非アルコール性脂肪肝炎患者口腔由来

Streptococcus mutans の病態発症関連因子の解析

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 小児歯科学分野

田畑 佳子

(令和3年12月10日受付)

緒言

齲蝕の主要な病原細菌である Streptococcus mutans は、近年、感染性心内膜炎の発症や、脳出血や腸炎の増悪化など全身疾患に関与している可能性が数多く報告されている¹⁴⁰. S. mutans の菌体表層には、菌体結合型のタンパクである分子量約 120kDa のコラーゲン結合タンパク(Cnm)⁵⁰ および分子量約 190kDa の高分子タンパク抗原(Protein antigen; PA)⁶⁰ などいくつかの細胞壁結合型タンパクが存在する. Cnm は、日本人の口腔より分離した S. mutans 臨床分離株のうち約 10%に発現が認められ、コラーゲンへの付着や、血管内皮細胞への付着および侵入に関与することが報告されている⁷⁰. 一方、PA は、臨床分離株の 90%以上に発現が認められ⁸⁰、菌体疎水性結合⁹⁰ や各種炎症性サイトカインの分泌に関与することなどが報告されている¹⁰⁰. これら両方のタンパクを発現する Cnm⁴/PA⁴ S. mutans の分布頻度は、およそ 7. 5%であると考えられている⁶.

脂肪性肝疾患は、肝細胞に主に中性脂肪が沈着して肝障害をきたす疾患の総称であり、近年、肥満人口の増加に伴い患者が急増している^{11,12)}.飲酒歴の有無により、脂肪性肝疾患は、アルコール性脂肪肝炎(Alcoholic steatohepatitis; ASH)と非アルコール性脂肪性肝疾患(Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)に分類され、NAFLD はさらに肝生検により、非アルコール性脂肪肝(Non-alcoholic

fatty liver; NAFL)と非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) に分類される. NASH は, 明らかな飲酒歴が無いにもかかわらず, 病理組織学的 にアルコール性脂肪肝炎に類似する所見を呈する原因不明の症例として1980年 に新しい疾患概念として提唱された¹³⁾.重症化すると、肝硬変を経て肝癌へと 進行する場合もあることが報告されている¹⁴⁾. 最初に過剰栄養摂取によりメタ ボリックシンドロームに陥ってインスリン抵抗性が生じ,糖尿病や動脈硬化,脂 質異常症などが引き起こされるとともに NAFL が生じ, その後, 酸化ストレス, 脂質過酸化およびミトコンドリアの機能異常などにより、肝臓における炎症性 変化および線維化が誘発され, NAFL から NASH へ進展する 2 段階で発症する という考えの two-hit theory がこれまで提唱されてきた 15-17⁾. しかし近年, 肝組 織内のみならず、肝臓と脂肪組織、腸管などの肝外臓器との相互作用が NASH 発症に寄与しているとされる multiple parallel-hit theory が広く支持されてきてい $5^{18)}$.

高脂肪食(High-fat diet; HFD)を摂取させ肝臓に脂肪を蓄積させたマウスモデ ルを用いた動物実験では, Cnm⁺/PA⁺ S. mutans は, Cnm を介して肝細胞に, PA を介して不飽和脂肪酸に結合することで脂肪蓄積した肝細胞に付着し, 線維化 を促進させることによって NAFL から NASH への病態進行に関与している可能 性があることが明らかにされている¹⁹⁾.また 6 週齢の C57BL/6J マウスに HFD

を与え続けると 48 週後に NASH に類似する所見を呈したとの報告²⁰⁾ がある一 方で、HFD を 4 週間与え続けたマウスに Cnm⁺/PA⁺ S. mutans を頸静脈より投与 すると、わずかに 16 週後に NASH に類似する所見を示すことが確認され、 Cnm⁺/PA⁺ S. mutans が NASH 発症を誘発することが示唆された²¹⁾. さらにヒト 研究において、歯周病の主要な病原細菌である Porphyromonas gingivalis が、健 常者と比較して NASH 患者において有意に多く検出されることが報告されてい る²²⁾. 最近になって、齲蝕の主要な病原細菌である S. mutans のうち Cnm を保 有する S. mutans が、NASH 患者から有意に多く検出されたことが報告された²³⁾.

これらのことから、本研究では、Cnm および PA に着目し、NAFLD 患者から 分離した S. mutans 株の性状および分子生物学的解析を行った. さらに、NASH と診断された患者から分離した S. mutans 株による NASH 発症の有無を、マウス モデルを用いて検討し、Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の NASH 発症への関与を明らかにす ることにした.

材料と方法

1. NAFLD 患者唾液中の S. mutans 性状の分析

1) 被験者

市立奈良病院でNAFLDと診断されて肝生検を受けた 40 名の患者(NAFL:20 名,NASH:20 名)を対象とした.本研究における被験者の病態のデータを表 1 に示す.なお本研究は,同病院倫理委員会(番号 32)および岡山大学医療系部局 研究倫理審査専門委員会(研 1707-021)の承諾を得た後,同意の得られた対象 から唾液の採取および血液採取を行い研究に使用した²³⁾.また,一般血液検査 により得られた臨床検査値と *S. mutans* 保有との関連を調べた.

2) 細菌 DNA の抽出

供試菌の培養には Mitis-Salivarius (MS) 寒天培地 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に Bacitracin (0.2 unit/ml;和光純薬,大阪) と 15%ス クロース (和光純薬) を添加した MSB 寒天培地および Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地 (Becton Dickinson) を用いた.

同意の得られた患者の唾液サンプルを MSB 寒天培地に播種し,37℃で48 時間,窒素95%,炭酸5%の条件下で嫌気的に培養した.寒天培地上に生じたコロニーを光学顕微鏡にて観察し,*S. mutans* 菌株を5株ずつランダムに釣菌し,10 mlの BHI 液体培地にて37℃で18 時間培養後,実験に用いた.

