

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19209063

研究課題名(和文) う蝕原性細菌における循環器疾患に対する病原因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of virulence factors in cariogenic bacteria for cardiovascular diseases

研究代表者

大嶋 隆 (OOSHIMA TAKASHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：80116003

研究成果の概要（和文）：う蝕（むし歯）の原因細菌である *Streptococcus mutans* は、血液中に侵入し病原性を呈することがあることが知られている。血清型 *k* 型に属する株は、口腔内では非常にマイナーな存在ではあるが、主要な菌体表層タンパク抗原が欠落しているものが多く、抗原性の低下が生じることで、血液中に長期に存在できる性状を持っていることが示された。また、血清型 *k* 型に属する株では、コラーゲンへの結合能を持つ株が多く存在するため、コラーゲン組織の露出している血管内皮に対して、高い病原性を発揮する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： *Streptococcus mutans* is known to be a major cariogenic bacterial species that may also show virulence in blood. Serotype *k* strains, a minor serotype present in the oral cavity, may show higher levels of virulence in blood, because of a longer duration of bacteremia due to lower antigenicity derived from defects of major cell surface antigens. In addition, the higher rate of the organisms with collagen-binding properties identified in this strain may also be associated with virulence toward blood vessel endothelia with exposed internal collagen tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
2008年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2009年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
総計	38,100,000	11,430,000	49,530,000

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：*Streptococcus mutans*, う蝕, 全身疾患, 循環器疾患, コラーゲン結合タンパク, 循環器疾患, 血清型

1. 研究開始当初の背景

う蝕と歯周病は、歯科における重要な二大疾患である。最近、歯周病と全身疾患との関連が取りざたされており、歯周病原性細菌が

循環器系に及ぼす様々な影響が検討されている。一方で、う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* に関しては、感染性心内膜炎の起炎菌となり得ることは古くから知られている

が、その他の全身疾患との関連はあまり取り上げられていない。

これまでに、抜歯後菌血症や感染性心内膜炎を呈した患者の血液中から分離した *S. mutans* 菌株の表層構造に関して様々な分子生物学的解析を行ってきた。その結果、口腔内に存在する菌株と比較して、血液中から分離される株では、タンパク抗原や多糖抗原に変異が生じている割合が高いことが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点に関して検討したいと考えている。

- (1)心臓血管外科手術時に摘出された検体と同患者からのデンタルプラーク検体に存在する口腔細菌種の分析
- (2) *In vitro* 実験系における口腔細菌の心臓血管系への病原性の解析
- (3)心臓血管疾患に対する高リスク菌種・菌株保有者の簡易同定法の確立
- (4) *S. mutans* 血清型 *k* 型株のゲノム解析

3. 研究の方法

- (1)心臓血管外科手術時に摘出された検体と同患者からのデンタルプラーク検体における口腔細菌の存在の分析
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 法および Broad-range PCR による増幅産物の遺伝子配列を決定することにより、各検体中に含まれる菌種の特特定を行う。また、*S. mutans* 陽性検体に対しては、血清型特異プライマーを用いた PCR 法により、各検体における *S. mutans* の血清型の特特定を行う。
- (2) *In vitro* 実験系における口腔細菌の心臓血管系への病原性の解析
ヒト多型核白血球による貪食能の検討および多血小板血漿を用いた血小板凝集能の測定を行った。また、コラーゲン結合能に関しても検討した。

(3)心臓血管疾患に対する高リスク菌株保有者の簡易同定法の確立

(2)の結果を踏まえ、高リスク菌株を推定し、それらの株に共通する遺伝子配列などを検索した。

(4) *S. mutans* 血清型 *k* 型株のゲノム解析

循環器系に対して病原性の高い可能性のある血清型 *k* 型株のうち LJ23 株について、全遺伝子配列を特定を試みた。

4. 研究成果

- (1)本研究期間を通じて約 400 症例の心臓弁および大動脈瘤検体から細菌 DNA を採取し、PCR 法によって口腔細菌の存在を分析した。その結果、う蝕原性細菌である *S. mutans* の DNA が高頻度に検出されたため、その血清型を決定すると、口腔内に高頻度に存在する *c* 型以外の血清型が多く検出された。また、心臓血管外科手術を受けた患者のデンタルプラーク中で *S. mutans* 陽性のものの血清型を特定すると、*c* 型以外の血清型が多く検出された。
- (2)感染性心内膜炎患者および抜歯後菌血液症を生じた患者の血液より分離された *S. mutans* 菌株を用いて検討を行った結果、それらの株に共通して、表層タンパク抗原に変異していることで、多型核白血球による貪食作用から逃れやすいことが明らかになった。また、これらの株では、口腔に存在する *S. mutans* 菌株の大部分では存在していないコラーゲン結合タンパクを保有している株が多いことが明らかになった。
- (3)コラーゲン結合能を有する約 50 株の *S. mutans* 菌株において、コラーゲン結合タンパクをコードする遺伝子の全配列を明らかにし、それらに共通する性状を見いだした。その配列を利用して、唾液やデンタルプラーク検体中にコラーゲン結合タンパクを有する *S. mutans* が存在するかどうかを検出できる方法を確立した。

