The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Streptococcus sanguinisにより産生される過酸化水素が好中球に対して及ぼす影響
Author(s)	住岡, 龍一
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56120
rights	© 2017 Sumioka et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　住岡　龍一　）	
論文題名	*Streptococcus sanguinis*により産生される過酸化水素が好中球に対して及ぼす影響

論文内容の要旨

【研究目的】

歯科治療や口腔清掃後に日常的におこる一過性の菌血症は，心疾患ハイリスク患者等において感染性心内膜炎の原因になる．これまで感染性心内膜炎の病巣から，*Streptococcus sanguinis*を含むmitis群口腔レンサ球菌が高頻度に分離されてきた．それゆえ，*S. sanguinis*の病原性を解明することは，感染性心内膜炎の予防･治療の確立につながる可能性がある．

口腔レンサ球菌は，糖代謝によるピルビン酸の生成過程においてATPを産生する．口腔レンサ球菌に幅広く保存されるピルビン酸オキシダーゼであるSpxBは，好気条件下で，酸化還元反応によりピルビン酸と無機リン酸からアセチルリン酸，二酸化炭素，および過酸化水素 (H_2O_2) を生成する．H_2O_2はフェントン反応によりヒドロキシラジカルを産生し，DNAやタンパク質を傷害する．また，mitis群レンサ球菌に属する肺炎球菌では，SpxBによるH_2O_2産生が菌体生存や病原性に重要な役割を果たす．*S. sanguinis*では，H_2O_2によりヒト細胞株の細胞死を誘導する．しかし，好中球を含む免疫系正常細胞に対するH_2O_2の細胞毒性や細胞死誘導機構は不明である．本研究では，*S. sanguinis*のH_2O_2産生能に着目し，血中での菌体の生存や好中球に対する細胞毒性への関与を検討した．

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) は，NETosisにより誘導された好中球由来DNAやヒストン，エラスターゼ等の抗菌物質を含む網目状構造物である．NETsは細菌を捕捉，殺菌することにより感染拡大防御に働くが，感染性心内膜炎の疣贅形成の足場としても機能する．そこで，*S. sanguinis*が産生したH_2O_2により刺激を受けた好中球がNETs形成を誘導するかについても併せて検討した．

【材料および方法】

1. *spxB*欠失株および復帰変異株の作製と各菌株のH_2O_2産生能の検討

S. sanguinis SK36株 (WT) の染色体DNAを用い，*spxB*遺伝子の上流および下流領域をPCR法で増幅･連結し，温度感受性シャトルベクターpSET6に挿入した．同ベクターをSK36株に形質転換し，*spxB*欠失株 (Δ*spxB*) および復帰変異株 (Wr) を作製した．

塩化第 2 鉄およびヘキサシアノ鉄 (Ⅲ) 酸カリウム含有BHI寒天プレート (プルシアンブルー寒天培地) に，対数増殖期中期まで培養した菌液を滴下した．菌がH_2O_2を産生すると，プルシアンブルー反応によりコロニー周囲には青色のハローが形成される．また，菌液中のH_2O_2産生量についてアンプレックスレッドを用いたペルオキシダーゼ法で測定した．

2. 血中での菌体生存に対するH_2O_2の影響と好中球に対する細胞毒性の検討

健常ヒト末梢血もしくは，末梢血から比重遠心分離法にて単離した好中球にカタラーゼ存在下もしくは非存在下で各菌株を 0.5~3 時間感染させ，経時的に菌体生存率を算出した．H_2O_2の好中球に対する細胞毒性を検討するため，好中球に各菌株を感染させた後，乳酸デヒドロゲナーゼの培養上清への放出を検討した (LDH assay).

3. 感染好中球の細胞死形態の観察とシトルリン化ヒストンの検出

感染もしくは非感染好中球のDNAをDAPIもしくはSYTOX Greenで蛍光染色を行った後，好中球の細胞死形態について蛍光顕微鏡を用いて観察した．また，NETosis誘導の指標の一つである好中球ヒストンH3およびH4のシトルリン化をウェスタンブロット解析により検出した．

4. 感染好中球の細胞外DNA量の測定

H_2O_2を分解するカタラーゼを添加した後，好中球に各菌株を感染させた．SYTOX Greenを添加し，蛍光強度を指標に好中球由来の細胞外DNA量を評価した．

5. 好中球の貪食能の観察

各菌株を感染させた好中球のギムザ染色を行い，位相差顕微鏡で観察した．好中球 1 細胞あたりの貪食菌数を算出した．

6. 統計処理と実験承認

Mann-Whitney *U* 検定を用いて独立2群の差を検定した．p <0.05を有意差ありとした．また，本研究は，大阪大学遺伝子組換え実験委員会，病原体等取扱安全管理委員会，および大阪大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て行った (遺伝子組換え実験承認番号; 3365，病原体所持承認番号; 23 (歯学研究科)-8，倫理研究承認番号; H26-E43).

