



Title	Streptococcus mutans の歯髄組織への定着における菌体表層コラーゲン結合タンパクの影響
Author(s)	鋸屋, 侑布子; 野村, 良太; 仲野, 和彦
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2018, 63(1), p. 1-3
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/71595
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Streptococcus mutans の歯髄組織への定着における 菌体表層コラーゲン結合タンパクの影響

鋸屋 侑布子*, 野村 良太*, 仲野 和彦*

(平成 30 年 8 月 20 日受付)

はじめに

Streptococcus mutans はう蝕の主要な原因細菌であり, その菌体表層に分子量約 120kDa のコラーゲン結合タンパク (Collagen-binding protein; CBP) を発現している株 (CBP 陽性株) が存在することが知られている¹⁾。CBP 陽性 *S. mutans* 株は, 健康者の口腔において 10 ~ 20% の頻度で存在しており²⁾, 感染性心内膜炎をはじめ脳出血, 潰瘍性大腸炎, 非アルコール性脂肪肝炎および IgA 腎症といった全身疾患にも関連することが報告されている^{3~7)}。一般に, 口腔細菌は口腔内の出血により血流に侵入して菌血症を引き起こし, 全身疾患を発症させることがあると考えられている⁸⁾。一方で, CBP 陽性 *S. mutans* 株は, I 型コラーゲンが有機成分の主成分である象牙質へ付着できることから¹⁾, 象牙質う蝕や根面う蝕に関わると報告されている⁹⁾。象牙質う蝕が進行し, 口腔細菌が血管に富む歯髄へと到達することにより, 菌血症のリスクは増加すると考えられるが, 炎症歯髄または感染歯髄と *S. mutans* との関連性について着目した報告はこれまでなされていない。本研究では, 炎症歯髄または感染歯髄中における *S. mutans* の分布と病原性について CBP に着目して検討することにした。

歯髄線維芽細胞への付着侵入能の検討

歯髄サンプルの採取は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会承認後, 患児の保護者または本人の同意を得

て行った。乳歯由来の歯髄線維芽細胞は, 当科にて矯正治療上の理由で便宜抜髄となった 8 歳男児の乳歯歯髄に対して, 滅菌されたエアータービンおよびダイヤモンドポイントを使用して髄腔開拓した後, 滅菌クレンザーを用いて採取した。また, 永久歯由来の歯髄線維芽細胞は, 智歯周囲炎のため抜歯を行うことになった 50 歳男性のう蝕に罹患していない智歯を用いて同様の方法により採取した。供試菌として, 日本人小児口腔由来の MT8148 株 (CBP 陰性株)¹⁰⁾ および NN2004 株 (CBP 陰性株)¹¹⁾, 抜歯後菌血症患者からの血液分離株である TW295 株 (CBP 陽性株)¹¹⁾ および TW295 株の CBP をコードする遺伝子を不活化させた TW295CND 株 (CBP 陰性株)¹²⁾, 日本人小児口腔分離株である NN2193-1 株 (CBP 陽性株)¹³⁾ および NN2193-1 株の CBP をコードする遺伝子を不活化させた NN2193-1CBD 株 (CBP 陰性株)²⁾ を用いた。*S. mutans* の歯髄線維芽細胞への付着能の分析は, 1.0×10^5 個に調整した歯髄線維芽細胞に対して 1.0×10^7 CFU に調整した *S. mutans* を感染させ, 90 分間反応させた後に感染させた菌数に対する付着した菌数の割合を算出することにより行った³⁾。侵入能の分析では, 付着能の分析と同様にして *S. mutans* を歯髄線維芽細胞に感染させ 120 分間反応させた後, 抗生物質を添加し 180 分反応させることにより細胞表面に付着した菌を死滅させた上で, 侵入した菌数の割合を算出した。その結果, CBP 陽性株は, CBP 陰性株と比較して有意に高い付着侵入能を示した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察から, CBP 陽性株では歯髄線維芽細胞への付着を認めたが, CBP をコード

* 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)

