

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463177

研究課題名(和文) 感染性心内膜炎リスク患者におけるアモキシシリンの有効性に関するエビデンスの構築

研究課題名(英文) Establishment of evidence of effectiveness of amoxicillin in the subjects at risk for infective endocarditis

研究代表者

根本 浩利 (NEMOTO, Hirotoshi)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：80527226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：健康な母子から採取した唾液中のアモキシシリンおよびクラリシリンに耐性を示す口腔レンサ球菌の存在を検討した結果、その分布頻度はそれぞれ約5%および約30%であった。また、これらの菌株は、他の抗菌薬に対しても耐性を示す傾向にあることが明らかとなった。さらに、これらの耐性菌株は母子間で伝播する可能性があることが明らかとなった。その後、心疾患罹患患者における調査を試みたが、採取検体数が十分ではなくエビデンスの構築にまでは至らなかった。今回の結果をもとに、今後の大規模調査につなげていく必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Analyses of saliva specimens collected from healthy mothers and their children revealed that the prevalence rate of amoxicillin-resistant oral streptococci was approximately 5%, while that of clindamycin-resistant oral streptococci was approximately 30%. Other findings revealed resistance to other antibiotics by these strains as well as their possible transmission from mother to child. Thereafter, analyses of obtained oral specimens were performed to investigate the presence of amoxicillin-resistant strains in subjects at risk for infective endocarditis. However, we were unable to collect an adequate number of samples in order to analyze with statistical significance and consider that a large-scale study is necessary to perform this research.

研究分野：小児歯科学

キーワード：感染性心内膜炎 アモキシシリン 唾液 抗生物質 耐性菌 母子伝播 心疾患 術前投与

## 1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎は、歯科領域で最もよく知られている全身疾患の1つであり、歯科処置等が誘因となって生じた菌血症に起因して、心機能低下をはじめとした様々な症状を呈し、死に至ることもあるとされる。その予防法としては、一般的には、発症リスクの高い対象者において、発症リスクの高い処置の前に、アモキシシリンを服用するように指示することとされている。最近になって、抗菌薬の使用とともに、耐性菌の出現や広がりが増え、危惧されている。実際に、ペニシリン耐性菌によって引き起こされた感染性心内膜炎の症例報告が存在している。しかしながら、アモキシシリン耐性菌の存在を考慮に入れた研究はなされておらず、ある患者において、感染性心内膜炎予防に対して十分な効果の認められないアモキシシリンを使用し続けている可能性が考えられる。そこで、実際に使用される抗菌薬の感受性に関する研究の必要性を感じ、まず、感染性心内膜炎発症リスクを有さない対象にアモキシシリンに対して耐性を示す口腔レンサ球菌種の存在を検討した。その結果、約4%の対象者が高度にアモキシシリンに耐性を示す口腔レンサ球菌種を有していることが分かった。次に、感染性心内膜炎発症高リスク者を対象に予備的に検討したところ、その頻度は約4倍であった。また、これらの菌株に対して、日本循環器学会による「感染性心内膜炎の予防と治療に関するガイドライン」に掲載されている他の抗菌薬であるアンピシリン、クリンダマイシンなどに対する感受性を検討した結果、これらの抗菌薬に対しても耐性を示すことが明らかとなった。そこで、これらの事実を踏まえ感染性心内膜炎発症高リスク者における口腔細菌の感受性に関する検討を大規模に分析することで、アモキシシリン使用の是非を議論していく上で有用な知見を得たいという考えに至った。

## 2. 研究の目的

感染性心内膜炎は歯科治療に関連して発症することが多く、死に至ることもある全身疾患の1つである。その予防策として、アモキシシリンの術前投与が行われている。一方、近年では、耐性菌の出現等の観点から抗生物質の使用は必要最小限にすべきという概念がある。申請者はこれまでに健康人においてアモキシシリン耐性口腔レンサ球菌が約5%の頻度で存在することを明らかにしてきた。しかしながら、感染性心内膜炎発症リスク患者におけるアモキシシリン耐性口腔レンサ球菌に関する研究は十分であるとは言えない。そこで、アモキシシリン耐性口腔レンサ球菌株の数を増やすために多数の親子兄弟の唾液検体を採取し、薬剤感受性パターンを明らかにする。さらに、水平および垂直伝播に関する検討を行い、薬剤耐性菌の伝播の頻度やそのメカニズムを明らかにしたいと考えている。次に、分離したAMPC耐性菌株における薬剤耐性に関与する遺伝子の分析を行い、唾液検体の分析からAMPC耐性菌株を保有している対象を簡便に検出するとともにこれらの菌株の他の薬剤に対する耐性を検出する方法を確立したい。

## 3. 研究の方法

### (1) アモキシシリン耐性口腔レンサ球菌における母子伝播の検討

健康な母子における対象者から唾液検体を採取し、高濃度のアモキシシリンを含有したレンサ球菌選択寒天培地に播種し、培地上に発育したコロニー採取した。そして、米国標準化委員会の方法を用いて、分離した菌株のアモキシシリンおよびアンピシリン、ペニシリン、エリスロマイシン、レボフロキサシンに対する最小発育阻止濃度を決定した。また、菌株からゲノムDNAを抽出し、16S rRNAをPCR法で増幅した遺伝子配列を決定し、

データベース上の各種細菌の 16S rRNA 配列と比較することで菌種を特定した。また、Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法によるフィンガープリントパターンから遺伝子型の比較を行った。