(4)これまでに特定した *S. mutans* NN2025 株における約 200 万塩基におよぶ配列における情報をもとに, *S. mutans* LJ23 株 (*k* 型)における全遺伝子配列の決定作業がほぼ終了している. 現在, 既知のデータとの比較検討から, 血液中において病原性が高いと考えられる *k* 型株の遺伝子学的性状の分析に取り組んでいる.

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 3 2 件)

- ① Nomura R, Nakano K, Mäkelä K, Vaara M, Salo E, Alaluusua S, Ooshima T. Isolation and characterization of *Streptococcus mitis* from blood of child with osteomyelitis. *Int J Paediatr Dent* 21, 192-199, 2011. (査読有)
- ② Nakano K, Ooshima T. Common knowledge regarding prevention of infective endocarditis among general dentists in Japan. *J Cardiol* 57, 123-130, 2011. (査読有)
- ③ Nomura R, Naka S, Nakano K, Taniguchi N, Matsumoto M, Ooshima T. Detection of oral streptococci with collagen-binding properties in saliva specimens from mothers and their children. *Int J Paediatr Dent* 20, 254-260, 2010. (査読有)
- ④ Taniguchi N, Nakano K, Nomura R, Naka S, Kojima A, Matsumoto M, Ooshima T. Defect of glucosyltransferases reduces platelet aggregation activity of *Streptococcus mutans*: Analysis of clinical strains isolated from oral cavities. *Arch Oral Biol* 55, 410-416, 2010. (査読有)
- ⑤ Nakano K, Nomura R, Matsumoto M, Ooshima T. Cell-surface structures of

novel serotype *k* *Streptococcus mutans* strains and correlation to virulence. *J Pharmacol Sci* 113, 120-125, 2010. (査読有)

- ⑥ 仲野和彦, 大嶋 隆 口腔細菌における循環器疾患に対する病原性の追究 -*Streptococcus mutans* における研究成果を足がかりに- 小児歯科学雑誌, pp. 1-10, 48, 2010. (査読無)
- ⑦ Nakano K, Nomura R, Taniguchi N, Lapidattanakul J, Kojima A, Naka S, Senawongse P, Srisatjaluk R, Grönroos L, Alaluusua S, Matsumoto M, Ooshima T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* clinical strains with gene encoding collagen-binding adhesin. *Arch Oral Biol* 55, 34-39, 2010. (査読有)
- ⑧ Lapidattanakul 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* 24, 431-433, 2009. (査読有)
- ⑨ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapidattanakul J, Nemoto H, Grönroos L, Alaluusua S, Ooshima T. Molecular and clinical analyses of the gene encoding collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol* 58, 469-475, 2009. (査読有)
- ⑩ Nakano K, Ooshima T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol* 4, 891-902, 2009. (査読有)
- ⑪ 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)
- ⑫ 仲野和彦, 大嶋 隆 口腔細菌による歯科疾患と全身疾患 「口腔細菌の全身疾患への影響」小児歯科臨床 pp. 69-72, 14(9), 2009. (査読無)
- ⑬ 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)
- ⑭ 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)
- ⑮ 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)
- ⑯ Nemoto H, Nakano K, Nomura R, Ooshima T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from heart valve of an infective endocarditis patient. *J Med Microbiol* 57, 891-895, 2008. (査読有)
- ⑰ 仲野和彦, 大嶋 隆 口腔細菌による歯科疾患と全身疾患, 感染防止, pp. 21-30, 17(6), 2007. (査読無)
- ⑱ 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)
- ⑲ 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 revealed by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 45, 2616-2625, 2007. (査読有)
- ⑳ 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)
- [学会発表] (計63件)
- ① Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Characterization of novel collagen-binding protein of *Streptococcus mutans*. 89th IADR meeting, 2011.3.16, San Diego, USA.
- ② Nakano K, Nomura R, Taniguchi N, Wada K, Ooshima T. Relationship of *Streptococcus mutans* collagen-binding properties with cerebral hemorrhage deterioration. 89th IADR meeting, 2011.3.16, San Diego, USA.
- ③ Nemoto H, Nakano K, Masuda K, Nomura R, Ooshima T. Prevalence of amoxicillin-resistant streptococci in dental plaque of young Japanese. 89th IADR meeting, 2011.3.16, San Diego, USA.
- ④ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Wada K, Matsumoto M, Ooshima T. Contribution of collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans* to

