



Title	Streptococcus属の口腔細菌における歯周病の病態形成機構に果たす役割の検討
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2024
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/95173
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名		すぎやま まお 杉山 真央	学部 学科	歯学部歯学科	学年	2 年
ふりがな 共 同 研究者氏名			学部 学科		学年	年
						年
						年
アドバイザー教員 氏名		広瀬 雄二郎	所属	大学院歯学研究科 微生物学講座		

研究課題名	<i>Streptococcus</i> 属の口腔細菌における歯周病の病態形成機構に果たす役割の検討
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)

研究背景・目的

人間の口腔内には約 500 種類の細菌が存在しているが、その中でもとりわけレッドコンプレックス (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) を代表とする細菌が歯周病を誘発していると考えられている (Socransky S.S. *Clin Periodontol.* 1998. PMID: 9495612)。また、「特定の菌が特定の病気の原因であることの条件として、その菌がその病気でのみ検出されなければならない」という Koch の原則の一項目に基づき、長年にわたる歯周病の研究では、それを満たすレッドコンプレックスが歯周病原菌として注目され、重点的に研究されてきた。それゆえ、レッドコンプレックス以外の口腔細菌の歯周病への関与について、不明な点が多い。一方で、歯周病発症時の病変部（歯周ポケット）由来の細菌構成および細菌の病原遺伝子発現を解析した研究によると、*Streptococcus* 属が一定の割合で検出されることに加え、*Streptococcus* 属由来の病原遺伝子は歯周病の進行中に上方制御されることが報告されている (Yost ら. *Genome Medicine.* 2015. PMID: 25918553)。そこで本研究では、*Streptococcus* 属の細菌種の有する毒性に着目し、歯周病の病態への関与について研究することにした。特に、*Streptococcus* 属の Streptolysin O (SLO) と Streptolysin S (SLS) という溶血毒素に着目し、歯肉細胞に対する *Streptococcus* 属細菌の傷害能力、および *Streptococcus* 属細菌と *P. gingivalis* 共感染の影響を検討した。

研究計画および方法

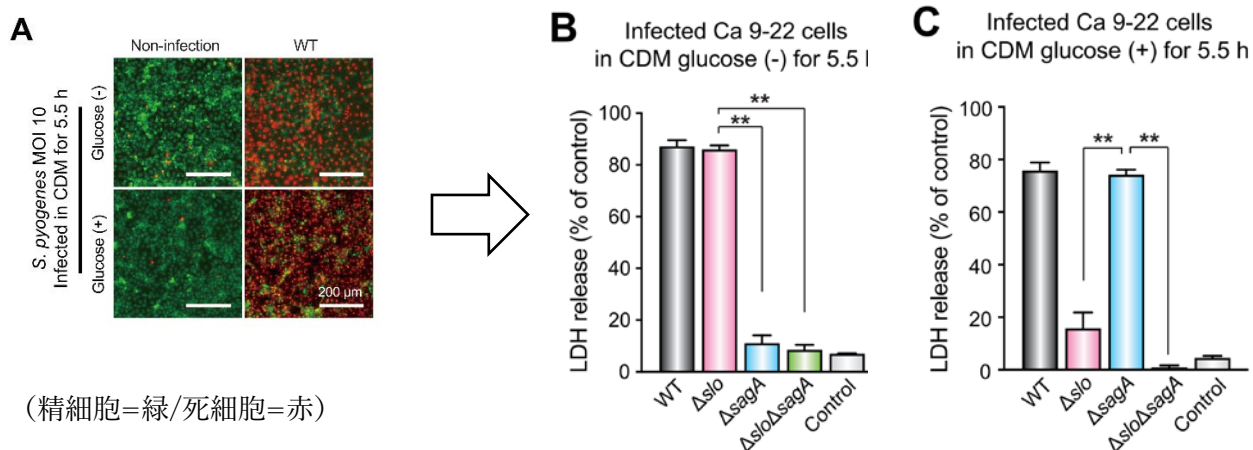
Streptococcus 属細菌については、SLO と SLS の両方の毒素を有している細菌株である *Streptococcus pyogenes* を便宜的に用いた。アドバイザー教員氏名の広瀬雄二郎先生が *S. pyogenes* は、glucose の有無で SLO と SLS の発現をスイッチできることを報告している (Hirose ら. *mSystems.* 2023. PMID: 37278526)。まず初めに、本実験で利用する培養条件 (Chemically Defined Medium, CDM) で、この現象を再現できるかを赤血球の溶血試験を用いて確認した。そして、ヒト歯肉細胞株 Ca9-22 に対する細胞毒性についても同様に評価した。

3. 2までに用いた培養条件において Ca9-22 の細胞剥離能力を評価した。その後、*P. gingivalis* による細胞剥離が生じない感染条件において *Streptococcus* 属細菌の各菌株を *P. gingivalis* と共感染させることで、溶血毒素の細胞剥離に対する影響を評価した。細胞の生死は、Cyto3D Live-Dead Assay Kit で可視化し、蛍光顕微鏡で観察した。その後にメチレンブルー染色により剥離された細胞の面積の測定を行った。

