



Title	Streptococcus mutans が引き起こす非アルコール性脂肪肝炎悪化メカニズムの追究
Author(s)	畠山, 理那
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61647
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Streptococcus mutans が引き起こす
非アルコール性脂肪肝炎悪化メカニズムの追究

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻
口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室

畠山理那

はじめに

う蝕の主要な病原細菌として知られる *Streptococcus mutans* は、グラム陽性通性嫌気性のレンサ球菌であり、抜歯などの侵襲的な歯科処置によって血液中に侵入することで、感染性心内膜炎を引き起こすことがあることが知られている（Nakano と Ooshima, 2009）。*S. mutans* の菌体表層には、分子量約 120 kDa のコラーゲン結合タンパク（Cnm タンパク）（Sato ら, 2004）や分子量約 190 kDa の Protein Antigen（PA タンパク）（Koga ら, 1990）などの様々なタンパク抗原が存在しており、う蝕における病原性に関与していることが知られている。Cnm タンパクは、血管内皮細胞への付着および侵入に関与することが明らかにされており、感染性心内膜炎を引き起こす重要な因子の一つとして考えられている（Abranches ら, 2011; Nomura ら, 2013）。最近になって、Cnm タンパクを発現する *S. mutans* 株が血液中に侵入すると、脳出血や炎症性腸炎の増悪化を引き起こすことも示されている（Nakano ら, 2011; Kojima ら, 2012）。一方、PA タンパクは、antigen I/II（Russel と Lehner, 1978）、P1（Forester ら, 1983）、SpaP（Lee ら, 1989）とも称されており、*S. mutans* のスクロース非依存性の歯面への初期付着に関与することが知られている（Koga ら, 1990）。また、PA タンパクは各種炎症性サイトカインの分泌にも関与することが示されている（Engels-Deutsch ら, 2003）。

近年、生活習慣病の一つとされる脂肪肝炎に注目が集まっている。脂肪肝はアルコール性と非アルコール性に分類され、非アルコール性脂肪肝疾患（Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD）は、さらに単純性脂肪肝（Simple steatosis; SS）と非アルコール性脂肪肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis; NASH）に分類される（Ludwig ら, 1980; Diehl, 1999）。このうち、NASH は明らかな飲酒歴が無いにも関わらず、病理組織学的にアルコール性脂肪肝炎に類似する所見を呈して肝硬変への進展を認める原因不明の症例として 1980 年に初めて報告され（Ludwig ら, 1980），重症化すると肝硬変を経て肝がんにまで至る場合もあるとされている（Ascha ら, 2010）。NASH の成り立ちとしては、まず、過剰栄養摂取によりメタボリックシンドロームに陥ってインスリン抵抗性が生じ、糖尿病や動脈硬化、脂質異常症などが引き起こされるとともに SS が生じるとされている（谷川, 2003； 笹森, 2002）。その後、酸化ストレス、脂質過酸化およびミトコンドリアの機能異常などの要因により、肝臓における炎症性変化および線維化が誘発され、SS から NASH へ進展すると考えられている（Sanyal, 2001）。この 2 段階における NASH 発生機序に対する考え方 Two-hit theory と称され、今まで広く受け入れられている（Day と James, 1998）。

脂肪肝は、中性脂肪の主要成分であるトリアシルグリセロールが肝臓組織に 5% 以上蓄積した状態を示すとされている (Sherlock, 1983). トリアシルグリセロールは 3 つの脂肪酸（飽和脂肪酸もしくは不飽和脂肪酸）とグリセロールが結合している (Murray ら, 2006). 飽和脂肪酸であり重要なヒト脂質形成成分であるパルミチン酸は室温では固体であり、アテローム性動脈硬化、脳梗塞および脂肪肝疾患の原因の一つとして考えられている (Oliver, 1990; Reiser と Shorland, 1990; McNamara, 1990). さらに、パルミチン酸は、*S. mutans* において菌体疎水性の評価に用いられるヘキサデカンと類似した化学構造をしているとされている (Kumar と Goswami, 2008; Rosenberg ら, 1980). 一方で、ヒトの重要なエネルギー源となる不飽和脂肪酸であるオレイン酸は室温では液体であり、パルミチン酸と比較して有害ではないと考えられている (Kris-Etherton, 1999; Paniagua ら, 2007). しかしながら、これらの飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸と NASH 増悪化の関係については明らかとなっていない.

これまでに、6 週齢の C57BL/6J マウスに高脂肪食 (high-fat diet; HFD) を摂取させ続けることで、48 週後に NASH に類似した所見を生じたとの報告がある (Nozaki ら, 2009). 一方で、これまでの当教室における研究では、HFD を摂取させはじめて 4 週後のマウスに 1×10^7 CFU ほどの *S. mutans* TW871 株 (Cnm^+/PA^+) を頸静脈より投与すると、およそ 12 週間で NASH に類似した所見が生じることを明らかにした (Naka ら, 2014). さらに、TW871 株を投与したマウスの肝臓では、インターフェロン (interferon; IFN) - γ とメタロチオネインの発現量が増加することで NASH の増悪化につながっていることが分かった (Naka ら, 2014). しかしながら、*S. mutans* の引き起こす NASH 増悪化に関するメカニズムの詳細は明らかにできていない.

Cnm タンパクは、I 型コラーゲンへの結合能を有するとともに、血管内皮細胞への付着侵入に関与することから (Sato ら, 2004; Nakano ら, 2007; Abranched ら, 2011), コラーゲンに富む肝臓組織への付着にも関連している可能性が考えられる. 一方で、PA タンパクは *S. mutans* の菌体における疎水性結合に関連することから (Koga ら, 1990), 脂肪化した肝臓組織への *S. mutans* 菌体の親和性にも関連している可能性が考えられる. これらのことから、 Cnm^+/PA^+ の *S. mutans* TW871 株は脂肪酸の蓄積はじめた肝臓組織に付着して、炎症性サイトカインである IFN- γ による炎症性変化とメタロチオネインによる酸化ストレスを惹起して、NASH の増悪化を引き起こすのではないかという考えに至った. 本研究では、TW871 株の Cnm タンパクまたは PA タンパクの欠失変異株およびその相補株を作成し、マウス NASH モデルを用いて病原性を評価することにした. また、*S. mutans* の菌体疎水性評価のプロトコールをもとに、各種脂肪酸への菌体の親和性の評価を行うことにした. さらに、脂肪の

蓄積の有無による肝臓細胞に対する菌体の付着能の違いを評価することにした。

材料と方法

1. 本研究で用いた細菌学的分析

1) 使用した *S. mutans* 菌株

本研究で用いた菌株を表 1 に示す。これまでの研究で NASH 増悪化への関与が示された感染性心内膜炎患者からの血液分離株である TW871 株（血清型 *k*）(Nakano ら, 2004a) を主に用いた。さらに、TW871 株の Cnm タンパクをコードする *cnm* 遺伝子中央部にエリスロマイシン耐性遺伝子 (*Em^r*) を挿入し不活化させることで菌体表層の Cnm タンパクを欠失させた変異株 TW871CND 株 (*k*) (Nakano ら, 2010) と、PA タンパクをコードする遺伝子に *Em^r* を挿入し不活化させることで菌体表層の PA タンパクを欠失させた変異株 TW871PD 株 (*k*) (Nomura ら, 2013) を使用した。また、*S. mutans* の標準株として、日本人小児口腔由来の Cnm タンパクを発現しない MT8148 株 (*c*) (Ooshima ら, 1983) を用いた。加えて、抜歯後菌血症患者からの血液分離株であり PA タンパクを発現しない TW295 株 (*k*) (Nakano ら, 2004a) を使用した。

供試菌の培養には、Brain Heart Infusion 液体培地 (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), Mitis-salivarius 寒天培地 (MS; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) および MS 寒天培地にバシトラシン (0.2 unit/ml; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) と 15% スクロース (和光純薬, 大阪) を添加した MSB 寒天培地を用いた。*Em^r* を用いて形質転換した変異株 (TW871CND 株および TW871PD 株) の培養には、エリスロマイシン (10 µg/ml; 和光純薬) をそれぞれの培地に添加して用いた。供試菌は BHI 液体培地では 37°C で 18 時間、MS 寒天培地もしくは MSB 寒天培地では 37°C で 48 時間、窒素 95%, 炭酸 5% の条件下で嫌気的に培養して実験に使用した。

2) TW871CND 相補株の作製

TW871CND 相補株は、TW871CND 株にプラスミド pDL278 (Dunny ら, 1991) を形質導入した後に転換させる Lindler と Macrina (1986) の方法に準じて作製した (図 1)。まず、*S. mutans* TW871 株の *cnm* 遺伝子 (GenBank アクセッション番号; AB469914) の Open reading frame 領域を、*Hind*III および *Bam*HI の制限酵素を付与したプライマー 5'-GAC AAA GAA ATG AAA GAT GT-3' および 5'-GCA AAG ACT CTT GTC CCT GC-3' と *TaKaRa ExTaq*® (タカラバイオ, 大津) を用いて後述する Polymerase Chain Reaction (PCR) 法にて遺伝子全長を增幅した。增幅した DNA 断片はフェノールクロロホルム処理後エタノール沈殿を行い精製した。得られた

DNA 断片を制限酵素 *Hind*III と *Bam*HIで消化し, pDL278 ベクターにライゲーションし, *cnm* 遺伝子を持つプラスミドを作製した. Todd Hewitt 液体培地(TH; Becton, Dickinson and Company) で 37°C, 1 日培養した TW871CND 株を, 10% の馬血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含む TH 液体培地に加え, 37°C で 2 時間培養した. この培養液に, 作製したプラスミド約 200 µg を添加し, 37°C で 2 時間培養した. 培養後, 遠心分離して菌体を集め, スペクチノマイシン (1 mg/ml) を含む MS 寒天培地に播種した. 37°C で 2 日間嫌気的に培養し, 生じたコロニーを形質転換株 TW871CNDcomp 株とした. 株の完成の確認には, 後述の Reverse Transcription PCR (RT-PCR) 法 (Nomura ら, 2005) により *cnm* 遺伝子の発現の確認を評価するとともに, コラーゲン結合率を後述の方法で測定した.

TW871CNDcomp 株を使用の際にはエリスロマイシン (10 µg/ml) とスペクチノマイシン (1 mg/ml) を添加した BHI 液体培地にて 37°C で 18 時間培養した.

3) TW871PD 相補株の作製

TW871PD 相補株は TW871PD 株にプラスミド pDL278 (Dunny ら, 1991) を形質導入した後に転換させる Lindler と Macrina (1986) の方法に準じて作製した (図 2). まず, *S. mutans* TW871 株の *pac* 遺伝子の Open reading frame 領域を, *Sph*I および *Xma*I の制限酵素を付与したプライマー 5'-GCC GCA TGC TTC AGA TTT GGA GGA TTT ATG-3' および 5'-AAT CCC GGG GTA ATA TCT ATG CTG TCA ATC-3' と *TaKaRa ExTaq*®を用いて後述の PCR 法にて遺伝子全長を増幅した. 増幅した DNA 断片はフェノールクロロホルム処理後エタノール沈殿を行い精製した. 増幅した DNA 断片を制限酵素 *Sph*I と *Xma*I で消化し, pDL278 ベクターにライゲーションし, *pac* 遺伝子を持つプラスミドを作製した. TH 液体培地で 37°C, 1 日培養した TW871PD 株を, 10% の馬血清を含む TH 液体培地に加え, 37°C で 2 時間培養した. この培養液に, 作製したプラスミド約 200 µg を添加し, 37°C で 2 時間培養した. 培養後, 遠心分離して菌体を集め, スペクチノマイシン (1 mg/ml) を含む MS 寒天培地に播種した. 37°C で 2 日間嫌気的に培養し, 生じたコロニーを形質転換株 TW871PDcomp 株とした. 株の完成の確認には, 後述の RT-PCR 法により *pac* 遺伝子の発現を評価するとともに脂肪酸結合率を後述の方法で測定した. TW871PDcomp 株の使用の際にはエリスロマイシン (10 µg/ml) とスペクチノマイシン (1 mg/ml) を添加した BHI 液体培地にて 37°C で 18 時間培養した.

4) TW871PD 株の Cnm 欠失変異株の作製

TW871 株の Cnm タンパクと PA タンパクの両方のタンパクを発現しないようにした TW871CNPD 株は, Nakano ら (2004a) の方法に準じて作製した (図 3).

まず、*S. mutans* TW871 株の *cnm* 遺伝子をもとに設計したプライマー 5'-GAC AAA GAA ATG AAA GAT GT-3' および 5'-GCA AAG ACT CTT GTC CCT GC-3' と *TaKaRa ExTaq®* を用いて後述する PCR 法にて遺伝子全長を増幅した。増幅した DNA 断片を pGEM-T Easy ベクター (Promega, Madison, WI, USA) にライゲーションし、*cnm* 遺伝子を持つプラスミドを作製した (Nakano ら, 2010)。トランスポゾン Tn1545 由来であり、カナマイシン耐性遺伝子 (*aphA*) を含む形質転換プラスミド pKF5 (Matsumoto-Nakano ら, 2007) のカナマイシン耐性遺伝子と *cnm* 遺伝子中央部を、制限酵素 *Bsm*I で消化、ライゲーションした。このプラスミドを用いて、Tobian と Macrina (1982) の方法で TW871PD 株に形質転換し、*cnm* 遺伝子と *pac* 遺伝子を不活化した変異株 (TW871CNPD 株) を作製した。BHI 液体培地で 37°C, 18 時間培養した TW871PD 株を、10% の馬血清を含む TH 液体培地に加え、37°C で 2 時間培養した。この培養液に、制限酵素認識部位 *Pst*I で消化して一本鎖化したプラスミドを加え、37°C で 2 時間培養した。培養後、遠心分離して菌体を集め、カナマイシン (500 µg/ml) を含む MS 寒天培地に播種した。37°C で 2 日間嫌気的に培養し、生じたコロニーから TW871CNPD 株を選別した。株の完成の確認には、後述の RT-PCR 法により *cnm* 遺伝子の発現を評価するとともにコラーゲン結合率を後述の方法で測定した。TW871CNPD 株の使用の際にはエリスロマイシン (10 µg/ml) とカナマイシン (500 µg/ml) を添加した BHI 液体培地にて 37°C で 18 時間培養した。

5) 供試菌からの染色体 DNA 抽出

S. mutans からの染色体 DNA の抽出は、Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いた Nakano ら (2004a) の方法に準じて行った。10 ml の BHI 液体培地にて 37°C で 18 時間培養した供試菌を遠心分離して集め、250 µl の Glu-TE Buffer (1 M グルコース, 10mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール, 1mM エチレンジアミン四酢酸) に懸濁した。この懸濁菌液 250 µl に、N-acetyl muramidase SG (2.0 mg/ml; 生化学工業, 東京) 62.5 µl と塩化リゾチーム (10mg/ml; 和光純薬) 0.25 µl を加え、37°C で 90 分間反応させた。その反応液に、まず Cell Lysis Solusion 600 µl を加えて 80°C で 5 分間、続いて RNase (10mg/ml; QIAGEN) 3 µl を添加して 37°C で 30 分間、最後に Protein Precipitation Solution を 200 µl 添加して、ボルテックスにて 20 秒間激しく懸濁させた。この反応液を遠心分離して得た上清に、600 µl のイソプロパノール (和光純薬) を添加して混和し、再度遠心分離を行った。得られた沈殿を 70% エタノール (和光純薬) にて洗浄して乾燥後、DNA Hydration Solution 100 µl に溶解した。このようにして得られた染色

体 DNA 溶液は、OD₂₆₀ により濃度を測定した後 20 µg/ml に調整して使用した。

6) PCR 法

PCR 法は Nakano ら (2004b) の方法に準じて行った。PCR 法による DNA の增幅には、*TaKaRa ExTaq®* と目的に応じて作成したプライマーを用い、サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用して反応を行った。試薬の量および温度サイクルは、それぞれの指示書に従って設定した。

7) アガロースゲル電気泳動

電気泳動は Nakano ら (2004b) の方法に準じて行った。TAE 緩衝液 (40 mM Tris, 40mM 酢酸, 1mM EDTA, pH 8.0; 和光純薬) に 0.7% もしくは 1.5%アガロース S (ニッポンジーン, 東京) を加え、加熱溶解したものを電気泳動用のゲルとして使用した。泳動用緩衝液には TAE 緩衝液を用い、100 V 定電圧で電気泳動を行った。DNA サイズマーカーとしては 100 bp ラダーもしくは 1 kbp ラダー (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を使用した。泳動用ゲルを臭化エチジウム (0.5 µg/ml ; 和光純薬) 溶液で 15 分間反応後、波長 312 nm の紫外線で DNA のバンドを可視化した。

8) 作製した菌株の生物学的性状の分析

(1) RT-PCR 法

RT-PCR 法は Nakano ら (2008) および Matsumoto-Nakano と Kuramitsu (2006) の方法に準じて行った。Fast RNA® Pro Blue kit (Q-Bio gene) と FastPrep® Cell Disrupter (Model FP 100A, Q-Bio gene, Carlsbad, CA, USA) を用いて RNA を抽出した。抽出した mRNA サンプルから SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行うことで cDNA を合成した。*cnm* 遺伝子の発現の確認には、*cnm* 遺伝子の配列をもとにプライマー 5'-CTA CCG TTT TCT ACT ATA AGA CTG GGG-3' および 5'-CCT TCT TGA CCG CGA TAA GAC TCA CTG CCA-3' を、*pac* 遺伝子の発現の確認には、*pac* 遺伝子の配列をもとにプライマー 5'-CCT AAA GGT GCT TTC CAA ATT TTC CGT GCC G-3' および 5'-CAG TCG GAT CAA GTG TTA AGG TCA AGG TCA CAT C-3' をそれぞれ設定した。55°C で 60 分加熱後、70°C で 15 分加熱して、100 ng の RNA から cDNA を転写した後、PCR 法を行った。PCR 法の反応は、熱変性 (94°C, 30 秒)、アニーリング (50°C, 30 秒)、伸長反応 (72°C, 30 秒) を 30 サイクル行った。TW871 株の DNA をポジティブコントロールとして使用した。

(2) Cnm タンパクの発現の評価(コラーゲン結合能の測定)

各供試菌のコラーゲン結合能は、Nomura ら (2012) の方法に準じて測定した。

まず、0.25 M 酢酸に溶解した I 型コラーゲン (Collagen (type I); Sigma) を 96 穴プレート (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) の各ウェルに 200 μ l (2mg) ずつ加え、4°C で一晩反応させた。このウェルを PBS で 3 回洗浄した後、37°C で 90 分間 5% Bovine Serum Albumin (BSA; SIGMA-ALDRICH, St. Luis, USA) で反応させた。その後、0.01% の Tween-20 (和光純薬) を含有したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 137 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄; 和光純薬) で洗浄した。BHI 液体培地で一晩培養した供試菌を PBS で洗浄後懸濁し、1 ウェル当たり 2×10^9 CFU (Colony Forming Unit) になるように添加した。37°C で 3 時間反応後、PBS で 3 時間洗浄し、25% ホルムアルデヒドでウェルの底に結合した菌を固定した。PBS で 3 回洗浄した後、200 μ l の 0.05% クリスタルバイオレット (和光純薬) で 1 分間染色し、PBS で 3 回洗浄した。その後、7% 酢酸 200 μ l を加えて、菌体コラーゲンに付着した染色剤を溶解させ、各ウェルの OD₅₉₅ 値を測定した。それぞれの株のコラーゲン結合能は、TW871 株の値を 100 として換算した。各菌株のコラーゲン結合能は 3 回測定し、平均土標準偏差で示した。統計学的有意差の検定には、ANOVA の Bonferroni 法を用いて、有意水準 5% 以下の場合を有意差ありとした。

