



Title	ラットにおける Streptococcus mutans 誘発性重度う蝕が及ぼす感染性心内膜炎に対する病原性の検討
Author(s)	又吉, 紗綾
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/82164">https://doi.org/10.18910/82164</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

ラットにおける *Streptococcus mutans* 誘発性重度  
う蝕が及ぼす感染性心内膜炎に対する病原性の検討

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻  
口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室

又 吉 紗 綾

## はじめに

感染性心内膜炎 (Infective endocarditis; IE) は、歯科領域で最もよく知られた全身疾患の 1 つであり、血液中に侵入した細菌が心内膜や弁膜において疣腫と呼ばれる塊を形成することで、全身性の炎症を誘発する疾患として知られている (Moreillon と Que, 2004)。日本国内における大規模調査から、IE 発症の誘引は不明なものを除き歯科処置が最大であるとされている (Nakatani ら, 2003)。特に、心疾患患者では心内膜や弁膜に内皮傷害を生じやすく、侵襲的な歯科処置で生じる菌血症によって、IE 発症リスクが高いことが知られている。IE の原因細菌のうち口腔由来のものとしては、口腔レンサ球菌がほとんどであるとされている (Moreillon と Que, 2004; Nakatani ら, 2003)。

う蝕の主要な原因細菌である *Streptococcus mutans* は、グラム陽性通性嫌気性のレンサ球菌であり (Hamada と Slade, 1980)、抜歯などの侵襲的な歯科処置により血液中に侵入して IE を誘発することがある (Nakano と Ooshima, 2009)。*S. mutans* の菌体表層には、分子量約 120 kDa のコラーゲン結合タンパク (Collagen-binding protein; CBP) を発現するものが存在しており (Nomura ら, 2012)、血管内皮細胞や内皮傷害部位に付着しやすいことから IE に対する病原性への関与が取りざたされている (Nomura ら, 2013; Nomura ら, 2014)。実際に、IE に罹患した患者から摘出された心臓弁検体のうち *S. mutans* 陽性の症例由来のものでは、CBP タンパクをコードする遺伝子が高頻度に検出されている (Nomura ら, 2013)。

IE の研究には、人工的に心臓弁を傷害したラットやウサギに供試菌を血中投与するモデルが広く用いられている (Jung ら, 2012; Nomura ら, 2014; Xiong ら, 2016)。これらのモデルは、抜歯のような侵襲的な歯科処置で生じる一過性の菌血症に起因する IE の病態を反映している。一方で、う蝕が進行して歯髄腔まで達することで、口腔細菌は露出した毛細血管を通じて持続的に血流に侵入できるようになることが知られている (Nakatani ら, 2019)。しかし、このような病態を再現することができるモデルについては未だ検討されておらず、詳細な発症機序の解明には至っていない。

本研究では、ラットの口腔に *S. mutans* 株を定着させた後、スクロースを摂取させながら長期飼育することで歯髄腔まで及ぶ重度う蝕を誘発させ、少ない菌量ではあるが持続的に血流に侵入できるモデルを構築した。その後、全身麻酔下にてラットの頸動脈よりカテーテルを挿入して、心臓弁に人工的に傷害を形成させた。このモデルを用いて、う蝕病変部に存在する *S. mutans* が及ぼす IE に対する影響について、CBP 陽性株に着目して評価することとした。

## 材料と方法

### 1. 供試菌と培養条件

フィンランド・ヘルシンキ大学小児歯科 Alaluusua 教授より供与を受けたフィンランド人からの口腔分離株であり CBP 陽性の *S. mutans* である SA31 株 (血清型 *k*) (Nakano ら, 2007) を使用した。まず、Fitzgerald ら (1960) の方法を用いて、SA31 株にストレプトマイシン (1,500 µg/mL) 耐性を付与して SA31R 株と命名し供試菌とした。SA31R 株は、ストレプトマイシン (1,500 µg/mL; Meiji Seika ファルマ, 東京) を添加した 10 mL の Brain Heart Infusion 液体培地 (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MO, USA) にて 37°C で 18 時間培養を行い、実験に使用した。

### 2. ラット重度う蝕モデルを用いた IE の病原性の検討

#### 1) 重度う蝕の誘発

ラットモデルを用いた検討は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会 (承認番号; 動物-24-019-0) の承認を得て行った。図 1 に実験プロトコールを示す。最初に、Specific pathogen-free (SPF) の Sprague-Dawley (SD) 系ラット (15 日齢オス; 日本クレア, 東京) に対して、滅菌蒸留水にペニシリン (4,000 単位/mL; Meiji Seika ファルマ) を添加し、普通食 (Rodent Diet CE-2; 日本クレア) にはテトラサイクリン塩酸塩 (4 mg/g; 富士フイルム和光純薬, 大阪) を混合して、3 日間自由に摂取させた。その後、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS; 137 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 富士フイルム和光純薬) を用いて OD<sub>550</sub> = 1.0 (1×10<sup>9</sup> CFU/mL 相当) に調整した SA31R 株の培養液を 100 µL ずつ 1 日 1 回 5 日間、ピペットを用いて経口投与することで菌を口腔内に定着させた。全てのラットに対して、スクロース 56% 含有う蝕誘発性飼料 (Diet 2000; 日本エスエルシー株式会社) を与え、重度う蝕を誘発させるために従来の飼育期間より 17 日延長した 90 日齢まで飼育することとした。

#### 2) 菌の定着評価

25 日齢の時点において、ラットの臼歯部を滅菌綿棒を用いて擦過し、1 mL 生理食塩水の入った滅菌試験管に浸漬した。その後、超音波洗浄器 (US-103, エスエヌディ, 長野) にて 10 分間の超音波処理を行った。この溶液を Mitis-Salivarius (MS) 寒天培地 (Difco Laboratories, 東京) にバシトラシン (0.2 U/mL; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) と 15% (w/v) スクロース (富士フイルム和光純薬) およびストレプトマイシン (1,500 µg/mL) を添加したストレプトマイシン含有 MSB 寒天培地に 100 µL ずつ播

種し、37℃ で 48 時間、窒素 95%、炭酸 5%の条件下で嫌氣的に培養した後、寒天培地上のコロニー形態を実体顕微鏡 (SZ2-ILST; OLYMPUS, 東京) にて確認した。

### 3) 心臓弁の傷害および実験群の設定

図 2 に実験プロトコールを示す。1) にて重度う蝕を誘発させた 90 日齢ラット (体重: 450~550g) に、Nomura ら (2014) の方法を用いて心臓弁の傷害を行った。まず、キシラジン (20 mg/mL; バイエル薬品, 大阪) とミダゾラム (5 mg/mL; 第一三共, 東京) を 1:1 で混和した混合液 0.1 mL/100g を用いて筋肉注射による全身麻酔を行った。その後、右頸動脈より左心室方向に 18G 留置針外筒のカニューレーションよりガイドワイヤーを挿入し、大動脈弁を傷害させた。処置終了後、切開部は 5-0 ナイロン糸による縫合を行った。傷害後、1 週間後に屠殺した群 (A 群, n=11)、1 か月後に屠殺した群 (B 群, n=11) および 3 か月後に屠殺した群 (C 群, n=12) を設定した。また、C 群と同じ飼育期間において、大動脈弁に傷害を与えない群 (D 群, n=11)、SA31R 株を定着させない群 (E 群, n=11)、大動脈弁の傷害も SA31R 株の感染も行わない群 (F 群, n=11) を設定した。

### 4) 顎骨検体の評価

歯垢染色液 (SUNSTAR, 大阪) を用いて上顎骨検体に付着したデンタルプラークを染め出して水洗した。その後、Quigley と Hein (1962) の方法を用いて実体顕微鏡下において顎骨を観察し、頬側面、咬合面および口蓋側面のデンタルプラークの付着を 0 (プラークを認めない)、1 (プラークが歯面の 1/3 未満)、2 (プラークが歯面の 1/3 以上 2/3 未満)、3 (プラークが歯面の 2/3 以上) のスコアにて評価して平均値を算出した。下顎骨検体は片側に滅菌生理食塩水 10mL を加え、超音波洗浄器にて 10 分間の超音波処理を行った懸濁液を、ストレプトマイシン含有 MSB 寒天培地に 100 μL ずつ播種した。37℃で 48 時間、窒素 95%、炭酸 5%の条件下で嫌氣的に培養した後、寒天培地上のコロニー数を目視下にて計測した。その後、上顎骨および下顎骨をオートクレーブ (トミー精工, 東京) にて 121℃、2 気圧でそれぞれ 10 分間の加熱処理を行った後、軟組織を除去した。実体顕微鏡下にてう蝕を観察し、エナメル質に限局しているう蝕を C1、象牙質におよぶう蝕を C2、歯髓腔に達するう蝕を C3 および歯冠が崩壊しているう蝕を C4 と判定し (図 3)、上下顎片側 6 臼歯中の C3 歯数および C4 歯数を測定した。さらに、Kuremoto ら (2014) の方法を用いて、マイクロ CT (R-mCT2; リガク, 東京) にて 90kV、160μA の条件下で上下顎片側を撮影した。撮影した画像から、Three-Dimensional Reconstruction Imaging for Bone (TRI/3D-BON) system (Ratoc, 東京) を用いて根尖病巣部を抽出し、体積を算出した。

