

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592602

研究課題名（和文）DGGE 法を用いた感染性心内膜炎の原因となる口腔フローラの網羅的解析

研究課題名（英文）Exhaustive analysis using DGGE method for oral flora causing the infective endocarditis

研究代表者

西口 美由季（NISHIGUCHI MIYUKI）

長崎大学・大学院医歯（薬）学総合研究科・助教

研究者番号：10253676

研究成果の概要（和文）：IEの口腔内での最大の原因菌である口腔レンサ球菌を標的として Rod shape-determining protein 遺伝子（*rodA*）の多様性に基づいた DGGE 法を確立した。これに基づき、唾液を検体として細菌叢の網羅的解析を行った。実際に感染性心内膜炎を引き起こした菌株の生化学的性状検査と 16S rRNA 遺伝子から菌種を推定、特に *Streptococcus mutans* と同定された菌株のゲノム DNA のドラフトシーケンスを決定し、既にデータベース上に発表されているゲノムシーケンスとの比較を行い、心内膜炎特異的な病原因子の検討を行った。レンサ球菌以外の口腔細菌も調査するため、う蝕検査、歯周疾患検査、日和見菌検査を利用し、小児患児の唾液を検体とした調査もあわせて行った。

研究成果の概要（英文）：We established DGGE method based on the variety of the Rod shape-determining protein gene (*rodA*) as a target the oral streptococcus which was the maximal bacterial species in the oral cavity causing infective endocarditis(IE). Based on this, we performed exhaustive analysis of the bacterial flora as saliva specimen. Also, we estimated bacterial strain from an examination for biochemical property and a 16S rRNA gene of the strain from a patient who has contracted IE. We determined a draft sequence of the genomic DNA of strain identified with *Streptococcus mutans* and performed comparison between genomic sequence that was already presented on a database. then, we reviewed the pathogenesis factor that was specific for IE. We made the study of bacterial species associated with dental caries, a periodontal disease-causing bacteria, the investigation of infecting organism for opportunistic infections by using an examination for dental caries, an examination for periodontal disease, fence-sitting bacteria examination of BML company.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：感染性心内膜炎・D G G E法・口腔フローラ・微生物群集解析・*rodA* 遺伝子・ゲノムシーケンス・歯科治療

### 1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎 (Infective endocarditis; IE) とは血液中のフィブリンと血小板により生じた塞栓が心内膜に付着、そこへ何らかの原因で病原体が付着増殖することで起こる全身性の敗血症性の疾患である。この IE に関し、歯科診療上最も憂慮されるべき点は、その最も頻度の高い感染原因として歯科治療が特定されていることである。かつ我々小児歯科医が診療中に心疾患を有する患児に遭遇する割合は、新生児の 100 人に 1 人が先天性心疾患を持っていることから、かなり高頻度である。従って、小児歯科医はとりわけ IE の予防について十分な知識を持ち合わせておく必要がある。この IE の予防法として多くはAHAの推奨するガイドラインを基準に多くなされてはいるが、これを含め多くのガイドラインが、感染原因とされる歯科治療と実際に IE を引き起こした原因菌をリンクさせ、どのような細菌種が危険であり、これらの細菌種が占める口腔細菌叢の部位や IE の予防に有効な抗菌薬、あるいは注意すべき歯科処置に関し詳細に述べられた報告はない。これらのため小児歯科医の誰もが IE 予防に関して基準に出来るガイドラインの必要性が強く望まれるところである。

### 2. 研究の目的

IE の原因となる細菌種が占める口腔細菌叢の部位や IE の予防に有効な抗菌薬、あるいは注意すべき歯科処置に関し詳細に述べられた報告がない理由は、今までに IE を引き起こした患者の口腔細菌叢や血液、痰等々の臨床検体を簡便かつ網羅的にプロファイリングする方法が構築された報告がなされていないためと考えられる。こうしたことから本研究の目的は、

