

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K12019

研究課題名（和文）心臓弁膜症の病態・進行度における口腔内常在菌の関与

研究課題名（英文）Involvement of resident oral microorganisms in the pathophysiology and degree of progression of valvular heart disease

研究代表者

葭葉 清香（Yoshiba, Sayaka）

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：60555358

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：今回我々は、心臓弁膜症患者における手術時の摘出弁組織と口腔内から検出された菌が同一クローンであるかの検討を行い、口腔内常在菌の心臓弁膜症の病態・進行度への関与を明らかにし、周術期における口腔内管理の有効性を検証することを目的とした。5症例の口腔内プラークと15症例の大動脈弁組織から抽出したDNAについて、次世代シーケンサーを行って塩基配列を解読した。解析結果と臨床情報について統計学的に解析した。メタゲノム解析を行うことで、従来の手法では検出が困難であった微量細菌種を検出することができた。大動脈弁組織は細菌叢により大きく2群に分かれる傾向があり、菌血症の発症リスクと関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔細菌の及ぼす各種全身疾患への影響が注目されているが、直接の関与を遺伝子レベルで検索した報告は少ない。今回我々は、病因や進行度、病理組織学的因子との関連に未だ不明な点が多い心臓弁膜症に着目し、対象患者における口腔内細菌と、摘出心臓弁組織より抽出されたDNAから配列同定した細菌のクローナリティを遺伝子レベルで解析した。また、近年周術期における口腔機能管理が保険収載され、周術期における質の高い医療の遂行と口腔ケアの重要性が周知されつつある。本研究の結果より、心臓弁膜症の病態や臨床病理学的因子に口腔内常在菌の関連が示唆されることで、周術期医療において歯科医師の行う口腔機能管理の有効性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined whether the bacteria detected in the oral cavity and the resected valve tissue at the time of surgery in patients with valvular heart disease are the same clone. The purpose was to clarify the involvement of histopathological factors and to verify the effectiveness of oral care in the perioperative period. DNA extracted from oral plaques in 5 cases and aortic valve tissue in 15 cases was sequenced by next-generation sequencing. The obtained sequence data were collated with the database and analyzed using statistical analysis software. Analysis results and clinical information were statistically analyzed. By performing metagenomic analysis, we were able to detect trace bacterial species that were difficult to detect by conventional methods. The aortic valve tissue tended to be divided into two groups according to the bacterial flora, suggesting a possible association with the risk of developing bacteremia.

研究分野：口腔外科学

キーワード：心臓弁膜症 感染性心内膜炎 口腔内常在菌 メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

口腔内常在菌は、未同定の細菌を含め約 700 種類、1000 億個以上あると言われており、そのほとんどが数種類のレンサ球菌属で占められている。これらの口腔細菌は、口腔内で病原性を発揮するだけでなく、抜歯等の観血的な処置によって血液中に侵入することが知られている。菌血症は、健常者では一過性であるが、ある種の心疾患を有する対象では心臓の弁膜や心内膜に血小板やフィブリンと細菌の塊を形成し、感染性心内膜炎の発症につながることもある。一方で、菌血症は侵襲的な処置だけではなく、日常の口腔清掃によっても度々生じている可能性があると言われており、口腔細菌の血液中への侵入は、一般に考えられているよりも高頻度であることが想定される。このことは、口腔細菌が血流を介して様々な組織や臓器に到達し、これまでに解明されていない影響を及ぼしている可能性を示唆している。既に口腔内常在菌が糖尿病、誤嚥性肺炎、低体重児出産、早産、関節リウマチなどの全身疾患と関連があることが近年の研究で明らかにされつつあるが、遺伝子解析によるクローナリティーを証明した報告は少ない。

心臓弁膜症とは、弁膜に生じる様々な機能障害の総称であり、それぞれの弁に狭窄症あるいは閉鎖不全もしくはその両方が起こり得る。心臓弁膜症は、僧帽弁や大動脈弁が罹患することが多いとされる。その病因としては、先天性・炎症性・虚血・老化・変性が挙げられる (Bedford, *et al.*, 1960, 杉浦昌也, 1973)。病理組織学的には、硝子化と著しく肥厚した血管を認め、病理組織学的に非常に多彩な所見を示す。心臓弁膜症患者の病因・進行度と病理学的因子との関連については未だ不明である点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、心臓弁膜症患者を対象とし、対象患者の口腔内より検出された菌、血液から検出された菌、心臓弁組織あるいは疣贅から検出された菌が同一クローンであるかの検討を行う。解析結果より、口腔内細菌と心臓弁膜症の病態、進行度、病理組織学的因子との関連を明らかにし、周術期口腔機能管理の有効性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 対象患者における口腔細菌の同定

