

論文内容要旨

Isolation of *Streptococcus mutans* temperate bacteriophage with broad killing activity to *S. mutans* clinical isolates

(*Streptococcus mutans* 臨床分離株に広範な殺傷活性を有する *S. mutans* 溶原性バクテリオファージの分離)

iScience, 26, 108465, 2023.

主指導教員：谷本 幸太郎教授
(医系科学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：小松澤 均教授
(医系科学研究科 細菌学)

副指導教員：太田 耕司教授
(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

菅井 克仁

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【諸言】

口腔感染症であるう蝕と歯周病の発症の要因はデンタルプラークの形成であり、*S. mutans* は重要な役割を果たす。デンタルプラークの除去はブラッシングや洗口液等が用いられるが、*S. mutans* に特異的ではない。現在、常在細菌叢へ影響を与えず標的細菌を特異的に攻撃するバクテリオファージ（以下ファージ）を利用した治療法が新たな抗菌薬として期待されている。本研究は、口腔感染症の予防を目指し、う蝕原因菌である *Streptococcus mutans* に特異的に作用するファージの探索を試みた。結果、*S. mutans* 株から溶原性ファージの単離に成功し、その特性を解析した。

【材料と方法】

1. *S. mutans* 株からのファージゲノムの同定

S. mutans 臨床分離株 125 株の全ゲノムデータからファージゲノム検索ソフトである PHASTER を用いて同定した。

2. *S. mutans* KSM96 からの溶原性ファージ ϕ KSM96 の分離

S. mutans の培養は trypticase soy 液体培地 (TSB) を用いた。対数増殖期の *S. mutans* KSM96 にマイトマイシン C 添加、16 時間後に培養液を遠心 (5,000 \times g、15 min、4 °C) 後、培養上清を超速心 (5,0000 \times g、2hours、4 °C) し、沈渣を回収した。沈渣を少量の TSB で懸濁し、ファージ溶液を得た。得られたファージ溶液を用いて、種々の感受性試験や透過型電子顕微鏡観察を行った。

3. ϕ KSM96 全ゲノム配列の決定と遺伝子解析

ファージ DNA 分離キットを用いてファージ粒子から DNA を抽出し全ゲノムシーケンスを決定した。ゲノムデータを用い遺伝子マップ作成、系統樹解析等を行った。

4. ファージ感受性試験

S. mutans 臨床分離株 125 株および他の口腔レンサ球菌種、*L. lactis* に対するファージ感受性を検証した。各菌株の一晩培養液の TSB での 10 倍希釈液 100 μ l を trypticase soy 寒天培地 (TSA) に播種後、ファージ溶液を TSA 上に滴下し 37°C、一晩培養後、阻止円を測定した。

5. *S. mutans* の増殖に対する ϕ KSM96 の効果

S. mutans を培養時に種々の濃度の ϕ KSM96 添加を行い経時的に濁度を測定し、 ϕ KSM96 非添加時と比較し増殖阻害率を算出した。

6. *S. mutans* のバイオフィルム形成に対する ϕ KSM96 の効果

スクロース含有 TSB を用いて *S. mutans* の培養時に種々の濃度の ϕ KSM96 を添加、16 時間培養後、形成されたバイオフィルムを定量し、 ϕ KSM96 非添加時と比較し形成阻害率を算出した。

7. *S. mutans* と他の細菌種との共培養における ϕ KSM96 の影響

S. mutans 株、その他の菌種（1 菌種または 3 菌種）を混合培養時に、 ϕ KSM96 添加し 8 時間培養後、細菌細胞を回収、DNA 抽出後、各菌種特異的プライマーを用いた定量 PCR より各菌種の割合を算出した。

【結果】

1. *S. mutans* 分離株 125 株中、KSM96 株において完全長の溶原性ファージゲノムを同定した。
2. 分離した ϕ KSM96 は電子顕微鏡観察より Siphoviridae 属の形態を示した。
3. ファージゲノムサイズは 39,820 bp、環状 DNA、48 個の Coding sequence が同定された。相同性解析の結果、過去の報告の *S. mutans* 溶菌性ファージと高い類似性を示さなかった。
4. 感受性試験より *S. mutans* 125 株中 113 株 (90.4%) が感受性を示した。また、*S. mutans* 血清型 (c, e, k, f) との関連性の結果、 ϕ KSM96 非感受性株 12 株は血清型 c (3/105 株), e (3/11 株), k (4/4 株), f (2/2 株) であった。他の口腔レンサ球菌種および *L. lactis* は ϕ KSM96 に感受性を示さなかった。
5. ファージ感受性 *S. mutans* 株の増殖は ϕ KSM96 の添加により抑制されたが、その効果は菌株により多様性を示し、非感受性株は増殖阻害は認められなかった。
6. ファージ感受性 *S. mutans* 株のバイオフィルム形成は ϕ KSM96 の添加により抑制されたが、その効果は菌株により多様性を示した。
7. *S. mutans* およびその他の菌種（1 種又は 3 種）との共培養にて、 ϕ KSM96 の添加により *S. mutans* の割合の著大な減少が観察された。

【考察・結論】

S. mutans 株に対し抗菌力を示す *S. mutans* 溶原性ファージ ϕ KSM96 を同定した。 ϕ KSM96 は *S. mutans* 臨床分離株に対して幅広い抗菌力を示し、*S. mutans* を特異的排除する新しい抗菌因子としての応用が期待される。