

研究者：末廣 雄登（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：死菌処理した *Streptococcus mutans* の感染性心内膜炎に対する病原性の評価

目 的：

Streptococcus mutans はう蝕の主要な病原細菌であるだけでなく感染性心内膜炎（Infective endocarditis；IE）の起炎菌としても知られている。*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、IE の病原性に関与すると考えられている。これまでに、IE 患者より摘出した心臓弁検体からは Cnm をコードする *cnm* 遺伝子が高頻度で検出されているものの、その症例で生菌自体が分離されることは稀であることが報告されている。このことから、*S. mutans* は死菌であっても生体に対して病原性を有する可能性が考えられた。そこで本研究では、死菌処理した *S. mutans* を用いて、IE の病原因子であるコラーゲン結合能におよぼす影響を分析するだけでなく、全身に対する病原性の評価に使用されているカイコモデルを用いて生体に対する病原性を検討することとした。

対象および方法：

1. 供試菌と培養条件

S. mutans TW295 株（Cnm 陽性）、TW295CND 株（TW295 株の *cnm* 遺伝子を不活化し Cnm を発現しないようにした株）および TW295comp 株（TW295CND 株に *cnm* 遺伝子を導入し Cnm を再発現させた株）を用いた。供試菌は Brain Heart Infusion（BHI）液体培地を使用して 37℃ で 18 時間培養した。その後、生菌を 1×10^9 CFU に調整し、それを用いて 121℃ で 20 分間のオートクレーブ処理もしくは 37℃ で 18 時間のホルマリン溶液懸濁処理を行うことで死菌を作製した。

2. コラーゲン結合能の分析

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 1×10^9 CFU の供試菌をそれぞれ添加し、37℃ で 3 時間反応させ、クリスタルバイオレットで染色した。各菌液の OD₅₉₅ 値を測定し、*S. mutans* SA83（Cnm 陽性）株の生菌におけるコラーゲン結合率を 100% とし、各供試菌のコラーゲン結合率を算出した。

3. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

I 型コラーゲンを添加したチャンバースライドに、 1×10^9 CFU に調整した供試菌を添加して 37℃ で 3 時間反応させた。その後、コラーゲンに結合した供試菌をヘキシジウムイオダイドで染色した後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

4. カイコモデルを用いた評価

S. mutans TW295 (CBP+/PA-) 株の生菌、ホルマリン溶液で死菌処理したもの、高圧蒸気滅菌で死菌処理したものおよびPBSを投与するコントロール群を設け、20匹もしくは21匹ずつを割り当てた。各群に対して、 1.0×10^6 CFUに調整した菌もしくはPBSを静脈内投与し、37°Cで180時間飼育した。

5. 統計学的分析

多群間の統計学的有意差の検定にはANOVAの後Bonferroni法を用いた。また、Kaplan-Meierプロットを用いカイコの生存率の評価を評価し、Log-Rank検定にて統計学解析を行った。

結果および考察：

1. コラーゲン結合能の評価

生菌において、TW295株およびTW295comp株は、TW295CND株と比較して有意に高いコラーゲン結合能を示した ($P < 0.001$)。ホルマリン溶液で死菌処理した際には、TW295株およびTW295comp株においては、生菌よりは程度は劣るもののTW295CND株と比較して有意に高いコラーゲン結合能を示した ($P < 0.05$)。また、オートクレーブで死菌処理を行った全ての供試菌では、コラーゲン結合能をほとんど示さなかった (図1)。

2. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

生菌において、TW295株およびTW295comp株は多くの菌体がコラーゲンに結合しており、ホルマリン溶液で死菌処理した際にも、生菌よりは程度は劣るもののコラーゲンに結合していた。一方で、オートクレーブで死菌処理を行った際は、コラーゲンに結合していなかった。また、TW295CND株は菌の処理状態に関わらず、コラーゲンに結合していなかった (図2)。

