OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 死菌処理したStreptococcus mutansのコラーゲン結合能およびカイコモデルに対する病原性の評価 |
| Author(s) | 末廣, 雄登 |
| Citation | 大阪大学, 2023, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/91860 |
| 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　（　末廣雄登　） | |
|---|---|
| 論文題名 | 死菌処理した*Streptococcus mutans*のコラーゲン結合能およびカイコモデルに対する病原性の評価 |

論文内容の要旨

【緒言】

口腔内には生菌だけでなく、抗菌薬や唾液中の抗菌成分によって死滅した細菌も存在している。歯科治療や日々のブラッシングなどにより口腔内に出血が生じた際、口腔内の生菌および死菌は血液中に侵入して全身を巡る可能性が生じる。先天性心疾患を有する患者や人工弁置換術を受けた患者では、傷害のある心内膜や弁膜において細菌が付着し、感染性心内膜炎（Infective endocarditis; IE）の発症に至ることがある。そのため、観血的な歯科処置を行う際には、IEの予防のために抗菌薬の術前投与が推奨されている。

IEの起炎菌として、う蝕の主要な原因細菌である*Streptococcus mutans*が知られている。*S. mutans*のうち、菌体表層に約120 kDaのコラーゲン結合タンパクであるCnmを発現する菌株は、心臓弁の主要な構成成分であるI型コラーゲンに付着して細菌塊を形成することでIEに対する病原性に関与すると考えられている。

近年、IE患者より摘出した心臓弁検体において、生菌は分離されないにもかかわらず細菌のDNAが検出される報告がなされていることから、死菌となった*S. mutans*もIEのリスクファクターになる可能性が考えられた。そこで本研究では、IE予防のための第一選択薬であるアモキシシリンもしくは唾液中の主要な抗菌成分であるリゾチームによって死菌処理した*S. mutans*を用いて、I型コラーゲンへの結合能の分析を行うとともに、IEの病原性のスクリーニングとして、カイコモデルにおける病原性の評価を行うこととした。

【材料および方法】

１．使用菌株および培養条件

１）使用菌株

当教室で保有するCnm陽性*S. mutans*臨床分離株のうち、IE患者の血液より分離した*S. mutans* TW295株、TW295株の*cnm*遺伝子を不活化させた変異株であるTW295CND株およびTW295CND株に*cnm*遺伝子を再導入した相補株であるTW295comp株を用いた。供試菌はいずれもBrain Heart Infusion（BHI）液体培地にて37°Cで18時間培養したものを使用した。

２）供試菌の死菌処理

$1.0\times10^9$ CFU/mLに調整した供試菌に、アモキシシリン1 mg/mLもしくはリゾチーム10 mg/mLのいずれかを37°Cで18時間作用させることで死菌処理を行った。

２．供試菌のI型コラーゲンに対する結合能の分析

I型コラーゲンをコーティングした96ウェルプレートに、1ウェルあたり$1.0\times10^9$ CFUの供試菌を添加し、37°Cで3時間インキュベートした。付着した細菌を25％ホルムアルデヒドにより固定した後に0.05％クリスタルバイオレットで染色し、吸光度計を用いて$OD_{595}$値を測定した。測定結果は、Cnm陽性株

であるSA83株の値を100％と定義した際の各供試菌の値を計算して比較した。

３．カイコモデルにおける供試菌の病原性の評価

１）供試菌を投与したカイコの経時的な生存率の分析

18日齢のカイコの背面に$1.0\times10^{7}$ CFUの供試菌を水平投与した後、37°Cで120時間飼育した。カイコの生死の判定は12時間ごとに実施した。

２）供試菌を投与したカイコの組織学的分析

供試菌投与後72時間のカイコを安楽死させて10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋を行った。カイコを体軸に対して垂直断の薄切切片にした後にグラム染色を行い、光学顕微鏡にて観察を行った。

４．統計学的分析

多群間比較は一元配置分散分析の後、Bonferroni法を用いて行い、カイコの生存率はKaplan-Meierプロットを用いて評価し、Log-Rank検定にて分析した。有意水準は全て5%に設定した。

【結果】

１．*S. mutans*のI型コラーゲンに対する結合能の分析

TW295株およびTW295comp株は生菌およびアモキシシリン処理した場合のいずれにおいてもコラーゲン結合能を示した。また、TW295CND株はアモキシシリン処理の有無に関わらずコラーゲン結合能をほとんど示さなかった。一方で、リゾチーム処理した場合には、いずれの供試菌においてもコラーゲン結合能をほとんど示さなかった。

２．カイコモデルにおける*S. mutans*の病原性の評価

１）カイコの経時的な生存率の分析

いずれの菌株においても、生菌もしくはアモキシシリン処理した菌を投与した場合はPBSを投与した場合と比較してカイコの生存率が有意に低下した。特に、TW295株やTW295comp株を投与した場合は生存率の低下が顕著であった。一方で、リゾチーム処理した菌を投与した場合は、いずれの菌株においてもカイコの生存率は低下しなかった。

２）カイコの組織学的分析

いずれの菌株においても、生菌を投与した場合においてカイコの腸管壁に多数の細菌塊を認めた。TW295株およびTW295comp株においては、アモキシシリン処理した菌を投与した場合においてもカイコの腸管壁に多数の細菌塊を認めた。一方で、アモキシシリン処理したTW295CND株ではカイコの腸管壁にわずかな細菌の付着を認めた。また、リゾチーム処理した菌を投与した場合は、いずれの菌株においてもカイコの腸管壁および他の組織に細菌塊を認めなかった。

【考察】

本研究において、アモキシシリンによる死菌処理を行ったCnm陽性*S. mutans*は、心臓弁の主要な構成成分であるI型コラーゲンに対する結合能を有するだけでなく、カイコへの病原性を有することが明らかとなった。一方で、唾液中の抗菌成分であるリゾチームにより死菌処理を行ったCnm陽性*S. mutans*は、I型コラーゲンに対する結合能がほとんど消失し、カイコへの病原性も低下することが明らかとなった。これらのことから、アモキシシリンによりIEの予防投与を行っても、Cnm陽性*S. mutans*のIEに対する病原性を完全に消失させることはできない可能性が示された。それとは対照的に、リゾチームはCnm陽性*S. mutans*のIEに対する病原性を消失させることができる可能性が示された。しかし、本研究で使用したリゾチームの濃度はヒトの唾液中に含まれる濃度よりもはるかに高いため、臨床応用するにはさらなる研究が必要であると考えられる。

様式７

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏　名 | （　末廣　雄登　） | |
|---|---|---|
| | （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 | 大嶋　淳 |

**論文審査の結果の要旨**

本研究は、死菌処理した *Streptococcus mutans* のコラーゲン結合能およびカイコモデルに対する病原性を評価したものである。その結果、今回の実験系では、コラーゲン結合タンパク（Cnm）陽性の *S. mutans* はアモキシシリンを用いて死菌としてもコラーゲン結合能を有し、カイコの幼虫への高い病原性を示した。一方で、唾液中の抗菌成分であるリゾチームを用いて死菌にするとコラーゲン結合能は失活し、カイコの幼虫への病原性が著しく低下した。

本研究結果は、Cnm 陽性の *S. mutans* に起因する感染性心内膜炎に対して有効な予防法の確立に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。