## 5) 血液検体の評価

ラットから採取した血液を用いて、4°Cで10分、3,000 rpm の遠心分離を行うことで血清を回収した。Widal ら (1896) の方法を用いて、スライドガラス (松浪硝子工業, 大阪) 上にて血清 3  $\mu$ L を OD<sub>550</sub> = 1.0 に調整した SA31R 株の培養液 10  $\mu$ L と混和し、10分静置後に凝集反応が生じているか目視下にて確認した。

## 6) 心臓検体の評価

心臓検体は重量を測定後に大動脈弁相当部にて横断し、下半分を粉砕して滅菌生理食塩水を 1 mL 加え、超音波洗浄器にて 10 分間の超音波処理を行った。その後懸濁液をストレプトマイシン 含有 MSB 寒天培地に 100  $\mu$ L ずつ播種し、37°Cで48時間、窒素 95%、炭酸 5%の条件下で嫌氣的に培養した後に寒天培地上のコロニー数を目視下にて計測した。

次に、心臓検体の上半分を 10% 中性緩衝ホルマリン液 (富士フィルム和光純薬) により固定し、パラフィン包埋を行った後、3  $\mu$ m の厚さでスライスして組織切片を作成した。この組織切片を用いて、ヘマトキシリン・エオジン染色により病理組織学的検討を行った。病理組織学的所見として、心室中隔および右心室における炎症性細胞浸潤、巣状壊死、線維化および血栓、右冠動脈における壊死および血栓、大動脈弁における壊死、肥厚、血管内膜の増殖、単核細胞の増加および線維化の 11 項目において 0 (なし)、1 (軽度)、2 (中等度)、3 (重度) の 4 段階で評価を行った (Ito ら、2006)。全てのスコアは病理組織学者 (セプトサピエ, 東京) によって二重盲検法にて行われた。

さらに、グラム染色によりグラム陽性菌の確認を行った後、抗 CBP 抗体を用いた免疫染色を行い (Nomura ら, 2013)、CBP 抗体に陽性反応を示す菌の存在の確認を行った。免疫染色においては、組織切片はキシレン (富士フィルム和光純薬) による脱パラフィン処理後、105°C に設定した恒温乾燥器 (Labostar CONVENTION OVEN LC-112; タバイ, 大阪) を用いて抗原賦活化液 (RM102-C; LSI メディエンス, 東京) を 1 時間作用させた。0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.6; LSI メディエンス) にて洗浄を行い、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (富士フィルム和光純薬) と Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) に含まれる 2.5% 馬血清を用いて心臓切片のブロッキングを行った後、PBS を用いて 1600 倍希釈を行った抗 CBP 抗体と 4°C にて 12 時間作用させた。次に、Vectastain ABC kit の二次抗体を添加して、室温にて 30 分間インキュベートを行った後、対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。標本封入材 (マウントクイック; 大道産業, 埼玉) を用いて封入し、システム生物顕微鏡 (BX53; OLYMPUS) を用いて観察した。

## 7) 遠隔臓器検体の評価

脳検体、肺検体、腎臓検体および脾臓検体は肉眼像から解剖学的異常所見の有無を判定した。全ての判定は実験動物技術者 (OSU, 大阪) によって行われた。摘出されたそれぞれの臓器は重量を測定した後に組織切片の作成を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて病理組織学的評価を行った。肺検体は、細気管支における炎症性細胞浸潤、呼吸上皮細胞の増生、管腔内の炎症性細胞浸潤、呼吸上皮細胞の単細胞死および脂肪浸潤、終末細気管支における炎症性細胞浸潤、呼吸細気管支における炎症性細胞浸潤および乳頭腫、肺胞における炎症性細胞浸潤、脱落粘膜上皮、出血および石灰化、肺血管における炎症性細胞浸潤、色素沈着、浮腫、水腫様変性、空砲変性および異栄養性石灰化、被膜における肥厚および炎症性細胞浸潤の 20 項目において評価した。また、腎臓検体は炎症性細胞浸潤、再生上皮、線維化、壊死、硝子円柱および石灰化の 6 項目、脾臓検体は肥厚、髄外造血、壊死、色素沈着および被膜肥厚の 5 項目において評価した。全ての項目において 0 (なし)、1 (軽度)、2 (中等度)、3 (重度) の 4 段階で評価を行い、病理組織学者(セプトサピエ)によって二重盲検法にて行われた (Ito ら、2006)。

## 8) 口腔細菌叢の特定

### (1) 口腔細菌叢のゲノム DNA の抽出

下顎骨の懸濁液を用いて、Nakano ら (2004) の方法に従い Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて以下のように行った。下顎骨の懸濁液中の菌を遠心分離で回収し、250  $\mu$ L の Glu-TE Buffer (1 M グルコース, 10 mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール, 1 mM エチレンジアミン四酢酸; 富士フィルム和光純薬) に懸濁した。この懸濁菌液 250  $\mu$ L に、N-アセチルムラミダーゼ (2.0 mg/mL; 生化学工業, 東京) 62.5  $\mu$ L と塩化リゾチーム (10 mg/mL; 富士フィルム和光純薬) 0.25  $\mu$ L を加え、37°C で 90 分間反応させた。その反応液に、Cell Lysis Solution (QIAGEN) 600  $\mu$ L を加えて 80°C で 5 分間反応させた後、RNase (10 mg/mL; QIAGEN) 3  $\mu$ L を添加して 37°C で 30 分間静置し、Protein Precipitation Solution (QIAGEN) を 200  $\mu$ L 加えてボルテックスにて 20 秒間激しく懸濁させた。この反応液を遠心分離して得た上清に、600  $\mu$ L のイソプロパノール (富士フィルム和光純薬) を混和し、再度遠心分離を行った。得られた沈殿を 70%エタノール (富士フィルム和光純薬) にて洗浄して乾燥後、DNA Hydration Solution (QIAGEN) 100  $\mu$ L に溶解した。

### (2) 口腔細菌叢の 16S rRNA のシーケンス解析

Marques da Silva ら (2006) の方法を用いて、Broad-range Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による 16S rRNA のシーケンス解析を行った。表 1 に示した PA および PD プライマー、TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> (タカラバイオ, 滋賀) およびサーマルサイクラー (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて抽出したゲノム DNA を増幅した後、QIAEX II gel extraction kit (QIAGEN) を用いて DNA フラグメントを抽出し、pGEM-T Easy ベクター (Promega, Madison, WI, USA) にライゲーションした。氷上で融解した *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  株 (ニッポンジーン, 東京) 90 $\mu$ L に得られたプラスミド溶液 10  $\mu$ L を混和し、氷中で 20 分静置した。その後、42°C で 40 秒間反応させ、再び氷中で 2 分間冷却した。この反応液に 400  $\mu$ L の SOC 液 (2% Triptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Sucrose; 富士フイルム和光純薬) を加え、37°C で 1 時間震盪培養した。この培養液を Luria-Bertani (1% Triptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl, 富士フイルム和光純薬) に 1.5% の寒天粉末 (富士フイルム和光純薬) およびエリスロマイシン (100  $\mu$ g/mL, 富士フイルム和光純薬) を添加した LB 寒天培地を用いて 37°C で一晩培養した。LB 寒天培地に得られたコロニーをエリスロマイシン (100  $\mu$ g/mL) 含有 LB 液体培地にピックアップし、37°C で 18 時間培養後、FastGene Plasmid mini kit (日本ジェネティクス, 東京) を用いてプラスミド抽出を行った。得られたプラスミドを株式会社ファスマック (神奈川) に送付し、Big Dye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、BigDye Xterminator (Thermo Fisher Scientific) および 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いたシーケンス解析を行った。得られた 16S rRNA シークエンスは、Gapped BLAST 2.0.5 (Thermo Fisher Scientific) を用いて National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) から取得されたデータベースのシーケンスと比較し、菌種を特定した。

#### 9) 顎骨検体および心臓検体から分離した *S. mutans* の遺伝子増幅パターンの評価

顎骨検体および心臓検体から分離した *S. mutans* を BHI 液体培地にて 37°C で 18 時間培養した後に遠心分離で集菌して、先述の方法を用いてゲノム DNA の抽出を行った。得られたゲノム DNA 溶液は、Nano Drop One (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定後 20  $\mu$ g/mL に調整して使用した。Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) 法 (Masuda ら, 2012; Nemoto ら, 2013) によりゲノム DNA の遺伝子増幅パターンを判定した。表 1 に示した 5 つのプライマーおよび TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> を用いて、95°C で 1 分の熱変性後に 36°C で 1 分のアニーリング、72°C で 1 分の伸長反応を 45 サイクル行った。その後、TAE 緩衝液にアガロース S を 1.5% となるように加えて加熱溶解したものを電気泳動用のゲルとして使用し、DNA サイズマーカーは 100 bp ラダー (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) を用いて 100 V 定電圧で電気泳動を行った。PCR 産物は臭化エチジウム溶液と 15 分間反応させて、FAS4 ゲル撮影装置 (日本ジェネティクス) を用いて波長 312 nm の紫外線照射下で可視化した。