#### (2) クリンダマイシン耐性口腔レンサ球菌における母子伝播の検討

健常な成人対象者から可及的に多くのサンプルを採取し、上記方法にてクリンダマイシン耐性菌株の存在とその菌種に関して検討した。

#### (3) アモキシシリン耐性に関与する遺伝子の分析

口腔レンサ球菌のアモキシシリンに対する耐性はペニシリン結合タンパク質 (penicillin-binding protein, PBP) である PBP1A、PBP2X、PBP2B をコードする遺伝子の変異が関与していることが考えられるため、上記方法によって分離されたアモキシシリン耐性菌株の PBP1A、PBP2X、PBP2B を PCR で増幅し、その遺伝子配列を決定し分離された各菌種の標準菌株の PBP1A、PBP2X、PBP2B 配列と比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) アモキシシリン耐性口腔レンサ球菌における母子伝播の検討

健常な母子 150 組の対象において小児 11 人(約 7%)、母親 7 人 (約 5%) から 17 菌株が分離された。その内訳は感染性心内膜炎の起炎菌とされる *Streptococcus mitis* (8 株)、*Streptococcus parasanguinis* (5 株)、*Streptococcus infantis* (2 株)、*Streptococcus oralis* (1 株)、*Streptococcus salivarius* (1 株) であった。分離した菌株の各種抗菌薬に対する最小発育阻止濃度を決定したところ、アンピシリン、ペニシリン、エリスロマイシンに対して強い

耐性を示したが、レボフロキサシンには感受性を示した。さらに、3 組の母子間において同一の遺伝子型のアモキシシリン耐性口腔レンサ球菌を保有していることが明らかとなった。また、母親がアモキシシリン耐性口腔レンサ球菌を保有している場合にその子供がアモキシシリン耐性口腔レンサ球菌を保有している割合は母親がアモキシシリン耐性口腔レンサ球菌を保有していない場合にその子供がアモキシシリン耐性口腔レンサ球菌を保有している割合よりも有意に高いことが明らかとなった。これらのことから、低頻度ではあるがアモキシシリン耐性口腔レンサ球菌の母子伝播の可能性が示唆された。

#### (2) クリンダマイシン耐性口腔レンサ球菌における母子伝播の検討

健常な母子 25 組の対象において小児 7 人(約 30%)、母親 7 人 (約 30%) から 14 菌株が分離され、その内訳は感染性心内膜炎の起炎菌とされる *Streptococcus sanguinis* (3 株)、*S. oralis* (3 株)、*S. salivarius* (3 株)、*Streptococcus australis* (2 株)、*S. parasanguinis* (1 株)、*S. mitis* (1 株)、*Streptococcus cristatus* (1 株) であった。アモキシシリン耐性口腔レンサ球菌よりもクリンダマイシン耐性口腔レンサ球菌の分布頻度の方が高かった。分離した菌株の各種抗菌薬に対する最小発育阻止濃度を決定したところ、アンピシリン、ペニシリン、エリスロマイシンに対して強い耐性を示したが、レボフロキサシンには感受性を示した。さらに、3 組の母子間において同一の遺伝子型のクリンダマイシン耐性口腔レンサ球菌を保有していることが明らかとなった。また、母親がクリンダマイシン耐性口腔レンサ球菌を保有している場合にその子供がクリンダマイシン耐性口腔レンサ球菌を保有している割合は母親がクリンダマイシン耐性口腔レ

ンサ球菌を保有していない場合にその子供がクリンダマイシン耐性口腔レンサ球菌を保有している割合よりも高いことが明らかとなった。これらのことから、低頻度ではあるがクリンダマイシン耐性口腔レンサ球菌の母子伝播の可能性が示唆された。

### (3) アモキシシリン耐性に関する遺伝子の分析

分離されたアモキシシリン耐性菌株のPBP1A、PBP2X、PBP2BをPCRで増幅し、その遺伝子配列を決定し分離された各菌種の標準菌株のPBP1A、PBP2X、PBP2B配列と比較した結果、これらの遺伝子配列の変異が認められ、アモキシシリン耐性の獲得に関与している可能性が示唆された。

## 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2件)

1. Nemoto H, Nomura R, Ooshima T, Nakano K. Distribution of amoxicillin-resistant oral streptococci in dental plaque specimens obtained from Japanese children and adolescents at risk for infective endocarditis. J Cardiol. 62(5): 296-300, 2013.
2. Nemoto H, Nomura R, Nakano K. Isolation of amoxicillin-resistant oral streptococci from children and their mothers. Ped Dent J. 25(1): 8-13, 2015.

[学会発表] (計2件)

1. Nemoto H, Nomura R, Nakano K. Distribution of amoxicillin-resistant streptococci in mothers and their children. 2nd IADR-APR (International Association of Dental Research- Asia

Pacific Region) Meeting, 2013.8.21, Bangkok, Thailand.

2. Nemoto H, Nomura R, Nakano K. Transmission of clindamycin-resistant oral streptococci between mother and their child. 9th PDAA (Biennial Conference of Pediatric Dentistry Association of Asia) Meeting, 2014.8.23, Singapore.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/%7Epedo/research/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

根本 浩利 (NEMOTO, Hirotooshi)  
大阪大学・歯学研究科・招へい教員  
研究者番号: 80527226

### (2) 研究分担者

仲野 道代 (NAKANO, Michiyo)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授  
研究者番号: 30359848