

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09613

研究課題名（和文）Rothia mucilaginosa感染症の病因解明と感染コントロール法の確立

研究課題名（英文）Study on pathogenicity of Rothia mucilaginosa and development of the anti-infective therapy

研究代表者

前田 博史（Maeda, Hiroshi）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00274001

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：日和見感染細菌であるRothia種（Rothia mucilaginosa, Rothia aeria, Rothia dentocariosa）の根管分布状況を調べた。その結果、Rothia種が日本人の根管に高頻度に分布していることが明らかとなった。また、これらの細菌種が根管に存在する場合、根尖部に炎症が起こりやすいことが分かった。菌体成分は高いマトリックスメタロプロテアーゼ活性を示し、Rothiaの病原因子となっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内に生息するRothia種は宿主の抵抗性が低下した場合に重篤な全身感染症を引き起こす場合がある。本細菌の口腔内分布を調べることは感染対策上重要である。また、病原因子を解明することは、将来的な診断と治療法の開発に結び付く可能性がある。根管は歯槽骨内と直結する空間であり、本研究結果から根管がRothiaの全身への感染ルートとなる可能性が示された。今後、根管内のRothiaへの感染対策を実施することで、全身感染症の発症を抑制できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Distribution of Rothia species (Rothia mucilaginosa, Rothia aeria and Rothia dentocariosa), known to be opportunistic pathogens, in root canals was investigated. The Rothia spp. were frequently detected in root canals among Japanese population. The presence of Rothia spp. showed correlations with the inflammatory conditions at the apical lesions. The cell components of Rothia demonstrated high level of matrix metalloprotease activity as a potential virulence factor.

研究分野：歯内療法学

キーワード：Rothia 日和見感染 根管 易感染性宿主

1. 研究開始当初の背景

Rothia 種はグラム陽性の口腔常在菌の一種であり、その病原性は非常に弱いものと考えられていた。このため、病原因子については、これまでほとんど明らかにされていない。近年、この細菌種が造血幹細胞移植患者の菌血症、敗血症、感染性心内膜炎、髄膜炎、肺炎、あるいは眼内炎など、幅広い領域で重篤な感染症の原因となることが数多く報告されるようになった。これらの疾患は、gut translocation、カテーテル挿入、あるいは粘膜病変からの感染に起因することが示唆されているが、感染経路の詳細は不明である。

感染根管は口腔内の微生物が根管に定着したもので、根尖孔を通して歯槽骨へ細菌を供給し、根尖性歯周炎を引き起こすものとなる。*R. mucilaginosa* は、難治性の根尖性歯周炎と関連することが報告されており、感染根管が本菌による全身感染症の感染巣となる可能性は非常に高い。しかしながら、感染根管が *Rothia* 種の感染巣となり得る事は広く認識されておらず、そのリスクを評価し、対処方法を検討していく必要がある。

2. 研究の目的

Rothia の根管内分布状況を調べ、感染巣としてのリスクを評価する。また、将来的な治療法の開発をめざして病原因子を解明する。

3. 研究の方法

(1) *Rothia* の根管内分布

被験者ならびに被験歯

大阪歯科大学附属病院歯内治療科を受診した満 20 歳以上の患者で、本研究の趣旨に同意が得られた患者 200 名を対象とした。被験歯には、感染根管治療を必要とする歯（一次感染 92 歯、二次感染 108 歯）を、各被験者から 1 歯のみ選択した。本研究は倫理委員会の承認（大歯医倫 第 110972 号）を得て行った。

根管細菌サンプルの採取

根管細菌サンプルの採取は、感染根管治療開始時に行った。開始時にはラバーダム防湿を行い、歯冠部をポピドンヨードで消毒した。髓室開拓後、オリジナルの根管径に一致する号数の K-ファイルを挿入し、根管壁の削片、ならびに根管内容を掻き出し、PBS (-) に懸濁して、根管細菌サンプルとした。

DNA 抽出操作

採取したサンプルを遠心分離して、沈渣に InstaGene matrix (Bio-Red) を加えた。56℃ で 30 分インキュベートし、その後 100℃ で 8 分インキュベートした後、再度遠心分離を行い、得られた上清を遺伝子抽出液として細菌検査 (*Rothia* の検出) に使用した。