## 10) 統計学的分析

結果は平均±標準誤差で示した。統計学的分析には、Stat view 5.0 (SAS Insutitute Inc., Cary, NC, USA) もしくは Prism 6 (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA, USA) を用いた。2 群間における統計学的有意差の検定には Student の  $t$  検定もしくは Fisher の正確確率検定を用い、多群間の比較には ANOVA の後 Bonferroni 法もしくはカイ二乗検定を用いた。全ての分析において、有意水準 5%以下の場合を有意差ありとした。

## 結果

### 1. 異なる飼育期間における病原性の検討

#### 1) 顎骨検体の評価

プラークインデックスは飼育期間が長期になるほど増加が認められ、C 群は A 群および B 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ ) (図 4)。顎骨検体から分離された *S. mutans* 菌数は、B 群は A 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ ) (図 5)。また、下顎骨のう蝕は飼育期間が長期化するにつれて歯質の実質欠損が増加し、C 群では歯冠崩壊が認められた (図 6)。C3 以上の歯数および C4 歯数は、飼育期間の長さに伴って高い値を示し、C 群は A 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ ) (図 7、8)。一方で、根尖病巣の体積は飼育期間が長期化するほど値は増加する傾向にあったが、有意差は認められなかった (表 2)。

#### 2) 血液検体の評価

抗原抗体反応の結果、C 群の全ての血清が CBP 陽性 *S. mutans* の培養液と凝集反応を示し、A 群および B 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (図 9)。

#### 3) 心臓検体の評価

心臓から *S. mutans* が分離された割合は飼育期間の長さに伴って増加し (図 10)、心臓からは 20~1,000 CFU の *S. mutans* が分離されたが、A から C の各群に有意差は認められなかった (図 11)。グラム染色による病理組織学的評価により、心臓から *S. mutans* が分離された 5 匹のラットのうち 2 匹ではグラム陽性菌の存在が確認され (図 12A)、CBP 抗体を用いた免疫染色により陽性反応を示した (図 12B)。一方で、ヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織学的評価において、それぞれのスコアに有意差は認められなかった (表 3)。

#### 4) 遠隔臓器の評価

A から C 群における全てのラットの脳検体において、異常所見は認められなかった (図 13)。肺検体では、点状出血が A 群、B 群および C 群の約半数に認められた (表 4、図 14)。脾臓検体および腎臓検体においては、B 群および C 群の一部のラットに脾臓と腎臓の癒着や脾臓の白色化といった異常所見が認められた (表 4、図 15)。また、体重に対する脾臓重量比は、B 群において A 群および C 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ ) (図 16)。また、各臓器におけるヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織学的評価から、肺検体の細気管支において炎症性細胞浸潤、呼吸上皮細胞増生および単細胞死の各評価項目に異常所見が認められ、B 群においてそれぞれの値が最大となった (表 5、図 17)。それに対して、腎臓検体や脾

臓検体に関しては A から C 群の全てのラットにおいて明らかな異常所見は認められなかった（表 6、7）。

## 2. 重度う蝕の誘発および心臓弁傷害の有無による病原性の検討

### 1) 顎骨検体の評価

*S. mutans* を口腔内に定着させた C 群および D 群は、*S. mutans* を定着させていない E 群および F 群と比較して有意に高いプラークインデックスを示し ( $P < 0.001$ ) (図 18)、*S. mutans* は C 群および D 群の顎骨検体のみから分離された (図 19)。また、C 群および D 群には歯髄に到達し歯冠の崩壊を伴う重度う蝕が多数認められたのに対し、E 群および F 群では主に咬耗や軽度う蝕が認められる程度であった (図 20)。C3 以上の歯数は、C 群および D 群では E 群および F 群と比較して有意に高い値を示し ( $P < 0.001$ )、C 群は D 群と比較して、C3 以上の歯数と C4 歯数の両方で有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (図 21、22)。そこで、C 群および D 群における心臓弁傷害による口腔細菌叢への影響を比較するために Broad-range PCR 法を用いたシーケンス解析を行った。いずれの群においても *Escherichia* 属と *Enterobacter* 属が主要な構成細菌であったが、*Pasteurellaceae* 属は C 群に特異的に検出され、*Klebsiella* 属は D 群特異的に検出された (表 8)。

### 2) 血液検体の評価

C 群および D 群においてはほとんど全ての血清で CBP 陽性 *S. mutans* との抗原抗体反応による凝集反応を生じたが、*S. mutans* を口腔内に定着させていない E 群および F 群では全ての血清で凝集反応は認められなかった (図 23)。

### 3) 心臓検体の評価

D 群の心臓検体から *S. mutans* が分離される割合は C 群よりも減少し、E 群および F 群では *S. mutans* は分離されなかった (図 24)。一方、C 群および D 群から分離された *S. mutans* 数は、20~100 CFU であった (図 25)。また、体重に対する心臓重量比は、C 群では E 群および F 群と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (図 26)。

## 3. 重度う蝕と心臓の病態における関連性の検討

### 1) 顎骨検体および心臓検体由来の *S. mutans* における関連性

RAPD 法により、顎骨検体および心臓検体から分離された *S. mutans* 株の遺伝子増幅パターンは全てのプライマーで一致した (図 27)。また、顎骨検体から分離された

*S. mutans* 数は、心臓検体から *S. mutans* が分離されたラットにおいて、分離されなかったラットと比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) (図 28)。

## 2) 口腔と心臓の病態における関連性

心臓検体から *S. mutans* が分離されたラットにおける C3 以上の歯数および C4 歯数は、*S. mutans* が分離されなかったラットと比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )

(図 29、30)。また、C3 以上の歯数が片顎 6 臼歯中に 5 本以上存在するラットでは 4 本以下のラットと比較して、心臓検体から *S. mutans* が分離される割合が有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (図 31)。さらに、C4 歯数が片顎 6 臼歯中に 2 本以下しか存在しないラットと比較して、3 本以上存在するラットでは心臓検体から *S. mutans* が分離される割合が有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (図 32)。

## 考察

口腔細菌が IE を引き起こす経路としては、抜歯などの侵襲的な歯科処置があげられ、出血により露出した毛細血管から細菌が侵入することが知られている (Seymour ら, 2000)。このような病態を想定した動物実験として、ラットやウサギの心臓弁をカテーテルで人工的に傷害後、頸動脈から供試菌を投与するモデルが用いられている (Jung ら, 2012; Nomura ら, 2014; Xiong ら, 2016)。一方で、これまでによく意識されてきた観血的な歯科処置に加えて、う蝕の進行も IE のリスクの 1 つと認識されている (Nakatani ら, 2019)。具体的には、う蝕が歯髓腔まで及ぶことにより、歯髓腔における毛細血管を通じて口腔細菌は血液中に侵入できるようになる。しかし、放置している重度のう蝕病変から、少量ながら持続的に菌が血流に侵入する状況を想定したモデルは検討されていない。本研究では、*S. mutans* を口腔に定着させて歯髓腔まで及ぶ重度のう蝕を誘発させた上で、心臓弁を人工的に傷害させることにより、*S. mutans* による重度う蝕に起因した IE が発症する可能性を検討することにした。

*S. mutans* の菌体表層に発現する CBP タンパクは、健常者の口腔において約 10～20% の頻度で認められる (Nomura ら, 2012)。CBP タンパクは、コラーゲン結合ドメイン、繰り返し領域を基本構造として、LPXTG モチーフにより菌の細胞壁に結合しており、CBP タンパクの存在によって *S. mutans* 株は心臓弁を構成する主要な成分である I 型および III 型コラーゲンや、血管内皮細胞下に存在する基底膜の主成分である IV 型コラーゲンに対する高い結合能を示す (Nomura ら, 2012; Nomura ら, 2013)。また、IE に罹患した患者から摘出された心臓弁検体のうち *S. mutans* の細菌 DNA が検出された 8 症例を用いた分析では、CBP をコードする遺伝子断片は 6 症例から検出されている (Nomura ら, 2013)。このような背景から、CBP 陽性 *S. mutans* である SA31 株を供試菌として重度のう蝕を誘発させ、IE の病態に影響を及ぼしている可能性を検討することにした。

これまでのラットう蝕モデルでは、56% スクロース配合う蝕誘発性粉末飼料を約 2 か月間与え続けることで、臼歯部に生じたう蝕の評価を行ってきた (Ooshima ら, 1998)。この飼育期間では、象牙質に及ぶう蝕は認められるものの、歯髓腔まで及ぶ重度う蝕はほとんど生じない。一方で、本研究では重度う蝕の誘発によって、歯髓腔に露出した毛細血管からの持続的な菌血症を生じさせることが必要だったため、従来のモデルにおける飼育期間を延長していくことにした。その結果、歯髓腔に及ぶ重度う蝕を呈した歯の割合は、飼育開始から約 3 か月後の時点では約 20% であり、心臓弁からは菌株が分離されなかった。また、飼育期間を約 4 か月まで延長した場合には、約 50% の臼歯が

重度う蝕の状態を呈したが、心臓から菌株が分離されたラットは 10% 以下であった。さらに、飼育開始から約 6 か月後の時点では、重度う蝕を誘発した臼歯は約 70% まで増加し、30% 以上のラットの心臓から菌株が分離された。これらのことから、重度う蝕に罹患した歯数と心臓からの菌株の分離率は正の相関を示し、重度のう蝕を長期的に放置するほどう蝕病変部に存在する *S. mutans* が心臓へと到達するリスクが増加することが示唆された。

