



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	https://hdl.handle.net/11094/1140
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

大阪大学大学院歯学研究科分子病態口腔科学専攻
口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室

仲野和彦

はじめに

感染性心内膜炎 (infective endocarditis; IE) は心内膜, 弁膜, 心臓に近い大血管に細菌集簇を含む病巣 (疣贅) の形成を伴い, 菌血症や血管塞栓, 心障害など多彩な臨床症状を呈する全身性感染症として知られている (雨宮, 1991). 口腔レンサ球菌はその主要な原因細菌の一つとして知られ, 約 50 % の IE 症例に関連していると考えられている (Douglas ら, 1993). 主たるう蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* も, 菌血症や IE 患者の血液から分離されている (Hamada と Slade, 1980; Vose ら, 1987; Ullman ら, 1988; Douglas ら, 1993). 歯科的処置により起炎菌が血中に侵入し, IE を引き起こす可能性があるため, 心室中隔欠損など先天性心疾患を有する患者あるいは人工弁置換術を受けた患者などのリスク患者の観血的処置においては, 抗生物質の術前投与が推奨されている (Seymour ら, 2000).

S. mutans の菌体表層には様々な抗原成分が存在し (Curtiss, 1985), いくつかは IE 発症への関与が推測されている. しかし, *S. mutans* の病原性因子と IE の明確な関連を示した報告は未だ見られない. *S. mutans* のう蝕発生の主要な病原性は, 粘着性で不溶性のグルカン合成するグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) にあると考えられている. GTF は菌体に付着した非水溶性グルカン合成する GTFB (Kuramitsu と Wondrack, 1983; Mukasa ら, 1985) と培養上清中に遊離する水溶性グルカン合成する GTFD, 非水溶性グルカンと水溶性グルカンの両方を合成する GTFC から構成される. 最初に GTFB をコードする遺伝子 *gtfB* がクローニングされ (Aoki ら, 1986), 続き GTFC をコードする遺伝子 *gtfC* が (Hanada と Kuramitsu, 1988), 最後に GTFD をコードする遺伝子 *gtfD* がクローニングされ, それぞれの配列が決定された (Hanada と Kuramitsu, 1989). しかし, これら GTF の IE 発症への関与に関する報告は未だ見られない. 一方, *S. mutans* の主要な菌体表層タンパクであるタンパク抗原 (PAc) も, 歯面への初期付着に深く関わっていると考えられており (Okahashi ら, 1989; Koga ら, 1990), PAc に対する抗体価は *S. mutans* に起因する IE 患者血液中では上昇していることが報告されている (Russell ら, 1992). このため PAc は, IE 発症因子の一つであると推測されていたが, 近年の PAc 欠失株を用いた動物実験において, PAc の有無と疣贅からの回収菌量には関連性が乏しいことが示され (Ryd ら, 1996), PAc と IE との関係ははっきりとはしていない.

S. mutans の主要な表層タンパク質であるグルカン結合タンパク (Gbp) は, GbpA (Russell

ら, 1985), GbpB (Smith ら, 1994), および GbpC (Sato ら, 1997) が精製され, それぞれをコードする *gbpA* (Banas ら, 1990), *gbpB* (Mattos-Graner ら, 2001), および *gbpC* (Sato ら, 1997) がクローニングされ遺伝子配列が決定されている. GbpA は GTF と相同性が高く, スクロース依存性付着に関与するとされ (Banas ら, 1990), GbpC は PAc と相同性が高いことから, 歯面への初期付着に関与すると考えられている (Sato ら, 1997). これら Gbp がう蝕発生に重要な役割を果たすことが報告されているが, IE との関係は明らかになっていない.

S. mutans の多糖抗原は主骨格であるラムノースのポリマーと側鎖であるグルコースのポリマーから構成され, *c*, *e*, *f* 型に分類される. 日本人小児から検出される

S. mutans はその大部分が *c* 型であり, *e* および *f* 型は少ない (Hamada と Slade, 1980). これまで, その血清型特異多糖抗原の生合成の過程とそれぞれの合成酵素をコードする遺伝子が特定されてきた. 主骨格であるラムノースのポリマーの生合成に関わる *rmlA*, *rmlB*, *rmlC*, *rmlD*, *rgpAc*, *rgpBc*, *rgpFc* 遺伝子が, また側鎖であるグルコースのポリマーの生合成および局在化に関わる *gluA*, *rgpCc*, *rgpDc*, *rgpEc* がクローニングされ, それらの遺伝子配列が明らかになった (Tsukioka ら, 1997a; Tsukioka ら, 1997b ; Yamashita ら, 1998a ; Yamashita ら, 1998b). また, その多糖抗原がヒト単球において IgG の Fc レセプターの発現や IL-1 β や TNF- α の誘導に深く関係することや (Benabdelmoumene ら, 1991; Soell ら, 1995), 多型核白血球による phagocytosis に関連することも示されている (Tsuda ら, 2000).

本研究の目的は, IE 患者血液より分離された *S. mutans* の性状を, 口腔より分離された *S. mutans* と比較することで, *S. mutans* によるう蝕発症および IE 発症に関わる病原因子を解析することである.

材料と方法

1. 供試菌の由来と生物学的性状

1) 供試菌と培養条件

表 1 に本研究で用いた血液分離レンサ球菌の由来を示す. これらの供試菌は東京女子医大より供与された患者血液から分離された 522 株のレンサ球菌[IE(141 株/84 症例), 敗血症(85 株/54 症例), 抜歯後菌血症(15 株/12 症例)]のうち, API-20 Strep system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)あるいは rapid ID32 Strep system (bioMérieux)で *S. mutans* と同定されたものである.

表 1 血液分離 *S. mutans* の由来

菌株	年齢	性別	病状
TW 295	59 歳	男性	抜歯後菌血症
TW 871	45 歳	女性	感染性心内膜炎 くも膜下出血を併発
TW 964	72 歳	男性	感染性心内膜炎
TW 1378	59 歳	男性	感染性心内膜炎

また, 本学小児歯科学教室保有の日本人小児口腔より分離された *S. mutans* MT8148 (血清型; c)を用いた. さらに, 本学小児歯科学教室 松村美依子博士より供与を受けた MT8148 株より作製した GbpC 欠失株 C1 も用いた.

遺伝子操作の宿主として *Escherichia coli* XL-2 (Stratagene, Cambridge, UK)を使用した. レンサ球菌の培養には, Brain Heart Infusion (BHI) 培地 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), Mitis-salivarius (MS) 寒天培地 (Difco), あるいは血液寒天培地 (5 % 羊脱繊維血含有) を用い, 37°C で静置培養した. *E. coli* の培養には Luria-Bertani (LB) 培地 (1 % トリプトン, 0.5 % 酵母エキス, 0.5 % 塩化ナトリウム; 和光純薬), あるいはこの培地に 1.5 % 寒天末を添加した LB 寒天培地を用いた. また, 必要に応じて LB 培地にはテトラサイクリン (7.5 µg/ml; 和光純薬; 大阪), アンピシリン (100 µg/ml; 和光純薬) を, MS 寒天培地にはストレプトマイシン (500 µg/ml; 明治製菓, 東京), カナマイシン (250 µg/ml; 和光純薬) を添加し, 選択培地として用いた.

2) 生物学的性状の分析

供試菌の MS 寒天培地上のコロニーの形態, バシトラシン抵抗性, 血液寒天培地上での溶血性, マンニトール, ソルビトール, ラフィノースおよびメリビオースを 1 % 含むフェノールレッド液体培地 (Difco) における糖発酵能, アルギニン分解能, デキストラン凝集能をそれぞれ調べた.

3) スクロース依存性平滑面付着能の測定

スクロース依存性平滑面付着能は Hamada ら (1981) の方法で測定した. 供試菌を 1 % スクロース含有 BHI 液体培地に播種し, 37°C で 18 時間水平面から 30° に傾けて培養した. 培養後, 培養試験管を静かに 3 回転させ浮遊した菌を画分 1 とし, 画分 1 を除いた後さらにこの試験管に蒸留水 3 ml を加えボルテックスミキサーで 3 秒間攪拌し浮遊させた菌液を画分 2 とした. さらに, 画分 2 を除いた後に培養試験管に強固に付着した菌液に蒸留水 3 ml 加えラバーポリスマンで剥ぎ取った後, 超音波処理したものを画分 3 とした. 各画分を超音波処理して分散させ, 波長 550 nm (OD550) における濁度を測定し,

$$\text{付着率 (\%)} = \frac{\text{画分 3 の濁度}}{\text{画分 (1+2+3) の濁度}} \times 100$$

とした.

4) 菌体疎水性の測定

菌体疎水性は Rosenberg ら (1980) のヘキサデカン法を用いて以下のように測定した. まず, 供試菌を BHI 液体培地で 37°C, 18 時間培養した. 遠心分離することにより得た菌体を PUM 緩衝液 (30 mM 尿素, 0.8 mM 硫酸マグネシウムを含むリン酸カリウム緩衝液; pH 6.5) で洗浄した後, 菌量が OD550=1.2 となるように同緩衝液で調製した. この菌液を n-ヘキサデカン (和光純薬) とともに加え, ボルテックスミキサーで 1 分間混和した. 室温で 15 分間静置後, 水層の濁度 (OD550) を測定し, ヘキサデカン非添加時の濁度に対する比率からヘキサデカン層に移動した菌量の比率を求めた.

5) GTF および PAc の発現の分析

GTF および PAc の発現は, ウェスタンブロッティング法により解析した. まず, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で懸濁した供試菌体に等量の 2x SDS-PAGE sample loading buffer [SL buffer; トリス塩酸緩衝液; pH 6.8, 100 mM ジチオスレイトール (和光純薬), 20 % グリセリン

(和光純薬)]を加え、95℃で5分間加熱して、SDS-PAGE用試料とした。SDS-PAGEはLaemmli (1970)の方法に従って行った。アクリルアミドの濃度は分離用として7.5%、濃縮用として3%のゲルを用いた。分子量測定マーカーとして、タンパク分子量マーカー「第一」・II(第一化薬、東京)を用いた。電気泳動はミニプロティアンII 1-Dセル(BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて、室温200V定電圧で行った。SDS-PAGE後、ゲルを0.25%クマシーブリリアントブルーR-250(Sigma Chemical Co., St. Louis, MI, USA)を含むメタノール-酢酸-水(45%-10%-45%)混合液で30分染色した後、メタノール-酢酸-水(45%-10%-45%)混合液(脱色液)で脱色し、タンパクのバンドを可視化した。

SDS-PAGE後、セミドライ式ブロッティング装置(Trans-blot SD;BIO-RAD)を用いて10V定電圧で、1時間通電することによりアクリルアミドゲル層からポリビニリジンジフルオライド(PVDF)転写膜(Immobilon, Millipore, Bedford, MA, USA)へ転写した。このPVDF膜を5%スキムミルク(Difco)と0.05% TritonX-100を含むPBS(PBST)溶液中に浸して4℃で一晩静置した。PBST溶液で3回洗浄後、本学小児歯科学教室所有のウサギ抗GTF抗血清およびウサギ抗PAC抗血清をPBST溶液で1000倍希釈して加え、室温で1時間反応させた。PBST溶液で3回洗浄後、PBST溶液で1000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識のブタ抗ウサギ免疫グロブリン抗体(Dakopatts, Glostrup, Denmark)と室温で1時間反応させた。PBST溶液で3回洗浄後、100mM塩化ナトリウム、5mM塩化マグネシウムを含む100mMトリス-塩酸緩衝液(AP緩衝液;pH 9.5)で1回洗浄後、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 *p*-トルイジン塩(和光純薬)とニトロブルーテトラゾリウムクロリド(和光純薬)を発色基質として添加したAP緩衝液により発色させ、バンドを可視化した。

2. 遺伝学的性状

1) 遺伝学的性状の分析

(1) 染色体 DNA の抽出

供試菌体を 500 ml の BHI 液体培地で 37°C 18 時間培養後、遠心処理により菌体を回収した。菌体を T10E1N100 (10 mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール, 1 mM エチレンジアミン四酢酸, 100 mM 塩化ナトリウム) 緩衝液 (pH 8.0) で洗浄後, 5 ml の同緩衝液に懸濁し, ムタノリジン (0.25 mg/ml; 大日本製薬, 大阪) を加え, 50°C で 1 時間反応させた。同反応液に N-ラウリルサルコシン (最終濃度 1.5 %) とエチレンジアミン四酢酸 (最終濃度 10 mM) を加え, 10 分間処理した。さらに, RNase (0.3 mg/ml; 和光純薬) を添加し, 37°C で 1 時間反応後, プロテイナーゼ K (0.3 mg/ml; Merck, Darmstadt, Germany) を加え, 50°C で 1 時間反応させ, 染色体 DNA 粗画分を得た。ついで, この粗画分をトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0), 飽和フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1), 最後にクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) で処理することにより染色体 DNA 画分の抽出を行った。さらに, この DNA 画分に 100 % エタノールを加え, 沈殿した染色体 DNA をガラス棒を用いて回収した。これを 70 % エタノールで洗浄後乾燥し, 1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0; TE 緩衝液) に溶解した。染色体 DNA は, OD₂₆₀ により濃度を測定し, 使用するまで 4°C にて保存した。

(2) 供試菌染色体 DNA における 16S リボゾーム RNA 配列の決定

まず, 血液分離株の 16S リボゾーム RNA の遺伝子配列を決定するために, Bentley ら (1991) の記載による *S. mutans* NCTC10449 株の遺伝子配列 (GenBank アクセッション番号: X58303) をもとにプライマーを設計した (表 2)。供試菌それぞれの染色体 DNA とプライマー 8UA および 1540R を用いて, 16S リボゾーム RNA 領域を PCR 法により増幅した。94°C, 3 分間の反応後, 94°C, 30 秒, 50°C, 30 秒および 72°C, 1 分の反応を 30 サイクル行い, さらに 72°C, 10 分の反応を行い, 得られた遺伝子増幅断片をフェノール・クロロホルム処理およびエタノール沈殿後, 滅菌精製水に溶解した。その後, この遺伝子増幅断片と表 2 のプライマーとを用いて, 各供試菌の 16S リボゾーム RNA の遺伝子配列を DNA Sequencing System (373-18 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で決定し, *S. mutans* NCTC10449 株のものと比較した。

表 2 16S リボゾームRNA 配列の決定に用いたプライマー

名称	配列
8UA	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
400F	5' TTCGGATCGAAAGCTCCTGT 3'
519B	5' ATTACCGCGGCTGCTG 3'
750R	5' TCACCGCTACACATGGAAT 3'
803F	5' GTAGTCCACGGCGTAAACG 3'
1160R	5' OCAACATCTCAACGACGAG 3'
1200F	5' TAGCGAGACTGCGGTAATA 3'
1540R	5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3'

(3) DNA-DNA ハイブリダイゼーション

①プローブ DNA のラベリング

DNA-DNA ハイブリダイゼーションに用いたプローブ DNA は Random Primer Labeling Kit Ver. 2(宝酒造, 京都)および $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (37 MBq/mmol; New England Nuclear, Boston, MA, USA)を用いて, 添付の指示書に従い, ランダムプライマー法により DNA 断片を標識した.

