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

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

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

末　廣　雄　登

はじめに

侵襲的な歯科処置や日々のブラッシングなどにより口腔内に出血が生じると、口腔細菌は血液中に侵入して菌血症を引き起こす（Tawakoli ら, 2013）。血液中の細菌は、心疾患を有する患者の心臓弁や血管壁に付着して疣腫と呼ばれる細菌塊を形成し、感染性心内膜炎（infective endocarditis; IE）を誘発することがある（Koren ら, 2011; Nakatani ら, 2019）。そのため、IE のリスクとなる心疾患を有する患者に対して観血的な歯科処置を行う際には、抗菌薬の予防投与が推奨されている（Nakano ら, 2011a）。

う蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* は IE の原因菌としても知られている（Nakano ら, 2011b）。口腔から分離される *S. mutans* のうち約 10〜20 %の株は、菌体表層に分子量 120 kDa のコラーゲン結合タンパクを発現している（Nomura ら, 2009a; Nomura ら, 2012）。Cnm 陽性 *S. mutans* は、心臓弁や血管壁の主要な構成成分である I 型コラーゲンに付着することで IE の病態に関与していると考えられている（Nomura ら, 2013）。また、Cnm 陽性 *S. mutans* は IE の主要な合併症である脳血管疾患を有する患者の口腔内から高頻度で検出されることが近年報告されている（Tonomura ら, 2016; Watanabe ら, 2016）。

IE における起炎菌の診断法として、生菌を検出する血液培養法が広く用いられている（Nakatani ら, 2019）。一方、生菌だけでなく死菌の DNA も検出することのできる遺伝子解析法が新たな診断法として応用されてきている（Nomura ら, 2009b）。これまでの研究から、IE 患者から摘出した心臓弁検体を分析した際に、血液培養法で生菌の *S. mutans* が検出されなくても、*S. mutans* の細菌 DNA が検出される症例が存在することが明らかになっている（Nomura ら, 2009b）。また、IE 患者の心臓弁検体から検出された *S. mutans* から、コラーゲン結合タンパクをコードする遺伝子が高頻度で検出されることも報告されている（Nomura ら, 2013）。これらのことから、死菌となった Cnm 陽性の *S. mutans* が IE の病原因子となる可能性が考えられた。

本研究では、IE の予防薬として広く用いられてい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り死菌処理した *S. mutans* を用いて、心臓弁の主要な構成成分である I 型コラーゲンへの結合能の分析を行うこととした。また、全身病原性の評価として、細菌を感染させた場合に哺乳類と共通した体内動態を示すカイコモデルを用いて、死菌処理した *S. mutans* の病原性を評価することとした。

材料および方法

１．菌株と培地

S. mutans のうち抜歯後菌血症患者の血液より分離した TW295 株（Cnm 陽性）、TW295 株の *cnm* 遺伝子を不活化させた変異株（TW295CND 株）および *cnm* 遺伝子を再導入した相補株である（TW295comp 株）を用いた。また、当教室で保有する *S. mutans* 臨床分離株のうち Cnm 陽性株 10 株および Cnm 陰性株 10 株を用いた（表 1）。供試菌は、Brain Heart Infusion（BHI; Difco Laboratories, Detroit, MO, USA）液体培地および Mitis-salivarius（MS）寒天培地（Difco Laboratories）に 100 unit/mL バシトラシン（Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, USA）および 15％スクロース（関東化学株式会社, 東京）を添加した MSB 寒天培地を用いて培養した。供試菌は BHI 液体培地では 37 ˚C で 18 時間、MSB 寒天培地では窒素 95 %、炭酸 5 %の条件下で 37 ˚C で 48 時間嫌気的に培養した。TW295CND 株は 10.0 μg/mL エリスロマイシン（富士フイルム和光純薬株式会社, 東京）を添加した BHI 液体培地、TW295comp 株は 10.0 μg/mL エリスロマイシンと 10.0 mg/mL スペクチノマイシン（富士フイルム和光純薬株式会社）を添加した BHI 液体培地を用いて培養して実験に使用した。

２．*S. mutans* の死菌処理

10 mL の BHI 液体培地にて 37 ˚C で 18 時間培養した供試菌を 3,000×rpm、4 ℃ で 10 分間遠心分離して集菌し、10.0 mg/mL リゾチーム（富士フイルム和光純薬株式会社）もしくは 1.0 mg/mL アモキシシリン（富士フイルム和光純薬株式会社）を含む滅菌リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline; PBS）にそれぞれ再懸濁し、37 ℃ で 18 時間作用させた。また、死菌処理した供試菌を MSB 寒天培地上に播種し 37 ℃ で 48 時間培養した後に細菌が存在しないことを確認した。リゾチームもしくはアモキシシリンで処理した後に各細菌懸濁液を PBS で 2 回洗浄し、PBS に再懸濁して OD_{550} 値 ＝1.0 すなわち菌の濃度が 1.0×10^9 CFU/mL になるように調整して各実験に使用した。

３．*S. mutans* の電子顕微鏡による観察

１）走査型電子顕微鏡による菌体表層構造の観察

走査型電子顕微鏡による *S. mutans* の観察は（Nomura ら, 2014）の方法を用いて行った。供試菌を PBS で洗浄後、2 %四酸化オスミウムおよび 1 %グルタルアルデヒドを用いて固定し、エタノールで脱色した。その後、 *t*-ブチルアルコールを用いて凍結乾燥させたサンプルをオスミウムでコーティングした後に観察した。

２）透過型電子顕微鏡による菌体内構造の観察

透過型電子顕微鏡による *S. mutans* の観察は（Fujita ら, 2007）の方法を用いて行った。

供試菌を PBS で洗浄し、2 %グルタルアルデヒドで固定した。その後、脱水してエポンに包埋し、組織切片を作製して観察した。

４．*S. mutans* の Ⅰ 型コラーゲン結合率の分析

１）Ⅰ 型コラーゲンに結合した *S. mutans* の吸光度測定による分析

S. mutans の I 型コラーゲン結合アッセイは（Nomura ら, 2009a）の方法を用いて行った。0.25 M 酢酸で調製した I 型コラーゲン（Sigma-Aldrich Co.; 10 mg/ml）を 96 穴マイクロタイタープレート（Becton Dickinson., Franklin Lakes, NJ, USA）にコーティングし、4 ℃ で一晩インキュベートした。プレートを PBS で 3 回洗浄し、ウシ血清アルブミン（BSA; Sigma-Aldrich Co.）を加えた PBS を各ウェルに添加し、37 ℃ で 1.5 時間インキュベートした。その後、PBS で調整した供試菌を 1 ウェルあたり 100 µL（1.0×10^9CFU）添加して 37 ℃ で 3 時間インキュベートした。ウェルを PBS で 3 回洗浄し、100 µL の 25 %ホルムアルデヒド（富士フィルム和光純薬株式会社）を各ウェルに添加して室温で 30 分間固定した。PBS で 3 回洗浄した後、付着した細菌を 0.05 %のクリスタルバイオレット水溶液（富士フイルム和光純薬株式会社）を 100 µL ずつ分注して 1 分間室温で染色した。染色後、プレートを PBS で 3 回洗浄して 7 % 酢酸を 100 µL ずつ添加して溶解させ、マイクロプレートリーダー（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を用いて各ウェルの OD_{595} 値を測定した。結果は、BSA でコーティングしたウェルの値を差し引き、SA83 株（Cnm 陽性）の値を 100 %と定義した際の各菌株の値を計算し、コラーゲン結合率として表した。データは 4 回の実験の平均値と標準偏差を分析結果とした。

２）Ⅰ 型コラーゲンに結合した *S. mutans* の共焦点レーザー顕微鏡による観察

共焦点レーザー走査顕微鏡を使用した *S. mutans* の観察は、（Nomura ら, 2021）の方法を用いて行った。４．１）の方法における 96 ウェルプレートの代わりにチャンバーカバーガラスシステム（CultureWell™, Grace Bio Labs, OR, USA）を使用して *S. mutans* を I 型コラーゲンに結合させた。3 時間後各ウェルを 1 mL のハンクス平衡塩溶液（Lonza, Walkersville, MD, USA）に 5 µL の 10 mM ヘキシジウムイオダイド水溶液（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を添加した染色液を用いて暗所にて 15 分間室温で染色した。染色した細菌を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 543 nm の波長のレーザー光を照射して観察した。

５．*S. mutans* のカイコの幼虫に対する病原性の分析

１）生菌の *S. mutans* のカイコの幼虫に対する病原性の分析

S. mutans のカイコの幼虫に対する病原性の分析は（Nomura ら, 2014）の方法を用いて行った。10 日齢のカイコの幼虫（高原社, 長野）を 25 °C の暗所で 18 日齢まで飼育し、カイコの幼虫 1 匹あたり 1.0×10^5 CFU、1.0×10^6 CFU もしくは 1.0×10^7 CFU の

生菌の TW295 株、TW295CND 株もしくは TW295comp 株およびコントロールとして PBS を投与する群に 10 匹ずつ分けた。カイコの幼虫の背面の半月紋後部に 50 μL の菌液もしくは PBS を水平投与後、37 ℃ で 120 時間飼育した。飼育期間中は 12 時間ごとに生存の確認を行い、カイコの幼虫の体動がない場合を死亡とみなした。

２）死菌処理した *S. mutans* のカイコの幼虫に対する病原性の分析

５．１）の方法によりカイコの幼虫を 18 日齢まで飼育し、投与する *S. mutans* を 1.0×10^7 CFU の生菌、アモキシシリン処理後もしくはリゾチーム処理後の *S. mutans* に変更した。投与後、経時的にカイコの幼虫の生存の確認を行った。

３）*S. mutans* を投与したカイコの幼虫の病理組織学的評価

５．２）の方法と同様に *S. mutans* を投与したカイコの幼虫を投与後 72 時間後に安楽死させた。それぞれ 10 %ホルムアルデヒドで固定し、頭部から尾部まで 7 mm 間隔で 5 分割した標本をパラフィン包埋して 3 μm の切片を作製した。作製した切片をグラム染色もしくはヘマトキシリン・エオジン染色にて染色して病理組織学的評価を行った。細菌感染および色素沈着の評価のために、カイコの幼虫の 5 つの切片を観察して各器官における細菌の付着または色素沈着が最も多い領域を抽出し、10 倍の拡大率で観察した。細菌塊もしくは色素沈着が認められた部位の数を数えて、スコア 0（細菌塊または色素沈着なし)、スコア 1（5 以下)、スコア 2（6〜10)、スコア 3（11 以上）と評価した。変性病変の評価は 5 つの切片のうち病変のある部位の数に基づいてスコア 0（病変なし)、スコア 1（1 か所)、スコア 2（2 か所)、スコア 3（3〜5 か所）と評価した。全ての評価は 1 人の病理学者（Sept. Sapie Co. Ltd, 東京）により二重盲検法で実施された。

６．*S. mutans* 臨床分離株の分析

当教室にて保有する TW295 株以外の *S. mutans* 臨床分離株のうち、Cnm 陽性株 10 菌種および Cnm 陰性株 10 菌種に対して ４．１）の方法により I 型コラーゲン結合率を分析し、５．２）の方法によりカイコの幼虫に対する病原性を評価した。また、*S. mutans* の I 型コラーゲン結合率と *S. mutans* を投与したカイコの幼虫の生存率の相関関係について回帰分析を行った。

７．統計分析

統計学的分析には GraphPad Prism 9（GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA）を用いた。多群間の比較には ANOVA の後 post-hoc 解析として Bonferroni 法を用いた。カイコの幼虫の生存率は Kaplan-Meier プロットを用いて評価し、log-rank 検定にて分析した。I 型コラーゲン結合率とカイコの幼虫の生存率の相関関係については回帰分析を行った。全ての分析において有意水準 5 %以下の場合を有意差ありとした。

結果

１. 生菌および死菌処理後の *S. mutans* の形態学的評価

１）走査型電子顕微鏡による *S. mutans* の菌体表層構造の観察

いずれの菌株も生菌においては菌体表層構造の傷害は認めなかったが、アモキシシリン処理後の *S. mutans* においてはわずかな傷害を認めた（図 1)。一方で、リゾチーム処理後の *S. mutans* においては菌体表層構造全体の明らかな傷害を認めた。

２）透過型電子顕微鏡による *S. mutans* の菌体内構造の観察

3 菌種とも生菌においては菌体内構造の異常は認めなかった（図 2)。しかし、アモキシシリン処理後の *S. mutans* においては細胞質内の変性を認め、リゾチーム処理後の *S. mutans* においては細胞質内の著しい崩壊を認めた。

２. 生菌および死菌処理後の *S. mutans* の Ⅰ 型コラーゲン結合率の分析

１）吸光度測定による *S. mutans* の Ⅰ 型コラーゲンに対する結合率の分析

TW295 株および TW295comp 株は生菌およびアモキシシリン処理後のいずれにおいてもコラーゲン結合率を示した（図 3)。また、TW295CND 株は細菌の処理方法によらずコラーゲン結合率をほとんど示さなかった。それに対して、リゾチーム処理後はいずれの菌株においてもコラーゲン結合率をほとんど示さなかった。