Rothia の検出

遺伝子抽出液を用いて *Rothia* 3 菌種 (*Rothia mucilaginosa*, *Rothia aeria*, *Rothia dentocariosa*) の検出を行った。検出法には Tuzukibashi らの記載 (journal of microbiological methods, 2017) に基づいた、PCR 法を応用した。

病態との関連性

二乗検定を用い、*Rothia* 3 菌種の根管内分布と根尖性歯周炎の病態 (根尖部のエックス線透過像、自発痛、打診痛、瘻孔) の関連性を評価した。

(2) 根管内 *Rothia* の定量解析

16S rRNA 遺伝子を標的とし、細菌種共通のプライマーを使用したリアルタイム PCR 法によって根管内の総細菌数を算出した。同様に *R. mucilaginosa* に特異的な配列をもった PCR プライマーを使用して、菌数を算出した。

(3) マトリックスメタロプロテアーゼ活性の測定

SensoLyte(R) 520 Generic MMP Activity Kit *Fluorimetric* (Anaspec, Inc.) を使用し、超音波破碎した *R. mucilaginosa* 菌体のマトリックスメタロプロテアーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) *R. mucilaginosa* は 24.5% の割合で、*R. aeria* は 47.5% の割合で、そして *R. dentocariosa* は 27.5% の割合で根管内から検出された。根管の 67% から 3 菌種の中のいずれかの *Rothia* 種が検出され、本菌種が比較的高頻度に根管内に分布していることが分かった (表 1)。

表 1 : 根管からの *Rothia* の検出頻度

	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. aeria</i>	<i>R. dentocariosa</i>	Including at least one <i>Rothia</i> spp.
primary infection (n = 92)	24 (26.1%)	43 (46.7%)	24 (26.1%)	61 (66.3%)
secondary infection (n = 108)	25 (23.1%)	52 (48.1%)	31 (28.7%)	74 (68.5%)
Total (n = 200)	49 (24.5%)	95 (47.5%)	55 (27.5%)	134 (67.0%)

(Teramoto et al., WJARR, 2019)

(2) *R. mucilaginosa* の検出頻度は歯肉腫脹が存在する場合に有意に高い結果となった (42.9%; $P=0.042$)。また、*R. aeria* の検出頻度は根尖部にエックス線透過像を認めた場合 (58.1%; $P=0.001$) ならびに打診痛を認めた場合 (56.7%; $P=0.044$) に有意に高い結果となった (表 2)。これらの結果から、*Rothia* が根尖性歯周炎の病態に関与している可能性が示唆された。

表 2 : 根管内 *Rothia* の分布と臨床所見

	Total sample (n=200)	Radio-lucency (n=117)	Swelling (n=21)	Percussion pain (n=67)	Spontaneous pain (n=19)	Sinus tract (n=39)	Cases including at least one finding (n=141)
<i>R. mucilaginosa</i>	49 (24.5%)	33 (28.2%)	9* (42.9%)	19 (28.4%)	5 (26.3%)	13 (33.3%)	39 (27.7%)
<i>R. aeria</i>	95 (47.5%)	68* (58.1%)	13 (61.9%)	38* (56.7%)	9 (47.4%)	21 (53.8%)	77* (54.6%)
<i>R. dentocariosa</i>	55 (27.5%)	32 (27.4%)	7 (33.3%)	19 (28.4%)	3 (15.8%)	7 (17.9%)	37 (26.2%)

(Teramoto et al., WJARR, 2019)

(3) 総菌数に占める *R. mucilaginosa* の割合は 0.04% から 91.8% の範囲であった。また全体の約 2 割のサンプルにおいて *R. mucilaginosa* は総菌数の 20% 以上の割合を占めていた (表 3)。感染根管によっては、*Rothia* が根管細菌叢の主要な細菌種になることが明らかになった。

表 3 : 根管内総菌数に占める *R. mucilaginosa* の割合

	< 1%	1% – less than 5%	5% – less than 10%	10% – less than 15%	15% – less than 20%	20% <
Subject number (%) n=49	16 (32.7)	14 (28.6)	3 (6.1)	4 (8.2)	2 (4.1)	10 (20.4)

(Teramoto et al., WJARR, 2019)

