

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏 名 (本籍)	宮之原 真 由 (神奈川県)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	乙 第 248 号
学位授与年月日	平成 25 年 12 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Distribution of <i>Streptococcus troglodytae</i> and <i>Streptococcus dentirousetti</i> in chimpanzee oral cavities (チンパンジー口腔における <i>Streptococcus troglodytae</i> および <i>Streptococcus dentirousetti</i> の分布様式) Microbiology and Immunology, 第 57 巻, 第 5 号 359 頁～365 頁 平成 25 年 5 月 15 日発行
論文審査委員	主査 教授 前田伸子 副査 教授 桃井保子 副査 教授 花田信弘

内 容 の 要 旨

【緒言】

Streptococcus (ストレプトコッカス ; レンサ球菌) 属はグラム染色陽性、形態は連鎖あるいは対を成す球菌で、通性嫌気性、カタラーゼ陰性である。レンサ球菌は 6 群に分けることができ、その中でミュータンスレンサ球菌群はヒトおよび動物のう蝕と密接に関連する。また、この菌は MS 寒天培地上で菌体外多糖であるグルカン进行合成し、特徴的なコロニーを形成する。

ヒト口腔から分離されるミュータンスレンサ球菌群の *S. mutans* および *S. sobrinus* は強いう蝕病原性を示し、酸产生、グルカン产生性、耐酸性が主要な病原因子と考えられている。動物から分離されるミュータンスレンサ球菌として、げっ歯類から分離される *S. criceti*、*S. ratti* および *S. ferus*、モンキーから分離される *S. downei* および *S. macacae* の 5 菌種が報告されている。近年、馬から *S. devriesei*、豚から *S. orisuis*、オオコウモリから *S. dentirousetti*、イノシシから *S. dentapri*、そして熊から *S. ursoris* などが新種類として分離され、ミュータンスレンサ球菌群として合計 12 菌種が報告されている。

私達は京都大学霊長類研究所との共同研究で、チンパンジー口腔から新菌種を分離し、*S. troglodytae* と命名、提唱した。この菌の 16S rRNA 遺伝子配列は *S. mutans* 基準菌株と 96.4% の相同性を示し、ミュータンスレンサ球菌群の中でヒトから分離される *S. mutans* に最も近縁である。チンパンジー (*Pan troglodytes*) はモンキーよりヒトに近縁であるにも関わらず、口腔レンサ球菌の構成菌種および分離頻度についての報告はない。本研究はチンパンジー口腔よりブラッシング歯垢を採取し、更にストレプトコッカス、特に我々が報告した新菌種 *S. troglodytae* を含めてその分離頻度および性状について詳細に調べた。

【実験方法】

1. チンパンジーのプラーク採取と培養

本研究は京都大学霊長類研究所施設内で飼育されているチンパンジー11 個体、年齢は 9～44 歳(平均年齢 26.9 歳) を対象とした。全身麻酔下にて被験歯表面のプラークを 1 分間滅菌歯ブラシにて可及的に採取し、35ml の滅菌 PBS に懸濁したものをチンパンジープラーク試料とした。

ストレプトコッカスの選択培地である Mitis-Salivarius (MS) 培地及びミュータンスレンサ球菌群の選択培地である改良 MS (mMSB) 培地に、段階希釈した試料をスパイラルプレーターで塗抹後、アナエロパックで 37℃、約 1～2 日間嫌気培養した。試料 1 ml 中のコロニー数はスパイラルプレーター装置付属マニュアルの計算式に従い、計測コロニー数から算定した。さらに各菌株は Tryptic Soy (TS) 培地にて 37℃、24 時間嫌気培養した。

2. 試験管壁付着性およびバシトラシン耐性試験

試験管壁付着性試験はガラス試験管に、グルコース不含 TS 培地に 1%スクロースを加え、45° の角度で 24 時間培養後、PBS で洗浄し、ミキサーで 10 秒間振盪後、剥離しない検体を試験管壁付着性有りとした。バシトラシン耐性試験は純培養をした菌をバシトラシン 200 units/l 含有 MS (MSB) 培地に塗抹し、生育の有無で調べた。