臨床において IE の確定診断を行うに当たり、Duke 診断基準が広く用いられている (Nakatani ら, 2019)。Duke 診断基準では、血液培養もしくは病理組織学的に心臓弁に細菌の存在が確認されることと、心エコーもしくは病理組織学的に疣腫の存在など心臓弁に明らかな異常所見が認められることの 2 つが、IE の確定診断を行う上で最も重要であるとされている。本研究におけるラットモデルでは、長期的に多数の重度う蝕が放置された場合において、傷害を与えた心臓弁から *S. Smutans* 株が分離された。一方で、摘出した心臓においては、明らかな疣腫の形成や IE に典型的な病理組織学的な異常所見は認められなかった。以上のことから、本研究のモデルでは心臓弁における *S. mutans* 株の定着は認められたが、疣腫の形成や組織破壊に至るほどの IE の進行には至っておらず、軽度の IE もしくは IE 様病変が生じていることが示された。

IE は何らかの基礎心疾患を有する症例に認められることが多いが、稀に心疾患の既往のない症例でも IE を発症することがある (Sun ら, 2015)。IE における高病原性菌として黄色ブドウ球菌が主要な起炎菌として知られている (van der Meer ら, 1992; Castillo ら, 2002)。本研究では、傷害を与えていないラットの心臓検体から *S. mutans* が分離されるラットが存在した。本研究で用いた *S. mutans* 株の CBP タンパクの中央部に存在するコラーゲン結合ドメインは、黄色ブドウ球菌のコラーゲン結合タンパクである Cna と約 50% の相同性を有する (Nomura ら, 2012)。ラットを用いた動物実験において、Cna 陽性黄色ブドウ球菌は IE に対して高い病原性を有することが明らかとなっている (Hienz ら, 1996)。また、CBP 陽性 *S. mutans* は心臓弁の表層を覆う血管内皮細胞への高い付着能を有することから (Nomura ら, 2012)、CBP タンパクが傷害を与えていない心臓弁に付着して IE の発症に関与している可能性が考えられた。本研究結果から、CBP 陽性 *S. mutans* による重度のう蝕を長期的に放置することは、基礎疾患のない心臓においても IE 発症のリスクとなり得ることが示唆された。

*S. mutans* が露出した歯髄腔から血液中に侵入したことを示すために、ラットから採取した血液を *S. mutans* 選択培地に播種し培養を行ったが、生菌の存在は確認できなかった。一方で、ラットから採取した血清と CBP 陽性 *S. mutans* から抽出した CBP 抗原とを反応させたところ、重度う蝕を誘発したラットの血清では CBP 抗体に対する陽

性反応を示す凝集塊の形成が認められた。さらに、RAPD 法を用いた分析結果から、顎骨検体および心臓検体由来の *S. mutans* の遺伝子パターンは、顎骨検体由来の *S. mutans* の遺伝子パターンと完全に一致した。これらの結果から、重度う蝕病変部に存在する *S. mutans* が血液中を介して心臓に到達した可能性が高いことが示されたものの、*S. mutans* の歯髄腔から毛細血管への侵入は少量かつ断続的であったため、血液から菌が分離されるには至らなかったと考えられる。

心疾患患者では、健常者と比較してう蝕罹患率が有意に高いとの報告がある (Cantekin ら, 2013)。本研究で重度う蝕を誘発させたラットにおいて、心臓弁に傷害を与えた群では傷害を与えなかった群と比較して、有意に高い重度う蝕菌数が認められた。それにもかかわらず、顎骨検体より分離された *S. mutans* 菌数は各群で有意差を認めなかった。そこで、う蝕の重症化に伴う口腔細菌種の変化を明らかにするために、Broad-range PCR 法を用いたシーケンス解析によって各群の口腔細菌種の比較を行った。その結果、重度う蝕病変部のような低 pH 環境下においても生存することのできるウレアーゼ産生菌である *Pasteurellaceae* 属の細菌が、心臓弁の傷害を与えた群で特異的に検出された。このことから、ラットの心臓弁を傷害することによって口腔内の *S. mutans* 以外の構成細菌叢に何らかの変化が生じた結果、う蝕の重症化を生じた可能性がある。その詳細を明らかにするために、今後は次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を応用して、口腔細菌叢の網羅的解析を行う必要があると考えられる。

本研究では、IE による合併症の好発部位として知られる脳、肺、腎臓および脾臓に着目して (Nakatani ら, 2019)、解剖学および病理組織学的に遠隔臓器の評価を行った。その結果、心臓弁傷害後 1 か月飼育したラットにおいて、肺の点状出血および脾臓の肥大化が多数認められたが、これらの異常は飼育 3 か月後には消失した。また、脳や腎臓では各群に異常所見は認められなかった。臨床的には、IE を発症後に適切な治療を受けずに重篤化すると、遠隔臓器に様々な合併症を引き起こすことが知られている (Nakatani ら, 2019)。本研究におけるラットの心臓弁では、組織破壊などの IE の重篤な所見を認められなかったことから、結果として遠隔臓器における重篤な合併症を生じるには至らなかったと考えられる。

本研究では、口腔内に定着させた CBP 陽性 *S. mutans* が重度のう蝕病変部において露出した毛細血管を通じて持続的に侵入することによって、軽度の IE もしくは IE 様病変が生じる可能性が示された。この病原性が CBP 陽性 *S. mutans* に特異的なものであることを示すために、今後は複数の CBP 陽性 *S. mutans* および CBP 陰性 *S. mutans* を用いた検討を行う必要がある。また、CBP タンパク自体が病原性に関与することを示すためには、CBP タンパクをコードする遺伝子を不活化した株および遺

伝子の再導入を行った相補株を用いた検討や、リコンビナント CBP タンパクのみで病態悪化を引き起こすかどうかの検討も必要であると考えている。さらに、本研究で構築したラットモデルを用いて、臨床で起こり得る状況を想定した上で様々な蝕の程度や心臓弁傷害の状態を再現して、さらなる詳細な検討を行いたいと考えている。

## 結論

ラット重度う蝕モデルを構築し、CBP 陽性の *S. mutans* 株である SA31 株の IE 発症に関する検討を行ったところ、以下の結果が得られた。

1. *S. mutans* SA31 株を口腔内に定着後に心臓弁を傷害させたラットでは、長期飼育を行うことでう蝕が重症化するほど、心臓からの菌株の分離率が上昇した。
2. 心臓検体から *S. mutans* SA31 株が分離されたラットにおいても、心臓弁に疣腫の形成はほとんど認められなかった。
3. *S. mutans* SA31 株を口腔内に定着後に長期飼育を行うことでう蝕が重症化すると、心臓弁を傷害させていない一部のラットの心臓からも菌株が分離された。

以上のことから、重度う蝕病変部に定着した CBP 陽性の *S. mutans* 株が歯髄腔の毛細血管を通じて持続的に侵入することにより、軽度の IE もしくは IE 様病変が生じる可能性が示された。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇意なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室 仲野 和彦 教授に心から謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、終始様々な御指導と御校閲をいただきました同教室 野村 良太 准教授、大継 将寿 助教に厚く御礼申し上げます。さらに、動物実験における研究に関して様々なご教示をいただきました株式会社オーエスユーの 寺本 昇 先生に深く感謝いたします。

最後になりましたが、終始研究に対し御理解と御協力をいただいた、大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- Cantekin, K., I. Cantekin and Y. Torun.** 2013. Comprehensive dental evaluation of children with congenital or acquired heart disease. *Cardiol. Young* 23, 705-710.
- Castillo, J. C., M. P. Anguita, F. Torres, D. Mesa, M. Franco, E. González, S. Ojeda, M. Delgado and F. Vallés.** 2002. Comparison of features of active infective endocarditis involving native cardiac valves in nonintravenous drug users with and without predisposing cardiac disease. *Am. J. Cardiol.* 90, 1266-1269.
- Fitzgerald, R. J. and P. H. Keyes.** 1960. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J. Am. Dent. Assoc.* 61, 9-19.
- Hamada, S. and H. D. Slade.** 1980. Biology, Immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44, 331-384.
- Hienz, S. A., T. Schennings, A. Heimdahl and J. I. Flock.** 1996. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *J. Infect. Dis.* 174, 83-88.
- Ito, H.** 2006. Infective endocarditis and dental procedures: evidence, pathogenesis, and prevention. *J. Med. Invest.* 53, 189-198.
- Jung, C. J., C. Y. Yeh, C. T. Shun, R. B. Hsu, H. W. Cheng, C. S. Lin and J. S. Chia.** 2012. Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing *Streptococci* on the injured heart valve. *J. Infect. Dis.* 205, 1066-1075.
- Kuremoto, K., R. Noiri, T. Ishimoto, N. Yoneda, R. Yamamoto, H. Maezono, T. Nakano, M. Hayashi and S. Ebisu.** 2014. Promotion of endodontic lesions in rats by a novel extraradicular biofilm model using obturation materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3804-3810.

