

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究（A）
研究期間：2006年度～2008年度
課題番号：18689050
研究課題名（和文） 口腔レンサ球菌による感染性心内膜炎発症に関わる病原因子の分子生物学的解析
研究課題名（英文） Molecular biological analyses of virulence factors for infective endocarditis caused by oral streptococci
研究代表者
仲野 和彦（NAKANO KAZUHIKO）
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：00379083

研究成果の概要：口腔レンサ球菌は感染性心内膜炎の主要な原因細菌として知られている。感染性心内膜炎は歯科治療に関連して発症することが多いとされ、死に至ることもある全身疾患であるため、歯科領域での本疾患への関心度は極めて高い。本研究では、感染性心内膜炎患者より摘出された心臓弁に対して分子生物学的解析を行った。その結果、う蝕原性細菌であるミュータンスレンサ球菌が高頻度に検出されるとともに、口腔内では検出率の低い血清型が多く認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2007年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：口腔レンサ球菌，感染性心内膜炎，分子生物学，心臓弁，歯垢

1. 研究開始当初の背景

口腔レンサ球菌は感染性心内膜炎 (Infective endocarditis; IE) の主要な原因細菌として知られ、約 50 % の IE 症例に関連している。IE は歯科治療に関連して発症することが多く、死に至ることもある全身

疾患であるため、歯科領域での本疾患への関心度は極めて高い。日常歯科臨床において、心室中隔欠損など先天性心疾患を有する患者や、人工弁置換術を受けた患者などの IE 発症リスクが高いとされる患者に対しては、歯科的処置により起炎菌が血中に侵入し IE

を引き起こすことを予防するために、抗生物質の術前投与が行われている。

小児期の IE は予防法、抗生物質療法の発達にも関わらず、依然一定の頻度で認められ、その罹患率、死亡率も高いとされている。小児歯科領域において、先天性心疾患を有する小児の歯科治療を行うことは多く、IE 発症予防は小児歯科医にとって、常に念頭にある事項の一つである。現時点ではその予防法は欧米のガイドラインに準拠しており、体重を基準に服用する抗生物質の量が決定されるが、術前に服用しなければならない量はかなり多く、小児期の患者にとって歯科治療を受ける際の負担となっていることは否めない。

2. 研究の目的

これまでは IE 発症に関しては基礎となる心疾患とリスクとなる医科的・歯科的処置のみ大きく取り上げられてきた。しかし、日常臨床から考えられることは、術前投与を行われていないが IE 発症に至らない症例がある割合で存在し、起炎菌側にも発症リスクの高い株や低い株あるいはビルレンスのない株などが存在するのではないかということであり、それも IE 発症予防のための基準の一部として考慮されるべきではないかということである。本研究の目的は、IE をはじめとした各種循環器疾患病変部組織における口腔細菌の存在を検討し、病原性と関連する菌種や菌株の分析を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 循環器疾患病変部検体およびデンタルプラーク検体における口腔細菌の分布の検討

①対象: 2004 年 12 月～2007 年 11 月に大阪労災病院心臓血管外科において施された手術において摘出された心臓弁 117 検体お

よび大動脈瘤 86 検体を対象とした。さらに、感染性心内膜炎 12 症例から得られた検体も対象とした。また、手術を受けた患者のデンタルプラーク 58 検体も分析対象とした。

② 方法: 各検体から細菌 DNA を抽出し、菌種特異的プライマーを用いた PCR 法による検出を行った。検出対象は、口腔レンサ球菌 6 菌種 (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii*) および歯周病原性細菌 6 菌種 (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campyrobacter rectus*) とした。さらに、循環器疾患病変部およびデンタルプラークの両方の検体が得られた 58 症例に対しては、Broad-range PCR 法によって増幅した 16S rRNA 断片の遺伝子配列を決定した。その後、データベース上の既知の配列との相同性 99% 以上をもって菌種の特定を行った。