(3) PA タンパクの発現の評価(脂肪酸結合性試験)

脂肪酸結合性試験は、従来の菌体疎水性評価の方法 (Rosenberg ら, 1980) を応用して行った。まず、40 ml の BHI 液体培地を用いて、各 *S. mutans* 株を 37°C で 16 時間培養した後、遠心処理により滅菌生理食塩水で 3 回洗浄し、滅菌生理食塩水で OD₅₅₀=0.6 になるように調整し、菌液 A を作成した。この菌液 A 3 ml に 600 μ l のオレイン酸 (和光純薬) を加え、ボルテックスミキサーにより 1 分間混和後に、室温で 10 分間静置して菌液 B を作成した。菌液 A および菌液 B の水層の濁度 (OD₅₅₀) を測定し、オレイン酸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、以下の計算式 {[(1 - 菌液 B の OD₅₅₀ 値) / 菌液 A の OD₅₅₀ 値] × 100 (%)} を用いて結合率とした。各菌株の脂肪酸結合率は 5 回測定し、平均土標準偏差で示した。統計学的有意差の検定には、ANOVA の Bonferroni 法を用いて、有意水準 5% 以下の場合を有意差ありとした。

2. マウス NASH モデルを用いた検討

1) 病原性の評価のための条件設定

マウス NASH モデルにおける実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会

の承認を得て行った。図 4 にプロトコールを示す。まず、実験 1 として、6 週齢の C57BL/6J マウス（オス；日本 SLC, 静岡）に通常食飼料（CE-2；日本 CREA, 東京）または高脂肪食飼料（HFD；日本 CREA, 東京）を摂取させた。HFD 群には、100 g 当たり 506.8 kcal (57.5% : 脂肪, 19.7% : タンパク質, 22.8% : 炭水化物) の HFD を使用した。HFD 中の飽和脂肪酸は 22.3%, 不飽和脂肪酸は 76.9% であった。飼料投与の 4 週後に肝臓を摘出し、生理食塩水で希釈した 3.7% リン酸緩衝ホルムアルデヒドで一晩固定した。固定後に凍結切片を作成し、ナイルブルー（Nile Blue）染色を行った。

実験 2 では、HFD 投与の 4 週後に頸静脈より 1×10^7 CFU の TW871 株, TW871CND 株, TW871PD 株 100 μl を投与する群と非投与の群に分け、実験 3 では TW871 株, TW871CND 株, TW871CNDcomp 株, TW871PD 株, TW871PDcomp 株および TW871CNPD 株を投与した。実験 2, 3 において、菌投与 12 週後（実験開始 16 週後）に体重を測定して屠殺を行った。屠殺時に心臓より採血するとともに、摘出した肝臓および内臓脂肪の観察と重量を測定した。内臓脂肪としては精巣上体周囲の脂肪を採取した。実験 2 における各群の血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）値および血清アラニンアミノトランスアミナーゼ（ALT）値の測定は、ファルコバイオシステムズ（京都）に依頼した。それぞれの結果は平均±標準誤差で示した。各群における統計学的有意差の検定には、ANOVA の Bonferroni 法を用いて、有意水準 5% 以下を有意差ありとした。

2) 組織学的分析

実験 2 の各群より摘出した肝臓組織を、10% 中性緩衝ホルマリン液（和光純薬）で一晩固定した。固定後パラフィン包埋し、薄さ 3 μm の切片を作製し、ヘマトキシリントリクローム（Masson's-trichrome; MT）染色を行い、肝臓組織における脂肪の蓄積、炎症性変化および線維化の有無を評価した。さらに、肝臓組織切片を脱パラフィン処理後、クエン酸緩衝液（三菱化学メディエンス、東京）にて 100°C で 1 時間反応させた後、Vectastain ABC キット（Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）を用いて、以下の手順で免疫組織染色を行った（Kojima ら, 2012）。まず、3% H₂O₂, 2.5% 馬血清にてブロッキングをした後、PBS で 100 倍に希釈した抗 IFN- γ モノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology, CA, USA）、PBS で 100 倍に希釈した抗メタロチオネインモノクローナル抗体（株式会社トランスジェニック、兵庫）を用いて、4°C で 12 時間反応させた。その後、2 次抗体として anti rabbit/mouse IgG Universal antibody（Vector Laboratories）を用いて発色させた。さらにヘマトキシリントリクローム液（武藤化学、

東京)にて対比染色を行った。

3) 各種臓器における供試菌の局在と経時的变化に関する分析

図 5 にプロトコールを示す。実験 4 では、飼料投与の 4 週後に、頸静脈より 1×10^7 CFU の TW871 株を投与したマウスを、1 時間、3 時間、6 時間後に屠殺し、血液と肝臓を摘出して肝臓は破碎した後に PBS にて段階希釀したものを、MSB 寒天培地に播種した。37°C で 48 時間培養した後、培地上のコロニー数を計測し、肝重量 (g) と血液量 (ml) で換算した。

また、培地上のコロニーのいくつかを分離して保存し、これらの回収した菌株と投与に用いた供試菌それぞれから染色体 DNA を抽出した。*S. mutans* 特異プライマーである MKD-F (5'-GGC ACC TTG GGA AGC TCA GTT-3') と MKD-R (5'-GGA ATG GCC GCT AAG TCA ACA GGA T-3') (Hoshino ら, 2004) および *Takara Ex Taq®* を用いた PCR 法により、*S. mutans* であることを確認した。反応は、熱変性 (98°C, 10 秒), アニーリングと伸長反応 (70°C, 1 分) を 30 サイクル行った。さらに、Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) 法によりそのフィンガープリントパターンを比較することで、遺伝子型が同一であることを確認した。AP-PCR 法は Li と Caufield (1998) の方法に従って、OPA-13 プライマー (5'-TGC CGA GCT G-3') と AmpliTaq Gold® (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を用いて行った。反応は、熱変性 (94°C, 30 秒), アニーリング (36°C, 30 秒), 伸張反応 (72°C, 1 分) を 45 サイクル行った。

一方で、実験 5 では、頸静脈より 1×10^7 CFU の TW871 株を投与したマウス 5 匹を 1 時間後に屠殺し、肺・心臓・血液・肝臓・脾臓・脾臓・大腸・腎臓を摘出した。摘出した各臓器を破碎して MSB 寒天培地に播種した後、37°C で 48 時間培養した後に培地上のコロニーを確認した。

さらに、実験 6 においては、頸静脈より 1×10^7 CFU の TW871 株、TW871CND 株および TW871PD 株を投与したマウスを 1 時間後に屠殺し、血液を採取するとともに肝臓を摘出して破碎した。その後、PBS にて段階希釀したものを MSB 寒天培地に播種し、37°C で 48 時間培養した後、培地上のコロニー数を計測し、肝重量 (g) と血液量 (ml) で換算した。

3. 脂肪酸結合性試験

1) 各種脂肪酸と肝臓細胞の結合能の比較

各種脂肪酸と肝臓細胞の結合能は、Gómez-Lechón ら (2007) と Hozumi ら (2000) の方法に準じて評価した。まず、ヒト肝臓癌由来細胞株 (Hepatocellular Carcinoma Cells; HepG2) (DS ファーマバイオメディカル株式会社、大阪) を 10% ウシ胎仔血

清 (fetal bovine serum; FBS) (ニチレイバイオサイエンス, 東京) と 1% ペニシリントレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (SIGMA-ALDRICH, 東京) を用いて, 37°C で二酸化炭素 5% の条件下で 24 時間培養した後, 1 mM の各種脂肪酸または PBS を添加して, 24 時間培養した。脂肪酸には, n-ヘキサデカン ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$; 和光純薬) と, 不飽和脂肪酸であるオレイン酸 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$; 和光純薬) およびリノール酸 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}:\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$; 和光純薬), 飽和脂肪酸であるパルミチン酸 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$; 和光純薬) およびトリパルミチン酸 ($(\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COO})_3\text{C}_3\text{H}_5$; 和光純薬) をそれぞれ使用した。培養後に PBS で 2 回洗浄し, 10% ホルマリン (和光純薬) にて室温で 10 分固定した後に PBS で 2 回洗浄した。次に, 1 ml の 60% イソプロパノール (和光純薬) に 1 分置換し, 1 ml の Oil Red O 染色液 (和光純薬) を細胞に加え, 室温で 20 分染色を行った。その後, 60% イソプロパノールで 1 回洗浄して PBS で 2 回洗浄した。最後に, 光学顕微鏡 (Inverted Microscope Olympus CKX41, Olympus, 大阪) で細胞への各種脂肪酸の蓄積を観察した。

2) 各種脂肪酸と各供試菌の結合能の比較

各種脂肪酸と各供試菌の結合能は 1.8) (3) PA タンパクの発現の評価 (脂肪酸結合性試験) の項目に記載の方法で行った。脂肪酸には, n-ヘキサデカン (和光純薬), 不飽和脂肪酸であるオレイン酸およびリノール酸と, 飽和脂肪酸であるパルミチン酸およびトリパルミチン酸をそれぞれ使用した。供試菌には, MT8148 株, TW295 株, TW871 株, TW871CND 株および TW871PD 株を使用した。結果は 5 回の平均士標準偏差で示し, 統計学的有意差の検定には, ANOVA の Bonferroni 法を用いて, 有意水準 5% 以下を有意差ありとした。

4. 培養細胞を用いた検討

1) 培養肝臓細胞への供試菌の付着能の比較

培養肝臓細胞への供試菌の付着能の測定は Kojima ら (2012) の方法に準じて行った。細胞数が 1×10^5 個になるよう調整した HepG2 細胞を, 抗生物質を添加していないメディウムで 24 時間 37°C 二酸化炭素 5% 条件下で, 24 ウエルの細胞培養プレート上に培養した。細胞の脂肪化にはオレイン酸を用いた。培養した細胞を PBS で 3 回洗浄した後, 1×10^7 CFU の各供試菌または 1 mM の脂肪酸を添加した 1×10^7 CFU の各供試菌を感染させ, 10 時間 37°C 二酸化炭素 5% 条件下で培養した。その後 PBS で 3 回洗浄し, 1 ml の滅菌水を加えて細胞を破碎した。この細胞破碎物を滅菌生理食塩水にて段階希釈し, MSB 寒天培地に播種した。37°C

で 48 時間, 窒素 95%, 二酸化炭素 5% の条件下で培養した後, 培地上のコロニー数を算定し, 総細胞数あたりに付着した菌数を以下の計算式{[付着した菌数/ HepG2 細胞に添加する前の菌数] × 100 (%)} より求めた. 同様に, リノール酸を添加して脂肪化した HepG2 細胞に TW871 株, TW871CND 株, TW871PD 株を感染させた場合の付着能も分析した. それぞれの結果は 3 回の平均±標準偏差で示した. 統計学的有意差の検定には, ANOVA の Bonferroni 法を用いて, 有意水準 5% 以下を有意差ありとした.

2) 培養肝臓細胞に付着している供試菌の視覚的な評価

培養肝臓細胞への供試菌の付着能を視覚的に評価するために, 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光二重染色法を行った (Nomura ら, 2013). まず, 前述と同様に各供試菌を感染させ培養した細胞を, PBS で 3 回洗浄した後 4% パラホルムアルデヒド (和光純薬) で 10 分固定し, PBS で 3 回洗浄した. HepG2 細胞に付着した TW871 株にはウサギ抗 *S. mutans* Cnm 抗体 (Nomura ら, 2012) を, 欠失株にはウサギ抗 *S. mutans* glucosyltransferase D 抗体 (Hamada ら, 1989) をそれぞれ 0.5% ウシ血清アルブミン (SIGMA-ALDRICH, 東京) を含む PBS (PBST) で 1:500 に希釈し, 室温で遮光して 1 時間培養した. 次に, PBS で 3 回洗浄した後に Alexa Fluor 633-conjugated goat anti rabbit immunoglobulin G (Molecular Probes[®]; Life Technologies Co., Eugene, OR, USA) を室温で遮光下にて 30 分反応させることで, 供試菌を赤く染色した. HepG2 細胞の細胞骨格を構成するアクチンを明示するために PBS で 3 回洗浄し, 0.4% TritonX-100 を室温で遮光下にて 5 分反応させた後に, Alexa Fluor 488-conjugated to phalloidin (Molecular Probes[®]; Life Technologies Co.) を室温で遮光下にて 30 分反応させ, 細胞骨格を緑に染色した. その後, TCS-SP5 microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) の DMI1600 B fluorescene microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) 63× 油浸対物レンズで観察した.

結果

1. 相補株および欠失株の性状

1) TW871CND 相補株の性状

RT-PCRにおいて、TW871CNDcomp 株より抽出した cDNA からは標的 *cnm* 遺伝子の増幅を認めた（図 6）。また、TW871CNDcomp 株では TW871CND 株で消失していたコラーゲン結合能の有意な回復を認めた（図 7）。

2) TW871PD 相補株の性状

RT-PCRにおいて、TW871PDcomp 株より抽出した cDNA からは標的 *pac* 遺伝子の増幅を認めた（図 8）。また、TW871PDcomp 株では TW871 株ほどではないが、TW871PD 株で減少していた脂肪酸結合率の有意な回復を認めた（図 9）。

3) TW871CNPD 株の性状

RT-PCRにおいて、TW871CNPD 株より抽出した cDNA からは *cnm* 遺伝子の増幅を認めなかった（図 10）。また、TW871CNPD 株ではコラーゲン結合能が完全に消失した（図 11）。

2. マウス NASH モデルを用いた検討

1) 実験開始 4 週後における肝臓組織の組織学的評価（実験 1）

6 週齢の C57BL/6J マウスに通常食飼料と高脂肪食飼料をそれぞれ 4 週間摂取させ、肝臓組織切片を作成しナイルブルー染色を行った結果、高脂肪食を摂取したマウスの肝臓組織において、脂肪滴の中に赤く染色された中性脂肪と青く染色された脂肪酸が認められた（図 12）。しかし、通常食を摂取したマウスの肝臓組織にこれらの所見は認められなかった。

2) 欠失株を用いた検討（実験 2）

（1）体重変化と肝臓および内臓脂肪の重量

実験開始 16 週後におけるマウスを観察したところ、TW871 株投与群のマウスの体重は他群のマウスと比較して有意に高い値を示した ($P < 0.01$)（図 13, 14）。また、TW871 株投与群の肝臓は非投与群の肝臓と比較して肥大しており、表面は白色を呈していた（図 15）。一方で、TW871CND 株投与群および TW871PD 株投与群の肝臓は、TW871 株投与群の肝臓と比較して肥大しておらず、非投与群と類似した状態を呈していた。TW871 株投与群の肝重量は非投与群と比較して有意に高い値を示し、*Cnm* および *PA* の欠失株投与群の肝重量は、TW871 株投与群と比較して有意に低い値を示した ($P < 0.01$)（図 16）。さらに、屠殺時のマ

ウスより採取した内臓脂肪を観察したところ、全ての群において内臓脂肪の性状や色に差異は認められなかつたが（図 17）、非投与群と比較して供試菌を投与した群の内臓脂肪重量が有意に低い値を示した ($P < 0.01$)（図 18）。

（2）血液生化学的検査

実験開始 16 週後における血清 AST 値は全ての群で有意な差を認めなかつたが、TW871 株投与群の血清 ALT 値は非投与群や TW871CND 株投与群、TW871PD 株投与群と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.01$)（図 19）。

3) 相補株と両タンパクの欠失株を用いた検討(実験 3)

TW871CND 株の相補株（TW871CNDcomp 株）と TW871PD 株の相補株（TW871PDcomp 株）を投与したマウスの体重は、実験開始 16 週後において、TW871 株投与群のマウスの体重と同程度まで 増加しており、TW871CND 株投与群と TW871PD 株投与群のマウスの体重と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.01$)（図 20）。一方で、TW871 株の Cnm タンパクと PA タンパクの両方を欠失させた変異株（TW871CNPD 株）を投与したマウスの体重は、TW871CND 株投与群と TW871PD 株投与群のマウスの体重よりも高く、TW871 株投与群よりも低い値を示した。次に、実験開始 16 週後のマウスより採取した肝臓の重量を測定したところ、TW871CNDcomp 株投与群および TW871PDcomp 株投与群の肝重量は、TW871CND 株投与群および TW871PD 株投与群の肝重量と比較して有意に高い値を示し、TW871CNPD 株投与群の肝重量は相補株投与群の肝重量と比較して有意に低い値を示した ($P < 0.05$)（図 21）。一方で、内臓脂肪重量に関しては、全ての群において有意差を認めなかつた（図 22）。

4) 菌の局在に関する検討(実験 4 および 5)

（1）肝臓と血液中における TW871 株の局在と経時的变化

1×10^7 CFU の TW871 株を頸静脈より投与し、1 時間後、3 時間後および 6 時間後の肝臓と血液における供試菌の局在を検討した結果、菌投与 1 時間後に摘出した肝臓から、最も多くの供試菌が回収され、その菌量は肝臓 1 g 中に約 3,000 CFU であった（図 23）。また、菌投与 3 時間後においても約 800 CFU/g の供試菌が肝臓から回収されたが、菌投与 6 時間後においては約 100 CFU/g しか回収されなかつた。一方で、血液 1 ml 中においては、菌投与 1 時間後に約 250 CFU、3 時間後に約 30 CFU の供試菌が回収されたが、6 時間後の血液中からは供試菌は回収されなかつた。さらに、肝臓および血液中からの回収された菌株のフィンガープリントパターンの確認を行つたところ、供試菌と肝臓および血液中から回収された菌株が同一のパターンを示すことが明らかとなつた（図 24）。実験 5 において、TW871 株投与 1 時間後の肺・心臓・血液・肝臓・脾臓・脾臓・

大腸・腎臓における供試菌の局在を検討した結果、肝臓、血液および脾臓からは 5 匹全てのマウスから供試菌が回収されたが、心臓と腎臓からは 5 匹中 2 匹のマウスからのみ供試菌が回収された（表 2）。一方で、肺、脾臓および大腸からは供試菌は回収されなかった。

（2）欠失株を用いた検討（実験 6）

1×10^7 CFU の TW871CND 株および TW871PD 株を投与したマウスの肝臓から回収された菌数は、TW871 株を投与した際と比較して有意に低い値を示した ($P < 0.01$) (図 25)。一方で、菌投与 1 時間後の血液 1 ml 中から回収された各供試菌の菌数は、TW871 株と TW871PD 株で約 500 CFU と同程度であり、TW871CND 株と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。

5) 肝臓組織切片を用いた検討

（1）肝臓組織切片を用いた病理組織学的分析

実験 2において、実験開始 16 週後の TW871 株投与群より摘出した肝臓組織を HE 染色で観察すると、非投与群と比較して大滴性の脂肪化と局所の炎症細胞浸潤が著明に認められた（図 26）。一方で、TW871CND 株投与群および TW871PD 株投与群の肝臓組織では、これらの所見は認められなかった。また、MT 染色で観察すると、TW871 株投与群の肝臓組織像では、肝実質の局所において青く染色された初発線維化像を認めた（図 27）。一方で、非投与群と欠失株投与群の肝臓組織像ではこれらの変化は見られなかった。

（2）肝臓組織切片を用いた免疫染色による検討

実験 2 のマウス NASH モデルにおいて、実験開始 16 週後に摘出した肝臓組織に免疫染色を行ったところ、TW871 株投与群より摘出した肝臓組織におけるメタロチオネインの発現は他群と比較して明らかに強いことがわかった（図 28）。一方で、IFN- γ の発現は TW871 株投与群より摘出した肝臓組織においてのみ認められた（図 29）。

3. 脂肪酸結合性試験

1) 脂肪酸と肝臓細胞の結合能の比較

不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸を反応させた HepG2 細胞では中性脂肪の蓄積を認めたが、飽和脂肪酸であるパルミチン酸とトリパルミチン酸では認められなかった（図 30）。また、飽和脂肪酸を反応させた HepG2 細胞は、PBS やヘキサデカンを反応させた HepG2 細胞と類似した所見を呈していた。一方で、オレイン酸を反応させた細胞では、リノール酸を反応させた細胞と比較して中性脂肪

の蓄積がより多く認められた。

2) 各種脂肪酸と各供試菌の結合能の比較

ヘキサデカンに対する PA タンパクを発現している MT8148 株, TW871 株, TW871CND 株の結合率が, PA タンパクを発現していない TW295 株と TW871PD 株と比較して有意に高い値を示した ($P<0.01$) (図 31). また, 不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸においても, PA タンパクを発現している MT8148 株, TW871 株, TW871CND 株の結合率が, PA タンパクを発現していない TW295 株および TW871PD 株と比較して, 有意に高い値を示した ($P<0.01$) (図 32). さらに, 飽和脂肪酸であるパルミチン酸とトリパルミチン酸においては, PA タンパクの欠失の有無にかかわらず, すべての菌株で高い脂肪酸との結合率を示した (図 33).

