10 mM	硫酸アンモニウム	キシリン塩酸塩, 0.01 mM パントテン酸,
35 mM	塩化ナトリウム	1 μ M リボフラビン, 0.3 M チアミン塩酸
2 mM	硫酸マグネシウム七水和物	塩, 0.05 μ M D-ビオチン)
20 mM	グルコース	アミノ酸類
0.2% (wt/vol)	カサミノ酸	(4 mM L-グルタミン酸, 1 mM L-アルギ
		ニン塩酸塩, 1.3 mM L-システイン塩酸
		塩, 0.1 mM L-トリプトファン)

図1 フローセルシステム

trose (TSB 培地, Difco Laboratories)] をセルへ注入し、1 時間 37°C にて静止培養することにより、菌をカバーガラス表面に付着させた。次いで、ペリスタリックポンプを使って TSB 培地を 20 時間フローセルに流す（流速 3 ml/h）ことによって、バイオフィルムをセル内のガラス表面に形成させた。

7. 共焦点レーザー顕微鏡による観察・画像解析

フローセルのガラス表面に形成されたバイオフィルムを LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit 染色液（4 ml D. W. におおの 6 μ l の component A と B を加えた液；Molecular Probes, Leiden, The Netherlands）でセル内を十分に満たし、30 分間室温にて静置して染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。この染色法は、488 nm の波長を用いることにより生菌を緑色に、568 nm の波長を用いることにより死菌を赤色に発光させることができる。共焦点画像は、水浸対物レンズ（100 倍）と Kr-Ar レーザーを有する Fluoview CLSM (Olympus, Japan) を使って得た。得られた画像を Fluoview software version 2.0 (Olympus) を用いて解析し、バイオフィルムの構造を観察した。まず、水平的断面 (xy) については、バイオフィルム水平面を 5.0 μ m 間隔で上部に向かって解析し、50 μ m の高さまで行った。加えて、立体構造を解析するためにおおののバイオフィルムの中央を切断した垂直的断面 (xz) も解析した。定量化するためにセル内ガラス表面上に形成されたバイオフィルムを無作為に 5 か所選び、輝度の測定を

行った。このソフトウェアは、いくつかの形式で画像を保存することができ、ピクセル数の平均のように画像の数的解析をすることができる。また、後の解析のためにデータをエクセルファイルとして保存することができる。すなわち、このソフトウェアは xy 平面において、任意の領域（本研究では、141.45 $\times$ 141.45 μ m）を 64 $\times$ 64 の格子に分割し、蛍光強度 (FI) をおおのの格子当たり 0~4,095 の値として示すことができる。解析では、生菌、死菌両方の FI の合計を用い、最も高い値（4,095）を 100% の FI としておおのの値を換算した。また、FI の平均と 25% 以上の FI を示す面積をバイオフィルム形成量として計算した。

8. 細胞の採取と RNA の分離

フローセルにて培養したバイオフィルムをセルから取り除いたカバーガラスから回収し、その総 RNA を RNase-free DNase I (QIAGEN) および RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。すなわち、バイオフィルムを PBS 中に懸濁し、超音波処理した後、5 分間 5,000 $\times g$ にて遠心操作を行った。次に、沈殿物を 100 μ l の TE 緩衝液に再懸濁し、6 μ l の 50 mg/ml リゾチーム溶液と 40 U/ml ムタノリシン溶液を加え、37°C にて 1 時間培養し、菌を溶解した。キット内の RNA 吸着カラムを用いて、分離精製を行った。また、抽出された総 RNA は OD₂₆₀ にて定量し、OD₂₆₀/OD₂₈₀ にて RNA の純度を測定した。総 RNA 50 μ g を DNA マイクロアレイに使用した。

9. DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイは、NimbleGen システム (NimbleGen Systems, Inc., USA) にて行われた。このアレイは 1,963 の *S. mutans* の Open Reading Frame (ORF, タンパク質に翻訳される DNA や RNA) のうち、1,960 を検出することができる²³⁾。データ解析には、Microarray Suit version 5.0 を使用して、蛍光強度の値を解析した。*S. mutans* の遺伝子情報は、National Center for Biotechnology Information のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から得た。

III. 結 果

1. 母子における *S. mutans* の検出結果

表 3 に、母子における細菌学的検査結果を示す。*S. mutans* の検出頻度は親子ともに検出されない群が最も多く、174 組中 75 組で 43.1% であった。次いで親のみ検出された群が 62 組で 35.6%、親子ともに検出された群が 19 組で 10.9% だった。最も少なかったのが子のみに検出された群で 10.3% であった。