細菌 DNA の抽出は, Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて行った. 培養した供試菌を遠心分離して回収し, Glu-TE Buffer (1 M グ ルコース, 10mM tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1 mM EDTA) 250 µl に懸濁し た. この菌液に, N-acetylmuramidase SG (2.0 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 62.5 µl とリゾチーム(10 mg/ml;和光純薬) 0.25 µl を加え,37℃で 90 分間反応させた. Cell Lysis Solution (QIAGEN) 600µl を添加し 80℃で5 分間 反応させ, RNase (10µg/ml; QIAGEN) 3 µl を添加した. 37℃で 30 分間反応さ せた後, Protein Precipitation Solution (QIAGEN) を 200 µl 添加し, ボルテックス を行い懸濁させた.この反応液を遠心分離して得た上清に,600 µl のイソプロパ ノール(和光純薬)を添加して混和し,再度遠心分離を行った.得られた沈殿を 70%エタノール (Sigma-Aldrich) にて洗浄して乾燥後, DNA Hydration Solution (QIAGEN) 100 µl に溶解した.得られた染色体 DNA 溶液は,OD260 により濃度

3) S. mutans の同定

を測定した後 20 µg/ml に調整して使用した.

用いたプライマー配列を表 2 に示す^{19, 24-26)}. S. mutans の同定は, S. mutans の MKD-F と MKD-R プライマーを用いた polymerase chain reaction (PCR) 法により 行った. また S. mutans と同定された菌の Cnm を, cnm-1F と cnm-1R のプライ マーを用いて Cnm をコードする遺伝子 cnm の保有の有無により調べた. 試薬の 量および温度サイクルは、それぞれの指示書に従って設定した.

得られた PCR 産物をアガロース電気泳動にてバンドの有無を確認した. 電気 泳動用のゲルは, TAE 緩衝液 [40 mM Tris (和光純薬), 40 mM 酢酸 (和光純 薬), 1 mM EDTA (pH8.0) (ニッポンジーン, 東京)] に 0.7%あるいは 1.5% アガロース S (ニッポンジーン) を加え,加熱溶解したものを使用した. 泳動用 緩衝液には TAE 緩衝液を用い, 100 V 定電圧で電気泳動を行った. DNA サイズ マーカーは, 100 bp ラダーあるいは 1 kbp ラダー (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を使用した. 泳動用ゲルを臭化エチジウム (0.5 μg/ml; 和光純薬) 溶液で 15 分間反応後,紫外線で DNA のバンドを可視化した.

4) PA タンパクの発現

PA タンパクの発現をウェスタンブロット分析により調べた.供試菌を BHI 液体培地で 37℃, 18 時間培養後, 890×g, 4℃で 10 分間遠心分離し,菌体を回収した.得られた菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS;137 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄;和光純薬) 100µl で懸濁した後,Gel loading buffer [1 M Tris (pH6.8), 10% Sodium Dodecyl sulfate (SDS), 0.2% Bromophenol blue, 5% Glycerol; 和光純薬] 80 µl および 10 mM Dithiothreitol (DTT) 20 µl を加え, 10 分間 100℃ で加熱し SDS-PAGE 用試料とした.SDS-PAGE は,Laemmli (1970)²⁷⁾の方法に

準じて行った. 分子量測定マーカーとして, Precision Plus Protein Dual Color standards (BIO-RAD) を用いた.

Mini-PROTEAN Tetra System (BIO-RAD) を用いて泳動後、セミドライ式ブロ ッティング装置 (Trans-blot SD, BIO-RAD) を用いて 10 V 定電圧で、1 時間通電 してアクリルアミドゲル層から Poly vinylidene difluoride (PVDF) 転写膜 (Immobilon; Millipore, Billerica, MA, USA) へ転写した.

この PVDF 膜を 5% Skim Milk (Becton Dickinson) を添加した 0.05% Triton X-100 (和光純薬) 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBST) 中で 4℃で一晩静置した. PBST にて 3 回洗浄後, PBST で 1000 倍希釈した *S. mutans* 血清型 *c* のウサギ抗 PA*c* 抗血清 ²⁸⁾ と室温で 1 時間反応させた.再び PBST にて 3 回洗浄後, PBST で 1000 倍希釈した Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Alkaline Phosphatase

(Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) でさらに1時間室温で反応させた.
反応後の PVDF 膜を PBST で 3 回洗浄後, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphate-*p*Toluidine (和光純薬) と Nitro Blue Tetrazolium (和光純薬)を発色基質として添加した AP 緩衝液を加えて発色させ,バンドを視覚化した.

5) 分離した菌株の生物学的性状の分析

(1) コラーゲン結合能

各供試菌のコラーゲン結合能は, Nomura ら (2012)²⁹⁾の方法に準じて測定し た. それぞれの株のコラーゲン結合能は、これまでの研究で用いた NASH 発症 を確認している菌株 Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の TW871 株^{19,21)}の値を 100%として換 算した.0.25 M 酢酸に溶解した I 型コラーゲン[Collagen(type I); Sigma-Aldrich] もしくはIV型コラーゲン [Collagen (type IV);新田ゼラチン,大阪]を96 穴平 底細胞培養用マイクロタイタープレート(FALCON, Franklin Lakes, NJ, USA) の各ウェルに 200 µl ずつ添加し、4℃で一晩反応させた. このウェルを PBS で3 回洗浄した後, 37℃で 90 分間 5% Bovine Serum Albumin (BSA; Sigma-Aldrich) で反応させた. その後, 0.01%の Tween-20(和光純薬)を含有した PBS で洗浄 した.BHI 液体培地で一晩培養した供試菌を PBS で洗浄後懸濁し、1 ウェル当 たり 2×10⁹ Colony Forming Unit (CFU) になるように添加した. 37℃で 3 時間反 応後, PBS で3回洗浄し, 25%ホルムアルデヒド(和光純薬)で菌を固定した. PBS で 3 回洗浄後, 200µl の 0.5% クリスタルバイオレット (Sigma-Aldrich) で 1 分間染色し, PBS で3回洗浄した. その後, 7% 酢酸 200 µl を加えて, 菌体コラ ーゲンに付着した染色剤を溶解させ、各ウェルの OD595 値を測定した. 各菌株の コラーゲン結合能は3回測定し、平均値で示した.統計学的有意差の検定には、 Mann-Whitney U 検定を用いて、有意水準 5%以下の場合を有意差ありとした. (2) Real-time Reverse transcription-PCR (RT-PCR) による定量的遺伝子解析

