

齶蝕原性細菌によって引き起こされる 感染性心内膜炎

野村 良太・仲野 和彦

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（小児歯科学教室）*

受付日：2018年8月23日 受理日：2018年10月29日

感染性心内膜炎は、弁膜や心内膜に疣腫と称される細菌を含む塊を形成し、血管塞栓や心不全症状などの多彩な臨床症状を呈する全身性敗血症性疾患である。侵襲的な歯科治療や日々のブラッシングなどによる口腔内の出血は、感染性心内膜炎発症の誘引となることが知られている。口腔レンサ球菌のうち主要な齶蝕病原性細菌である *Streptococcus mutans* は、感染性心内膜炎の主要な原因菌の一つであり、血清学的に c, e, f および k の4型に分類される。口腔から分離される *S. mutans* のうち、約70~80%はc型、約20%はe型であるのに対し、f型やk型の *S. mutans* はわずか5%以下しか存在しないことが知られている。一方で、菌血症や感染性心内膜炎を発症した患者の血液や心臓弁から *S. mutans* の検出を試みたところ、口腔とはまったく異なる血清型分布が認められた。そこで、菌体表層構造を詳細に分析したところ、f型やk型の *S. mutans* ではコラーゲン結合タンパクである Cnm および Cbm を発現している株が多く存在することが明らかになった。これらのコラーゲン結合タンパク陽性の *S. mutans* は、血管内皮細胞への高い付着侵入能やフィブリノーゲンを介した血小板凝集を誘導するとともに、ラット感染性心内膜炎モデルにおいて心臓弁に菌塊を伴う疣腫を形成した。さらに、細断したウシの心臓弁表面に *S. mutans* の菌塊を形成させることにより、簡易的に多くの菌の病原性をスクリーニングすることのできる *ex-vivo* 評価法の構築に成功した。これらの研究成果から、ある種の *S. mutans* が感染性心内膜炎のリスクファクターとなることが明らかとなり、そのような菌による口腔から血液中への侵入を防ぐために、定期的な歯科検診や歯科治療への積極的な介入が歯科領域において重要であることが示唆された。

Key words: *Streptococcus mutans*, serotype, collagen-binding protein, infective endocarditis

はじめに

拔牙や歯石除去（スクレーピング）などの歯科治療を行った際に、口腔細菌が血液中に侵入し菌血症を生じることが古くから知られている¹⁾。最近では、齶蝕や歯周病による歯科疾患の進行や、食事やブラッシングなどの日常生活において、口腔内に出血が生じた際にも菌血症が生じていると考えられている²⁾。健常者の場合、菌血症が生じた直後に菌は免疫系により排除され大きな問題となることはほとんどない

が、心臓に基礎疾患を有する対象においては菌血症から感染性心内膜炎を発症することがある¹⁾。感染性心内膜炎は発症率の高い疾患ではないが、発症した場合には弁膜や心内膜に疣腫と呼ばれる血小板、フィブリンおよび細菌からなる塊を形成するとともに多くの合併症を引き起こし、高い死亡率を呈する疾患として知られている¹⁾。

感染性心内膜炎の主要な原因菌として、口腔レンサ球菌、黄色ブドウ球菌、腸球菌などが知られており、国内では感染性心内膜炎患者の心臓弁や血液中

*大阪府吹田市山田丘 1-8

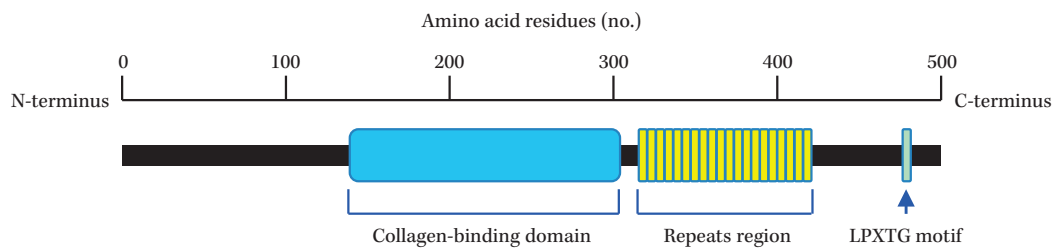


Fig. 1. Illustration of the putative structures of the collagen-binding proteins of *S. mutans*.