２）Ⅰ 型コラーゲンに結合した *S. mutans* の共焦点レーザー顕微鏡による観察

TW295 株および TW295comp 株は生菌およびアモキシシリン処理後のいずれにおいても I 型コラーゲンに多数結合していた（図 4)。また、TW295CND 株は細菌の状態にかかわらず I 型コラーゲンにほとんど結合していなかった。一方、リゾチーム処理後はいずれの菌株においても I 型コラーゲンに結合していなかった。

３. カイコモデルを用いた生菌および死菌処理後の *S. mutans* の病原性の分析

１）生菌の *S. mutans* のカイコの幼虫への病原性の分析

1.0×10^5 CFU もしくは 1.0×10^6 CFU の TW295 株を投与した場合、カイコの幼虫の生存率は菌の投与後 72 時間後以降に低下し始め、120 時間後では 50％を下回った（図 5)。1.0×10^7 CFU の TW295 株を投与した場合は、菌の投与後 12 時間後以降にカイコの幼虫の生存率は低下し始め、72 時間後以降で 50％を下回った。1.0×10^5 CFU もしくは 1.0×10^6 CFU の TW295CND 株を投与したカイコの幼虫では、120 時間後においても生存率が 50％以上であった（図 6)。一方、1.0×10^7 CFU の TW295CND 株を投与した場合は、菌の投与後 84 時間後以降にカイコの幼虫の生存率は 50 ％を下回った。TW295comp 株を投与した場合は、いずれの菌量においても TW295 株を投与した場合と同様の傾向を示した（図 7)。

２）*S. mutans* のカイコの幼虫への病原性の分析

アモキシシリン処理後の TW295 株を投与したカイコの幼虫において、生菌の TW295 株を投与したカイコの幼虫と比較して生存率の低下が遅延したが、両群間の生存率に有意差は認めなかった。(図 8)。一方、生菌を投与した群およびアモキシシリン処理した群はともに、PBS 投与群と比較してカイコの幼虫の生存率の有意な低下を認めた（$P < 0.001$)。リゾチーム処理後の TW295 株を投与した場合は、カイコの幼虫の生存率は低下しなかった。生菌もしくはアモキシシリン処理後の TW295CND 株を投与した場合は PBS を投与した場合と比較して生存率は有意に低下したが（$P < 0.05$)、生菌およびアモキシシリン処理後の TW295 株を投与したカイコの幼虫の生存率よりも高かった（図 9)。一方で、リゾチーム処理後の TW295CND 株を投与した場合は、カイコの幼虫の生存率は低下しなかった。 TW295comp 株は、菌株にいずれの処理を行った場合においても TW295 株と同様の傾向を示した（図 10)。

３）*S. mutans* を投与したカイコの幼虫の病理組織学的分析

（１）カイコの幼虫の各器官に付着した *S. mutans* の分析

生菌の TW295 株を投与したカイコの幼虫では、繭糸腺を除く各器官で細菌が検出され、腸管で最も多くの細菌が検出された（図 11、12)。アモキシシリン処理後の TW295 株を投与したカイコの幼虫は、生菌の TW295 株を投与したカイコの幼虫よりも各器官に付着した細菌数が少なかったが、繭糸腺を除くすべての器官において細菌が検出された。対照的に、リゾチーム処理後の TW295 株を投与したカイコの幼虫においてはどの器官にも細菌は検出されなかった。生菌の TW295CND 株を投与したカイコの幼虫においては、繭糸腺を除く各器官で細菌が検出された（図 13、14)。しかし、アモキシシリン処理後の TW295CND 株を投与したカイコの幼虫は、腸管と間質にわずかな細菌しか検出されず、リゾチーム処理後の TW295CND 株を投与したカイコの幼虫は、どの器官からも細菌は検出されなかった。さらに、生菌もしくはアモキシシリン処理後の TW295comp 株を投与したカイコの幼虫においては繭糸腺を除く各器官で細菌が検出されたが、リゾチーム処理後の TW295comp 株を投与したカイコの幼虫においては、いずれの器官でも細菌は検出されなかった（図 15、16)。

（２）*S. mutans* を投与したカイコの幼虫の各器官における病理組織学的分析

生菌の TW295 株を投与したカイコの幼虫は PBS を投与したカイコの幼虫と比較して、腸管の粘膜上皮剥離および間質の色素沈着において有意に高いスコアを示した($P < 0.05$)（表 2)。TW295CND 株を投与したカイコの幼虫においては、生菌投与時に腸管への明らかな色素沈着を認めた（表 3)。また、生菌もしくはアモキシシリン処理後の TW295comp 株を投与したカイコの幼虫においてはともに繭糸腺の水腫様変性および腸管の色素沈着を認め、アモキシシリン処理後の TW295comp 株を投与したカイコの幼虫においては粘膜上皮剥離および粘膜上皮壊死を認めたが、PBS を投与したカイコの幼虫と比較していずれも有意差は示さなかった（表 4)。

４. 生菌および死菌処理した *S. mutans* 臨床分離株を用いた分析

１）I 型コラーゲン結合率の分析

Cnm 陰性の *S. mutans* 臨床分離株は、細菌の処理方法に関わらずコラーゲン結合率は 0～数%しか認めなかった（図 17)。それに対して、生菌およびアモキシシリン処理後の Cnm 陽性の *S. mutans* 臨床分離株においては、Cnm 陰性の *S. mutans* 臨床分離株よりも有意に高いコラーゲン結合率を認めた（P<0.001)。一方で、リゾチーム処理後には Cnm の有無に関係なく全ての *S. mutans* 臨床分離株において、コラーゲン結合率は 0～数%しか認められなかった。

２）カイコの幼虫への病原性の分析

Cnm 陰性の *S. mutans* 臨床分離株において、生菌を投与したカイコの幼虫は投与後 84 時間後において生存率が 50 %以下となったが、アモキシシリン処理後もしくはリゾチーム処理後の菌を投与した場合、投与後 120 時間後においてカイコの幼虫の生存率はそれぞれ 70 %以上であった（図 18)。それに対して Cnm 陽性の *S. mutans* 臨床分離株の、生菌もしくはアモキシシリン処理後の菌を投与した場合は、投与後 60 時間後でカイコの幼虫の生存率は 50 %以下となった（図 19)。しかし、リゾチーム処理後の菌を投与した場合は、PBS を投与した場合と比較して生存率の低下を示さなかった。また、*S. mutans* 臨床分離株の I 型コラーゲン結合率と *S. mutans* 臨床分離株を投与したカイコの幼虫の生存率の低下との間には有意な相関関係を示した（P＜0.001）（図 20)。

考察

S. mutans は観血的な歯科処置や日々のブラッシングなどにより口腔に出血を生じた際に毛細血管を介して血液中に侵入後、ある種の心疾患を有する患者の心臓弁に到達して IE を発症することがある（Nakano ら, 2011a）。*S. mutans* の心臓弁組織への付着能は IE の主要な病原因子であるが（Avilés-Reyes ら, 2017）、死菌となった *S. mutans* が付着能を有しているかは明らかとなっていない。本研究では、IE の予防的抗菌薬として広く用いられているアモキシシリンおよび唾液中の主要な抗菌成分であるリゾチームにより死菌処理した *S. mutans* を用いて、コラーゲン結合能およびカイコモデルを用いた分析を行った。その結果、Cnm 陽性の *S. mutans* がアモキシシリン処理によって死菌となった場合でもコラーゲン結合能を示し、カイコの幼虫に対する病原性を有することが明らかとなった。一方で、リゾチーム処理によって死菌となった場合には、Cnm 陽性の *S. mutans* はコラーゲン結合能を失い、カイコの幼虫に対する病原性は大きく低下することが示された。

本研究では *S. mutans* の死菌処理の方法として、観血的な歯科処置を行う際に IE 予防のための第一選択薬として用いられるペニシリン系抗菌薬であるアモキシシリンを使用した。IE の予防のために推奨される約 2 g のアモキシシリンを経口投与した場合には、血清中では 9〜16 μg/mL まで濃度が上昇することが報告されている（Cannon ら, 1984）。本研究で使用した *S. mutans* のアモキシシリンによる最小発育阻止濃度は 16 μg/mL 以下であったが、菌を完全に死滅させるには 1.0 mg/mL のアモキシシリンが必要であった。1.0 mg/mL のアモキシシリンで死菌処理を行った場合、*S. mutans* の菌体表層構造の一部に傷害を認めるとともに、細胞質内の変性を生じることが電子顕微鏡解析により明らかとなった。このことから、1.0 mg/mL のアモキシシリンを *S. mutans* に作用した場合、細胞壁を破壊した後に、抗菌薬の成分が細胞質内に作用することによって *S. mutans* が死滅すると考えられた。

リゾチームは分子量約 14 kDa のタンパクであり、細菌の細胞壁を加水分解することで溶菌作用を示す（Ferraboschi ら, 2021）。リゾチームは自然界に広く分布し、成人の唾液中には 10〜200 μg/mL のリゾチームが含まれている（Twetman ら, 1981）。また、動植物から分離・生成したリゾチームは食品や医薬品に応用されている（Altin ら, 2021; Proctor ら, 1988）。本研究では、*S. mutans* を完全に死滅させるためには、唾液中に含まれるよりも高濃度の 10 mg/mL のリゾチームが必要であることが分かった。また、電子顕微鏡所見から、10 mg/mL のリゾチームで処理した *S. mutans* は菌体表層構造が全体的に溶解し、菌体そのものが粉砕していくことで菌が死滅することが明らかとなった。

これまでの生菌を用いた検討から、Cnm 陽性の *S. mutans* はコラーゲン結合能を有し、遺伝子操作により作製した Cnm 欠失変異株や Cnm 陰性の *S. mutans* はコラーゲン

に結合能を示さないことが明らかになっている（Nakano ら, 2010）。本研究では、アモキシシリンおよびリゾチームで死菌処理した Cnm 陽性の *S. mutans* のコラーゲン結合能の分析を行った。その結果、アモキシシリン処理後の Cnm 陽性の *S. mutans* のコラーゲン結合率は、生菌のコラーゲン結合率の約 70〜80%まで低下させる程度にとどまった。アモキシシリンが Cnm 陽性の *S. mutans* のコラーゲン結合能を十分に抑制できなかったのは、電子顕微鏡所見から、アモキシシリンによる Cnm 陽性の *S. mutans* の細胞壁への傷害は局所的であり、細胞壁上に発現する多くの Cnm タンパクが構造的に損なわれなかったためと考えられる。一方で、リゾチームで死菌処理した場合には、Cnm 陽性の *S. mutans* のコラーゲン結合能はほとんど消失した。これは、リゾチームが細菌の細胞壁を加水分解する作用が Cnm 陽性の *S. mutans* の細胞壁全体に生じたことで、菌体表層のタンパク質も構造的に崩壊したことによるものと考えられる。これらの結果から、抗菌薬の種類によって、Cnm 陽性の *S. mutans* の Cnm タンパクの構造およびコラーゲン結合能に及ぼす影響が異なることが明らかになった。特に、Cnm タンパクが発現する細胞壁に高い傷害性を有するリゾチームが、Cnm 陽性の *S. mutans* のコラーゲン結合能の抑制に有効である可能性が示唆された。

カイコの幼虫は哺乳類と類似した自然免疫を有しており、黄色ブドウ球菌や緑膿菌、コレラ菌、サルモネラ菌などの病原細菌を感染させた際に生存率の低下を生じることが知られている（Kaito ら, 2002）。近年、カイコの幼虫は動物モデルに代わる全身病原性のスクリーニング法として用いられており、*S. mutans* の IE に対する病原性評価のスクリーニング法としても応用されている（Nomura ら, 2014）。カイコの幼虫は、ヒトの肝臓で薬物などの生体外異物の解毒を行い、脂溶性の高い薬物を代謝して水溶性を高める機能をもつ代謝酵素であるシトクロム P450 を有しており、毒物による 50%致死量（LD_{50}）はカイコとヒトとで相関することから（Hamamoto ら, 2004）、本研究では *S. mutans* 感染後に 50%のカイコの幼虫が死亡するまでの時間に着目した。その結果、アモキシシリンで死菌処理した Cnm 陽性の *S. mutans* 感染群では生菌感染群と比較して半数のカイコの幼虫が死亡するまでの時間は延長したものの、両群間のカイコ幼虫の生存率には統計学的な有意な差は認めなかった。それに対して、リゾチーム処理した Cnm 陽性の *S. mutans* 感染群では、実験期間中にカイコの幼虫はほとんど死亡せず、生菌感染群と比較して生存率が有意に高かった。これらの結果から、Cnm 陽性の *S. mutans* は死菌処理の方法によって全身病原性が異なり、リゾチームが Cnm 陽性の *S. mutans* の病原性の低下に有効であることが示唆された。

本研究において、Cnm 陽性の *S. mutans* がカイコの幼虫に及ぼす病原性をより詳細に分析するために、カイコを横断して器官の状態を病理組織学的に評価した。その結果、生菌およびアモキシシリンで処理した Cnm 陽性の *S. mutans* 感染群では、カイコの幼虫の器官に Cnm 陽性の *S. mutans* が付着して菌塊形成を認めた。それに対して、リゾチーム処理した Cnm 陽性の *S. mutans* 感染群では、カイコの体内に菌を全く認めなか