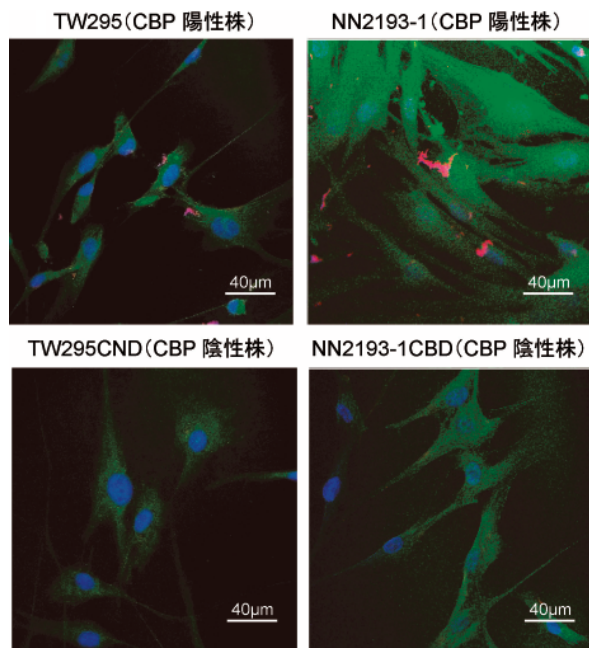


図1 *S. mutans* の歯髄線維芽細胞への付着能
(共焦点レーザー顕微鏡像)

青：細胞核，緑：細胞骨格のアクチン，赤：歯髄線維芽細胞に付着する *S. mutans*

CBP 陽性株である TW295 株および NN2193-1 株において歯髄線維芽細胞への付着を認めたが，CBP をコードする遺伝子を不活化した TW295CND 株および NN2193-1CBD 株では付着が認められなかった。

する遺伝子を不活化させた株では付着は認められなかった（図1）。

歯髄線維芽細胞における増殖能の検討

S. mutans 感染による乳歯由来および永久歯由来歯髄線維芽細胞の細胞増殖能の検討を Methyl tetrazolium (MTT) 法¹⁴⁾によって行った。供試菌として，前述の歯髄線維芽細胞への付着侵入能の検討において使用した *S. mutans* 株を用いた。まず， 1.0×10^5 個に調整した歯髄線維芽細胞に 1.0×10^7 CFU に調整した *S. mutans* を感染させ，6 時間共培養した。その後，MTT 溶液を添加して 4 時間反応させることにより生細胞を染色後，0.04mol/L の塩酸を加えて細胞を溶解し，595nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。その結果，CBP 陽性株を感染させた歯髄線維芽細胞は，CBP 陰性株を感染させた細胞および *S. mutans* を感染させていない細胞と比較して有意に高い細胞増殖能を認めた。また，CBP 陽性株を感染させた細胞のうち，乳歯由来歯髄線維芽細胞における

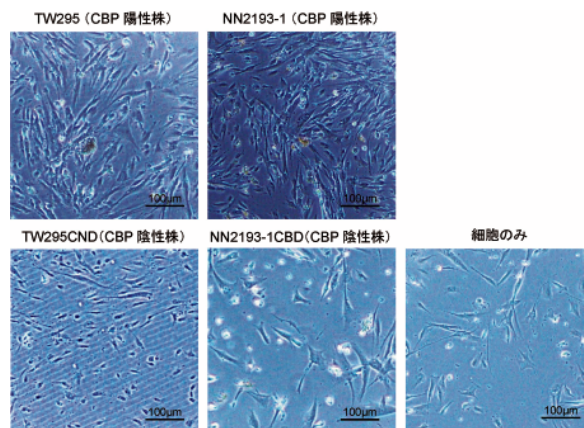


図2 *S. mutans* の歯髄線維芽細胞に対する増殖能
(光学顕微鏡像)

CBP 陽性株である TW295 株および NN2193-1 株を感染させた歯髄線維芽細胞において，明らかな細胞増殖を認めたが，CBP をコードする遺伝子を不活化した TW295CND 株および NN2193-1CBD 株では細胞増殖は認められなかった。

増殖率は，永久歯由来歯髄線維芽細胞と比較して有意に高い値を示した。さらに，光学顕微鏡を用いて観察すると，CBP 陽性株を感染させた歯髄線維芽細胞において明らかな増殖が認められた（図2）。

S. mutans 臨床分離株を用いた検討

大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会承認後，当科を受診し歯髄処置の適応となった1歳～20歳の患者64名から，患児の保護者または本人の同意を得た上で摘出した炎症歯髄または感染歯髄サンプルより *S. mutans* の分離を行い細菌 DNA を抽出した。これらの *S. mutans* 株における CBP をコードする遺伝子の有無を PCR 法を用いて分析した^{2,3)}。その結果，64 サンプル中 30 サンプル（46.9%）より *S. mutans* 株が分離され，そのうち 6 株（20.0%）が CBP 陽性であった。全ての CBP 陽性株がコラーゲン結合能を認めたのに対し，CBP 陰性株においてコラーゲン結合能を示す菌株は存在しなかった。また，CBP 陽性株では，CBP 陰性株と比較して歯髄線維芽細胞への付着率が高い傾向を示した。

