

## 論文審査の結果の要旨

氏名：荒井俊明

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：*Actinomyces naeslundii* GroEL-dependent initial attachment and biofilm formation in a flow cell system  
(GroELに依存した *Actinomyces naeslundii* の初期付着とフローセル法によるバイオフィーム形成について)

審査委員：(主査) 教授 小方頼昌

(副査) 教授 小宮正道

教授 近藤壽郎

う蝕や歯周病、菌性感染症に起因する顔面膿瘍において形成されるバイオフィームを抑制することは、口腔内の疾患を予防するうえで重要である。バイオフィームは、固体表面に形成されることで外的要因に対して抵抗性をもち、増殖するのに適した環境となる。バイオフィームの研究には、マイクロタイタープレートを用いた静止系培養実験とフローセルを用いた流路系培養実験がある。フローセル法によるバイオフィーム形成実験法は、マイクロタイタープレート法とは異なり、フローセル法は、培養液を循環させることで、細菌の代謝による栄養源の枯渇と pH の低下、それに伴う細菌の死滅を防ぐことが可能となる。フローセル法のように流れがあるという実験環境は、静止系培養実験よりも口腔内に近い環境を再現している実験方法である。

96 穴マイクロタイタープレートによる静止系培養実験において、歯周病原性細菌の代謝産物である酪酸が初期付着細菌の *Actinomyces naeslundii* のバイオフィーム形成を促進すること、同時に熱ショックタンパク質の 1 種である GroEL の産生量が増加していることを明らかになっている。著者らは、フローセル法による酪酸に依存した *A. naeslundii* のバイオフィーム形成実験方法を確立するとともに、酪酸に依存した *A. naeslundii* のバイオフィーム形成における *A. naeslundii* の初期付着と GroEL との関連性についても検討した。

筆者らは、今回の研究で以下の結果を得た。

- 1) *A. naeslundii* は、浮遊細菌において培地中に 30 mM 以上の濃度の酪酸を添加した条件では、生育が著しく抑制した。また、塩酸によって pH=5.5 以下に低下した条件においても、著しく生育が抑制したことから、低 pH における浮遊細菌の生育は困難であることが明らかとなった。
- 2) フローセル法において酪酸 60 mM を培地中に添加することで、*A. naeslundii* は、有意に厚いバイオフィーム形成をすることが明らかとなった。酪酸 60 mM を添加したことによって培地 pH4.7 に低下しており、この培地 pH を pH7.0 に調整した条件では、有意なバイオフィームは形成されなかった。そこで、pH によるバイオフィーム形成に与える影響を検討するために行った条件として酪酸ナトリウム 60 mM (pH7.0) を培地中に添加した条件では、有意なバイオフィーム形成は認められなかったが、この条件における培地 pH を pH4.7 に調整した条件では有意にバイオフィームを形成した。これらの結果から低 pH であることが、バイオフィーム形成に影響を与えていることが明らかとなった。
- 3) バイオフィーム形成が有意に増加した条件における蛍光強度の検出頻度を比較した結果、酪酸 60 mM を培地中に添加した条件において高蛍光強度の死菌が多く検出されたため、酪酸を添加によって死菌形成が誘導され、よりバイオフィームを形成したことが明らかとなった。
- 4) 低 pH における有意なバイオフィーム形成が酪酸に特異的なものであるかどうかを検討するために、濃度別に酪酸を培地中に添加した条件と塩酸によって酪酸添加時と同じ pH に調整した条件でフローセル法によるバイオフィーム形成実験を行った結果、酪酸 60 mM を添加した条件において、他の 30, 40, 50 mM 添加時の条件と比較して有意にバイオフィームを形成した。また、塩酸によって酪酸 60 mM 添加時と同じ pH4.7 に調整した条件においては、酪酸添加時と比較してバイオフィーム形成は誘導されなかった。以上のことから、この実験における *A. naeslundii* のバイオフィーム形成を促進するためには、酪酸と酪酸添加時に伴う低 pH の両方の条件が必要であることが明らかとなった。
- 5) フローセル法における *A. naeslundii* のバイオフィーム形成実験方法を確立した過程において、酪酸を添加した条件によって強固なバイオフィーム形成したことから、付着に対して影響を及ぼしているこ

とを著者は考えた。そこで、初期付着と酪酸との関連性について検討した結果、酪酸 60 mM を添加した条件において、有意に初期付着する細菌量が増加したことを観察した。また、最初に行ったフローセル法の結果と同様の傾向であったことが明らかとなった。

- 6) 培養開始時から GroEL のポリクローナル抗体を添加することで、細菌の初期付着を抑制したことを観察したことから、*A. naeshundii* の初期付着には、酪酸が関与していることが明らかとなった。菌体外多糖であるレバンを分解する酵素である FruA を添加した条件では、初期付着に対して有意な効果が認められなかったことから、*A. naeshundii* における菌体外多糖は、付着よりも凝集に関与している結果となった。

本論文では、酪酸に依存した *A. naeshundii* のバイオフィーム形成を促進する現象をフローセル法によって再現することが可能となった。酪酸を添加したことによって低 pH 状態を引き起こすことが *A. naeshundii* に対するストレスとなり、熱ショックタンパク質である GroEL を産生した。この GroEL が初期付着における付着因子として働いていることを明らかとした。これらの結果は、フローセル法という口腔内環境をより再現できる実験方法を確立し、バイオフィーム形成における口腔細菌の代謝産物が関連していることを明らかとしたことによって、今後の口腔微生物学にとって有益であると考えられる。

よって本論文の著者は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 27 年 2 月 26 日