からは口腔レンサ球菌が最も高い頻度で検出される³⁾。口腔レンサ球菌属の中では、ミテイスグループに属する *Streptococcus sanguinis* や *Streptococcus mitis* が亜急性の感染性心内膜炎の原因菌として最もよく知られているが、主要な齧蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* はこれらに次いで分離される⁴⁾。*S. mutans* が感染性心内膜炎の原因菌であることは以前から知られているにもかかわらず、発症のメカニズムの詳細についてはあまりわかっていない。本稿では、口腔レンサ球菌のうち *S. mutans* により生じる感染性心内膜炎に着目し、これまでの著者らの研究成果を中心に解説する。

I. *S. mutans* の菌体表層構造

S. mutans の菌体表層には、ラムノースポリマーの主骨格にグルコースポリマーの側鎖が結合する構造の血清型特異多糖抗原が存在し、側鎖の主骨格への結合様式の違いによって血清型 *c*、*e* および *f* 型の3型に分類されてきた^{5,6)}。2004年に著者らの研究グループが、グルコースポリマーの側鎖が認められずラムノースポリマーの主骨格のみが存在する *S. mutans* を同定し *k* 型と定義したことから、現在 *S. mutans* の血清型は4型に分類されるにいたっている⁷⁾。

健常者の口腔内から分離された *S. mutans* における血清型分布は、*c* 型が約70~80%、*e* 型が約20%の頻度であるのに対し、*f* 型と *k* 型はわずか5%以下とされている⁷⁾。一方で、1990年代前半に抜歯後菌血症の患者もしくは感染性心内膜炎の患者の血液から分離された4株の *S. mutans* の血清型は、*e* 型と *f* 型がそれぞれ1株ずつで残りの2株は *k* 型に分類され、口腔分離株とはまったく異なる血清型分布を示した⁷⁾。また、2004年から2006年の間に感染性心内膜炎を発症した患者において、心臓弁置換術の際に摘出された心臓弁から細菌DNAを検出し

た研究では、*S. mutans* 陽性であった7検体のうち5症例で *k* 型に対する陽性反応を示すことが明らかとなっている⁸⁾。

II. *S. mutans* のコラーゲン結合タンパク

1993年に、口腔より分離された *S. mutans* の約20%にI型コラーゲンに結合する菌株が存在することが報告された⁹⁾。このことから、一部の *S. mutans* は歯の表面のエナメル質だけでなく、エナメル質の下層に存在しI型コラーゲンを豊富に含む象牙質にも付着能を有し、象牙質や歯根面に生じた齧蝕にもかかわっている可能性が示された。その後2004年になって、*S. mutans* の菌体表層に存在する分子量約120 kDaのコラーゲン結合タンパクである Cnm が同定された¹⁰⁾。次いで2012年には、著者らのグループが *S. mutans* における第2のコラーゲン結合タンパクとして Cbm を同定した¹¹⁾。現在までに、諸外国で分離された *S. mutans* 株においても、Cnm と Cbm の存在が確認されてきている¹²⁾。

Cnm と Cbm はほぼ同じ分子量からなり、コラーゲン結合ドメイン、繰り返し領域および細胞壁に結合するための LPXTG 配列を基本構造とする¹¹⁾ (Fig. 1)。コラーゲン結合能の主たる役割を果たすと考えられるコラーゲン結合ドメインは、Cnm と Cbm の間で高い相同性を示すが、繰り返し領域の配列は Cnm と Cbm の間で異なり、繰り返しの数も菌株によりさまざまである。これらのコラーゲン結合ドメインは、*S. mutans* と並んで感染性心内膜炎の主要な原因細菌として知られる黄色ブドウ球菌の一種である *Staphylococcus aureus* や腸球菌の一種である *Enterococcus faecalis* のコラーゲン結合タンパクなどとも相同性を有する¹¹⁾。