- Marques da Silva, R., D. A. Caugant, E. R. K. Eribe, J. A. Aas, P. S. Lingaas, O. Geiran, L. Tronstad and I. Olsen.** 2006. Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. *J. Vasc. Surg.* 44, 1055-1060.
- Masuda, K., H. Nemoto, K. Nakano, S. Naka, R. Nomura and T. Ooshima.** 2012. Amoxicillin-resistant oral streptococci identified in dental plaque specimens from healthy Japanese adults. *J. Cardiol.* 59, 285-290.
- Moreillon, P and Y. A. Que.** 2004. Infective endocarditis. *Lancet* 363, 139-149.
- Nakano, K., R. Nomura, N. Shimizu, I. Nakagawa, S. Hamada and T. Ooshima.** 2004. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype *k* strains. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4925-4930.
- Nakano, K., J. Lapidattanakul, R. Nomura, H. Nemoto, S. Alaluusua, L. Grönroos, M. Vaara, S. Hamada, T. Ooshima and I. Nakagawa.** 2007. *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2616-2625.
- Nakano, K and T. Ooshima.** 2009. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol.* 4, 891-902.
- Nakatani, S., K. Mitsutake, T. Hozumi, J. Yoshikawa, M. Akiyama, K. Yoshida, N. Ishizuka, K. Nakamura, Y. Taniguchi, K. Yoshioka, K. Kawazoe, M. Akaishi, K. Niwa, M. Nakazawa, S. Kitamura and K. Miyatake, Committee on Guideline for Prevention and Management of Infective Endocarditis, Japanese Circulation Society.** 2003. Current characteristics of infective endocarditis in Japan an analysis of 848 Cases in 2000 and 2001. *Circ. J.* 67, 901-905.
- Nakatani, S., T. Ohara, K. Ashihara, C. Izumi, S. Iwanaga, K. Eishi, Y. Okita, M. Daimon, T. Kimura, K. Toyoda, H. Nakase, K. Nakano, M. Higashi, K. Mitsutake, T. Murakami, S. Yasukochi, S. Okazaki, H. Sakamoto, H. Tanaka, I. Nakagawa, R. Nomura, K. Fujiu, T. Miura and T. Morizane, on behalf of the Japanese Circulation Society Joint Working Group.** 2019. JCS 2017 Guideline on prevention and treatment of infective endocarditis. *Circ. J.* 83, 1767-1809.

- Nemoto, H., R. Nomura, T. Ooshima and K. Nakano.** 2013. Distribution of amoxicillin-resistant oral streptococci in dental plaque specimens obtained from Japanese children and adolescents at risk for infective endocarditis. *J. Cardiol.* 62, 296-300.
- Nomura, R., K. Nakano, S. Naka, H. Nemoto, K. Masuda, J. Lapirattanakul, S. Alaluusua, M. Matsumoto, S. Kawabata, and T. Ooshima.** 2012. Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral Microbiol.* 27, 308-323.
- Nomura, R., S. Naka, H. Nemoto, S. Inagaki, K. Taniguchi, T. Ooshima and K. Nakano.** 2013. Potential involvement of collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* in infective endocarditis. *Oral Dis.* 19, 387-393.
- Nomura, R., M. Otsugu, S. Naka, N. Teramoto, A. Kojima, Y. Muranaka, M. Matsumoto-Nakano, T. Ooshima and K. Nakano.** 2014. Contribution of the interaction of *Streptococcus mutans* Serotype *k* strains with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis. *Infect. Immun.* 82, 5223-5234.
- Ooshima, T., T. Minami, M. Matsumoto, T. Fujiwara, S. Sobue and S. Hamada.** 1998. Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols in SPF rats. *Caries Res.* 32, 75-80.
- Quigley, G. A. and J. W. Hein.** 1962. Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J. Am. Dent. Assoc.* 65, 26-29.
- Seymour, R. A., R. Lowry, J. M. Whitworth and M. V. Martin.** 2000. Infective endocarditis, dentistry and antibiotic prophylaxis; time for a rethink?. *Br. Dent. J.* 189, 610-616.
- Sun, B. J., S. W. Choi, K. H. Park, J. Y. Jang, D. H. Kim, J. M. Song, D. H. Kang, Y. S. Kim and J. K. Song.** 2015. Infective endocarditis involving apparently structurally normal valves in patients without previously recognized predisposing heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 65, 307-309.

**van der Meer, J. T., J. Thompson, H. A. Valkenburg and M. F. Michel.** 1992. Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands. II. Antecedent procedures and use of prophylaxis. *Arch. Intern. Med.* 152, 1869-1873.

**Widal, F.** 1896. On the sero-diagnosis of typhoid fever. *Lancet* 148, 1371-1372.

**Xiong, Y. Q., W. Abdelhady, C. G. Tang and A. S. Bayer.** 2016. Comparative efficacy of telavancin and daptomycin in experimental endocarditis due to multi-clonotype MRSA strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2890-2894.

表1 本研究で用いたプライマー

使用目的	名称	配列 (5' → 3')	文献
16S rRNA の検出	PA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Marques da Silva ら (2006)
	PD	GTA TTA CCG CGG CTG CTG	
RAPD 法	P1	GGT GCG GGA A	Nakano ら (2004)
	P2	GTT TCG CTC C	
	P3	GTA GAC CCG T	
	P4	AAG AGC CCG T	
	P5	AAC GCG CAA C	

表2 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける根尖病巣の体積

実験群	心臓弁傷害後	根尖病巣の体積 ( $\mu\text{m}^3$ ) (平均 $\pm$ 標準誤差)	<i>P</i> 値
A 群 (n=11)	1 週間	$(5.7 \pm 2.2) \times 10^8$	ns
B 群 (n=11)	1 か月	$(6.1 \pm 2.2) \times 10^8$	ns
C 群 (n=12)	3 か月	$(11.1 \pm 8.6) \times 10^8$	ns

ANOVA の後 Bonferroni 法; 有意差なしを ns と表記

表3 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける心臓の病理組織学的スコア

評価項目	病理組織学的評価スコア (平均 ± 標準誤差)		
	A 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 週間)	B 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 か月)	C 群 (n=12) (心臓弁傷害後 3 か月)
心室中隔 / 右心室			
炎症性細胞浸潤	0.91 ± 0.09	1.18 ± 0.12	0.92 ± 0.08
巣状壊死	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.09	0.08 ± 0.08
線維化	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.08
血栓	0.27 ± 0.27	0.18 ± 0.12	0.00 ± 0.00
右冠動脈			
壊死	0.36 ± 0.36	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
血栓	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
大動脈弁			
壊死	0.27 ± 0.14	0.09 ± 0.09	0.00 ± 0.00
肥厚	0.09 ± 0.09	0.64 ± 0.28	0.17 ± 0.11
血管内膜の増殖	0.36 ± 0.15	0.45 ± 0.21	0.00 ± 0.00
単核細胞の増加	0.36 ± 0.15	0.36 ± 0.15	0.08 ± 0.08
線維化	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.21	0.33 ± 0.22

表4 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける遠隔臓器の各解剖学的異常所見の頻度

評価項目	A 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 週間)	B 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 か月)	C 群 (n=12) (心臓弁傷害後 3 か月)
肺の点状出血	5 (45.5%)	5 (45.5%)	6 (50.0%)
脾臓の白色組織	0 (0%)	1 (9.1%)	0 (0%)
腎臓と脾臓の癒着	0 (0%)	1 (9.1%)	0 (0%)
脾臓の肥大化	0 (0%)	2 (18.2%)	1 (8.3%)

( ) 内は各グループにおけるグループ全体に対する割合 (%) を示す。

表5 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける肺の病理組織学的スコア

評価項目	病理組織学的評価スコア (平均 ± 標準誤差)		
	A 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 週間)	B 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 か月)	C 群 (n=12) (心臓弁傷害後 3 か月)
細気管支			
炎症性細胞浸潤	<b>2.0 ± 0.4</b>	<b>2.6 ± 0.3</b>	<b>1.7 ± 0.4</b>
呼吸上皮細胞の増生	<b>1.6 ± 0.6</b>	<b>2.4 ± 0.4</b>	0.8 ± 0.5
管腔内の炎症性細胞浸潤	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.2
呼吸上皮細胞の単細胞死	1.0 ± 0.4	<b>1.4 ± 0.3</b>	0.7 ± 0.4
脂肪浸潤	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.2
終末細気管支			
炎症性細胞浸潤	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2
呼吸細気管支			
炎症性細胞浸潤	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
乳頭腫	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
肺胞			
炎症性細胞浸潤	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.2
脱落粘膜上皮	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
出血	0.6 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2
石灰化	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
肺血管			
炎症性細胞浸潤	<b>1.3 ± 0.2</b>	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
色素沈着	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2
浮腫	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
水腫様変性	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0
空胞変性	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
異栄養性石灰化	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2
被膜			
肥厚	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
炎症性細胞浸潤	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0

太字は病理組織学的評価の平均スコアが 1.0 よりも高いものを示す。

表6 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける腎臓の病理組織学的スコア

評価項目	病理組織学的評価スコア（平均 ± 標準誤差）		
	A 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 週間)	B 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 か月)	C 群 (n=12) (心臓弁傷害後 3 か月)
炎症性細胞浸潤	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
再生上皮	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2
線維化	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
壊死	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
硝子円柱	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.2
石灰化	1.0 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2

