

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17254

研究課題名(和文) 重度のう蝕病変部に定着したミュータンスレンサ球菌が全身に及ぼす影響の追究

研究課題名(英文) Investigation of systemic virulence caused by Streptococcus mutans colonization in severe carious lesions

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutansは主要なう蝕原性細菌であり、感染性心内膜炎(Inflective Endocarditis; IE)の起炎菌としても知られている。コラーゲン結合タンパク(Collagen-binding protein; CBP)はS. mutansの10～20%程度が発現しており、う蝕やIEの病原性に関与している。本研究では、重度のう蝕を生じさせたラットモデルを用いて、う蝕病変を介したIEの病原性を評価できる新たな動物実験系を確立した。また、CBP陽性のS. mutansが、う蝕病変部より歯髄腔を介して血液循環内に侵入し、IEの病原性に影響を及ぼす可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、口腔細菌が引き起こす全身疾患が注目を集めており、抜歯などの観血的処置によって口腔細菌が遠隔臓器へ到達すると考えられている。本研究では、重度のう蝕が生じることにより口腔細菌がう蝕病変部の歯髄腔より毛細血管を通じて血液循環内に侵入し、全身疾患の病原性に影響を及ぼす可能性を示すことができた。本研究により、口腔細菌が遠隔臓器へと至る新たな経路を提示できただけでなく、全身の健康維持における口腔ケアの重要性を提唱することにつながれると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans, a major pathogen of dental caries, is also considered to cause infective endocarditis (IE). Collagen-binding protein (CBP) has been identified on cell surfaces of approximately 10% to 20% of S. mutans strains, and is considered to be involved in bacterial pathogenicity for dental caries and IE. In the present study, using a newly developed rat model of severe dental caries, heart valve injury was performed for evaluation of IE. Our experimental results with those animals indicate that CBP-positive S. mutans may be a pathogenic factor for IE by invading from severe dental caries to the bloodstream via exposed pulp space.

研究分野：歯学

キーワード：感染性心内膜炎 ミュータンスレンサ球菌 コラーゲン結合タンパク う蝕 ラット

## 1. 研究開始当初の背景

近年、口腔細菌が引き起こす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。感染性心内膜炎 (Infective Endocarditis; IE) は歯科領域において最もよく知られた全身疾患の1つであり、抜歯などの観血的処置や日々のブラッシングにおける口腔内の出血が生じた際に、菌が血中に侵入することで生じるとされている。口腔内の出血によって菌血症が生じても、健常者においては免疫系の働きにより速やかに菌が排除されるため、一過性であることが多い。一方で、先天性心疾患を有する患者や人工弁置換術を行った患者では、傷害のある心内膜や弁膜において、血小板やフィブリンとともに菌が付着し、IEの発症に至る可能性があると考えられている。

*Streptococcus mutans* は、う蝕の主要な病原細菌であるとともに IE の原因細菌としても知られている。*S. mutans* の菌体表層タンパクとして分子量 120 kDa のコラーゲン結合タンパク (Collagen-binding protein; CBP) の存在が知られており、健常者の口腔内からは CBP 陽性の *S. mutans* が 10~20%程度検出されている。一方で、IE 患者から摘出された心臓弁検体では、CBP 陽性の菌株の DNA が高頻度で検出されることが明らかとなり、CBP 陽性の *S. mutans* が IE の病原性に関与している可能性が考えられた。これまでの研究成果から、CBP 陽性の *S. mutans* は血液成分中のフィブリノーゲンと反応し、血小板凝集を惹起して疣腫と呼ばれる細菌塊を形成することで IE の病原性に関与していることが明らかになった。IE の主要な合併症としては、脳血管疾患や腎障害などが知られており、実際に脳血管疾患に罹患した患者や IgA 腎症に罹患した患者の口腔内から、CBP 陽性の *S. mutans* が高頻度で検出されることが示された。このことから、CBP 陽性の *S. mutans* は脳や腎臓などの遠隔臓器においても病原性を示す可能性があると考えられた。