シードスワブ 1 号 (昭和メディカルサイエンス) にて、歯肉・口蓋・頬粘膜・舌からぬぐい試験にて検体を採取する。スワブ検体から DNA を採取する。

2) 心臓弁検体からの DNA の抽出、病理組織像の観察

対象患者が、手術を行う際に摘出された心臓弁検体から DNA を抽出する。また、パラフィン包埋を行い、HE 染色にて病理組織像を観察する。

3) 抽出 DNA の断片化

超音波断片化装置 M220 (Covaris) を用いて、心臓弁膜症患者における手術時の摘出弁組織 (15 例)、同一患者の口腔内プラーク (5 例) から採取し、品質検定を行った DNA を断片化する。

Agilent 2100 Bioanalyzer により断片化した DNA のサイズを確認する。

4) 各サンプルのライブラリー調製

微量 (50 pg) DNA にも対応可能である、SMARTer® ThruPLEX® DNA-Seq Kit (TaKaRa) を用いて、末端修復および 3' 末端のアデニル化、アダプターのライゲーション、ライゲーション後の精製、ライブラリー増幅を行う。各ライブラリーの濃度計測を行い、シーケンスに最適な濃度に調整を行う。

5) 次世代シーケンサーを用いたシーケンス

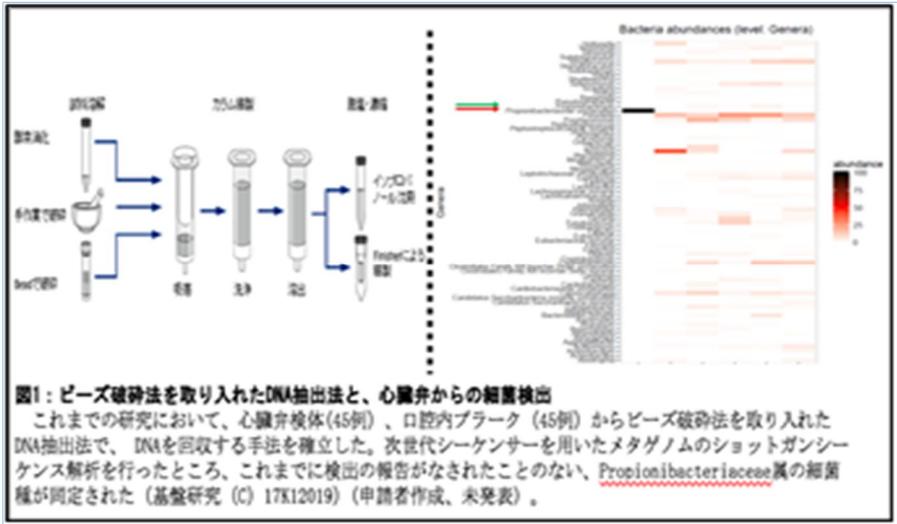
作製したライブラリーをフローセルに結合させ、シーケンサー HiSeq 2500 (イルミナ) を用いて、Sequencing by Synthesis 法による 2 色または 4 色蛍光検出により塩基配列を一挙に解読する。

6) 口腔内常在菌、心臓弁組織中の細菌のクローナリティーの解析、臨床病理像との関連の解析
平成 29、30 年の解析より得られた口腔内細菌、心臓弁組織中の細菌を比較し、同一菌種が同定されるか検討する。また、病因・進行度・病理組織学的所見との相関について解析する。