コラーゲン結合タンパク陽性の *S. mutans* は、心臓弁を構成する主要な成分であるI型およびIII型

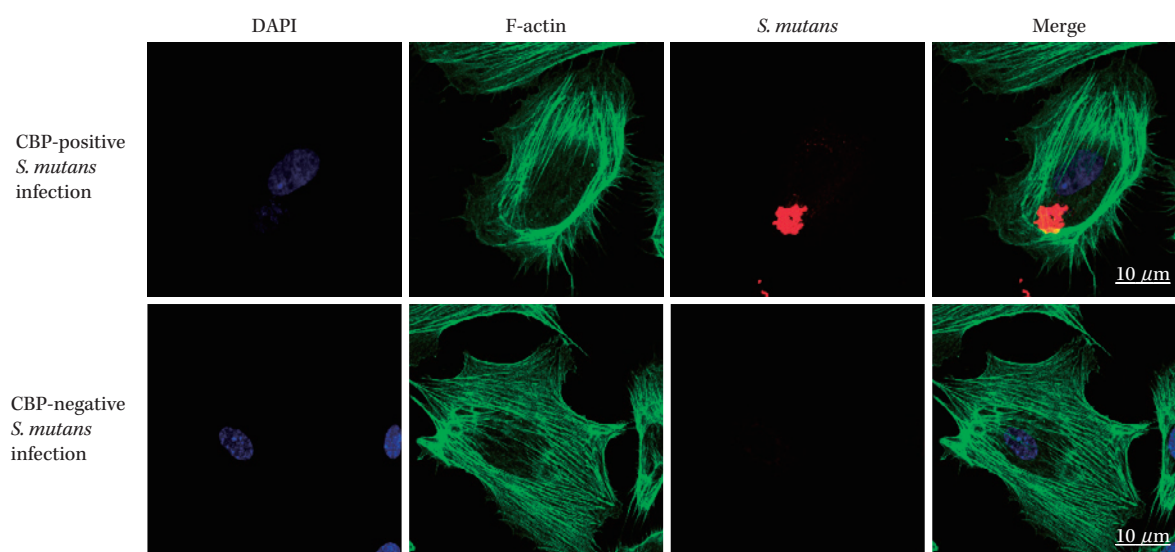


Fig. 2. Invasion of human umbilical vein endothelial cells by *S. mutans*.

CBP; collagen-binding protein. Nuclei are stained in blue, F-actin in green, and bacterial cells invaded of human umbilical vein endothelial cells in red.

コラーゲンや、血管内皮細胞下に存在する基底膜の主成分であるIV型コラーゲンに結合能を示すとともに^{10,13}、ヒト臍帯静脈内皮細胞やヒト冠動脈内皮細胞への高い付着侵入能を示した^{13,14}(Fig. 2)。また、コラーゲン結合タンパク陽性の *S. mutans* は、歯髄線維芽細胞への高い付着侵入能も示したことから、重度の齶蝕により露出した歯髄に付着した後に血流を介して菌血症を生じるリスクとなると考えられた¹⁵。このような細胞への付着侵入能は、コラーゲン結合タンパク陰性の *S. mutans* ではほとんど認められない。

III. 臨床サンプルからの *S. mutans* のコラーゲン結合タンパクの検出

500株以上の口腔由来の *S. mutans* 臨床分離株(日本人由来約300株、フィンランド人由来約100株、タイ人由来約150株)を用いた分析から、Cnm陽性の *S. mutans* 株は、健常者の口腔において13%の頻度で、Cbm陽性の *S. mutans* 株は2%の頻度で存在が確認された¹¹。これまでに、*S. mutans* のコラーゲン結合能にかかわるとされるCnmおよびCbm以外のタンパクについても報告されているが¹⁶、約500株のうちCnmあるいはCbmを発現しない口腔分離株では、強固なコラーゲン結合能を有する株は認められなかった。一方、CnmあるいはCbmを発現する *S. mutans* では、*S. mutans* のス