②DNA-DNA ハイブリダイゼーション

各供試菌 DNA を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように TE 緩衝液に溶解し, 15 秒間超音波処理をして断裂させた. この DNA を 100°C で 5 分間熱処理後, 直ちに氷水中で急冷して一本鎖とした. 一本鎖とした DNA を含む溶液を 1 μl ずつナイロン膜 (Hybond-N, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) にスポットし, これを 2 分間紫外線照射して, DNA をナイロン膜に固定させた. 固定後, ナイロン膜を, 5 ml の前処理液 (750 mM 塩化ナトリウム, 75 mM クエン酸ナトリウム, 0.1 % BSA, 0.1 % フィコール 400, 0.1 % ポリビニルプロピデン, 1 % グリシン, 0.05 % ヘパリン, 25 % ホルムアミド) 中で, 42°C で 1 時間反応させ, その反応液に 5 ml のハイブリダイゼーション液 (前処理液に 0.2 % SDS を加えたもの) と, 一本鎖としたプローブ DNA 溶液を加えて, 42°C で 18 時間ハイブリダイズさせた. 反応終了後, ナイロン膜を, 0.5 % SDS, 3 mM クエン酸ナトリウムを含んだ 30 mM 塩化ナトリウム溶液で室温で 15 分間, さらに 0.2 % SDS, 0.15 mM クエン酸ナトリウムを含んだ 1.5 mM 塩化ナトリウム溶液で 50°C 30 分間, それぞれ洗浄した. このナイロン膜を乾燥後, 膜上スポットの放射活性を液体シンチレーションカウンター (LKB-Wallac, Rackbeta 1241 型, Wallac oy., Turku, Finland) で測定した. DNA の相同性は, プローブ DNA として用いた DNA とのハイブリッドの示す放射活性の値を 100 とし, 供試菌 DNA のハイブリッドの放射活性を相対値で示した.

3. 血清学的性状の分析

1) 血清型の分析

血清型特異抗原の抽出には Rantz と Randall (1955) の方法を用いた。供試菌を BHI 液体培地で 37℃, 18 時間培養後集菌し, 元の培養液の 1/40 量の生理食塩水を加え 121℃, 15 分間加熱し抽出し, その遠心上清を Rantz-Randall (RR) 抗原とした。抗体として, 小児菌科学教室に保有している抗 *c* 型特異抗体, 抗 *e* 型特異抗体, 抗 *f* 型特異抗体, 抗 *d* 型特異抗体, 抗 *g* 型特異抗体を用いた。また, 抗原抗体反応はゲル内沈降反応 (Ouchterlony, 1968) をアガロースゲル内で行い, 24 時間後の沈降線の有無で確認した。

2) 細胞壁と多糖抗原の精製と組成の分析

細胞壁の精製は Okahashi ら (1983) の方法に従って行った。供試菌を 10 l の TTY 培地 (Hamada and Torii, 1978) で培養し全菌体を得た。次に, Braun cell homogenizer (model MSK, B. Braun Apparatebau, Melsungen, Germany) に全菌体をガラスビーズ (直径 0.17 ~ 0.18 mm) とともに加え, 菌体を破碎した。破碎した菌体をビーズと分離した後, 13,000 x *g* で 60 分間遠心し, 細胞壁粗画分とした。この粗細胞壁をトリプシンで 37℃, 2 時間処理し, 表層タンパクや細胞膜成分を取り除いた。これを滅菌水で洗浄後凍結乾燥し, 精製細胞壁とした。

血清型特異多糖抗原は以下のように精製した。まず, 供試菌を 10 l の TTY 培地で大量培養し, 3. の 1) で示した方法で RR 抗原を抽出し, 生理食塩水で洗浄し透析後, 凍結乾燥を行った。その後, 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー HiTrap-Q (5 ml x 3, Pharmacia) に展開し, 流速 2.5 ml/分で 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて溶出し, 5 ml ずつの分画した。各画分の糖含有量をアンスロン法 (Van Handel, 1967) を用いて測定し, 非吸着画分で糖量の最も多い 3 番目の溶出画分を透析後凍結乾燥した (図 1)。次に, ゲル濾過カラムクロマトグラフィー TSKgel G3000SW (60 cm x 7.5 mm inside diameter, Toso, 東京) を用い流速 1.0 ml/分で展開し, 滅菌イオン水にて 1 ml ずつに分画した。アンスロン法で糖量を測定により 17, 18 および 19 番目のピークに糖含有画分が得られたため, これらを透析後凍結乾燥して精製された表層多糖抗原として以下の分析に用いた (図 2)。

糖の組成分析の前処理として, 精製細胞壁および表層多糖抗原を 0.1 M 塩酸で 100℃, 48 時間反応させ, イオン交換カラムクロマトグラフィーに展開した。その後, 高速液体カラムクロマトグラフィーを用い, 60℃ で 0.1 mM 水酸化ナトリウムを溶出液として 0.5 ml/分の流

速で糖分析カラム SUPELCOGEL C611 (30 cm x 7.8 mm inside diameter, Supelco, Bellefonte, PA, USA) に展開し, グルコースおよびラムノースの標準溶液のピークと比較することで分析した.

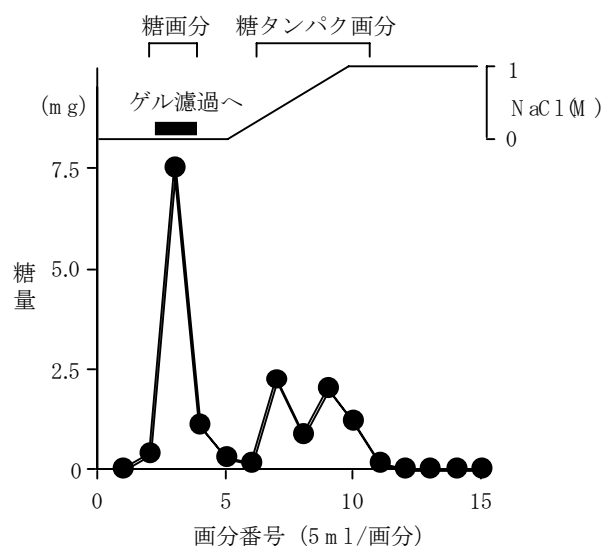


図1 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる血清型特異多糖抗原の精製

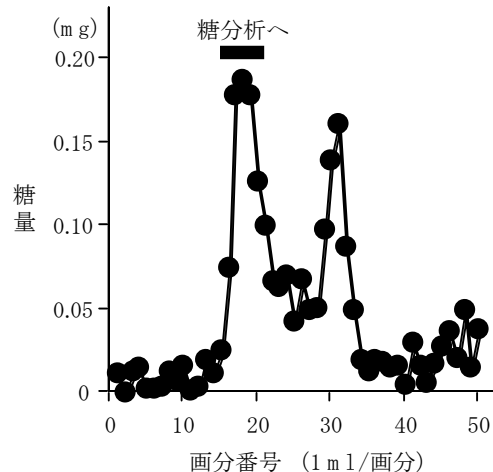


図2 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる血清型特異多糖抗原の精製

3) 抗血清の作製

供試菌を BHI 液体培地で 37℃, 18 時間培養し, 全菌体をフロイントの完全アジュバント (Difco) と混合し, ウサギ (ニュージーランド白ウサギ; 約 1.5 kg) の背部皮下に注射した. 一週間後さらに同部に同抗原を注射した. その一週間後採血を行い, ゲル内沈降反応で抗体価の上昇を確認した. 抗体価の上昇の認められなかった TW295 株および TW871 株については免疫法を変更し, 下記の方法で行った. すなわち, 第 1 週目に 5 日間連続で全菌体を耳介静脈より注射し, 1 週間免疫を休止した後, 再び第 3 週目, 第 4 週目にも同様に 5 日間連続で全菌体を耳介静脈より注射した. その 1 週間後に採血を行い, ゲル内沈降反応で抗体価の上昇を確認した.

4) 血清型特異的多糖抗原の合成に関わる遺伝子の分析

主骨格であるラムノースポリマーの生合成に関係する *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* 遺伝子, および側鎖であるグルコースポリマーの生合成に関わる *rgpEc* 遺伝子の存在を以下の方法で分析した.

(1) PCR 法による増幅の確認

rmlA, *rmlB*, *rmlC* および *rgpEc* 遺伝子の増幅には PCR 法を用いた. 表 3 に示したプライ

マーと2. の1)の(1)で抽出した染色体DNAを用い, 94℃, 3 分間の反応後, 94℃, 30 秒, 40℃, 30 秒および 72℃, 1 分の反応を 30 サイクル行い, さらに 72℃, 10 分の反応を行った.

表 3 血清型特異多糖抗原の生合成に関与する遺伝子の分析に用いたプライマーの配列

名称	配列
rm AF	5' GTTTATGATAAAACCAATGAT 3'
rm AR	5' ATACGATAAGCAATTTCTTC 3'
rm BF	5' ATCGGTTCAAACCTTTGTCCA 3'
rm BR	5' TCCTTTTCAGCTTTTCAACA 3'
rm CF	5' TGCAAGATTGATGCTATTTC 3'
rm CR	5' GCTTCTGCTAGATTTTCAACA 3'
rgpEcF	5' GGCAATTTTCATAGGATATAGTGT 3'
rgpEcR	5' CATTTGAGTCAACTGATAAAACGAC 3'

(2) サザンハイブリダイゼーション

① プローブ DNA のラベリング

MT8148 株の *rgpEc* 遺伝子を PCR により増幅し, ラベリングを2. 1) (4)①で示す方法で行った.

② サザントランスファー

2 µg の供試菌染色体 DNA を制限酵素 *HincII* (New England Biolabs) で消化し, 電気泳動後, アガロースゲルをアルカリ溶液 (1.5 M 塩化ナトリウム, 0.5 M 水酸化ナトリウム) に 30 分間, ついで中和溶液 (1.5 M 塩化ナトリウム, 1 M トリス-塩酸緩衝液; pH 7.4) に 30 分間浸漬した. このアガロースゲルをナイロン膜 (HYbond-N, Amersham Biosciences) に密着させ, 20 X SSPE (3 M 塩化ナトリウム, 173 mM リン酸二水素ナトリウム, 25 mM エチレンジアミン四酢酸) を用い, 毛細管現象を利用して DNA 断片をナイロン膜に転写した. DNA の転写されたナイロン膜は UV クロスリンカー (CL-1000 ULTRAVIOLET CROSSLINKER, UVP, INC., Upland, CA, USA) を用いて紫外線照射することにより DNA を膜上に固定した.