2. 血清中における *S. mutans* 特異的抗体価の結果

図 2 に、3 歳児の血清中における PAc (361-386) ペプ

表 3 母子における *S. mutans* の検出結果

<i>S. mutans</i> が子のみに検出された群	18 組	10.3%
<i>S. mutans</i> が親のみに検出された群	62 組	35.6%
<i>S. mutans</i> が親子ともに検出された群	19 組	10.9%
<i>S. mutans</i> が親子ともに検出されない群	75 組	43.1%
総数	174 組	

チドに対する IgG 抗体価を示す。対照として、齲蝕を有する 6~8 歳児 7 名、14~15 歳児 8 名についても調べた。3 歳児では、6~8 歳児や 14~15 歳児程度の抗体価の上昇は認められなかったが、半数以上においてわずかな抗体の検出が認められた。

3. 母子間における *S. mutans* の遺伝子型の相同性

次に、表 3 において親子ともに *S. mutans* が検出された 19 組中、PCR 法にて *S. mutans* と同定できた 11 組を対象とし、*S. mutans* の遺伝子型の相同性について検討を行った。PFGE を用いて、3 歳児とその母親における *S. mutans* の遺伝子型の相同性を検討したところ、母子間において *S. mutans* の遺伝子型が一致したのは 11 組中 5 組で 45.5% であることがわかった。図 3 A において代表的な母子 3 組の PFGE パターンを示す。1c では 1m の DNA の *Not* I 切断時における電気泳動パターンと一致していることがわかる。2c と 3c は 2m と 3m と一致していないことがわかる。なお、制限酵素 *Not* I を用いて相同性が認められた 5 組の母子の *S. mutans* (4c と 4m, 8c と 8m, 9c と 9m, 10c と 10m, 1c と 1m)

図 2 PAc ペプチドに対する血清中ヒト IgG 抗体価

A: *Not* I

B: *Sma* I

図 3 母子から分離した *S. mutans* の DNA 断片の PFGE
c: 子供から分離した *S. mutans*, m: その母親から分離した *S. mutans*,
λ: 分子量マーカー

図4 分離した *S. mutans* のバイオフィーム形成能の比較

図5 バイオフィーム形成能と MS ratio, MS number, dmft の関係

においては、さらに制限酵素 *Sma* I にて処理し、再度 PFGE にて DNA 切断パターンを検討した。その結果、すべて一致していることが確認された (図 3 B)。

4. 分離した *S. mutans* におけるバイオフィーム形成の評価

母子 11 組中 5 組の *S. mutans* の遺伝子型が一致したことから、全部で 17 種類の遺伝子型の異なる *S. mutans* を得ることができた。それら、17 種類の *S. mutans* について、バイオフィーム形成分析を行ったところ、バイオフィーム形成レベルが実験株 *S. mutans* MT 8148 より高い臨床分離株や低い臨床分離株が存在することが明らかとなった (図 4)。これらの結果は、遺伝子型が異なる *S. mutans* では、バイオフィーム形成の能力に多様なバリエーションがあることを示唆している。また、子供の *S. mutans* についてのバイオフィーム形成能と dmft, 唾液中 MS 菌量、総レンサ球菌量における MS 菌の割合 (MS ratio) との関係を示す。バイオフィーム形成能が高かった群 (2 c, 3 c, 6 c, 7 c, 11 c) と低かった群 (1 c, 4 c, 5 c, 8 c, 9 c, 10 c) を比較してみると、有意差は認められなかったものの、形成能が高かった群では dmft と MS 菌量が多く、MS ratio が高い傾向が認められた。しかし、いずれも有意差が認められなかった。

5. フローセルシステムにおけるバイオフィームの画像解析

典型的なバイオフィーム形成能が高い株である 3 c と低い株である 4 c を用いて、フローセルシステムでのバイオフィーム形成実験を行った。CLSM 画像は、z 軸方向へ 5 μ m ずつの水平断面として合計 11 断面 (0~50.0 μ m) を撮影した後、解析を行ったが、そのうちの、xy 平面 [底面 (0 μ m) から 10 μ m まで] と xz 平面の CLSM 画像を図 6 に示す。4 c と *S. mutans* MT 8148 のバイオフィームは、Auschill ら⁷⁾により報告されている空洞と