った。このことから、Cnm 陽性の *S. mutans* はカイコの幼虫の器官に存在するコラーゲンに付着して菌塊を形成し、生存率の低下を引き起こすと考えられた。一方、カイコの幼虫側の付着因子としては、食作用を有する顆粒細胞が体内に侵入した異物を認識し、細胞内に取り込む細胞性免疫応答があり、その一つとして細菌に結合能を有するタンパク質の存在が知られていることから（Watanabe ら, 2006）、今後は Cnm 陽性の *S. mutans* のカイコの幼虫への付着能を介した病原メカニズムについて、宿主要因も含めたより詳細な分析を行う必要がある。

本研究では *S. mutans* の菌体表層タンパクである Cnm に着目したが、*S. mutans* の菌体表層には Cnm 以外にも、スクロース依存性付着および菌体疎水性に関与する Protein Antigen（PA）が存在することが知られている（Okahashi ら, 1989）。PA は分子量約 190 kDa の高分子タンパク高原であり、*S. mutans* によるフィブリノーゲンに対する結合に関連しているという報告も存在する（Beg ら, 2002）。そのため、PA の存在が *S. mutans* のコラーゲン結合能やカイコの幼虫への付着能に何らかの影響を及ぼしている可能性も考えられるため、今後は、Cnm 以外の菌体表層タンパクにも着目した分析を行っていく必要があると考えられる。

近年、口腔内に存在する Cnm 陽性の *S. mutans* は IE だけでなく、脳出血、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪肝炎および IgA 腎症にも影響を与えることが示されている（Nakano ら, 2011b; Kojima ら, 2012; Naka ら, 2016; Naka ら, 2021）。これらの全身疾患は、口腔内の Cnm 陽性の *S. mutans* が血液中に侵入することで何らかの問題を有する臓器において疾患を発症するという点で IE と共通している。そのため、死菌となった Cnm 陽性の *S. mutans* は血液中に侵入後に様々な全身疾患の悪化にも関わっている可能性がある。今後はそれぞれの全身疾患に着目して、動物モデルや基礎実験による検討を行う必要があると考えられる。

本研究結果から、自然界に存在するリゾチームが Cnm 陽性の *S. mutans* の抑制に有効であることが明らかとなり、リゾチームが抗菌薬に代わる IE の予防法として応用できる可能性が示唆された。唾液中や血液中には、リゾチームだけでなくラクトフェリンやペルオキシダーゼなどの抗菌物質も含まれており（van't Hof ら, 2014; Wally ら, 2007; Fernández-Espejo ら, 2021）、*S. mutans* に対する抑制作用が明らかになってきている（Pinheruo ら, 2020）。今後は Cnm 陽性の *S. mutans* の IE における病原性に対して、ヒト由来の唾液中および血液中の抗菌物質の有効性についても分析し、生菌だけでなく死菌の病原性も消失させることができる、抗菌薬に代わる革新的な治療法の開発を検討する必要があると考えられる。

今後は、*S. mutans* が IE などの全身疾患を惹起するメカニズムを詳細に解析するとともに、*S. mutans* のコラーゲンへの結合能を阻害し、生体に対する病原性を消失させることができる臨床応用可能な物質に着目した分析を行っていきたいと考えている。

結論

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ところ、以下の結果が得られた。

1. Cnm 陽性の *S. mutans* はアモキシシリンにより死菌となっ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。
2. Cnm 陽性の *S. mutans* は唾液中の抗菌成分であるリゾチームにより死菌にな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。

以上のことから、Cnm 陽性の *S. mutans* に起因する IE を予防するうえで、ヒト由来の抗菌物質であるリゾチームが抗菌薬であるアモキシシリンよりも有効である可能性が示された。

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科学専攻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広島大学大学院医系科学研究科小児歯科学 野村 良太 教授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口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座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

Altin, K. T., N. Topcuoglu, G. Duman, M. Unsal, A. Celik, S. S. Kuvvetli, E. Kasikci, F. Sahin and G. Kulekci. 2021. Antibacterial effects of saliva substitutes containing lysozyme or lactoferrin against *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 129, 105183.

Avilés-Reyes, A., J. H. Miller, J. A. Lemos and J. Abranches. 2017. Collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* and related streptococci Mol. Oral Microbiol. 32, 89-106.

Beg, A. M., M. N. Jones, T. Miller-Torbert, R. G. Holt. 2002. Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 298, 75-79.

Cannon, P. D., H. J. Black, K. Kitson and C. S. Ward. 1984. Serum amoxy- cillin levels following oral loading dose prior to outpatient general anaesthesia for dental extractions. J Antimicrob Chemother. 13: 285−289.

Fernández-Espejo, E., F. R. de Fonseca, J. Suárez and Á. M. de Pablos. 2021. Cerebrospinal fluid lactoperoxidase level is enhanced in idiopathic Parkinson's disease, and correlates with levodopa equivalent daily dose. Brain Res. 1761, 147411.

Ferraboschi, P., S. Ciceri and P. Grisenti. 2021. Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. Antibiotics (Basel). 14;10(12):1534.

Fujita, K., M. Matsumoto-Nakano, S. Inagaki and T. Ooshima. 2007. Biological functions of glucan-binding protein B of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol. Immunol. 22, 289-292.

Hamamoto, H., K. Kurokawa, C. Kaito, K. Kamura, I. M. Razanajatovo, H. Kusuhara, T. Santa and K. Sekimizu. 2004. Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 774-779.

Kaito C., N. Akimitsu, H. Watanabe and K. Sekimizu. 2002. Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. Microb. Pathog. 32, 183-190.

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.

Koren, O., A. Spor, J. Felin, F. Fåk, J. Stombaugh, V.Tremaroli, C. J. Behre, R. Knight, B. Fagerberg, R. E. Ley and F. Bäckhed. 2011. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 108, 4592-4598.

Lapirattanakul, J., K. Nakano, R. Nomura, P. Leelataweewud, N. Chalermsarp, A. Klaophimai, R. Srisatjaluk, S. Hamada and T. Ooshima. 2011. Multilocus sequence typing analysis of *Streptococcus mutans* strains with the *cnm* gene encoding collagen-binding adhesin. J Med Microbiol. 60, 1677-1684.

Lapirattanakul, J., R. Nomura, M. Matsumoto-Nakano, R. Srisatjaluk, T. Ooshima and K. Nakano. 2015. Variation of expression defects in cell surface 190-kDa protein antigen of *Streptococcus mutans.* Int. J. Med. Microbiol. 305, 383-391.

Naka, S., R. Hatakeyama, Y. Takashima, M. Matsumoto-Nakano, R. Nomura and K Nakano. 2016. Contributions of *Streptococcus mutans* Cnm and PA antigens to aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice. Sci. Rep. 6, 36886.

Naka, S., K. Wato, T. Misaki, S. Ito, D. Matsuoka, Y. Nagasawa, R. Nomura, M Matsumoto-Nakano and K. Nakano. 2021. *Streptococcus mutans* induces IgA nephropathy-like glomerulonephritis in rats with severe dental caries. Sci. Rep. 11, 5784.

Nakano, K., R. Nomura, I. Nakagawa, S. Hamada and T. Ooshima. 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.

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 adhesin. Archives of Oral Biology. 55: 34-39.

Nakano, K. and T. Ooshima. 2011a. Common knowledge regarding prevention of infective endocarditis among general dentists in Japan. J. Cardiol. 57, 123-130.

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. Speziale, N. Shimada, A. Amano, Y. Kamisaki, T. Tanaka, K. Umemura and T. Ooshima. 2011b. The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. Nat. Commun. 2, 485.

Nakatani, S., T. Ohara, K. Ashihara, C. Izumi, S. Iwanaga, K. Eishi, Y Okita, M. Daimon, T. Kimura, K. Toyoda, H. Nakase, K. Nakano, M. Higashi, K. Mitsutake, T. Murakami, S. Yasukochi, S. Okazaki, H. Sakamoto, H. Tanaka, I. Nakagawa, R. Nomura, K. Fujiu, T. Miura, T. Morizane and Japanese Circulation Society Joint Working Group. 2019. JCS 2017 Guideline on prevention and treatment of infective endocarditis. Circ. J. 83, 1767-1809.

Nomura, R., K. Nakano, N. Taniguchi, J. Lapirattanakul, H. Nemoto, L. Grönroos, S. Alaluusua and T. Ooshima. 2009a. Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. J. Med. Microbiol. 58, 469-475.

Nomura, R., K. Nakano, H. Nemoto, T. Mukai, H. Hata, K. Toda, H. Yoshioka, K. Taniguchi, A. Amano and T. Ooshima. 2009b. Molecular analyses of bacterial DNA in extirpated heart valves from patients with infective endocarditis. Oral Microbiol. Immunol. 24, 43-49.

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, S. Inagaki, K. Taniguchi, T. Ooshima and K. Nakano. 2013. Potential involvement of collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* in infective endocarditis. Oral Dis. 19, 387-393.

Nomura, R., M. Otsugu, S. Naka, N. Teramoto, A. Kojima, Y. Muranaka, M. Matsumoto-Nakano, T. Ooshima and K. Nakano. 2014. Contribution of *Streptococcus mutans* serotype *k* strains interaction with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis.

Infect. Immun. 82, 5223-5234.

Nomura, R., J. Ohata, M. Otsugu, R. Okawa, S. Naka, M. Matsumoto-Nakano and K. Nakano. 2021. Inhibitory effects of flavedo, albedo, fruits, and leaves of *Citrus unshiu* extracts on *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 124, 105056.

Okahashi, N., C. Sasakawa, M. Yoshikawa, S. Hamada and T. Koga. 1989. Cloning of a surface protein antigen gene from serotype *c Streptococcus mutans*. Mol Microbiol. 3,:221-228.

Otsugu, M., R. Nomura, S. Matayoshi, N. Teramoto and K. Nakano. 2017. Contribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins in the presence of serum to the pathogenesis of infective endocarditis. Infect. Immun. 85, e00401-17.

Pinheiro, S. R. L., C. C. da Silva, L. A. da Silva and M. P. Cicotti. 2020. Antimicrobial capacity of a hydroxyapatite-lysozyme-lactoferrin-lactoperoxidase combination against *Streptococcus mutans* for the treatment of dental caries. Indian J. Dent. Res. 31, 916-920.

Proctor, V. A. and F. E. Cunningham. 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 26, 359-395.

Tawakoli, P. N., A. Al-Ahmad, W. Hoth-Hannig, M. Hannig and C. Hannig. 2013. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. Clin. Oral Investig. 17, 841-850.

Tonomura, S., M. Ihara, T. Kawano, T. Tanaka, Y. Okuno, S. Saito, R. P. Friedland, N. Kuriyama, R. Nomura, Y. Watanabe, K. Nakano, K. Toyoda and K. Nagatsuka. 2016. Intracerebral hemorrhage and deep microbleeds associated with *cnm*-positive *Streptococcus mutans*; a hospital cohort study. Sci. Rep. 6, 20074.

Twetman, S., A. Lindner and T. Modéer. 1981. Lysozyme and salivary immunoglobulin A in caries-free and caries-susceptible pre-school children. Swed Dent J. 5(1):9-14.

van't Hof, W., E. C. Veerman, A. V. N. Amerongen and A. J. M. Ligtenberg. 2014. Antimicrobial defense systems in saliva. Monogr. Oral Sci. 24, 40-51.

Wally, J. and S. K. Buchanan. 2007. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. Biometals 20, 249-262.

Watanabe, A., S. Miyazawa, M. Kitami, H. Tabunoki, K. Ueda and R. Sato. 2006. Characterization of a novel C-type lectin, *Bombyx mori* multibinding protein, from the *B. mori* hemolymph: mechanism of wide-range microorganism recognition and role in immunity. J. Immunol. 177, 4594-4604.

Watanabe, I., N. Kuriyama, F. Miyatani, R. Nomura, S. Naka, K. Nakano, M. Ihara, K. Iwai, D. Matsui, E. Ozaki, T. Koyama, M. Nishigaki, T. Yamamoto, A. Tamura, T. Mizuno, K. Akazawa, A. Takada, K. Takeda, K. Yamada, M. Nakagawa, T. Tanaka, N. Kanamura, R. P. Friedland and Y. Watanabe. 2016. Oral Cnm-positive *Streptococcus mutans* expressing collagen binding activity is a risk factor for cerebral microbleeds and cognitive impairment. Sci. Rep. 6, 38561.