③ サザンハイブリダイゼーション

DNA ボトル (クラボウ, 倉敷) に転写後のナイロン膜を入れ, 50 %ホルムアミド (和光純薬) を添加したハイブリダイゼーション溶液 [5 µg/ml サケ精子 DNA (和光純薬), 6 X SSPE, 0.5 % SDS, 5 X Denhard 試薬 (0.1 % Ficoll 400 (和光純薬), 0.1 % ポリビニルピロリドン

(Sigma)0.1 % BSA)]を加え DNA オーブン(クラボウ)を用い、42℃で1時間反応させた。ついで、新しいハイブリダイゼーション溶液と交換し、標識 DNA 断片を加え、10-20 rpm で回転させながら 42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のナイロン膜は一次洗浄液(2 X SSPE, 0.5 % SDS)を用いて 42℃で10分間洗浄後、二次洗浄液(0.1 X SSPE, 0.5 % SDS)を用いて 68℃1時間洗浄した。洗浄後のナイロン膜は、-80℃で X線フィルム(RX100, 富士フィルム, 東京)に18時間露光した。

4. う蝕原性の検討

1)う蝕誘発動物実験

図3に動物モデルでの供試菌のう蝕原性の評価を検討する実験スケジュールを示す。供試菌は TW295 株, TW871 株, TW964 株, TW1378 株および MT8148 株をストレプトマイシン耐性とした TW295R 株, TW871R 株, TW964R 株, TW1378R 株および MT8148R 株を用いた。実験動物として生後 15 日目に強制離乳させた Specific pathogen-free の Sprague-Dawley (SD) 系ラット(日本クレア, 東京)の雄を一群 15 匹として使用した。生後 15 日と 16 日の2日間, 供試菌の定着を容易にするために, 飲料水中に 200 U/ml のペニシリン G カリウム(明治製菓)を添加し, また粉末飼料中には 4 mg/g の塩酸テトラサイクリン(和光純薬)を加え, 自由に摂取させた。生後 18 日目から 22 日目まで, BHI 培地で一晩培養後, 滅菌生理食塩水で 1×10^{10} 集落形成単位 (Colony Forming Unit; CFU) /ml になるように調整した供試菌 100 μ l を毎日1回ラットの口腔に感染させた。感染と同時に飼料として粉砂糖(コンフェクショナルシュガー)を 56 %含むう蝕誘発性飼料を与え自由に摂取させた。供試菌の定着は1週間に一度, 綿棒を用いてラット臼歯部よりプラークを採取し, 滅菌生理食塩水で連続 10 倍希釈後, ストレプトマイシン(SM)含有の MS 寒天培地に播種することにより確認した。

55 日間飼育後, ラットを屠殺し, 全臼歯のう蝕スコアを Ooshima らの方法 (1981) で, また上顎臼歯のプラークスコアを Regolati と Hotz の方法 (1972) で算出した。また, 下顎骨を取り出し, 滅菌生理食塩水中, 超音波処理して, プラークを歯面より分離させた。このプラーク懸濁液を連続希釈し, 上記の方法で, SM 含有の MS 寒天培地に播種することにより, 供試菌の下顎からの回収量を調べた。

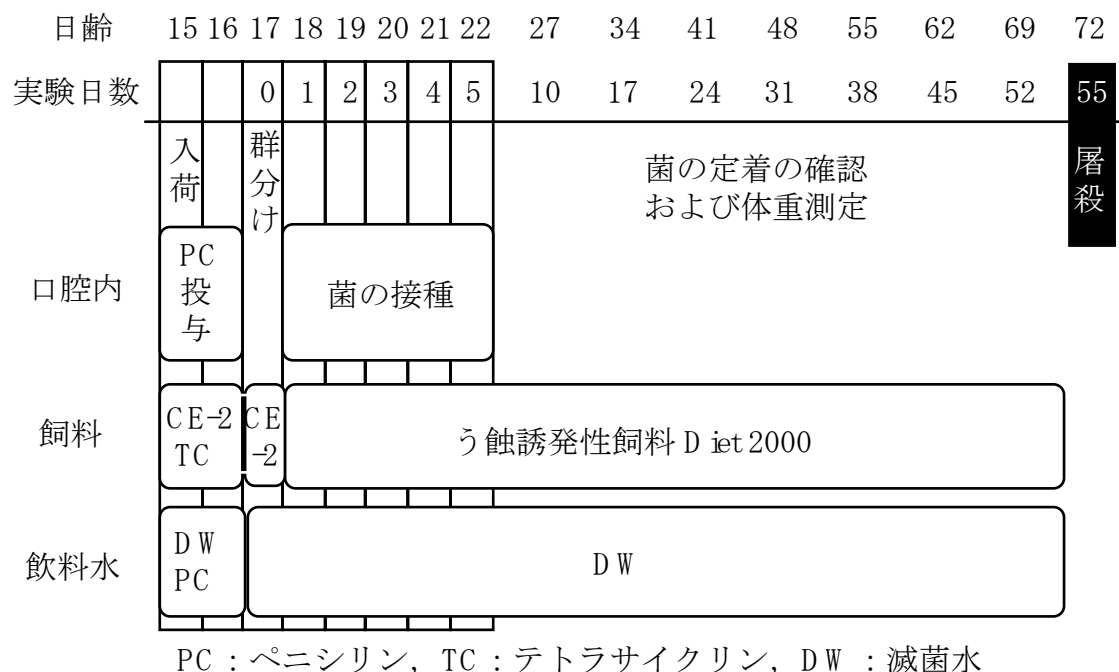


図3 ラットう蝕誘発実験のスケジュール

2) *gbpA* 遺伝子, *gbpC* 遺伝子および GbpC の分析

(1) *gbpA* 遺伝子, *gbpC* 遺伝子を用いたサザンハイブリダイゼーション分析

表4 *gbpA* および *gbpC* 遺伝子のサザンブロットにおいて
プローブ作製に用いたプライマー

名称	配列
<i>gbpA</i> 1F	5' CCGGCTATAAGTTGAAATATTGT 3'
<i>gbpA</i> 1968R	5' CTTTCATTAATTGATAAC 3'
<i>gbpC</i> 1F	5' GATATCAGTTTAGACTCTAT 3'
<i>gbpC</i> 2195R	5' ATCGATAGATCGTAATGAAA 3'

表4に *gbpA* (GenBank アクセッション番号:M30945; Banas ら, 1990) および *gbpC* の既知の配列 (GenBank アクセッション番号:D85031; Sato ら, 1997) をもとに設計したプローブ作製のプライマーの塩基配列を示す. 3. の4) の(2)で示す方法でサザンハイブリダイゼーションを行った.

(2) 供試菌の *gbpC* 遺伝子配列の決定

表 5 *gbpC* 遺伝子の配列決定に用いたプライマー

名称	配列
1F	5' GATATCAGTTTAGACTCTAT 3'
249R	5' CGATTTTCATAAAAAACATOC 3'
361F	5' OCTACTGCTGATACACAAGC 3'
615R	5' TGTATTAATTGTTTGTGOCT 3'
781F	5' GTTGAAAAAGOOCAAGGACT 3'
1015R	5' AGGTAAGTCAAATCTGATCT 3'
1191F	5' AATCAGTGTGACGATGCAAA 3'
1415R	5' TATTGGTTGTCTTAGOOGA 3'
1601F	5' CTAATTCAGCTGTAGCTGTG 3'
1815R	5' AGCTACGACAGGTGATTGAG 3'
2004F	5' CTATAAAAAGAGGTTGGGAC 3'
2195R	5' ATOGATAGATCGTAATGAAA 3'

表 4 に示すプライマー, *gbpC*1F および *gbpC*2195R と供試菌染色体 DNA を用いて, 供試菌の *gbpC* 遺伝子断片を PCR 法で増幅した. 94℃, 3 分間の反応後, 94℃, 30 秒, 42℃, 30 秒および 72℃, 2 分の反応を 30 サイクル行い, さらに 72℃, 10 分の反応を行い, 得られた *gbpC* 遺伝子断片を pGEM-T Easy Vector (Promega Co., Madison, WI, USA) に組換えを行った. このプラスミド溶液と *E. coli* XL-2 株とを混和し, 氷水中で 30 分間放置した. その後, 42℃で 45 秒反応させた後, 氷水中で 2 分間冷却した. この反応液に 400 μ l の SOC 培地 (2 %トリプトン, 0.5 % 酵母エキス, 10 mM 塩化ナトリウム, 2.5 mM 塩化カリウム, 20 mM 塩化マグネシウム, 10 mM 硫酸マグネシウム, 20 mM グルコース) を添加し, 37℃ 1 時間震盪培養した. この培養液をテトラサイクリン (7.5 μ g/ml; 和光純薬) とアンピシリン (100 μ g/ml; 和光純薬) を添加した LB 寒天培地に播種し, 37℃で一晩培養した. このようにして得られた *gbpC* 遺伝子断片を含むプラスミドと表 5 に示すプライマーを用い, 供試菌の *gbpC* 遺伝子の全配列を DNA Sequencing System (373-18 DNA Sequencer, Applied Biosystems) で決定した.

(3) 抗リコンビナント GbpC 抗体を用いたウエスタンブロッティング

抗リコンビナント GbpC 抗体は本学小児歯科学教室 松村美依子博士より供与を受けた. ウエスタンブロッティングは 1. の 5) に示した方法で行った. また, タンパク分子量マーカーとして, Prestained Protein Marker (BIO-RAD) を用いた.

3) 唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの吸着能の分析

唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの吸着能は Matsumoto らの方法(1999)で調べた。供試菌として血中分離株 4 株(TW295R 株, TW871R 株, TW964R 株, TW1378R 株)および MT8148R 株と GbpC 欠失株(C1)もあわせて分析し比較した。

無刺激ヒト全唾液を一人の被験者(血液型 O)から採取した。その唾液を 60℃, 30 分加熱処理を行い, 12,000 x g で遠心し, その上清を唾液標品として実験に供試した。一方, ヒドロキシアパタイト(HA;BDH Chemicals Ltd., Poole, GB)粒子(直径;44 μm, 5 mg)は, ポリスチレンチューブ内で, 塩化カリウム緩衝液(5 mM 塩化カリウム, 2 mM リン酸カリウム, 1 mM 塩化カルシウム;pH 6.0)で 3 回洗浄した。この洗浄 HA 粒子を上記唾液標品とともに, ローテーター(RT-50, タイテック, 越谷)を用いて室温で 60 分反応させた。この唾液処理したアパタイト(SHA)を, 吸引濾過器(1225 サンプリングマニホールド, Millipore Co.)を用いて, セルロースエステルメンブレンフィルター(0.45 μm, Advantec, Toyo, 大阪)上に吸着させた。メンブレンフィルターを塩化カリウム緩衝液で 3 回洗浄し, 付着していないアパタイト粒子を除去した。この SHA 付着メンブレンに ³[H] チミジンで標識した供試菌の懸濁液を添加し, 1 分間反応させた。塩化カリウム緩衝液で 3 回洗浄した後 SHA に吸着した供試菌の菌量をメンブレンフィルター上の放射活性をシンチレーションカウンター(LKB-Wallac)で測定することにより計測した。MT8148 株の吸着率を 100 % として他の供試菌の割合を計算した。

また, 抗 rGbpC 抗体による抗血清による唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの吸着阻害能の実験を行った。供試菌を加える前に抗 rGbpC 抗体を 10 倍連続希釈し(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), ³[H] チミジンで標識した供試菌体と室温で 1 時間反応させること以外は上記と同じ方法で行った。

4) デキストラン結合能の分析

4. の3)であげた各供試菌のデキストラン結合能を Lis らの方法(1995)で調べた。96 穴マルチタイタープレート(Multi Well Plate for ELISA, スミロン, 住友ベークライト, 東京)の各ウェルに, BHI 培地で 37℃18 時間培養した供試菌体を PBS に懸濁し OD₆₃₀=0.2 としたものを 200 μl ずつ加え, ビオチン標識デキストラン(分子量, 70,000;Sigma)を添加し室温で 10 分間反応させた。蒸留水で 3 回洗浄後, スレプトアビジン・ホースラディッシュペルオキシダーゼ(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を添加し, 混和後室温で 5 分間反応させた。洗浄後発色液を添加し, OD₄₉₀ でその発色を測定することで各菌体へのデキストラン結合能

を判定した.

5. 全身への病原性の分析

1) 50 % 致死量の決定

8 週齢のマウス(JCl/ICR; 日本クレア, 大阪) 120 匹を用いて行った. 供試菌(MT8148R 株, TW295R 株, TW871R 株, TW964R 株, TW1378R 株)は BHI 培地で 37°C, 18 時間培養し, PBS で洗浄後, 連続希釈し菌液を 1×10^7 から 1×10^{10} CFU/ml に調整した. 一供試菌あたり 24 匹(1 希釈菌液あたり 6 匹, 4 群)それぞれの希釈菌液 100 μ l を腹腔内に注射し, 2 週間後に 50 % 致死量を求めた. なお, 菌数の算出は, 段階希釈した菌液を MS 寒天培地(Difco)に播種し, 37°C, 48 時間培養後コロニー数を計算することにより求めた. また, MT8148R 株と TW871R 株については 5 週齢のマウス(JCl/ICR; 日本クレア, 大阪)においても, 50 % 致死量を求めた.

2) ヒト多型核白血球による食作用率の測定

供試菌として TW871 株と MT8148 株および MT8148 株の GbpC を欠失した C1 株を用いた. 各菌体を 37°C, 18 時間培養後 PBS で洗浄し OD₅₅₀=1.0 に調整した後, 健常人より採取した静脈末梢血を等量加え 37°C, 10 分間反応させた後, ギムザ染色を行い, 100 個の多型核白血球のうち食作用を呈しているものの割合を求めた.

3) ラット心内膜損傷モデルの確立

コラーゲン阻害剤である β -aminopropionitrile fumarate (BAPN; Sigma)を用いて, 心内膜に損傷を与えかつ全身への影響を及ぼさないラットモデルの確立のため次の実験を行った. 21 日齢の SD ラット(各群 5 匹, ただし 0.2 % の群 6 匹)に BAPN を 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 および 0 % 混入させた飼料 CE-2(日本クレア)を 3 週間与え飼育した. その期間中の, 体重変化および死亡の有無を観察した. 3 週間後, 体重測定を行った後, エーテル麻酔にて屠殺し, 剖検を行った. また, 心臓を摘出しリン酸緩衝ホルマリンで固定し, 組織切片を作製した. この組織切片を HE 染色もしくはコラーゲン線維を特異的に染め出すエラストイカ・ワンギーソン染色を行い, 組織所見を診査した.

4) ラット心内膜損傷モデルでの血中分離株の病原性の評価

21 日齢の SD ラットを, BAPN 無添加の CE-2 を与える群(30 匹; 1 群 10 匹)と 0.05 % BAPN

添加の CE-2 を与える群 (30 匹; 1 群 10 匹) に分け, それぞれの食餌を与え, 3 週間飼育した. 血中分離株の代表として TW871R 株を, また, 口腔分離株 MT8148R 株のそれぞれを BHI 培地で一晚培養後, 滅菌生理食塩水で 1×10^8 CFU /ml になるように調整し, その 1 ml をエーテル麻酔下にて頸静脈より注射した. その後, 菌体の注射前, 1 日後, 2 日後, 4 日後, 7 日後に採血し, 血中菌数を算出した. また, 残りの血液は 3,000 回転 10 分間遠心し, 上清を -20°C で保存した. これを用いて, 全身の炎症状態を評価する指標として血清シアル酸濃度を経時的に調べた (Stefenelli ら, 1985; Tanahashi ら, 1998). 血清シアル酸濃度は, 極東シアル酸テスト試薬 (極東製薬, 東京) を用いて, 指示書に従って計測した. 7 日後, エーテル麻酔下にて屠殺し, 脾臓を摘出しその重量を測定した. 脾臓重量は体重 (g) 当たりの割合 (%) で表した. また, 摘出し心臓の組織切片の作製をし, コラーゲン線維を特異的に染め出すエラスティカ・ワンギーソン染色を行った.

