

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19791572
研究課題名 (和文) 分子疫学的手法を用いた *S. mutans* ビルレンスの識別
研究課題名 (英文) Classification of virulence of *S. mutans* strains using molecular epidemiological approaches
研究代表者
野村 良太 (NOMURA RYOTA)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：90437385

研究成果の概要：*Streptococcus mutans* はう蝕の主要な原因細菌であるとともに感染性心内膜炎の起炎菌としても知られている。本研究では、国内外のう蝕および感染性心内膜炎患者血液より分離された *S. mutans* 菌株を用いて、分子疫学的解析法である Multi Locus Sequence Typing (MLST) 法を確立し、病原性や伝播に関する系統的解析を行った。その結果、病原性に関与する血清型や遺伝子を保有する菌株が、系統樹上のある特定の領域に集中することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

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, 臨床分離株, ハウスキーピング遺伝子, MLST 法

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus mutans はう蝕の主要な原因細菌であるとともに、感染性心内膜炎の起炎菌としても知られている。これまでに、*S. mutans* の分類法としては、血清学的分類や染色体 DNA を用いたフィンガープリント法などが用いられてきたが、これらの方法に対しては種々の問題点が指摘されてきた。

ヒトの口腔内に存在する *S. mutans* の血清型は、*c*, *e*, *f*, *k* の4種であり、一般に、日本においても欧米においても血清型 *c* の *S. mutans* が全体の約70～80%

を占めている。血清学的分類法では、血清型の種類が少なく、その多くが *c* 型に属することが分類法として用いる上での大きな問題点であった。

分子生物学的手法の発展により、菌の DNA フィンガープリンティングパターンを解析する分子疫学的手法として、パルスフィールドゲル電気泳動法やリボタイピング、AP-PCR 法などが分類法として用いられるようになった。しかし、これらの分析法は手法によって得られた分類が異なることや再現性に欠けることなどの問題点が存在していた。

近年、分子生物学的手法を応用した系統的な進化解析法として Multilocus Sequence Typing (MLST) 法が様々な菌種の分類同定法として確立されてきている。そこで、これまでの手法で指摘されてきた問題点を解決すべく、MLST 法を *S. mutans* で初めて確立するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、MLST 法を確立することで、これまでに存在していた分類法の問題点を補う新たな分類法を確立したいと考えている。また、この手法が確立すれば、世界各国で分離されたすべての *S. mutans* 臨床分離株をデータベース上の情報のみから照合・比較することが可能であり、海外で新たに発見された遺伝子型（シーケンスタイプ; ST）を有する菌株を系統樹上に追加していくことが可能である。これにより、世界の研究者の間で *S. mutans* 菌株に関する情報を共有することができ、データベースを充実させることが可能となる。

S. mutans の主要な表層タンパクであるグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) や Protein antigen (PA) がう蝕病原性に強く関与することが知られている。これらのタンパクについて、多数の臨床分離株を分析すると、その発現はバリエーションに富んでおり、このことがう蝕における病原性や多様なう蝕臨床像に関連していると考えられる。一方、*S. mutans* は、抜歯やスクーリングなどの歯科における観血処置時に血液中に侵入し、心疾患を有する患者における感染性心内膜炎をはじめとする全身疾患にも関与することが分かっている。これまでに、菌血症患者および感染性心内膜炎患者血液から分離した *S. mutans* 菌株では口腔分離株と異なる血清型パターンや表層タンパクを有することが明らかとなっている。そこで、う蝕および全身における多様な臨床像を呈する症例から菌株を分離し、MLST データと臨床像を結びつけ、その病原性との関連を識別することが可能かどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 対象

総計 101 人の国内外の歯科受診患者から、同意のもとで採取したデンタルプラークおよび唾液から *S. mutans* 菌株を分離し研究に用いた。また、菌血症と感染性心内膜炎患者血液から分離された *S. mutans* 菌株も使用した。これらについてゲノム DNA を抽出し、以下の分析を行った。