【結果および考察】

1. 大気中での培養において，プルシアンブルー寒天培地上で生育したWTおよびWrのコロニー周囲に境界明瞭な青色のハローを認めた．一方，Δ*spxB*のコロニー周囲には，境界不明瞭な淡青色のハローが認められた．ペルオキシダーゼ法により大気中での培養における各菌株のH_2O_2産生量を定量した結果，WTおよびWrのH_2O_2産生量は 2.9〜3.5 mMであった．一方，Δ*spxB*のH_2O_2産生量は 0.9 mMまで減少した．したがって，SpxBは*S. sanguinis* SK36株のH_2O_2産生に関与する主要な因子であると推測された．

2. 末梢血および好中球を用いた感染実験において，感染後 0.5〜3 時間におけるΔ*spxB*の菌体生存率は，WTおよびWrと比較して，低下した．カタラーゼ添加時においても，Δ*spxB*の菌体生存率は，WTおよびWrと比較して，低下した．これらの結果から，*S. sanguinis*のH_2O_2は血中における菌体生存へ有利に働くが，H_2O_2非依存的に好中球の殺菌に抵抗する可能性が示唆された．また，好中球に対するΔ*spxB*の細胞毒性は，WTおよびWrと比較して，有意に減少した．*S. sanguinis*のH_2O_2は，好中球に対して細胞毒性を示すことが示唆された．

3. WTおよびWrを感染させた好中球を蛍光顕微鏡で観察した結果，好中球の細胞死や細胞外での糸状DNA染色像が認められた。一方，Δ*spxB*を感染させた好中球染色像では，分葉核が保たれていた．また，ウェスタンブロット解析により，シトルリン化ヒストンH3およびH4のバンドがWTもしくはWrを感染させた好中球において認められたが，Δ*spxB*を感染させた好中球では認められなかった．*S. sanguinis*のH_2O_2は好中球を刺激し，NETosisの誘導に寄与することが示唆された．

4. WTおよびWrと比較して，Δ*spxB*を感染させた好中球から産生する細胞外DNA量は有意に減少した．WTおよびWrの細胞外DNA量は，カタラーゼの添加によりΔ*spxB*のそれと同等レベルまで低下した．*S. sanguinis*のH_2O_2は好中球に作用し，NETs誘導を有意に増加させることが示唆された．

5. 好中球がΔ*spxB*を貪食した菌数は，WTおよびWrと比較して，有意に増加した．しかし，感染好中球におけるWT株もしくはWr株の菌体生存率はカタラーゼ添加により抑制されなかった．H_2O_2依存的な抗貪食因子の報告はないが，Δ*spxB*のコロニーは粗造な表面性状を呈したことから，表層タンパクの発現量が変化し，好中球による貪食への抵抗性が低下することが示唆された．

【結論】

*S. sanguinis*のSpxBの酵素活性により産生されるH_2O_2は，好中球ヒストンのシトルリン化を誘導し，NETs形成を促進した．また，*S. sanguinis*はH_2O_2非依存的な好中球に対する抗貪食能を有した．末梢血殺菌試験および好中球殺菌試験の結果から，SpxBによるH_2O_2産生はNETsによる殺菌以上に*S. sanguinis*の生存に有利に働いた．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　住岡　龍一　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	川端　重忠
	副 査	教授	仲野　和彦
	副 査	准教授	永田　英樹
	副 査	講師	山田　聡

論文審査の結果の要旨

本研究は，口腔レンサ球菌 *Streptococcus sanguinis* の SpxB の酵素活性により産生される H_2O_2 が，血中での菌体の生存や好中球への細胞毒性に関与するかについて検討した．また，*S. sanguinis* が産生した H_2O_2 により刺激を受けた好中球が NETs 形成を誘導するかについても併せて検討した．その結果，SpxB による H_2O_2 産生は血中における菌体生存へ有利に働き，好中球に対して細胞毒性を有していた．*S. sanguinis* 感染好中球の DNA を染色した結果，NETs 様構造物が観察された．ウェスタンブロット解析から，NETosis の指標の一つである好中球ヒストンのシトルリン化が検出された．また，カタラーゼにより感染好中球の細胞外 DNA 量が減少した．以上の結果より，*S. sanguinis* の SpxB の酵素活性により産生される H_2O_2 は，好中球ヒストンのシトルリン化を誘導し，NETs 形成を促進することが示唆された．

以上より，本研究は博士 (歯学) の学位論文に値するものと認める．