結果

1. 生物学的性状

表 6 に血液分離した *S. mutans* 4 株の生物学的性状を示す. 血液分離株は 4 株ともコロニーの形態, バシトラシン抵抗性, 血液寒天培地上の溶血性, 糖発酵能, アルギニン分解能, およびデキストラン凝集能は口腔由来の MT8148 株と同じ性質を示した. また, *S. mutans* のう蝕発生と関連性のあるスクロース依存性付着はいずれの菌株も高い値を示したが, TW295 株と TW964 株および TW1378 株で MT8148 株よりも有意に低い値を示した ($P<0.001$). 一方, 菌体疎水性には有意差は認められなかった.

表 6 供試菌の生物学的性状

	M T8148	TW 295	TW 871	TW 964	TW 1378
M S 寒天培地上のコロニー形態	R	R	R	R	R
バシトラシン抵抗性	+	+	+	+	+
溶血性	γ	γ	γ	γ	γ
糖発酵能					
マンニトール	+	+	+	+	+
ソルビトール	+	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+
メリビオース	+	+	+	+	+
アルギニン分解能	—	—	—	—	—
デキストラン凝集能	—	—	—	—	—
スクロース依存性付着率 [平均±標準偏差 (%)]	86.8 ± 2.5	71.4 ± 2.4 ^{***}	85.4 ± 3.1	69.0 ± 2.0 ^{***}	76.0 ± 2.0 ^{***}
菌体疎水性 [平均±標準偏差 (%)]	41.9 ± 5.6	45.1 ± 8.4	53.4 ± 6.3	49.2 ± 3.5	54.2 ± 6.8

* は M T8148 株 と比較して Fisher の PLSD 分析の結果, 有意差があったものを示す (***) $P<0.001$).

R : ラフ型コロニーを示す

さらに, 抗 CA-GTF, 抗 CF-GTF 抗体および抗 PAc 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果, 血中分離 4 株とも MT8148 株と同様に GTF, PAc とも存在することが認められた (図 4).

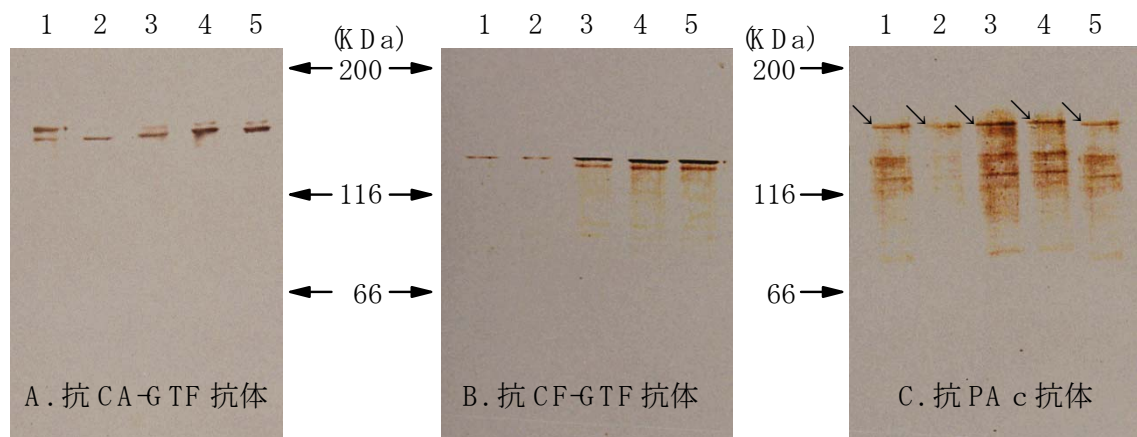


図4 供試菌のGTFとPA cの発現
1. TW 295, 2. TW 871, 3. TW 964, 4. TW 1378, 5. MT 8148

2. 遺伝学的性状

血中分離4株の16SリボソームRNAの配列は、Genbank DNAデータベース上の *S. mutans* NCTC10449株の16SリボソームRNAの配列と完全に一致した。

また、DNA-DNAハイブリダイゼーションの結果、MT8148株の染色体DNAに対する血中分離4株のDNA相同性は、TW871株で最も低く76.3%，ついでTW295株で93.7%であり、TW964株、TW1378株はそれぞれ、111.6%，106.9%を示した。

3. 血清学的性状

TW964株のRR抗原は、*f*型特異的抗血清と反応し、血清型 *f*のOMZ175株のRR抗原と沈降線を形成した(図5)。また、TW1378株のRR抗原は、血清型 *e*のMT4245株のRR抗原と沈降線を形成した。一方、TW295株およびTW871株のRR抗原は、*c*、*e*、*f*型の特異的抗血清とは沈降線を形成せず、また同じミュータンスレンサ球菌である *d*、*g*型の *S. sobrinus*の特異的抗血清とも沈降線を形成せず、両株は既知のものとは異なる血清型を有すると考えられた。

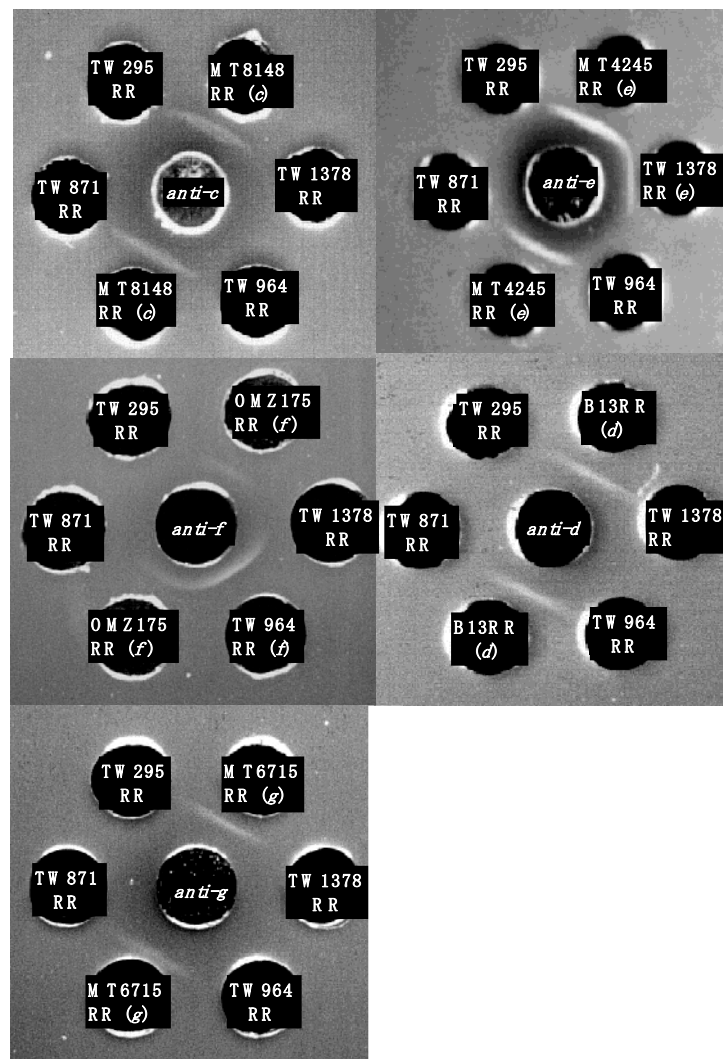


図 5 供試菌の血清学的性状
供試菌から抽出したRR抗原と血清型特異抗血清によるゲル内沈降反応

また、糖分析カラムを用いて血中分離 4 株の表層多糖抗原の糖組成を分析したところ、MT8148 株ではラムノースとグルコースの両方のピークが認められるのに対して、血清型不定の TW295 株ではラムノースのピークは認めるものの、グルコースのピークはほとんど認めなかった(図 6)。

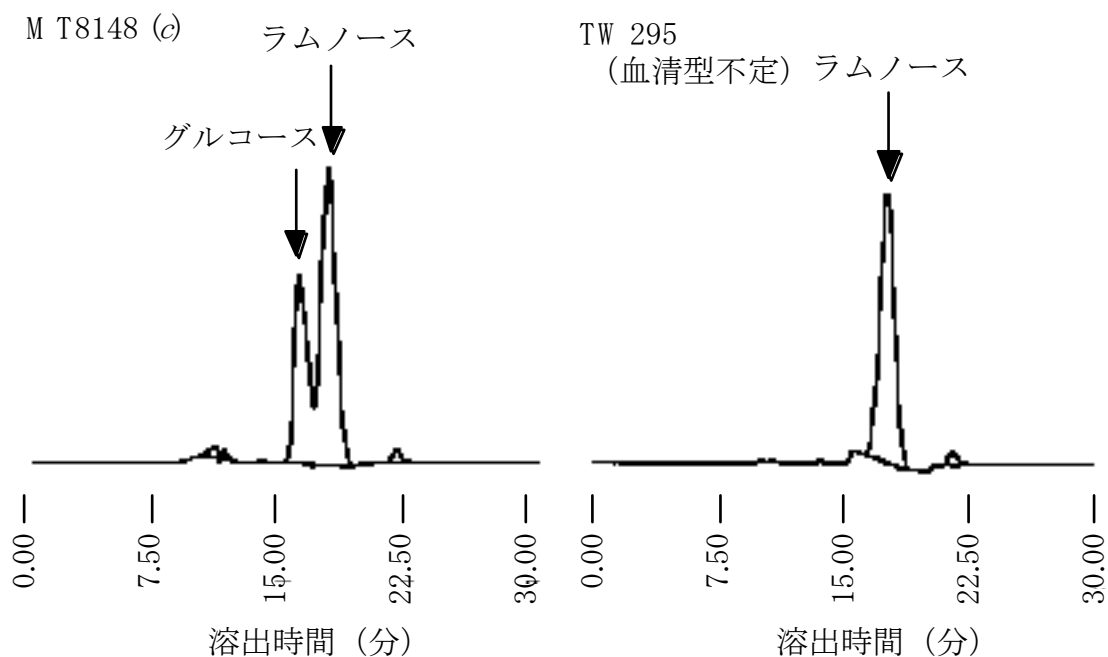


図6 高速液体クロマトグラフィーを用いた糖組成の分析

血清型不定の TW871 株でも同様の傾向が認められたが、血清型の特定できた TW964 株, TW1378 株においては, MT8148 株にみられるのと同じラムノースとグルコースのピークを認めた. そのため, 血液由来株の血清型不定の株の多糖抗原中のグルコース/ラムノース比を計測したところ, 血清型不定の 2 株においてその比率が極めて高く, グルコース量の低下していることが示唆された(表 7).

表 7 血清型特異的多糖抗原におけるラムノース/グルコース比

菌株	血清型	ラムノース / グルコース モル比	
		精製細胞壁	精製多糖抗原
TW 295	不定	13.85	28.33
TW 871	不定	12.25	25.91
TW 964	<i>f</i>	1.99	1.87
TW 1378	<i>e</i>	N.D.	1.80
M T8148	<i>c</i>	1.96	2.57

N.D. 測定を行っていないことを示す.

血清型不定の TW295 株および TW871 株の全菌体を 15 日間毎日耳介静脈より投与する方法により, 図 7 に示すような RR 抗原と沈降線を形成する抗血清を得た. TW295 株の RR 抗原は TW295 株の抗血清および TW871 株の抗血清と fuse する一本の沈降線を形成した. また, TW871 株の抗血清は *c* 型, *e* 型, *f* 型の RR 抗原とは沈降線を形成しなかったが, TW295 株の RR 抗原および TW871 株の RR 抗原と沈降線を形成した. TW295 株の抗血清も TW871 株の抗血清と同様な結果を示した.

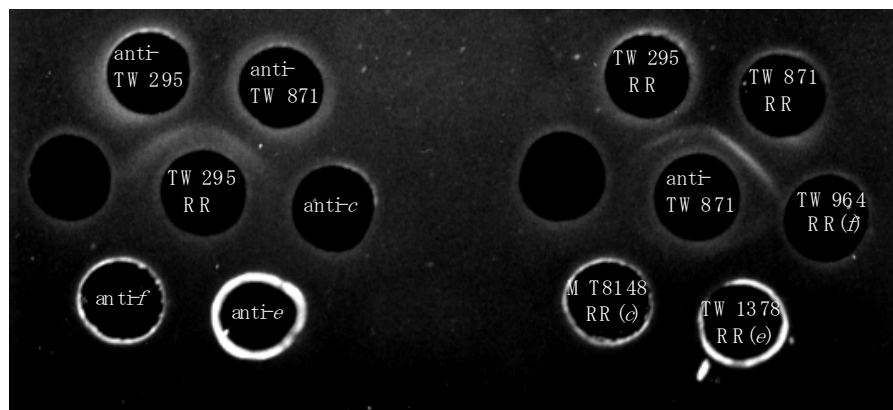


図 7 血清型不定供試菌の血清学的特異性
各 RR 抗原と血清型特異抗血清との反応

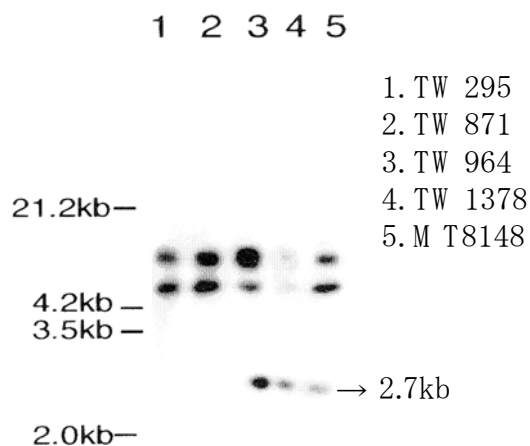


図 8 M T8148 *igpEc* 遺伝子に対するサザンブロッティング

血清型特異多糖抗原の生合成に関する酵素をコードする遺伝子を PCR で分析したところ、ラムノース主骨格の生合成に関与する遺伝子の存在を認めた。しかし、グルコース側鎖の生合成に関与する遺伝子のうち *Hinc* II で処理した *rgpEc* 遺伝子に関しては、MT8148 株の *rgpEc* 遺伝子をプローブとするサザンハイブリダイゼーションの結果、TW964 株、TW1378 株、MT8148 株で認めた 2.7 kb にハイブリダイズするバンドは、血清型不定の TW295 株および TW871 株においては認められなかった(図 8)。