3. 細菌の同定

a) 菌種特異的プライマーを用いた PCR による検出

純培養した細菌から Genomic DNA purification kit を用いて DNA を抽出した。*S. mutans* と *S. sobrinus* の菌種特異的グルコシルトランスフェラーゼ(GTF)遺伝子を PCR で増幅し、アガロース電気泳動後のバンドの有無により便宜的にこの菌の存在を調べた。

b) 16SrRNA 遺伝子シーケンシングによる菌種同定

プライマーは 27F および 520R を用い 16SrRNA 遺伝子を増幅した。PCR 産物を ABI BigDye terminator v1.1 cycle sequencing kit および ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて塩基配列を解析した。得られた約 500 塩基の遺伝子配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ)などのデータベース(BLAST あるいは Ez taxon サーバー)を用いて菌種を同定した。基準株と遺伝子配列が 2%以上異なる菌については、更に約 1400 塩基以上の遺伝子配列を解析して菌種を同定した。基準株との類似性が 3%以上異なるものについては、最も近似する菌種とした。

【結果】

チンパンジー11 個体全ての口腔からレンサ球菌が検出された。MS 培地上のコロニー数は 5.64～7.68 log10 cfu/ml で、平均 6.88 log10 cfu/ml であった。同様に mMSB 上に生育する、ミュータンスレンサ球菌群のコロニー数は 0～5.60 log10 cfu/ml で、平均 2.45 log10 cfu/ml であった。

MS 培地上から分離された 46 菌株について 16S rRNA 遺伝子による菌種同定を行った。そ

の結果、ミテイスレンサ球菌群の *S. sanguinis* が 11 個体中 5 個体から最も多く分離され、レンサ球菌の 45%を占めた。ミュータンスレンサ球菌群は 6 個体から分離され (55%)、菌種別では我々が新菌種を提案した *S. troglodytae* が 4 個体から(36%)と最も多く、次いで *S. dentirousetti* が 3 個体から(27%)分離された。ヒトから分離される *S. mutans* が 1 個体から (9%)分離されたが、*S. sobrinus* およびモンキーから分離される *S. macacae*、*S. downei* などの菌種は分離されなかった。

GTF 遺伝子配列を用いた菌種特異的 PCR では、*S. troglodytae* は *S. mutans* のプライマーと、*S. dentirousetti* は *S. sobrinus* のプライマーと反応した。また、ミュータンスレンサ球菌群の *S. troglodytae* および *S. dentirousetti* は強い試験管壁付着性を示した。*S. troglodytae* および *S. mutans* はバントラシン耐性を示した。

【考察】

S. troglodytae および *S. dentirousetti* は近年発表された菌種であるが、この 2 菌種が単離した全レンサ球菌群の 30%を占め、チンパンジー口腔ミュータンスレンサ球菌群の優占種として存在することが明らかとなった。ヒトで強いう蝕原性を示すミュータンスレンサ球菌群の *S. mutans* や *S. sobrinus*、モンキーから分離される *S. downei*、*S. macacae* は存在しないか極めて少なく、チンパンジー口腔には固有のミュータンスレンサ球菌が構成されていた。これは霊長類の進化の程度により固有の構成菌種が存在することを示している。宿主の進化とともに母子感染などの要因で口腔細菌叢が動物種特異的に保存されている可能性がある。また、オオコウモリから分離される *S. dentirousetti* が何故チンパンジーに存在するのか今後の研究課題である。

本研究ではう蝕病原因子として *S. troglodytae* および *S. dentirousetti* のガラス面付着性を調べた。これらの菌はヒトで強いう蝕原性を示す *S. mutans* や *S. sobrinus* と同様に強い付着性を示し、う蝕病原性を有するものと思われた。

本研究と同時に行われた鶴見大学歯学部保存修復学講座チームによるチンパンジーの口腔内診査の結果によると、極めて健常な口腔衛生状態であることが確認されている。ミュータンスレンサ球菌群が存在するにも拘らず、う蝕が少ない現象は、今後ヒトのう蝕の成因およびう蝕予防を考察する上で重要な研究対象となるのではないかと思われた。

【結論】

1. チンパンジー口腔から分離される主要なミュータンスレンサ球菌群は *S. troglodytae* および *S. dentirousetti* であった。
2. *S. troglodytae* および *S. dentirousetti* は強いガラス面付着性を示した。
3. チンパンジー口腔にはヒトあるいはモンキーとは異なる固有のミュータンスレンサ球菌群が存在することが判明した。