OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | ラットにおける Streptococcus mutans 誘発性重度う蝕が及ぼす感染性心内膜炎に対する病原性の検討 |
| Author(s) | 又吉, 紗綾 |
| Citation | 大阪大学, 2021, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/82164 |
| rights | |
| 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　（　又　吉　紗　綾　） | |
|---|---|
| 論文題名 | ラットにおける *Streptococcus mutans* 誘発性重度う蝕が及ぼす感染性心内膜炎に対する病原性の検討 |

論文内容の要旨

【緒言】

感染性心内膜炎（Infective endocarditis; IE）は、歯科領域で最もよく知られた全身疾患の１つであり、血液中に侵入した細菌が心内膜や弁膜において疣腫と呼ばれる塊を形成することで、発症に至るとされている。臨床的には、血液培養における起炎菌の分離や、心エコーによる疣腫の検出によって診断がなされている。特に、心疾患患者では心内膜や弁膜に内皮傷害を生じやすく、侵襲的な歯科処置で生じる菌血症によって、IE 発症リスクが高いことが知られている。

グラム陽性通性嫌気性のレンサ球菌である *Streptococcus mutans* は、う蝕の主要な原因細菌であるとともに、IE の起炎菌としても知られている。*S. mutans* の菌体表層には、コラーゲン結合タンパク（Collagen-binding protein; CBP）を発現している株が存在しており、内皮傷害部位に付着しやすいことから、IE に対する病原性への関与が取りざたされている。

IE の研究には、人工的に心臓弁を傷害したラットに供試菌を血中投与するモデルが広く用いられており、侵襲的な処置で生じる一過性の菌血症に起因する IE の病態を反映している。一方で、歯髄腔に達するう蝕が存在すると、露出した毛細血管から持続的な菌血症が生じ得る。本研究では、CBP 陽性の *S. mutans* をラットの口腔に定着させて、重度う蝕を誘発させた状態で心臓弁に傷害を与えることで、IE が発症する可能性を検討することにした。

【材料および方法】

本研究は、本学歯学研究科動物実験委員会の承認（承認番号：24-019-0）を得て行った。

１．使用菌株および培養条件

*S. mutans* SA31 株（CBP 陽性；血清型 *k*）にストレプトマイシン（1,500 μg/mL）耐性による標識付けを行った（SA31R 株と命名した）。SA31R 株は Brain Heart Infusion 液体培地を用いて 37℃ で 18 時間培養後、滅菌生理食塩水に懸濁して菌量を調整後に使用した。

２．ラット重度う蝕モデルにおける病原性の検討

１）ラット重度う蝕モデルの構築

Sprague-Dawley 系ラット（オス； 15 日齢）に抗菌薬を３日間投与した後に、$1.0\times10^8$ CFU に調整した SA31R 株を１日１回５日間連続して口腔内に投与して定着させた。重度のう蝕を誘発させるために、飼育期間は従来より約 20 日間延長した 90 日齢までとし、スクロース 56% 配合う蝕誘発性飼料を常時与えた。

２）実験群の設定

１）で重度う蝕を誘発させた 90 日齢のラットに、全身麻酔下にて右頸動脈よりカテーテルを挿入して大動脈弁に傷害を与え、１週間後（Ａ群）、１か月後（Ｂ群）および３か月後（Ｃ群）に屠殺した。また、１）で構築したモデルを用いるものの、大動脈弁に傷害を与えずに３か月後に屠殺する群を設定した（Ｄ群）。さらに、同様のラットに *S. mutans* 株を定着させずにスクロース 56% 配合う蝕誘発性飼料を与えた後、大動脈弁に傷害を与える群（Ｅ群）と与えない群（Ｆ群）とを設定して３か月後に屠殺した。各群はそれぞれ 11～12 匹とした。

３）顎骨および心臓の評価

屠殺時に摘出した顎骨検体を用いて、実体顕微鏡下にて上下顎片側のう蝕の程度を評価した。また、屠殺時に摘出

した心臓検体は、グラム染色および抗 CBP 抗体を用いた免疫染色によって病理組織学的評価を行った。また、心臓検体を細分し滅菌生理食塩水を加えて超音波処理した懸濁液を、ストレプトマイシン含有 Mitis-Salivarius-Bacitracin 寒天培地にて播種し、37℃で 48 時間培養し *S. mutans* 株を分離した。さらに、顎骨および心臓検体由来の株のゲノム DNA を用いて、Arbitrarily primed polymerase chain reaction（AP-PCR）法にて遺伝子増幅パターンを比較した。