4. ラットにおけるう蝕誘発能

表 8 動物実験における供試菌のう蝕誘発能

接種菌	下顎よりの接種菌の 回収量 (x 10 ⁴ CFU) (平均 ± 標準誤差)	プラークスコア (平均 ± 標準誤差)	う蝕スコア (平均 ± 標準誤差)	
			平滑面う蝕	総う蝕
M T8148R	55.71 ± 12.17	1.13 ± 0.05	21.80 ± 1.97	78.12 ± 3.60
TW 295R	130.25 ± 35.88	0.86 ± 0.06 **	17.13 ± 2.06	60.48 ± 5.68 *
TW 871R	17.56 ± 8.43 *	0.52 ± 0.03 ***	9.40 ± 0.87 ***	39.03 ± 2.47 ***
TW 964R	96.75 ± 22.86	1.12 ± 0.07	21.77 ± 1.76	75.80 ± 4.46
TW 1378R	51.21 ± 18.44	1.59 ± 0.10 ***	29.73 ± 2.18 **	94.08 ± 4.98 *

*FisherのPLSD分析の結果、M T8148R を接種した群との間で有意差があったものを示す。
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

表 8 に血液分離株のラットにおけるう蝕誘発実験の結果を示す。TW295R 株および TW871R 株を感染させた群では MT8148R 株を感染させた群と比較して、う蝕スコアは有意に低下していた(それぞれ $P < 0.05$ および $P < 0.001$)。プラークスコアに関しても、TW295R 株および TW871R 株を感染させた群では、MT8148R 株を感染させた群と比較して有意に低下していた($P < 0.01$ および $P < 0.001$)。また、TW871R を感染させた群では、顎骨からの回収菌量が有意に低下していた($P < 0.001$)。

5. Gbp のう蝕病原性への関与

スクロース依存性付着に関わる GTF と相同性の高い GbpA をコードする *gbpA* 遺伝子の存在を分析するためサザンハイブリダイゼーションを行うと、TW1378 株では *gbpA* 遺伝子の存在が示唆された。しかし、TW295 株、TW871 株および TW964 株では *gbpA* 遺伝子が欠失していた(図 9)。また、スクロース非依存性付着に関わる PAc と相同性の高い GbpC をコードする *gbpC* 遺伝子の存在も同様に分析すると、TW295 株、TW871 株、TW964 株およ

び TW1378 株には *gbpC* 遺伝子の存在することが示唆された (図 10)。

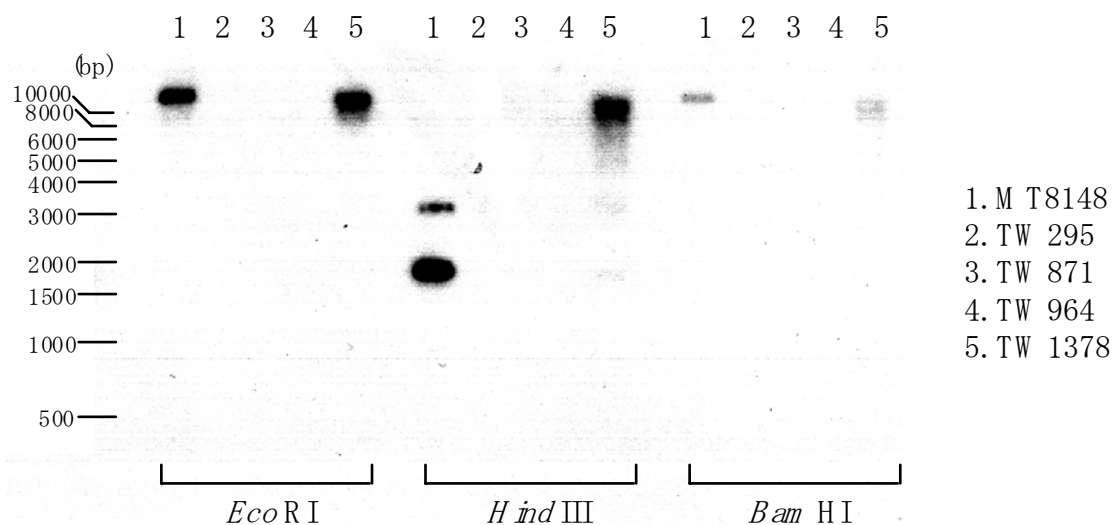


図9 各供試菌のM T8148の*gbpA* に対するサザンハイブリダイゼーション

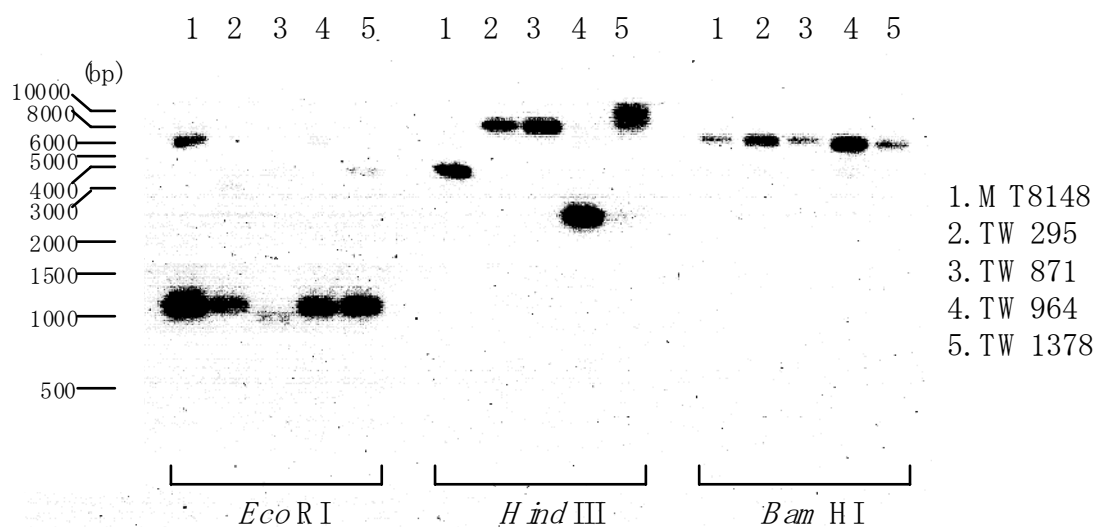


図10 各供試菌のM T8148の*gbpC*に対するサザンハイブリダイゼーション

次に, GbpC の発現を分析するため抗 rGbpC 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行うと, TW964 株および TW1378 株では, 分子量約 63kDa の GbpC の存在することが示唆された. しかし, TW871 株では GbpC は分子量約 59kDa であると推定され, また TW295 株では GbpC の存在が示されなかった (図 11)。

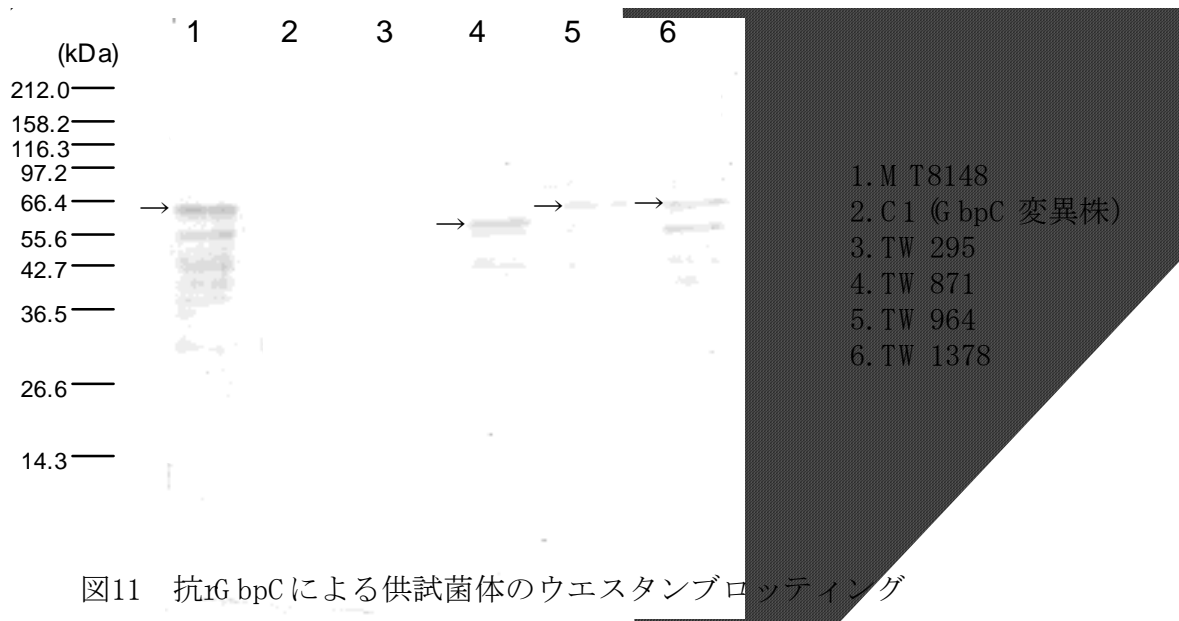


図11 抗rG bpCによる供試菌体のウエスタンブロッティング

そこで, *gbpC* 遺伝子の全配列を特定し, その変異を分析した. その結果, 供試菌すべての *gbpC* 遺伝子のプロモータ領域には変異は存在しなかった. また, TW964 および TW1378 の GbpC の推定構造は対照株と比較し, いくつかのアミノ酸の置換が認められたが, MT8148 株の GbpC と同じ推定構造を呈した. それに対して TW295 株では MT8148 株 GbpC の 323 番目に相当するグルタミン酸残基が終止コドンに変化し 322 アミノ酸残基から構成される Open reading frame1 (ORF1)と, MT8148 株 GbpC の 343 番目に相当するアミノ酸が開始コドンとなり 241 アミノ酸残基からなる ORF2とで構成されることが示唆された. また, TW871 株の GbpC については, C 末端部の 39 アミノ酸が欠落する構造が推定された (図 12, 13).

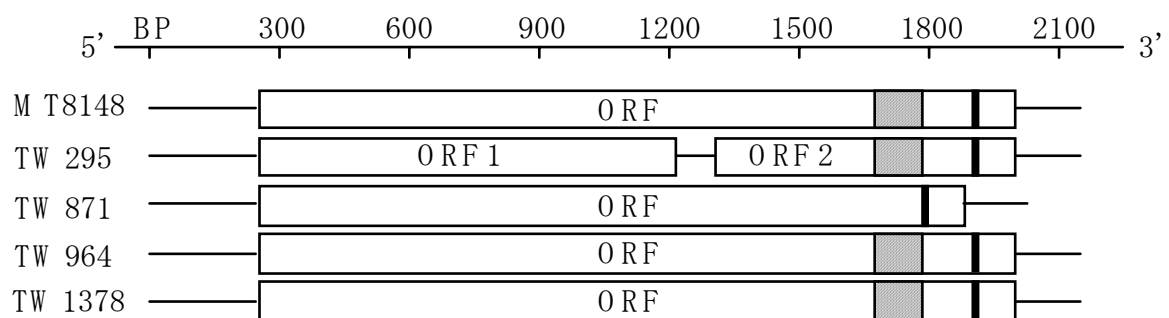


図12 供試菌G bpC の推定構造

■ TW 871株において脱落している 39 アミノ酸の部分 | LPNTG モチーフ

	460	470	480	490	500	510	520
MT8148	WFATNSAVAVPKDPGAKPTPPEKPELKKTPTVTHKNLWETKTEEVPVTPPTTPDEPTPEKPKTPEDPQ						
TW295	WFATNSAVAVPKDPGAKPTPPEKPELKKTPTVTHKNLWETKTEEVPVTPPTTPDEPTPEKPKTPEDPQ						
TW871	WFATNSAVAVPKDPGAKPTPPEKPELKKTPTVTHKNLWETKTEEVPVTPPTTPDEPTPEKPKTPEDPQ						
TW964	WFATNSAVAVPKDPGAKPTPPEKPELKKTPTVTHKNLWETKTEEVPVTPPTTPDEPTPEKPKTPEDPQ						
TW1378	WFATNSAVAVPKDPGAKPTPPEKPELKKTPTVTHKNLWETKTEEVPVTPPTTPDEPTPEKPKTPEDPQ						
	530	540	550	560	570	580	
MT8148	SPVWAKSVSFRTARKCEMRVREFDYQPTLPHTCAAKQNGLATLGAISTAFAAATLI AARKKEN						
TW295	SPVWAKSVSFRTARKCEMRVREFDYQPTLPHTCAAKQNGLATLGAISTAFAAATLI AARKKEN						
TW871	SPVWAKSVSFRTARKCEMRVREFDYQPTLPHTCAAKQNGLATLGAISTAFAAATLI AARKKEN						
TW964	SPVWAKSVSFRTARKCEMRVREFDYQPTLPHTCAAKQNGLATLGAISTAFAAATLI AARKKEN						
TW1378	SPVWAKSVSFRTARKCEMRVREFDYQPTLPHTCAAKQNGLATLGAISTAFAAATLI AARKKEN						