RT-PCR 法は Matsumoto-Nakano と Kuramitsu (2006)²⁵⁾の方法に準じて行っ た.各株を BHI 液体培地で 37°C, 18 時間培養後,新鮮な同液体培地に継代し, OD550 で対数増殖期後期まで培養した.その後,890 × g,4°Cで 10 分間遠心し, 菌体を回収した.回収した菌体を 300µl の UltraPureTM Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水 (BioDynamics Laboratory) に懸濁し,Lysing Matrix B[®] (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) に菌液を移し,TRI Reagent (Sigma-Aldrich) を 900 µl 添加し た後,FastPrep[®] (Bio-Rad) を用いて菌体を破砕した.破砕菌体を含む懸濁液を 遠心し,クロロホルム (和光純薬)を混和させた後,上清の全 RNA をイソプロ パノール (和光純薬)を用いて沈殿させ,回収を行った.その後,RNase-free DNase

(Promega, Madison, WI, USA) を 37°Cで 15 分間反応させ、回収した全RNA から染色体 DNA を除去した.この mRNA サンプルから SuperScriptTM IV Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した.作製し た cDNA を鋳型として、NASH 患者群の供試菌株および NAFL 患者群の供試菌 株の cnm および PAc をコードする遺伝子 pac の発現を SYBR green[®] (Bio-Rad) を用いた Real-time RT-PCR 法により調べた. cnm の増幅には, cnm-202F と cnm-202R プライマーを用い, pac の増幅には pac 上流域の塩基配列 161 番から 315 番に設定した PA-161F と PA-315R プライマーを用いた (表 2).遺伝子増幅反 応および蛍光強度の測定には、StepOnePlusTM (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)を使用した. Real-time RT-PCR の条件は添付文書に従い設定した. また,目的遺伝子の発現量は,16S rRNA を内部コントロールとして補正した. TW871株をポジティブコントロールとして用い,各回における TW871株の各遺 伝子の発現量を1とした相対値で示した.統計学的有意差の検定には,Mann-Whitney U 検定を用いて,有意水準 5%以下の場合を有意差ありとした.

- 2. マウス NASH モデルを用いた検討
- 1) 使用した S. mutans 菌株

動物実験に用いた菌株を表 3 に示す. NASH 発症を確認している感染性心内 膜炎患者からの血液分離株である S. mutans TW871 株 ³⁰⁾ と,本研究で,重度な NASH 患者から分離した口腔分離株 S. mutans KT3 株を使用した.

2) 病原性の評価のための条件設定

マウス NASH モデルにおける実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会(承認番号:動歯-25-002-0)および岡山大学動物実験委員会(承認番号:OKU-2017214)の承認を得て行った.図1にプロトコールを示す.まず、6週齢のC57BL/6Jマウス(オス;日本SLC,静岡)に高脂肪食飼料32(High Fat Diet 32,HFD 32;日本 CREA、東京)を摂取させた.HFD 中の飽和脂肪酸は22.3%、不飽和脂肪酸は76.9%であった.HFD 投与開始4週後に頸静脈より1×10⁷ CFU に

調整した 100 µl 菌液の TW871 株 (n=9) および KT3 株 (n=16) を投与する群と 菌を投与しない群 (n=8) に分けた. なお, KT3 株については病原性が不確定な ため,死亡することを想定し匹数を増やし設定した. 実験開始 16 週後に体重を 測定し,イソフルラン (ファイザー株式会社,東京) 麻酔下にて屠殺を行った. 屠殺時に心臓より採血し,血清中の肝臓および胆道疾患に関連する項目を調べ た. 摘出した内臓脂肪および肝臓の観察と重量を測定し,内臓脂肪としては精巣 上体周囲の脂肪³¹⁾を採取した. 各群における統計学的有意差の検定には, ANOVA の Tukey 検定法を用いて,有意水準 5%以下を有意差ありとした. 3) 組織学的分析

各群より摘出した肝臓組織を 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬)で一晩 固定した.固定後パラフィン包埋し,薄さ3µmの切片を作製し,ヘマトキシリ ンエオジン(Haematoxylin-Eosin; HE)染色およびマッソントリクローム (Masson's-trichrome; MT)染色を行い,肝臓組織における脂肪の蓄積,炎症性 変化および線維化の有無を評価した.

結果

- 1. NAFLD 患者が保有する S. mutans の分子生物学的検討
- 1) 唾液中の S. mutans の分布および性状の分析

市立奈良病院で NAFLD と診断され肝生検を行った 40 名の患者(NAFL: 20 名, NASH: 20名)の唾液中の S. mutans の検出率を調べた. その結果, NAFL 患者群と NASH 患者群の S. mutans 検出率は, それぞれ 80%と 90%で有意差は なかった(図2). これらの S. mutans のうち, NAFL 患者群と NASH 患者群で PA のみを有する Cnm⁻/PA⁺ S. mutans, Cnm のみを有する Cnm⁺/PA⁻ S. mutans, どちらも持たない Cnm⁻/PA⁻ S. mutans の検出率に有意な差はなかっ た. しかしながら, NASH 患者群から Cnm⁺/PA⁺ S. mutans が 27%と高頻度に検 出され, NAFL 患者群の 11%より有意に高い値を示した(図3).