(1) 口腔細菌叢や IE 患者からの血液、痰等から検出される細菌種を分子生物学的手法により簡便かつ網羅的に同定する方法を構築すること

(2) (1)の情報をもとに IE の真の原因菌を明らかにし、より有効な抗菌薬投与方法と注意すべき歯科治療に関するガイドラインを作成することである。

### 3. 研究の方法

(1) デンタルプラーク中の微生物群集構造の解析

①16S リボソームRNA遺伝子 ( 16S rDNA ) ラ

イブラリーのランダムシーケンシング

健康者およびIE罹患者のデンタルプラークより抽出した細菌トータルDNAを鋳型に16S rDNAをターゲットにしたユニバーサルプライマーによりPCRを行う。得られた増幅産物を大腸菌にクローニングし、16S rDNAライブラリーを構築する。ライブラリー中のクローンをランダムにシーケンスし、各シーケンスをデータベースに対してホモロジー解析し、細菌種情報を得る。複数のクローンを解析することにより、各被験者のデンタルプラーク中の各種細菌種のおよそのポピュレーションのプロフィールのデータベース構築を行う。

②唾液を検体とした細菌叢の網羅的解析

長崎大学小児科の連携の下、実際に感染性心内膜炎を引き起こし、口腔由来と考えられるレンサ球菌の臨床分離株を入手し、菌株の生化学的性状検査と16S rRNA遺伝子から菌種を推定する。

(2) 心内膜炎特異的な病原因子の検討

菌株のゲノムDNAのドラフトシーケンスを決定し、既にデータベース上に発表されているゲノムシーケンスとの比較を行い、心内膜炎特異的な病原因子の検討を行う。その中で *Streptococcus mutans* と同定された菌株のゲノムDNAのドラフトシーケンスを決定し、既にデータベース上に発表されているゲノムシーケンスとの比較を行い、心内膜炎特異的な病原因子の検討を行う。

(3) レンサ球菌以外の口腔細菌における検討

レンサ球菌以外の口腔細菌も調査するために、BML社のう蝕検査、歯周疾患検査、日和見菌検査を利用して、小児歯科外来患児の唾液を検体として、*Lactobacillus* 属などのう蝕関連細菌、*Porphyromonas gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* などの歯周病菌、*Streptococcus pneumoniae* や *Haemophilus influenzae* などの日和見感染菌の調査もあわせて行う。

(4) 歯科治療に関するガイドラインを作成以上の結果をもとに IE の真の原因菌を明らかにし、より有効な抗菌薬投与方法と注意すべき歯科治療に関するガイドラインを作成する。

#### 4. 研究成果

口腔フローラは 300 種を超える細菌種で構成される複雑な細菌叢である。この口腔フローラで大多数を占める種が口腔レンサ球菌と呼ばれる *Streptococcus* 属である。この口腔レンサ球菌は常在菌で通常は強い病原性を示さないが、*Streptococcus mutans* のように齲蝕病原性を示したり、ミティスグループレンサ球菌のように日和見感染により亜急性感染性心内膜炎を引き起こしたりするものが含まれている。そこで本研究ではまずこれらの口腔レンサ球菌を標的として網羅的解析を行うための手法を開発した。また、我々は細菌細胞の形態形成に關与する Rod shape-determining protein 遺伝子 (*rodA*) に関して、この *rodA* 遺伝子が口腔レンサ球菌をはじめとした多くの細菌が有していること、遺伝系統解析から細菌叢の網羅的解析に通常使用される 16S rRNA 遺伝子よりも 10 倍以上の多様性を有していることを解明した。

Note: Each number written from right to left corresponds to the same-numbered bacterial species from the top to the bottom.

