

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)	氏名	谷口 友梨
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Periapical lesion following Cnm-positive <i>Streptococcus mutans</i> pulp infection worsens cerebral hemorrhage onset in an SHRSP rat model (Cnm 陽性 <i>Streptococcus mutans</i> 歯髄感染に伴う根尖病変は SHRSP ラットにおける脳出血を悪化させる)			
論文審査担当者			
主査	教授	太田 耕司	印
審査委員	教授	谷本 幸太郎	
審査委員	教授	柿本 直也	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>脳卒中患者はライフスタイルの変化と高齢者人口の増加により年々増え続けており、虚血性心疾患に次いで世界的な死因の第 2 位を占めている。しかし、脳卒中のリスクファクターの 3 分の 1 は原因不明である。近年、コラーゲン結合タンパク (Cnm)-陽性 <i>Streptococcus mutans</i> (Sm) が、脳微小出血の発症に関与していると報告された。そのメカニズムは、損傷血管における露出コラーゲンと Sm が結合することで、血小板凝集が阻害されると考えられる。本研究では、高血圧を自然発症する stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) ラットで Sm 歯内感染モデルを確立し、脳微小出血に対する Cnm 陽性 Sm 歯内感染の影響を検証すると共に、Sm の Cnm 発現が細胞外基質 (ECM) や細胞に対する結合強度に関与するかを、Cnm 陽性 Sm である KSM153 (WT 株)、KSM153 Δ Cnm (CnmKO 株) と臨床分離 Sm を実験に供して検討した。</p> <p>行った実験に用いた材料と方法を以下に示す。</p> <p>1. 歯内感染モデルラットでの解析</p> <p>SHRSP ラット (10 週齢) の下顎第一臼歯咬合面を切削し、歯髄腔へ WT 株を感染させる群 (WT 群)、CnmKO 株を感染させる群 (CnmKO 群)、そして無処置群 (Control 群) の 3 群を用いた。術後 0、3、7、10 日目に神経症状スコアを計測。10 日目に屠殺し、ラットの脳、下顎、血清を回収した。大脳を冠状断で 2mm ごとにスライスした切片を用いた出血面積の比較、病理学的比較、そして血清を用いたサイトカイン量の比較を行った。また免疫染色法によって脳組織における Sm の存在を検討した。</p> <p>2. ECM と細胞に対する Sm 付着実験、細胞浸潤実験</p> <p>ECM は、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチンの 4 種類を対象とした。細胞は歯髄細胞 (HDPC)、血管内皮細胞 (HUVEC)、および歯肉線維芽細胞 (HGF) を用いた。WT 株と CnmKO 株を BHI 培地で培養後、10^7 CFU/ml へ調整した菌液 100 μl を 96well ECM coating plate へ加え、10^5 CFU/ml へ調整した菌液 100 μl を 96well plate にて培養した細胞へ加えた。37°C で 1 時間培養した後、</p>			

プレートをトリプシン処理し、細菌を回収して寒天培地へ播種、生育したコロニーをカウント、ECM と細胞に対する Sm の付着率を測定した。また浸潤実験として、同様に菌と細胞を培養後、抗菌薬溶液 (Penicillin:50 μ g/ml +Gentamicin:300 μ g/ml) を 100 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間 30 分培養し、寒天培地に生育したコロニー数で評価した。

3. siRNA を用いた細胞に対する付着実験

細胞付着における ECM の影響を検証するために、siRNA にて HDPC と HUVEC における ECM をノックダウンした Δ ECM HDPC と Δ ECM HUVEC を用い、同様の付着実験を行った。

4. 臨床分離 Sm を用いた IV 型コラーゲンと HUVEC に対する付着実験

Sm は広島大学口腔検査センターで患者唾液中から分離した臨床分離 Sm35 株 (Cnm 陽性株 11 株、Cnm 陰性株 24 株) と標準株 LM-7 (Cnm 陽性) と MT703R (Cnm 陰性) を供試し、付着実験を行った。

得られた結果と考察を以下に示す。

1. ラットの下顎骨を CBCT で比較したところ、Sm 感染群 (WT 群, CnmKO 群) において根尖病巣形成を認め、根尖組織を Western-blotting 解析した結果、Sm 感染群において根尖組織に Sm の存在を認めた。ラット血清を用いた ELISA 法にて Sm に対する血清抗体価の値を比較したところ、Sm 感染群において優位な血清抗体価の上昇を確認した。ラット血清を PCR 法にて解析し Sm 感染群の血清中に Sm の存在を確認した。神経症状スコアを比較したところ、7 日目と 10 日目で WT 群における有意な神経症状スコアの上昇を認めた。ELISA 法にて、脳出血を起こすと上昇する炎症性サイトカイン IL-1 β 値を比較したところ、WT 群にて有意な血清抗体価の上昇を認めた。ラットの大脳において出血斑数と拡張血管数を比較したところ、WT 群において優位な出血斑と拡張血管の増加を認めた。WT 群では HE 染色画像にて出血像が見られるとともに、Sm に対する蛍光免疫染色において血管内皮の裏打ちが崩壊した箇所に沿って Sm の局在を認めた。

2. ECM においては、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、ラミニンで WT 株と比べて CnmKO 株は付着率が有意に低かったが、フィブロネクチンでは有意差を認めなかった。HDPC、HUVEC、HGF に対する付着実験においては、WT 株と比べて CnmKO 株は付着率が有意に低かった。加えて、HUVEC に対する浸潤実験においては、WT 株と比べて CnmKO 株は浸潤率が有意に低かった。

3. WT 株を用いた付着実験において、Ctrl HUVEC と比べて Δ I 型コラーゲン HUVEC、 Δ IV 型コラーゲン HUVEC において優位に付着率が減少していた。CnmKO 株を用いた付着実験においては、Ctrl HUVEC と Δ ECM HUVEC で有意差は認めなかった。HDPC においても同様の傾向を示した。

4. IV 型コラーゲンと HUVEC に対する付着実験において、Cnm 陽性株群と比べて、Cnm 陰性株群は付着率が優位に低かった。また、HUVEC に対する浸潤実験において、Cnm 陽性株群と比べて、Cnm 陰性株群は浸潤率が優位に低かった。

以上の結果から、本論文は歯内感染モデルラットを用いた研究で IV 型コラーゲンに対して Cnm 陽性 Sm が付着することによって脳微小出血の悪化が引き起こされることを示唆している。

これらの研究成果は、歯科医学の発展に寄与するもの大きいと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が谷口友梨に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。