4. 培養肝臓細胞を用いた検討

1) 培養肝臓細胞への供試菌の付着能の比較

Cnm タンパクを発現している TW295 株と TW871 株の付着率は, Cnm タンパクを発現していない MT8148 株の付着率と比較して有意に高い値を示した ($P<0.05$) (図 34). また, Cnm タンパクを欠失させた TW871CND 株の付着率は, Cnm タンパクを発現する TW871 株と TW871PD 株と比較して有意に低い値を示した ($P<0.01$). 一方で, TW871PD 株の付着率は TW871 株と比較して有意に高い値を示した ($P<0.01$). さらに, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行うと, TW871 株が TW871CND 株と比較して HepG2 細胞により多く付着している像が認められた (図 35).

2) 脂肪化肝臓細胞への供試菌の付着能の比較

オレイン酸を添加して脂肪化した場合の HepG2 細胞への供試菌の付着能を分析した結果, PA タンパクを発現している MT8148 株と TW871 株の付着率は, PA タンパクを発現していない TW295 株と比較して高い値を示した ($P<0.01$) (図 36). また, PA タンパクを欠失させた TW871PD 株の付着率は, PA タンパクを発現する TW871 株と TW871CND 株と比較して有意に低い値を示した ($P<0.01$). さらに, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行うと, TW871 株が TW871PD 株よりもオレイン酸を添加して脂肪化した HepG2 細胞に多く付着している像が認められた (図 37). 一方で, リノール酸を添加して脂肪化した場合の HepG2 細胞への供試菌の付着能を分析すると, Cnm タンパクを欠失させた TW871CND 株の付着率は, Cnm タンパクを発現する TW871 株と TW871PD 株と比較して有意に低い値を示し ($P<0.01$), オレイン酸を添加した場合とは異なっていた (図 38). さらに,

共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行うと、TW871 株は TW871CND 株よりもリノール酸を添加して脂肪化した HepG2 細胞に対して多くの菌株が付着している像が認められた（図 39）。

考察

本研究におけるマウス NASH モデルを用いた検討では、*S. mutans* TW871 株によつて引き起こされる NASH の増悪化は、Cnm タンパクの欠失株 (TW871CND 株) および PA タンパクの欠失株 (TW871PD 株) を頸静脈より投与した際には認められなかつた。一方で、それぞれの相補株である TW871CNDcomp 株および TW871PDcomp 株を投与した際には NASH の増悪化が TW871 株を投与した時と同様に引き起こされた。これらのことから、*S. mutans* TW871 株において菌体表層に発現する Cnm タンパクおよび PA タンパクが、*S. mutans* の引き起こす NASH 増悪化において重要な役割を果たしていることが示された。

マウス NASH モデルにおいて、血液中に投与した *S. mutans* TW871 株は、血液中および肝臓において菌投与 6 時間後には消失したことから、血液中に侵入した菌は一過性にしか存在はしないが、その間に NASH 病状の増悪化に影響を与えていることが示唆された。また、肝臓から回収された菌数は、TW871 株群が TW871CND 株群および TW871PD 株群と比較して有意に高い値を示した。このことから、Cnm タンパクと PA タンパクの両方を発現している *S. mutans* 株が肝臓組織中により多く存在できることが示唆された。肝臓における供試菌の局在を検討する際には、胆嚢、肝動静脈および門脈周囲約 0.5 g の肝臓組織を採取した。肝臓では肝動脈および門脈より小葉へと血液が運ばれ、小葉から胆嚢へと胆汁が運ばれている。したがって、この胆嚢および血管周囲の組織において菌株が認められたことは、肝臓組織全体に菌株が存在していたことを示していると考えられる。

肝臓はグリコーゲン、タンパク質の他に脂質を 3~5% 蓄えるが、そのうち 2~3% はリン脂質で、さらに約 1% の中性脂肪および少量のコレステロール、遊離脂肪酸、グリセリドなどがある (Negoro, 1972)。HFD を 4 週間摂取したマウスの肝臓組織をナイルブルー染色で観察すると、脂肪酸および中性脂肪の蓄積が認められたため、いわゆる Two-hit theory における 1st hit 後の SS の状態を再現できていることが確認された。HFD には 76.9% の不飽和脂肪酸が含まれているため、HFD 群の肝臓に蓄積した脂肪酸は不飽和脂肪酸である可能性が高いと考えられる。したがって、本研究に用いたマウス NASH モデルにおいては、不飽和脂肪酸が蓄積した肝臓に供試菌が侵入するというモデルが構築されていることが示唆された。HFD における不飽和脂肪酸の主な成分はオレイン酸とリノール酸である。オレイン酸とリノール酸を多く含む一般的な食品として、オリーブ油やひまわり油のような植物油、落花生やアーモンドのようなナッツ類お

より牛肉や豚肉のような肉類が知られている。したがって、ヒトにおいては、植物油の過剰摂取が当てはまると考えられる。

菌投与 16 週のマウスの内臓脂肪重量が非投与群と比較して投与群で低い値を示した（図 18）のは、投与群のマウスは内臓脂肪ではなく肝臓において脂肪が蓄積したためであると考えられる。また、TW871CNPD 株投与群の体重は TW871CND 株投与群および TW871PD 株投与群よりも高く、肝重量の重い TW871 株投与群の体重と近い値を示した（図 20）。これは、TW871CNPD 株投与群の内臓脂肪重量が TW871 株投与群および欠失株投与群よりも高い値を示しているためであると考えられるが、Cnm タンパクおよび PA タンパク以外の菌体表層タンパクが関与している可能性もあるため、今後検討していきたいと考えている。

血液中から回収された菌数は、TW871CND 株群と比較して TW871 株群が有意に高い値を示した（図 25）が、TW871PD 株群は TW871 株群よりも高い値を示した。これは、PA タンパクを欠失した菌株は抗原性の低下により、血液中に侵入した際に多形核白血球の貪食を受けにくくなること（Nakano ら、2006）が主に関与しているためであると思われる。また、血液中のコラーゲンやフィブリノーゲンに Cnm タンパクを発現する *S. mutans* が付着しやすくなること（Nomura ら、2013）も関与していると考えられる。さらに、TW871 株は PA タンパクと Cnm タンパクの両方を発現するのに対して、TW871PD 株は Cnm タンパクのみを発現している。すなわち、TW871 株では PA タンパクが Cnm タンパクを覆うように発現しているために Cnm タンパクのみが発現している TW871PD 株の方が血液中で多く検出されたと考えている。

本研究のマウス NASH モデルにおいて、頸静脈から投与する菌量を 1×10^7 CFU に設定し、TW871 株投与群のマウスに NASH の増悪化が引き起こされることが示された。頸静脈より投与する TW871 株の菌量を 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^8 CFU にした場合のマウスの体重と肝重量を比較検討したところ、 1×10^8 CFU の菌株を投与したマウスは死亡し、 1×10^6 CFU 以下の菌株を投与したマウスの体重と肝重量は増加を認めなかった。このことから、NASH 増悪化を引き起こすためには、ある一定以上の菌株が血液中に侵入する必要があると示された。また、ある一定量以上の菌量では、生体に重度な菌血症を生じさせていることも示唆された。これまでに、抜歯を行ったヒトの約 60% で 1×10^4 CFU/ml 以上の細菌が血液中に存在していたことが示されている（Lockhart ら、2008）。また、約 20% のヒトにおいては、ブラッシングを行っただけでも、同様の菌量が血液中で検出されると報告されている。さらに、1 mg のデンタルプラーク中には 1×10^7 CFU 以上の細菌が存在していることが知られている（Gibbons ら、1964）。したがって、一部のヒトでは血液中への細菌の侵入が日常で頻繁に起こり、持続的に菌血症

が生じている可能性があるため、本研究のマウスモデルと同様の状況が生じる可能性はあると考えられる。マウスの寿命を約2年、ヒトの寿命を約80年として、本研究のマウスNASHモデルをヒトで想定すると、2nd hitが生じて約9年経過するとNASHの増悪化が引き起こされることが予想される。

NASH発生機序としてTwo-hit-theoryが考えられており、本研究のマウスNASHモデルにおいても、4週間高脂肪食を与えることで1st hitを起こした後に、2nd hitとして菌株を投与し、NASH増悪化に関する検討を行った。しかし、菌株の感染は1st hitの時点で生じている可能性もあるため、高脂肪食の投与を開始する時点で菌株を投与した場合のNASH増悪化に関しても今後検討したいと考えている。

これまでの当教室で行ったマウスNASHモデルを用いた研究から、*S. mutans*によるNASH増悪化は、メタロチオネイン、ケモカイン、アポリポタンパク、インターロイキン、IFN- γ などのサイトカインに関連する遺伝子発現の上昇によって引き起こされることを明らかにした(Nakaら, 2014)。特にメタロチオネインとIFN- γ の遺伝子発現の上昇が高く認められたため、本研究では2nd hitを引き起こす酸化ストレスや炎症性変化の原因となる因子でもあるメタロチオネインとIFN- γ に着目して免疫染色を用いた検討を行った。メタロチオネインは肝臓や腎臓に常に発現しているが、過剰発現すると酸化ストレスや活性酸素を生成するとされている(SatoとBremner, 1993)。また、IFN- γ の過剰発現は*S. mutans*によるNASH増悪化を引き起こす可能性があることが明らかになっている(Changら, 2015)。本研究において免疫染色を行ったところ、TW871株投与群より摘出した肝臓組織におけるメタロチオネインの発現は他群と比較して明らかに増強されており、IFN- γ の発現はTW871株投与群より摘出した肝臓組織においてのみ認められた。このことから、Cnm $^+$ /PA $^+$ の*S. mutans*株が肝臓組織でIFN- γ とメタロチオネインの発現を上昇させることで酸化ストレスや炎症性反応を惹起させ、NASHの病状の増悪化を引き起こしていることが想定された。

本研究において、不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸を反応させたHepG2細胞では中性脂肪の蓄積を認めたが、飽和脂肪酸であるパルミチン酸とトリパルミチン酸を反応させたHepG2細胞では中性脂肪の蓄積を認めなかった。オレイン酸を反応させたHepG2細胞はNAFLDモデルとして有用であると報告されている(Mohammadら, 2016)。本研究においても、オレイン酸を反応させた細胞は、リノール酸を反応させた細胞と比較して中性脂肪の蓄積がより多く認められた。これらのことから、オレイン酸が肝臓培養細胞の脂肪化に最も適していると考え、脂肪化した肝臓細胞に対する供試菌の付着能の比較にオレイン酸を主に用いた。

飽和脂肪酸と各種供試菌の結合率は不飽和脂肪酸と比較して高い値を示している。しかし、脂肪酸と培養肝臓細胞の結合能を比較したところ、不飽和脂肪酸を反応させた培養肝臓細胞では中性脂肪の蓄積を認めたが、飽和脂肪酸では認められなかった。また、マウス NASH モデルにおいて TW871 株投与群においてのみ NASH の増悪化が引き起こされたことから、不飽和脂肪酸と各種供試菌の結合率の違いが NASH の増悪化に関与している可能性が高いと考えられる。

S. mutans 菌体表層のタンパク抗原である PA タンパクは、細菌の疎水性に関与していることが知られており (Koga ら, 1990)、PA タンパクの存在が供試菌と脂肪酸との結合に関連している可能性があるのではないかと考えた。本研究において、PA タンパクを発現する MT8148 株および TW871 株では、PA タンパクを発現しない TW295 株と比較して、不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸に対して有意に高い結合率を示した。また、PA タンパクを欠失させた TW871PD 株では、TW871 株と比較して不飽和脂肪酸に対して有意に低い結合率を示した。これらのことから、不飽和脂肪酸を過剰に摂取すると *S. mutans* の肝臓での蓄積が早まることで、NASH の増悪化が引き起こされることが示唆された。

Cnm タンパクは *S. mutans* が血管内皮細胞へ付着および侵入して感染性心内膜炎を引き起こす上で、病原性の発揮に深く関与していると報告されている (Nomura ら, 2013)。本研究では、Cnm タンパクを発現する TW295 株および TW871 株が、Cnm タンパクを発現しない TW871CND 株および MT8148 株と比較して、有意に高い肝臓細胞に対する付着能を示した。このことから、肝臓細胞への付着には Cnm タンパクが関与しており *S. mutans* が引き起こす NASH 増悪化の重要な因子の 1 つである可能性が考えられた。また、オレイン酸を反応させて肝臓細胞を脂肪化させた場合、Cnm タンパクによる肝臓細胞への付着能が有意に減少した。このことは、オレイン酸によって PA タンパクへの付着能の増加が生じたか、あるいはオレイン酸によって新しい付着因子が誘導された可能性が考えられた。また、TW871PD 株は TW871 株よりも肝臓細胞に対して有意に高い付着能を示したことから、PA タンパクが Cnm タンパクを部分的に覆うように発現している可能性や、PA タンパクが不活化することで Cnm タンパクの発現がより強くなるように誘導される可能性が想定される。さらに、PA タンパクが不活化すると別の付着因子が誘導される可能性も考えられる。これらのことから、Cnm タンパクは肝臓細胞の付着に関与しており、肝臓細胞が脂肪化した場合には Cnm タンパクよりも PA タンパクによる脂肪酸への結合が強く見られるが、Cnm タンパクによる肝臓細胞への付着が加わると、より多くの菌株が肝臓に蓄積するため、両方のタンパ

クを発現する *S. mutans* 株は、Two-hit theory における 2nd Hit として NASH を増悪化させると考えられる。

S. mutans 株の菌体表層に発現している PA タンパクは PAc と呼ばれ、*S. mutans* と同じ口腔レンサ球菌である *Streptococcus sobrinus* の菌体表層に発現する PA タンパクは、PAg と呼ばれている (Okahashi ら, 1986)。今後、他のレンサ球菌の発現する PA タンパクの NASH 増悪化に対する影響に関する調査を行っていきたいと考えている。

PA タンパクを発現する *S. mutans* は、口腔内に存在する株のうち 90% 以上の頻度で認められるとされている (Nakano ら, 2006)。一方で、Cnm を発現する *S. mutans* が口腔内から約 10% 程度しか認められず、そのうちの 75% が PA タンパクを発現することが示されている (Nomura ら, 2013)。これらのことから、Cnm⁺/PA⁺ の *S. mutans* 株の保有者の分布頻度は約 7.5% であると予想される。このタイプの株を保有する対象は *S. mutans* が引き起こす NASH 増悪化のハイリスク群である可能性があると思われるため、今後大規模臨床研究を行っていきたいと考えている。

本研究で用いたマウスでは血液中に抗体が存在しないが、ヒトにおいては血液中に抗体が存在するため、肝臓まで *S. mutans* が到達することは困難である可能性がある。また、PA タンパクは各種炎症性サイトカインの分泌に関与することが示されている (Engels-Deutsch ら, 2003)。しかし、NASH 患者は血液中の抗体価が低下しているため、肝臓まで *S. mutans* が到達し、NASH 増悪化が引き起こされている可能性もある。今後臨床研究を行う際には、NASH 患者の血液中の抗体との関連性も検討していきたいと考えている。

本研究の結果から、Cnm⁺/PA⁺ の *S. mutans* 株は、脂肪酸の蓄積はじめた肝臓組織に一定時間局在することによって、炎症性サイトカインである IFN- γ による炎症性変化やメタロチオネインによる酸化ストレスの産生を誘発し、Two-hit theory における 2nd Hit として NASH の増悪化を引き起こすのではないかと考えられる (図 40)。今後、*S. mutans* 以外の口腔細菌についても NASH に与える影響についてさらに検証していきたいと考えている。

結論

S. mutans TW871 株の発現する 2 つの主要な菌体表層タンパクである Cnm タンパクと PA タンパクに着目して NASH 増悪化のメカニズムを検討したところ、以下の結果を得た。

- (1) 血中に侵入した TW871 株は、肝臓組織に一定時間局在することで IFN- γ とメタロチオネインの発現を上昇させて炎症性変化や酸化ストレスを惹起する。
- (2) TW871 株は菌体表層の Cnm タンパクを介して肝臓細胞に付着する。
- (3) TW871 株は菌体表層の PA タンパクを介して、肝臓に蓄積した不飽和脂肪酸と結合する。

以上のことから、血液中から侵入した Cnm⁺/PA⁺ の *S. mutans* 株は、肝臓組織に一定時間局在することで、NASH の成立におけるいわゆる Two-hit theory の 2nd Hit の一要因として増悪化に関与していることが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり，終始御懇意なる御指導を賜りました 大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（小児歯科学教室）仲野 和彦 教授に心から謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、終始様々な御指導と御校閲をいただきました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（小児歯科学教室），野村 良太 准教授，仲 周平 助教および岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児歯科学分野，仲野 道代 教授，高島 由紀子 助教に厚く御礼申し上げます。

最後になりましたが、終始研究に対し御理解と御協力をいただいた，大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

- Abrances, J., J. H. Miller, A. R. Martinez, P. J. Simpson-Haidaris, R. A. Burne, and J. A. Lemos.** 2011. The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect. Immun.* 7, 2277-2284.
- Ascha, M. S., I. A. Hanouneh, R. Lopez, T. A. Tamimi, A. F. Feldstein, and N. N. Zein.** 2010. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 51, 1972-1978.
- Chang, C. C., C. L. Wu, W. W. Su, K. L. Shih, D. C. Tarn, C. T. Chou, T. Y. Chen, C. T. Kor, and H. M. Wu.** 2015. Interferon gamma-induced protein 10 is associated with insulin resistance and incident diabetes in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* 5, 10096.
- Day, C. P., and O. F. James.** 1998. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114, 842-845.
- Diehl, A. M.** 1999. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin. Liver. Dis.* 19, 221-229.
- Dunny, G. M., L. N. Lee, and D. J. LeBlanc.** 1991. Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1194-1201.
- Engels-Deutsch, M., A. Pini, Y. Yamashita, Y. Shibata, Y. Haikel, M. Schöller-Guinard, and J. P. Klein.** 2003. Insertional inactivation of *pac* and *rmlB* genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. *Infect. Immun.* 71, 5169-5177.
- Forester, H., N. Hunter, and K. W. Knox.** 1983. Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2779-2788.
- Gómez-Lechón, M. J., M. T. Donato, A. Martínez-Romero, N. Jiménez, J. V. Castell, and J. E. O'Connor.** 2007. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem. Biol. Interact.* 165, 106-116.
- Gibbons, R. J., S. S. Socransky, W. C. Dearaujo, and J. Vanhouste.** 1964. Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque. *Arch. Oral Biol.* 9, 365–370.
- Hamada, S., T. Horikoshi, T. Minami, N. Okahashi, and T. Koga.** 1989. Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype c *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 335-344.