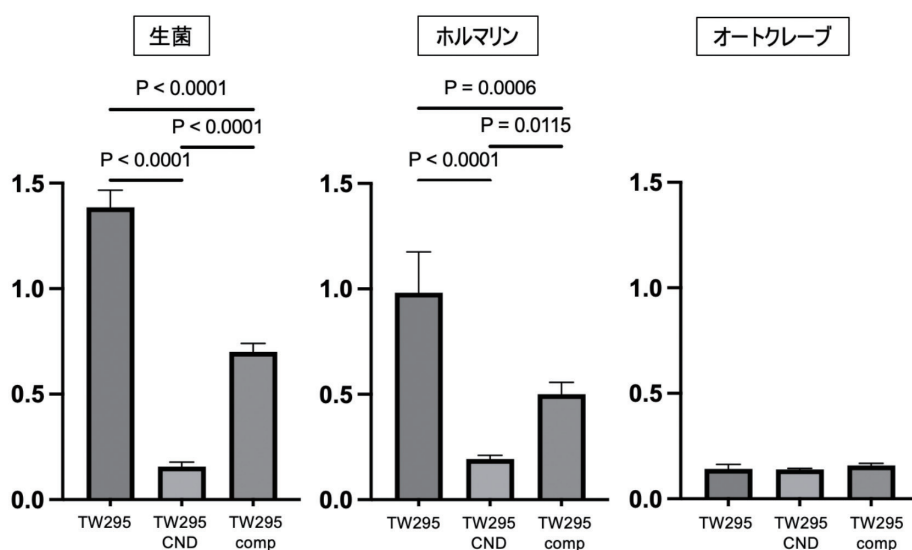


図1 菌の処理法ごとの各菌株のコラーゲン結合率

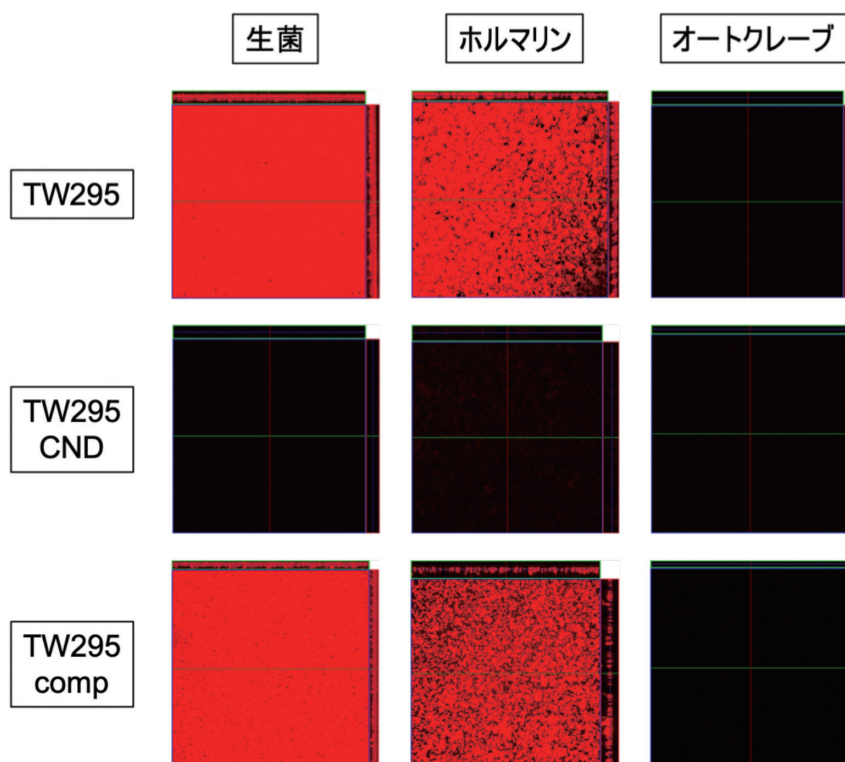


図2 各菌株の共焦点レーザー顕微鏡像

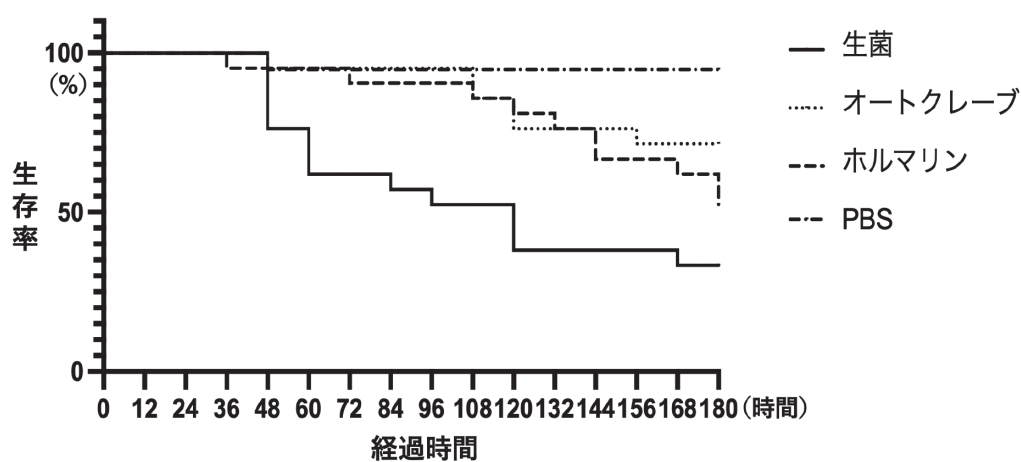


図3 TW295 株を投与したカイコの生存率の経時的変化

3. カイコモデルを用いた評価

生菌投与群および2つの死菌投与群において、コントロール群と比較して生存率の有意な低下を認めた ($P < 0.05$)。180 時間後において、コントロール群の生存率は 90 % であったが、生菌投与群では 33% まで低下した。また、オートクレープによる死菌処理群は 71 % の生存率を示したが、ホルマリウムによる死菌処理群では 52% まで低下した (図 3)。

本研究では死菌処理した *S. mutans* の感染性心内膜炎に対する病原性の評価を行うにあたり心臓弁に含まれる主要なコラーゲンである I 型コラーゲンへの付着能を分析するだけでなく、カイ

コに対する病原性についても検討したが、カイコ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。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。また、カイコ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 (LD₅₀) はカイコとヒトとで相関することが知られている。

本研究結果より、*S. mutans* TW295 株はオートクレーブにより死菌になるとコラーゲン結合能は消失するが、ホルマリンにより死菌となった場合はコラーゲン結合能を示すだけでなくカイコへの病原性も有することが明らかとなった。このことから、*S. mutans* TW295 株は死菌処理の方法によっては心臓弁に付着し、疣腫を形成する可能性があるだけでなく、ヒトに対しても病原性を有する可能性が示された。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。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

本研究の成果はいくつかの学会での発表を予定しており、今後さらに研究を発展させて論文化を目指している。また、一般的にわかりやすい形にして当教室のホームページや市民向けフォーラム等の場でも公開することも研究成果を社会に還元するうえで重要であると考えている。