表1 本研究で使用した供試菌

菌株	血清型	特徴	分離国	Cnm	引用
TW295	*k*	抜歯後菌血症患者の血液より分離 東京女子医大菊池教授より供与	日本	+	Nakano ら, 2004
TW295CND	*k*	TW295 株の *cnm* 遺伝子を不活化	日本	-	Nakano ら, 2010
TW295comp	*k*	TW295CND 株に *cnm* 遺伝子を導入	日本	+	Otsugu ら, 2017
NN2101	*c*	健常者口腔内より分離	日本	-	Nakano ら, 2004
NN2004	*c*	健常者口腔内より分離	日本	-	Nakano ら, 2004
NN2006	*c*	健常者口腔内より分離	日本	-	Nakano ら, 2004
NN2007	*c*	健常者口腔内より分離	日本	-	Nakano ら, 2004
NN2009	*c*	健常者口腔内より分離	日本	-	Nakano ら, 2004
NN2010	*c*	健常者口腔内より分離	日本	-	Nakano ら, 2004
NN2012	*c*	健常者口腔内より分離	日本	-	Nakano ら, 2004
SA23	*c*	健常者口腔内より分離	フィンランド	-	Nomura ら, 2014
TLJ5-1	*c*	健常者口腔内より分離	タイ	-	Nomura ら, 2014
TLJ6-1	*c*	健常者口腔内より分離	タイ	-	Lapirattanakul ら 2011
NN2095	*c*	健常者口腔内より分離	日本	+	Nakano ら, 2004
NN2115	*e*	健常者口腔内より分離	日本	+	Nakano ら, 2004
NN2103	*f*	健常者口腔内より分離	日本	+	Nakano ら, 2004
NN1005	*c*	健常者口腔内より分離	日本	+	Nakano ら, 2004
NN2141	*f*	健常者口腔内より分離	日本	+	Nakano ら, 2004
LJ24	*f*	健常者口腔内より分離	日本	+	Lapirattanakul ら, 2015
LJ32	*f*	健常者口腔内より分離	日本	+	Lapirattanakul ら, 2015
SA63	*e*	健常者口腔内より分離	フィンランド	+	Otsugu ら, 2017
TLJ34-1	*f*	健常者口腔内より分離	タイ	+	Lapirattanakul ら, 2011
TLJ72-3	*k*	健常者口腔内より分離	タイ	+	Lapirattanakul ら, 2011
SA83	*c*	健常者口腔内より分離	フィンランド	+	Otsugu ら, 2017

表2 1.0×10^7 CFU の *S. mutans* TW295 株の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫の病理組織学的評価（平均値 ± SEで評価）（ANOVA の後 Bonferroni 法; **P*<0.05, ***P*<0.01 : PBS投与群と比較、$^{\#}P$ <0.05, $^{\#\#}P$<0.01 : 生菌投与群と比較）

器官	生菌 (n=5)	アモキシシリン処理後 (n=5)	リゾチーム処理後 (n=5)	PBS (n=5)
繭糸腺				
水腫様変性	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.40	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.24
色素沈着	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
上皮壊死	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
腸管				
色素沈着	0.00 ± 0.00	0.80 ± 0.37	0.20 ± 0.20	0.20 ± 0.20
変性 (明細胞), 基底細胞	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
粘膜上皮剥離	1.40 ± 0.24**	0.60 ± 0.60	0.00 ± 0.00$^{\#\#}$	0.00 ± 0.00$^{\#\#}$
粘膜上皮壊死	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.00
脂肪体				
色素沈着	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
変性, 硝子体	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
水腫様変性	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
萎縮	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
筋組織				
色素沈着	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.20	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00
間質				
色素沈着	1.00 ± 0.00*	0.40 ± 0.24	0.00 ± 0.00$^{\#}$	0.20 ± 0.20$^{\#}$

表3 1.0×10^7 CFU の *S. mutans* TW295CND 株の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫の病理組織学的評価（平均値 ± SEで評価）（ANOVA の後 Bonferroni 法; $^{\#}P$ <0.05 : 生菌投与群と比較）

器官	生菌 (n=5)	アモキシシリン処理後 (n=5)	リゾチーム処理後 (n=5)	PBS (n=5)
繭糸腺				
水腫様変性	0.80 ± 0.37	0.40 ± 0.40	0.20 ± 0.20	0.40 ± 0.24
色素沈着	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
上皮壊死	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
腸管				
色素沈着	1.20 ± 0.37	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00$^{\#}$	0.20 ± 0.20
変性 (明細胞), 基底細胞	0.20 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
粘膜上皮剥離	0.80 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
粘膜上皮壊死	0.60 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.60 ± 0.00
脂肪体				
色素沈着	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
変性, 硝子体	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
水腫様変性	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
萎縮	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
筋組織				
色素沈着	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
間質				
色素沈着	0.40 ± 0.24	0.40 ± 0.24	0.80 ± 0.20	0.20 ± 0.20

表4 1.0×10^7 CFU の *S. mutans* TW295comp 株の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫の病理組織学的評価（平均値 ± SEで評価）

器官	生菌 (n=5)	アモキシシリン処理後 (n=5)	リゾチーム処理後 (n=5)	PBS (n=5)
繭糸腺				
水腫様変性	1.00 ± 0.55	1.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.24
色素沈着	0.20 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
上皮壊死	0.20 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
腸管				
色素沈着	1.40 ± 0.68	2.00 ± 0.45	0.20 ± 0.20	0.20 ± 0.20
変性 (明細胞), 基底細胞	1.20 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
粘膜上皮剥離	0.80 ± 0.58	1.00 ± 0.63	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
粘膜上皮壊死	0.00 ± 0.00	1.40 ± 0.00	0.60 ± 0.00	0.60 ± 0.00
脂肪体				
色素沈着	0.20 ± 0.20	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
変性, 硝子体	0.40 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
水腫様変性	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
萎縮	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
筋組織				
色素沈着	0.20 ± 0.20	0.40 ± 0.40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
間質				
色素沈着	0.40 ± 0.24	0.80 ± 0.20	0.40 ± 0.24	0.20 ± 0.20

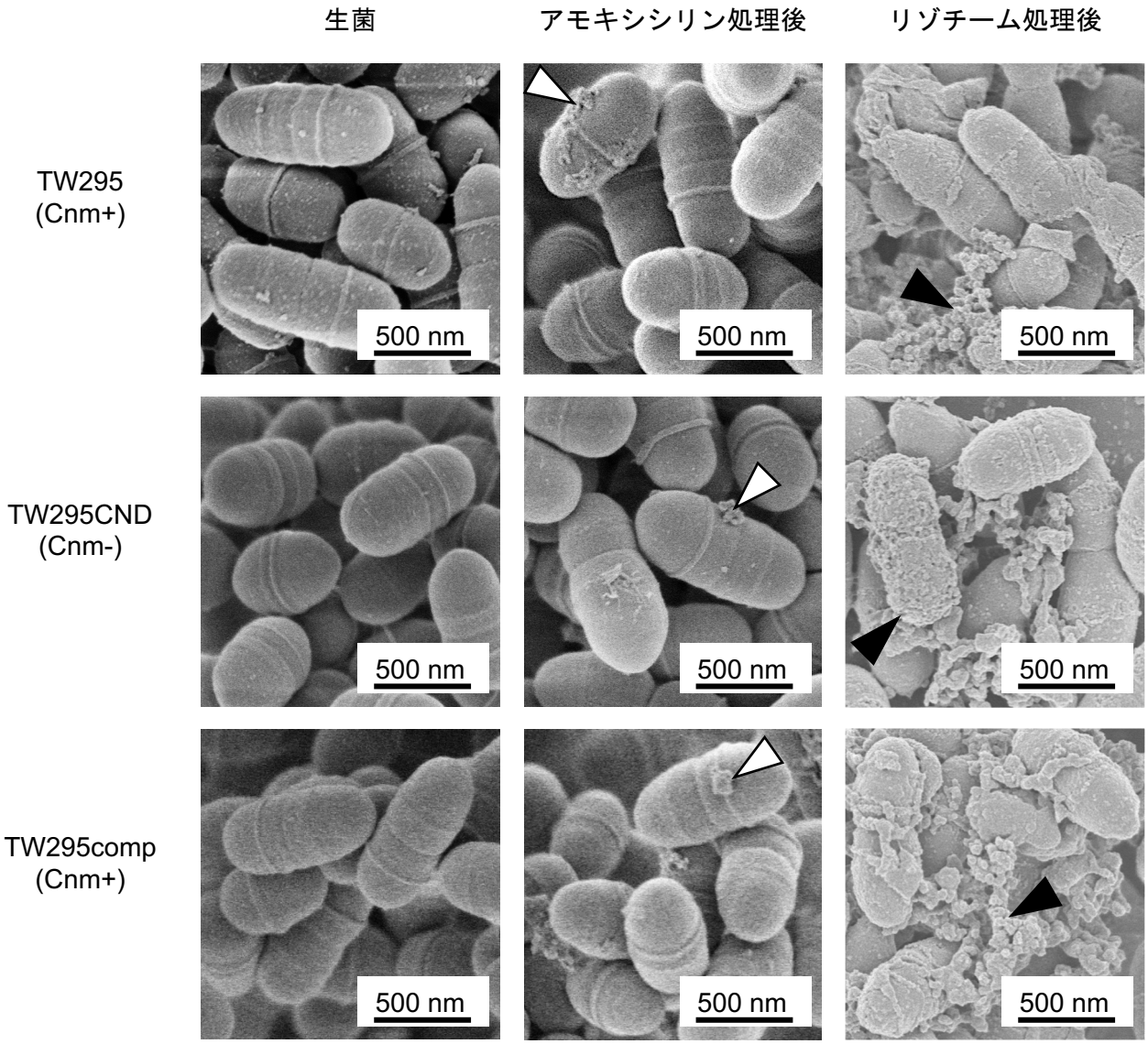

図1 *S. mutans* の走査型電子顕微鏡画像
（白矢頭：細胞表層の傷害、黒矢頭：細胞表層の溶解）
アモキシシリン処理後の菌においては菌体表層構造に軽度の傷害を認めた。また、リゾチーム処理後の菌においては菌体表層構造の溶解を認めた。

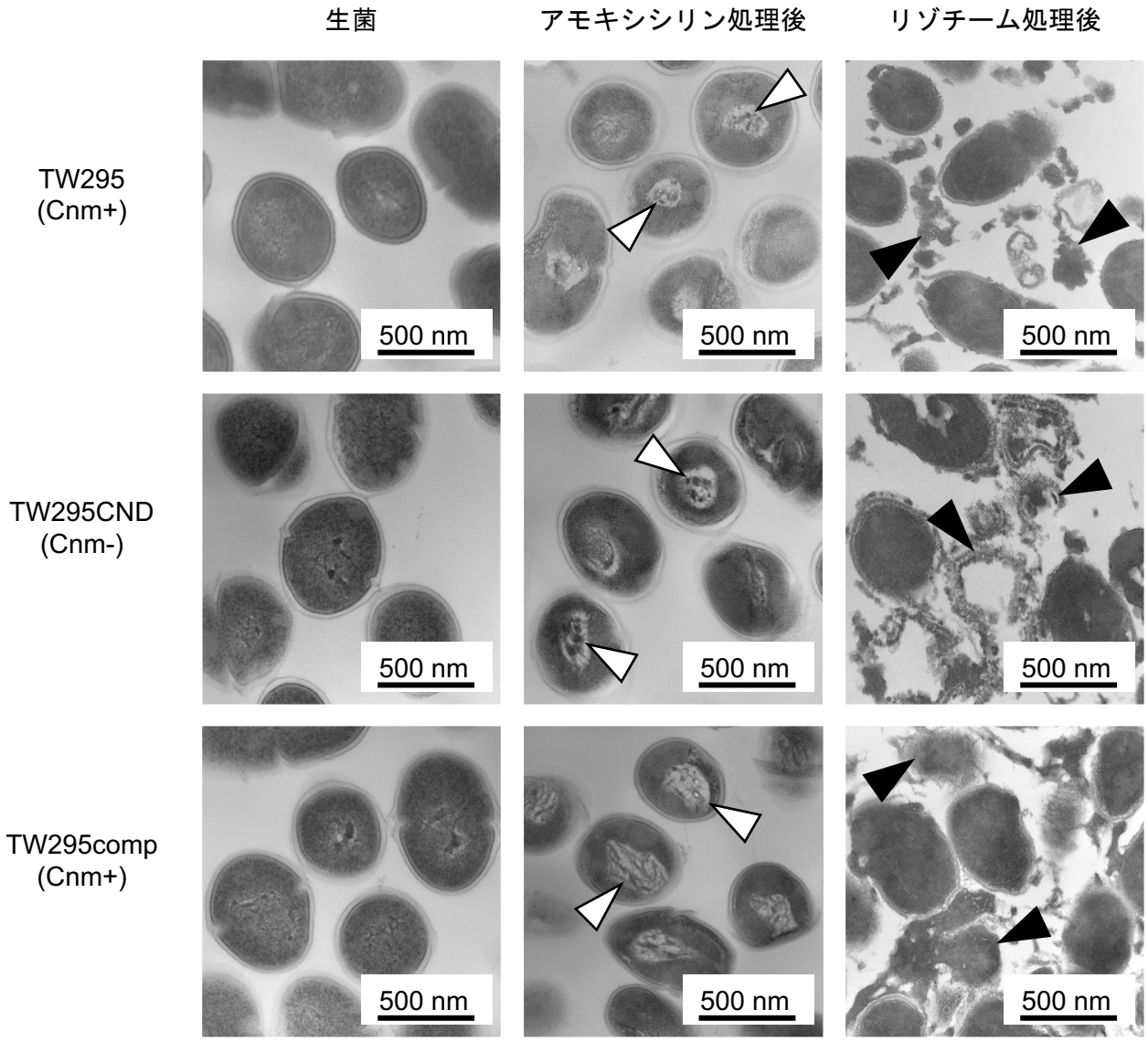

図2 *S. mutans* の透過型電子顕微鏡画像
（白矢頭：細胞質の変性、黒矢頭：細胞質の崩壊）
アモキシシリン処理後の菌においては細胞質内の変性を認めた。また、リゾチーム処理後の菌においては細胞質内の崩壊を認めた。