2) Cnm⁺/PA⁺ S. mutans 保有と臨床検査値との関連

NAFLD 患者で *S. mutans* が検出された患者 34 名(NASH: 18 名, NAFL: 16 名)のうち, Cnm+/PA+ *S. mutans* が検出された患者は 11 名(NASH: 8 名, NAFL: 3 名)であった. そのうち, Cnm+/PA+ *S. mutans* を保有する NASH 患者群を保有 群, Cnm+/PA+ *S. mutans* を保有しない群を非保有群として臨床検査値を分析した. その結果, 保有群は, 非保有群と比較して, IV型コラーゲン-78 が有意に高い値 を示し(P<0.05),アディポネクチンが有意に低い値を示した(P<0.05)(表 4).

3) 分離した菌株の生物学的性状の分析

(1) 各菌株のコラーゲン結合能の比較

Cnm+/PA+ S. mutans を陽性群, その他の S. mutans を陰性群として調べたところ, NASH 患者群において, 陽性群は陰性群と比較して I 型コラーゲンに対して 有意に高い結合能を示した(図 4).また, IV型コラーゲンについても同様に, NASH 患者群において, 陽性群は陰性群と比較して有意に高い結合能を示した (図 5).さらに, NASH 患者群および NAFL 患者群における Cnm+/PA+ S. mutans の I 型コラーゲンとIV型コラーゲンに対する結合能を比較したところ, NASH 患 者群および NAFL 患者群ともに, I 型コラーゲンと比較してIV型コラーゲンに 対して有意に高い結合能を示した(図 6).

(2) 各菌株の cnm および pac 遺伝子の発現解析

NAFLD 患者の唾液サンプルから分離された全ての菌株の cnm および pac の発 現量を調べ、その中央値を比較した.その結果、NASH 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の cnm の発現量は、NAFL 患者と比較して有意な差はなかっ た(図7).しかし、pac の発現量は、NAFL 患者と比較して有意に高い値を示 した(P < 0.05)(図7).また、Cnm の保有の有無で pac の発現量を比較した

ところ, NASH 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ S. *mutans* の pac の発現量は, Cnm を保有していない Cnm⁻/PA⁺ S. *mutans* の pac の発現量と比較して有意に高い値を 示した(P < 0.05)(図 8).

- 2. マウス NASH モデルを用いた NASH 患者口腔由来 Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の NASH 発症への関与の検討
- 1) 体重変化と内臓脂肪および肝臓の重量

実験開始16週後のマウスを観察したところ,各群の体格や内臓脂肪の大きさ に違いはなく(図9A,B),体重および内臓脂肪重量にも有意差はなかった(図 9C,D).しかし,TW871株投与群およびKT3株投与群の肝臓は,菌非投与群 のものと比較して明らかに肥大しており(図10a),TW871投与群およびKT3 株投与群の肝重量は菌非投与群と比較して有意に高い値を示した(P<0.01)(図 10b,c).

2) 血液生化学的検查

実験開始16週後におけるマウス血清の肝臓および胆道疾患に関連する項目を 調べたところ,TW871株投与群およびKT3株投与群は菌非投与群と比較して, 血清総コレステロール,遊離コレステロール,LDLコレステロール,HDLコレ ステロール,コリンエステラーゼ(ChE)の脂質代謝異常に関する項目の値が有 意に上昇した(図 11).また,アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST),
 アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT),アルカリフォスファターゼ(ALP),
 ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP),血清鉄(Fe)の肝機能障害に関する項目
 の値も有意に上昇した(P<0.05)(図 12).

3) 肝臓組織の病理組織学的分析

実験開始16週後のTW871株投与群およびKT3株投与群より摘出した肝臓組織のHE染色像では,菌非投与群と比較して大滴性の脂肪沈着と局所の炎症性細胞の浸潤が顕著であった(図13).一方で,菌非投与群では脂肪沈着はあったものの,小滴性の脂肪沈着であった.また,MT染色像では,TW871株投与群およびKT3株投与群の肝実質の局所において青く染色された線維化像が観察されたが(図14),菌非投与群では観察されなかった.

歯科の二大疾患の一つである齲蝕は、グラム陽性細菌である S. mutans が菌体 表層に様々なタンパクを発現し、これらが協調してバイオフィルムを形成する ことで誘発されることが知られている³²⁾.しかしながら、菌体表層に Cnm を発 現している S. mutans は、齲蝕原性能が低いと考えられており³³⁾、血中から分離 されることから Cnm を発現していない S. mutans と比較して血中に侵入しやす い可能性が報告されている³⁴⁾.さらに、これらの菌株は、コラーゲン結合能や 多形核白血球からの貪食への抵抗性を示すことから、感染性心内膜炎や脳出血、 腸炎などの全身疾患に関与することが報告されている¹⁴⁾.これらのことから、 これらの菌株が NAFL から NASH への増悪化にも関与している可能性が考えら れた.

これまで Naka らの報告によると、4 週間高脂肪食を与えたマウス NASH モデ ルに感染性心内膜炎患者からの血液分離株である *S.mutans* TW871 株 (Cnm⁺/PA⁺) を頸静脈より投与したところ、16 週後に NASH の増悪化が引き起こされるもの の、標準株で Cnm を保有していない *S.mutans* MT8148 (Cnm⁻/PA⁺) 株では生じ ないことが明らかとなっている³⁵⁾. その後、Cnm および PA の欠失変異株, そ れぞれの相補株を用いて検討を行ったところ、Cnm の欠失変異株および PA の 欠失変異株をそれぞれ投与した場合には NASH の増悪化は認められなかったも

のの,各相補株を投与した際には S. mutans TW871 株を投与したときと同様に NASH の増悪化が認められた¹⁹⁾.このことから,S. mutans が引き起こす NASH の増悪化には,Cnm および PA の両方が存在していることが重要である可能性 が考えられた.

本研究では、Cnm および PA に着目し、実際に NAFLD と診断された患者の保 有する S. mutans の性状を分析し、NAFL 患者と NASH 患者で比較検討を行った. その結果、両患者群の S. mutans の検出率は同等で、検出された S. mutans のうち 約 70%が Cnm⁻/PA⁺ S. mutans であった. また、Cnm⁺/PA⁺ S. mutans は NASH 患者 から多く検出され、その検出率は 27%であった. これまで Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の 分布頻度はおよそ 7.5%と報告されており[。]、本研究では NASH 患者からは通常 よりも高頻度に検出されることが明らかとなった.