図6 CLSMにより観察したバイオフィルム

類似したものが認められた。これに対し、3cは、4cと *S. mutans* MT 8148 よりバイオフィルム形成能が高く、空洞も認められなかった (図6 xz)。xy 画像において、蛍光強度 (図7) と蛍光した面積 (図8、輝度 25%以上の面積) をバイオフィルム形成の特性として解析したところ、いずれにおいてもバイオフィルムの底面から頂点にいくに従ってバイオフィルム形成量が減少していくことが明らかとなった。また、バイオフィルムの底面において、3cが4cと MT 8148 よりもバイオフィルム形成量が高いことが認められたが、頂点にいくに従ってその差が認められなくなった (図7、8)。

6. 臨床分離株 2 株における遺伝子発現の違い

フローセルシステムで形成された 3c と 4c のバイオフィルムから RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の違いを検討した。4c と比較して 3c の遺伝子発現では 565 遺伝子でその発現に違いが認められた (表4)。4c のバイオフィルムに比べ 3c のバイオフィルムでは、4 倍以上の発現の差が認められた遺伝子は 74 遺伝子あることがわかり、そのうち、43 遺伝子 (約 2.2%) の発現が増加し、31 遺伝子 (約 1.6%) の発現が低下していた (表4)。既知のタンパクをコードしている遺伝子で、発現に 4 倍以上の差が認められた遺伝子を表5と表6に列挙した。代表的なものとして、増加していた遺伝子は Putative bacteriocin secretion protein や Bacitracin transport ATP-binding protein *glr* A, Putative immunity protein, BLpL-like があり、低下していた遺伝子は PTS system IIA, B, C, D や com B

であった。

IV. 考 察

齲蝕は MS が口腔へ定着することと密接にかかわる疾患であるため、口腔内での MS の伝播について調べることは、齲蝕の予防対策上、重要である。MS の伝播経路の検討には、さまざまな方法^{3,5,6)}が用いられているが、血清型やバクテリオシン型、プラスミド型を調べる方法はいずれも解析方法としては緩慢であり、MS の伝播を正確に調べるには不十分である。しかし、近年の大腸菌 O 157 での研究により、DNA フィンガープリント法が開発され、その方法を利用し、すべての MS の相同性を調べることが可能となった。今回、あらゆるフィンガープリント法のうち、最も優れている PFGE 法を用いて MS の母子間での伝播について解析を行ったところ、DNA が相同していた *S. mutans* をもつ母子は 11 組中 5 組 (45.5%) であった (図3)。*S. mutans* の DNA フィンガープリント法は日本⁶⁾だけでなく、欧米でも行われているが^{3,5,24)}、これらの研究のほとんどが約 45~70% の確率で母親から子へ伝播していると報告している。地方都市である広島での研究では、子供より分離した 70 遺伝子型のうち、母親と一致したのは 36 (51.4%) であったと報告⁶⁾している。この結果は、旧 6 大都市である横浜の母子を解析した本研究の結果とほぼ一致している。これは、旧 6 大都市や地方都市にかかわらず、齲蝕予防を行ううえでは母親に対する口腔衛生指導が重要であることを示唆している。

図7 CLSM 画像 xy 平面における蛍光強度

図8 CLSM 画像 xy 平面における輝度 25%以上の面積

表4 DNA マイクロアレイにより発現に差が認められた遺伝子

4c と比した 3c の遺伝子発現	up-regulate	down-regulate	計
1.5 倍未満	23	18	41
1.5 倍以上 2.0 倍未満	166	29	195
2.0 倍以上 4.0 倍未満	227	28	255
4.0 倍以上 8.0 倍未満	24	14	38
8.0 倍以上	19	17	36
合計	459	106	565 遺伝子

血清型 c の *S. mutans* の菌体表層タンパク質抗原である PAc²⁵⁾ はペリクル中の唾液成分と疎水性相互作用を介した歯面への吸着、つまり *S. mutans* の歯表面への初期付着にかかわっている^{26~28)}。このタンパク質内のアラニンの豊富な繰り返し領域は *S. mutans* と唾液との相互作用において重要^{29~31)}であり、これにヒト型アグレトープが加わった PAc (361-377) ペプチドは、ヒトにお