- Hoshino, T., M. Kawaguchi, N. Shimizu, N. Hoshino, T. Ooshima, and T. Fujiwara.** 2004. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48, 195-199.
- Hozumi, Y., M. Kawano, and V. C. Jordan.** 2000. *In vitro* study of the effect of raloxifene on lipid metabolism compared with tamoxifen. *Eur. J. Endocrinol.* 143, 427-430.
- 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.
- Kojima, A., K. Nakano, K. Wada, H. Takahashi, K. Katayama, M. Yoneda, T. Higurashi, R. Nomura, K. Hokamura, Y. Muranaka, N. Matsuhashi, K. Umemura, Y. Kamisaki, A. Nakajima, and T. Ooshima.** 2012. Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Sci. Rep.* 2, 332.
- Kris-Etherton, P. M.** 1999. For the American Heart Association. Nutrition Committee. AHA Science Advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 100, 1253-1258.
- Kumar, A. K., and P. Goswami.** 2008. Purification and properties of a novel broad substrate specific alcohol oxidase from *Aspergillus terreus* MTCC 6324. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784, 1552-1559.
- Lee, S. F., A. Progulske-Fox, G. W. Erdos, D. A. Piacentini, G. Y. Ayakawa, P. J. Crowley, and A. S. Bleiweis.** 1989. Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). *Infect. Immun.* 57, 3306-3313.
- Li, Y., and P. W. Caufield.** 1998. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of *mutans streptococci* from humans. *Oral Microbiol. Immunol.* 13, 17-22.
- Lindler, L. E. and F. L. Macrina.** 1986. Characterization of genetic transformation in *Streptococcus mutans* by using a novel high-efficiency plasmid marker rescue system. *J. Bacteriol.* 166, 658-665.
- Lockhart P. B., M. T. Brennan, H. C. Sasser, P. C. Fox, B. J. Paster, and F. K. Bahrani-Mougeot.** 2008. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*. 117, 3118-3125.

- Ludwig, J., T. R. Viggiano, D. B. McGill, and B. J. Oh.** 1980. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* 55, 434-438.
- Matsumoto-Nakano, M., and H. K. Kuramitsu.** 2006. Role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 188, 8095-8102.
- Matsumoto-Nakano, M., K. Fujita, and T. Ooshima.** 2007. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 22, 30-35.
- McNamara, D. J.** 1990. Relationship between blood and dietary cholesterol in Meat and Health, (ed. Pearson, A. M. & Dutson, T. R.) 63-87 (Elsevier Applied Science).
- Mohammad, J., M. J. Alkhatatbeh, L. F. Lincz, and R. F. Thorne.** 2016. Low simvastatin concentrations reduce oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells: An *in vitro* model of non-alcoholic fatty liver disease. *Exp. Ther. Med.* 11, 1487-1492.
- Murray, R. K., D. K. Granner, and V. W. Rodwell.** 2006. Harper's Illustrated Biochemistry, 27th ed. McGraw-Hill Companies. 124.
- Naka, S., R. Nomura, Y. Takashima, R. Okawa, T. Ooshima, and K. Nakano.** 2014. A specific *Streptococcus mutans* strain aggravates non-alcoholic fatty liver disease. *Oral Dis.* 20, 700-706.
- Nakano, K., H. Nemoto, R. Nomura, H. Homma, H. Yoshioka, Y. Shudo, H. Hata, K. Toda, K. Taniguchi, A. Amano, and T. Ooshima.** 2007. Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients. *J. Med. Microbiol.* 56, 551-556.
- Nakano, K., and T. Ooshima.** 2009. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol.* 4, 891-902.
- Nakano, K., K. Hokamura, N. Taniguchi, K. Wada, C. Kudo, R. Nomura, A. Kojima, S. Naka, Y. Muranaka, M. Thura, A. Nakajima, K. Masuda, I. Nakagawa, P. Spezziale, N. Shimada, A. Amano, Y. Kamisaki, T. Tanaka, K. Umemura, and T. Ooshima.** 2011. The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nat. Commun.* 2, 485.
- Nakano, K., M. Tsuji, K. Nishimura, R. Nomura, and T. Ooshima.** 2006. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. *Microbes Infect.* 8, 114-121.

- Nakano, K., R. Nomura, H. Nemoto, J. Lapirattanakul, N. Taniguchi, L. Grönroos, S. Alaluusua, and T. Ooshima.** 2008. Protein antigen in serotype *k* *Streptococcus mutans* clinical isolates. *J. Dent. Res.* 87, 964-968.
- Nakano, K., R. Nomura, I. Nakagawa, S. Hamada, and T. Ooshima.** 2004a. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, *k*, in the human oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 42, 198-202.
- Nakano, K., R. Nomura, N. Shimizu, I. Nakagawa, S. Hamada, and T. Ooshima.** 2004b. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype *k* strains. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4925-4930.
- Nakano, K., R. Nomura, N. Taniguchi, J. Lapirattanakul, A. Kojima, S. Naka, P. Senawongse, R. Srisatjaluk, L. Grönroos, S. Alaluusua, M. Matsumoto, and T. Ooshima.** 2010. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesion. *Arch. Oral Biol.* 55, 34-39.
- Negoro T.** 1972. Histochemical Observations on Early Changes of Various Experimental Fatty Livers in Rats. *The Journal of Kansai Medical University* 24(2), 187-212
- Nomura, R., K. Nakano, and T. Ooshima.** 2005. Molecular analysis of the genes involved in the biosynthesis of serotype specific polysaccharide in the novel serotype *k* strains of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 20, 303-309.
- Nomura, R., K. Nakano, S. Naka, H. Nemoto, K. Masuda, J. Lapirattanakul, S. Alaluusua, M. Matsumoto, S. Kawabata, and T. Ooshima.** 2012. Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral Microbiol.* 27, 308-323.
- Nomura, R., S. Naka, H. Nemoto, M. Otsugu, S. Nakamura, T. Ooshima, and K. Nakano.** 2013. Potential high virulence for infective endocarditis in *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins but lacking PA expression. *Arch. Oral Biol.* 58, 1627-1634.
- Nozaki, Y., K. Fujita, M. Yoneda, K. Wada, Y. Shinohara, H. Takahashi, H. Kirikoshi, M. Inamori, K. Kubota, S. Saito, T. Mizoue, N. Masaki, Y. Nagashima, Y. Terauchi, and A. Nakajima.** 2009. Long-term combination therapy of ezetimibe and acarbose for non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 51, 548-556.

- Okahashi N., T. Koga, and S. Hamada.** 1986. Purification and immunochemical properties of a protein antigen from serotype *g* *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Immunol.* 30, 35-47.
- Oliver, M. F.** 1990. Introduction: Lipids and coronary diseases resolved and unresolved problems. *Br. Med. Bull.* 46, 865-872.
- Ooshima, T., A. Izumitani, S. Sobue, and S. Hamada.** 1983. Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 36, 219-223.
- Paniagua, J. A., A. G. de la Sacristana, E. Sánchez, I. Romero, A. Vidal-Puig, F. J. Berral, A. Escribano, M. J. Moyano, P. Peréz-Martínez, J. López-Miranda, and F. Pérez-Jiménez.** 2007. A MUFA-rich diet improves posprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J. Am. Coll. Nutr.* 26, 434-444.
- Reiser, R., and F. B. Shorland.** 1990. Meat fats and fatty acids in Meat and Health, (ed. Pearson, A. M. & Dutson, T. R.) 21-62 (Elsevier Applied Science).
- Rosenberg, M., D. Gutnick, and E. Rosenberg.** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29-33.
- Russell, M. W., and T. Lehner.** 1978. Characterisation of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype *c*. *Arch. Oral Biol.* 23, 7-15.
- 笹森典雄.** 2002. 人間 ドッグ全国集計成績. *日病院会誌*, 49, 1951-1996.
- Sanyal, A.** 2001. Nonalcoholic steatohepatitis. *Indian J Gastroenterol.* 20, C64-70.
- Sato, M., and I. Bremner.** 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 325-337.
- Sato, Y., K. Okamoto, A. Kagami, Y. Yamamoto, T. Igarashi, and H. Kizaki.** 2004. *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. *J. Dent. Res.* 83, 534-539.
- Sherlock, S.** 1983. Acute fatty liver of pregnancy and the microvesicular fat diseases. *Gut.* 24, 265-269.
- 谷川久一.** 2003. 肝胆膵疾患こそ生活習慣病のトップ. *肝胆膵*, 46, 127-129.
- Tobian, J. A., and F. L. Macrina.** 1982. Helper plasmid cloning in *Streptococcus sanguis*: cloning of a tetracycline resistance determinant from the *Streptococcus mutans* chromosome. *J Bacteriol.* 152, 215-222.

表1 本研究に用いた *S. mutans* 株

菌株	血清型	Cnm タンパク	PA タンパク	性状	文献
MT8148	c	-	+	日本人小児口腔分離株	Ooshima ら (1983)
TW295	k	+	-	拔歯後菌血症患者からの血液分離株 (東京女子医科大学 菊池 賢 教授よ り供与)	Nakano ら (2004a)
TW871	k	+	+	感染性心内膜炎患者からの血液分離株 (東京女子医科大学 菊池 賢 教授よ り供与)	Nakano ら (2004a)
TW871CND	k	-	+	Em ^r ; TW871 株の Cnm タンパクをコード する遺伝子を不活化した変異株	Nakano ら (2010)
TW871CNDcomp	k	+	+	Em ^r Spe ^r ; TW871CND 株において遺伝 子操作によって Cnm タンパクを発現す るようにした変異株	本研究
TW871PD	k	+	-	Em ^r ; TW871 株の PA タンパクをコード する遺伝子を不活化した変異株	Nomura ら (2013)
TW871PDcomp	k	+	+	Em ^r ; TW871PD 株において遺伝子操作 によって PA タンパクを発現するようにな った変異株	本研究
TW871CNPD	k	-	-	Em ^r Km ^r ; TW871 株の cnm 遺伝子と PA タンパクをコードする遺伝子を不活化 した変異株	本研究

Em^r; エリスロマイシン耐性、Spe^r; ストレプトマイシン耐性、Km^r; カナマイシン耐性

本研究では 3 つの臨床分離株と 5 つの変異株を使用した。

表 2 感染 1 時間後における TW871 株の各臓器からの検出(実験 5)

摘出臓器	菌が回収されたマウスの数
肝臓	5/5
血液	5/5
脾臓	5/5
心臓	2/5
腎臓	2/5
肺	0/5
膵臓	0/5
大腸	0/5

実験 5 より、肝臓、血液および脾臓からは 5 匹全てのマウスから TW871 株が回収されたが、心臓と腎臓からは 5 匹中 2 匹のマウスからのみ TW871 株が回収された。

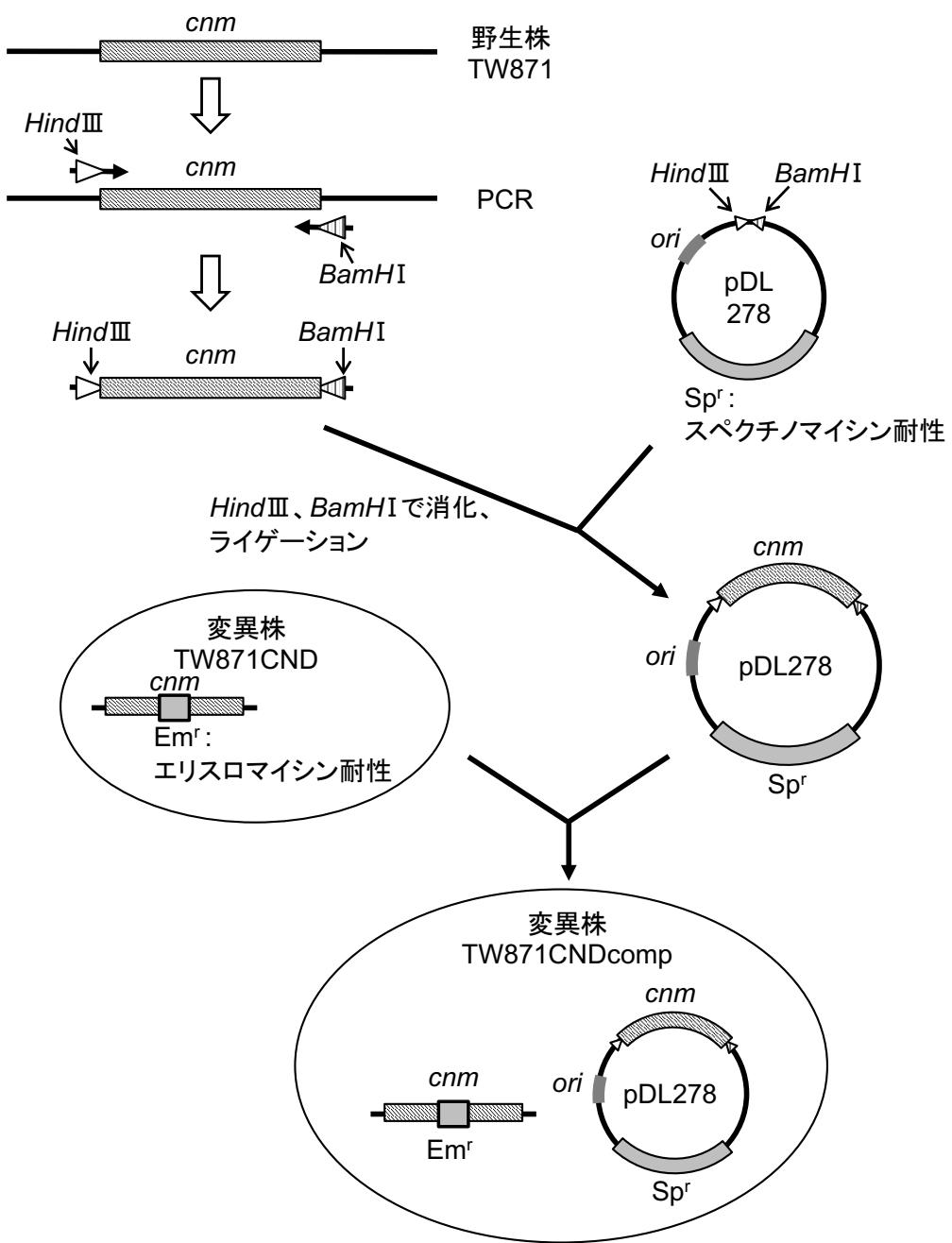
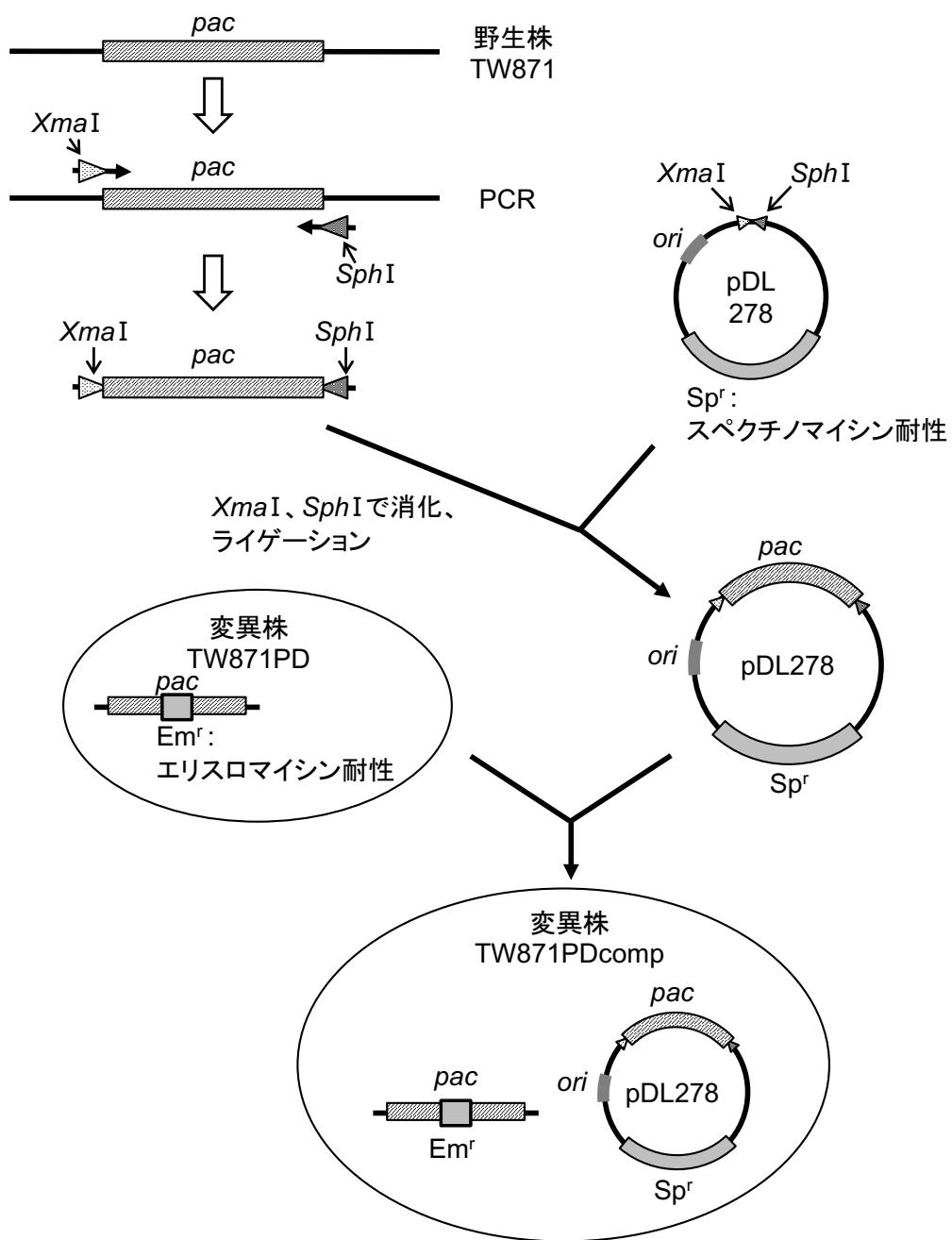