図13 供試菌G bpC の推定アミノ酸配列

■ TW 871株において脱落している 39 アミノ酸の部分 | LPNTG モチーフ

次に、血液分離株の唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの吸着能 (SHA 吸着能) を測定した。TW295R 株, TW964R 株, TW1378R 株の SHA 吸着能はともに MT8148R 株の SHA 吸着能と同等であった。しかし、TW871R 株の SHA 吸着能は MT8148R 株の約 70 % であり、それは MT8148 株の GbpC 欠失変異株 C1 の約 75% と同程度であった ($P < 0.001$ および $P < 0.01$) (図 14)。

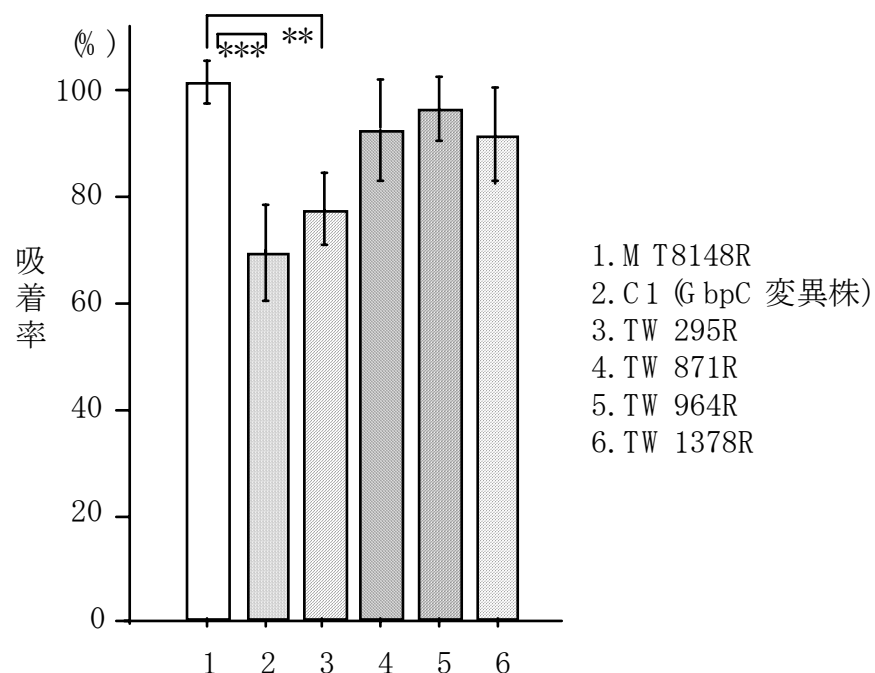


図14 唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの吸着

*FisherのPLSD分析の結果、M T8148R を接種した群との間で有意差があったものを示す。 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

また, 抗 rGbpC 抗体で MT8148R 株を前処理すると SHA への吸着が有意に低下するのが認められた(図 15). 1000 倍に希釈した rGbpC 抗体で MT8148R 株を前処理すると, SHA への吸着能は 40% にまで低下した($P<0.001$). しかし, 1000 倍に希釈した rGbpC 抗体で TW871R 株および GbpC 欠失株を処理しても, rGbpC 抗体で処理しないものとの間に有意差は認められなかった. 一方, TW871R 株および GbpC 欠失株を 100 倍に希釈した rGbpC 抗体で処理すると, SHA 吸着率の有意な低下を認めた($P<0.001$).

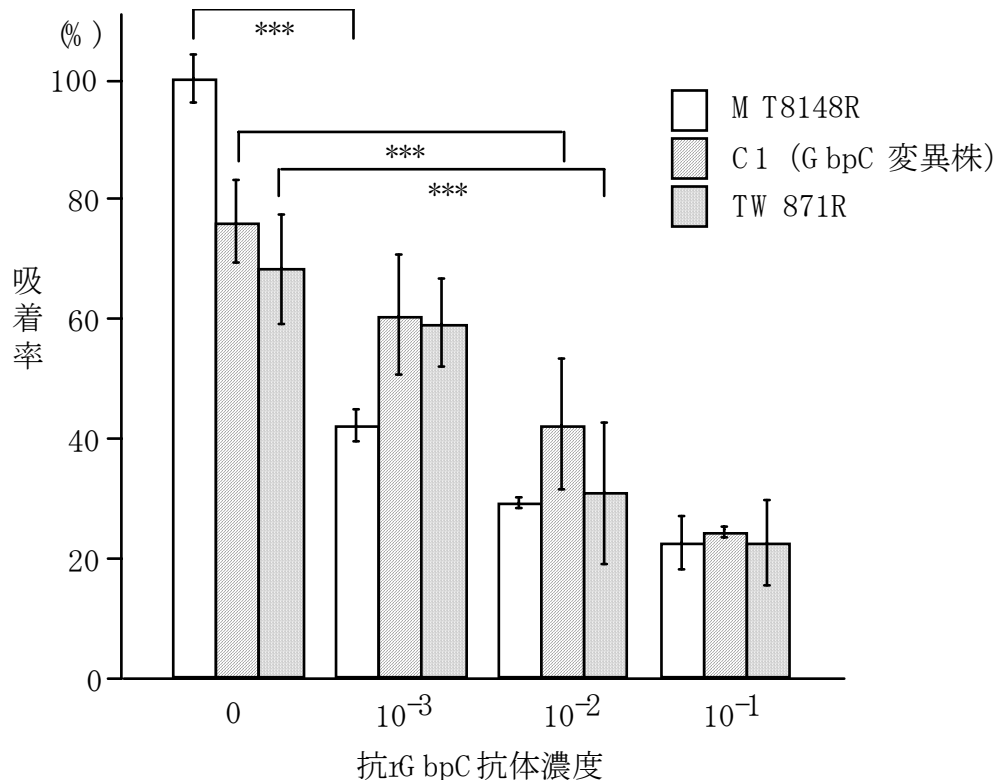


図15 抗rG bpC 抗体による唾液被覆ハイドロキシアパタイト吸着の抑制

*FisherのPLSD分析の結果, M T8148R を接種した群との間で有意差があったものを示す. (***) $P<0.001$

さらに, 各供試菌のデキストラン結合能を調べると, TW295R 株および TW871R 株のデキストラン結合能は MT8148R 株と比較すると有意に低い値を示した($P<0.001$) (図 16). GbpC 欠失変異株 C1 のデキストラン凝集能は TW295R 株や TW871 株と同程度であった. また, GbpA の欠失する TW964R 株でも低い値を示したが($P<0.01$), Gbp の欠失しない TW1378R 株では MT8148R 株と同等な結合能を有していた.

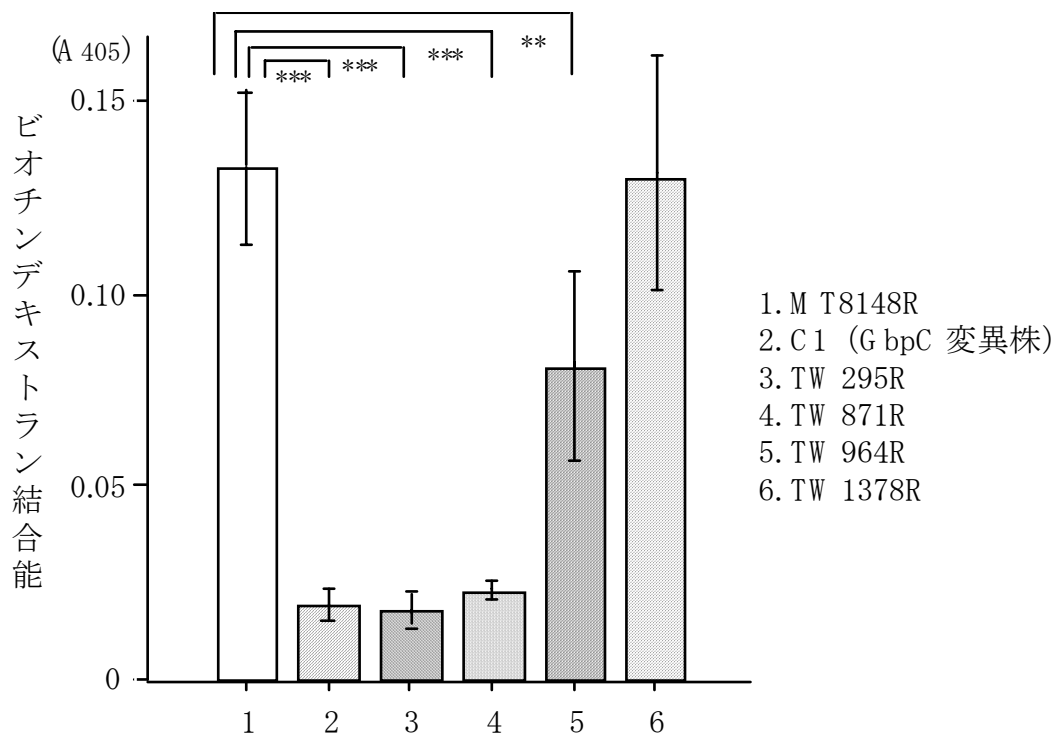


図16 デキストラン結合能

*FisherのPLSD分析の結果，M T8148R を接種した群との間で有意差があったものを示す． (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

6. 全身への病原性の評価

1) 50 % 致死量

表9 マウスにおける50% 致死量

菌株	8 週齢	5 週齢
M T8148R	9.5×10^9	3.2×10^9
TW 295R	9.0×10^9	N.D.
TW 871R	9.5×10^9	9.0×10^8
TW 964R	8.3×10^9	N.D.
TW 1378R	1.0×10^{10}	N.D.

N.D. 測定を行っていないことを示す.

表9 にマウスでの供試菌の 50 % 致死量の値を示す. 8 週齢のマウスで血中分離株 4 株と口腔分離株である MT8148 の 50 % 致死量に明確な差は認めなかった. しかし, TW871 株と MT8148 株を, 5 週齢のマウスで比較すると, 50 %致死量は MT8148 株では約 1/3, TW871 株では約 1/10 ほど低下した.

2) ヒト多型核白血球による食作用率

TW871 株の食作用率は $72.5 \pm 2.6\%$ で、MT8148 株の食作用率の $91.0 \pm 2.8\%$ より有意に低かった ($P < 0.001$)。また、GbpC 欠失株 (C1) の食作用率は $58.4 \pm 0.8\%$ で、これは親株の phagocytosis 率の $90.0 \pm 2.5\%$ と比較して有意に低い値を示した ($P < 0.001$)。

7. 心内膜炎モデル動物での全身への病原性

表 10 各種 BAPN 濃度の全身的・局所的影響

BAPN 濃度 (%)	死亡数/ 総数	体重 [平均 ± 標準偏差 (g)]	剖検所見	組織学的所見
0.2	4/6	153.8 ± 8.9 ***	胸椎・後肢の湾曲 鼻腔出血 腹水多量 左心室壁の白色化 肋骨の形成異常	解離性動脈瘤 内弾性板の断裂 炎症細胞浸潤
0.1	1/5	191.6 ± 6.3 ***	静脈系の腫脹 胸椎の湾曲	内弾性板の断裂 中膜の一部弾性板の断裂
0.05	0/5	220.2 ± 6.7	特になし	内膜の肥厚 限局性の不規則に配列する細線維
0.025	0/5	234.0 ± 15.3	特になし	特になし
0	0/5	224.0 ± 8.9	特になし	特になし

* 0 % の群と比較して Fisher の PLSD 分析の結果、有意差があったものを示す (*** $P < 0.001$)。

表 10 に 21 日齢から 3 週間各 BAPN 濃度を含む飼料で飼育したラットの、死亡数、生存ラットの 3 週間後の平均体重、剖検所見および組織学的所見の要約を示す。0.2 % BAPN 添加群では屠殺日までに 6 匹中 4 匹が死亡し、生存したものの体重も BAPN を添加しない群の約 70 % であった。組織学的には図 17-A の矢印部に示すように、内弾性板の断裂が認められ、解離性動脈瘤の所見を示した。0.1 % 添加群においては屠殺日までに死亡したのは 1 匹で、全身的、局所的影響も 0.2 % の群ほど重篤ではなかった。図 17-B の矢印部に示すように組織学的所見は内弾性板の断裂および中膜の一部弾性板の断裂を認めた。0.05 % および 0.025 % 添加群においては、屠殺日まで死亡したものはなく、平均体重も BAPN 非添加群との間に有意な差を認めなかった。0.025 % 添加群においては心臓組織像に異常所見は認められなかったが、0.05 % 添加群においては大動脈起始部に限局した、不規則な細線維と内膜の腫脹を認めた (図 17-C 矢印部)。これらの所見から、0.05 % を BAPN によるラット心内膜炎モデルの至適濃度とした。

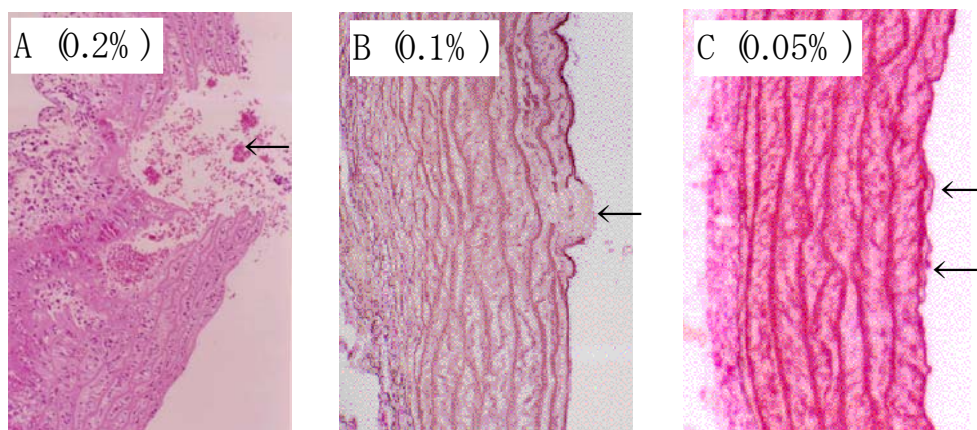


図17 各種 BAPN 濃度が心内膜に及ぼす影響

表 11 供試菌注射後の血中からの回収量と屠殺時の脾臓重量

食餌	供試菌	頸静脈からの供試菌の回収量 [平均 ± 標準誤差 (CFU / mL)]			7 日後の脾臓 重量比 [平均 ± 標準誤差]
		1 日後	2 日後	4 日後	
CE-2 のみ	-	0	0	0	0.40 ± 0.02
	M T8148R	9.0 ± 3.8 (5)	0	0	0.45 ± 0.02
	TW 871R	9.0 ± 2.3 (6)	2.0 ± 1.3 (2)	0	0.50 ± 0.02
CE-2+ 0.05% BAPN	-	0	*** 0	0	0.40 ± 0.03
	M T8148R	20.0 ± 7.2 (8)	*** 0	0	0.43 ± 0.02
	TW 871R	78.0 ± 19.9 (10)	*** 10.0 ± 3.3 (5)	1.0 ± 1.0 (1)	0.52 ± 0.03

() 内の数字は10匹中供試菌の回収されたラットの数を示す.