いても抗原性を有することが明らかになっている³²⁾。このペプチドは *S. sobrinus* との交差抗原を有するものの、比較的 *S. mutans* に特異的な抗原であると考えられている。本研究ではこのペプチドに対する抗体価を調べ、それを *S. mutans* の抗体価として検討した。その結果、ほとんどの 3 歳児において、わずかながらも抗体の検出が認められた。これは、選択培地を用いた細菌学的方法

表 5 遺伝子発現が活性化された遺伝子

<i>S. mutans</i> ORF	3 c と 4 c 間の変化倍率
Transmembrane protein Tmp 5	4.1
Dipeptidyl aminopeptidase/acylaminoacyl-peptidase related protein	4.2
Hemolysin III	4.2
Murein hydrolase export regulator	4.3
SUN protein	4.6
UDP-glucose 4-epimerase	4.7
DNA-damage-inducible protein J, putative	5.0
Citrate transporter	5.3
PTS system, cellobiose-specific IIC component	5.3
Sterol biosynthesis methyltransferase related [Pyrococcus abyssi]	5.5
PTS system, lactose-specific IIA component	6.1
Putative ABC transporter, ATP-binding protein	6.5
Acetylornithine aminotransferase	6.5
BlpU protein (<i>S. pneumoniae</i>)	6.7
Bactoprenol glucosyl transferase	7.1
Putative bacteriocin secretion protein	8.6
Bacitracin transport ATP-binding protein <i>glrA</i>	9.0
Contains similarity to (p) ppGpp synthase (GTP pyrophosphokinase) gene	13.9
Phosphoglycerol transferase	14.5
Glucosyltransferase (side chain biosynthesis)	16.9
Putative immunity protein, BLpL-like	21.2
Glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis	22.4
L-type calcium channel, alpha 1 subunit	22.4
Transcriptional regulator	23.4
Large-conductance mechanosensitive	32.5
Bactoprenol glucosyltransferase	39.2

により検出されなかったとしても *S. mutans* に感染している可能性があることを示唆している。

PFGE パターンが異なる 17 種類の *S. mutans* のバイオフィーム形成能は、96-well プレートを用いたポリスチレン表面上でのバイオフィーム形成実験 (*in vitro*) で解析した (図 3)。興味深いことに、母親とは異なる種類の MS をもつ子供の場合、それらはバイオフィーム形成能が高い傾向にあった (2 c, 3 c, 6 c, 7 c, 11 c; 図 3)。これら子供の MS は、母親以外から伝播していると考えられ、たとえば子供との接触時間が短い人からでもバイオフィーム形成能の高い *S. mutans* は伝播する可能性があることを示唆している。また、バイオフィーム形成能が低い *S. mutans* でも母親から子供へ伝播しやすいことを示唆しており、これらのことから、バイオフィーム形成能の低い *S. mutans* を保有する母親を増加させることに加え、*S. mutans* を限りなく少ない量に制御すれば齲蝕予防を間接的に行うことに繋がるかもしれない。

バイオフィーム形成能が高い *S. mutans* をもっている子供ほど dmft が多く (図 5)、*S. mutans* 量も多い傾向であることから、母親に加えて子供の口腔に存在する *S. mutans* によるバイオフィーム形成能を検査することが、齲蝕予防対策として重要であることが考えられる。

近年、バイオフィームに関する研究が増加しているにもかかわらず、固層面における微生物の生理機能は解明されていない点が多い。固層面で成長するバイオフィーム状態での細菌は、殺菌剤や抗生物質に対する耐性の増加など、浮遊菌とは異なる特性を示す。本研究では、口腔内のように常に唾液が流れている状況に近づけて実験を行うため、培地が流動している状態下のバイオフィーム形成を観察した。すなわち、近年、再現性のあるバイオフィームを形成させるのに最も適しているフローセルシステム^{21,22)}を利用した。さらに、*S. mutans* のバイオフィーム形成能における違いの機構を調べるために、CLSM による画像解析でバイオフィーム形成能の異な