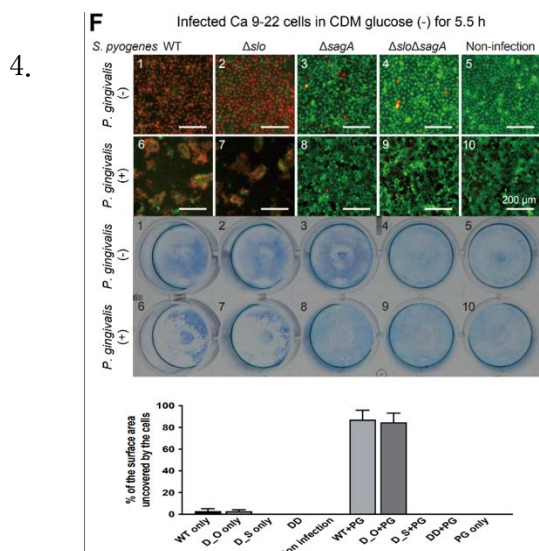
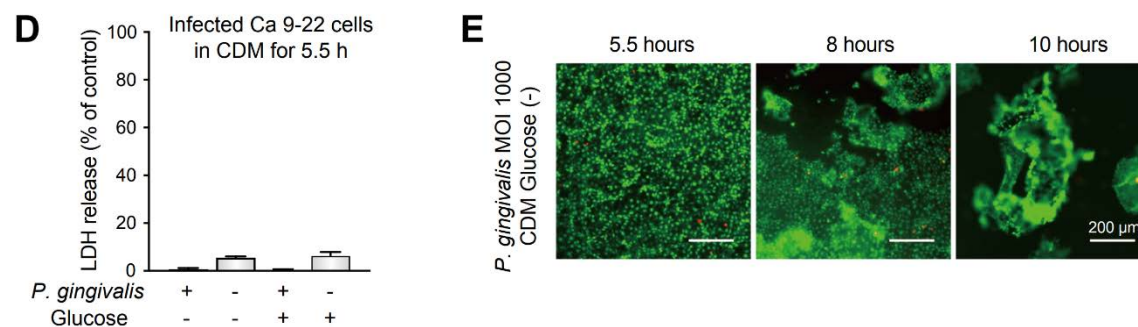
1. *S. pyogenes* の SLO と SLS はそれぞれどちらか一方の培地でのみ発現し、したがってその溶血作用も、発現を示した培地で優位に発揮されていた。下図（矢印の右側）より、CDM Glucose(-)の培地では Δ slo、すなわち SLS が発現される細菌株が溶血作用を優位に発揮しており、一方の CDM Glucose(+)の培地では Δ sagA すなわち SLO が発現される細菌株が優位に溶血作用を発揮していたことが確認された。



2. Ca9-22 への *S. pyogenes* 感染後 5.5 時間において、1 と類似のの結果が確認できた。CDM Glucose(-) の培地では Δslo が、CDM Glucose(+) の培地では $\Delta sagA$ がそれぞれ優位的に Ca 9-22 細胞の細胞死を誘導していた。

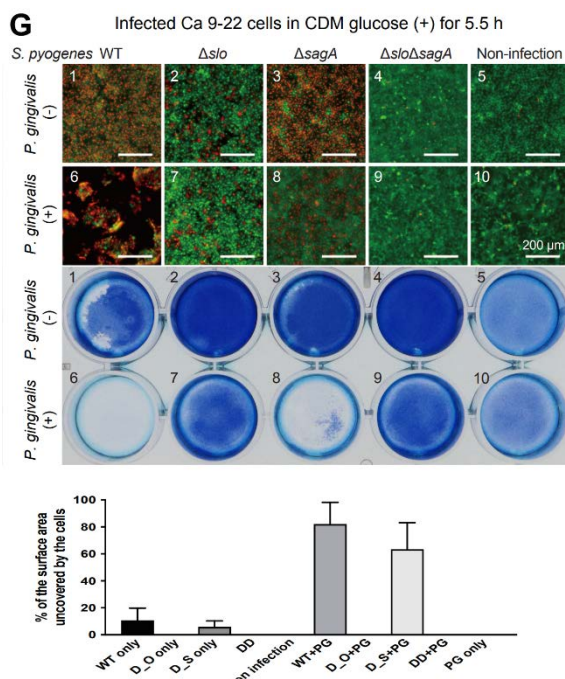


3. Ca9-22 への *P. gingivalis* 感染後 10 時間まで、CDM Glucose(-)と CDM Glucose(+)培地の両方で、*P. gingivalis* は Ca9-22 細胞の細胞死を誘導しなかった。ただし、8、10 時間後の蛍光観察では細胞剥離がみられた。



CDM Glucose(-)の培地では WT+PG と Δ slo+PG をそれぞれ感染させた Ca9-22 細胞の細胞剥離が顕著に見られた (左図上部の蛍光染色 6,7)。

左図下部のグラフは細胞が剥離された面積を表しており、ここでも上記の結果を示すデータが得られた。



CDM Glucose(+) の培地では WT+PG と Δ sagA+PG をそれぞれ感染させた Ca9-22 細胞の細胞剥離が顕著に見られた（左図中部のメチレンブルー染色 6,8）。

しかし、左図上部の蛍光染色からは WT+PG を感染させた細胞の剥離 (6 番) は顕著にみられたものの、 Δ sagA+PG を感染させた細胞では剥離が見られなかった (8 番)。すなわち、蛍光染色をした時点では細胞剥離が起こっておらず、その後に行ったメチレンブルー染色処理によって細胞剥離が起こった。

まとめ

実験 3 と 4 の結果から、CDM Glucose(-)と CDM Glucose(+)の培地ではそれぞれ SLS と SLO が *P. gingivalis* の細胞剥離作用を助長していることが示された。