口腔細菌の遠隔臓器への主な侵入経路は、抜歯などの観血的処置によって生じる血管の露出部からと考えられてきた。そのため、これまでの IE に対する研究においては、右頸動脈よりカテーテルを挿入して人工的に心臓弁を傷害させた後、菌を血液中に投与するモデルが広く用いられていた。一方で、放置された重度のう蝕により歯髄腔内に定着した菌が血液循環内に持続的に侵入し、遠隔臓器へ到達する経路となっている可能性も考えられる。しかし、これまでに重度のう蝕と IE との関連性を示す報告はなく、検討する実験系も存在していなかった。そこで本研究では、これまでに構築してきたラットう蝕モデルとラット心臓弁傷害モデルを融合させた新たな動物実験系を確立し、重度う蝕病変部に存在する CBP 陽性の *S. mutans* が血液循環に侵入することで IE の病原性に与える影響について検討を行うこととした。また、IE における主要な合併症を生じることで知られている脳、腎臓などの各種遠隔臓器における病原性についても分析することを企画立案することとした。

## 2. 研究の目的

CBP 陽性の *S. mutans* をラットの口腔内に定着させて以下の評価を行う。

- (1)長期間飼育した際のラットにおける口腔内状態
- (2)心臓弁に傷害を与えた後、長期間飼育した際のラットにおける心臓の状態
- (3)心臓弁に傷害を与えた後、長期間飼育した際のラットにおける口腔と心臓の状態の相関
- (4)心臓弁に傷害を与えた後、長期間飼育した際のラットにおける各種遠隔臓器の状態

## 3. 研究の方法

本研究は、本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 24-019-0)

#### (1)供試菌および培養条件

CBP 陽性の *S. mutans* 臨床分離株である SA31 株(血清型 *k*)を用い、ストレプトマイシン(1,500 µg/mL) 耐性による標識付けを行った。Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地を用いて 37 で 18 時間培養後、滅菌生理食塩水に懸濁し菌量を調整して使用した。

#### (2)ラットの飼育条件

15 日齢の Sprague-Dawley ラットに抗菌薬を 3 日間投与することで口腔常在細菌を抑制した後、供試菌を  $1 \times 10^8$  CFU ずつ 1 日 1 回 5 日間ピペットにて経口投与することで口腔内に定着させた。実験開始から屠殺時まで 56%スクロース含有う蝕誘発性飼料を与えて飼育し、歯髄腔に及ぶ重度う蝕を誘発させた。90 日齢時に全身麻酔下にてラットの右頸動脈よりカテーテルを挿入し、心臓弁に傷害を生じさせた。その後、心臓弁傷害後の屠殺時期に準じて、1 週間群、1 か月群および 3 か月群の 3 群に分け、血液採取と顎骨および各種遠隔臓器の摘出を行った。一方で、対照群として心臓弁非傷害群および菌非感染群もあわせて飼育し、3 か月群と同時期に屠殺して血液採取と顎骨および各種遠隔臓器の摘出を行った。

#### (3)歯面に付着した *S. mutans* 菌数の評価

ラットより摘出した下顎骨の片側を 10mL の生理食塩水中に加え、10 分間超音波処理を行うことで *S. mutans* 株を下顎臼歯より生理食塩水中に分離した。その後、100mL を Mitis-Salivarius-Bacitracin (MSB) 寒天培地に播種し、嫌気下にて 37 で 48 時間培養することにより歯面に付着した *S. mutans* 菌数を分析した。

#### (4)う蝕歯数の評価

ラットより摘出した顎骨を用いて上下顎の片側 6 臼歯を実体顕微鏡下にて目視し、う蝕の深度を C1 から C4 の 4 段階で判定した。

#### (5)心臓における解剖学的評価および病理組織学的評価

ラットより摘出した心臓において心肥大の有無を評価した。その後、心臓を弁相当部で横断し、上半分を用いて組織切片を作製し、グラム染色および抗 CBP 抗体を用いた免疫染色による病理組織学的評価を行った。

#### (6)心臓における *S. mutans* の検出率の評価

分割した心臓の下半分を破碎し、1mL の生理食塩水中に加え、10 分間超音波処理を行うことで *S. mutans* を心臓から生理食塩水中に遊離させた。その後、100mL を MSB 寒天培地に播種し、嫌気下にて 37 で 48 時間培養することにより *S. mutans* 株の存在を分析した。

#### (7)口腔および心臓より検出された *S. mutans* 株の遺伝子型の評価

口腔および心臓の両方より *S. mutans* の存在が確認されたラットにおいては、それぞれの *S. mutans* のゲノム DNA を通法にて抽出した。5 種類のプライマーを用いて Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) 法を行い、電気泳動にて遺伝子増幅パターンの比較を行った。