(2) 循環器疾患病変部検体およびデンタルプラーク検体における *S. mutans* の血清型の特定

①対象: 上記の検体の中で *S. mutans* に対して陽性反応を認めた検体 (心臓弁: 51 症例, 大動脈瘤: 54 症例, デンタルプラーク: 50 症例) を対象とした。

②方法: 各サンプルから抽出した細菌 DNA を用いて、血清型特異プライマー (*c/e/f/k*) を用いた PCR 法により血清型の特定を行った。

(3) 循環器疾患病変部組織から分離された *S. mutans* の性状についての検討

①対象: 感染性心内膜炎の診断のもと心臓弁置換術を施された 61 歳の男性を対象とした。

②方法: 弁置換術の際に得られた人工弁検体

とデンタルプラーク検体とを *S. mutans* の選択培地に播種し 2 日間培養した。分離された菌株の表層タンパク抗原の発現については、グルコシルトランスフェラーゼ (GTF) などの主要な表層タンパクに対する抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法により検討を行った。さらに、3 種の GTF をコードする遺伝子 *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* の全配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 各種口腔細菌の分布

心臓弁、大動脈瘤および感染性心内膜炎から得られた検体において *S. mutans* が最大の検出率であり、*A. actinomycetemcomitans* が次に多く検出された。心臓弁検体、大動脈瘤検体に対する解剖学的部位ごとの検出頻度には有意差が認められなかった。また Broad-range PCR 法を用いて分析した結果も、循環器疾患変部組織では、*S. mutans* の割合が最も多く認められた。一方、デンタルプラークにおいては歯周病原性細菌種の割合が最も多く、*S. mutans* の検出頻度は低い頻度でしか検出されなかった。

(2) *S. mutans* 血清型の分布

循環器疾患患者より得られた病変部の検体もデンタルプラーク検体においても、健常人の口腔における分布とは明らかに異なり、*c* 型以外のものが多く認められた。さらに、従来の分類 (*c/e/f/k*) に当てはまらない検体も存在していた。

(3) 感染弁検体から分離された *S. mutans* の性状

デンタルプラークから分離した 25 株は全て *S. mutans* に典型的なラフなコロニー形態をしていた。一方、心臓弁から分離された 7 株はスムーズな形態を呈し、遺伝子操作によって GTF を欠失させた株のコロニー形態

と類似していた。ウェスタンブロッティング法で確認した結果、心臓弁から分離された株は 3 種の GTF の発現が認められないことが明らかになった。その株の 3 種の *gtf* の遺伝子の全配列を決定した結果、*gtfB*, *C* 遺伝子の中央部にエリスロマイシン耐性遺伝子が、また *gtfD* 遺伝子の中央部にはスペクチノマイシン耐性遺伝子が存在していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapirattanakul J, Nemoto H, Grönroos L, Alaluusua S, Ooshima T. Molecular and clinical analyses of gene encoding collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol* (in press) (査読有)
- ② Miyamoto E, Nakano K, Fujita K, Nomura R, Okawa R, Matsumoto M, Ooshima T. Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva specimens from Japanese subjects. *Arch Oral Biol* (in press) (査読有)
- ③ Lapirattanakul J, Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Kojima A, Senawongse P, Srisatjaluk R, Ooshima T. Detection of serotype *k* *Streptococcus mutans* in Thai subjects. *Oral Microbiol Immunol* (in press) (査読有)
- ④ Inaba H, Hokamura K, Nakano K, Nomura R, Katayama K, Nakajima A, Yoshioka H, Taniguchi K, Kamisaki Y, Ooshima T, Umemura K, Murad F, Wada K, Amano A.