表6 遺伝子発現が抑制された遺伝子

<i>S. mutans</i> ORF	3c と 4c 間の変化倍率
Transport protein comB	-4.0
Putative transposase, ISSmu 1	-4.5
Transcriptional regulator, MutR family	-4.6
Dihydrolipamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	-4.7
Putative site-specific DNA-methyltransferase restriction-modification protein	-4.8
Phage-related protein	-5.3
Putative transposase, ISSmu 1	-5.5
PTS system, IIC component	-5.6
Putative transposase	-5.9
Sucrose operon repressor	-7.9
Na ⁺ -driven multidrug efflux pump	-9.4
Putative PTS system, IID component	-9.5
PTS system, IIB component	-9.8
Alpha-glucosidase	-9.9
Heme biosynthesis protein	-17.3
Putative PTS system, IIA component	-20.2
BlpJ protein (<i>S. pneumoniae</i>)	-97.0
BlpU protein (<i>S. pneumoniae</i>)	-137.5
BlpU protein (<i>S. pneumoniae</i>)	-147.8

ることが確認された3cおよび4cについて、DNA マイクロアレイを用いて、遺伝子発現の変化を調べた。

その結果、まず、バイオフィルムの立体構造では、3cおよび4cの間で底面の形成量の明らかな差が認められたが、頂点に向かうに従って差が認められなくなった。この結果は、バイオフィルムの性質の違いが底面において出てくる可能性があることを示唆している。また、アレイの結果では、3cと4cのバイオフィルム形成時での遺伝子発現の差が認められた遺伝子としてPTS遺伝子群が挙げられた。口腔レンサ球菌におけるさまざまな種類の糖を輸送したり、代謝する能力は、細菌の増殖、口腔内への定着、齲蝕の誘発能力に直接的に関与する重要な特性である。PTSシステムは、特に炭水化物が限られた条件下での口腔レンサ球菌の主要な糖輸送の手段であり、遺伝子発現の包括的な制御において重要な役割を果たしている³³⁾。*S. mutans* Ingbritt株を用いた研究では、グルコースのPTS活性がpH 5.5にて成長した菌において著しく減少していることがわかり、これは、E II合成が抑制されているからかもしれないと述べている³⁴⁾。一方、*Streptococcus parasanguis*の研究においては、グルコースの添加がバイオフィルム形成を増強すると報告している³⁵⁾。ところが他の研究では、栄養豊富な培地での*Streptococcus gordonii*²⁰⁾や*S. mutans*¹¹⁾においてPTS活性がバイオフィルム形成を妨げると報告している。本

研究のPTS system IIA, B, C, D componentについては、底面のバイオフィルム形成の増加に対して、抑制されている遺伝子が多いが、活性化されている遺伝子もあり、バイオフィルム形成にこれらが複雑に相互作用していることがわかる(表5, 6)。今後、遺伝子間のバイオフィルム形成における役割について、さらなる研究が必要であろう。

3cバイオフィルムでは4cに比較して、Gtfsの側鎖合成にかかわる遺伝子が16.9倍発現増加していた(表5)。これは、本研究ではスクロースを含んだ培地で培養したため、グルカン合成の結果がバイオフィルム形成増強に深く関与したためと考えられる。

*S. mutans*は齲蝕原性があり、抗生物質であるバシトラシンに耐性があることが知られている³⁶⁻³⁸⁾。バシトラシン耐性のメカニズムはさまざまな菌で報告されており、バシトラシンを合成する微生物である*Bacillus licheniformis*では、その耐性が*glr ABC*遺伝子にコードされていると考えられている³⁹⁾。この*glr ABC*遺伝子は、バシトラシンの活動的な流出に影響を与えると考えられている推定上のヘテロ二量体ATP結合カセット(ABC)輸送体をコードしており、この輸送体の相同物は、*Bacillus subtilis*³⁷⁾と*S. mutans*³⁸⁾においても同定されている。本研究の結果、4cと比較して3cで*glr A*が9倍増強されていた(表5)。したがって、3cでは*glr A*

がバイオフィーム形成時のバシトラシン耐性に加えて、バイオフィーム形成にも深く関与する別のシグナル発現や活性物質の発現に関与してくるのかもしれない。

クオラムセンシングシステムは、菌体密度依存的な遺伝子制御システムであり、細菌内において、形質転換や毒性、生物発光、孢子形成のような、いくつかの重要な生物学的過程を制御している。グラム陽性菌では、クオラムセンシングの大部分は、グラム陰性菌³⁹⁾でのオートインデューサーである *N*-acyl homoserine lactones に代わり、competence-stimulating peptide (CSP) ホルモンにより開始される。それらを制御する過程の一つである Com ABCDE 経路は、自然界の受容能の発達を制御し、相対的に特徴付けられている^{40,41)}。近年発見された別の経路はバクテリオシン様ペプチド (Blp) ABCSRH であり、これは class II バクテリオシンとそれらの免疫タンパクの生成を制御している⁴²⁾。近年の研究により ABC 輸送体をコードしているオペロンの転写率は、両方のペプチドホルモンに刺激されることが明らかとなった⁴³⁾。本研究において、Blp タンパクのいくつかの制御遺伝子と輸送タンパク *comB* が、バイオフィーム形成能が高い 3c において著しく抑制されていることがわかった (表 5, 6)。この結果は、*S. mutans* のバイオフィーム形成の制御において、これらの遺伝子は重要な役割を果たしていることを示唆している。

