

学位論文題名

Clearance of wild-type and lipoprotein-deficient strains of human oral streptococci from murine peritoneal cavity, blood flow, spleen and liver

(腹腔, 血中, 脾臓ならびに肝臓からの口腔レンサ球菌の排除におけるリポタンパク質の影響)

学位論文内容の要旨

【目的】微生物由来リポタンパク質(LP)は種々の生物活性を有している。口腔レンサ球菌は菌血症の原因菌の一つであり、また、細胞壁にLPを有している。本研究では、口腔レンサ球菌の生体からのクリアランスにおけるLPの役割を、LPを発現する野生株(WT)と発現しない欠損株(dLP)を用いて調べた。

【材料と方法】口腔レンサ球菌として *Streptococcus mutans* 109c (Sm) ならびに *S. gordonii* Challis (Sg) の WT 株と dLP 株を用いた。実験動物として C57BL/6 (TLR2^{+/+}) と TLR2 ノックアウトマウス (TLR2^{-/-}) を用いた。TLR2^{+/+} と TLR2^{-/-} マウスの腹腔にレンサ球菌を接種し、経時的に腹腔浸出液を採取し、希釈した後 BHI 寒天培地に播種し、2 日間ローソク嫌気下で培養し、形成されたコロニー数をカウントした。また、腹腔マクロファージ (PM) を調製し、WT 株と dLP 株の貪食速度を比較した。血中からのクリアランスは尾静脈に菌体を接種した後、経時的に採血し、上記の方法で生菌数をカウントした。脾臓、肝臓からのクリアランスは尾静脈に菌体を接種した後、経時的に臓器を摘出し、ホモジナイズした臓器ペーストを PBS に懸濁し、生菌数をカウントした。血中における TNF- α 産生誘導活性は尾静脈に菌体を接種した後、経時的に採血し、TNF- α 量を ELISA 法で測定し、評価した。PM をレンサ球菌で刺激し、貪食受容体 CD14 ならびに CD36 の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で解析した。さらに、これらの菌株の臍帯血内皮細胞 (HUVEC, IF050271) に対する付着能を以下の方法で評価した。HUVEC と菌体を反応させ、よく洗浄した後 0.025% (v/v) TritonX-100 で溶解し、BHI 寒天培地に播種して得られた生菌数を総菌数(付着+侵入)とした。また、HUVEC と菌体を反応した後、100 μ g/ml のペニシリンと 100 μ g/ml ストレプトマイシンで 1 時間処理し、0.025% (v/v) TritonX-100 で細胞を溶解して得られた菌数を侵入菌数とした。なお、付着菌数は総菌数から侵入菌数を引き算して得られた菌数とした。

【結果と考察】 TLR2^{+/+} マウスの腹腔では、両菌株とも WT 株が dLP 株より有意に早くクリアランスされ、TLR2^{-/-} マウスでは両菌株のクリアランスの速度に有意差がみられなかった。また、PM による貪食が腹腔からのクリアランスに重要であると考えられるので、PM による WT 株と dLP 株の貪食能を比較した。その結果、TLR2^{+/+} マウス由来 PM では両菌株とも WT 株が dLP 株より有意に早く貪食され、TLR2^{-/-} マウス由来 PM では両菌株の貪食能に有意差が認められなかった。PM による細菌の貪食は貪食受容体を介して行われることが報告されているので、PM をこれらの菌株で刺激した後、貪食受容体である CD14 と CD36 の mRNA の発現を調べた。その結果、両菌株とも WT 株が dLP 株より強くこれらの貪食受容体の発現を誘導することがわかった。したがって、マウス腹腔から WT 株が dLP 株よりも早くクリアランスされた理由の一つとして、WT 株に存在する LP が TLR2 依存的に PM における CD14 ならびに CD36 等の貪食受容体の発現を dLP 株よりも強く誘導したことが