図 1 TW871CND 相補株の作製手順

PCR 法にて増幅した *cnm* 遺伝子を *HindIII* と *BamHI* で消化し, *pDL278* に挿入してスペクチノマイシン耐性のシャトルベクターを作製した。このシャトルベクターをエレクトロポレーションにより TW871CND 株の菌体内に挿入して TW871CND 相補株を作製した。



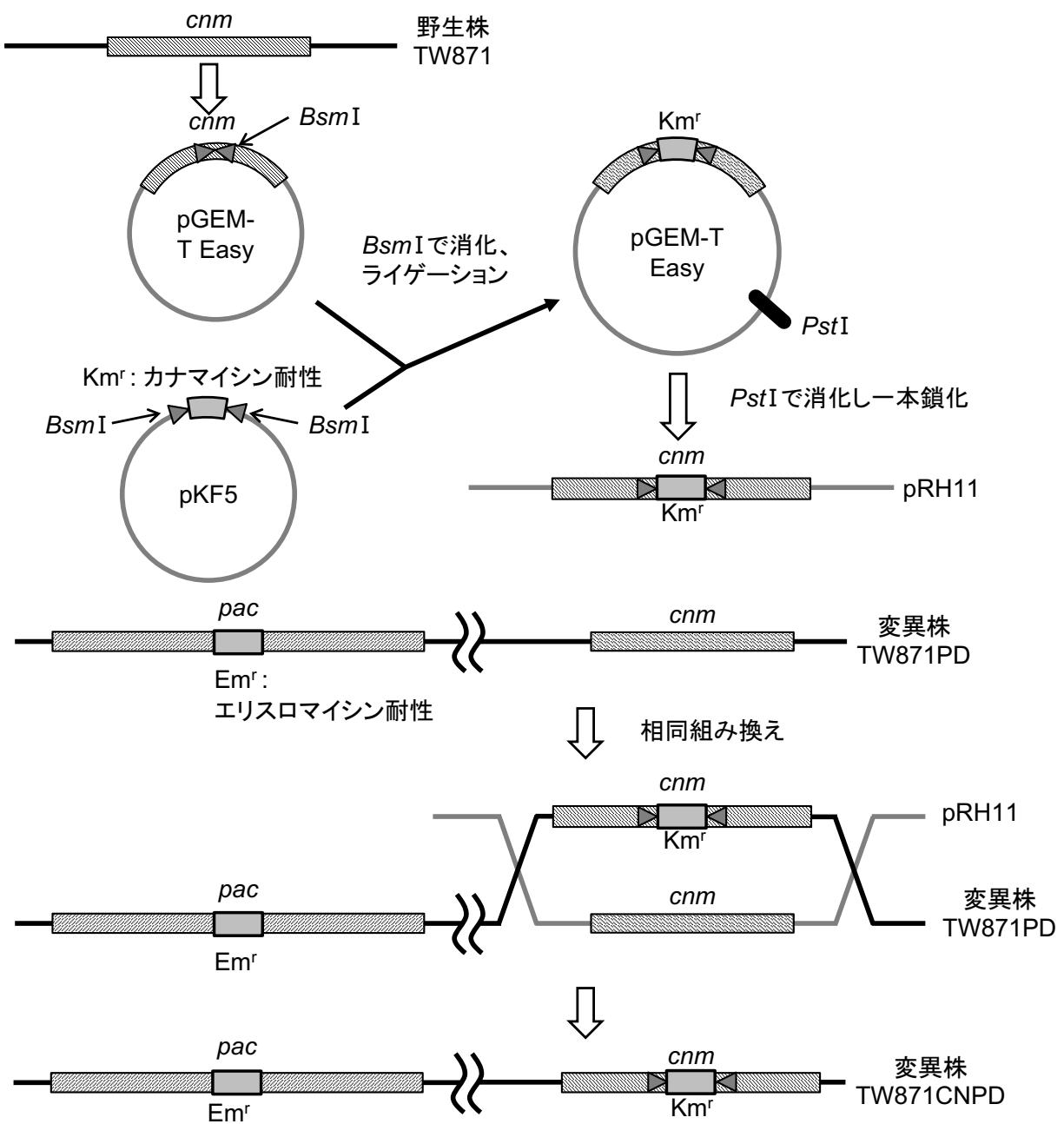


図 3 TW871CNPD 株の作製手順

PCR 法にて増幅したカナマイシン耐性遺伝子カセットを、*cnm* 遺伝子の中央部を *BsmI* で消化した pGEM-T Easy に挿入し、プラスミド pRH11 を作製した。このプラスミドを用いて TW871PD 株に形質転換し、*cnm* 遺伝子を不活化した変異株を作製した。

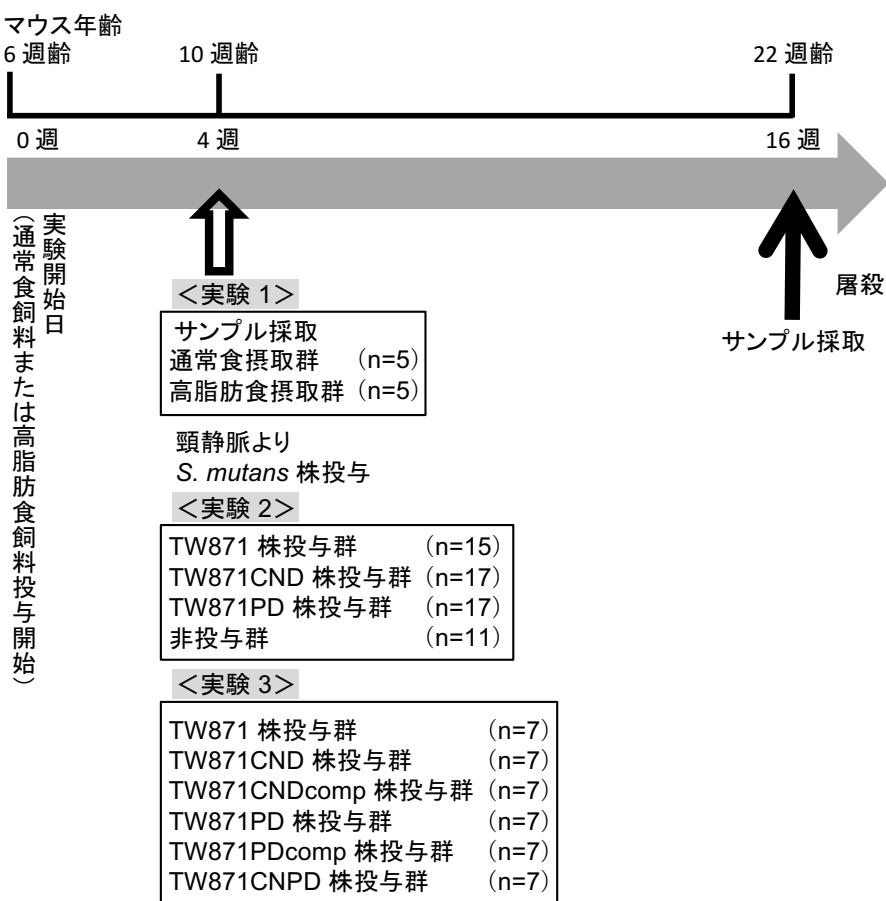


図 4 マウス NASH モデルを用いた本研究のプロトコール
 実験 1 では実験開始 4 週後の肝臓を採取した。実験 2 および 3 では実験開始 4 週後に *S. mutans* を頸静脈より投与し、16 週後に屠殺を行いマウスよりサンプル採取を行った。

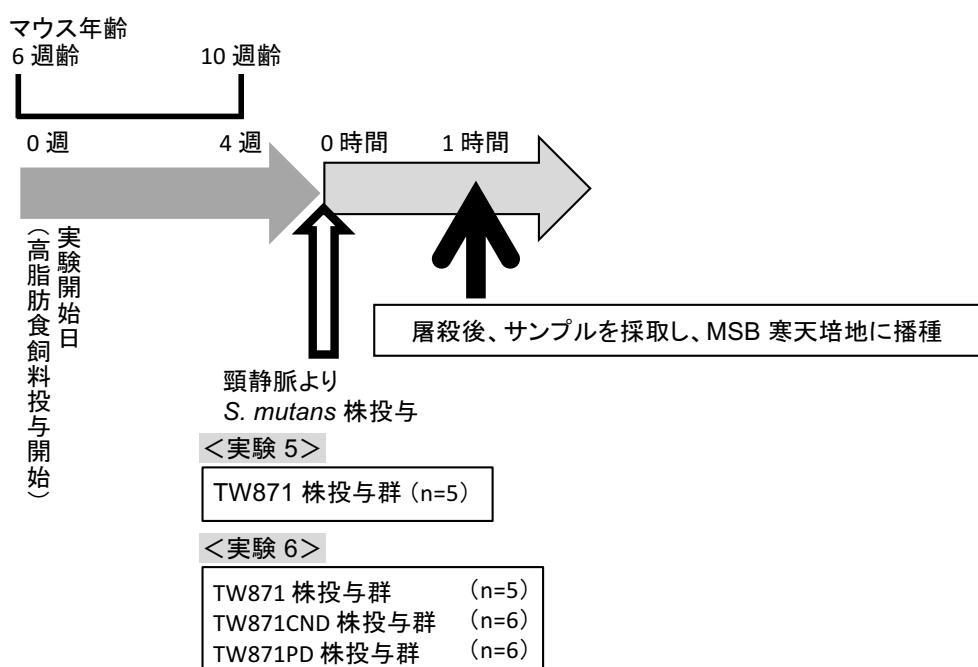
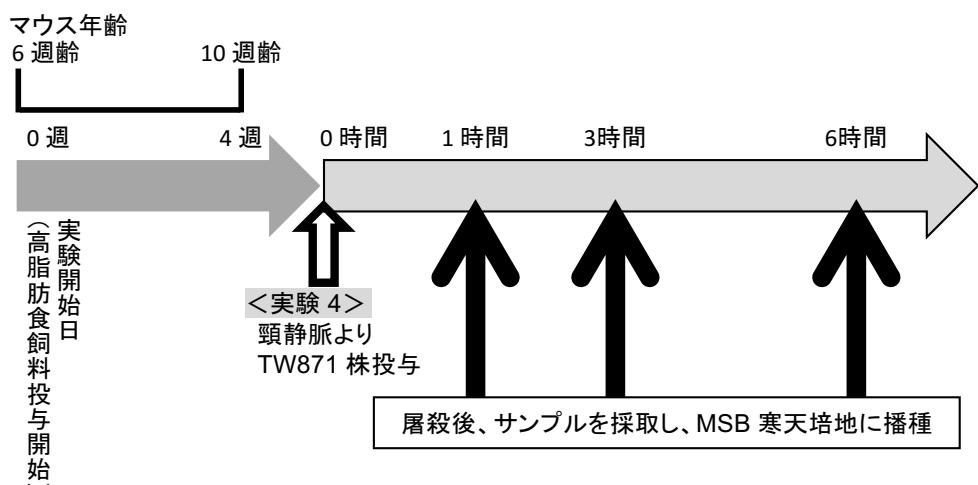


図5 マウス NASH モデルを用いた菌の回収のプロトコール
実験開始 4 週後に *S. mutans* を頸静脈より投与し、各種臓器における菌株の局在と経時的な変化に関して分析した。

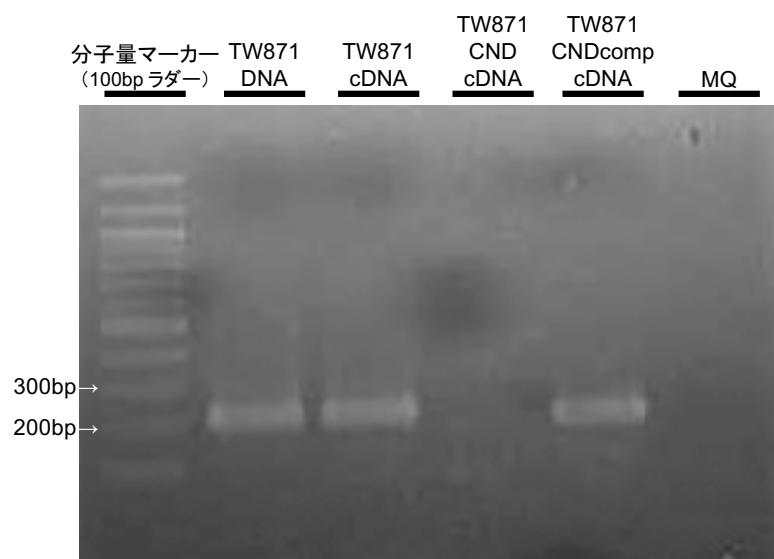


図 6 RT-PCR 法を用いた TW871CND 相補株の作製の確認
RT-PCR 法において、TW871CNDcomp 株では、*cnm* 遺伝子
による cDNA のゲル像(205bp)を認めた

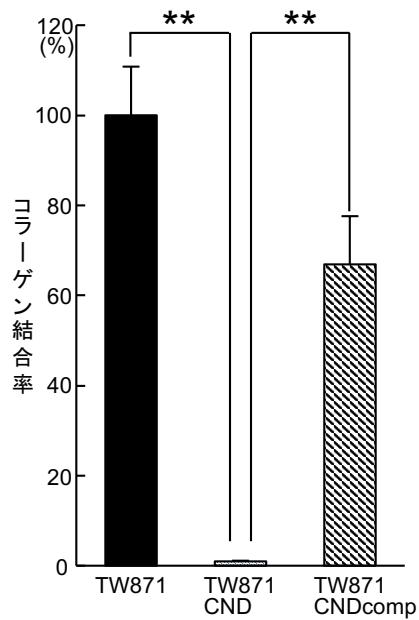


図 7 コラーゲン結合能の比較による
TW871CND 相補株の作製の確認
TW871CNDcomp 株は、TW871CND 株
と比較して有意に増加したコラーゲン結合
能を示した。
(** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

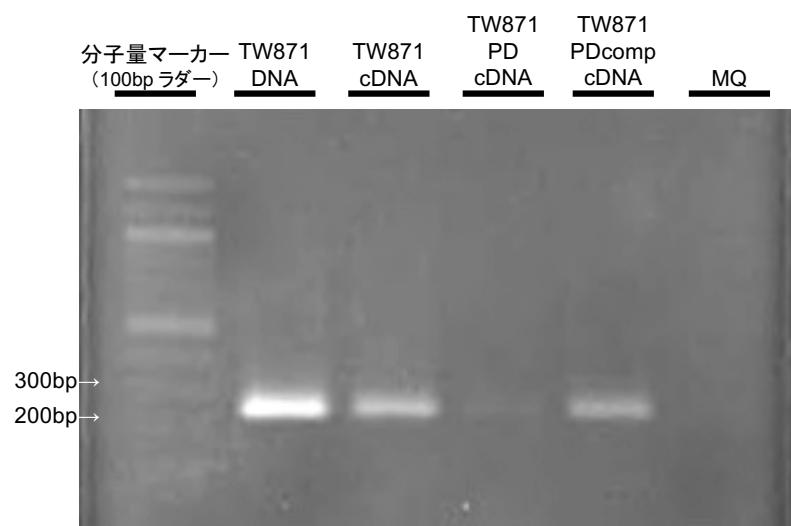


図 8 RT-PCR 法による TW871PD 相補株の作製の確認
RT-PCR 法において、TW871PDcomp 株では、*pac* 遺伝子による cDNA のゲル像(253bp)を認めた。

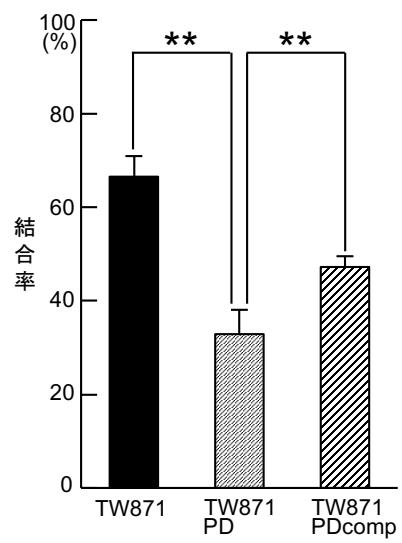


図 9 脂肪酸結合能の比較による
TW871PD 相補株の作製の確認
TW871PDcomp 株は、TW871PD 株と
比較して有意に増加した脂肪酸結合率を
示した。
(** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

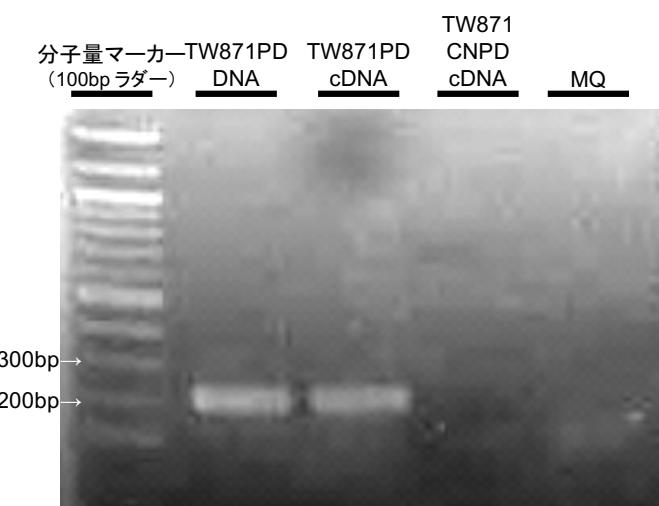


図 10 RT-PCR 法による TW871CNPD 株の作製の確認
RT-PCR 法において、TW871CNPD 株では、*cnm* 遺伝子
による cDNA のゲル像(205bp)を認めなかった。

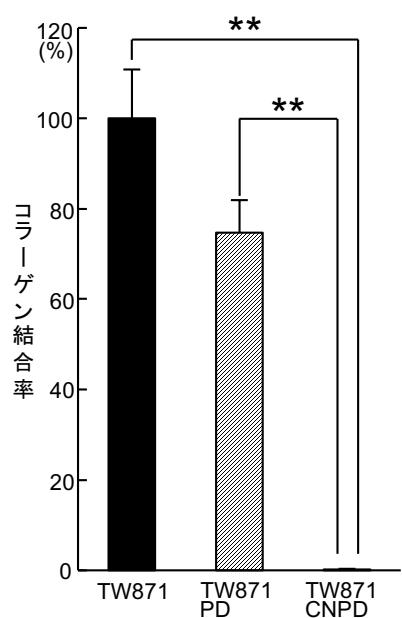


図 11 コラーゲン結合能の比較による
TW871CNPD 株の作製の確認
TW871CNPD 株は、TW871PD 株と比
較して有意に減少したコラーゲン結合能を
示した。
(** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