(4) *R. mucilaginosa* のマトリックスメタロプロテアーゼ活性を他の口腔内細菌種と比較した。その結果、*R. mucilaginosa* は非常に高いマトリックスメタロプロテアーゼ活性を有していることが明らかとなり、本菌の病原因子として機能している可能性が高いことが示唆された (図 1)。

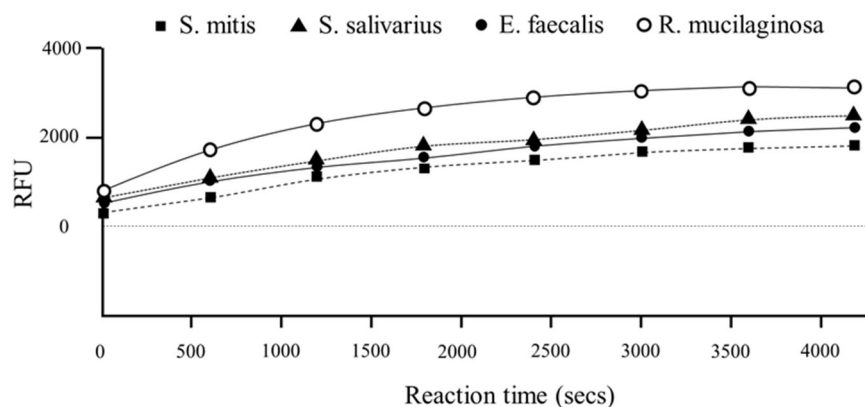


図 1 . *R. mucilaginosa* のマトリックスメタロプロテアーゼ活性 (Aso et al., WJARR, 2020) *R. mucilaginosa* を超音波破碎し、マトリックスメタロプロテアーゼ活性を測定した。*Enterococcus faecalis* は根尖性歯周炎、そして全身感染症の原因細菌として広く知られており、

マトリックスメタロプロテアーゼ活性がその病原因子として報告されている。*R. mucilaginosa* は *E. faecalis* よりも強いマトリックスメタロプロテアーゼ活性を示した。この性状が *R. mucilaginosa* 感染症の病態に関与している可能性が高く、マトリックスメタロプロテアーゼとその関連分子が将来的な病態コントロールのための標的分子候補として有力であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Teramoto Satoshi, Maeda Hiroshi, Tsuji Norimasa, Ikenaga Hideaki, Yoshikawa Masataka	4. 巻 4
2. 論文標題 Distribution of Rothia species in root canals in a Japanese population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Advanced Research and Reviews	6. 最初と最後の頁 20-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.30574/wjarr.2019.4.2.0095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sugimoto S, Maeda H, Kitamatsu M, Nishikawa I, Shida M	4. 巻 43
2. 論文標題 Selective growth inhibition of Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans by antisense peptide nucleic acids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular probes	6. 最初と最後の頁 45-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mcp.2018.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiroaki Aso, Hiroshi Maeda, Takayuki Nambu, Toshinori Okinaga, Muneyasu Shida	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of MMP-like protein from Streptococcus mitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Advanced Research and Reviews	6. 最初と最後の頁 154-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.30574/wjarr.2020.8.3.0473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hideaki Ikenaga, Hiroshi Maeda, Yuki Hirakawa, Yuki Aso, Norimasa Tsuji, Ikuo Nishikawa, Sadaomi Sugimoto, Ayano Miyamoto, Takeshi Inamoto, Hitomi Nakama, Muneyasu Shida and Masataka Yoshikawa	4. 巻 54
2. 論文標題 Rapid and simple detection of vanA and vanB by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 183-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18905/jodu.54.2_183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺本賢史, 前田博史, 好川正孝, 池永英彰, 辻 則正
2. 発表標題 日本人の感染根管におけるRothia菌種の分布状況
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年度秋季学術大会（第151回）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 麻生由樹, 至田宗泰, 西川郁夫, 池永英彰, 稲本雄之, 辻 則正, 仲間ひとみ, 杉本貞臣, 麻生浩章, 前田博史
2. 発表標題 日本人の感染根管におけるRothia菌種の分布調査ならびにR. mucilaginosaeの定量検出
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会（第152回）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	辻 則正 (Tsuji Norimasa) (30454565)	大阪歯科大学・歯学部・助教 (34408)	
研究分担者	高柴 正悟 (Takashiba Shogo) (50226768)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	曽我 賢彦 (Soga Yoshihiko) (70509489)	岡山大学・大学病院・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------