(2) ハウスキーピング遺伝子の決定

全遺伝子配列の分かっている *S. mutans* UA159 株の配列を利用して、*S. mutans* の生

命機能に必須の遺伝子である 8 つのハウスキーピング遺伝子 (*aroE*, *glk*, *gltA*, *gluA*, *lepC*, *murI*, *tkt*, *gyrA*) を選択し、これらの遺伝子をターゲットとしたプライマーの設計を行った。

(3) MLST 解析を用いた系統樹の作製

設計したプライマーと臨床分離株 101 株から抽出したゲノム DNA を用いて PCR 法により遺伝子断片を増幅し、シーケンス解析により各菌株の遺伝子配列を決定した。これらにより得られた配列から遺伝子型を決定し、MLST 解析を行うことにより系統樹を作製した。

(4) 病原性に関与する遺伝子の検討

S. mutans の病原性に関与する遺伝子のうち、象牙質や軟組織中に多く含まれる I 型コラーゲンへの結合に関与する *cnm* 遺伝子に着目し、系統樹上でのその局在について分析を行った。

(5) 母子伝播に関する分析

本学歯学部小児歯科を受診した小児患者とその母親 20 組から採取した唾液より *S. mutans* を分離した。これらの菌株からゲノム DNA を抽出し 8 つのハウスキーピング遺伝子を用いてシーケンスサンプルを作製した。これらについて MLST 解析を行うことにより、母親と子どもが有する菌の遺伝子型を比較し、双方の菌が同一由来のものであるか検討した。

4. 研究成果

(1) MLST 解析を用いた系統樹の作製

系統樹を作製した結果、臨床分離株 101 株は 92 の遺伝子型に分類された。血清学的には、*e*, *f* 型がそれぞれ特定のクラスターに集中する傾向を示した。

(2) 病原性に関する検討

I 型コラーゲンへの結合に関与する *cnm* 遺伝子を有する *S. mutans* が、ある特定のクラスターに集中する傾向が見られた。そこで、*cnm* 遺伝子に着目し研究を進めたところ、*cnm* 遺伝子保有 *S. mutans* が口腔内に存在する患者の割合は約 10 %であり、*cnm* 遺伝子保有菌株が口腔内に存在する小児では、*cnm* 遺伝子を持たない菌株のみしか存在しない小児と比較して多数のう蝕が存在することが明らかとなった。さらに、*cnm* 遺伝子保有菌株は母から子へと伝播していることを明らかとした。このことから、本研究で確立された MLST 法で、ある特定のクラスターに集中する *S. mutans* に共通した性状が、う蝕病原性に関与していることが示された。

(3) 母子伝播に関する分析

母子 20 組について MLST 解析を行ったところ、新たに 16 の遺伝子型が発見された。また、母子 20 組のうち 14 組で母親と

その子どもで同一の遺伝子型を有する菌が検出され、MLST 法の伝播に関する研究に対する有効性が示された。

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 19 件)

- ① Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapidattanakul 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* 58, 469-475, 2009. (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 Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Inagaki S, Fujita K, Nagayama K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to platelet aggregation. *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, Lapirattanakul 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)
- ⑯ 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)
- ⑰ 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)
- ⑱ 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)
- ⑲ 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 17 件)
- ① 野村良太, 仲野和彦, 大嶋 隆 *P. gingivalis* 感染による血管内皮肥厚メカニズムの解明 第 47 回日本小児歯科学会大会, 2009. 5. 15, 大阪.
- ② 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.
- ③ 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.
- ④ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapidrattanakul 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.
- ⑤ 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.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
- 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 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.
- ⑪ 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.
- ⑫ 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.
- ⑬ 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.
- ⑭ 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.
- ⑮ 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.
- ⑯ 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.
- ⑰ 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

野村 良太 (NOMURA RYOTA)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90437385