- cause deterioration of cerebral hemorrhage. 58th ORCA congress, 2010.7.7, Montpellier, France.
- ⑤ 谷口奈穂, 仲野和彦, 野村良太, 松本道代, 大嶋 隆 マウス大脳動脈損傷モデルにおける *Streptococcus mutans* コラーゲン結合タンパクの病原性への関与 第48回日本小児歯科学会大会, 2010.5.19, 名古屋.
- ⑥ 谷口奈穂, 仲野和彦, 野村良太, 松本道代, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* 臨床分離株におけるグルコシルトランスフェラーゼの発現と血小板凝集能への関与 第28回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2009.10.18, 大阪.
- ⑦ Lapidattanakul J, Nakano K, Senawongse P, Leelataweewud P, Srisatjaluk R, Ooshima T. Genes concerning adhesion to extracellular matrix in *Streptococcus mutans* from Thai subjects. 5th International Dental Collaboration of the Mekong River Region Congress, 2009.10.14, Hanoi, Vietnam.
- ⑧ 中川一路, 仲野和彦, 川端重忠, 大嶋 隆, 浜田茂幸 *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51回日本歯科基礎医学会大会, 2009.9.10, 新潟.
- ⑨ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Kojima A, Naka S, Ooshima T. Molecular analyses of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding properties. 56th ORCA congress, 2009.7.1, Budapest, Hungary.
- ⑩ Nakano K, Taniguchi N, Kojima A, Nomura R, Wada K, Ooshima T. Presence of serotype *k* strains of *Streptococcus mutans* is a potential risk factor for cerebral hemorrhage. 56th ORCA congress, 2009.7.1, Budapest, Hungary.
- ⑪ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 心臓血管系疾患患者の病変部およびデンタルプラーク検体における口腔細菌種の検出 第47回日本小児歯科学会大会, 2009.5.14, 吹田.
- ⑫ 谷口奈穂, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 マウス大脳動脈損傷モデルにおける *S. mutans* の病原性の検討 第47回日本小児歯科学会大会, 2009.5.14, 吹田.
- ⑬ 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.
- ⑭ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 循環器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.
- ⑮ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapidattanakul 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.
- ⑯ 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, 2008.6.12, さいたま.
- ⑰ 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.
- ⑱ 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.

- ⑱ 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.

- ⑳ 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.

[図書] (計 2 件)

- ① Nakano K, Taniguchi K, Ooshima T. Oral
bacteria detected in the hearts of
patients with valvular diseases. In :
Bennington EH editor. Horizons in
World Cardiovascular Research. Vol. 2,
Nova Science Publishers, pp. 143-163,
2010.

- ② 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆
Streptococcus mutans の循環器疾患に対
する病原因子の解析 生命歯科医学の
カッティング・エッジ, pp79-89, 大阪
大学出版, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ①
名称: 高病原性口腔細菌の高感度検出法
発明者: 大嶋 隆, 仲野和彦, 野村良太, 和
田孝一郎, 梅村和夫, 外村和也
権利者: 浜松医科大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2010/054364
出願年月日: 平成 22 年 3 月 15 日
国内外の別: 海外

- ②
名称: 高病原性口腔細菌による腸炎誘発原因
分子の産生とその高感度検出法
発明者: 大嶋 隆, 仲野和彦, 野村良太, 和
田孝一郎, 梅村和夫, 外村和也
権利者: 大阪大学, 浜松医科大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-053079
出願年月日: 平成 22 年 3 月 10 日
国内外の別: 国内

- ③
名称: 高病原性口腔細菌の高感度検出法
発明者: 大嶋 隆, 仲野和彦, 野村良太, 和
田孝一郎, 梅村和夫, 外村和也
権利者: 大阪大学, 浜松医科大学
種類: 特許
番号: 特願 2009-088239
出願年月日: 平成 21 年 3 月 31 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 隆 (OOSHIMA TAKASHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 80116003

(2) 研究分担者

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

野村 良太 (NOMURA RYOTA)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 90437385

中川 一路 (NAKAGAWA ICHIRO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号: 70294113