Osaka University Knowledge Archive

Title	Streptococcus mutansが誘発する腸炎悪化メカニズムの解析
Author(s)	小島, あゆち
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59289
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【29】

氏　　名	小　島　あゆち
博士の専攻分野の名称	博　士（歯学）
学　位　記　番　号	第　２５０３７　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 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 が誘発する腸炎悪化メカニズムの解析
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　大嶋　　隆 （副査） 教　授　天野　敦雄　　准教授　和田孝一郎　　准教授　寺尾　　豊

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

う蝕の主要な病原性細菌である *Streptococcus mutans* は，菌血症および感染性心内膜炎の起炎菌として知られている．この *S. mutans* は菌体表層に存在する多糖抗原の違いにより 4 つの血清型に分類されている．血清型 *c*，*e*，*f* では，ラムノース主骨格にグルコース側鎖が結合する様式をとるのに対して，血清型 *k* では，ラムノース主骨格に結合するグルコース側鎖を欠如した構造をとっている．口腔内における分布は，*c* 型が最も多く(約 70ー80%)，次いで *e* 型(約 20%)であり，*f* 型，*k* 型は 5% 以下となっている．また，*S. mutans* 菌体表層には様々なタンパク抗原が存在し，病原性に深く関与している．分子量約 120 kDa のコラーゲン結合タンパク（Cnm タンパク）もその 1 つで，10ー20% の *S. mutans* 株が保有している．

これまでに，微細な脳出血を引き起こしたマウスに，菌血症患者血液から分離した *S. mutans* 株を頸静脈より感染させると，脳出血の増悪を引き起こすことが示されている．その研究の中で，マウス腹腔内を観察すると腸炎を示す所見が認められた．本研究の目的は，炎症性腸疾患に及ぼす *S. mutans* の影響を検討し，その発生機序を考察することである．

【材料および方法】

１．供試菌株

抜歯後菌血症患者の血液より分離された TW295 株(血清型 *k*； Cnm タンパク発現株) と *S. mutans* 標準株として用いられている日本人小児口腔より分離された MT8148 株(血清型 *c*； Cnm タンパク非発現株) を使用した．また， 共焦点顕微鏡観察に用いるため，TW295 株を蛍光ラベルした TW295EGFP 株を作製し使用した．さらに，MT8148 株の血清型特異多糖からグルコース側鎖を欠失させて *k* 型とした MT8148GD 株，また TW295 株の Cnm タンパクを欠失させた TW295CND 株も用いた．

２．多型核白血球による貪食能の評価

5×10^7 集落形成単位 (Colony Forming Unit; CFU) に調整した供試菌に 500ml のヒト末梢血を添加して 10 分間反応させた後，ギムザ染色を行い，多型核白血球が貪食している供試菌を顕微鏡下で算定した．

３．マウス腸炎モデルにおける検討

C57BL/6J マウス(7 週齢オス)に，2.5%デキストラン硫酸 (Dextran Sulfate Sodium; DSS) 溶液を飲料水として実施期間中自由摂取させ，軽度の腸炎を誘発させた．DSS 摂取 4 日目に，1×10^3ー1×10^9 CFU の供試菌を頸静脈より感染させ，マウスの体重，下痢および血便状態 (Disease Activity Index; DAI, 0ー3 でスコア)および生存率を腸炎の重症度の指標として，15 日目まで毎日調べた．

また，供試菌の感染後 30 分，3 時間，6 時間，12 時間後に大腸，小腸，肝臓，肺を摘出し，その臓器を破砕し，段階希釈したものを，*S. mutans* の選択培地である Mitis-salivarius-bacitracin (MSB) 寒天培地に播種し，生菌数を計測した．さらに，摘出した肝臓組織から RNA を抽出後に cDNA 合成を行い，IFN-γ に対する mRNA の発現を，RT-PCR 法で検討した．

４．肝臓培養細胞への付着能の評価

細胞数が 1×10^5 になるよう調整したヒト肝臓培養細胞（Huh-7）に，1×10^8CFU の供試菌を感染させ 30 分共培養した後，MSB 寒天培地に播種し，Huh-7 細胞に付着した *S. mutans* 数を計測した．

【結果】

１．多型核白血球による貪食能の評価

TW295 株の貪食率は MT8148 株と比較して有意に低く，MT8148GD 株と同程度であった．

２．マウス腸炎モデルにおける検討

S. mutans を感染させず DSS を摂取させたコントロール群マウスにおいては，軽度の腸炎を発症した．また 1×10^7 CFU の MT8148 株を頸静脈より感染させたマウスにおいても，コントロール群と同程度の腸炎を発症した．しかし，1×10^7 CFU の TW295 株を頸静脈より感染させたマウスにおいては，コントロール群および MT8148 株感染群と比較して有意な体重減少，DAI 値の増加および生存率の減少が認められた．また，TW295 株の感染菌量を 1×10^5 CFU 以上とした時に腸炎の悪化が認められ，1×10^6 CFU 以上の菌量を感染させた群では，生存率の有意な減少が認められた．一方，経口ゾンデを用いて 1×10^7 CFU あるいは 1×10^8 CFU の TW295 株を経胃感染させた群では，コントロール群と比較して，腸炎の悪化に有意な差は認められなかった．また，TW295 CND 株感染群を頸静脈より感染させても腸炎の悪化を誘発しなかった．

1×10^7 CFU の TW295 株を感染させたマウスにおいて，屠殺後摘出した大腸，小腸および肺からは TW295 株は回収されなかった．それに対して，感染 30 分および 3 時間後に摘出した肝臓からは TW295 株が回収された．また，TW295EGFP 株を感染させたマウス肝臓の凍結切片を作製し，共焦点顕微鏡で観察すると，供試菌が肝臓の実質細胞に取り込まれていた．さらに，TW295 を感染させたマウスの肝臓組織において，IFN-γ の発現の増加が認められた．

３．*S. mutans* 株の肝臓培養細胞への付着能の評価

TW295 株は，MT8148 株と比較して Huh-7 への有意に高い付着が認められた．さらに，TW295CND 株を用いて同様の実験を行ったところ，TW295 株と比較して Huh-7 への付着能の有意に低く，MT8148 株と同程度であった．

【考察】

本研究の結果、*k* 型株のように多型核白血球による貪食を受けにくい *S. mutans* 株では，血液中に残存しやすく，さらに菌体表層に Cnm タンパクが存在すると，肝臓実質細胞への局在に有利なことが示された．この肝臓実質細胞内に侵入した *S. mutans* 株が IFN-γ などのサイトカインの産生を誘発することで免疫機構の不均衡を生じさせ，腸炎の悪化につながる可能性が示唆された．

論文審査の結果の要旨

本研究は，*Streptococcus mutans* の炎症性腸疾患に及ぼす影響をマウス腸炎モデルを用いて検討し，その発生機序を考察したものである．血液中に感染させた Cnm タンパクを保有する *k* 型 *S. mutans* は，多型核白血球による貪食を受けにくく，モデルマウスの腸炎を増悪させた．その発生機序として，*S. mutans* 株が肝臓細胞内に侵入して IFN-γ などのサイトカインの産生を誘発することで免疫機構の不均衡を生じさせ，腸炎の悪化につながる可能性が示唆された．

以上の研究結果は *S. mutans* が誘発する腸炎悪化のメカニズムを明らかにし，*S. mutans* の病原性を考察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．