考えられる。TLR2^{+/+}マウスの血中では、両菌種とも dLP 株が WT 株より有意に早くクリアランスされたが、TLR2^{-/-}マウスでは WT 株と dLP 株で有意差は認められなかった。この結果は、LP の存在が血中からのレンサ球菌のクリアランスに抵抗性を示すことを示唆している。次に、毛細血管の豊富な臓器である脾臓、肝臓からのクリアランスを調べた。TLR2^{+/+}マウスでは、両菌種とも dLP 株が WT 株より有意に早くクリアランスされ、TLR2^{-/-}マウスでは WT 株と dLP 株で有意差は認められなかった。このように、臓器からのクリアランスは血中からのクリアランスと同じ傾向を示した。LP の存在が血中や臓器からのレンサ球菌のクリアランスに対して抵抗性を示す原因の一つとして、菌体が LP を介して血管内皮に付着したのではないかと推測されたので、HUVEC へのレンサ球菌の付着と侵入について調べた。両菌種とも WT 株の方が dLP 株と比べて強く HUVEC に付着した。一方、HUVEC への菌体の侵入性では、Sm は両菌種とも侵入性を示したが、有意差は認められなかった。しかしながら、Sg は両菌種とも侵入性を示さなかった。これらの結果は、LP の存在が血管内皮細胞の付着に関与していることを示唆している。以上のことから、血中ならびに臓器から WT 株が dLP 株よりもより遅くクリアランスされる理由の一つとして、LP を介した血管内皮細胞の付着が考えられる。さらに、菌血症ならびに敗血症で重要な役割を果たしている炎症性サイトカインの一つである TNF- α の血中産生誘導活性を調べた。TLR2^{+/+}マウスでは両菌種とも WT 株が dLP 株より有意に強い活性を示したが、TLR2^{-/-}マウスではその差が減弱した。この結果は口腔レンサ球菌の血中における TNF- α の産生誘導活性には WT 株に存在する LP の TLR2 による認識が重要であることが推測された。

このように、両菌種において、WT 株は dLP 株に比べて強い血中 TNF- α 産生誘導活性を有し、また、血中ならびに臓器からのクリアランスにおいて WT 株が dLP 株よりも抵抗性を示したことから、口腔レンサ球菌に存在する LP は菌血症や敗血症等において病因的役割を果たしているものと推測される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 柴 田 健一郎
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Clearance of wild-type and lipoprotein-deficient strains of human oral streptococci from murine peritoneal cavity, blood flow, spleen and liver

(腹腔, 血中, 脾臓ならびに肝臓からの口腔レンサ球菌の排除における
リポタンパク質の影響)

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対して本論文の概要の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

本研究は、口腔レンサ球菌の生体からのクリアランスにおける LP の役割を、LP を発現する野生株 (WT) と発現しない欠損株 (dLP) を用いて調べた。

【材料と方法】口腔レンサ球菌として *Streptococcus mutans* 109c (Sm) ならびに *S. gordonii* Challis (Sg) の WT 株と dLP 株を用いた。実験動物として C57BL/6 (TLR2^{+/+}) と TLR2 ノックアウトマウス (TLR2^{-/-}) を用いた。TLR2^{+/+} と TLR2^{-/-} マウスの腹腔にレンサ球菌を接種し、経時的に腹腔浸出液を採取、希釈後、寒天培地で培養し、形成されたコロニー数をカウントした。また、腹腔マクロファージ (PM) を調製し、WT 株と dLP 株の貪食速度を比較した。血中からのクリアランスは尾静脈に菌体を接種した後、経時的に採血し、上記の方法で生菌数をカウントした。脾臓、肝臓からのクリアランスは尾静脈に菌体を接種した後、経時的に臓器を摘出し、臓器ペーストを懸濁し、生菌数をカウントした。血中における TNF- α 産生誘導活性は尾静脈に菌体を接種した後、経時的に採血し、TNF- α 量を ELISA 法で測定し、評価した。PM をレンサ球菌で刺激し、貪食受容体 CD14 ならびに CD36 の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で解析した。さらに、これらの菌株の臍帯血内皮細胞 (HUVEC) に対する付着能を以下の方法で評価した。HUVEC と菌体を反応させ、洗浄後 TritonX-100 で溶解し、寒天培地に播種して得られた生菌数を総菌数 (付着+侵入) とした。また、HUVEC と菌体を反応した後、抗生物質で処理し、TritonX-100 で細胞を溶解して