さらに、これらの菌株が検出された NASH 患者と検出されなかった NASH 患 者の血液データを比較したところ、IV型コラーゲン-7S が有意に高い値を示し、 アディポネクチンが有意に低い値を示した.IV型コラーゲンは消化管、皮膚、筋 肉、腎糸球体、肺胞などに多く存在する細胞外マトリックスの主要成分の一つで あり、IV型コラーゲン-7S は、IV型コラーゲン分子の N 末端の 7S 領域を指す. 慢性肝疾患において、IV型コラーゲン-7S は肝臓の線維化の進行とともに上昇す ることが知られており³⁰、肝線維化の比較的早期から血中に増加することから 肝線維化の指標として有用である.これらのことから,肝生検を回避できる NAFL と NASH の鑑別マーカーの一つとしても期待されている 37^{1} . Cnm⁺/PA⁺S. mutans を保有する NASH 患者群では、この菌株を保有しない NASH 患者群と比 較してⅣ型コラーゲン-7Sが有意に高い値を示したことから、これらの菌株が肝 臓の線維化に関与する可能性が示唆された.一方,アディポネクチンは、脂肪細 胞から特異的に分泌される脂肪組織由来生理活性物質であるアディポサイトカ インの一つであり,肥満および内臓脂肪蓄積時に低下し,体重減少によって増加 することが報告されている³⁸⁾.また、高脂肪食給餌マウスにアディポネクチン を投与したところ、血中の遊離脂肪酸クリアランスが亢進し糖代謝が改善され たことが報告されている ³⁰⁾. さらにアディポネクチンが骨格筋において糖の取 り込みを促進し、肝臓においては糖新生を抑制することでインスリン抵抗性を 改善することが示されている^{40,41)}.このように、アディポネクチンと脂肪組織 および肝臓組織は深く関連しており、本研究において Cnm+/PA+S. mutans を保有 する NASH 患者群でアディポネクチンの値が有意に低下していたことは興味深 い結果となった.これまでに、各種脂肪酸のうち不飽和脂肪酸であるオレイン酸 とリノール酸に, PA を発現している S. mutans 菌株が PA を発現していない S. mutansと比較して有意に結合することが報告されている¹⁹⁾.またヒト肝臓癌由 来細胞株(Hepatocellular Carcinoma Cells; HepG2)を用いた実験において、オレ イン酸を添加して脂肪化した HepG2 細胞に PA を発現している菌株が有意に結 合したことが示されている.脂肪組織には,皮膚の下に位置する皮下脂肪と内臓 の周囲にみられる内臓脂肪があり,その脂肪酸組成は不飽和脂肪酸が主である. また,アディポネクチンは皮下脂肪と比較して,内臓脂肪の脂肪細胞から多く分 泌されることが報告されている⁴²⁾.したがって,Cnm⁺/PA⁺S.mutans が脂肪組織 に結合し,アディポネクチンの分泌抑制に何らかの影響を及ぼしている可能性 が考えられる.

また、アディポネクチンの分泌には TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカイン、 酸化ストレスなどが関与しており、これらの因子はアディポネクチンの発現を 抑制することが知られている⁴³⁾.しかし、本研究において Cnm*/PA* S. mutans を保有する NASH 患者群では、保有しない患者群と比較してアディポネクチン の有意な低下が認められたものの、TNF- α や IL-6 の発現に違いは認められなか った.しかしながら、過去の研究で、DNA マイクロアレイ解析によって TW871 株投与 24 時間後のマウス肝臓において IFN- γ や酸化ストレスに関与するメタ ロチオネイン⁴⁴⁾が有意に発現が上昇することが確認されている³⁵⁾. IFN- γ は、 活性化 T リンパ球および NK 細胞によって産生され、マクロファージを活性化 し、TNF- α や IL-6、TGF- β などの炎症性サイトカインが分泌される.TNF- α と IL-6 の血漿中濃度はそれぞれ 1.5 時間後と 2 時間後にピークに達することが報 告されていることから⁴⁵⁾,今後は様々な実験期間において,各種炎症性サイト カインの動態について調べていく必要があると考えられる.

S. mutans の菌体表層表面に存在する Cnm は、コラーゲン結合能を有すること が知られており⁵⁾,本研究では NAFLD 患者から分離された S. mutans 株の Cnm の発現をコラーゲン結合試験を行い評価した. NASH 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ S. mutans は, これら2つのタンパクを発現しない Cnm⁺/PA⁻ S. mutans, Cnm⁻/PA⁺ S. mutans, そして Cnm⁻/PA⁻ S. mutans と比較して I 型コラーゲンおよ びIV型コラーゲンに対し、ともに有意に高い結合能を示した. さらに、NAFL 患 者および NASH 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ S. mutans は, I型コラーゲンと 比較してIV型コラーゲンに対して有意に結合した.これらのことから, Cnm+/PA+ S. mutans は、IV型コラーゲンに特異的に結合することが示された. IV型コラー ゲンは、肝臓の類洞と呼ばれる肝細胞板間に存在する毛細血管の基底膜に存在 するが、正常な肝臓の類洞では基底膜構造が欠如している 40 . 肝臓の線維化に 伴って類洞内の肝星細胞から基底膜成分が分泌されて沈着し、基底膜形成が生 じることで肝臓組織および血中におけるⅣ型コラーゲンやⅣ型コラーゲン-7S が上昇することが報告されている 47,480. したがって本研究より, 基底膜成分が 沈着している肝臓組織に Cnm⁺/PA⁺ S. mutans が結合し、肝線維化に関与する可能 性が示唆された.