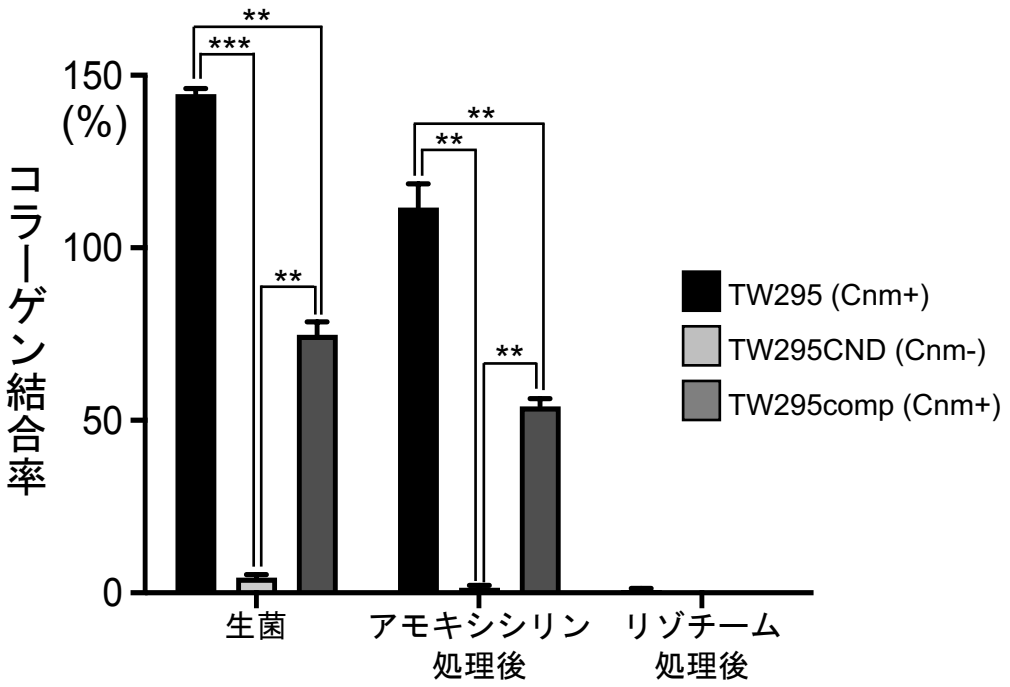

図3 *S. mutans* の I 型コラーゲン結合率の分析
（ANOVA の後 Bonferroni 法; ***P*<0.01 および ****P* <0.001） の分析
TW295 株および TW295comp 株において生菌は高いコラーゲン結合率を示した。アモキシシリン処理後も生菌よりは低いが、コラーゲン結合率を示した。TW295CND 株においては細菌の状態に関わらずコラーゲン結合率はほとんど示さなかった。また、リゾチーム処理後は、いずれの菌株においてもコラーゲン結合率は示さなかった。

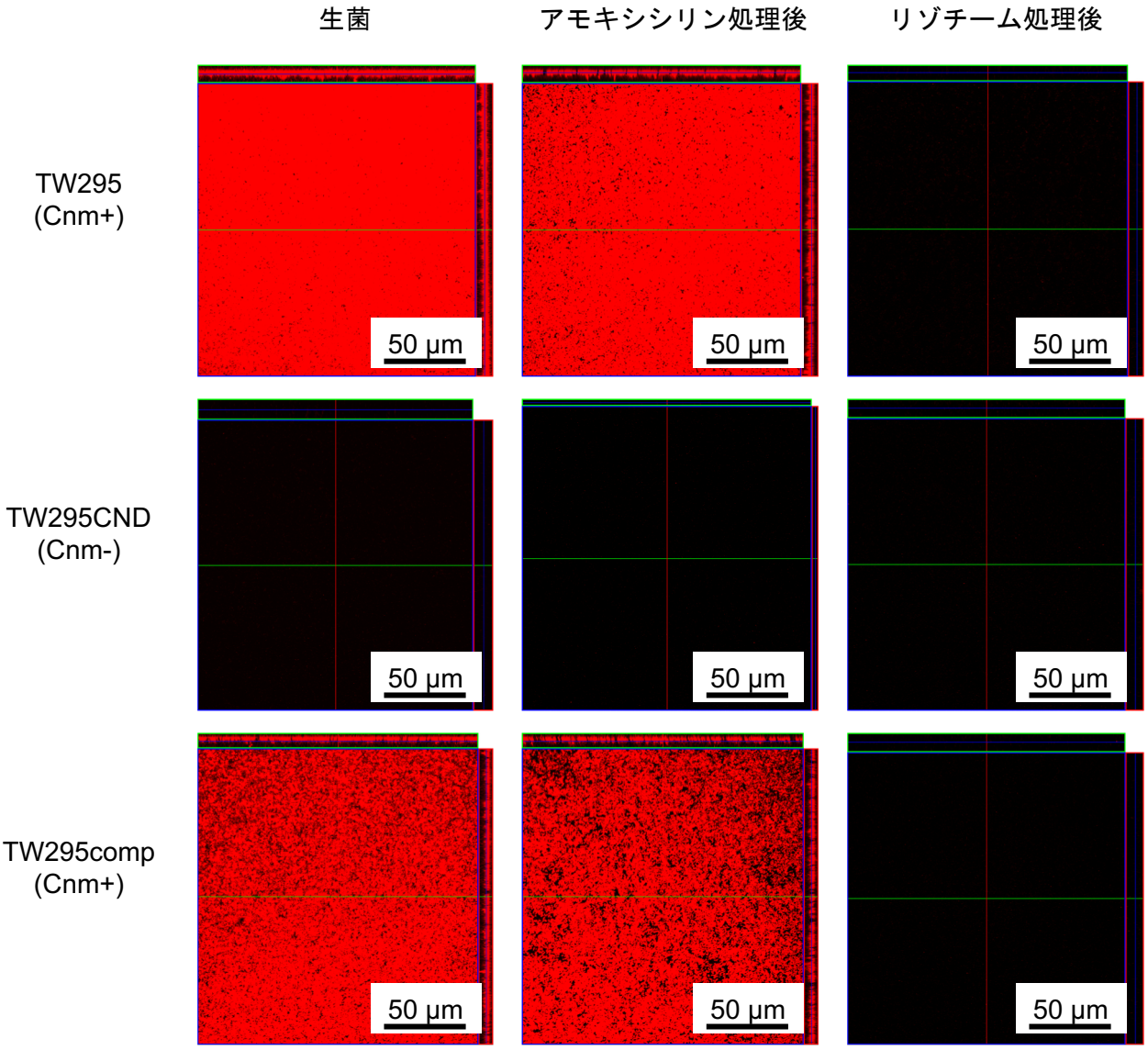

図4 Ⅰ型コラーゲンに結合した *S. mutans* の共焦点レーザー顕微鏡画像（赤色は *S. mutans* を示す）

TW295 株および TW295comp 株において生菌は多くの菌がコラーゲンに結合しており、アモキシシリン処理後も生菌よりは少ないが、コラーゲンに結合していた。TW295CND 株においては細菌の状態に関わらずコラーゲンにほとんど結合能していなかった。また、リゾチーム処理後は、いずれの菌株においてもコラーゲンにほとんど結合していなかった。

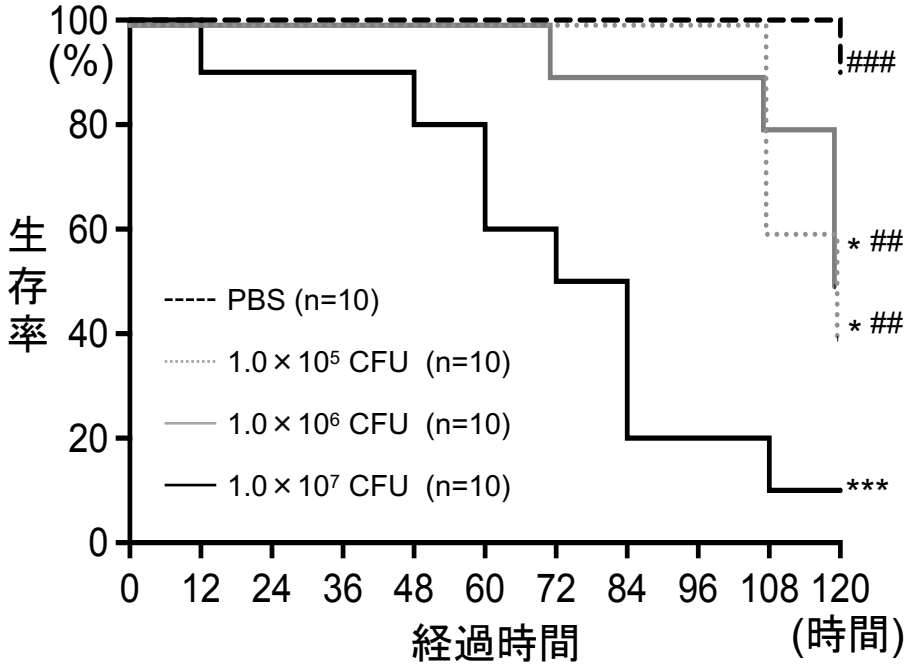

図5 様々な濃度の*S. mutans* TW295 株を投与した際のカイコの幼虫の生存率の経時的変化
（Kaplan-Meier プロットを用いて評価し Log-Rank 検定にて分析; **P*<0.05, ****P*<0.001 : PBS投与群と比較、$^{\#\#}P$ <0.01, $^{\#\#\#}P$<0.001 : 1.0×10^7 CFU の TW295 株投与と比較）

1.0×10^5 CFU もしくは 1.0×10^6 CFU の TW295 株を投与した場合は実験の後半でカイコの幼虫の生存率が低下し始め、投与後 120時間でカイコの幼虫の生存率は 50% 以下まで低下した。 1.0×10^7 CFU の TW295 株を投与した場合は投与後 12時間でカイコの幼虫の生存率が低下し始め 72時間以内にカイコの幼虫の生存率は 50% 以下に低下した。

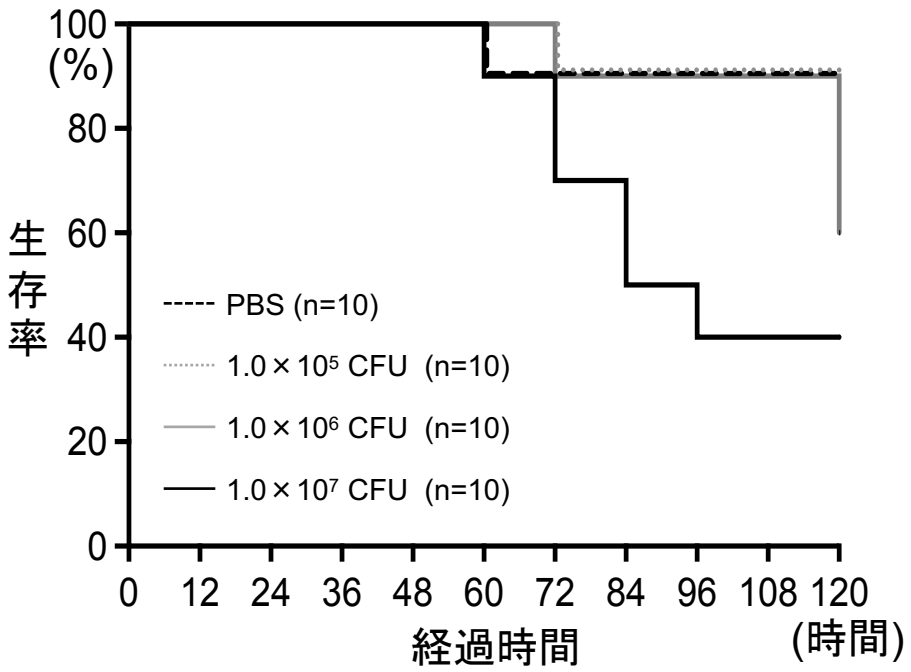

図6 様々な濃度の*S. mutans* TW295CND 株を投与した際のカイコの幼虫の生存率の経時的変化（Kaplan-Meier プロットを用いて評価し Log-Rank 検定にて分析）

1.0×10^5 CFU もしくは 1.0×10^6 CFU の TW295CND 株を投与した場合は投与後 120時間においてもカイコの幼虫の生存率は 50%以上であった。1.0×10^7 CFU の TW295CND 株を投与した場合は投与後 84時間でカイコの幼虫の生存率は 50% 以下に低下した。