* FisherのPLSD分析の結果有意差があったものを示す (***) $P < 0.001$).

表 11 に 0.05 % BAPN 添加あるいは非添加した飼料をラットに与え, MT8148R 株あるいは TW871R 株を頸静脈より感染させた時の血中からの供試菌の回収量および屠殺時の脾臓重量を示す. MT8148R を感染させた群では BAPN 非添加群も添加群も 1 日後でのみ供試菌が回収された. BAPN 添加群の方が回収された個体数も菌量も多い傾向はあったものの, 有意差は認めなかった. 一方, TW871R を注射した群においては, BAPN 非添加群と比較して BAPN 添加群では明らかに多くの個体から長期間供試菌は回収され, BAPN 添加群では 4 日目まで菌が回収された. また, BAPN 添加群ラットでは 1 日後は全ての個体から菌は回収され, その回収菌量は BAPN 非添加群よりも有意に高い値を示した ($P < 0.001$). また, BAPN 添加群における TW871R 感染群の 1 日後の回収菌量は MT8148R 感染群よりも明らかに高い値を示した ($P < 0.001$). また, 体重に対する脾臓重量も BAPN 非添加群

においては、TW871R 感染群が最大値を示し、非感染群との間に有意な差を認めたが ($P<0.001$)、MT8148R 感染群との間に有意な差は認めなかった。一方、BAPN 添加群においては、TW871R 感染群が最大値を示し、PBS 投与群だけではなく ($P<0.001$)、MT8148R 感染群との間においても有意な差を示した ($P<0.001$)。

表 12 供試菌投与後の血清シアル酸濃度の経時的変化

食餌	供試菌	血清シアル酸濃度 [平均 ± 標準誤差 (μg/dL)]				
		投与前	1 日後	2 日後	4 日後	7 日後
CE-2 のみ	-	98.4 ± 3.9	102.0 ± 4.9	101.9 ± 1.9	102.3 ± 4.8	100.7 ± 4.7
	M T8148R	95.2 ± 1.5	123.2 ± 2.6***	115.0 ± 1.8***	111.4 ± 4.1***	111.2 ± 3.7***
	TW 871R	97.2 ± 1.2	123.0 ± 3.1***	116.2 ± 4.1***	117.6 ± 2.4***	116.5 ± 2.8***
CE-2+ 0.05% BAPN	-	98.2 ± 2.9	105.3 ± 2.8	102.6 ± 2.3	105.4 ± 3.1	107.9 ± 1.6
	M T8148R	101.9 ± 2.8	121.8 ± 4.2***	116.8 ± 3.9***	115.6 ± 3.3**	113.8 ± 2.2**
	TW 871R	96.7 ± 2.3	143.2 ± 3.8####	128.6 ± 3.7###	126.9 ± 2.6##	128.4 ± 4.1###

* 菌体投与前と比較してFisherのPLSD分析の結果、有意差があったものを示す
(** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

BAPN 非添加群と比較してFisherのPLSD分析の結果、有意差があったものを示す
(# $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$)。

表 12 に供試菌注射後の、血清シアル酸濃度の経時的変化を示す。MT8148R 株および TW871R 株を感染させた群では感染前と比較して、1 日後、2 日後、4 日後および 7 日後のすべてにおいて有意に高い値を示した。さらに、TW871R 株を感染させた群において、BAPN 非添加群と添加群では有意に高い値を示した (1 日後、2 日後、4 日後、7 日後でそれぞれ $P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$)。BAPN 非添加群においては、MT8148R を感染させた群と TW871R を感染させた群との間ではほとんど差は認められなかったものの、BAPN 投与群では、TW871R 感染群の値は MT8148R 感染群の値と比較して、有意に高い値を示した (1 日後、2 日後、4 日後、7 日後でそれぞれ $P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$)。

図 18 に供試菌投与 1 週間後の摘出した心臓組織をエラスティカ・ワンギーソン染色したものを示した。A に非感染で PBS を注射した対照群を、B および C にそれぞれ MT8148R および TW871R を感染させた群のラット心臓の大動脈弁起始部付近の組織像を示した。菌体を注射した群ではどちらも心内膜表面に変化を認め、その程度を比較すると TW871R 株を感染させた群の方が、MT8148R を感染させた群より明瞭な病変の形成を認めた。

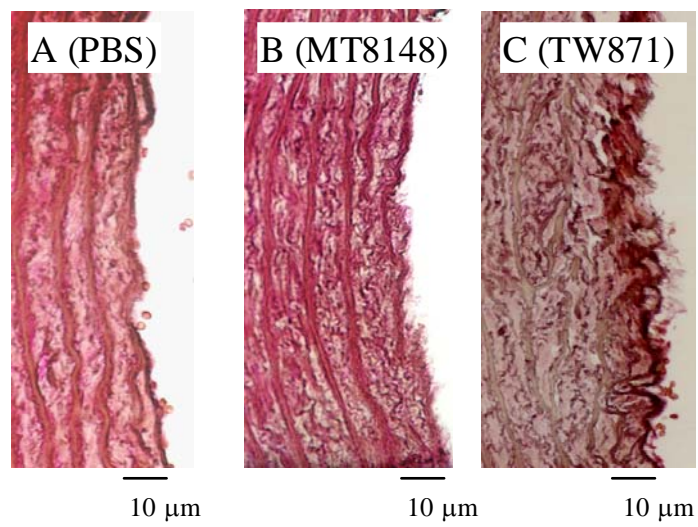


図18 供試菌投与 1 週間後の心内膜組織像

考察

S. mutans は血清型特異多糖抗原の構造から *c*, *e*, *f* 型に分類されるが、日本人小児から検出される *S. mutans* においてはその 80 % 以上が *c* 型であるとされている (Hamada と Slade, 1980). それに対して, IE 患者血液より分離された本研究の供試菌 4 株はどれも *c* 型には分類されなかった (図 5). さらに, そのうち 2 株は分類不能でさえあった. DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果から, この血清型不定の 2 株は MT8148 株の染色体 DNA に対する相同性が低く, 血清型特異多糖抗原以外にも病原因子に関連する表層構造に変異が生じていることが考えられた. そこで, IE 患者血液より分離された *S. mutans* のう蝕原性をラット実験う蝕系で調べたところ, 血清型の決定できない TW295 株および TW871 株のう蝕誘発能が血清型 *c* の標準株として使用している MT8148 株よりも有意に低いことが明らかになった (表 8). TW295 株および TW871 株では, *S. mutans* のう蝕原性への主要な因子とされる GTF および PAc には変異が生じていなかった (図 4). しかし, Gbp に関して細かく検討すると *gbpA* 遺伝子の欠失と *gbpC* 遺伝子の変異が示唆された (図 9, 10, 11). GbpA は GTF と相同性の高いことからスクロース依存性付着に関与すると考えられている. Russell ら (1985) は, *gbpA* を挿入失活させた変異株ではスクロース依存性付着能が低下するとしている. しかし, 本研究で用いた *gbpA* 遺伝子の存在しない TW295 株および TW964 株ではスクロース依存性付着能が低下したが, 同じく *gbpA* 遺伝子の存在しない TW871 株ではスクロース依存性付着能の低下は認められなかった (表 6). *gbpA* に関しては, ラットを用いたう蝕誘発実験において, それを挿入失活した株のう蝕原性が減少するどころか上昇したとの報告もある (Hazlett ら, 1998). これらのことから, GbpA 単独がう蝕原性に関与するのではなく, 他の要因も複雑に関わっていることが考えられた.

GbpC は PAc と高い相同性を有する表層タンパクの一つである (Sato ら, 1997). PAc がスクロース非依存性付着に関与することから (Okahashi ら, 1989; Koga ら, 1990), GbpC も同様な性質を持っていることが考えられた. 実際, GbpC を欠失させた株では唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの付着率が低下し, それは GbpC の変異している TW871 株と同程度であった (図 14). また, rGbpC 抗体を用いて菌体を前処理すると, 唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの吸着を阻害した (図 15). さらに, ラットう蝕誘発実験においても, TW871 株を感染させた群の顎骨からの回収菌量は著しく低下していた (表 8). しかし, GbpC の変異している TW295 株については唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの付着率の低下は認めず, ラットう蝕誘発実験においても顎骨からの回収菌量の低下は認めなかった (表 8, 図 14). これらの株

の *gbpC* 遺伝子配列から, TW871 株の GbpC は C 末端側の 39 アミノ酸が欠失しているのに対して, TW295 株では 2 つの ORF からなり 2 量体を形成していると推定された (図 12, 13). TW295 株と TW871 株ではともに標準株と異なる GbpC を有していると推定されたが, TW871 株の唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの付着率には有意な低下を認めたのに対して, TW295 株では付着率に低下を認めなかった. これは, TW295 株の ORF2 の領域が唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの付着率に関与している可能性があることを示唆している. また, 歯面への初期付着には PAc および GbpC 以外の他の要因も関与しているからとも考えられる. また, GbpC の変異している TW295 株および TW871 株において, 著しいデキストラン結合能の低下を認め, これは GbpC 欠失株と同程度であった (図 16). これらの結果は, GbpC は歯面への初期付着と同時にグルカン結合にも関係していることが考えられた. さらに, TW295 株と TW871 株の GbpC の推定構造から考えると, N 末端側にグルカン結合に関係する領域が存在し, C 末端側に歯面への初期付着に関係する領域が存在している可能性が示唆された.

S. mutans の血清型特異多糖抗原は, ラムノースポリマーからなる主骨格にグルコースポリマーからなる側鎖が結合している. しかし, IE 患者血液より分離された血清型分類不能の供試菌 2 株では血清型特異多糖抗原はグルコース側鎖の量が著しく低下していた (表 7, 図 6). また, 抗血清も通常の方法では得られず, 供試菌を合計 15 回静脈内に投与することでようやく得られた (図 7). これは, 血清型特異多糖抗原の抗原性が著しく低下していることに起因すると考えられる. そして, その抗原性の低下が多型核白血球による食作用の低下につながり, 血中に長期間存在できる可能性が考えられた. 実際, グルコース側鎖の欠如している TW871 株は MT8148 株よりも食作用を受けにくかった. 一方, 血清型特異多糖抗原を挿入失活した株は, リポタイコ酸が露出して疎水性が上昇し, 食作用を受けやすくなるという報告がある (Tsuda ら, 2000). ただ, この報告では血清型多糖抗原自体を欠失した株で分析しているが, 本研究の供試菌 TW295 株および TW871 株ではラムノースからなる主骨格は存在しているため, リポタイコ酸が露出していない可能性があり, 多型核白血球による食作用の低下につながっていないのではないかと考えられる. これらのことより, ラムノース主骨格が存在するがグルコース側鎖を欠く血清型特異多糖抗原の構造をとる株は, 免疫機構を逃れ血中に長期間存在できる可能性が示唆された.

これまで, IE 患者の血清 IgG 抗体が調べられ, PAc に対する抗体価が高いことがわかっている (Russell ら, 1992). さらに, その後クローニングされ遺伝子配列が決定した GbpC に対する唾液中の IgA および血清 IgG の抗体価は PAc に対するものよりもさらに高いという

報告がある (Chia ら, 2000). このことは, GbpC の変異している TW295 株および TW871 株では生体での免疫応答が低下している可能性があることを示唆している. 実際, 静脈内に TW871R 株を注射したラットからは MT8148R 株を注射したラットからよりも, 血液から多量にかつ長期間に投与菌が回収された (表 11). また, GbpC 欠失変異株は食作用を受けにくく, 血管内に注射した時, その親株 MT8148R 株よりも血中に長く存在することが明らかになった. これらのことは, 血清型特異多糖抗原や GbpC が全身への病原性に関与することを示唆していると考えられる.