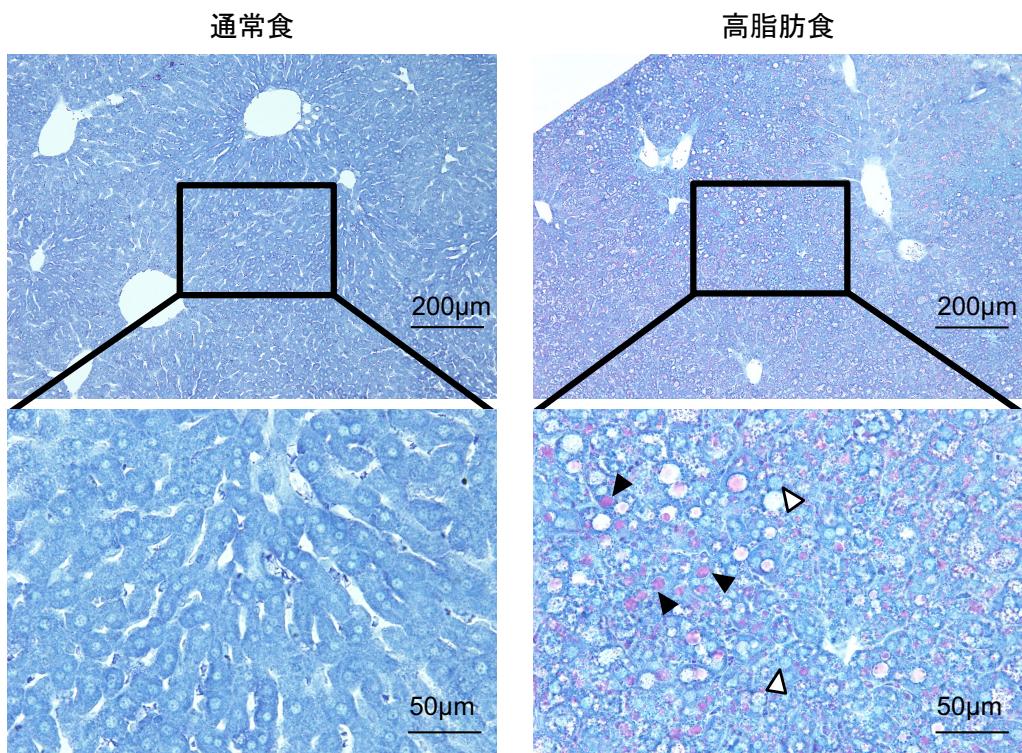


図 12 実験開始 4 週後のマウスより摘出した肝臓組織の Nile Blue 染色像

(実験 1)

▷ 脂肪酸

▶ 中性脂肪

高脂肪食を摂取したマウスの肝臓組織において、脂肪滴の中に赤く染色された脂肪酸と青く染色された中性脂肪が認められた。しかし、通常食を摂取したマウスの肝臓組織にこれらの所見は認められなかった。

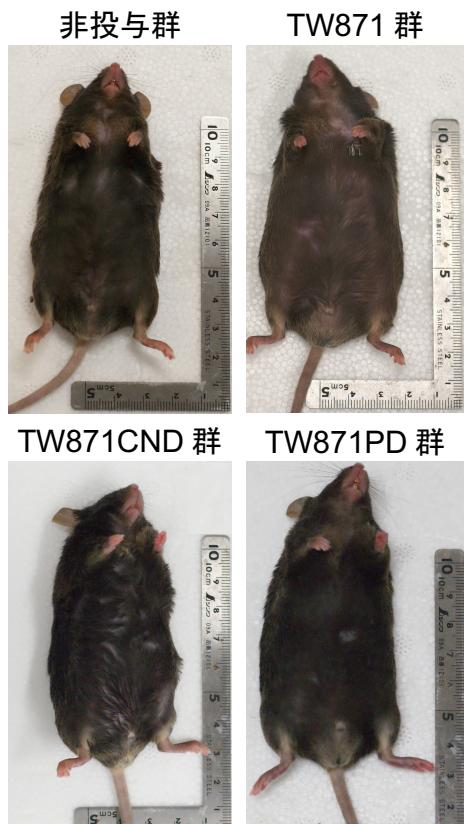


図 13 実験開始 16 週後における
屠殺時のマウスの体格(実験 2)
TW871 株感染群のマウスの体格は、
他群のマウスと比較して大きく肥満し
ていた。

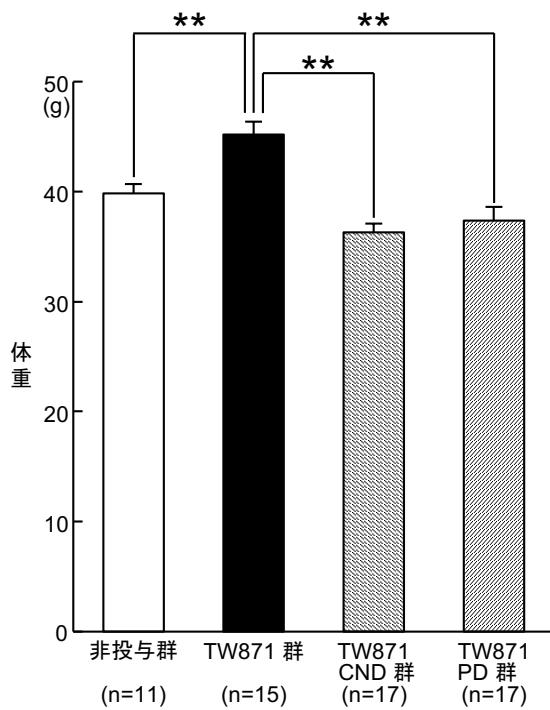


図 14 実験開始 16 週後における屠殺時の
マウス体重(実験 2)
TW871 株感染群のマウスの体重は、他群
のマウスと比較して有意に高い値を示した。
(** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

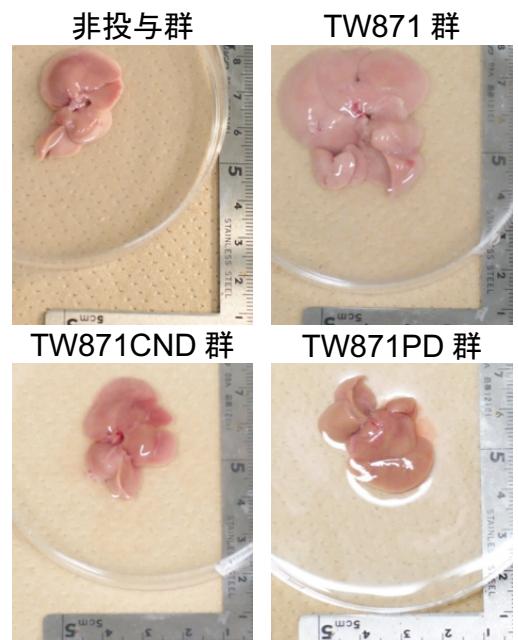


図 15 実験開始 16 週後における屠殺時のマウス肝臓(実験 2)
TW871 株感染群の肝臓は非感染群の肝臓と比較して肥大しており、表面は白色を呈していた。TW871CND 株感染群および TW871PD 株感染群の肝臓は、TW871 株感染群の肝臓と比較して肥大しておらず、非感染群と類似した状態を呈していた。

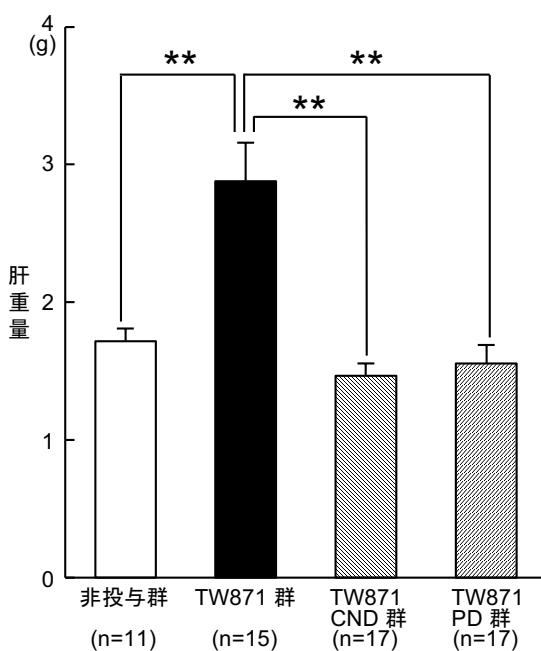


図 16 実験開始 16 週後における屠殺時の
マウス肝重量(実験 2)
TW871 株感染群の肝重量は非感染群と比較
して有意に高い値を示し、欠失株感染群の肝
重量は、TW871 株感染群と比較して有意に
低い値を示した。
(** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

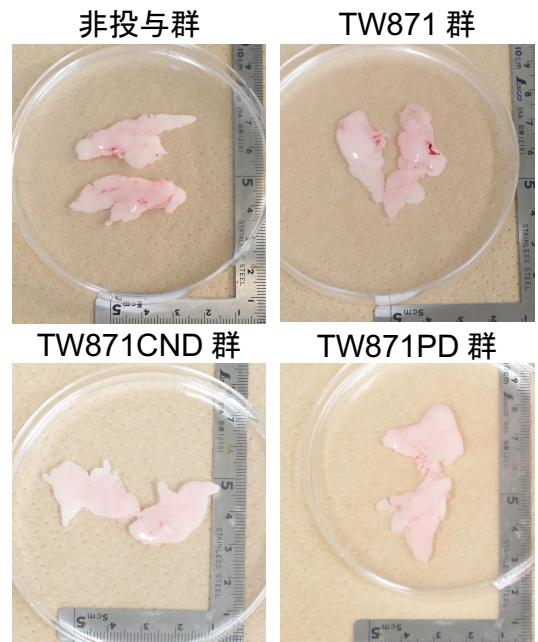


図 17 実験開始 16 週後における
屠殺時のマウス内臓脂肪(実験 2)
すべての群において内臓脂肪の性状
や色に差異は認められなかった。

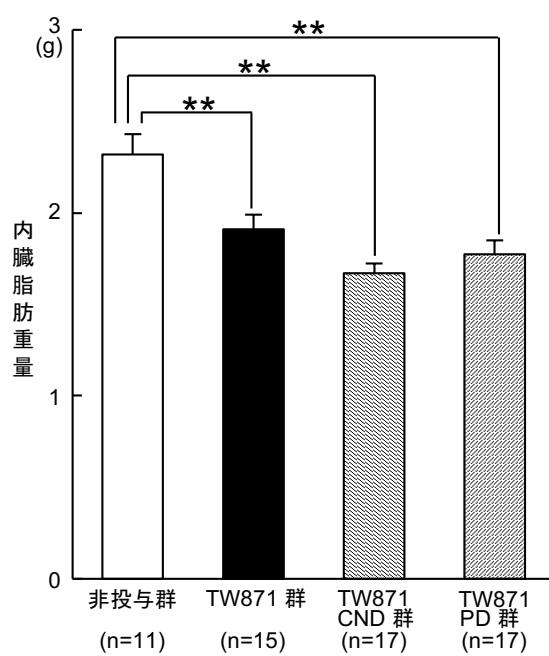


図 18 実験開始 16 週後における屠殺時の
マウス内臓脂肪重量(実験 2)
マウスの内臓脂肪重量を測定すると、非感染
群と比較して感染群が有意に低い値を示した。
(** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

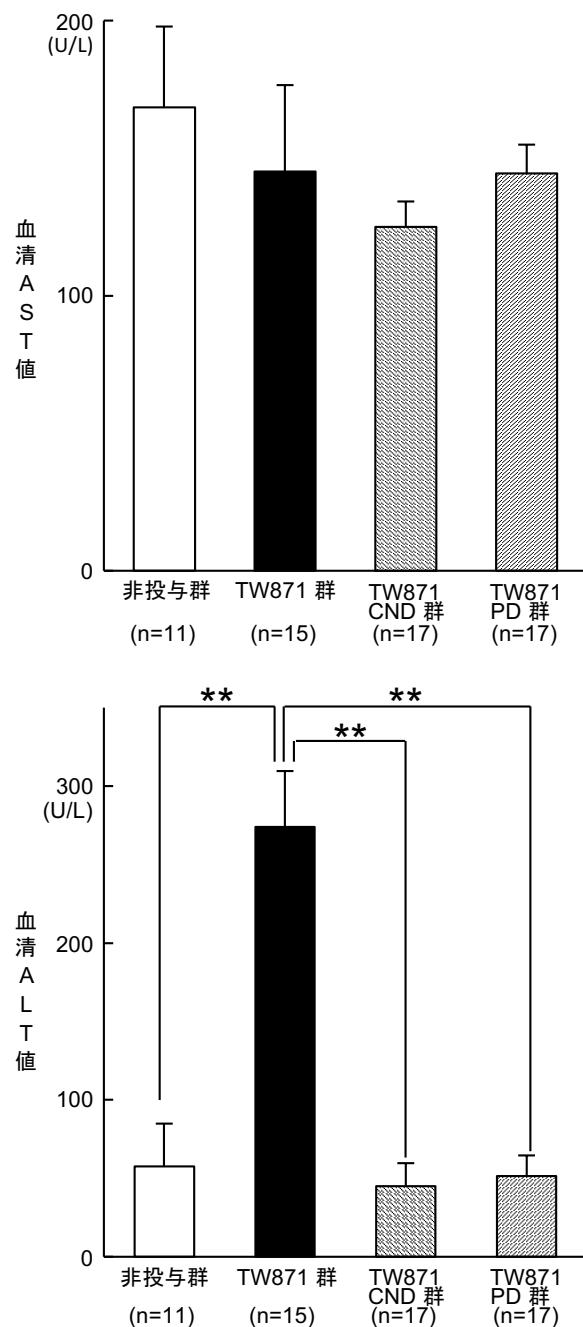


図 19 実験開始 16 週後における血清 AST および ALT 値(実験 2)
 すべての群において、実験開始 16 週後における血清 AST 値に有意な差は認められなかったが、TW871 株感染群の血清 ALT 値は他群と比較して有意に高い値を示した。
 $(**P < 0.01, \text{ANOVA の Bonferroni 法})$

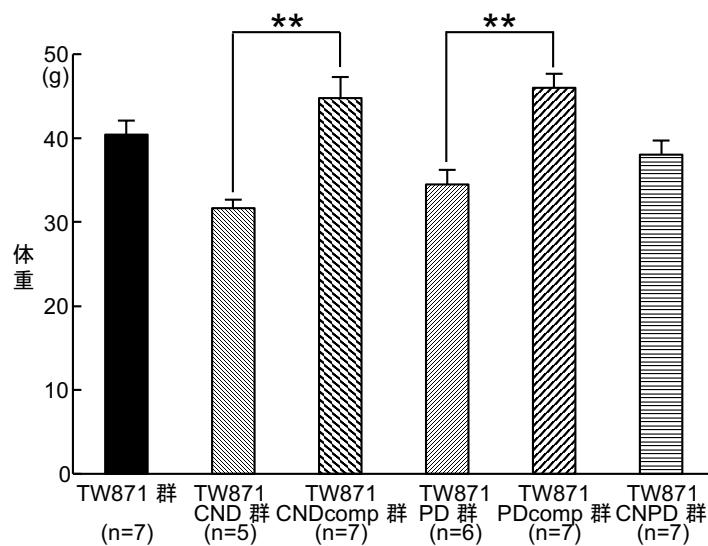


図 20 実験開始 16 週後における相補株および両タンパクの欠失株とのマウス体重の比較(実験 3)
 TW871CNDcomp 株および TW871PDcomp 株感染群のマウスの体重は、TW871 株感染群とほぼ同程度まで増加しており、
 TW871CND 株感染群と TW871PD 株感染群のマウスの体重と比較して有意に高い値を示した。
 TW871CNPD 株感染群のマウスの体重は、TW871CND 株感染群と TW871PD 株感染群のマウスの体重と同様の値を示した。
 (**P<0.01, ANOVA の Bonferroni 法)

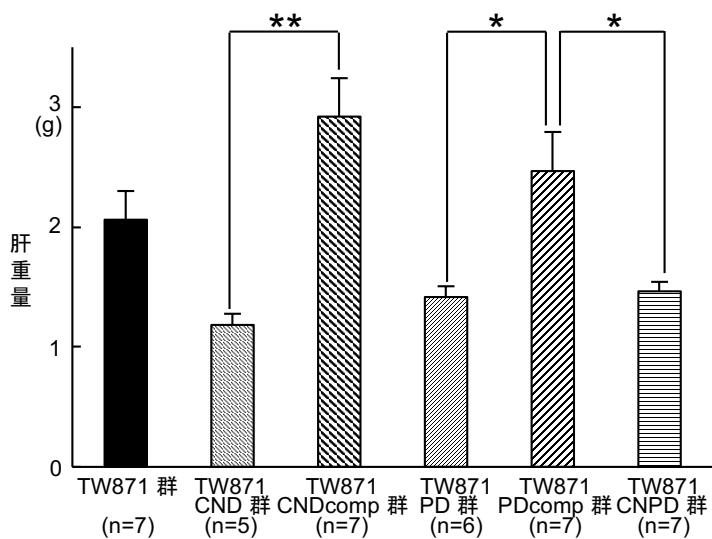


図 21 実験開始 16 週後における相補株および両タンパクの欠失株とのマウス肝重量の比較(実験 3)
 TW871CNDcomp 株感染群および TW871PDcomp 株感染群の肝重量は、TW871CND 株感染群および TW871PD 株感染群の肝重量と比較して有意に高い値を示した。
 TW871CNPD 株感染群の肝重量は欠失株感染群の肝重量と比較して有意に低い値を示した。
 $(*P < 0.05, **P < 0.01, \text{ANOVA の Bonferroni 法})$

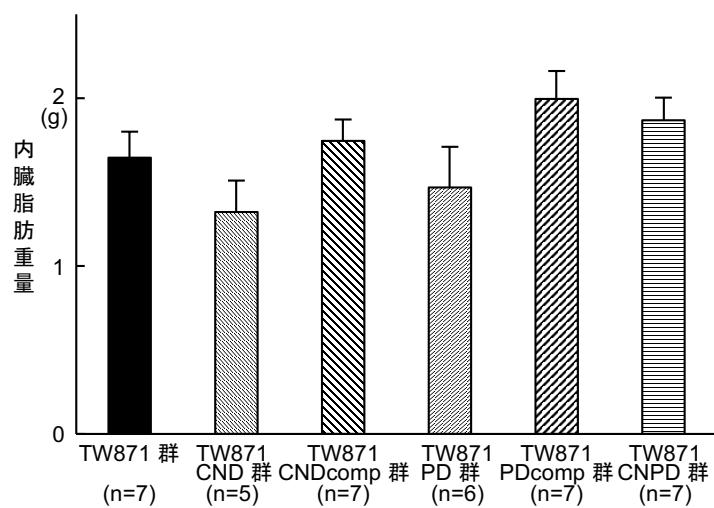


図 22 実験開始 16 週後における相補株および両タンパクの欠失株とのマウス内臓脂肪重量の比較(実験 3)
屠殺時のマウスより採取した内臓脂肪重量は、すべての群において有意差を認めなかった。