クロース非依存性の初期付着にかかわるタンパク抗原であるProtein antigen (PA)の発現がきわめて弱い菌株が約25%の割合で認められた¹⁷。PA陰性でコラーゲン結合タンパク陽性の *S. mutans* では、PA陽性でコラーゲン結合タンパク陽性の *S. mutans* と比較して、コラーゲン結合能や血管内皮細胞への付着侵入能が増強することが明らかになり、PAがコラーゲン結合タンパクのネガティブレギュレーターとして働いている可能性が考えられた¹⁷。

コラーゲン結合タンパクと血清型との関連性については、c型およびe型ではコラーゲン結合タンパク陽性の *S. mutans* 株は10%以下であり、f型およびk型では約75%もの *S. mutans* 株がコラーゲン結合タンパク陽性であることが示されている¹¹。このうち、Cnm陽性の *S. mutans* 株はf型に分類されることが多く、Cbm陽性の *S. mutans* 株はk型に分類されることが多いことが明らかとなっている。

口腔外から分離された *S. mutans* に関しては、前述の血液から分離された4株の *S. mutans* のうちk型に分類された2株において、いずれもCnmの発現が確認されている¹⁸。また、2004~2012年にかけて、感染性心内膜炎の診断のもと摘出された心臓弁のうち、*S. mutans* の細菌DNAが検出された8症例について分析したところ、5症例においてCbm

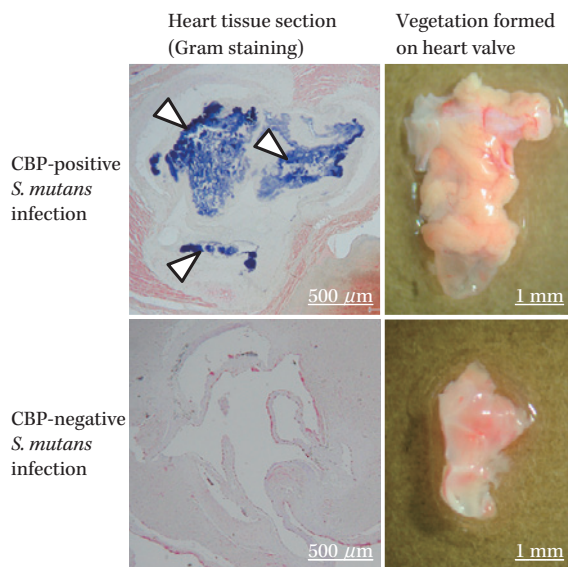


Fig. 3. Evaluation of extirpated heart specimens infected with *S. mutans*. CBP; collagen-binding protein. Arrowheads indicate bacterial masses.

をコードする *cbm* 遺伝子断片が検出され、1 症例において *Cnm* をコードする *cnm* 遺伝子断片が検出された¹³⁾。

IV. *S. mutans* のフィブリノーゲン結合能

フィブリノーゲンは、血小板上の GPIIb/IIIa (α IIb β 3 インテグリン) と呼ばれる糖タンパクに結合して血小板どうしをつなげ、血小板凝集を誘導し創傷部位の止血に関与することが知られている。コラーゲン結合タンパク陽性の *S. mutans* のうち、主に Cbm を発現している菌株では、血漿中の濃度に相当する 2~4 mg/mL のフィブリノーゲンに対する結合能が認められるとともに、フィブリノーゲン存在下において高い血小板凝集反応を示した¹⁹⁾。このことから、Cbm 陽性 *S. mutans* は、フィブリノーゲンを架橋として血小板凝集を誘導し心臓弁での菌塊形成に関与していると考えられる。Cbm をコードする *cbm* 遺伝子の中央部に抗菌薬耐性遺伝子を挿入し不活化させた *S. mutans* では、フィブリノーゲン結合能は失われることから、Cbm はフィブリノーゲン結合タンパクとしても機能していることが示された。

