

Title	Streptococcus mutans新規血清型の確立とその臨床的意義の検索
Author(s)	野村, 良太
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46411">https://hdl.handle.net/11094/46411</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名 野 村 良 太

博士の専攻分野の名称 博士(歯学)

学位記番号 第 20226 号

学位授与年月日 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

歯学研究科分子病態口腔科学専攻

学位論文名 *Streptococcus mutans* 新規血清型の確立とその臨床的意義の検索

論文審査委員 (主査)

教授 大嶋 隆

(副査)

教授 森崎市治郎 助教授 杉村 光隆 講師 中川 一路

## 論文内容の要旨

### 【研究目的】

う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* は感染性心内膜炎 (infective endocarditis; IE) の主要な起炎菌の 1 つでもある。これまでに抜歯後菌血症あるいは IE 患者血液より分離した *S. mutans* について、生化学的・血清学および分子生物学的側面から分析してきた。*S. mutans* は菌体表層に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する血清型特異多糖を有しており、グルコース側鎖の結合様式によって *c/e/f* 型のいずれかに分類される。口腔内の *S. mutans* は 80% 以上が *c* 型に分類されるのに対して、菌血症あるいは IE 患者血液から分離された *S. mutans* は、4 株とも *c* 型ではなかった。特にそのうち 2 株は *c/e/f* 型のいずれにも属さず、これらの糖組成を分析すると、ラムノース主骨格に結合するグルコース側鎖の量が著しく低下していることが明らかとなった。本研究の目的は、これらの血清型不定の *S. mutans* 株を新規血清型 *k* と定義し、それらのう蝕原性および血液中での病原性を検討するとともに、分子生物学的解析からそれを保有する対象の簡易的同定法を確立することである。

### 【実験方法】

#### 1) 供試菌の由来と生物学的性状

東京女子医大より供与された抜歯後菌血症あるいは IE 患者血液から分離された *S. mutans* 株を用いた。また、日本人小児口腔由来の *S. mutans* MT8148 株 (血清型; *c*) を用いた。さらに、本学歯学部附属病院小児歯科に来院した患者のプラークおよび唾液より分離した 2600 株の *S. mutans*、および 1982 年から 1990 年に当科で分離し保存していた 1326 株の *S. mutans* も使用した。

#### 2) 血清学的性状の分析

日本人小児口腔から分離した *S. mutans* および 1982 年から 1990 年に分離し保存していた *S. mutans* を培養後、121°C15 分加熱し血清型特異多糖抗原の抽出を行った。これらを抗 *c/e/f* 型抗体と反応させそれぞれの血清型を決定した。また、菌血症あるいは IE 患者血液から分離された血清型不定の株をウサギに免疫し新規血清型 (*k* 型) 抗血清を作製した。

#### 3) グルコース側鎖欠失株の作製

MT8148 株のグルコース側鎖の生合成に関与する *gluA* 遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入不活化した株

(MT8148GD株)を作製した。

#### 4) 病原性の検討

MT8148株、MT8148GD株およびその他の*k*型株において、う蝕病原性に関する性状；耐酸性、スクロース依存性付着、唾液被覆ハイドロキシアパタイトの付着、デキストラン結合能およびGTF活性について *in vitro* の試験系で調べた。また、*in vivo* におけるう蝕誘発能をラットを用いた実験う蝕系で検討した。さらに、MT8148株、MT8148GD株およびその他の*k*型株を培養後健康常人より採取した静脈末梢血と反応させ、ギムザ染色にて食作用を呈している多型核白血球の割合を経時的に求めた。

#### 5) 分子生物学的性状の分析

血液分離株および口腔分離株について染色体DNAの抽出を行った。*k*型株については血清型特異多糖の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子をPCR法にて増幅後遺伝子配列を決定し、データベース上の株と比較した。それにより得られた*k*型株特異的配列をもとにプライマーを設計し、*k*型株と*celf*型株を識別できるPCR反応系を確立した。この反応系でヒト唾液サンプルから抽出したDNAを用いて、*k*型株を保有する対象の割合を求めた。また、*k*型株のRNA抽出を行い、血清型特異多糖の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子のmRNAの発現を検討した。

#### 【結果および考察】

1) *k*型特異抗血清を用いて100株の口腔分離株から抽出した抗原と反応させたところ2株がこの抗血清と反応した。一方で、1982年から1990年に分離した1326株の血清型を調べると、その中に*k*型株は認められなかった。

2) *k*型 *S. mutans* におけるグルコース側鎖の欠如は、*in vitro* における試験においてう蝕病原性の低下という結果を示したが、ラット実験系ではう蝕誘発能の明確な低下は認められなかった。また、グルコース側鎖の欠如はヒト多型核白血球による食作用の低下につながっていた。

3) *k*型株の血清型特異多糖の生合成に関与する遺伝子配列のうち、*rgpF*遺伝子に*k*型特異的配列を見いだした。その領域をターゲットとして*k*型および非*k*型(*celf*型)特異プライマーを設計し、それぞれの株の存在をPCR法にて検出する系を確立した。この反応系によると、*k*型株を保有する対象の割合は約5%であった。さらに、*k*型株ではグルコース側鎖の生合成に関する*rgpE*遺伝子のmRNAの発現が低下していることが明らかになった。

以上のことから、*S. mutans* の*k*型株はう蝕原性には大きな影響を与えないものの、血液中に侵入すると全身における病原性を発揮しやすい可能性が示唆された。このことは*k*型 *S. mutans* をPCR法で迅速に簡易同定するシステムの確立は臨床上有用であると考えられる。

#### 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および健康な小児口腔から新規血清型*k*に属する *S. mutans* を分離し、その性状を検討したものである。その結果、*k*型株に共通する血清型特異多糖におけるグルコース側鎖の量の著しい低下が、全身での病原性の発揮に関連していることが示唆された。さらに、*k*型株に共通する分子生物学的性状を利用して、唾液サンプルからPCR法による*k*型株の簡易検出系を確立した。以上のことから、本研究はう蝕原性細菌 *S. mutans* の感染性心内膜炎における病原性と予防法を明らかにする上で重要な示唆を与えるものであり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認める。