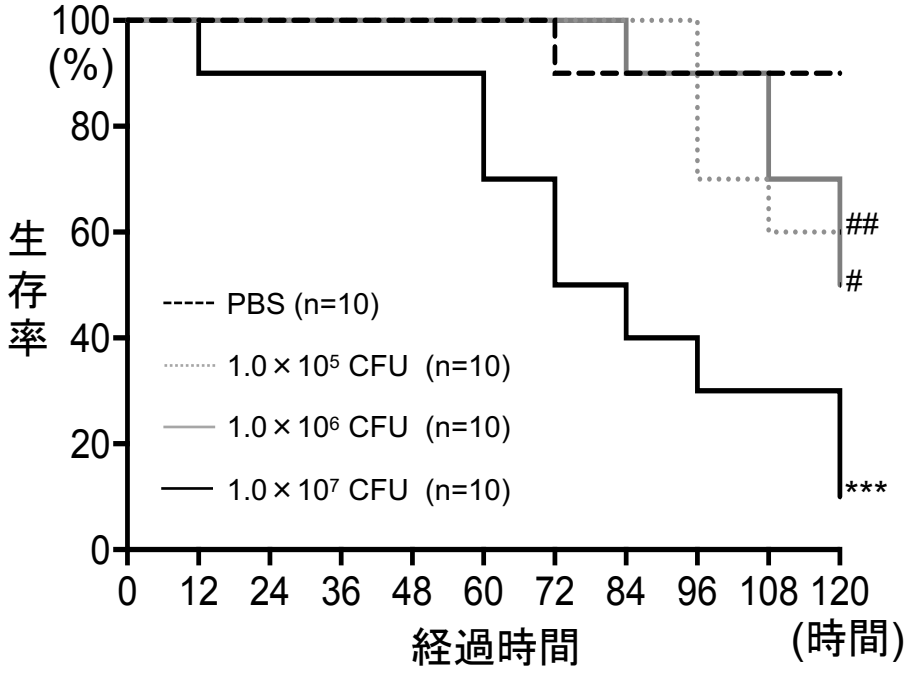

図7 様々な濃度の*S. mutans* TW295comp 株を投与した際のカイコの幼虫の生存率の経時的変化（Kaplan-Meier プロットを用いて評価し Log-Rank 検定にて分析; ***P<0.001 : PBS投与群と比較、$^{\#}P$ <0.05, $^{\#\#}P$ <0.01 : 1.0×10^7 CFU の TW295comp 株投与群と比較）

1.0×10^5 CFU もしくは 1.0×10^6 CFU の TW295comp 株を投与した場合は実験の後半でカイコの幼虫の生存率が低下し始め、投与後 120時間でカイコの幼虫の生存率は 50% 以下まで低下した。 1.0×10^7 CFU の TW295 株を投与した場合は投与後 12時間でカイコの幼虫の生存率が低下し始め 72時間以内にカイコの幼虫の生存率は 50% 以下に低下した。

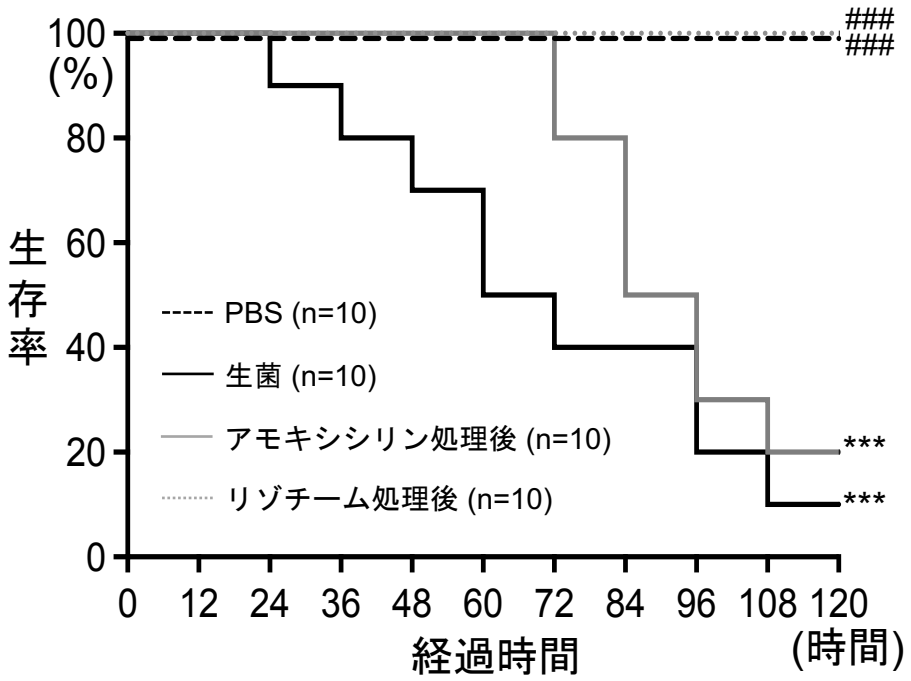

図8 1.0×10^7 CFU の *S. mutans* TW295 株の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫の生存率の経時的変化（Kaplan-Meier プロットを用いて評価し Log-Rank 検定にて分析; ***P<0.001 : PBS投与群と比較、 ###P<0.001 : 生菌投与群と比較）

アモキシシリン処理後の TW295 株を投与したカイコの幼虫は、生菌を投与したカイコの幼虫と比較して、死亡し始める時間が遅延した。しかし、アモキシシリン処理後の TW295 株を投与したカイコの幼虫の生存率は、PBSを投与したカイコの幼虫よりも低く、投与後 84時間でカイコの幼虫の50%が死亡した。対照的に、リゾチーム処理後の TW295 株を投与した場合は、カイコの幼虫の生存率は低下しなかった。

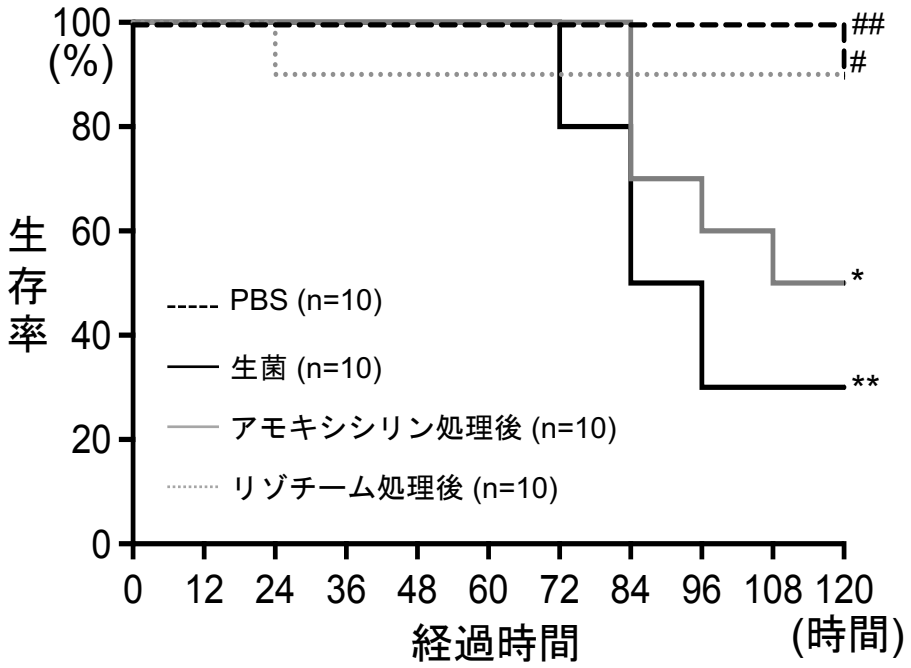

図9 1.0×10^7 CFU の *S. mutans* TW295CND 株の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫の生存率の経時的変化（Kaplan-Meier プロットを用いて評価し Log-Rank 検定にて分析; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$: PBS投与群と比較、$^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$: 生菌投与群と比較）

TW295CND 株の生菌およびアモキシシリンで処理した菌を投与したカイコの幼虫は、PBS を投与したカイコの幼虫と比較して生存率が低下した。しかし、TW295 株の生菌もしくはアモキシシリン処理後の菌を投与した場合と比較すると生存率は高かった。リゾチーム処理後の TW295CND 株を投与した場合は、カイコの幼虫の生存率は低下しなかった。

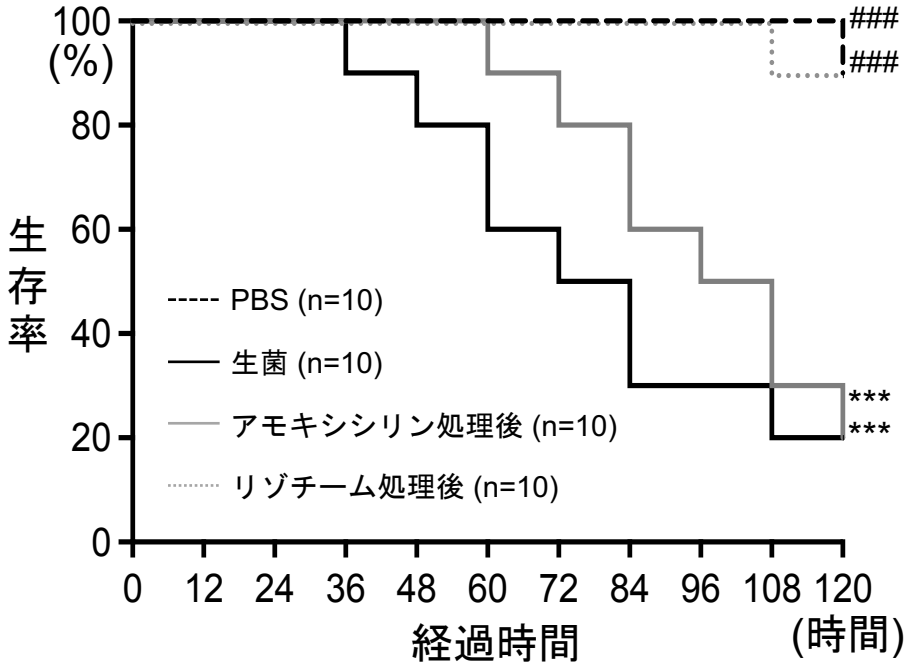

図10 1.0×10^7 CFU の *S. mutans* TW295comp 株の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫の生存率の経時的変化（Kaplan-Meier プロットを用いて評価し Log-Rank 検定にて分析; $^{***}P<0.001$: PBS投与群と比較、 $^{###}P<0.001$: 生菌投与群と比較）

アモキシシリン処理後の TW295comp 株を投与したカイコの幼虫は、生菌を投与したカイコの幼虫と比較して、死亡し始める時間が遅延した。しかし、アモキシシリン処理後の TW295comp 株を投与したカイコの幼虫の生存率は、PBSを投与したカイコの幼虫よりも低く、投与後 96時間でカイコの幼虫の50%が死亡した。対照的に、リゾチーム処理後の TW295comp 株を投与した場合は、カイコの幼虫の生存率は低下しなかった。

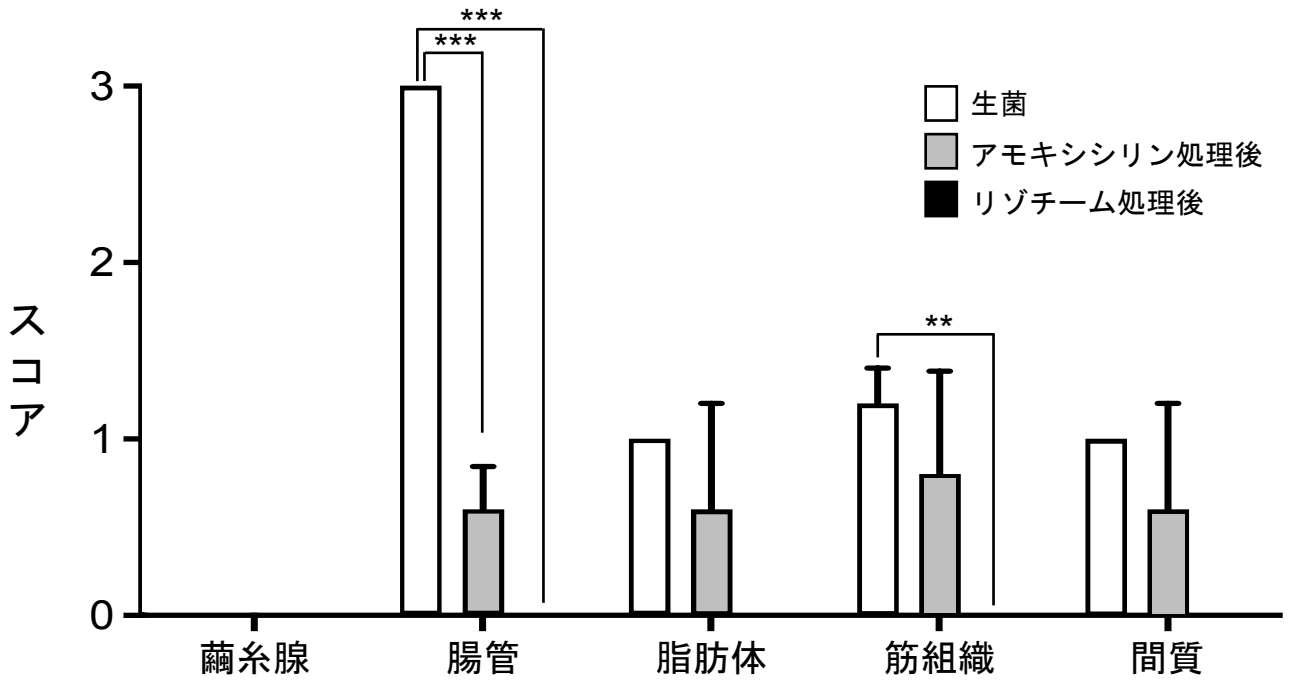

図11 1.0×10^7 CFU の *S. mutans* TW295 株の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫における各器官の病理組織学的スコア（ANOVA の後 Bonferroni 法; $^{**}P<0.01$, $^{***}P < 0.001$）
TW295 株の生菌を投与した場合は繭糸腺を除く各器官で細菌が検出され、腸管で最も多くの細菌が検出された。アモキシシリン処理後の TW295 株を投与した場合は、TW295 株の生菌を投与した場合よりも少ないが全ての器官で細菌が検出された。対照的に、リゾチーム処理後の TW295 株を投与した場合はどの器官にも細菌は検出されなかった。

