

ふ り が な 氏 名	ふるもり ただし 古森 賢
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	乙 第 1604 号
学位授与の日付	平成 28 年 9 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項に該当
学 位 論 文 題 目	静置培養時と振盪培養時の <i>Rothia mucilaginosa</i> の遺伝子発現 の比較
学位論文掲載誌	歯科医学 第 79 巻 第 2 号 平成 28 年 9 月 25 日
論 文 調 査 委 員	主 査 王 宝禮 教授 副 査 山本 一世 教授 副 査 前田 博史 教授

論文内容要旨

根尖性歯周炎は、細菌や真菌の残存が原因となって起こる疾患で、治療のためには残存する病原微生物のコントロールが鍵となる。特に通常の歯内治療を施しても症状が無くならない難治性根尖性歯周炎の症例の多くは、何らかの原因で根管内及び根尖部の感染制御が困難な状態になっている。感染制御を困難にする原因の 1 つに、感染している細菌の環境抵抗性が挙げられる。難治性の根尖性歯周炎から分離される細菌には、物理的性質が強い菌種の他に、菌体外マトリックスを産生する株が存在することが分かっている。これらの細菌の産生する菌体外マトリックスは食餌抵抗因子として働くだけでなく、細菌に環境抵抗性を付与し、疾患の慢性化、難治化に重要な役割を果たすことが分かっている。

Rothia mucilaginosa DY-18 株（DY-18 株）は数回の根管治療にもかかわらず、持続的に単一の細菌種が分離される難治性根尖性歯周炎の病巣から分離された菌株で、菌体外マトリックスを産生することで治療に抵抗して病巣で長期に生存することが明らかになっている。本研究では DY-18 株のバイオフィーム形成について更に詳細に検討し、その遺伝学的な背景を明らかにすることを目的に、浮遊状態の細胞と、バイオフィーム形成状態の細胞の遺伝子発現をマイクロアレイ分析した。

DY-18 株のバイオフィーム形成性について詳しく検討するため、DY-18 株を sucrose 不含の培地で培養し、その菌体表層を走査型電子顕微鏡で観察したところ、菌体間にバイオフィーム形成菌に特徴的な網目様の構造物が観察できた。このことから DY-18 株は sucrose 非依存性に菌体外多糖を産生し、バイオフィームを形成できることが示唆された。また、培養菌液の粘度を測定して EPS の産生量を経時的に計測したところ、種菌接種 30 時間後から 42 時間後まで粘度が著しく上昇しており、この時間に菌体外多糖の産生が急速に起こっていることが示唆された。さらに種菌接種 36 時間後の振盪培養した浮遊状態と、静置培養したバイオフィーム形成状態の培養菌液の粘度を比較したところ、振盪培養

では粘度上昇が認められず、静置培養時とは菌体外マトリックスの産生量に大きな差があることが示された。そこで DY-18 株のゲノム情報を基にマイクロアレイをデザインし、浮遊状態とバイオフィルム形成状態の細胞における遺伝子の発現量を測定した。その結果、バイオフィルム形成状態で DNA polymerase III subunit beta, signal transduction histidine kinase, molecular chaperone をコードする遺伝子が有意に発現上昇していることが明らかになった。これらの遺伝子は、DY-18 株のバイオフィルム形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

論文審査結果要旨

根尖性歯周炎から分離される細菌には、物理的性質が強い菌種の他に、菌体外マトリックスを産生してバイオフィルムを形成する株が存在することが分かっている。これらの細菌の産生する菌体外マトリックスは食食抵抗因子として働くだけでなく、細菌に環境抵抗性を付与し、疾患の慢性化、難治化に重要な役割を果たす。著者はこの研究で、数回の根管治療にもかかわらず、持続的に細菌が残存する難治性根尖性歯周炎の病巣から分離された *Rothia mucilaginosa* DY-18 株を用いて、そのバイオフィルム形成条件について検討すると共に、形成に関与する遺伝子を明らかにした。

著者は DY-18 株のバイオフィルム形成条件について詳しく検討するため、スクロースを含まない培地で培養し、その菌体表面を走査型電子顕微鏡で詳細に観察した。その結果、菌体表面に網目様の構造物が存在することを明らかにし、本菌株がスクロース非依存性にバイオフィルムを形成することを証明した。また、培養菌液の粘度を測定することで本菌株の菌体外多糖産生量を経時的に計測し、種菌接種 30 時間後から 42 時間後まで粘度が著しく上昇して菌体外多糖の産生が急速に起こっていることを示した。さらに種菌接種 36 時間後の振盪培養した浮遊状態と、静置培養したバイオフィルム形成状態の培養菌液の粘度を比較したところ、振盪培養では粘度上昇が認められず、静置培養時とは菌体外多糖の産生量に大きな差があることが示した。著者はこれらの結果を基にバイオフィルム形成状態と、非形成状態の菌体を採取し、その遺伝子発現を比較することでバイオフィルム形成に関与する遺伝子を検索した。その結果、バイオフィルム形成状態で DNA polymerase III subunit beta, signal transduction histidine kinase, molecular chaperone をコードする遺伝子が有意に発現上昇していることを明らかにした。これらの遺伝子は、DY-18 株のバイオフィルム形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

以上、*Rothia mucilaginosa* DY-18 株のバイオフィルム形成機構の遺伝学的背景の一端を明らかにした点において、本論文は博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。

なお、外国語 1 か国語（英語）について試問を行った結果、合格と認定した。