

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)	氏名	菅井 克仁
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Isolation of <i>Streptococcus mutans</i> temperate bacteriophage with broad killing activity to <i>S. mutans</i> clinical isolates (<i>Streptococcus mutans</i> 臨床分離株に広範な殺傷活性を有する <i>S. mutans</i> 溶原性バクテリオファージの分離)			
論文審査担当者			
主査	教授	二川 浩樹	印
審査委員	教授	野村 良太	
審査委員	講師	重石 英生	
〔論文審査の結果の要旨〕			
【諸言】			
<p>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、<i>S. mutans</i> 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等が用いられるが、<i>S. mutans</i> に特異的ではない。現在、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る。本研究は、<i>Streptococcus mutans</i> に特異的に作用するファージの探索を試みた。結果、<i>S. mutans</i> 株から溶原性ファージを単離し、その特性を解析した。</p>			
【材料と方法】			
1. <i>S. mutans</i> 株からのファージゲノムの同定			
<p><i>S. mutans</i> 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。</p>			
2. <i>S. mutans</i> KSM96 からの溶原性ファージ ϕ KSM96 の分離			
<p><i>S. mutans</i> の培養は trypticase soy 液体培地 (TSB) を用いた。対数増殖期の <i>S. mutans</i> 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 \timesg, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) 後、培養上清を超速心 (5,0000 \timesg, 2hours, 4 $^{\circ}$ 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。</p>			
3. ϕ KSM96 全ゲノム配列の決定と遺伝子解析			
<p>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。</p>			
4. ファージ感受性試験			
<p><i>S. mutans</i> 臨床分離株 125 株および他の口腔レンサ球菌種、<i>L. lactis</i> に対するファージ感受性を検証した。各菌株の一晚培養液の TSB での 10 倍希釈液 100 μl 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$^{\circ}$C、一晚培養後、阻止円を測定した。</p>			
5. <i>S. mutans</i> の増殖に対する ϕ KSM96 の効果			
<p><i>S. mutans</i> 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。</p>			
6. <i>S. mutans</i> のバイオフィルム形成に対する ϕ KSM96 の効果			
<p>スクロース含有 TSB を用いて <i>S. mutans</i> 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。</p>			

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、非感受性株の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* の割合の著名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。

以上の結果からファージは *S. mutans* に対して幅広い抗菌力を示し、*S. mutans* を特異的に殺菌することから、新しい抗菌因子の可能性を示した。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。