表7 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける脾臓の病理組織学的スコア

評価項目	病理組織学的評価スコア (平均 ± 標準誤差)		
	A 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 週間)	B 群 (n=11) (心臓弁傷害後 1 か月)	C 群 (n=12) (心臓弁傷害後 3 か月)
肥厚	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
髓外造血	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0
壊死	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0
色素沈着	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.2
被膜肥厚	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.3	0.3 ± 0.2

表8 6か月間重度う蝕を誘発したラット顎骨検体におけるBroad-range PCR を用いたシーケンス分析による細菌種の検出

菌種名	C 群 (n=50) (重度う蝕および心臓弁傷害)	D 群 (n=50) (重度う蝕誘発のみ)	P 値
<i>Escherichia</i>	16 (32)	16 (32)	ns
<i>Enterobacter</i>	14 (28)	17 (34)	ns
<i>Pasteurellaceae</i>	10 (20)	0 (0)	<0.01
<i>Klebsiella</i>	0 (0)	10 (20)	<0.01
<i>Proteus</i>	3 (6)	2 (4)	ns
<i>Streptococcus</i>	2 (4)	1 (2)	ns
<i>Citrobacter</i>	2 (4)	0 (0)	ns
<i>Staphylococcus</i>	2 (4)	0 (0)	ns
<i>Providencia</i>	0 (0)	2 (4)	ns
<i>Pseudomonas</i>	0 (0)	2 (4)	ns
<i>Lactobacillaceae</i>	1 (2)	0 (0)	ns

( ) 内は各グループにおけるグループ全体に対する割合 (%) を示す。  
Fisher の正確確率検定; 有意差なしを ns と表記

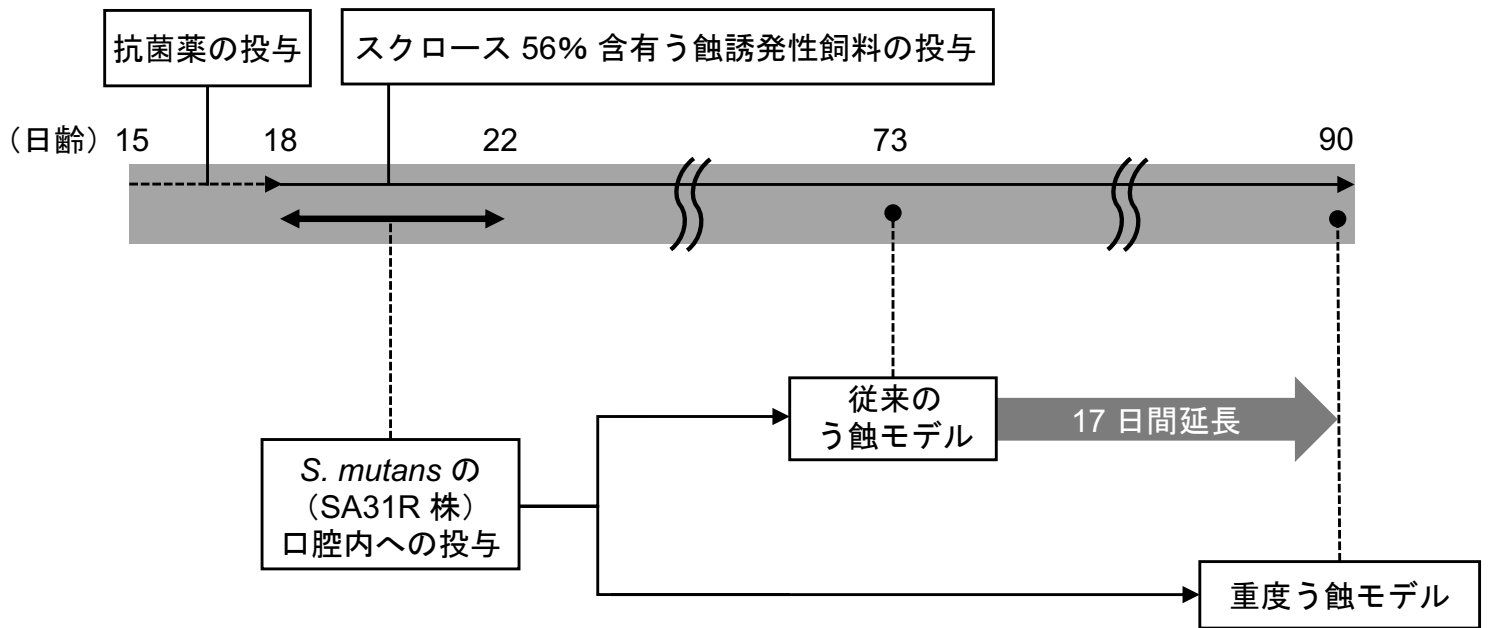


図1 本研究で検討したラット重度う蝕モデルのプロトコール

15日齢のラット（n=45）に、3日間抗菌薬を投与し口腔常在菌を抑制した後、*S. mutans* SA31R株を1日1回5日間、ピペットを用いて口腔内に直接投与した。飼育期間中はスクロース56%含有う蝕誘発性飼料を常時与え、重度う蝕を誘発するために従来のモデルより17日間延長して90日齢まで飼育した。

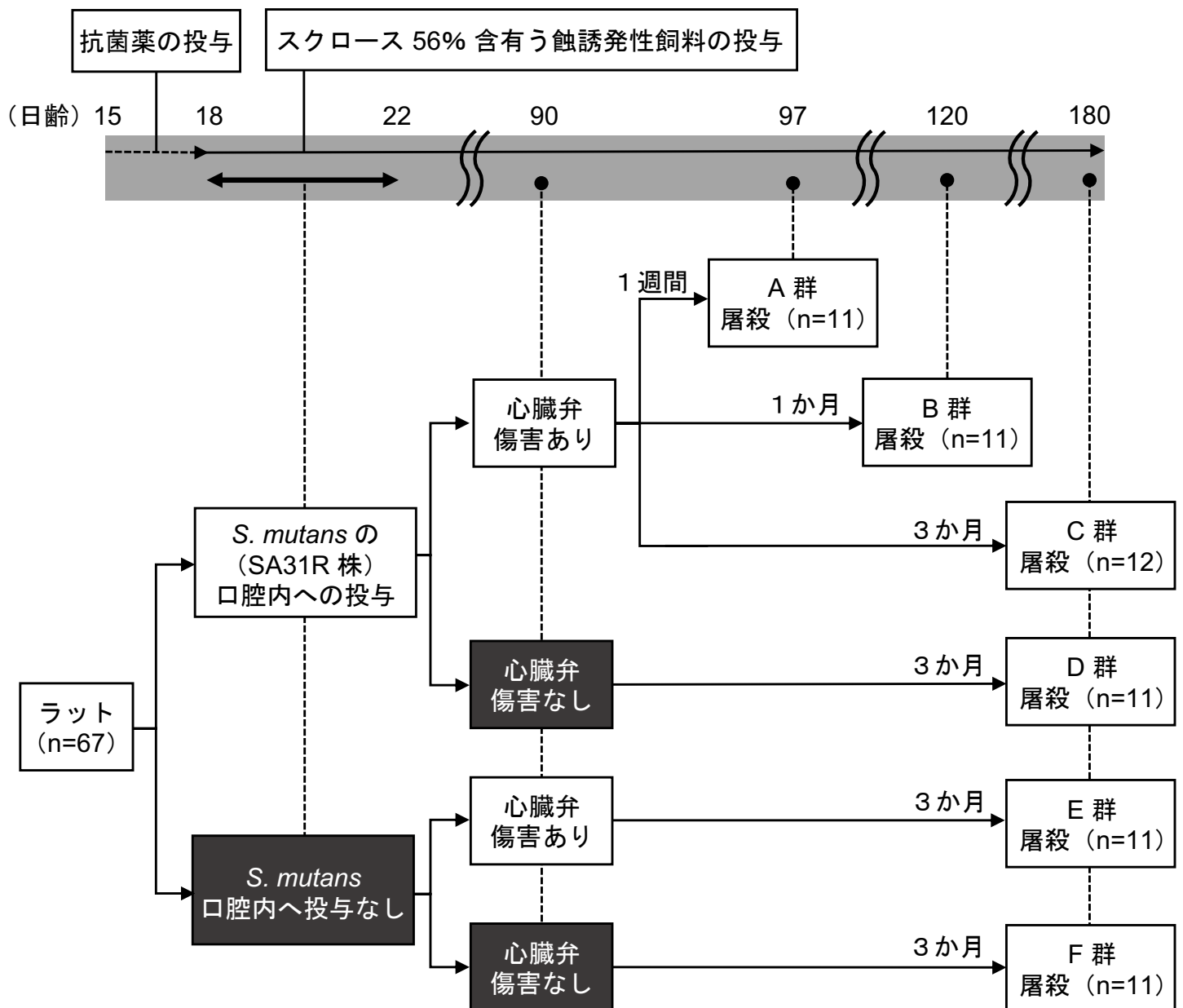


図2 ラット重度う蝕モデルを用いた本研究のプロトコール

重度う蝕を誘発させた 90 日齢のラットにおいて、全身麻酔下にてカテーテルを右頸動脈から挿入し大動脈弁を傷害した。飼育期間による影響を検討するために、傷害から 1 週間後に屠殺した群 (A 群; n=11)、1 か月後に屠殺した群 (B 群; n=11) および 3 か月後に屠殺した群 (C 群; n=12) を設定して検体の摘出を行った。

