

研究者：又吉 紗綾（所属：大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室）

## 研究題目：ラット齶蝕—感染性心内膜炎関連モデルの構築

### 目的：

感染性心内膜炎（Infective endocarditis；IE）は、侵襲的な歯科処置によって血液中に侵入した口腔細菌が、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。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いことから、IE 発症リスクが高いことが報告されている。齶蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* は感染性心内膜炎（Infective Endocarditis；IE）の起炎菌でもある。*S. mutans* 菌株のうち、菌体表層にコラーゲン結合タンパク（Collagen-Binding Protein；CBP）を発現するものは血管内皮の傷害部位に疣腫を形成しやすいことから、IE 発症に関与すると考えられる。これまで、IE の研究では、侵襲的な歯科処置にて生じる一過性の菌血症を想定して、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いる。一方で、歯髄腔に達する齶蝕が存在することによって、露出した毛細血管から口腔細菌が侵入し、持続的な菌血症が生じる可能性も考えられる。そこで、本研究では、CBP 陽性 *S. mutans* 株をラットの口腔内に定着させて、重度の齶蝕を誘発させた状態で心臓弁を人工的に傷害することによって「ラット齶蝕—感染性心内膜炎関連モデルの構築」を目指すこととした。

### 対象および方法：

#### 1. 使用した *S. mutans* 菌株

当教室にて保有している *S. mutans* SA31 株（CBP 陽性；血清型 *k*）にストレプトマイシン（1,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）耐性による標識付けを行い、SA31R 株と命名した。SA31R 株は Brain Heart Infusion 液体培地を用いて 37°C 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. ラットモデルにおける検討

##### 1) 実験群の設定

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、 $1.0 \times 10^8$  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。重度の齶蝕を誘発させるために、スクロース 56% 配合齶蝕誘発性飼料を常時与え、従来の齶蝕モデルラットの飼育期間より約 20 日間延長した 90 日齢まで飼育した。その後、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。

##### 2) 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齶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°C 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、Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) 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。重度齲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。

#### 結果および考察：

##### 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齲蝕 (C3) は観察できたが、歯冠が完全に崩壊した齲蝕 (C4) は観察できなかった (図 1)。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 の齲蝕が観察できた。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おり、その一部のラットにおいてグラム染色に陽性反応を示す菌の存在が示された (図 2)。