#### (8)各種遠隔臓器での解剖学的評価および病理組織学的評価

脳、肺、腎臓および脾臓は、肉眼的に異常所見を評価した。その後、各種臓器の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織学的評価を行った。

#### (9)統計学的分析

ラットにおける群間比較に関しては、一元配置分散分析後、Bonferroni 法による多群間比較を行った。重度う蝕歯数と心臓の状態の相関に関しては、カイ二乗検定を用いた。有意水準を5%に設定し、全ての統計学的分析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)口腔における *S. mutans* のう蝕病原性

*S. mutans* を経口摂取させた全てのラットの口腔内より *S. mutans* の存在が確認され、3 か月群の口腔内の菌数は、1 週間群と比較して有意に多かった。また、歯髄まで到達したう蝕 (C3) および歯冠が完全に崩壊したう蝕 (C4) の歯数は、飼育期間に依存して有意に増加した。

#### (2)心臓における病原性

心肥大を生じたラットは飼育期間に依存して増加し、3 か月群では1 週間群と比較してその割合が有意に高かった。

#### (3)心臓からの *S. mutans* 株の分離

1 か月群および3 か月群において心臓より *S. mutans* 株が分離され、3 か月群では検出率が高い傾向が認められた。また、組織切片においてもグラム染色および免疫染色により CBP 陽性のグラム陽性菌の存在が確認された。さらに、心臓より検出された *S. mutans* は口腔内より分離された *S. mutans* と遺伝子パターンが一致した。

#### (4)重度う蝕歯数と心臓の状態の相関

C3 が片顎臼歯に6 本中5 本以上存在するラットおよびC4 が片顎臼歯に6 本中3 本以上存在するラットでは、心臓において *S. mutans* の存在が確認された確率が有意に高かった。

#### (5)各種遠隔臓器での病態

1 週間群、1 か月群および3 か月群において、肺の点状出血が認められたラットの割合が高かった。また、1 か月群において腎臓の白色化および腎臓と脾臓との癒着が認められた。さらに、1 か月群および3 か月群において脾臓の肥大も認められた。

これまでに、重度のう蝕と IE との関連性を示す報告はなく、検討する実験系も存在していなかった。しかし、本研究において、う蝕病変を介した IE の病原性を評価できる新たな動物実験系を確立できた。また、本研究結果より、長期にわたり重度う蝕が放置されることで、CBP 陽性の *S. mutans* 株は、う蝕病変部より歯髄腔を介して持続的に血液循環に侵入し、心臓弁傷害部位にて IE の病原性に影響を及ぼすことが示された。さらに、その他の遠隔臓器において病原性を示す可能性も示唆された。本研究では、口腔細菌による遠隔臓器への新たな侵入経路を提示できただけでなく、口腔衛生状態が全身疾患の病原性に影響を及ぼす可能性を示すことから、全身の健康維持における口腔ケアの重要性を提唱することにつながれると考えられる。

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 Nomura R, Matayoshi S, Otsugu M, Kitamura T, Teramoto N, Nakano K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Contribution of severe dental caries induced by Streptococcus mutans to the pathogenicity of infective endocarditis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	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） 10.1128/IAI.00897-19.	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 3件）

1. 発表者名 Matayoshi M, Otsugu M, Nomura R, Nakano K.
2. 発表標題 Streptococcus mutans associated with severe dental caries Induces infective endocarditis.
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the International Association for Dental Research（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nomura R, Matayoshi S, Otsugu M, Kitamura T, Nakano K.
2. 発表標題 Systemic evaluation of rat model of simultaneous dental caries and infective endocarditis.
3. 学会等名 The 66th Congress of the European Organization for Caries Research（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 又吉紗綾、大継將寿、野村良太、仲野和彦
2. 発表標題 重度齲蝕によって誘発されるラット感染性心内膜炎新規モデルの構築
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matayoshi S, Otsugu M, Nomura R, Nakano K
2. 発表標題 Streptococcus mutans-induced infective endocarditis in severe dental caries model rats
3. 学会等名 The 66th annual meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pedo/research/index.html">http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pedo/research/index.html</a>
---

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