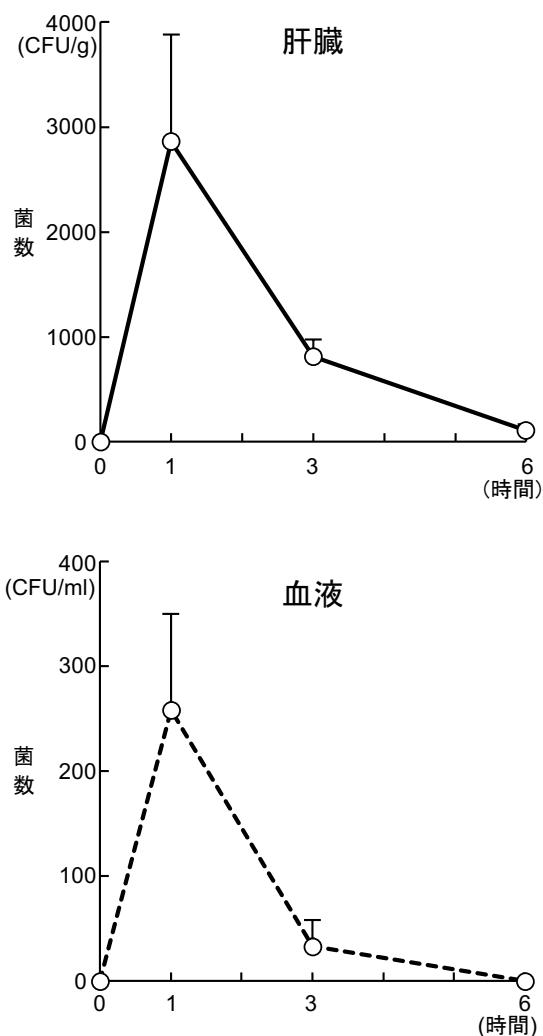


図 23 実験開始 4 週後のマウス肝臓と血液における供試菌数の経時的变化(実験 4)
菌感染 1 時間後に摘出した肝臓から、最も多くの供試菌が回収された。菌感染 6 時間後の血液中からは供試菌は回収されなかった。

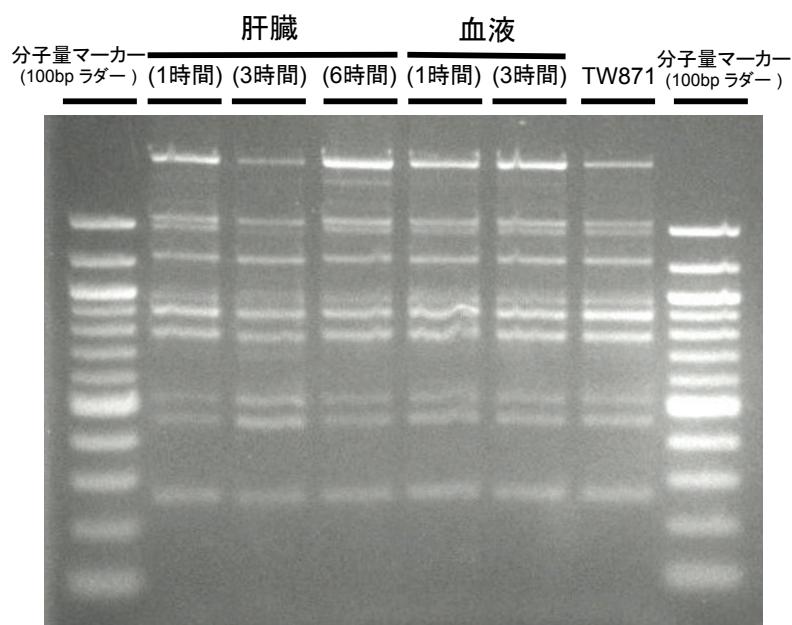


図 24 実験開始 4 週後のマウス肝臓と血液より検出した TW871 株のフィンガープリントパターンの比較(実験 4)
供試菌と肝臓および血液中から回収された菌株が同一の
フィンガープリントパターンを示した。

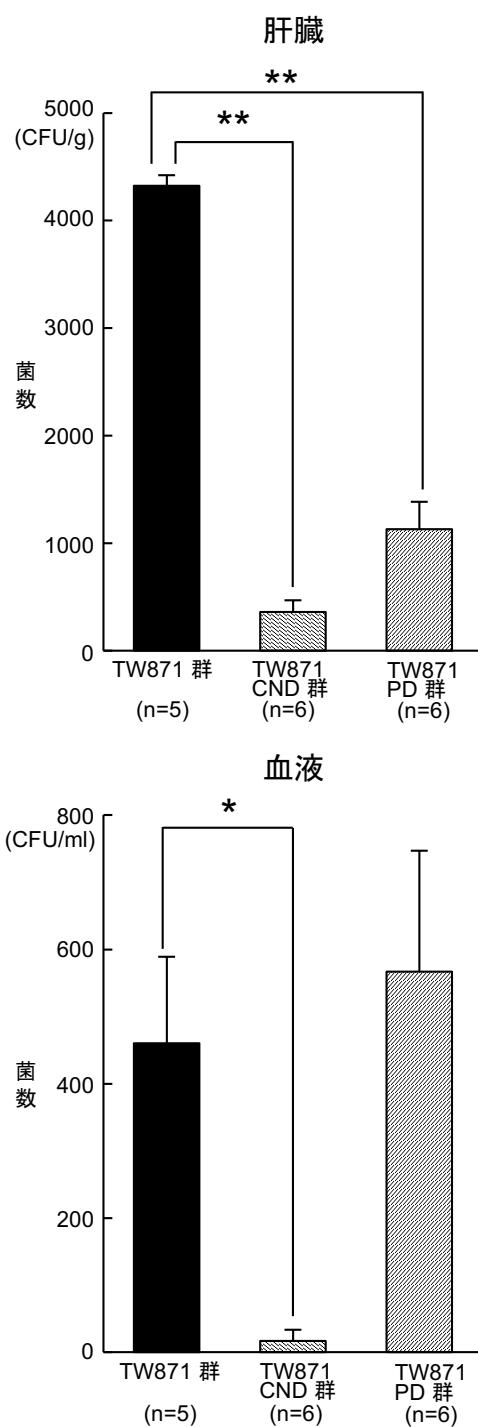


図 25 実験開始 4 週後のマウス肝臓と血液における感染 1 時間後の各供試菌数(実験 6)
 TW871CND 株および TW871PD 株を感染させたマウスの肝臓から回収された菌数は、TW871 株と比較して有意に低い値を示した。
 菌感染 1 時間後の血液 1ml 中から回収された各供試菌の菌数は、TW871 株と TW871PD 株でと同程度であったが、TW871CND 株と比較して有意に高い値を示した。
 $(*P < 0.05, **P < 0.01, \text{ANOVA の Bonferroni 法})$

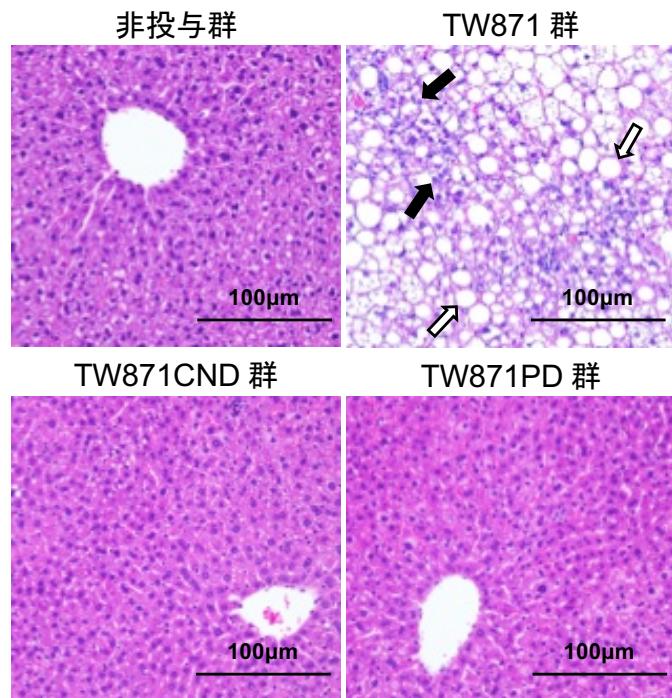


図 26 実験開始 16 週後のマウスより摘出した肝臓組織の Hematoxylin-Eosin 染色像(実験 2)
 ⇡ 脂肪化
 → 炎症性細胞

TW871 株感染群のマウスより摘出した肝臓組織では、非感染群と比較して大滴性の脂肪化と局所の炎症細胞浸潤が著明に見られた。TW871CND 株感染群および TW871PD 株感染群の肝臓組織では、これらの所見は認められなかった。

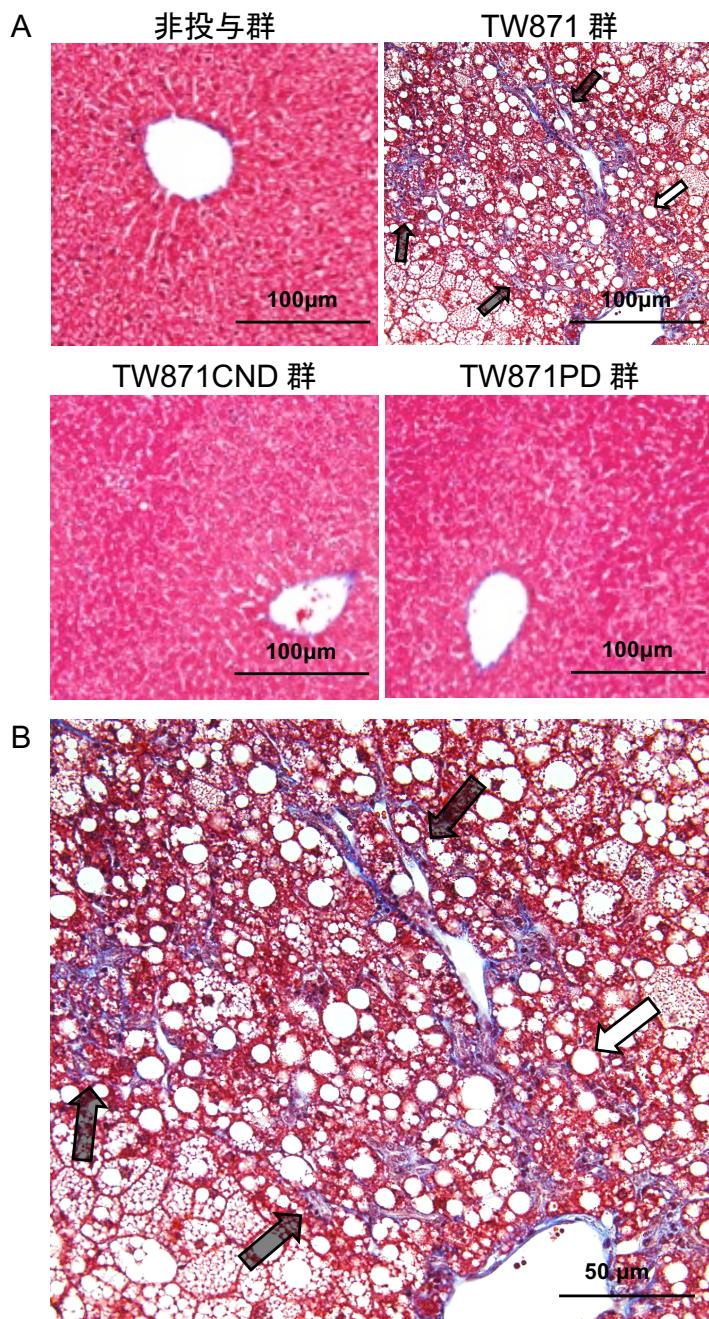


図 27 実験開始 16 週後のマウスより摘出した肝臓組織の Masson's-trichrome 染色像(実験 2)

➡脂肪化

➡初発線維化

A: 各群の比較

B: TW871 株投与群の肝臓組織の拡大像

TW871 株感染群の肝臓組織像では、肝実質の局所において青く染色された初発線維化像を認めた。一方で、非感染群と欠失株感染群の肝臓組織像ではこれらの変化は見られなかった。

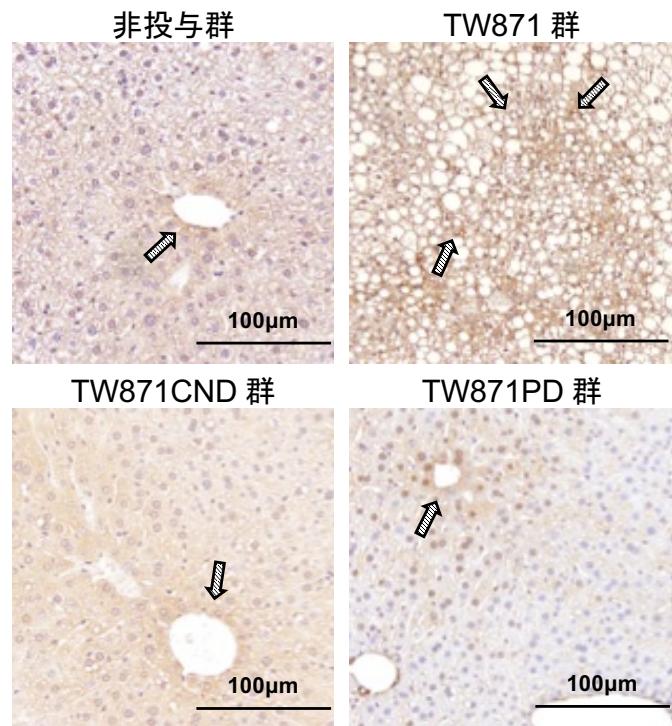


図 28 実験開始 16 週後のマウスより摘出した肝臓組織
の抗メタロチオネイン抗体による免疫染色像(実験 2)
➡はメタロチオネインの発現を示す。
TW871 株感染群より摘出した肝臓組織におけるメタロチ
オネインの発現は他群と比較して多く認められた。

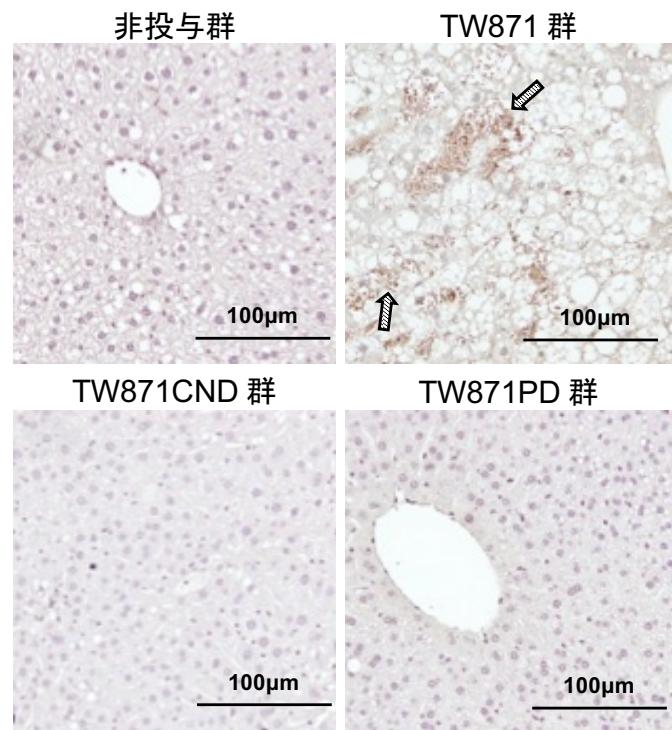


図 29 実験開始 16 週後のマウスより摘出した肝臓組織
の抗 IFN- γ 抗体による免疫染色像(実験 2)
➡はIFN- γ の発現を示す。
IFN- γ の発現は TW871 株感染群より摘出した肝臓組織に
おいてのみ認められた。

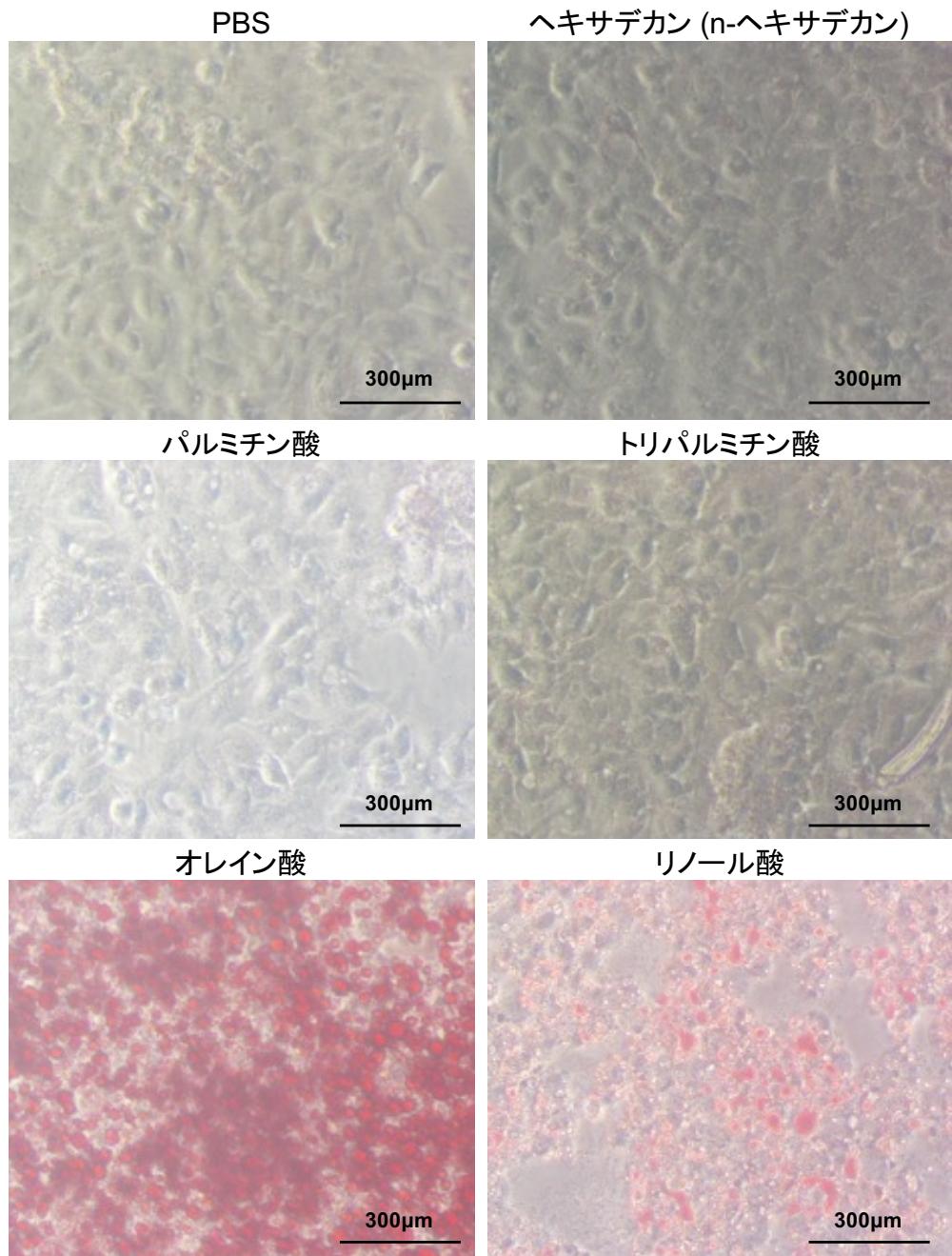


図 30 HepG2 細胞の Oil Red O 染色像

不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸を反応させた HepG2 細胞では中性脂肪の蓄積を認めたが、飽和脂肪酸であるパルミチン酸とトリパルミチン酸では認められず、PBS やヘキサデカンを反応させた HepG2 細胞と類似した所見を呈していた。オレイン酸を反応させた細胞では、リノール酸を反応させた細胞と比較して中性脂肪の蓄積がより多く認められた。