[1] <i>S. mitis</i>	0.01	0.00	0.03	0.03	0.03	0.01	0.02	0.03	0.03	0.03	0.05	0.05	0.06	0.06	0.04	0.04	0.04	0.07	0.06	0.06	0.05	0.05
[2] <i>S. pseudopneumoniae</i>	0.08	0.00	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.04	0.04	0.04	0.08	0.06	0.06	0.06	0.05
[3] <i>S. oralis</i>	0.29	0.28	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.05	0.05	0.05	0.06	0.04	0.04	0.04	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	
[4] <i>S. gordonii</i>	0.39	0.42	0.46	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.03	0.04	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	
[5] <i>S. sanguinis</i>	0.27	0.27	0.02	0.46	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.03	0.03	0.05	0.06	0.05	0.05	0.04	
[6] <i>S. parvus</i>	0.48	0.45	0.52	0.52	0.51	0.03	0.02	0.02	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.08	0.07	0.08	0.04	0.04	
[7] <i>S. infantis</i>	0.40	0.42	0.48	0.53	0.47	0.39	0.00	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.04	0.04	0.04	0.08	0.06	0.05	0.04	0.04	
[8] <i>S. australis</i>	0.40	0.42	0.48	0.53	0.47	0.39	0.00	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.04	0.04	0.04	0.08	0.06	0.05	0.04	0.04	
[9] <i>S. anitris</i>	0.45	0.49	0.41	0.42	0.42	0.50	0.50	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04	0.05	0.07	0.06	0.04	0.04	0.04	
[10] <i>S. pneumoniae</i>	0.31	0.32	0.32	0.43	0.31	0.47	0.48	0.48	0.41	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.05	0.04	0.08	0.07	0.05	0.04	0.04	
[11] <i>S. salivarius</i>	0.66	0.71	0.71	0.73	0.70	0.65	0.60	0.60	0.74	0.64	0.00	0.01	0.05	0.05	0.06	0.04	0.06	0.07	0.05	0.04	0.04	
[12] <i>S. vestibularis</i>	0.75	0.79	0.78	0.79	0.79	0.67	0.82	0.82	0.79	0.67	0.17	0.01	0.04	0.05	0.06	0.04	0.08	0.06	0.05	0.04	0.04	
[13] <i>S. thermophilus</i>	0.72	0.75	0.75	0.78	0.79	0.66	0.61	0.61	0.78	0.64	0.16	0.03	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06	0.07	0.05	0.04	0.04	
[14] <i>S. anginosus</i>	0.38	0.38	0.41	0.46	0.41	0.47	0.45	0.45	0.40	0.35	0.72	0.73	0.70	0.00	0.02	0.01	0.01	0.06	0.05	0.04	0.04	
[15] <i>S. constellatus subsp. constellatus</i>	0.38	0.38	0.40	0.44	0.39	0.46	0.44	0.44	0.38	0.34	0.70	0.72	0.69	0.02	0.01	0.01	0.06	0.05	0.04	0.04	0.04	
[16] <i>S. constellatus subsp. pharyngis</i>	0.30	0.30	0.41	0.46	0.41	0.47	0.45	0.45	0.4	0.35	0.72	0.73	0.70	0.00	0.02	0.01	0.06	0.05	0.04	0.04	0.04	
[17] <i>S. intermedius</i>	0.40	0.39	0.39	0.39	0.37	0.45	0.45	0.38	0.33	0.66	0.72	0.69	0.16	0.15	0.16	0.06	0.05	0.06	0.05	0.04	0.04	
[18] <i>S. mutans</i>	0.59	0.64	0.67	0.62	0.67	0.60	0.57	0.57	0.61	0.6	0.53	0.57	0.55	0.66	0.64	0.66	0.62	0.07	0.06	0.05	0.05	
[19] <i>S. sobrinus</i>	0.68	0.72	0.70	0.67	0.70	0.64	0.69	0.65	0.62	0.61	0.61	0.73	0.74	0.73	0.64	0.64	0.64	0.06	0.05	0.04	0.04	
[20] <i>S. bovis</i>	0.62	0.66	0.64	0.64	0.67	0.66	0.62	0.62	0.63	0.66	0.62	0.62	0.60	0.63	0.61	0.63	0.60	0.39	0.39	0.39	0.03	
[21] <i>S. galolyticus subsp. mucosolicus</i>	0.63	0.63	0.66	0.62	0.65	0.61	0.67	0.67	0.69	0.63	0.64	0.62	0.63	0.60	0.59	0.60	0.62	0.41	0.59	0.59	0.23	