近年、バイオフィーム形成に関与するいくつかの遺伝子が、さまざまな微生物において同定されている^{9,11,13,20)}。本研究でもまた、バイオフィーム形成能が異なる株を用いてバイオフィーム形成に関与する新しい遺伝子が発見された。しかしながら、バイオフィームの発達を引き起こす遺伝子間における相互作用についてはほとんどわかっていない。それゆえ、バイオフィームの発達を引き起こす分子メカニズムを定義すると同時に、これらのシグナルがどのように感知され、相互作用し、バイオフィーム形成する細菌に形質変換されるかを解明すれば、バイオフィーム形成ならびに病原性および、母子感染のメカニズム解明にも繋がっていく。このような研究は齲蝕のリスク診断や予防方法の確立に役立ち、口腔保健の進展に寄与するものと考えられる。

V. 結 論

174 組の母子 (3 歳児とその母親) を対象に、*S. mutans* の母子伝播率やバイオフィーム形成能についてさまざまな方法を用いて検討した。また、バイオフィーム形成能に関与する遺伝子について検討を行った。その結果、以下の結論を得た。

1. 母子間において *S. mutans* の遺伝子型が一致したのは 45.5% であった。

2. PFGE パターンが異なる *S. mutans* では、バイオフィーム形成の能力に差があることが明らかとなった。

3. バイオフィーム形成能が高い *S. mutans* を保有する 3 歳児では、dmft, MS 菌量が多くなり、また MS ratio が高くなる傾向が認められた。

4. バイオフィーム形成能が高い *S. mutans* (3c) と低い *S. mutans* (4c) の差は、バイオフィーム立体構造の底面において認められたが、頂点に向かうに従って差が認められなくなった。

5. 4c のバイオフィームと比較して、3c で 4 倍以上の発現の差がある遺伝子は 74 遺伝子あることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご教示とご校閲を賜りました本学大学院医歯学総合研究科 小児歯科学分野 高木裕三教授に深甚なる謝意を表します。また直接ご指導、ご校閲を賜りました国立感染症研究所 細菌第一部 泉福英信室長に謹んで感謝の意を表します。また、研究試料および情報を供与していただきました旭川医科大学研究班の皆様へ感謝いたします。最後に終始温かいご支援を頂きました国立保健医療科学院 口腔保健部 花田信弘部長および諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Hamada, S. and Slade, H. D. : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44 : 331-384, 1980.
- 2) Berkowitz, R. J. and Jordan, H. V. : Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. Arch. Oral Biol. 20 : 725-730, 1975.
- 3) Gronroos, L., et al. : Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother and child. Infect. Immun. 66 : 2595-2600, 1998.
- 4) Van Loveren, C., et al. : Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquire the strains after the age of 5. Caries Res. 34 : 481-485, 2000.
- 5) Caufield, P. W. and Walker, T. M. : Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism. J. Clin. Microbiol. 27 : 274-278, 1989.
- 6) Kozai, K., et al. : Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to child transmission. Microbiol. Immunol. 43 : 99-106, 1999.
- 7) Auschill, T. M., et al. : Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. Arch. Oral Biol. 46 : 471-476, 2001.
- 8) Yamashita, Y., et al. : Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific pathogen-free rat model. Infect. Immun. 61 : 3811-3817, 1993.
- 9) Wen, Z. T. and Burne, R. A. : Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm