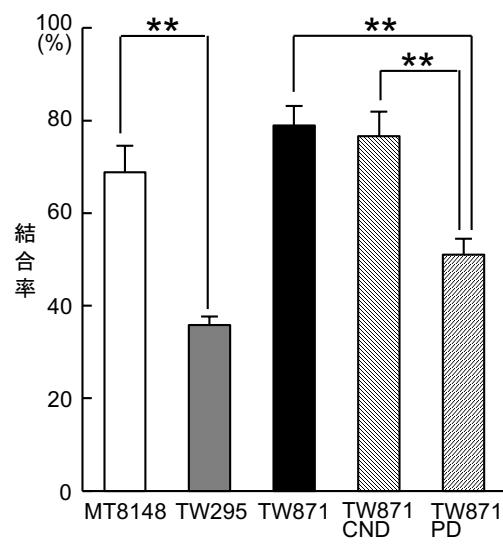


図 31 ヘキサデカンと各種菌体の結合能
PA タンパクを発現している MT8148 株,
TW871 株, TW871CND 株の結合率が,
PA タンパクを発現していない TW295 株
と TW871PD 株と比較して、有意に高い
値を示した。
(** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

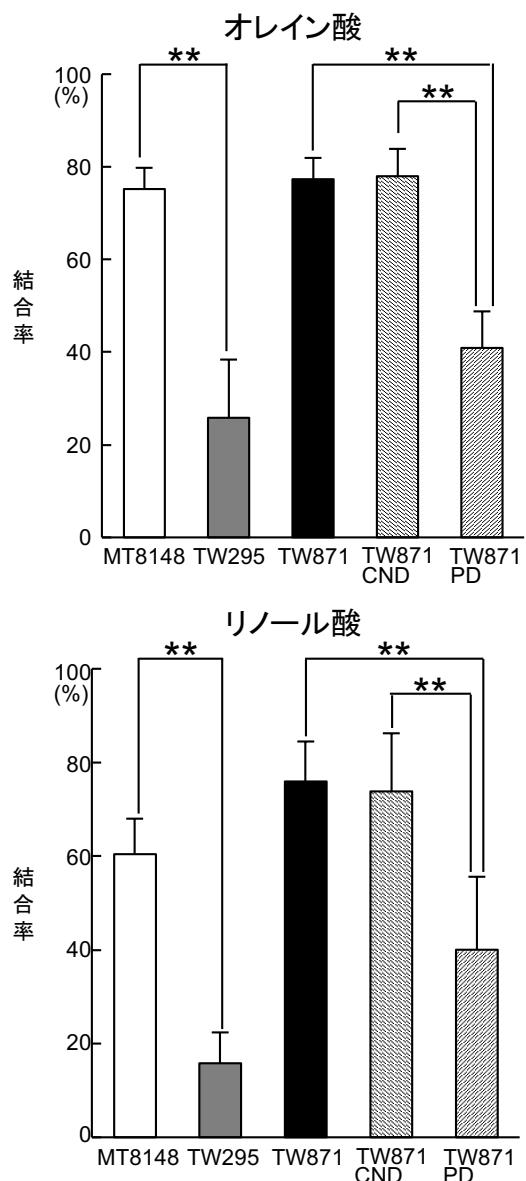


図 32 不飽和脂肪酸と各種菌体の結合能
 不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸において、PA タンパクを発現している。
 MT8148 株, TW871 株, TW871CND 株の結合率が、PA タンパクを発現していない
 TW295 株と TW871PD 株と比較して、有意に高い値を示した。
 (** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

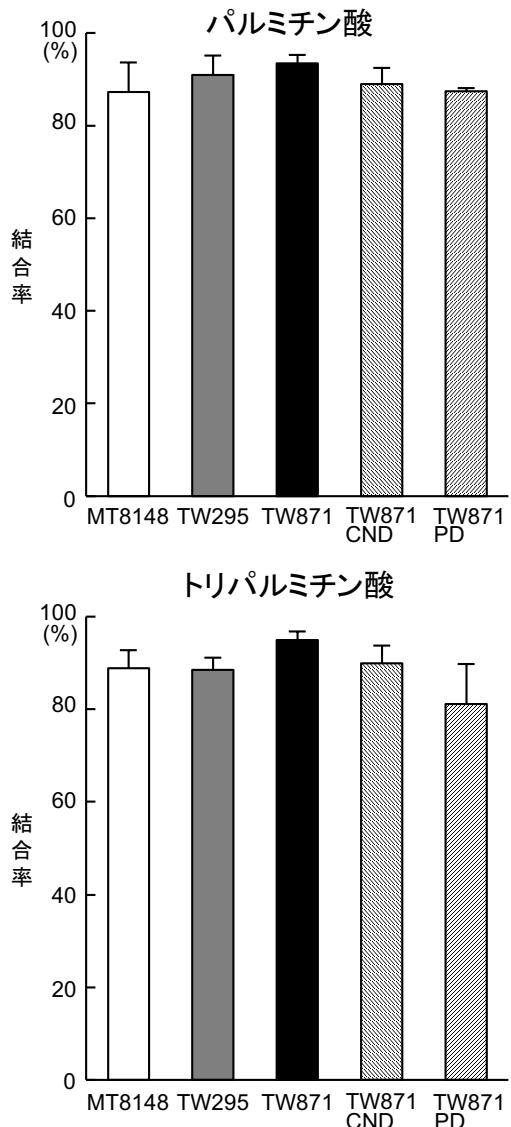


図 33 飽和脂肪酸と各種菌体の結合能
飽和脂肪酸であるパルミチン酸とトリパルミチン酸においては、PA タンパクの欠失の有無にかかわらず、すべての菌株で高い脂肪酸との結合率を示した。

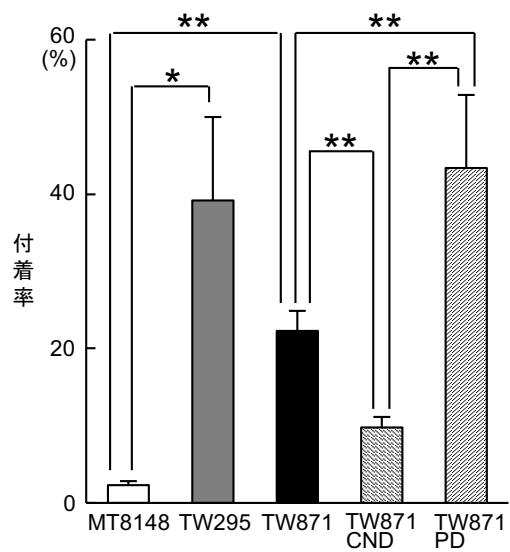


図 34 肝臓細胞への供試菌の付着能
 Cnm タンパクを発現している TW295 株と
 TW871 株の付着率は、Cnm タンパクを発
 現していない MT8148 株の付着率と比較
 して有意に高い値を示した。
 Cnm タンパクを欠失させた TW871CND
 株の付着率は、Cnm タンパクを発現する
 TW871 株と TW871PD 株と比較して有
 意に低い値を示した。
 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, ANOVA の
 Bonferroni 法)

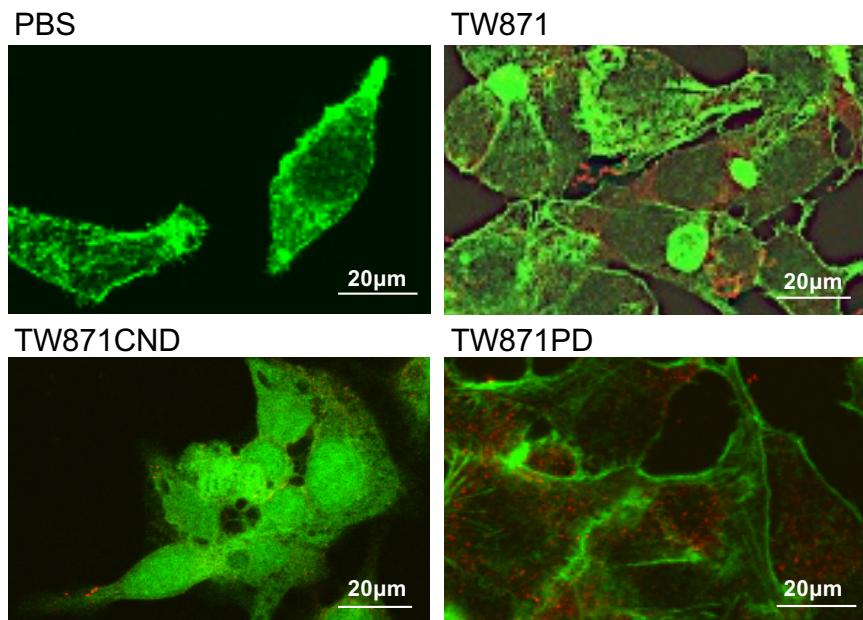


図 35 肝臓細胞への供試菌の付着像(共焦点レーザー顕微鏡像)
緑色が培養肝臓細胞を示し、赤色が付着した各供試菌を示す。
共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行うと、TW871 株が
TW871CND 株と比較して HepG2 細胞により多く付着している像
が認められた。

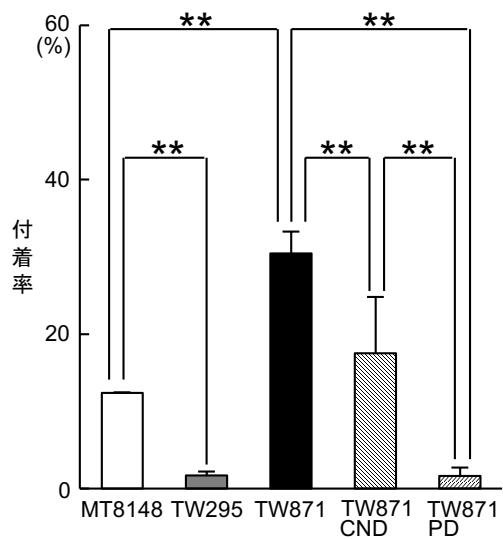


図 36 オレイン酸を添加した場合の
肝臓細胞への供試菌の付着能
PA タンパクを発現している MT8148 株
と TW871 株の付着率は、PA タンパクを
発現していない TW295 株と比較して有
意に高い値を示した。
PA タンパクを欠失させた TW871PD 株
の付着率は、PA タンパクを発現する
TW871 株と TW871CND 株と比較して
有意に低い値を示した。
(** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

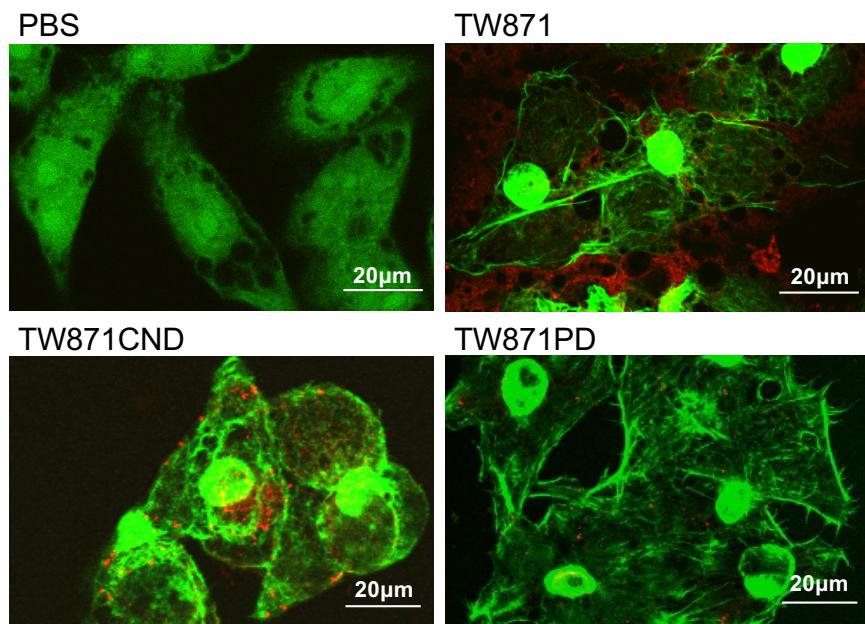


図 37 オレイン酸を添加した場合の肝臓細胞への供試菌の付着像(共焦点レーザー顕微鏡像)
緑色が培養肝臓細胞を示し、赤色が付着した各供試菌を示す。
共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行うと、TW871 株が TW871PD 株よりもオレイン酸を添加して脂肪化した HepG2 細胞に多く付着している像が認められた

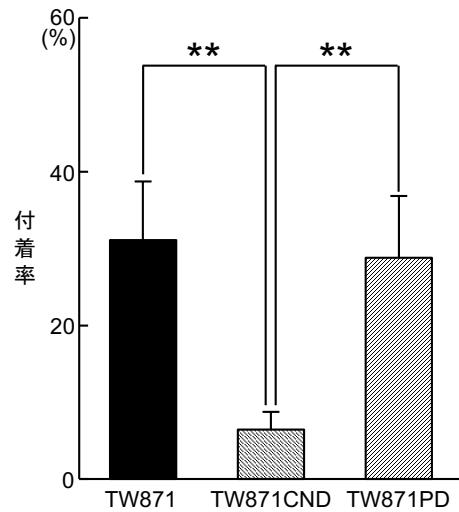


図 38 リノール酸を添加した場合の
肝臓細胞への供試菌の付着能
Cnm タンパクを欠失させた TW871CND
株の付着率は、Cnm タンパクを発現す
る TW871 株と TW871PD 株と比較して
有意に低い値を示した。
(** $P < 0.01$, ANOVA の Bonferroni 法)

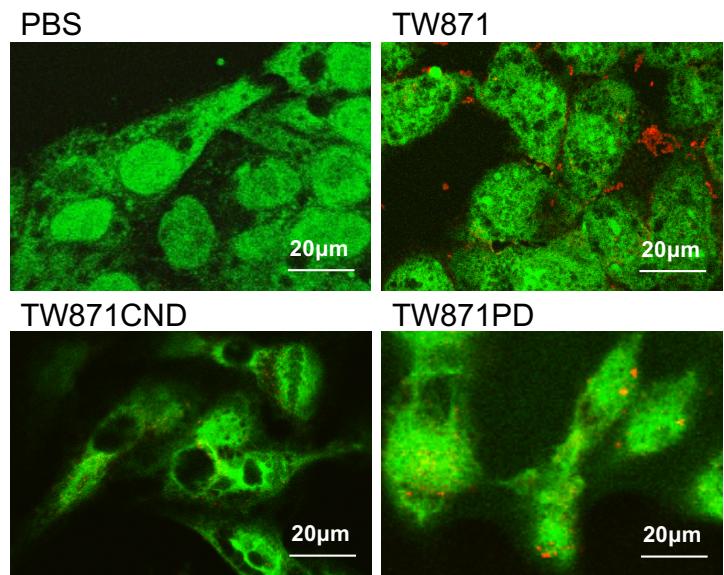


図 39 リノール酸を添加した場合の肝臓細胞への供試菌の付着像(共焦点レーザー顕微鏡像)
緑色が培養肝臓細胞を示し、赤色が付着した各供試菌を示す。
共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行うと、
TW871 株は TW871CND 株よりもリノール酸を添
加して脂肪化した HepG2 細胞に対して多くの菌
株が付着している像が認められた。

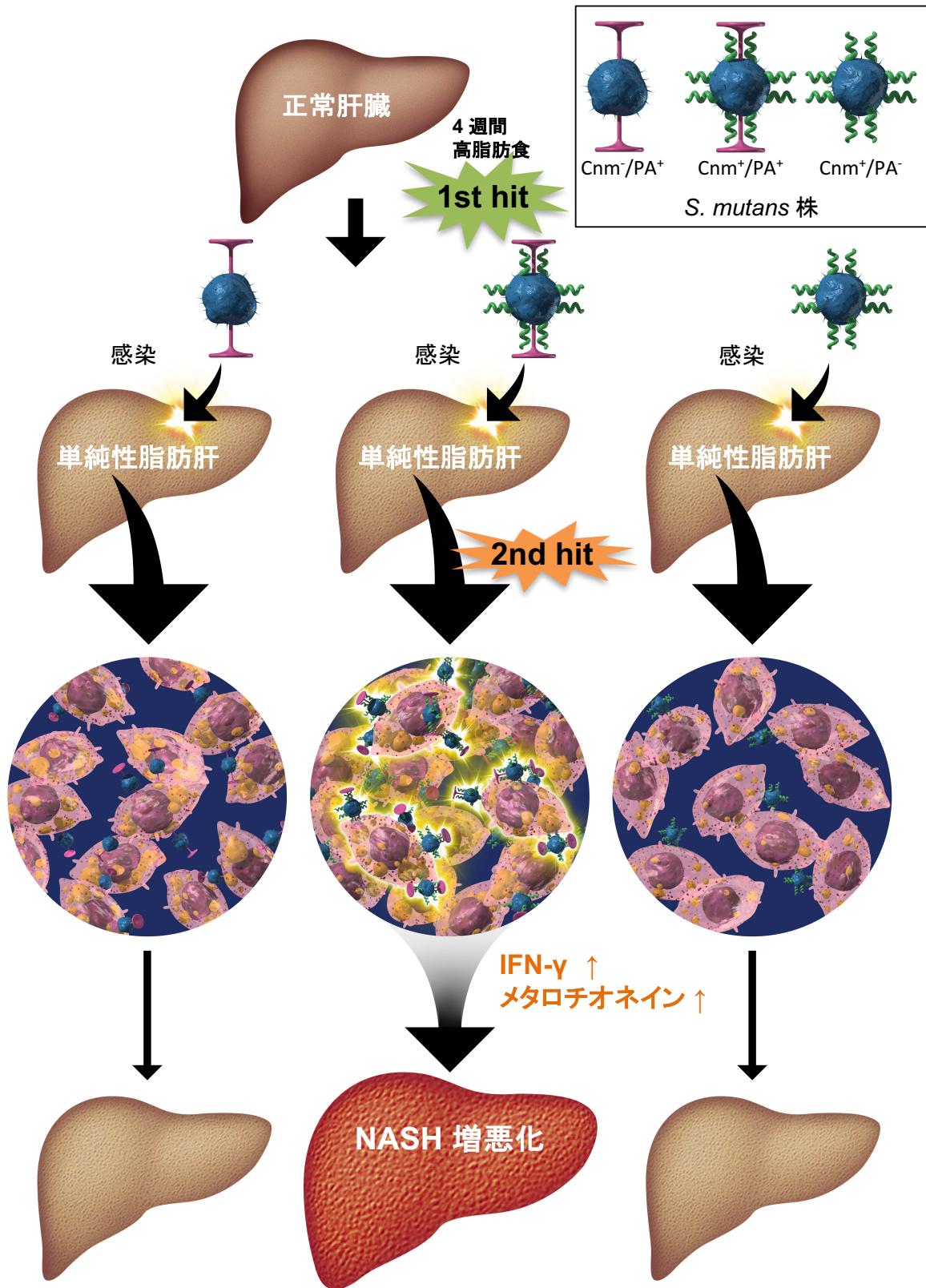


図 40 *S. mutans* が引き起こす非アルコール性脂肪肝炎悪化のメカニズム