さらに、重度う蝕および心臓弁の傷害の有無による影響を検討するために、屠殺時期を心臓弁傷害後 3 か月に固定して、重度う蝕を誘発させたものの心臓弁を傷害しない群 (D 群; n=11)、S. mutans を口腔内へ投与せずに心臓弁の傷害を行う群 (E 群; n=11) およびどちらの処置も行わない群 (F 群; n=11) を設定して検体の摘出を行った。

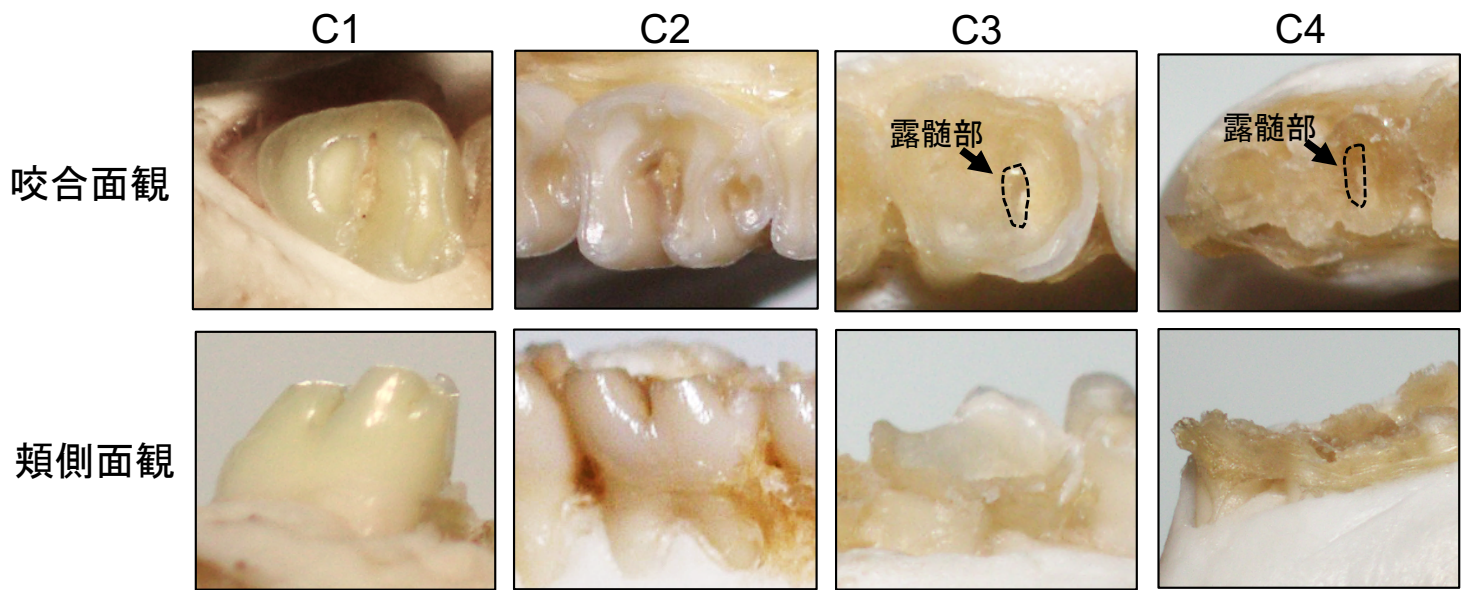


図3 ラットう蝕モデルにおけるう蝕進行度の判定基準

エナメル質に限局するう蝕を C1、象牙質に及ぶう蝕を C2、歯髄に到達したう蝕を C3、歯冠が崩壊したう蝕を C4 と判定した。

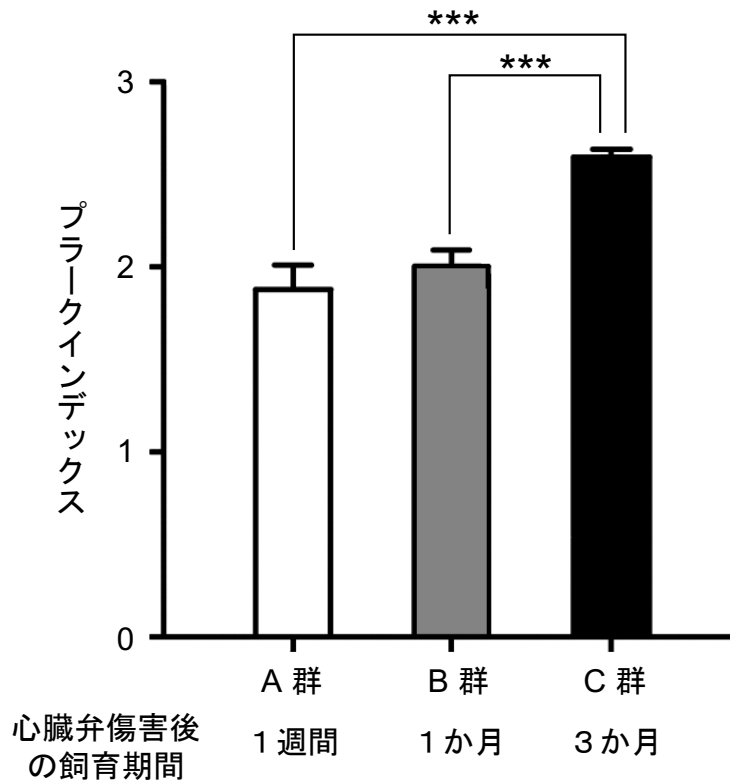


図4 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いによるプラークインデックスの比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*\*\*  $P < 0.001$ )  
飼育期間が長期になるほど値が増加し、C 群は他の 2 群と比較して有意に高い値を示した。

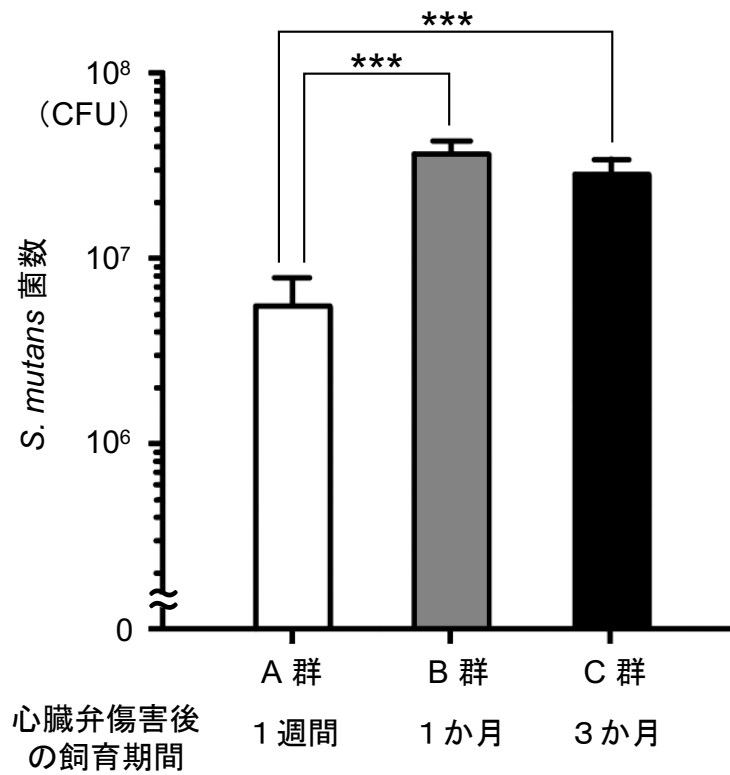
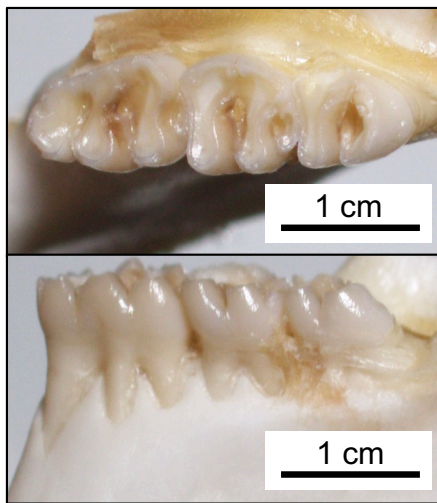
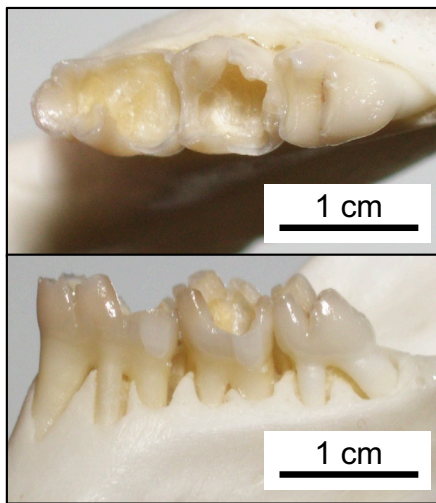


図5 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いによる顎骨検体から分離された *S. mutans* 菌数の比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*\*\*  $P < 0.001$ )  
 A 群は他の 2 群と比較して有意に低い値を示した。

A 群  
(心臓弁傷害後 1 週間)



