

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K18777
研究課題名(和文) 全身疾患との関連性が高いミュータンスレンサ球菌の口腔内への定着メカニズムの追究

研究課題名(英文) Research regarding mechanism of oral colonization of Streptococcus mutans associated with systemic disease development

研究代表者
大継 将寿(Otsugu, Masatoshi)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40803086
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、菌体表層にコラーゲン結合タンパクを発現しているミュータンスレンサ球菌(CBP陽性株)の定着メカニズムを、乳幼児期の口腔細菌の定着および授乳習慣の観点から検討した。100ペアの小児および母親から唾液サンプルを採取し、抽出したDNAを用いてPCR法によりコラーゲン結合遺伝子の検出を行った。まず、母親では小児と比較してCBP陽性率が高い傾向を示した。また、母親がCBP陽性の小児では、母親がCBP陰性の小児と比較して有意に高い確率でCBP陽性株が検出された。さらに、CBP陽性株を保有する小児は保有しない小児と比較して、母乳育児期間が有意に短いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腐蝕病原性細菌のうち菌体表層にコラーゲン結合タンパクを発現しているミュータンスレンサ球菌(CBP陽性株)は、感染性心内膜炎や脳内微小出血などの全身疾患に関与することを明らかにしてきた。一方で、これらの予防法については明確に確立できておらず、CBP陽性株を口腔内に定着させないことが根本的な予防策といえる。本研究により、CBP陽性株の主要な感染源や口腔内の定着に影響を及ぼす因子を明らかにすることができた。本研究成果は、予防法が確立していない全身疾患において、口腔領域から予防法を提唱するための一途となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism of colonization of CBP-positive Streptococcus mutans, which expresses a collagen-binding protein on the bacterial surface layer, was investigated in terms of oral bacterial colonization during infancy and its association with breastfeeding practices. Saliva samples from 100 pairs of mothers and their children were collected, then collagen-binding gene (cnm, cbm) detection was performed by PCR with DNA extraction. Overall, the mothers showed a higher CBP-positive rate as compared to the children. Notably, the possession rate of CBP-positive strains in the children was significantly higher in those whose mother also possessed a CBP-positive strain as compared to those whose mother had no such strain. Also, children possessing CBP-positive strains had a significantly shorter breastfeeding period as compared to those without CBP-positive results.

研究分野：小児歯科

キーワード：ミュータンスレンサ球菌 感染性心内膜炎 コラーゲン結合タンパク 定着メカニズム 予防

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、口腔細菌と全身疾患との関連についての報告が数多くなされている。申請者らは、う蝕病原性細菌であるミュータンスレンサ球菌のうち菌体表層にコラーゲン結合タンパク (Collagen-binding protein; CBP) を発現する菌株が、歯科領域において最もよく知られた全身疾患の一つである感染性心内膜炎の病原性に関与していることを明らかにしてきた。また、感染性心内膜炎の主要な合併症として脳血管疾患や腎障害などが知られているが、最近になって、脳内微小出血などの脳血管疾患に罹患した患者や IgA 腎症の患者の口腔内からも高頻度で CBP 陽性株が検出されることが複数の臨床研究から明らかになった。

一方で、これらの全身疾患の予防法については未だ検討がなされていない。予防法を検討する上でもっとも重要な点は、CBP 陽性株を口腔内に定着させないことである。出生直後の新生児の口腔内は無菌状態であるが、養育者の唾液中に含まれている細菌が新生児の大きな感染源となる。ミュータンスレンサ球菌は主に養育者の唾液から子に伝播し定着すると考えられており、特に生後 19 か月から 31 か月の間が最も定着しやすいことが明らかになっている。これまでに、健康者の約 10~20% の人の口腔内において CBP 陽性株が存在していることが分かっているが、小児では CBP 陽性率が成人に比べて低いとされており、CBP 陽性株の感染は養育者の唾液を介した単純な伝播とは考えにくい。しかしながら、その伝播および定着メカニズムに関してはこれまでに明らかにされていない。

乳児期の口腔内の細菌叢への影響を与える可能性のある因子として授乳が考えられる。母乳中には様々な抗菌活性因子や免疫性因子が含まれており、母乳栄養児と人工栄養児の腸内細菌叢の違いは古くから指摘されていることから口腔内の細菌叢への影響も考えられる。また、ミュータンスレンサ球菌は歯に定着するとされているが、無歯期の乳児の唾液よりミュータンスレンサ球菌が検出されたという報告も存在する。これまでの研究結果から、CBP 陽性株はコラーゲンやフィブリノーゲンなどの細胞外マトリックスへの付着能およびウシの心臓弁への付着能が非常に高いことが明らかになっているため、CBP 陽性株は歯だけでなく口腔粘膜などの軟組織へ付着する特性を有する可能性も考えられる。