IE は菌血症が生じるだけではなく, 血中に侵入した菌が損傷している心内膜に付着することによってはじめて成立する病態と考えられている (Freedman, 1987). そのため, 従来は頸静脈からカテーテルを挿入し, 人工的に弁損傷を惹起する動物モデルが用いられてきた (Munro と Macrina, 1993; Carbon 1994; Contrepolis, 1995; Ryd ら, 1996; Kitten ら, 2000). しかし, 以前から術式自体あるいは得られる結果のばらつきなど, このモデルの問題点は指摘されてきた. そこで, カテーテルを用いたモデルの技術的な難しさおよび得られる結果の統計学的信頼性における問題点から, 技術的に簡便でかつ得られる結果にばらつきの少ないモデルを考案することの重要性が考えられた. また, これまでは疣贅の形成のみが重要視され, 屠殺した動物の心臓の病理組織の分析を行い疣贅の形成を観察しているにすぎず, 菌体投与後の全身状態の経時的变化は議論されてきていない. これらのことから, 本研究では, 薬物を飼料に混入し, 心内膜の損傷を人工的に誘発し, かつ経時的に動物の全身状態を評価できるモデルの確立を目指した. 薬物には, コラーゲン形成に関わる酵素を特異的に阻害し (Pasquali-Ronchetti ら, 1981; Tang ら, 1983; Eyre ら, 1984), 気腫 (Blank ら, 1988), 解離性動脈瘤 (Nakashima と Sueishi, 1992; Huffman ら, 2000) や大脳動脈瘤 (Contrad と Osborne-Pellegrin, 1997) の研究に用いられてきた BAPN を応用することを考えた. BAPN のみの効果を評価する実験から, 0.05 % BAPN を食餌中に混ぜて 3 週間飼育するという簡便な方法で, 心内膜の人工的損傷を作り出すことができた. BAPN を混入しない普通飼料で飼育した動物も, 菌体を投与し病原性を比較したが, 血中分離株が口腔分離株よりも病原性が強いことが明確に示せなかった. それに対し, 0.05% BAPN を混入したラットでの結果は, 血中分離株の病原性の強さを明確に示していた (表 11, 表 12, 図 18). ただ, 本モデルの問題点として, BAPN を飼料中に混入するのでは, 心内膜の人工的損傷を作り出す BAPN の摂取量を明確にできないということがある. そこで, 様々な濃度の BAPN を腹腔内投与したが, 0.05 % 含有飼料を与えたときのようなモデルを作り出すことができなかった. IE は心疾患をもつリスク患者で問題となってくる疾

患であるから、心内膜の人工的損傷を作り出すため、本研究で確立した 0.05 % BAPN 含有飼料を与える動物モデルは、リスク患者の心臓の状態を反映するモデルとなりえると考えられる。今後、IE に関連する様々な病原因子の解析にこのモデルを適用することは有用であろう。

結論

感染性心内膜炎患者血液より分離された *S. mutans* の様々な性質を調べ、その病原性を口腔分離株と比較検討し、次の結果が得られた。

- (1) 心内膜炎患者血液より分離された2株は血清型が不定で、それらの血清型特異多糖抗原はラムノース骨格に付着するグルコース側鎖が著しく低下していた。
- (2) その2株は菌体表層グルカン結合タンパクの一つ (GbpC) が変異し、歯面への付着能が低下することによって、う蝕誘発能が著しく低下していた。
- (3) 心内膜を人工的に損傷させたラットの血中に血中分離株を投与すると、口腔分離株を投与したものに対して、有意に高い病原性を示した。

以上の結果は、*S. mutans* の血中分離株が、表層多糖抗原やタンパク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、全身への病原性にも影響している可能性が高いことを示唆している。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇意なる御指導を賜った大阪大学名誉教授
祖父江鎮雄 先生に心から謝意を表します。本研究を進めるにあたり、終始様々な御指導
と御教授および御校閲をいただいた大阪大学大学院歯学研究科分子病態口腔科学専攻
口腔分子感染制御学講座 大嶋 隆 教授，浜田 茂幸 教授ならびに長崎大学医歯薬
統合研究科 藤原 卓 教授に厚く御礼申し上げます。

また、動物モデルの確立に対し、技術的なご指導を賜りました国立循環器病センター 寺
本 昇 先生に厚く感謝致します。最後に、終始研究に対し、御援助、御助力いただいた大
阪大学大学院歯学研究科分子病態口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座の皆様に厚
く御礼申し上げます。

文献

- 雨宮武彦. 1991. 感染性心内膜炎 最新内科学体系 37 循環器疾患9 弁膜症, 感染性心内膜炎 (井村裕夫, 尾形悦郎, 高久史麿, 垂井清一郎編), 中山書店, 東京: 369-389.
- Aoki, H., T. Shiroza, M. Hayakawa, S. Sato, and H. K. Kuramitsu.** 1986. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. Infect. Immun. 53:583-594.
- Banas, J. A., R. R. B. Russell, and J. J. Ferretti.** 1990. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. Infect. Immun. 58:667-673.
- Benabdelmoumene, S., S. Dumont, C. Petit, P. Poindron, D. Wachsmann, and J. P. Klein.** 1991. Activation of human monocytes by *Streptococcus mutans* serotype f polysaccharide: immnoglobulin G Fc receptor expression and tumor necrosis factor and interleukin-1 production. Infect. Immun. 59:3261-3266.
- Bentley, R.W., J. A. Leigh, and M. D. Collins.** 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:487-494.
- Blank, J., J. E. Glasgow, G. G. Pietra, L. Burdette, and G. Weinbaum.** 1988. Nitrogen-dioxide-induced emphysema in rats. Lack of worsening by β -aminopropionitrile treatment. Am. Rev. Respir. Dis. 137:376-379.
- Carbon, C.** 1994. Animal models of endocarditis. Int. J. Biomed. Comput. 36:59-67.
- Chia, J. S., W. C. Chang, C. S. Yang, and J. Y. Chen.** 2000. Salivary and serum antibody response to *Streptococcus mutans* antigens in humans. Oral. Microbiol. Immunol. 15:131-138.
- Contrepolis, A.** 1995. Notes on the early history of infective endocarditis and the development of an experimental model. Clin. Infect. Dis. 20:461-466.
- Coutard, M., and M. Osborne-Pellegrin.** 1997. Genetic susceptibility to experimental cerebral aneurysm formation in the rat. Stroke 28:1035-1042.
- Curtiss, R. III.** 1985 Genetic analysis of *Streptococcus mutans* virulence. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 118:253-277.

- Douglas, C. W., J. Heath, K. K. Hampton, and F. E. Preston.** 1993. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.* 39:179-182.
- Eyre, D.R., Paz, M.A., Gallop, P.M.** 1984. Cross-linking in collagen and elastin. *Annu. Rev. Biochem.* 53:717-748.
- Freedman, L. R.** 1987. The pathogenesis of infective endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* 20:Suppl A:1-6.
- Hamada, S., and H. D. Slade.** 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44:331-384.
- Hamada, S., and M. Torii.** 1978. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect. Immun.* 20:592-599.
- Hamada, S., M. Torii, S. Kotani, and Y. Tsuchitani.** 1981. Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interaction of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Infect. Immun.* 32:364-372.
- Hanada, N., and H. K. Kuramitsu.** 1988. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* *gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect. Immun.* 56:1999-2005.
- Hanada, N., and H. K. Kuramitsu.** 1989. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* *gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infect. Immun.* 57:2079-2085.
- Hazlett, K. R., S. M. Michalek, and J. A. Banas.** 1998. Inactivation of the *gbpA* gene of *Streptococcus mutans* increases virulence and promotes *in vivo* accumulation of recombinations between the glucosyltransferase B and C genes. *Infect. Immun.* 66:2180-2185.
- Huffman, M. D., J. A. Curci, G. Moore, B. Kerns, B. C. Starcher, and R. W. Thompson.** 2000. Functional importance of connective tissue repair during the development of experimental abdominal aortic aneurysm. *Surgery* 128:429-38.
- Kitten, T., C. L. Munro, S. M. Michalek, and F. L. Macrina.** 2000. Genetic characterization of a *Streptococcus mutans* LraI family operon and role in virulence. *Infect. Immun.* 68:4441-4451.
- Koga, T., N. Okahashi, I. Takahashi, T. Kanamoto, H. Asakawa, and M. Iwaki.** 1990.

- Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype *c*. Infect Immun 58:289-296.
- Kuramitsu, H. K., and L. Wandrack.** 1983. Insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans* serotype *c* strains. Infect. Immun. 42:763-770.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lis, M., T. Shiroza, and H. K. Kuramitsu.** 1995. Role of the C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. Appl Environ. Microbiol. 61:2040-2042
- Matsumoto, M., T. Minami, H. Sasaki, S. Sobue, S. Hamada, and T. Ooshima.** 1999. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. Caries. Res. 33:441-445.
- Mattos-Graner, R. O., S. Jin, W. F. King, T. Chen, D. J. Smith, and M. J. Duncan.** 2001. Cloning of *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. Infect. Immun. 69:6931-6941.
- Mukasa, H., H. Tsumori, and A. Shimamura.** 1985. Isolation and characterization of an extracellular glucosyltransferase synthesizing insoluble glucan from *Streptococcus mutans* serotype *c*. Infect. Immun. 49: 790-796.
- Munro C. L., and F. L. Macrina.** 1993. Sucrose-derived exopolysaccharides of *Streptococcus mutans* V403 contribute to infectivity in endocarditis. Mol. Microbiol. 8:133-142.
- Nakashima, Y., and K. Sueishi.** 1992. Alteration of elastic architecture in the lathyrus rat aorta implies the pathogenesis of aortic dissecting aneurysm. Am. J. Pathol. 140:959-969.
- Okahashi, N., T. Koga, H. Akada, and S. Hamada.** 1983. Purification and immunochemical characterization of *Streptococcus sanguis* serotype I carbohydrate antigen. Infect. Immun. 39:552-558.
- Okahashi, N., C. Sasakawa, M. Yoshikawa, S. Hamada, and T. Koga.** 1989. Cloning of a

- surface protein antigen gene from serotype *c* *Streptococcus mutans*. Mol. Microbiol. 3:221-228.
- Ooshima, T., S. Sobue, S. Hamada, and S. Kotani.** 1981. Susceptibility of rats, hamsters, and mice to carious infection by *Streptococcus mutans* serotype *c* and *d* organism. J. Dent. Res. 60:855-859.
- Ouchterlony, O.** 1968. The techniques of double diffusion in two demensions. In O. Ouchterlony (ed.) Handbook of immnodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor Science Publishers, Michigan, pp. 31-32.
- Pasquali-Ronchetti, I., C. Fornieri, I. Castellani, G. M. Bressan, and D. Volpin.** 1981. Alteration of the connective tissue components induced by β -aminopropionitrile. Exp. Mol. Pathol. 35:42-56.
- Rantz, L. A., and E. Randall.** 1955. Use of autoclaved extract of hemolytic streptococci for serological grouping. Stanford Med. Bull. 13:290-291
- Regolati, B., and P. Hotz.** 1972. Cariostatic effect of glycerophosphate. Helv. Odontol. Acta. 16:13-18.
- Rosenberg, M., D. Gutnick, and E. Rosenberg.** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbon: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol. Lett. 9:29-33.
- Russell, M. W., H. Y. Wu, P. L. White, M. Kilian, and J. Henrichsen.** 1992. Serum antibody responses to *Streptococcus mutans* antigens in human systemically infected with oral streptococci. Oral Microbiol. Immunol. 7:321-325.
- Russell, R. R. B., D. Coleman, and G. Dougan.** 1985. Expression of a gene for glucan-binding protein from *Streptococcus mutans* in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 131:295-299.
- Ryd, M., T. Schennings, M. Flock, A. Heimdahl, and J. I. Flock.** 1996. *Streptococcus mutans* major adhesion surface protein, P1 (I/II), does not contribute to attachment to valvular vegetations or to the development of endocarditis in a rat model. Arch. Oral. Biol. 41:999-1002.
- Sato, Y., Y. Yamamoto, and H. Kizaki.** 1997. Cloning and sequence analysis of the *gbpC*

- gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 65:668-675.
- Seymour, R. A., R. Lowry, J. M. Whitworth, and M. V. Martin.** 2000. Infective endocarditis, dentistry and antibiotic prophylaxis; time for a rethink? Br. Dent. J. 189:610-616.
- Smith, D. J., H. Akita, W. F. King, and M. A. Taubman.** 1994. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 62:2545-2552.
- Soell, M., E. Lett, F. Holveck, M. Scholler, D. Wachsmann, and J. P. Klein.** 1995. Activation of human monocytes by streptococcal rhamnose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan binding protein inhibits TNF- α release. J. Immunol. 154:851-860.
- Stefnelli, N., H. Klotz, A. Engel, and P. Bauer.** 1985. Serum sialic acid in malignant tumors, bacterial infections, and chronic liver diseases. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 109:55-59.
- Tanahashi, M., Y. Funada, M. Itoh, N. Kawabe, and T. Nakadate-Matsushita.** 1998. Inhibitory effects of TRK-530 on rat adjuvant arthritis. Pharmacology 56:242-251.
- Tang, S. S., P. C. Trackman, and H. M. Kagan.** 1983. Reaction of aortic lysyl oxidase with β -aminopropionitrile. J. Biol. Chem. 258:4331-4338.
- Tsuda, H., Y. Yamashita, K. Toyoshima, N. Yamaguchi, T. Oho, Y. Nakano, K. Nagata, and T. Koga.** 2000. Role of serotype-specific polysaccharide in the resistance of *Streptococcus mutans* phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 68:644-650.
- Tsukioka, Y., Y. Yamashita, Y. Nakano, T. Oho, and T. Koga.** 1997a. Identification of a fourth gene involved in dTDP-rhamnose synthesis in *Streptococcus mutans* J. Bacteriol. 179: 4411-4414.
- Tsukioka, Y., Y. Yamashita, T. Oho, Y. Nakano, and T. Koga.** 1997b. Biological function of dTDP-rhamnose synthesis pathway in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 179: 1126-1134.
- Ullman, R.F., S. J. Miller, M. J. Strampfer, and B. A. Cunha.** 1988. *Streptococcus mutans*

- endocarditis: report of three cases and review of the literature. *Heart Lung* 17:209-212.
- Van Handel, E.** 1967. Determination of fructose and fructose-yielding carbohydrates with cold anthrone. *Anal. Biochem.* 19:193-194.
- Vose, J. M., P. W. Smith, M. Henry, and D. Colan.** 1987. Recurrent *Streptococcus mutans* endocarditis. *Am. J. Med.* 82:630-632.
- Yamashita, Y., Y. Tsukioka, Y. Nakano, K. Tomihisa, T. Oho, and T. Koga.** 1998a. Biological function of UDP-glucose synthesis in *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 144: 1235-1245.
- Yamashita, Y., Y. Tsukioka, K. Tomihisa, Y. Nakano, and T. Koga.** 1998b. Genes involved in cell wall localization and side chain formation of rhamnose-glucose polysaccharide in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 180:5803-5807.