これまでに、S. mutans が引き起こす NASH の増悪化をはじめ、感染性心内膜 炎や脳出血、腸炎などの全身疾患に Cnm や PA が関与する可能性が報告されて いるが、その発現量について検討した報告はない. 今回、NAFLD 患者から分離 された全ての菌株の cnm および pac の発現量を RT-qPCR により分析を行った. これにより、NASH 患者が保有する Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の pac の発現量は、NAFL 患者と比較して有意に高いことが明らかとなった. また、その発現量は、cnm を 持たない S. mutans 株と比較して cnm を持つ S. mutans 株で有意に高かった. こ のことから、NASH の増悪化には pac の発現量が関与していることが示唆され、 その pac の発現量は cnm の発現量と相関している可能性が示唆された.

以上の結果に基づいて、高脂肪食を与えインスリン抵抗性が生じている NASH モデルマウスに、NASH 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ S. mutans を頸静 脈より投与すると、NASH を発症することが明らかとなった. Cnm⁺/PA⁺ S. mutans が、その中でも PA の発現量が多い S. mutans が血液中に侵入すると、脂 肪化した肝臓組織においては、Cnm が肝細胞に付着し、PA が脂肪に結合する ことで炎症が惹起されて肝障害が生じる可能性が示唆された. また脂肪組織に おいても、PA の発現量が多い S. mutans が結合し、アディポネクチンの分泌が 抑制されてインスリン抵抗性が生じる可能性が示唆された. そして肝臓組織内 のIV型コラーゲンの産生が亢進し、Cnm を介してIV型コラーゲンに S. mutans が結合することで肝線維化に寄与し,NASH 発症に至る可能性が示唆された. しかし,肝臓組織の類洞内にはマクロファージの一種であるクッパー細胞が存 在し⁴⁹⁾,肝臓組織に到達したこれらの菌株は,クッパー細胞により数時間後に は貪食されることが容易に推測される.今後は,Cnm および PA が直接的に NASH を誘発するかを検討していきたいと考えている.

謝辞

稿を終えるにあたり,終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学学術 研究院医歯薬学域小児歯科学分野の仲野道代教授ならびに岡山大学大学院医歯 薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の仲周平講師に心から感 謝致します.また,様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の諸 先生に厚く御礼申し上げます.

文献

- Nakano K, and Ooshima T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol* 56: 551-556, 2009.
- 2) Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K, Kudo C, Nomura R, Kojima A, Naka S, Muranaka Y, Thura M, Nakajima A, Masuda K, Nakagawa I, Speziale P, Shimada N, Amano A, Kamisaki Y, Tanaka T, Umemura K, and Ooshima T. The collagenbinding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nat. Commun.* 2: 485, 2011.
- 3) Kojima A, Nakano K, Wada K, Takahashi H, Katayama K, Yoneda M, Higurashi T, Nomura R, Hokamura K, Muranaka Y, Matsuhashi N, Umemura K, Kamisaki Y, Nakajima A, and Ooshima T. Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Sci. Rep.* 2: 332, 2012.
- 4) Nomura R, Otsugu M, Hamada M, Matayoshi S, Teramoto N, Iwashita N, Naka S, Matsumoto-Nakano M, and Nakano K: Potential involvement of *Streptococcus mutans* possessing collagen binding protein Cnm in infective endocarditis. *Sci. Rep.* 10: 19118, 2020.
- 5) Sato Y, Okamoto K, Kagami A, Yamamoto Y, Igarashi T, and Kizaki H: Streptococcus mutans strains harboring collagen-binding adhesin. J. Dent. Res. 83:

534-539, 2004.

- 6) Nomura R, Naka S, Nemoto H, Otsugu M, Nakamura S, Ooshima T, and Nakano K. Potential high virulence for infective endocarditis in *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins but lacking PA expression. *Arch. Oral Biol.* 58: 1627-1634, 2013.
- 7) Abranches J, Miller HJ, Martinez RA, Simpson-Haidaris JP, Burne AR, and Lemos AJ. The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect. Immun.* 79: 2277-2284, 2011.
- Nakano K, Tsuji M, Nishimura K, Nomura R, and Ooshima T. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. *Microbes Infect*.
 8: 114-121, 2006.
- 9) Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, and Iwaki M. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype *c. Infect. Immun.* 58: 289-296, 1990.
- 10) Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, Shibata Y, Haikel Y, Scholler-Guinard M, and Klein PJ. Insertional inactivation of *pac* and *rmlB* genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus*

mutans in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. *Infect. Immun.* **71**: 5169-5177, 2003.

- 11) Tokushige K, Hyogo H, Nakajima T, Ono M, Kawaguchi T, Honda K, Eguchi Y, Nozaki Y, Kawanaka M, Tanaka S, Imajo K, Sumida Y, Kamada Y, Fujii H, Suzuki Y, Kogiso T, Karino Y, Munekage K, Kuromatsu R, Oeda S, Yanase M, Mori K, Ogawa Y, Seko Y, Takehara T, Itoh Y, Nakajima A, Kanemasa K, Nishino K, Masaki N, Takahashi H, Seike M, Torimura T, Saibara T, Toyota J, Chayama K, and Hashimoto E. Hepatocellular carcinoma in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease: multicenter survey. *J. Gastroenterol.* 51: 586-596, 2016.
- Seto WK, and Yuen MF. Nonalcoholic fatty liver disease in Asia: emerging perspectives. J. Gastroenterol. 52: 164-174, 2017.
- 13) Ludwig J, Viggiano RT, McGill BD, and Oh JB. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* 55: 434-438, 1980.
- 14) Ascha M, Hanouneh AI, Lopez R, Tamimi AT, Feldstein FA, and Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 51: 1972-1978, 2010.