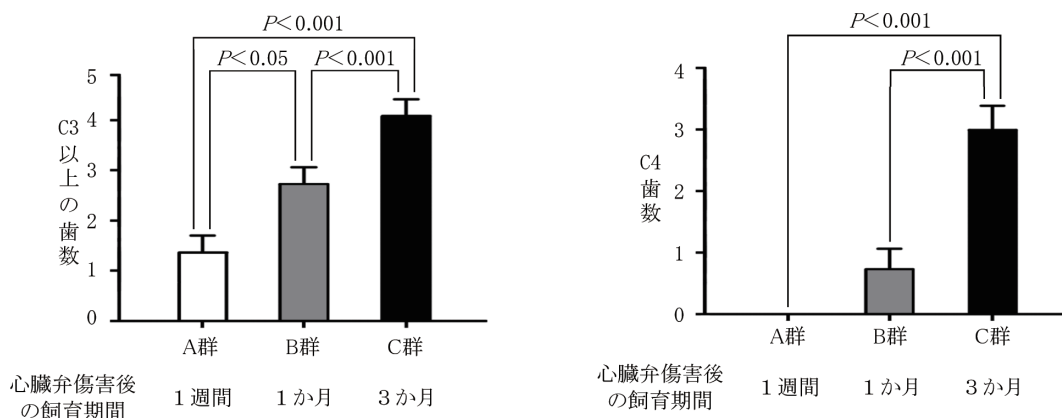


図 1 飼育期間の違いによる齲蝕歯数の比較

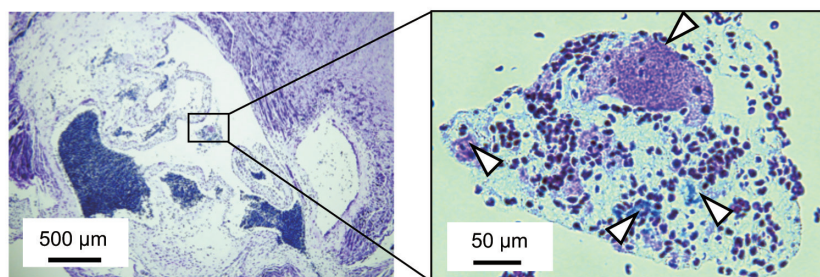


図 2 ラット心臓検体におけるグラム染色像 (矢頭: *S. mutans*)

## 2. 重度齲蝕と心臓の病態における関連性の検討

RAPD 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 (図 3)。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 ( $P < 0.05$ ) (図 4)。

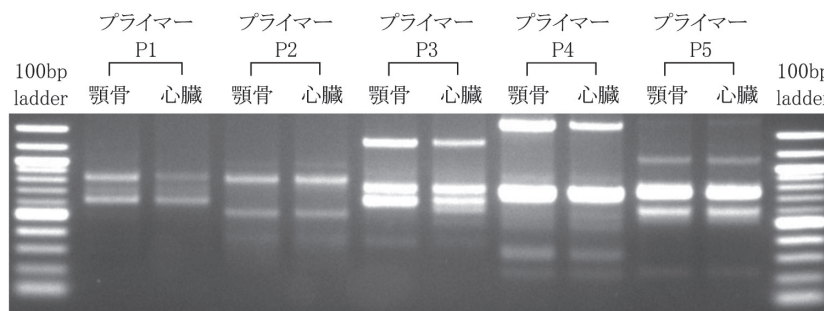


図 3 RAPD 法による顎骨および心臓検体由来 *S. mutans* 株の遺伝子増幅パターンの比較

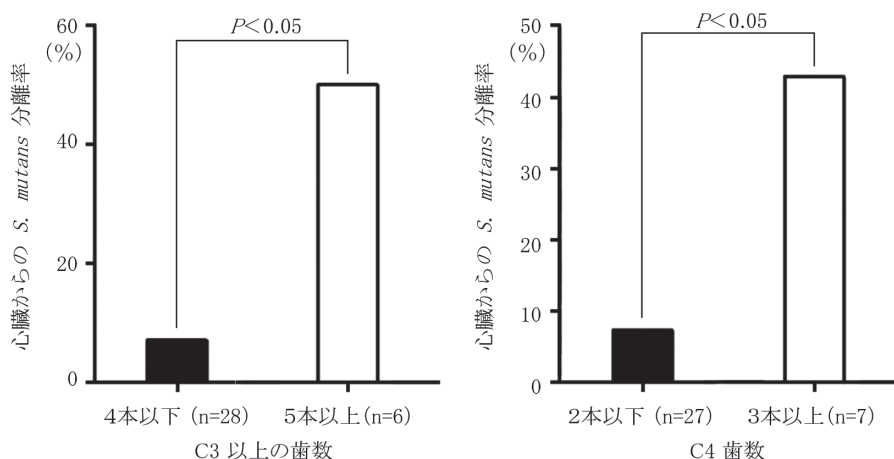


図 4 心臓からの *S. mutans* の分離の有無と齲蝕歯数の関連性

本研究の結果から、長期的な飼育を行ったラットほど齲蝕が重症化し、重度の齲蝕病変を放置することによって軽度の IE もしくは IE 様の病変を生じることが示唆された。今後、本研究で構築したラットモデルを応用して、様々な齲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* 株を感染させることで、「ラット齲蝕-感染性心内膜炎関連モデル」を発展させていきたいと考えている。

**成果発表：**(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

いくつかの学会で発表を予定していたが、新型コロナウイルス感染症拡大のため中止になり実現できなかった。