4. 研究成果

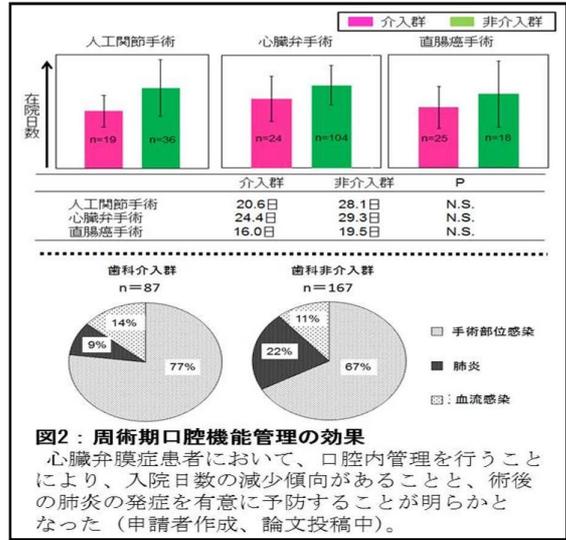
1) ビーズ破砕法を取り入れた DNA 抽出方法と、心臓弁からの細菌検出

申請者はこれまでの研究として、ビーズ破砕法を取り入れた DNA 抽出法で、心臓弁検体から DNA を回収する手法を確立した。さらに、予備研究として、心臓弁検体 5 症例について次世代シーケンサーを用いたメタゲノムのショットガンシーケンス解析を行ったところ、これまでに検出の報告がなされたことのない、Propionibacteriaceae 属の細菌種が同定された (図 1)。



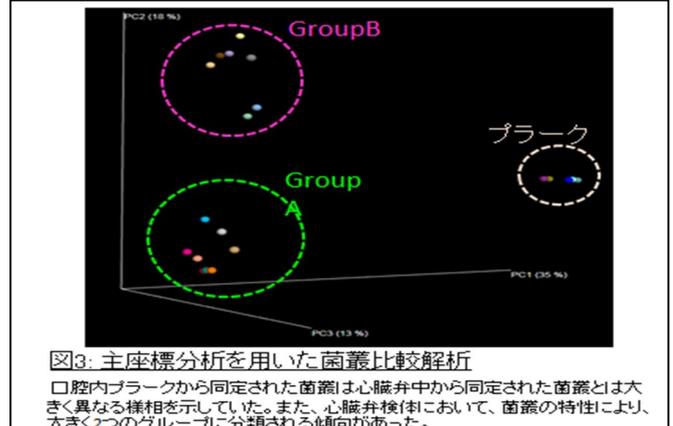
2) 周術期口腔機能管理の実際

心臓弁膜症手術後は感染性心内膜炎発症のリスクが上昇することから、歯性感染予防を目的として術前の歯科検診と治療が推奨されている。申請者らは、心臓弁膜症のため弁置換術を施行した患者について周術期口腔機能管理を行った群、行っていない群を比較した際に、在院日数が減少傾向にあることと、術後の医療関連感染の発症を減少させることを報告した(J. Jpn. Stomatol. Soc. 2020 Volume 69 Issue 1 Pages 22-28)(図2)。



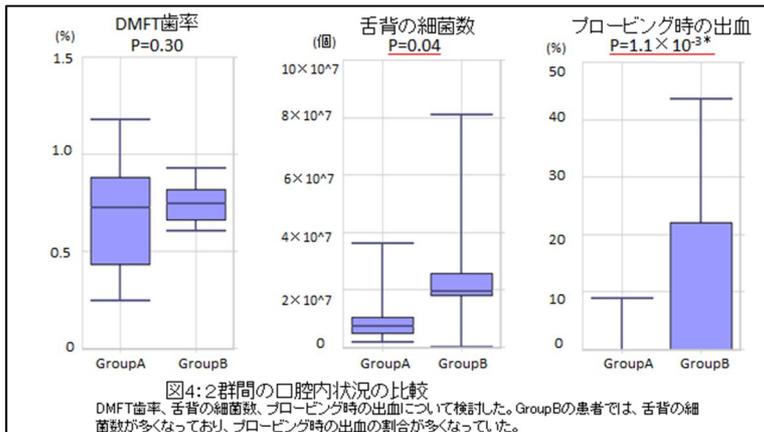
3) 主座標分析を用いた菌叢比較解析

メタゲノム解析から得られた菌叢データを基に主座標分析を行ったところ、口腔内プラークから同定された菌叢は心臓弁中から同定された菌叢とは大きく異なる様相を示していた。また、心臓弁検体において、菌叢の特性により、大きく2つのグループに分類される傾向があった(図3)。