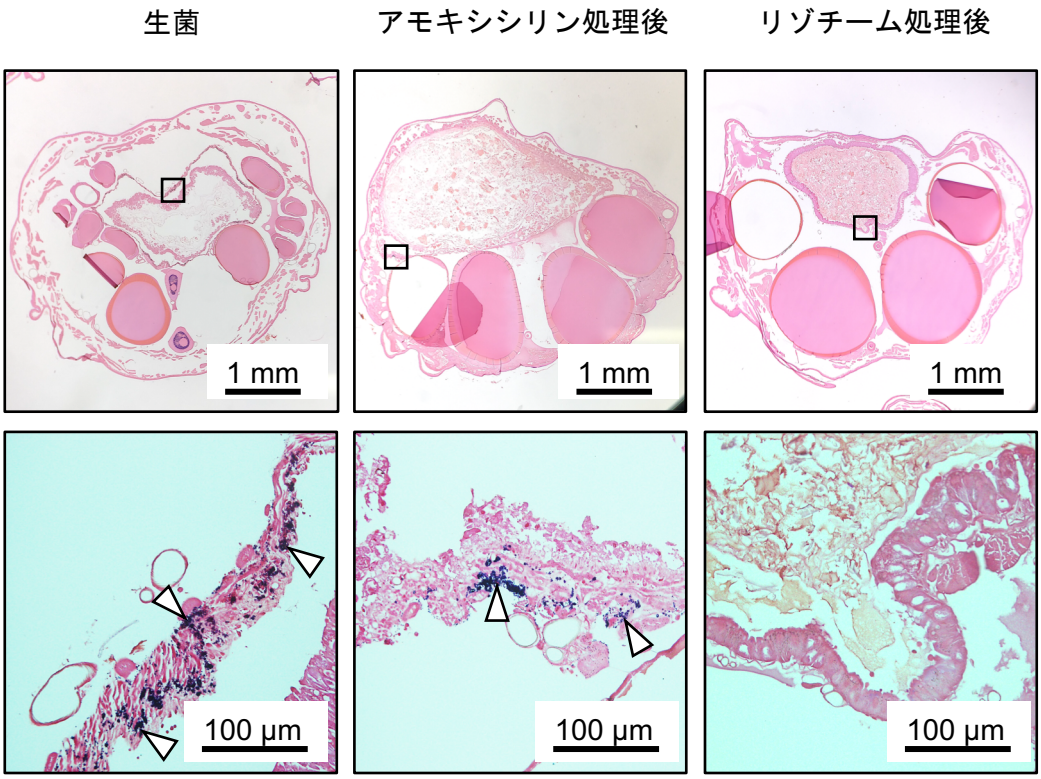

図12 *S. mutans* TW295 株を投与したカイコの幼虫の垂直断における病理組織像
（白矢頭：腸管壁に付着した細菌塊）
TW295 株の生菌もしくはアモキシシリン処理後の菌を投与した場合はカイコの幼虫の腸管壁に細菌塊を認めた。一方、リゾチーム処理後の TW295 株を投与した場合はカイコの幼虫の腸管壁に細菌は認めなかった。

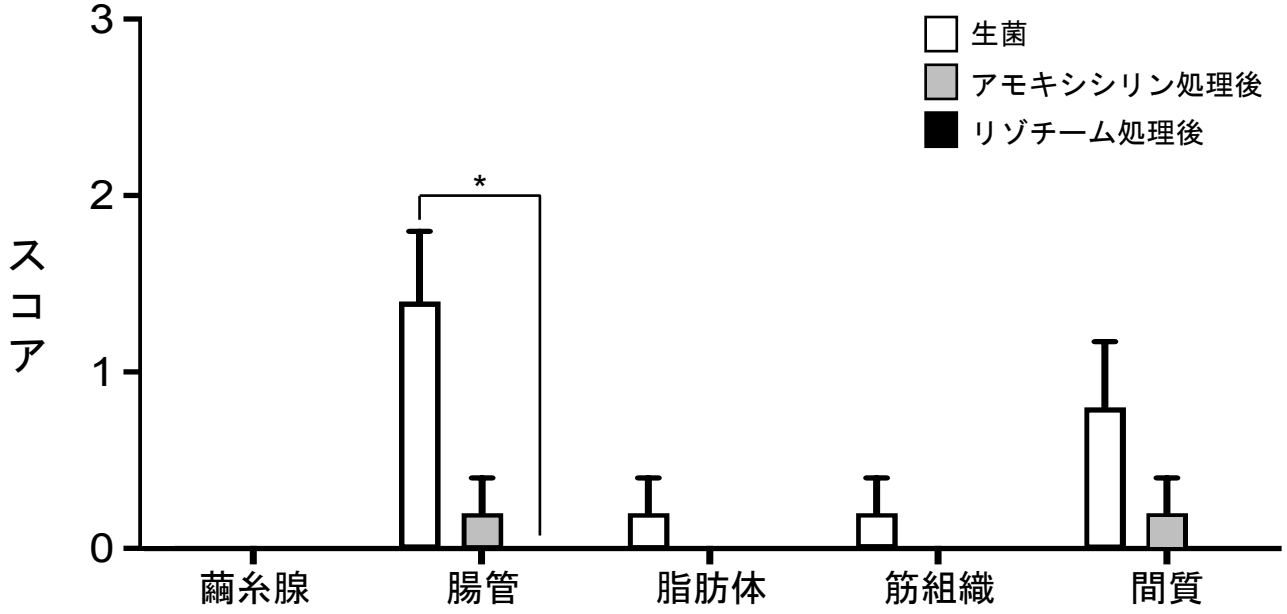

図13 1.0×10^7 CFU の *S. mutans* TW295CND 株の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫における各器官の病理組織学的スコア（ANOVA の後 Bonferroni 法; $^*P<0.05$）

TW295CND 株の生菌を投与した場合は、繭糸腺を除くすべての器官で細菌が検出された。しかし、アモキシシリン処理後の TW295CND 株を投与した場合は、腸管と間質組織にわずかな細菌しか検出されず、リゾチーム処理後の TW295CND 株を投与した場合は、どの器官にも細菌は検出されなかった。

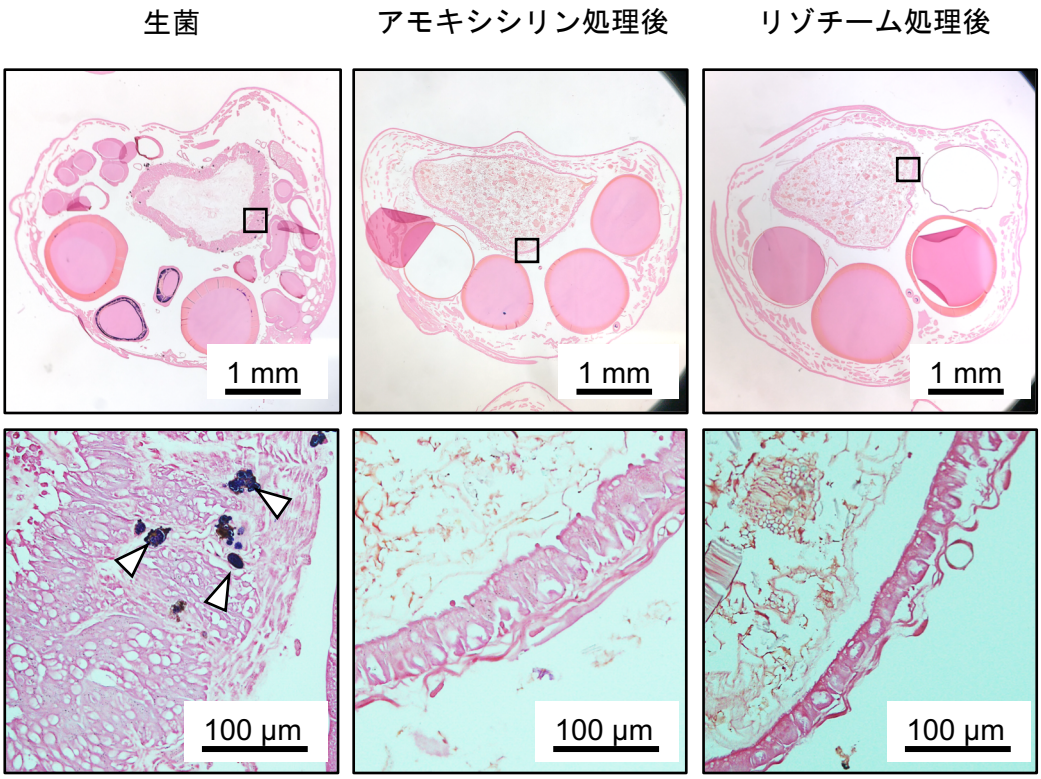

図14 *S. mutans* TW295CND 株を投与したカイコの幼虫の垂直断における病理組織像
（白矢頭：腸管壁に付着した細菌塊）
TW295CND 株の生菌を投与した場合はカイコの幼虫の腸管壁に細菌塊を認めた。一方、アモキシシリン処理後の TW295CND 株を投与した場合はカイコの幼虫の腸管壁にわずかな細菌しか認めず、リゾチーム処理後の TW295CND 株を投与した場合はカイコの幼虫の腸管壁に細菌は認めなかった。

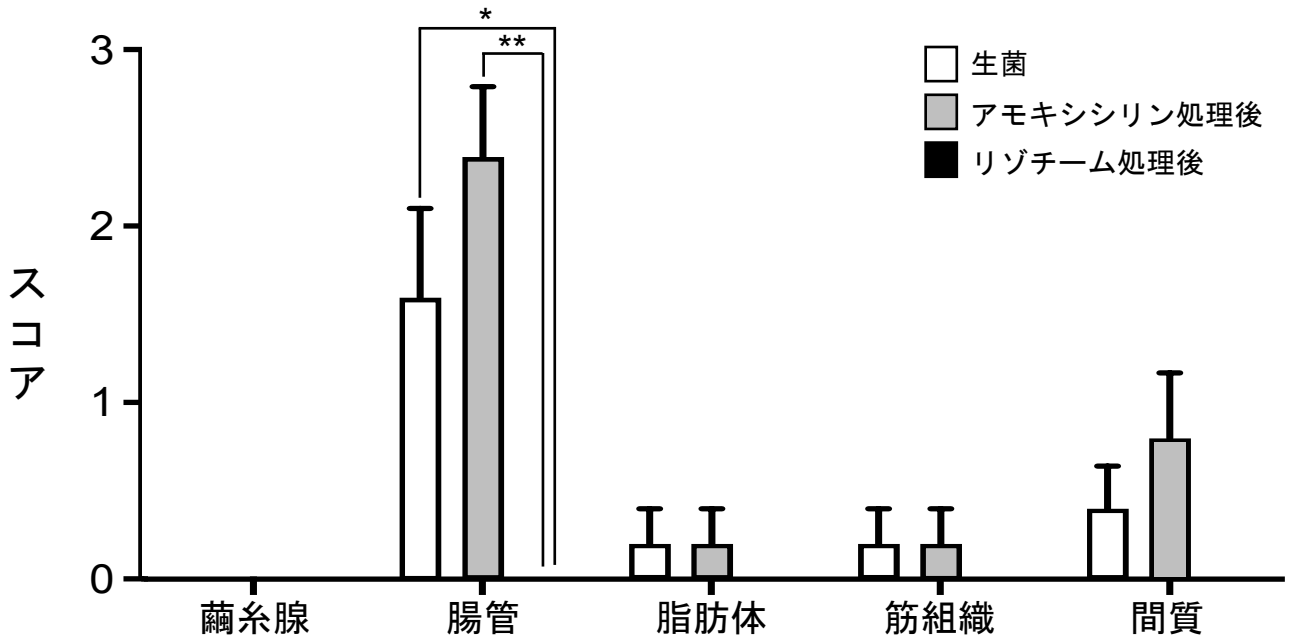

図15 1.0×10^7 CFU の *S. mutans* TW295comp 株の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫における各器官の病理組織学的スコア（ANOVA の後 Bonferroni 法; $^*P<0.05$, $^{**}P < 0.01$）
TW295comp 株の生菌もしくはアモキシシリン処理後の TW295comp 株を投与した場合は繭糸腺を除くすべての器官で細菌が検出されたが、リゾチーム処理後の TW295comp 株を投与した場合はどの器官でも細菌は検出されなかった。

