



Title	Streptococcus mutans の菌体結合型グルコシルトランスフェラーゼに対するニワトリ卵黄抗体によるS. mutans ビルレンス因子の阻害及びラット実験う蝕の抑制
Author(s)	堀越, 俊雄
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38520
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	ほり 越 俊 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	第 1 1 1 4 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 3 月 1 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	<i>Streptococcus mutans</i> の菌体結合型グルコシルトランスフェラーゼ に対するニワトリ卵黄抗体による <i>S. mutans</i> ビルレンス因子の阻害 及びラット実験う蝕の抑制
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 浜田 茂幸 (副査) 教 授 雫石 聡 助教授 大嶋 隆 助教授 滝川 正春

論 文 内 容 の 要 旨

〔研究目的〕

ミュータンスレンサ球菌は、ヒトあるいは実験動物におけるう蝕の主要な病原菌である。中でも血清型 *c* に属する *Streptococcus mutans* は、ヒト由来のミュータンスレンサ球菌の約 80% を占める。*S. mutans* のう蝕原性を担う重要な因子として、グルコシルトランスフェラーゼ (GTase) が挙げられる。*S. mutans* は数種の GTase を産生するが、これらはスクロースを基質として水不溶性でかつ粘着性のグルカンを合成し、*S. mutans* 菌体を歯面へ強固に付着させる。近年我々は、水不溶性グルカンを合成する菌体結合型 GTase (CA-GTase) を分離精製することに成功した。本研究は、*S. mutans* のう蝕原性の発現に際し、CA-GTase が関与しているか否かを調べるために、CA-GTase に対する卵黄抗体を作製し、同抗体による *in vitro* での CA-GTase の活性阻害と *S. mutans* 菌体の試験管壁への付着阻害、さらに同抗体を経口受動免疫した時のラットにおける実験う蝕抑制効果を検討した。

〔研究方法〕

- (1) 抗原の調製・CA-GTase は、8 M 尿素溶液により *S. mutans* MT8148 株の培養菌体から抽出し、塩析・クロマトグラフィーにより精製した。培養上清中の水溶液グルカン合成酵素である CF-GTase はクロマトフォーカシング法により精製した。
- (2) ニワトリ卵黄抗体の作製：各々の抗原を 18 週齢のニワトリの胸筋に Freund の完全アジュバント (FCA) と共に免疫し、その 8 週後に追加免疫を行なった。
- (3) 卵黄からの抗体の精製：高度免疫ニワトリの卵から卵黄を分離し、クロロホルムで脱脂後、IgG 含有水溶性タンパク画分 (WSF) を得た。*in vitro* 実験には、WSF から DEAE-Sephacel を用いてさらに精製した IgG 画分を用いた。偽免疫したニワトリ由来の卵からも同様にして WSF、IgG 画分を調整し、対照標品として用いた。
- (4) 精製卵黄抗体の大量調製・卵黄を最終 9 倍濃度まで純水で希釈し、生じた脂質沈殿物を除去した。残存脂質をさらに完全に除去するために、得られた上清画分に対し 60% エタノール沈殿を行ない、沈査を 30mM の NaCl に濁懸し、不溶物をろ過・除去し、水溶性画分を得た。同画分を 4℃にて最終 30% 及び 25% エタノール沈殿精製を繰り返して、卵黄抗体 (ylgG) を純化した、ylgG の回収率は卵黄に対して 40%、純度は HPLC 分析により 99% 以上であった。
- (5) *in vitro* う蝕抑制試験：SPF Sprague-Dawley ラットに *S. mutans* MT8148R 株を感染させ、同時に卵黄抗体標

品を配合 (WSF, 0.8%, ylgG 画分; 0.025~1%) したう蝕誘発性飼料 2000 を自由摂取させた。 *S. mutans* の感染後 52 日後にラットを屠殺し、プラーク指数とう蝕スコアを測定した。

〔結果及び考察〕

1. *in vitro* における卵黄抗体の抗ビルレンス作用

抗 CA-GTase, 抗 CF-GTase, 抗全菌卵黄特異抗体の ELISA 抗体価は、それぞれ $7.5, 2.8 \sim 4.7 \times 10^4$ であった。各抗体の反応性を ELISA を用いて調べた結果、抗 CA-GTase 抗体は CA-GTase 及び全菌に対して反応した。一方、抗 CF-GTase 抗体は抗 CF-GTase とのみ反応した。さらに抗 CA-GTase 抗体を用いて免疫ブロッティング法で解析すると、同抗体は全菌抽出液中の CA-GTase のバンドとのみ反応した。また、抗 CA-GTase 抗全菌抗体は *S. mutans* 菌体凝集能を示した。が、抗 CF-GTase 抗体には認められなかった。これらの結果は、CA-GTase と CF-GTase は免疫化学的に区別されること、さらに CA-GTase は菌体表面上に存在しているが CF-GTase は殆ど存在しないことを明らかに示している。遺伝子レベルでは CA-GTase と CF-GTase はある程度相同性を示すとされているが、両酵素は明らかに異なる抗原決定基を有すると考えられる。CA-GTase によるグルカン合成と、スクロースからのグルカン合成を介する *S. mutans* 菌抗体により用量依存的に顕著に阻害された。

2. 卵黄抗体による実験う蝕抑制効果

抗 CA-GTase, 抗 CF-GTase, 抗全菌抗体を含む WSF を配合した飼料を *S. mutans* 感染 SPF ラットに投与すると、抗 CA-GTase 抗体投与群のみが対照群に比べてプラーク指数、う蝕スコアともに有意に低下した。次に抗 CA-GTase 抗体の最少有効投与量を決定するために、lgG 画分を 0.025% から 1% までの濃度で飼料に配合し、実験う蝕抑制効果を調べた。その結果、0.1% 以上の抗体を配合した実験群において、プラーク指数、う蝕スコアの有意な低下がみとめられた。また、同う蝕抑制効果は投与量に依存する傾向が認められた。

以上の結果から、CA-GTase に対する特異卵黄抗体は *in vivo* においてう蝕抑制効果を有することが明らかにされ、抗 CA-GTase 特異卵黄抗体による経口受動免疫が、う蝕の予防に有効な手段となりうる可能性が示唆された。さらに、菌体結合型の CA-GTase が *S. mutans* のう蝕原性の発現に、大きく関与していることが明かにされた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、*Streptococcus mutans* の菌体結合型グルカン合成酵素 (CA-GTase) に対するニワトリ卵黄抗体を調製し、同抗体の性状と、経口受動免疫による *S. mutans* 感染 SPF ラットにおけるう蝕抑制効果を検討したものである。その結果、同抗体は精製同酵素の活性と生育菌体の平滑面への付着、及びラットでの実験う蝕を用量依存的に抑制することを明らかにした。これらの知見は、う蝕の病原因子の解明と受動免疫による予防法の開発に大きく資するものであり、博士 (学術) の学位に値するものと認められた。