３．統計学的分析

多群間比較は、一元配置分散分析の後 Bonferroni 法を用いた。重度う蝕歯数と心臓弁から *S. mutans* が分離される個体の割合の相関は、カイ二乗検定を用いた。有意水準は全て５% とした。

【結果】

１． 飼育期間における病原性の比較

Ａ群の顎骨検体では、歯髄腔まで到達したう蝕（C3）は観察できたが、歯冠が完全に崩壊したう蝕（C4）は観察できなかった。それに対して、Ｂ群およびＣ群の顎骨検体では C3 および C4 のう蝕が観察できた。また、C3 以上の歯数および C4 歯数は、飼育期間に依存して有意に増加していた。一方で、*S. mutans* が心臓検体から分離される個体は、飼育期間に依存して増加していたが、その一部のラットのみで、グラム染色と CBP 抗体に陽性反応を示す菌の存在が示された。

２．重度う蝕と心臓弁傷害の有無における病原性の比較

Ｄ群のラットでは C3 以上および C4 のう蝕が認められたのに対して、Ｅ群およびＦ群ではう蝕はほとんど認められなかった。また、Ｄ群では心臓検体から *S. mutans* が分離される個体はＣ群の約半数にとどまり、Ｅ群およびＦ群では存在しなかった。さらに、グラム染色と CBP 抗体に陽性反応を示す菌を認める個体は、Ｄ群、Ｅ群およびＦ群のいずれにおいても存在しなかった。

３．重度う蝕と心臓の病態における関連性の検討

AP-PCR 法による検討の結果、顎骨と心臓検体から分離された *S. mutans* 株の遺伝子増幅パターンは完全に一致した。また、C3 以上の歯数が上下顎片側の臼歯６本中５本以上、C4 歯数が６本中３本以上存在する個体では、心臓弁から *S. mutans* が分離される割合が有意に多かった。

【考察】

本研究において、長期的な飼育を行ったラットほどう蝕が重症化し、心臓検体から *S. mutans* が分離されることが明らかになった。一方で、重度う蝕を誘発させなかったラットや、心臓弁を傷害させなかったラットでは、心臓検体からの *S. mutans* の検出率は著しく低下した。心臓検体から *S. mutans* が分離されたラットにおいても、心臓弁に明らかな疣腫の形成を認めるに至ったものはごく一部であった。これらの結果から、心疾患患者では侵襲的な歯科処置だけでなく、重度のう蝕病変を放置することによっても軽度の IE もしくは IE 様の病変を生じることが示唆された。さらに、心臓弁を傷害させていない一部のラットの心臓からも *S. mutans* が分離されたことから、稀にではあるが健常者でも IE 発症のリスクを有する可能性が考えられた。今後、本研究で構築したラットモデルを応用して、様々なう蝕の程度や心臓弁傷害の程度を生じさせるとともに、様々な *S. mutans* 株を感染させ、う蝕病変部に存在する *S. mutans* が IE に及ぼす影響について詳細に検討していきたいと考えている。

様式 7

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏　名　（　又吉　紗綾　） | | | |
|---|---|---|---|
| | （職） | | 氏　　名 |
| 論文審査担当者 | 主 査 | 教　授 | 仲野　　和彦 |
| | 副 査 | 教　授 | 川端　　重忠 |
| | 副 査 | 准教授 | 久保庭　　雅恵 |
| | 副 査 | 講　師 | 村上　　旬平 |

**論文審査の結果の要旨**

本研究は、*Streptococcus mutans* 株を用いた従来のラットう蝕モデルを改変し、歯髄腔に及ぶ重度う蝕を生じさせ、大動脈弁に傷害を与えた状況下で認められる心臓の変化について検討した。その結果、感染性心内膜炎の発症が認められ、口腔に定着した *S. mutans* 株が歯髄腔を通じて心臓に到達し、病変を形成した可能性が示唆された。

本研究の結果は、*S. mutans* の関わる感染性心内膜炎の発症メカニズムの一端について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。