表 *Streptococcus* 種族内における *rodA* と 16 rDNA 系統発生的比較

そこで、*rodA* 遺伝子の多様性に基づいた口腔レンサ球菌を検出するための DGGE 法を確立し、*Journal of oral microbiology* 誌に報告を行った。

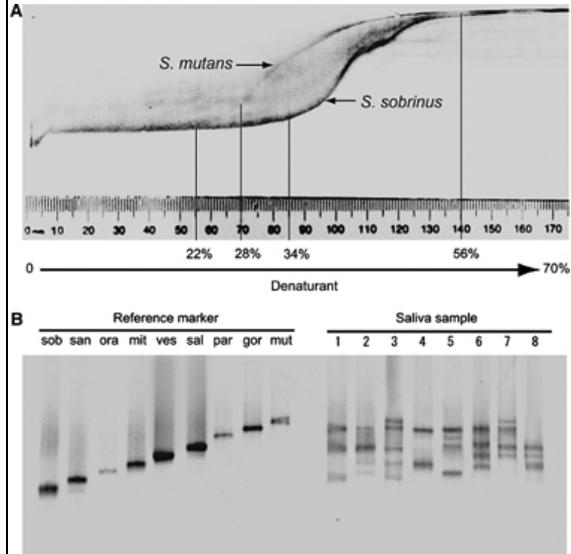


図 *rodA*-DGGE 分析における Negative image

また実際に感染性心内膜炎を引き起こし、口腔由来と考えられるレンサ球菌の臨床分離株を入手出来たことからこの菌株の生化学的性状検査と 16S rRNA 遺伝子の決定を行って大体の菌種を推定した。

特に *Streptococcus mutans* と同定された菌株のゲノム DNA のドラフトシーケンスを決定し、既にデータベース上に発表されているゲノムシーケンスとの比較を行い、心内膜炎特異的な病原因子の検討を行った。その一方で、レンサ球菌以外の口腔細菌も調査するために、BML 社のう蝕検査、歯周疾患検査、日和見菌検査を利用して、小児歯科外来患児の唾液を検体として、*Lactobacillus* 属などのう蝕関連細菌、*Porphyromonas gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* などの歯周病菌、*Streptococcus pneumoniae* や *Haemophilus influenzae* などの日和見感染菌の調査もあわせて行った。

更に、IE を起こした患児から分離された *Streptococcus oralis* のゲノムシーケンスを行い、現在 10 個ほど残った gap シーケンスを解析しているところである。また本菌のゲノム状の特徴としてはハウスキーピング遺伝子は *Streptococcus oralis* に分類されるものであるが他のシーケンスのホモロジーがデータベース上に存在するものの比較で 80~95% と低いため、この点で IE との関連が示唆できないか検討中である。また IE 患児の情報を積み重ね、ガイドライン作成

を目指しているところである。

## 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 1 件)

Konishi I, Hoshino T, Kondo Y, Saito K  
Nishiguchi M, Sato K, Fujiwara T

Phylogenetic analyses and detection of  
viridans streptococci based on sequences  
and denaturing gradient gel  
electrophoresis of the  
rodshaped-determining protein gene.

Journal of Oral Microbiology, 査読有, 2009,  
1(Supplements)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西口 美由季 (NISHIGUCHI MIYUKI)  
長崎大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・  
助教  
研究者番号: 10253676

### (2) 研究分担者

藤原 卓 (FUJIWARA TAKU)  
長崎大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・  
教授  
研究者番号: 00228975

#### 研究分担者

星野 倫範 (HOSHINO TOMONORI)  
長崎大学・長崎大学病院・講師  
研究者番号: 00359960

#### 研究分担者

釜崎 陽子 (KAMASAKI YOKO)  
長崎大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・  
助教

研究者番号: 30253678

#### 研究分担者

齋藤 幹 (SAITO KAN)  
長崎大学・長崎大学病院・助教  
研究者番号: 40380852

### (2) 連携研究者

なし