V. 動物モデルを用いた検討

S. mutans の感染性心内膜炎における病原性の評価を行うために、10 週齢の Sprague-Dawley 系ラッ

トを用いて、全身麻酔下にて右頸動脈よりカテーテルを挿入し左心室方向から大動脈弁に人工的に傷害を与えることにより、心臓に基礎疾患を有するラットモデルを作製した¹⁹⁾。この直後に、反対側の頸静脈から *S. mutans* を感染させた後、飼育を続けることにより感染性心内膜炎を誘発させた。このラット心臓弁傷害モデルに Cbm 陽性 *S. mutans* 株を感染させた場合においては、感染 6 日目にすべてのラットが死亡した。摘出した心臓を大動脈弁相当部で横断し、組織切片を作製しグラム染色を行ったところ多数の菌の心臓弁への付着が認められた (Fig. 3)。一方で、Cbm を人工的に不活化した *S. mutans* を感染させたラットにおいては、1 週間後に屠殺して評価を行った際に心臓弁への菌の付着はまったく認められなかった。また、心臓弁の傷害を生じさせないラットでは、Cbm 陽性 *S. mutans* 株を感染させても心臓弁への菌の付着はまったく認められなかった。また、左心室と心筋組織に接する白色を呈する疣腫とともに大動脈弁を摘出し重量を測定したところ、Cbm 陽性 *S. mutans* 株感染群において心臓弁の肥大が確認された。

VI. ウシ心臓弁を用いた *ex-vivo* 評価法

ラット感染性心内膜炎モデルはヒトに近い病態を再現できる反面、高度な処置技術を必要とするために行うことのできる施設が限られており、多くの *S. mutans* 株を用いた評価は困難であることから、*S. mutans* の病原性をより簡易的にスクリーニングできる方法の構築を行った²⁰⁾。コラーゲン結合タンパク陽性の *S. mutans* は、ヒトやウシ由来の血清に対して凝集反応を示すが、血清を不活化することにより凝集反応は認められなくなることから²⁰⁾、この凝集反応はコラーゲン結合タンパク陽性の *S. mutans* による補体への結合の結果生じていると考えられている。この凝集能の詳細なメカニズムや臨床的意義は明らかとされていないが、凝集の程度とラット感染性心内膜炎モデルにおける病原性の強さとの間には相関が認められた。

この凝集反応を応用して、リン酸緩衝生理食塩水に溶解した *S. mutans* にヒトやウシ由来の血清を 10% の濃度となるよう添加したものを、ウシの心臓から採取し 5 mm 四方に細断した心臓弁に加えることにより *ex-vivo* 評価法を構築した。*S. mutans* と血清を添加した 3 時間後には、コラーゲン結合タ

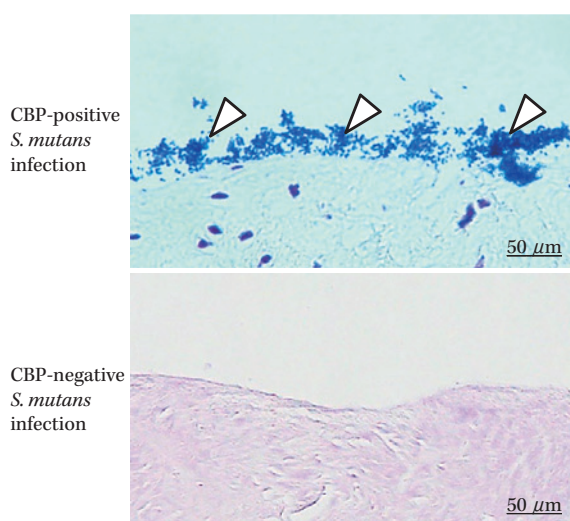


Fig. 4. Histopathological images of an *ex-vivo* adherence model following Gram staining of tissue sections of a bovine heart valve specimens infected with *S. mutans* in the presence of serum.

CBP: collagen-binding protein. Arrowheads indicate bacterial masses.