4) 2群間の口腔内状況の比較

主座標分析で分類された2群について、口腔内状況の比較を行った。DMFT 歯率、舌背の細菌数、プロービング時の出血について検討を行ったところ、GroupB の患者では、舌背の細菌数が多くなっており、プロービング時の出血の割合が多くなっていった(図4)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 筑田 洵一郎, 葭葉 清香, 笹間 雄志, 安田 有沙, 八十 篤聡, 代田 達夫.	4. 巻 81
2. 論文標題 魚骨が舌背部に迷入した1例.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昭和学会誌	6. 最初と最後の頁 363-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14930/jshowaunivsoc.81.363	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 -
1. 著者名 宮本 栄也, 葭葉 清香, 朝倉 眞莉子, 池崎 かおり, 栗原 舞, 頌彦 玲子, 代田 達夫	4. 巻 81
2. 論文標題 慢性炎症性刺激が誘因と考えられた上顎洞内骨腫の一例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昭和学会誌	6. 最初と最後の頁 89-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14930/jshowaunivsoc.81.89	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 -
1. 著者名 葭葉 清香, 伏居 玲香, 糸瀬 昌克, 八十 篤聡, 代田 達夫	4. 巻 70
2. 論文標題 急性期病院における周術期口腔機能管理の現状と有用性 術後合併症に対する影響とリスク評価	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11277/stomatology.70.95	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 -
1. 著者名 葭葉清香, 伏居玲香, 糸瀬昌克, 八十篤聡, 代田達夫	4. 巻 69
2. 論文標題 急性期病院における周術期口腔機能管理の現状と有用性 - 術後合併症に対する影響とリスク評価 -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 22-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 葭葉清香、渡辺仁資、伏居玲香、糸瀬昌克、長崎理佳、八十篤聡、代田達夫	4. 巻 79
2. 論文標題 昭和大学横浜市北部病院 歯科・歯科口腔外科 開設後 8 年間における患者の臨床統計学的観察	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 昭和学士会雑誌	6. 最初と最後の頁 757-764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 葭葉 清香, 朝倉 眞莉子, 宮本 装也, 頌彦 玲子, 安田 有沙, 鈴木 麻衣子, 八十 篤聡, 鎌谷 宇明, 代田 達夫	4. 巻 80
2. 論文標題 骨吸収を伴った周辺性エナメル上皮腫の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 昭和学士会雑誌	6. 最初と最後の頁 265-270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 齊藤 芳郎, 勝田 秀行, 佐藤 仁, 守谷 崇, 葭葉 清香, 栗原 祐史, 河内奈穂子, 代田 達夫, 嶋根 俊和	4. 巻 80
2. 論文標題 歯科用コーンビームCTにて診断し得た上顎洞内遊離骨片の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 昭和学士会雑誌	6. 最初と最後の頁 277-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 葭葉 清香, 守谷 崇, 鈴木 麻衣子, 八十 篤聡, 武井 良子, 高橋 浩二, 鎌谷 宇明, 代田 達夫	4. 巻 80
2. 論文標題 舌縁に発生した神経鞘腫の1例 -術前後の舌運動訓練が奏功した1例-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 昭和学士会雑誌	6. 最初と最後の頁 422-429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 葎葉清香、伏居玲香、糸瀬昌克、八十篤聡、代田達夫	4. 巻 69
2. 論文標題 急性期病院における周術期口腔機能管理の現状と有用性 - 術後合併症に対する影響とリスク評価 -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 22-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11277/stomatology.69.22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 葎葉清香、渡辺仁資、伏居玲香、糸瀬昌克、長崎理佳、八十篤聡、代田達夫	4. 巻 6
2. 論文標題 昭和大学横浜市北部病院 歯科・歯科口腔外科 開設後 8 年間における患者の臨床統計学的観察	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 昭和学士会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sayaka Yoshiba, Takaaki Kamatani, Tatsuo Shirota	4. 巻 8
2. 論文標題 Temporal Fossa Abscess Caused by Apical Periodontitis: A Case Report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Open Journal of Clinical Diagnostics	6. 最初と最後の頁 47-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/ojcd.2018.84005	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 -

1. 著者名 Sayaka Yoshiba, Koki Takamatsu, Shinsuke Nakamura, Junichiro Chikuda, Naoko Kawachi, Tatsuo Shirota	4. 巻 8
2. 論文標題 A Case of Huge Fibroma in the Palate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Open Journal of Clinical Diagnostics	6. 最初と最後の頁 52-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/ojcd.2018.84006	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 -

1. 著者名 Sayaka Yoshiba, Hirofumi Nakagawa, Hirotaka Kuwata, Akihiro Nabuchi, Atsutoshi Yaso, Tatsuo Shirota	4. 巻 -
2. 論文標題 Metagenomic analysis of oral plaques and aortic valve tissues reveals oral bacteria associated with aortic stenosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-023-05053-8	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 -