- development by *Streptococcus mutans*. Appl. Environ. Microbiol. 68 : 1196-1203, 2002.
- 10) Li, Y. H., *et al.* : A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. J. Bacteriol. 184 : 2699-2708, 2002.
- 11) Yoshihda, A. and Kuramitsu, H. K. : Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 68 : 6283-6291, 2002.
- 12) Merritt, J., *et al.* : Mutation of luxS affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 71 : 1972-1979, 2003.
- 13) Bhagwat, S. P., *et al.* : Effects of mutating putative two-component systems on biofilm formation by *Streptococcus mutans* UA 159. FEMS Microbiol. Lett. 205 : 225-230, 2001.
- 14) Whiteley, M., *et al.* : Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature 413 : 860-864, 2001.
- 15) DeLisa, M. P., *et al.* : DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183 : 5239-5247, 2001.
- 16) Gold, O. G., *et al.* : A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 18 : 1357-1364, 1973.
- 17) Oho, T., *et al.* : Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol. Immunol. 15 : 258-262, 2000.
- 18) Okahashi, N., *et al.* : Identification of antigenic epitopes in an alanine-rich repeating region of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 61 : 1301-1306, 1993.
- 19) Deannal, L., *et al.* : Genetic analysis of fructan-hyper-producing strains of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 62 : 2679-2686, 1994.
- 20) Loo, C. Y., *et al.* : *Streptococcus gordonii* biofilm formation : identification of genes that code for biofilm phenotypes. J. Bacteriol. 182 : 1374-1382, 2000.
- 21) Christensen, B. B., *et al.* : Molecular tools for study of biofilm physiology. Methods Enzymol. 310 : 20-42, 1999.
- 22) Wolfaardt, G. M., *et al.* : Multicellular organization in a degradative biofilm community. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 434-446, 1994.
- 23) Ajdic, D., *et al.* : Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 : 14434-14439, 2002.
- 24) Emanuelsson, I. R., *et al.* : Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. Oral Microbiol. Immunol. 13 : 271-277, 1998.
- 25) Okahashi, N., *et al.* : Cloning of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*. Mol. Microbiol. 3 : 221-228, 1989.
- 26) Demuth, D. R., *et al.* : Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. Microb. Pathog. 9 : 199-211, 1990.
- 27) Russell, M. W. and Masson-Rahemtulla, B. : Interaction between surface protein antigen of *Streptococcus mutans* and human salivary components. Oral Microbiol. Immunol. 4 : 106-111, 1989.
- 28) Senpuku, H., *et al.* : Interaction of lysozyme with a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol. Lett. 39 : 195-201, 1996.
- 29) Brady, L. J., *et al.* : Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesion P 1. Infect. Immun. 60 : 1008-1017, 1992.
- 30) Nakai, M., *et al.* : Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. Infect. Immun. 61 : 4344-4349, 1993.
- 31) Yu, H., *et al.* : Effects of antibodies against cell surface protein antigen Pac-glucosyltransferase fusion proteins on glucan synthesis and cell adhesion of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 65 : 2292-2298, 1997.
- 32) Senpuku, H., *et al.* : Identification of a repeated epitope recognized by human serum antibodies in a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol. Immunol. 11 : 121-128, 1996.
- 33) Moreno, M. S., *et al.* : Catabolite repression mediated by the Ccp protein in *Bacillus subtilis* : novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. Mol. Microbiol. 39 : 1366-1381, 2001.
- 34) Vadeboncoeur, C., *et al.* : Effect of growth rate and pH on intracellular levels and activities of the components of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system in *Streptococcus mutans* Ingbritt. Infect. Immun. 59 : 900-906, 1991.
- 35) Froeliger, E. H. and Fives-Taylor, P. : *Streptococcus parasanguis* fimbria-associated adhesin Fap1 is required for biofilm formation. Infect. Immun. 69 : 2512-2519, 2001.
- 36) Neumuller, A. M., *et al.* : The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. Eur. J. Biochem. 268 : 3180-3189, 2001.
- 37) Ohki, R., *et al.* : The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 49 : 1135-1144, 2003.
- 38) Tsuda, H., *et al.* : Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. Antimicrob. Agents Chemother. 46 : 3756-3764, 2002.
- 39) Miller, M. B. and Bassler, B. L. : Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55 : 165-199, 2001.
- 40) Alloing, G. B., *et al.* : Development of competence in *Streptococcus pneumoniae* : pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. Mol. Microbiol. 29 : 75-83, 1998.
- 41) Chandler, M. S. and Morrison, D. A. : Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* : molecular cloning of com, a competence control locus. J. Bacteriol. 169 : 2005-2011, 1987.
- 42) Saizieu, A., *et al.* : Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. J. Bacteriol. 182 : 4696-4703, 2000.
- 43) Knutsen, E., *et al.* : Two separate quorum-sensing systems upregulate transcription of the same ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 186 : 3078-3085, 2004.