ンパク陽性の *S. mutans* ではウシの心臓弁の表面に菌塊形成が生じたのに対して、コラーゲン結合タンパク陰性の *S. mutans* では反応時間を延長しても菌塊はほとんど認められなかった (Fig. 4)。この菌塊の形成の程度は、ラット感染性心内膜炎モデルにおける病原性の強さと相関が認められたことから、この *ex-vivo* 評価法は *S. mutans* の病原性の簡易的評価法として有効であることが示唆された。

おわりに

マイナーな血清型に分類され、コラーゲン結合タンパクを発現する特殊な *S. mutans* の発見により、ある種の *S. mutans* が感染性心内膜炎において高いリスクとなることが明らかとなってきた。歯科医師である著者らが改訂に参加した『感染性心内膜炎の予防と治療に関するガイドライン (2017年改訂版)』において、歯科処置による菌血症の発症率は抜歯ではほぼ100%であり、歯石除去でも高率であるとされている²¹⁾。このことから、感染性心内膜炎のリスクとなる基礎疾患を有する患者に観血的歯科治療を行う際には、予防的抗菌薬投与を行うことが強く推奨されている。一方、*S. mutans* は抗菌薬に対する感受性が比較的高いが、口腔清掃不良により

歯面にバイオフィームが形成されると、抗菌薬はバイオフィーム内の菌まで浸透することができず除菌は困難になる。また、口腔清掃状態が不良だと、日々のブラッシングによる歯肉からの出血が生じやすくなるとともに、齲蝕の進行により歯髄が露出することにより口腔細菌は容易に血液中へと侵入できるようになると考えられる。これらのことから、感染性心内膜炎のリスクとなるような基礎疾患を有する患者にとって、口腔清掃や定期的な歯科検診および歯科治療への早期介入は健常者以上に重要であり、口腔細菌の血液中への侵入を極力抑えるために歯科医師が務めるべき役割は大きいと考えられる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文献

- 1) Seymour R A, Lowry R, Whitworth J M, Martin M V: Infective endocarditis, dentistry and antibiotic prophylaxis; time for a rethink? *Br Dent J* 2000; 189: 610-6
- 2) Roberts G J, Gardner P, Simmons N A: Optimum sampling time for detection of dental bacteraemia in children. *Int J Cardiol* 1992; 35: 311-5
- 3) Nakatani S, Mitsutake K, Ohara T, Kokubo Y, Yamamoto H, Hanai S: CADRE Investigators: Recent picture of infective endocarditis in Japan—lessons from Cardiac Disease Registration (CADRE-IE)–. *Circ J* 2013; 77: 1558-64
- 4) Nakano K, Nomura R, Ooshima T: *Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases. *Jpn Dent Sci Rev* 2008; 44: 29-37
- 5) Schleifer K H, Kilpper-Bälz R, Kraus J, Gehring F: Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and “Mutans-like” streptococci. *J Dent Res* 1984; 63: 1047-50
- 6) Coykendall A L, Gustafson K B: Taxonomy of *Streptococcus mutans*. In Hamada S, Michalek M, Kiyono H, Menaker L, Mcghee J R (eds.), *Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1986; 21-8
- 7) Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T: Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, *k*, in the human oral cavity. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 198-202
- 8) Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Mukai T, Yoshioka H, Shudo Y, et al: Detection of novel serotype *k* *Streptococcus mutans* in infective endocarditis patients. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1413-5
- 9) Switalski L M, Butcher W G, Caufield P C, Lantz M S: Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin. *Infect Immun* 1993; 61: 4119-25