- Upregulation of S100 calcium-binding protein A9 is required for induction of human smooth muscle cell proliferation by a periodontal pathogen. *FEBS Lett* 583, 128-134, 2009. (査読有)
- ⑤ Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol* 24, 64-68, 2009. (査読有)
- ⑥ Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Mukai T, Hata H, Toda K, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Molecular analyses of bacterial DNA in extirpated heart valves from infective endocarditis patients. *Oral Microbiol Immunol* 24, 43-49, 2009. (査読有)
- ⑦ Lapidattanakul J, Nakano K, Nomura R, Hamada S, Nakagawa I, Ooshima T. Demonstration of mother to child transmission of *Streptococcus mutans* using multilocus sequence typing. *Caries Res* 42, 466-474, 2008. (査読有)
- ⑧ Nakano K, Miyamoto E, Tamura K, Nemoto H, Fujita K, Nomura R, Ooshima T. Distribution of 10 periodontal bacterial species in children and adolescents over 7-year period. *Oral Dis* 14, 658-664, 2008. (査読有)
- ⑨ Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Lapidattanakul J, Taniguchi N, Grönroos L, Alaluusua S, Ooshima T. Protein antigen in serotype *k* *Streptococcus mutans* clinical isolates. *J Dent Res* 87, 964-968, 2008. (査読有)
- ⑩ Nemoto H, Nakano K, Nomura R, Ooshima T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from heart valve of infective endocarditis patient. *J Med Microbiol* 57, 891-895, 2008. (査読有)
- ⑪ Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeuchi H, Yoshioka H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol* 23, 170-172, 2008. (査読有)
- ⑫ Inaba H, Nakano K, Kato T, Nomura R, Kawai S, Kuboniwa M, Ishihara K, Ooshima T, Amano A. Heterogenic virulence and related factors among clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae. *Oral Microbiol Immunol* 23, 29-35, 2008. (査読有)
- ⑬ Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Mukai T, Yoshioka H, Shudo Y, Hata H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of novel serotype *k* *Streptococcus mutans* in infective endocarditis patients. *J Med Microbiol* 56, 1413-1415, 2007. (査読有)
- ⑭ Nomura R, Hamada M, Nakano K, Nemoto H, Fujimoto K, Ooshima T. Repeated bacteremia caused by *Streptococcus mutans* in patient complicated with Sjögren's syndrome. *J Med Microbiol* 56, 988-992, 2007. (査読有)
- ⑮ Nakano K, Lapidattanakul J, Nomura R, Nemoto H, Alaluusua S, Grönroos L, Vaara M, Hamada S, Ooshima T, Nakagawa I. *Streptococcus mutans* exhibits clonal variation as revealed by

- multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 45, 2616-2625, 2007. (査読有)
- ⑩ Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Homma H, Yoshioka H, Shudo Y, Hata H, Toda K, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Serotype distribution of *Streptococcus mutans*, a pathogen of dental caries, in cardiovascular specimens from Japanese patients. *J Med Microbiol* 56, 551-556, 2007. (査読有)
- ⑪ Kato T, Kawai S, Nakano K, Inaba H, Kuboniwa M, Nakagawa I, Tsuda K, Omori H, Ooshima T, Yoshimori T, Amano A. Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. *Cell Microbiol* 9, 753-765, 2007. (査読有)
- ⑫ Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Tamura K, Miyamoto E, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection and serotype distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol* 22, 136-139, 2007. (査読有)
- ⑬ Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, Matsue H, Takahashi T, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol* 44, 3313-3317, 2006. (査読有)
- ⑭ Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, Taniguchi K, Takeda M, Yoshioka H, Amano A, Ooshima T. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *J Med Microbiol* 55, 1135-1140, 2006. (査読有)
- [学会発表] (計20件)
- ① 谷口奈穂, 野村良太, 仲野和彦, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* 臨床分離株におけるコラーゲン結合能に関する分析 第27回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2008.10.19, 大阪.
- ② 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 心臓血管疾患病変部組織において検出される *Streptococcus mutans* の分子生物学的解析 第27回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2008.10.19, 大阪.
- ③ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapirattanakul J, Nemoto H, Ooshima T. Clinical analysis of gene encoding collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. 86th International Association of Dental Research, 2008.7.3, Toronto, Canada.
- ④ 谷口奈穂, 野村良太, 仲野和彦, 大嶋 隆 唾液サンプル中の *S. mutans* *cnm* 遺伝子の保有と関連する臨床所見の検討 第46回日本小児歯科学会大会, 2008.6.12, さいたま.
- ⑤ 野村良太, 仲野和彦, 根本浩利, 大嶋 隆 感染性心内膜炎患者心臓弁に存在する口腔細菌に関する分子生物学的解析 第46回日本小児歯科学会大会, 2008.6.12, さいたま.
- ⑥ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 大動脈瘤組織における *Streptococcus mutans* の検出 第46回日本小児歯科学会大会, 2008.6.12, さいたま.
- ⑦ 丸山史人, 仲野和彦, 大野雅幸, 桜井敦