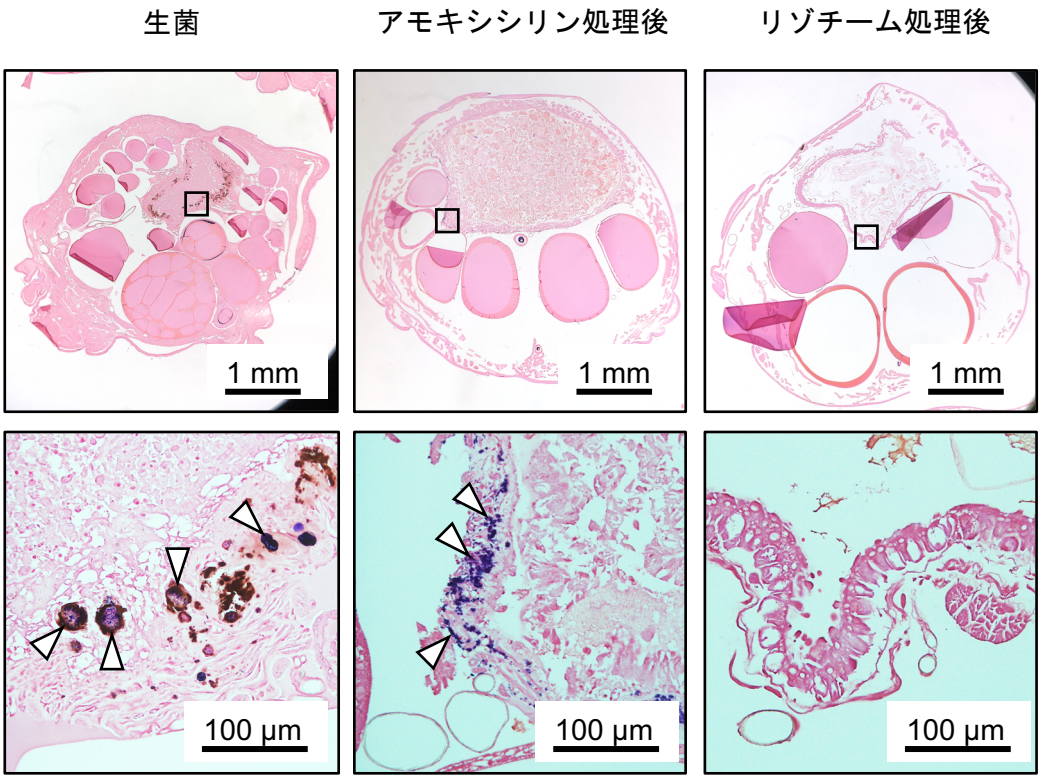

図16 *S. mutans* TW295comp 株を投与したカイコの幼虫の垂直断における病理組織像
（白矢頭：腸管壁に付着した細菌塊）
TW295comp 株の生菌もしくはアモキシシリン処理後の菌を投与した場合はカイコの幼虫の腸管壁に細菌塊を認めた。一方、リゾチーム処理後の TW295copm 株を投与した場合はカイコの幼虫の腸管壁に細菌は認めなかった。

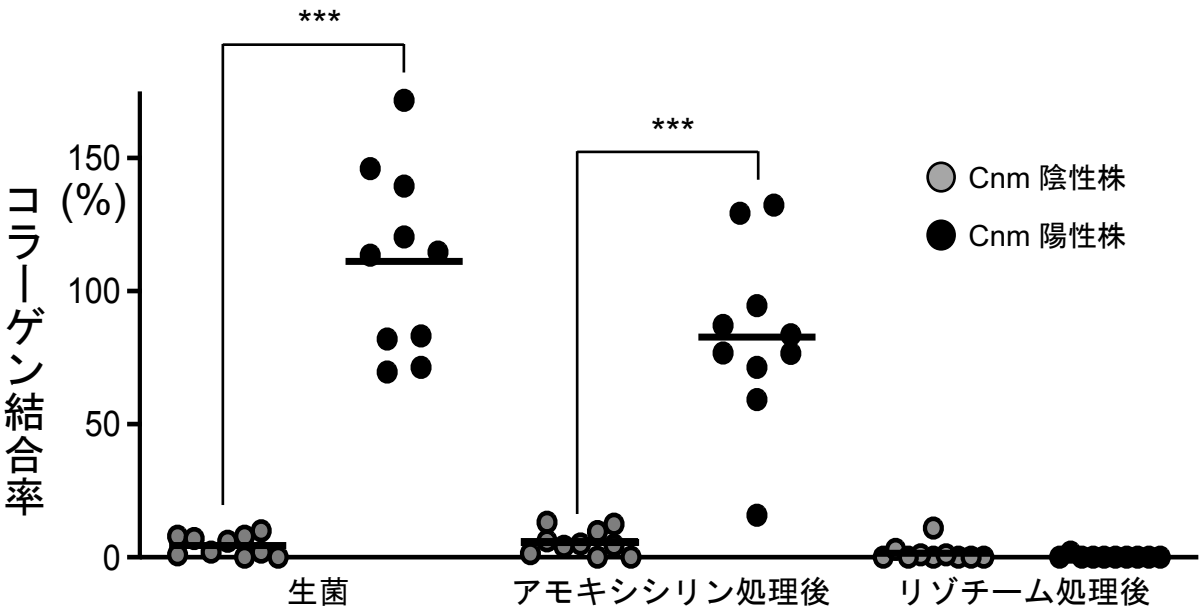

図17 *S. mutans* 臨床分離株の I 型コラーゲン結合率 （プロット : それぞれの菌株の平均値）（バー : 10菌株の平均値）（ANOVA の後 Bonferroni 法; ***$P < 0.001$）

Cnm 陰性株は細菌の状態に関わらずコラーゲン結合率はほとんど示さなかった。対照的に、Cnm 陽性株の生菌は Cnm 陰性株の生菌と比較して高いコラーゲン結合率を示した。また、アモキシシリンで処理後も Cnm 陽性株は Cnm 陰性株と比較して高いコラーゲン結合率を示した。一方、リゾチームで処理後は Cnm 陽性株および Cnm 陰性株ともにコラーゲン結合率はほとんど示さなかった。

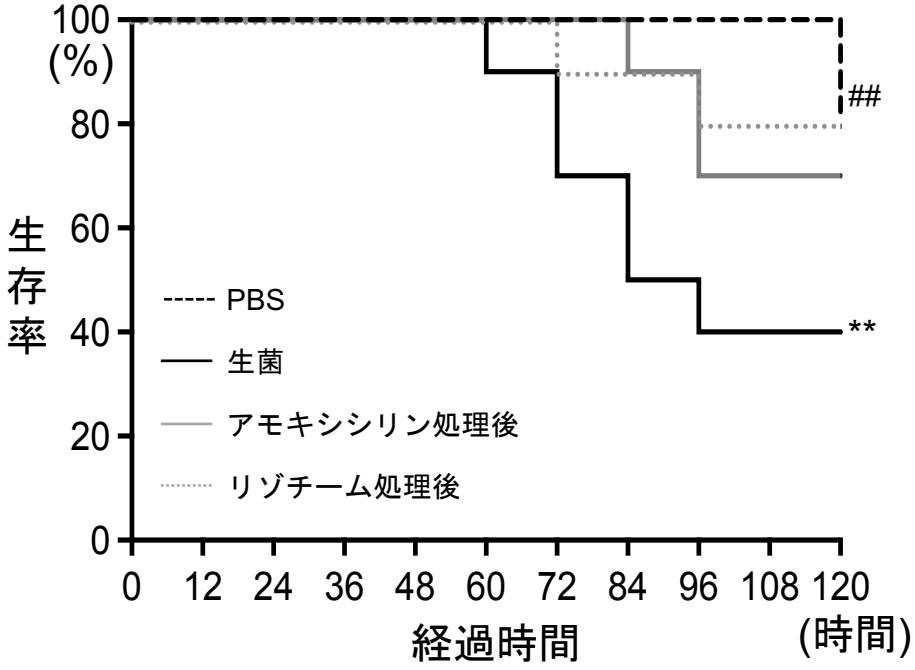

図18 1.0×10^7 CFU の Cnm 陰性 *S. mutans* の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫の生存率の経時的変化（Kaplan-Meier プロットを用いて評価し Log-Rank 検定にて分析; $^{**}P<0.01$: PBS投与群と比較、$^{\#\#}P<0.01$: Cnm 陰性株の生菌投与群と比較）

Cnm 陰性株の生菌においては投与後 84時間でカイコの幼虫の 50%が死亡したが、アモキシシリン処理後の Cnm 陰性株を投与した場合は 70%以上のカイコの幼虫が生存し、リゾチーム処理後の Cnm 陰性株を投与した場合は 80%以上のカイコの幼虫が生存した。

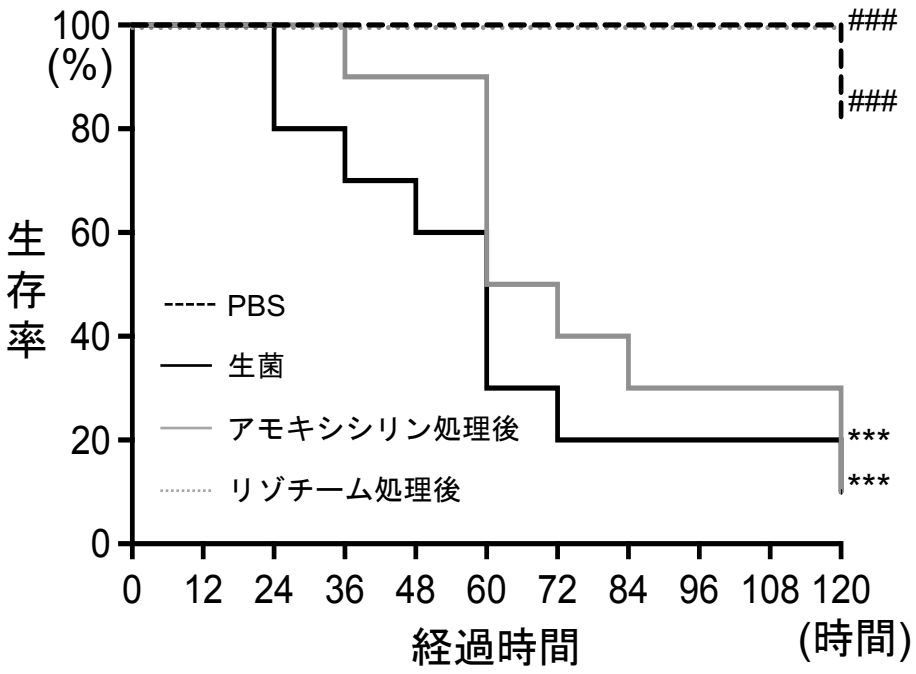

図19 1.0×10^7 CFU の Cnm 陽性 *S. mutans* の生菌もしくは死菌を投与したカイコの幼虫の生存率の経時的変化（Kaplan-Meier プロットを用いて評価し Log-Rank 検定にて分析; ***P<0.001 : PBS投与群と比較、###P<0.001 : Cnm 陽性株の生菌投与群と比較）

Cnm 陽性株の生菌もしくはアモキシシリン処理後の Cnm 陽性株を投与した場合は、投与後60時間でカイコ幼虫の生存率は 50%以下に低下した。一方、リゾチーム処理後の Cnm 陽性株を投与した場合は、生存率はほとんど低下しなかった。

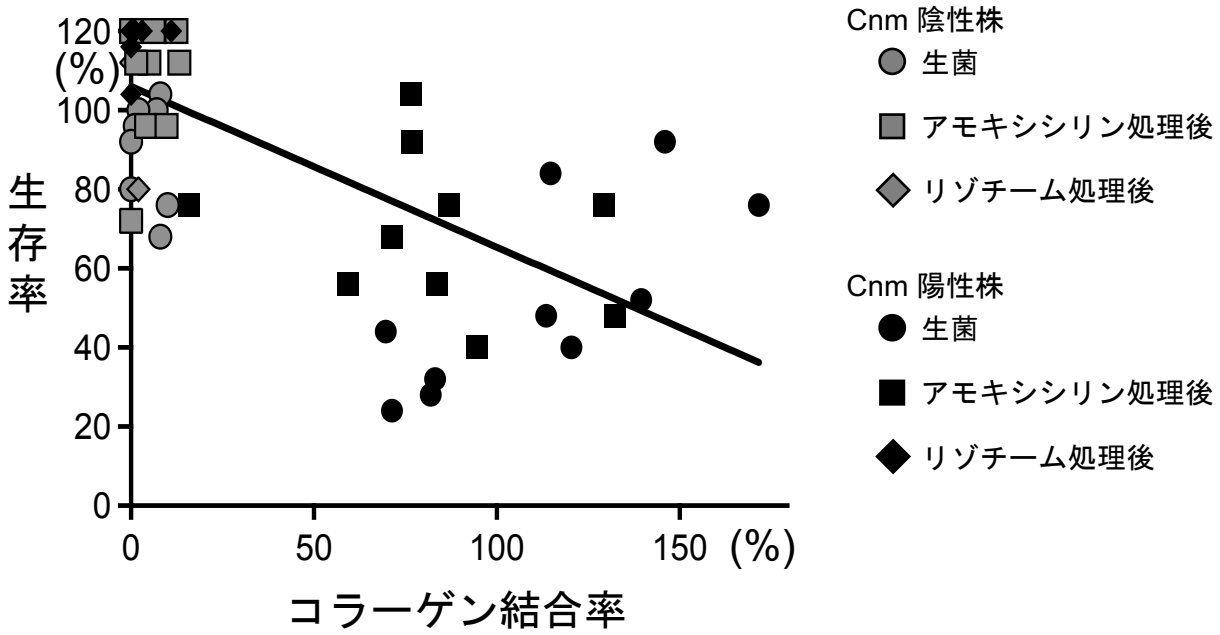

図20 *S. mutans* のⅠ型コラーゲン結合率と *S. mutans* を投与したカイコの幼虫の生存率の相関関係（プロット : それぞれの菌株の平均値）（回帰分析; $P<0.001$）

S. mutans の臨床株において、コラーゲン結合率と*S. mutans* を投与したカイコの幼虫の生存率との間に相関関係を示した。