- 10) Sato Y, Okamoto K, Kagami A, Yamamoto Y, Igarashi T, Kizaki H: *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. J Dent Res 2004; 83: 534-9
- 11) Nomura R, Nakano K, Naka S, Nemoto H, Masuda K, Lapidattanakul J, et al: Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. Mol Oral Microbiol 2012; 27: 308-23
- 12) Esberg A, Sheng N, Mårell L, Claesson R, Persson K, Borén T, et al: *Streptococcus mutans* Adhesin Biotypes that Match and Predict Individual Caries Development. EBioMedicine 2017; 24: 205-15
- 13) Nomura R, Naka S, Nemoto H, Inagaki S, Taniguchi K, Ooshima T, et al: Potential involvement of collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* in infective endocarditis. Oral Dis 2013; 19: 387-93
- 14) Abranches J, Miller J H, Martinez A R, Simpson-Haidaris P J, Burne R A, Lemos J A: The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. Infect Immun 2011; 79: 2277-84
- 15) Nomura R, Ogaya Y, Nakano K: Contribution of the collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* to bacterial colonization of inflamed pulp. PLoS One 2016; 11: e0159613
- 16) Avilés-Reyes A, Miller J H, Lemos J A, Abranches J: Collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* and related streptococci. Mol Oral Microbiol 2017; 32: 89-106
- 17) Nomura R, Naka S, Nemoto H, Otsugu M, Nakamura S, Ooshima T, et al: Potential high virulence for infective endocarditis in *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins but lacking PA expression. Arch Oral Biol 2013; 58: 1627-34
- 18) Nakano K, Lapidattanakul J, Nomura R, Nemoto H, Alaluusua S, Grönroos L, et al: *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2007; 45: 2616-25
- 19) Nomura R, Otsugu M, Naka S, Teramoto N, Kojima A, Muranaka Y, et al: Contribution of the interaction of *Streptococcus mutans* serotype *k* strains with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis. Infect Immun 2014; 82: 5223-34
- 20) Otsugu M, Nomura R, Matayoshi S, Teramoto N, Kakano K: Contribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins in the presence of serum to the pathogenesis of infective endocarditis. Infect Immun 2017; 85: e00401-17
- 21) 中谷 敏, 芦原京美, 泉 知里, 岩永史郎, 江石清行, 大地 裕, 他: 感染性心内膜炎の予防と治療に関するガイドライン (2017年改訂版). 2018
http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2017_nakatani_h.pdf

Infective endocarditis induced by a major pathogen of dental caries

Ryota Nomura and Kazuhiko Nakano

Department of Pediatric Dentistry, Osaka University Graduate School of Dentistry, 1-8 Yamada-oka, Suita, Osaka, Japan

Infective endocarditis is a systemic septic disease characterized by embolization and heart failure, with the formation of bacterial masses called vegetations on the heart valves or endocardium. Bleeding from the oral cavity induced by invasive dental treatments or daily routine tooth brushing is thought to be a risk factor for the occurrence of infective endocarditis. *Streptococcus mutans*, a major pathogen of dental caries, is also known to be involved in the etiology of infective endocarditis; this bacterium is serologically classified into four serotypes, the *c*, *e*, *f* and *k* serotypes. Serotype *c* is the major type in oral isolates, with a distribution frequency of approximately 70% to 80%, followed by serotype *e* (frequency of approximately 20%); the distribution frequencies of serotypes *f* and *k* are lower than 5%. On the other hand, the serotype distribution of *S. mutans* in the blood or extirpated heart valves taken from patients with bacteremia or infective endocarditis was totally different from that in the oral cavity. Detailed analyses focusing on the cell surface structure of *S. mutans* revealed that collagen-binding proteins (CBP), such as Cnm and Cbm, were frequently identified in the serotype *f* and *k* strains. Some of the CBP-positive *S. mutans* strains show high levels of adhesion to and invasion of vascular endothelial cells, and induce platelet aggregation in the presence of fibrinogen, resulting in the formation of prominent vegetations in a rat model of infective endocarditis. Furthermore, an *ex-vivo* model with *S. mutans* strains adhering to bovine heart valves cut into small pieces was constructed, which may be a useful tool to evaluate the virulence of many bacterial strains for screening purposes. These results suggest that specific *S. mutans* strains show high virulence for causing infective endocarditis, and that it is therefore important for dentists to prevent invasion of the bloodstream by bacteria from the oral cavity.