1. 著者名 Sayaka Yoshiba, Hiromasa Hasegawa, Tetsuo Nemoto, Yuzo Abe, Takashi Moriya, Tatsuo Shirota	4. 巻 35
2. 論文標題 Maxillary extraskelatal Ewing sarcoma concurrent with non-small cell lung cancer: A case report and review of the literature	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 92-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2022.07.003	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15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 葭葉 清香, 伏居 玲香, 糸瀬 昌克, 八十 篤聡, 代田 達夫
2. 発表標題 急性期病院における周術期口腔機能管理の現状と有用性 術後合併症に対する影響とリスク評価
3. 学会等名 第75回NPO法人日本口腔科学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守谷崇, 佐藤仁, 葭葉清香, 勝田秀行, 嶋根俊和, 代田達夫
2. 発表標題 除皮質動脈韓流標本を用いた嚥下関連神経活動におけるイミダプリルの作用メカニズム
3. 学会等名 第66回 (公社)日本口腔外科学会 総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高松弘貴、河内菜穂子、田中元博、齊藤芳郎、葭葉清香
2. 発表標題 口腔内異常感と口腔カンジダ症の関連性について
3. 学会等名 第66回 (公社)日本口腔外科学会 総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兼田麻矢、木本未、大橋優子、守谷崇、宮本焜也、木村幸紀、葭葉清香
2. 発表標題 舌潰瘍のある患者に対してマウスガードの応用及び口腔衛生管理を実施し改善した例
3. 学会等名 北部医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葭葉 清香 , 伏居 玲香, 糸瀬 昌克1, 八十 篤聡1, 代田 達夫
2. 発表標題 昭和大学横浜市北部病院における周術期口腔機能管理の現状と有用性
3. 学会等名 第54回 NPO法人日本口腔科学会関東地方部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 葭葉 清香、桑田 啓貴、南淵 明宏、中川 博文、伏居 玲香、糸瀬 昌克、八十 篤聡、代田 達夫
2. 発表標題 メタゲノム解析を用いた大動脈弁の細菌叢解析と口腔内状況との関連
3. 学会等名 第65回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 祝部 亜紗美, 葎葉 清香, 宮本 綏也, 勝田 秀行, 齊藤 芳郎, 安部 勇蔵, 田中 元博, 池崎 かおり, 武田 健一, 代田 達夫
2. 発表標題 上唇にみられた血管平滑筋腫の1例
3. 学会等名 第208回(公社)日本口腔外科学会 関東支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葎葉清香
2. 発表標題 昭和大学横浜市北部病院における周術期口腔機能管理の現状とその効果について
3. 学会等名 第63回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田真優、葎葉清香
2. 発表標題 当科における骨吸収抑制薬使用患者に対する口腔管理システムの現状～第2報～
3. 学会等名 第9回北部医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葎葉 清香
2. 発表標題 口蓋にみられた巨大な線維腫の1例
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 葭葉清香, 宮本崧也, 氷見奈々絵, 稲田大佳暢, 田中元博, 堅田凌悟, 芳賀秀郷, 小倉 董, 榎 宏太郎, 代田達夫
2. 発表標題 顎矯正手術に伴う顔貌変化が認知に与える影響の検討
3. 学会等名 第32回特定非営利活動法人 日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河内奈穂子, 葭葉清香
2. 発表標題 歯性感染症から継発した脳膿瘍の一例
3. 学会等名 第31回日本有病者歯科医療学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 葭葉清香, 桑田啓貴, 中川博文, 南淵明宏, 伏居玲香, 糸瀬昌克, 八十篤聡, 代田達夫
2. 発表標題 メタゲノム解析を用いた大動脈弁の細菌叢解析と口腔内状況との関連
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野尚, 中島恵, 葭葉清香
2. 発表標題 粘液嚢胞と診断され、開窓療法5年後の小児患者に発症した口蓋粘表皮癌の1例
3. 学会等名 第34回 一般社団法人日本小児口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野尚, 中島恵, 藤本依里, 近藤周, 阿部田昇平, 山口潤, 葭葉清香
2. 発表標題 右頬部の腫脹を初発症状とした慢性活動性EBウイルス感染症(CAEBV)の一例
3. 学会等名 第67回 公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	鎌谷 宇明 (KAMATANI TAKAAKI) (00315003)	昭和大学・歯学部・准教授 (32622)	
研究分担者	椋代 義樹 (MUKUDAI YOSHIKI) (50325099)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	
研究分担者	栗原 祐史 (KURIHARA YUUJI) (90514969)	昭和大学・歯学部・兼任講師 (32622)	

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