- 朗, 野澤孝志, 大嶋 隆, 浜田茂幸, 中川一路 *Streptococcus mutans* ゲノム解析に基づく種レベルでの進化機構の解析 第 2 回日本ゲノム微生物学会年会, 2008. 3. 6, 吹田.
- ⑧ 谷口奈穂, 野村良太, 仲野和彦, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* コラーゲン結合タンパク遺伝子の局在に関して 第 26 回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2007. 10. 21, 尼崎.
- ⑨ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 感染性心内膜炎患者血液より分離した *Streptococcus mutans* の由来に関して 第 26 回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2007. 10. 21, 尼崎.
- ⑩ Lapidattanakul J, Nakano K, Kawabata S, Ooshima T. *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. The 2nd Thailand-Japan joint forum on infectious diseases. 2007. 10. 8, Bangkok, Thailand.
- ⑪ 野村良太, 仲野和彦, 根本浩利, 大嶋 隆 菌血症患者血液より分離した *Streptococcus mutans* の性状の解析 第 45 回日本小児歯科学会大会, 2007. 7. 19, 東京.
- ⑫ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* 臨床分離株における表層タンパク発現状態の解析 第 45 回日本小児歯科学会大会, 2007. 7. 19, 東京.
- ⑬ Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Ooshima T. Characterization of surface protein antigen in serotype *k* *Streptococcus mutans* clinical isolates. 54th ORCA congress, 2007. 7. 4, Helsingor, Denmark.
- ⑭ Lapidattanakul J, 仲野和彦, 中川一路, 浜田茂幸, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* における Multilocus sequence typing 法の確立 第 80 回日本細菌学会総会, 2007. 3. 26, 大阪.
- ⑮ Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Ooshima T. Serotype distribution of *Streptococcus mutans* in cardiovascular specimens. 85th International Association of Dental Research, 2007. 3. 21, New Orleans, USA.
- ⑯ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 心臓血管病巣からの口腔細菌の検出 第 25 回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2006. 11. 9, 大阪.
- ⑰ 仲野和彦, 野村良太, 根本浩利, 大嶋 隆 感染性心内膜炎患者摘出弁における新規血清型 *S. mutans* の検出 第 25 回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2006. 11. 9, 大阪
- ⑱ 稲葉裕明, 仲野和彦, 大嶋 隆, 天野敦雄 心臓血管疾患病変部組織からの口腔細菌種の検出 第 48 回歯科基礎医学会学術大会, 2006. 9. 22, 横浜.
- ⑲ Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Ooshima T. Comparison of *Streptococcus mutans* from dental plaque and heart valve. 84th International Association of Dental Research, 2006. 6. 30, Brisbane, Australia.
- ⑳ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 感染性心内膜炎患者プラークおよび感染弁から分離した *Streptococcus mutans* の分子生物学的性状の検討 第 44 回日本小児歯科学会, 2006. 5. 25, 松本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲野 和彦 (NAKANO KAZUHIKO)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 00379083