得られた菌数を侵入菌数とした。なお、付着菌数は総菌数から侵入菌数を引き算して得られた菌数とした。

【結果と考察】 TLR2^{+/+}マウスの腹腔では、両菌種とも WT 株が dLP 株より有意に早くクリアランスされ、TLR2^{-/-}マウスでは両菌株のクリアランスの速度に有意差がみられなかった。また、PM による食食が腹腔からのクリアランスに重要であると考えられるので、PM による WT 株と dLP 株の食食能を比較した。その結果、TLR2^{+/+}マウス由来 PM では両菌種とも WT 株が dLP 株より有意に早く食食され、TLR2^{-/-}マウス由来 PM では両菌株の食食能に有意差が認められなかった。PM による細菌の食食は食食受容体を介して行われることが報告されているので、PM をこれらの菌株で刺激した後、食食受容体である CD14 と CD36 の mRNA の発現を調べた。その結果、両菌種とも WT 株が dLP 株より強くこれらの食食受容体の発現を誘導することがわかった。したがって、マウス腹腔から WT 株が dLP 株よりも早くクリアランスされた理由の一つとして、WT 株に存在する LP が TLR2 依存的に PM における CD14 ならびに CD36 等の食食受容体の発現を dLP 株よりも強く誘導したことが考えられる。TLR2^{+/+}マウスの血中では、両菌種とも dLP 株が WT 株より有意に早くクリアランスされたが、TLR2^{-/-}マウスでは WT 株と dLP 株で有意差は認められなかった。この結果は、LP の存在が血中からのレンサ球菌のクリアランスに抵抗性を示すことを示唆している。次に、毛細血管の豊富な臓器である脾臓、肝臓からのクリアランスを調べた。TLR2^{+/+}マウスでは、両菌種とも dLP 株が WT 株より有意に早くクリアランスされ、TLR2^{-/-}マウスでは WT 株と dLP 株で有意差は認められなかった。このように、臓器からのクリアランスは血中からのクリアランスと同じ傾向を示した。LP の存在が血中や臓器からのレンサ球菌のクリアランスに対して抵抗性を示す原因の一つとして、菌体が LP を介して血管内皮に付着したのではないかと推測されたので、HUVEC へのレンサ球菌の付着と侵入について調べた。両菌種とも WT 株の方が dLP 株と比べて強く HUVEC に付着した。一方、HUVEC への菌体の侵入性では、Sm は両菌株とも侵入性を示したが、有意差は認められなかった。しかしながら、Sg は両菌株とも侵入性を示さなかった。これらの結果は、LP の存在が血管内皮細胞の付着に関与していることを示唆している。以上のことから、血中ならびに臓器から WT 株が dLP 株よりもより遅くクリアランスされる理由の一つとして、LP を介した血管内皮細胞の付着が考えられる。さらに、菌血症ならびに敗血症で重要な役割を果たしている炎症性サイトカインの一つである TNF- α の血中産生誘導活性を調べた。TLR2^{+/+}マウスでは両菌種とも WT 株が dLP 株より有意に強い活性を示したが、TLR2^{-/-}マウスではその差が減弱した。この結果は口腔レンサ球菌の血中における TNF- α の産生誘導活性には WT 株に存在する LP の TLR2 による認識が重要であることが推測された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容および関連事項について質疑応答がなされた。主な質問事項は、

- (1) dLP が血中からの早くクリアランスされた理由について

- (2) 付着することにより、食食が促進するかについて
- (3) CD14, CD36 を調べた理由について
- (4) リポタンパク質の有無で歯質への付着能へは違いはないかについて
- (5) 血中からのクリアランスと臓器からのクリアランスが同じになった理由について

これらの質問に対して、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門的分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

本研究は口腔レンサ球菌に存在する LP は菌血症や敗血症等において病因的役割を果たしていることを示したことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分に貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与することに値するものと認めた。