そこで本研究では、CBP 陽性株の口腔への伝播および定着メカニズムを、乳幼児期の口腔細菌の定着および授乳習慣の観点から検討することを企画立案するに至った。

2. 研究の目的

- (1) 養育者と子における CBP 陽性株の保有率を評価する。
- (2) 養育者と子のペアにおける CBP 陽性株の保有の有無を評価する。
- (3) CBP 陽性株の保有者の特徴を評価する。

3. 研究の方法

本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った。(承認番号 H30-E3-3)

(1) 口腔サンプルの収集

研究への同意が得られた 100 ペアの小儿およびその養育者(全て母)から唾液を採取し、生理食塩水にて 10 倍および 100 倍希釈した後、100mL を Mitis-Salivarius-Bacitracin(MSB)寒天培地に播種し、嫌気下にて 48 時間 37°C で培養した。得られたコロニーは対象者ごとにそれぞれ 5 株ずつ合計 1000 株採取した。

(2)DNA 抽出と PCR 法にコラーゲン結合遺伝子の確認

各株を Brain Heart Infusion 液体培地を用いて 37 18 時間にて培養後、通法にて DNA を抽出した。得られた DNA を用いて PCR 法を行い、コラーゲン結合遺伝子 (*cnm* および *cbm*) の確認を行った。

(3)養育者へのアンケート調査

養育者には、年齢、在胎週数、全身状態、う蝕経験、小児の養育時の授乳習慣についてアンケート調査を行った。

4 . 研究成果

(1)養育者および子における CBP 陽性株の保有率

CBP 陽性株保有率は、養育者(29.0%)において小児(17.0%)よりも高かったが有意差は認めなかった。また、CBP 陽性株の検出率においても養育者(18.9%)において小児(14.0%)よりも高かったが、CBP のうち *Cnm* 陽性株の検出率は養育者(16.8%)において小児(12.2%)よりも有意に高かった。

(2)養育者と子のペアにおける CBP 陽性株の保有率

CBP 陽性株を保有している養育者の小児(41.4%)では、CBP 陽性株を保有している養育者の小児(7.0%)と比較して有意に CBP 陽性率が高かった。

(3)CBP 陽性株を保有している養育者の特徴

養育者においては、う蝕経験歯数や唾液中のミュータンスレンサ球菌数など CBP 陽性株の保有の有無との関連を認める項目は検出されなかった。

(4)CBP 陽性株を保有している小児の特徴

CBP 陽性株を保有している小児は保有していない小児と比較して、母乳育児期間が有意に短く、母乳摂取経験がない小児も有意に多いことが明らかになった。

これまでに、ミュータンスレンサ球菌の伝播および定着については明らかになっている点もあるが、感染性心内膜炎などの全身疾患との関連が強い CBP 陽性株の伝播および定着に関しては検討されていなかった。本研究によって、養育者は小児への CBP 陽性株の主要な感染源であるとともに、乳幼児期の授乳習慣も CBP 陽性株の口腔内の定着に影響を及ぼす因子である可能性を示すことができた。これらの結果は、CBP 陽性株が関連する予防法の確立されていない全身疾患に対して、口腔領域から予防法を提唱できる可能性を示している。CBP 陽性株の定着部位や定着時期の特性については今後も更なる研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suehiro Y, Nomura R, Matayoshi S, Otsugu M, Iwashita N, Nakano K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Evaluation of the collagen-binding properties and virulence of killed Streptococcus mutans in a silkworm model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06345-x	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Suehiro Y, Matayoshi S, Otsugu M, Nomura R, Nakano K.
2. 発表標題 Collagen-binding properties of Streptococcus mutans killed by amoxicillin.
3. 学会等名 69th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末廣雄登, 又吉紗綾, 大継將寿, 野村良太, 仲野和彦.
2. 発表標題 死菌処理したStreptococcus mutansの感染性心内膜炎に対する病原性の評価
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末廣雄登, 又吉紗綾, 大継將寿, 野村良太, 仲野和彦.
2. 発表標題 死菌処理したStreptococcus mutans のカイコモデルにおける病原性の評価
3. 学会等名 第40回日本小児歯科学会近畿地方会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Otsugu M, Kitamura T, Nomura R, Nakano K
2. 発表標題 Association of breastfeeding duration with mother-to-child transmission of Streptococcus mutans strains with collagen-binding activity
3. 学会等名 67th Congress of the European Organisation for Caries Research (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------