- 15) Kurose I, Higuchi H, Yonei Y, Ebinuma H, Watanabe N, Hokari R, Fukumura D, Miura S, Takaishi M, Saito H, Nakatsumi R, and Ishii H. Rat Kupffer cell-derived nitric oxide suppresses proliferation and induces apoptosis of syngeneic hepatoma cells. *Gastroenterology* **111**: 1058-1070,1996.
- 16) Day CP, and James FO. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology* **114**: 842-845, 1998.
- 17) Higuchi H, Adachi M, Miura S, Gores JG, and Ishii H. The mitochondrial permeability transition contributes to acute ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* **34**: 320-328, 2001.
- 18) Tilg H, and Moschen RA. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52: 1836-1846, 2010.
- 19) Naka S, Hatakeyama R, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M, Nomura R, and Nakano K. Contributions of *Streptococcus mutans* Cnm and PA antigens to aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci. Rep.* **6**: 36886, 2016.
- 20) Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Wada K, Shinohara Y, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Kubota K, Saito S, Mizoue T, Masaki N, Nagashima Y, Terauchi Y, and Nakajima A. Long-term combination therapy of ezetimibe and acarbose for non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **51**: 548-556, 2009.

- 21) Naka S, Wato K, Hatakeyama R, Okawa R, Nomura R, and Nakano K. Longitudinal comparison of Streptococcus mutans-induced aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Oral. Microbiol.* **10**: 1428005, 2018.
- 22) Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S, Tohnai I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, Amano A, Okanoue T, Ooshima T, and Nakajima A. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. **12**: 16, 2012.
- 23) Tonomura S, Naka S, Tabata K, Hara T, Mori K, Tanaka S, Sumida Y, Kanemasa K, Nomura R, Matsumoto-Nakano M, Ihara M, Takahashi N, and Nakano K. Relationship between *Streptococcus mutans* expressing Cnm in the oral cavity and non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *BMJ Open Gastroenterol.* 6: e000329, 2019.
- 24) Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, and Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48: 195-199, 2004.
- 25) Matsumoto-Nakano M, and Kuramitsu KH. Role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. **188**: 8095-8102,

- 26) Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapirattanakul J, Nemoto H, Gronroos L, Alaluusua S, and Ooshima T. Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. J. Med. Microbiol. 58: 469-475, 2009.
- 27) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 28) Fujiwara T, Nakano K, Kawaguchi M, Ooshima T, Sobue S, Kawabata S, Nakagawa I, and Hamada S. Biochemical and genetic characterization of serologically untypable *Streptococcus mutans* strains isolated from patients with bacteremia. *Eur. J. Oral Sci.* 109: 330-334, 2001.
- 29) Nomura R, Nakano K, Naka S, Nemoto K, Masuda J, Lapirattanakul J, Alaluusua S, Matsumoto M, Kawabata S, and Ooshima T. Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol* 27: 308-323, 2012.
- 30) Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, and Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, *k*, in the human oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 198-202, 2004.

- 31) Mulder P, Morrison MC, Wielinga PY, Van Duyvenvoorde W, Kooistra T, and Kleemann R. Surgical removal of inflamed epididymal white adipose tissue attenuates the development of non-alcoholic steatohepatitis in obesity. *Int J Obes* (*Lond*) 40: 675-684, 2016.
- 32) Matsumoto-Nakano M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Jpn Dent Sci Rev* 54: 22-29, 2018.
- 33) Nakano K, Matsumura M, Kawaguchi M, Fujiwara T, Sobue S, Nakagawa I, Hamada S, and Ooshima T. Attenuation of glucan-binding protein C reduces the cariogenicity of *Streptococcus mutans*: analysis of strains isolated from human blood. *J. Dent. Res.*81: 376-379, 2002.
- 34) Nakano K, Nomura R, Taniguchi N, Lapirattanakul J, Kojima A, Naka S, Senawongse P, Srisatjaluk R, Gronroos L, Alaluusua S, Matsumoto M, and Ooshima T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesin. *Arch. Oral Biol.* 55: 34-39, 2010.
- 35) Naka S, Nomura Y, Takashima Y, Okawa R, Ooshima T, and Nakano K. A specific *Streptococcus mutans* strain aggravates non-alcoholic fatty liver disease. *Oral Dis*, 20: 700-706, 2014.
- 36) Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H,

Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, and Nakajima A. Type IV collagen 7s domain is and independent clinical marker of the severity of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis before the cirrhotic stage. *J. Gastroenterol.* **42**: 375-381, 2007.

- 37) Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Yamaguchi K, Ono M, Fuji H, Eguchi Y, Suzuki Y, Imai S, Kanemasa K, Fujita K, Chayama K, Yasui K, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Okanoue T, and Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD): A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* 46: 257-268, 2010.
- 38) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, and Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 79-83, 1999.
- 39) Fruebis J, Tsao T, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson M, Yen F, Bihain B, and Lodish H. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 2005-2010, 2001.

- 40) Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, and Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ ACRP30. *Nat. Med.*8: 731-737, 2002.
- 41) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, and Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8: 1288-1295, 2002.
- 42) Nakamura Y, Sekikawa A, Kadowaki T, Kadota A, Kadowaki S, Maegawa H, Kita Y, Evans WR, Edmundowicz D, Curb DJ, and Ueshima H. Visceral and subcutaneous adiposity and adiponectin in middle-aged Japanese men: The ERA JUMP study. *Obesity* **17**: 1269-1273, 2009.
- 43) Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner A, Tomiyama Y, and Matsuzawa Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively, regulates the growth of

myelomonocytic progenitors and the functions. Blood 96: 1723-1732, 2000.

- 44) Sato M, Bremner I. Oxigen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.*14: 325-337, 1993.
- 45) Keller P, Mφller K, Krabbe K, and Pedersen B. Circulating adiponectin levels during human endotoxaemia. *Clin. Exp. Immunol.* **134**: 107-110, 2003.
- 46) Hahn E, Wick G, Pencev D, and Timpl R. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* 21: 63-71, 1980.
- 47) Senoo H, Hata R, Nagai Y, and Wake K. Stellate cells (vitamin A-storing cells) are the primary site of collagen synthesis in non-parenchymal cells in the liver. *Biomed. Res.* 5: 441-458, 1984.
- 48) Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, and Kawasaki H. Serum type III procollagen peptide, type IV collagen 7S domain, central triple-helix of type IV collagen and tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic viral liver disease: Relationship to liver histology. *Hepatology* 20: 780-787, 1994.
- 49) Bilzer M, Roggel F, and Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 26: 1175-1186, 2006.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 小児歯科学分野 (指導:仲野道代教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した.

