

Title	感染性心内膜炎患者血液より分離された Streptococcus mutansの病原因子の解析
Author(s)	仲野, 和彦
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/1140">https://hdl.handle.net/11094/1140</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	なかの かつ ひこ 仲野和彦
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 17354 号
学位授与年月日	平成14年11月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	感染性心内膜炎患者血液より分離された <i>Streptococcus mutans</i> の病原因子の解析
論文審査委員	(主査) 教授 大嶋 隆 (副査) 教授 雫石 聡 教授 天野 敦雄 講師 中川 一路

### 論文内容の要旨

う蝕の主要な原因菌とされる *Streptococcus mutans* は、感染性心内膜炎の起炎菌としても知られている。これまでに *S. mutans* による感染性心内膜炎の症例の報告や心内膜を人工的に損傷させた動物モデルでの研究がなされているが、そのメカニズムやビルレンス因子などについては報告が少ない。本研究の目的は、感染性心内膜炎患者血液から分離された *S. mutans* 4株 (TW295、TW871、TW964、TW1378) を日本人小児口腔からの分離株 (MT8148) と比較することにより、う蝕および感染性心内膜炎発症に関わる病原因子を解析することである。

血液分離された4株の生化学的性状には、スクロース依存性平滑面付着能が低い以外、口腔分離株と明らかに異なる点は認められなかった。しかし血清学的性状に関しては、*S. mutans* の口腔分離株の80%以上が *c*型に分類されるのに対して、血液分離株は4株とも *c*型には分類されず、TW964株は *f*型、TW1378株は *e*型に分類され、TW295株およびTW871株は血清型分類不能であった。*S. mutans* の血清型はラムノースポリマーによる主骨格とグルコースポリマーによる側鎖から構成される菌体表層多糖抗原によって決定される。このため、血液分離株の血清型特異多糖抗原をカラムクロマトグラフィーで精製し、その組成を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、血清型の決定できない2株においてはラムノースポリマーによる主骨格は存在するが、グルコースポリマーによる側鎖の量が著しく低下しているのが明らかになった。これら血清型不定の2株の抗血清は、2回の免疫を行う通常の方法では得られず、供試菌を合計15回静脈内に免疫することで得られた。これは、血清型特異多糖抗原の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子のうち、側鎖の生合成に関与する *rgpEc* 遺伝子に欠落が認められ、血清型特異多糖抗原側鎖のグルコースポリマーの形成量の低下が抗原性の低下につながったことを示唆している。

次に、この血清型不定のTW871株およびTW295株の遺伝子の変異レベルを調べるため、DNA-DNAハイブリダイゼーションを行ったところ、MT8148株の染色体DNAに対するこれら血液分離株の相同性は低く、それぞれ約76%と約93%であった。その結果は、血液分離株には血清型特異多糖抗原以外にも表層構造の変異が存在する可能性を示唆しており、血液分離株のう蝕誘発能をラット実験系において検討した。その結果、血清型不定のTW295株およびTW871株の2株において、う蝕スコア、プラークスコアの有意な低下と、TW871株においては、顎骨からの回収菌量が著しく低下しているのが明らかとなった。そこで、初期付着に関係する菌体表層 Protein antigen c (PAc) の分析を行ったが、その変異は認められなかった。PAcと相同性の高い Glucan-binding protein C (GbpC) をコードする *gbpC* 遺伝子配列とタンパク分析を行ったところ、TW295株では2つの open reading frame によって構成され、

TW871 株においては C 末端側に 39 アミノ酸の脱落があることが明らかになった。この GbpC の変異は TW871 株の唾液被覆ヒドロキシアパタイトへのスクロース非依存性付着を低下させ、TW295 株および TW871 株のデキストラン結合能を低下させた。これらと同様の所見が、MT8148 株の *gbpC* 遺伝子を挿入失活した株においても認められ、歯面への初期付着とグルカンの結合に関連する表層タンパクの一つである GbpC の変異が、う蝕誘発能の低下に関連していることが示唆された。

心内膜の損傷が感染性心内膜炎のリスクとされているため、心内膜炎のモデル実験はカテーテルを用い心内膜を人工的に損傷させる動物モデルで行われてきた。しかし、技術的に熟練を要し、また得られる結果にばらつきが大きいことから、コラーゲン阻害剤である  $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN) をラットの食餌中に混入し、人工的に心内膜の損傷を誘発する実験系で、*S. mutans* の感染性心内膜炎の関与を調べた。BAPN を 0.05% の濃度で 21 日齢のラット飼料に 3 週間混入したとき、全身的な異常を引き起こすことなく心内膜に損傷を与えることを明らかにし、これを至適濃度として以下の研究に用いることとした。この心内膜炎に損傷を誘発させたラットに TW871R 株と MT8148R 株を頸静脈よりそれぞれ  $1 \times 10^8$  CFU 感染させた。また、陰性対照群として PBS を投与した。頸静脈より回収される菌量は TW871R 株を投与した群で MT8148R 株を投与した群より有意に高く、長期間検出された。また、血清中の炎症マーカーについても、TW871R 株を感染させた群では MT8148R 株を感染させた群よりも常に高い値を示した。1 週間後に屠殺し、摘出した脾臓の重量も TW871R 株を感染させた群では MT8148R 株を感染させた群よりも有意に大きく、組織学的診査では TW871R 株を感染させた群で心内膜に著明な病変の形成を認めた。

以上の結果は、*S. mutans* の血液分離株が表層多糖抗原や蛋白抗原の変異をきたしており、菌体表層の変異がう蝕に対する病原性だけではなく、全身への病原性にも影響している可能性の高いことを示唆している。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、感染性心内膜炎患者血液より分離された *Streptococcus mutans* の病原因子を口腔分離株と比較検討したものである。その結果、*S. mutans* の血液分離株が、菌体表層にある多糖抗原や蛋白抗原の変異をきたしており、それらの変異がう蝕に対する病原性だけではなく、心内膜炎発症の病原性にも影響している可能性が高いことを明らかにした。

以上のことは、感染性心内膜炎患者血液より分離された *S. mutans* の全身への病原因子の一端を明らかにしたものであり、博士（歯学）の学位を得るに値するものと認める。