おわりに

本研究の結果より，CBP 陽性 *S. mutans* 株は歯髄線維芽細胞に対し付着侵入能を有していることが示された。また，臨床的に増殖性歯髄炎が認められやすい乳

歯由来の歯髄線維芽細胞において, *S. mutans* 株の感染により高い細胞増殖能を示した。口腔検体を用いた分析から, 炎症歯髄および感染歯髄サンプルから実際に *S. mutans* 株が分離され, そのうち 20% が Cnm 陽性株であった。これらのことから, 歯髄に達するう蝕病変部には *S. mutans* が存在し, このうち CBP 陽性 *S. mutans* は歯髄組織に定着し菌血症を引き起こす危険因子となり得ることが示唆された。

文献

- 1) Sato, Y., Okamoto, K., Kagami, A., Yamamoto, Y., Igarashi, T. and Kizaki, H. (2004): *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. *J. Dent. Res.* **83**, 534-539.
- 2) Nomura, R., Nakano, K., Naka, S., Nemoto, H., Masuda, K., Lapirottanakul, J., Alaluusua, S., Matsumoto, M., Kawabata, S. and Ooshima, T. (2012): Identification and characterization of collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral Microbiol.* **27**, 308-323.
- 3) Nomura, R., Naka, S., Nemoto, H., Inagaki, S., Taniguchi, K., Ooshima, T. and Nakano, K. (2013): Potential involvement of collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* in infective endocarditis. *Oral Dis.* **19**, 387-393.
- 4) Nakano, K., Hokamura, K., Taniguchi, N., Wada, K., Kudo, C., Nomura, R., Kojima, A., Naka, S., Muranaka, Y., Thura, M., Nakajima, A., Masuda, K., Nakagawa, I., Speziale, P., Shimada, N., Amano, A., Kamisaki, Y., Tanaka, T., Umemura, K. and Ooshima, T. (2011): The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nat. Commun.* **2**, 485.
- 5) Kojima, A., Nakano, K., Wada, K., Takahashi, H., Katayama, K., Yoneda, M., Higurashi, T., Nomura, R., Hokamura, K., Muranaka, Y., Matsuhashi, N., Umemura, K., Kamisaki, Y., Nakajima, A. and Ooshima, T. (2012): Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Sci. Rep.* **2**, 332.
- 6) Naka, S., Nomura, R., Takashima, Y., Okawa, R., Ooshima, T. and Nakano, K. (2014): A specific *Streptococcus mutans* strain aggravates non-alcoholic fatty liver disease. *Oral Dis.* **20**, 700-706.
- 7) Misaki, T., Naka, S., Kuroda, K., Nomura, R., Shiooka, T., Naito, Y., Suzuki, Y., Yasuda, H., Isozaki, T. and Nakano, K. (2015): Distribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins in the oral cavity of IgA nephropathy patients. *Clin. Exp. Nephrol.* **19**, 844-850.
- 8) Seymour, R. A., Lowry, R., Whiworth, J. M. and Martin, M. V. (2000): Infective endocarditis, dentistry and antibiotic prophylaxis; time for a rethink? *Br. Dent. J.* **189**, 610-616.
- 9) Miller, J. H., Avilés-Reyes, A., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Watson, G. E., Sampson, E., Progulsk-Fox, A., Koo, H., Bowen, W. H., Lemos, J. A. and Abranches, J. (2015): The collagen binding protein Cnm contributes to oral colonization and cariogenicity of *Streptococcus mutans* OMZ175. *Infect. Immun.* **83**, 2001-2010.
- 10) Ooshima, T., Izumitani, A., Sobue, S. and Hamada, S. (1983): Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **36**, 219-223.
- 11) Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S. and Ooshima, T. (2004): 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.
- 12) Nomura, R., Naka, S., Nemoto, H., Otsugu, M., Nakamura, S., Ooshima, T. and Nakano, K. (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.
- 13) Nakano, K., Lapirottanakul, J., Nomura, R., Nemoto, H., Alaluusua, S., Groenroos, L., Vaara, M., Hamada, S., Ooshima, T. and Nakagawa, I. (2007): *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2616-2625.
- 14) Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55-63.