* 第68回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会(2020年11

月, Web 開催)

- * 第 59 回日本小児歯科学会大会(2021 年 6 月, Web 開催)
- * 第 69 回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会(2021 年 10

月, Web 開催)

図の説明

図 1. マウス NASH モデルを用いた本研究のプロトコール

6週齢のC57BL/6Jマウスに高脂肪食飼料を摂取させ,実験開始4週後にS.mutans を頸静脈より投与した.実験開始16週後に屠殺を行い,サンプル採取を行った.

図 2. NAFLD 患者群における S. mutans の検出率の比較

NASH 患者および NAFL 患者における S. mutans の検出率に有意差はなかった.

(Fisher's PLSD)

図 3. NAFLD 患者群における *S. mutans* の Cnm および PA 陽性率の比較 NASH 患者群において, Cnm および PA を保有する *S. mutans* の割合に有意差が あった. (**P* < 0.05, Fisher's PLSD)

図 4. NAFLD 患者における Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の I 型コラーゲン結合能
Cnm⁺/PA⁺ S. mutans を陽性群, その他の S. mutans を陰性群として両群間で有意
差検定を行った. NASH 患者群で, 陽性群は陰性群と比較して I 型コラーゲンに
対して有意に高い結合能を示した. (*** P < 0.001, Mann-Whitney U 検定, 中央
値) (# 各回における TW871 のコラーゲン結合率を 100%とした相対値で示し

た.)

図 5. NAFLD 患者における Cnm⁺/PA⁺ S. mutans のIV型コラーゲン結合能
 NASH 患者群で,陽性群は陰性群と比較してIV型コラーゲンに対して有意に高
 い結合能を示した.(*** P < 0.001, Mann-Whitney U 検定,中央値)(# 各回に
 おける TW871 のコラーゲン結合率を 100%とした相対値で示した.)

図 6. NAFLD 患者群における Cnm⁺/PA⁺ S. mutans のコラーゲン結合能の比較 Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の I 型コラーゲンに対する結合能およびIV型コラーゲンに対 する結合能との間で有意差検定を行った. NASH 患者群および NAFL 患者群に おいて, I 型コラーゲンと比較してIV型コラーゲンに対して有意に高い結合能 を示した. (* P < 0.05, *** P < 0.001, Mann-Whitney U 検定,中央値) (# 各回 における TW871 のコラーゲン結合率を 100%とした相対値で示した.)

図 7. 各患者群における cnm および pac の発現量の比較

NASH 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の cnm および pac の発現量の中 央値と, NAFL 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ S. mutans の cnm および pac の発現 量の中央値との間で有意差検定を行った. NASH 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans*の *cnm*の発現量は, NAFL 患者と比較して有意な差はなかった. 一方, *pac*の発現量は, NAFL 患者と比較して有意に高い値を示した. (**P*<0.05, Mann-Whitney U 検定, 中央値)(# 各回における TW871 の発現量を1とした相対値で 示した.)

図 8. 各患者群における pac の発現量の比較

NAFLD 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* の *pac* の発現量の中央値と, Cnm ⁻/PA⁺ *S. mutans* の *pac* の発現量の中央値との間で有意差検定を行った. NASH 患 者から分離された Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* の *pac* の発現量は, Cnm を保有していな い Cnm⁻/PA⁺ *S. mutans* と比較して有意に高い値を示した. 一方, NAFL 患者群で は有意な差はなかった. (* *P* < 0.05, Mann-Whitney U 検定, 中央値)(# 各回に おける TW871 の発現量を 1 とした相対値で示した.)

図 9. 実験開始 16 週後における屠殺時のマウス体格と内臓脂肪 各群のマウスの体格および内臓脂肪に差異はなく,体重および内臓脂肪重量に も有意差はなかった.(A)マウス体格,(B)内臓脂肪,(C)体重,(D)内臓脂肪 重量 図 10. 実験開始 16 週後における屠殺時のマウス肝臓

TW871 投与群および KT3 投与群の肝臓は,菌非投与群の肝臓と比較して明らか に肥大していた.また,TW871 投与群および KT3 株投与群の肝重量は菌非投与 群と比較して有意に高い値を示した.(a)マウス肝臓,(b) 肝重量,(c) 肝重量 /体重比(**P*<0.05, ANOVA の Tukey 検定)(平均値±標準誤差)

図 11. 実験開始 16 週後における血液検査所見

TW871株投与群およびKT3株投与群は菌非投与群と比較して,T-CHO,F-CHO,

LDL-C, HDL-C, ChEの脂質代謝異常に関する項目の値が有意に上昇していた.

(**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, ANOVA の Tukey 検定)(平均値±標
 準誤差)

図 12. 実験開始 16 週後における血液検査所見

TW871株投与群およびKT3株投与群は菌非投与群と比較して,AST,ALT,ALP,
LAP, Feの肝機能障害に関する項目の値が有意に上昇していた.(* P < 0.05,
** P < 0.01, *** P < 0.001, ANOVAのTukey 検定)(平均値±標準誤差)

図 13. 実験開始 16 週後のマウスより摘出した肝臓組織の Hematoxylin-Eosin

(HE) 染色像

HE 染色にて各群における肝臓組織の脂肪の蓄積および炎症性変化の有無を評価した. TW871 株投与群および KT3 株投与群のマウスより摘出した肝臓組織では、非投与群と比較して大滴性の脂肪沈着と局所の炎症性細胞の浸潤が顕著であった. 一方、非投与群では脂肪沈着はあったものの、小滴性の脂肪沈着であった.

図 14. 実験開始 16 週後のマウスより摘出した肝臓組織の Masson's-trichrome (MT) 染色像

MT 染色にて各群の肝臓組織における線維化の有無を評価した. TW871 株投与 群および KT3 株投与群の肝臓組織像では, 肝実質の局所において青く染色され た線維化像が観察された. 一方で, 非投与群ではこれらの変化はなかった. 黒矢 印:線維化