B 群  
(心臓弁傷害後 1 か月)



C 群  
(心臓弁傷害後 3 か月)

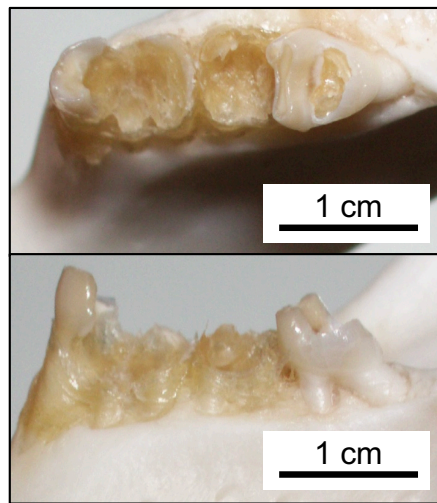


図6 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いにおけるう蝕の重篤度の比較

それぞれの群で代表的な 1 例を示す。飼育期間が長期になるほどう蝕の重症化が認められた。

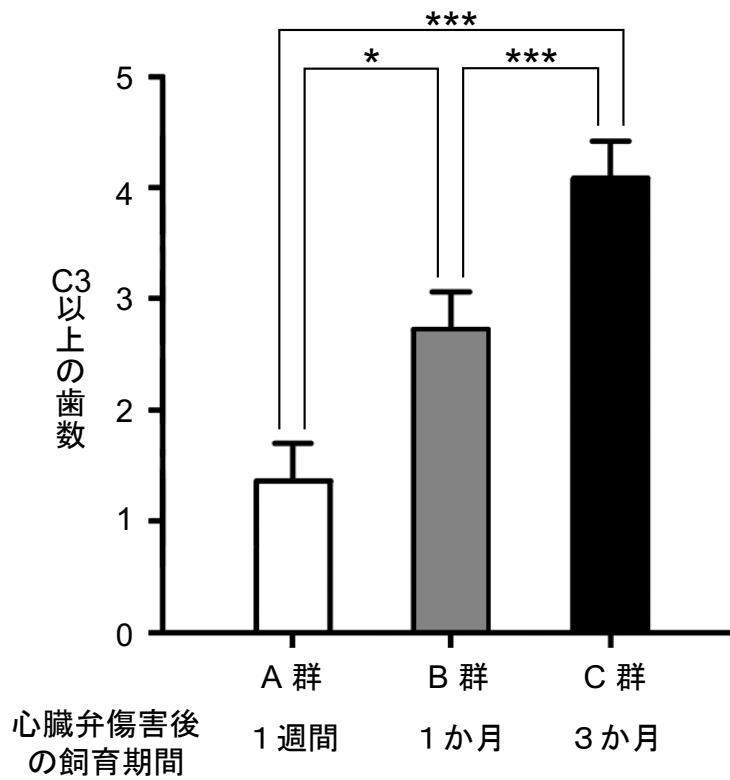


図7 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いによる C3 以上の歯数の比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )  
飼育期間が長期になるほど C3 以上の歯数が増加し、C 群は他の 2 群と比較して有意に高い値を示した。

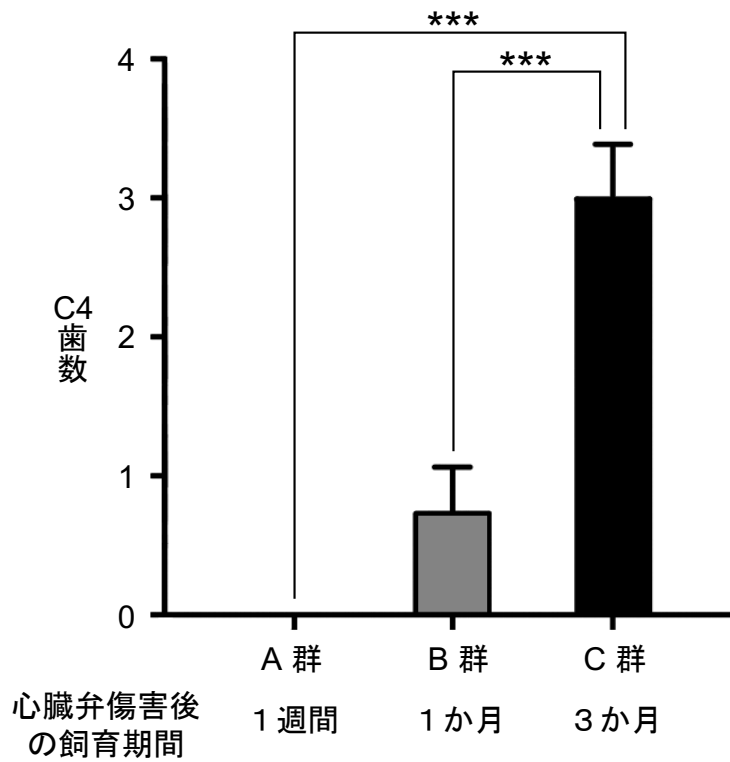


図8 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いによる C4 菌数の比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*\*\*  $P < 0.001$ )  
飼育期間が長期になるほど C4 菌数が増加し、C 群は他の 2 群と比較して有意に高い値を示した。

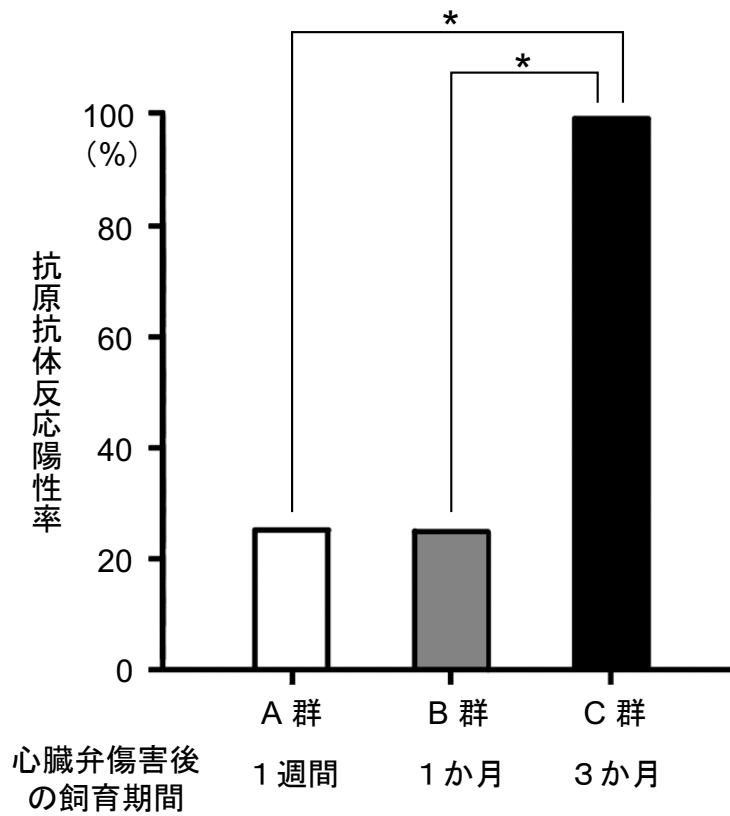


図9 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いによる抗原抗体反応の比較（カイニ乗検定; \* $P < 0.05$ ）

C群の全ての血清がCBP陽性 *S. mutans* の培養液と凝集反応を示し、他の2群と比較して有意に高い値を示した。

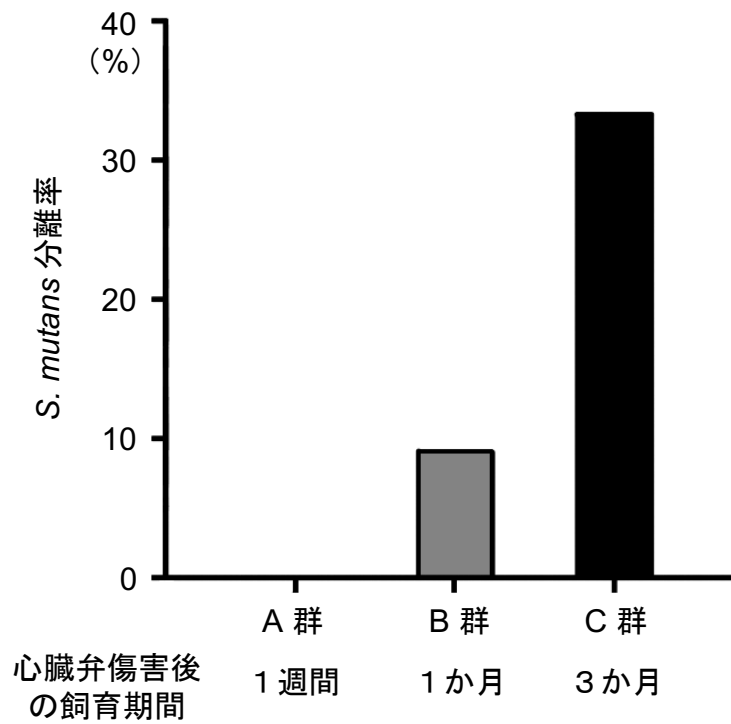


図10 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いによる心臓からの *S. mutans* の分離率の比較  
飼育期間が長期になるほど *S. mutans* の分離率は増加した。

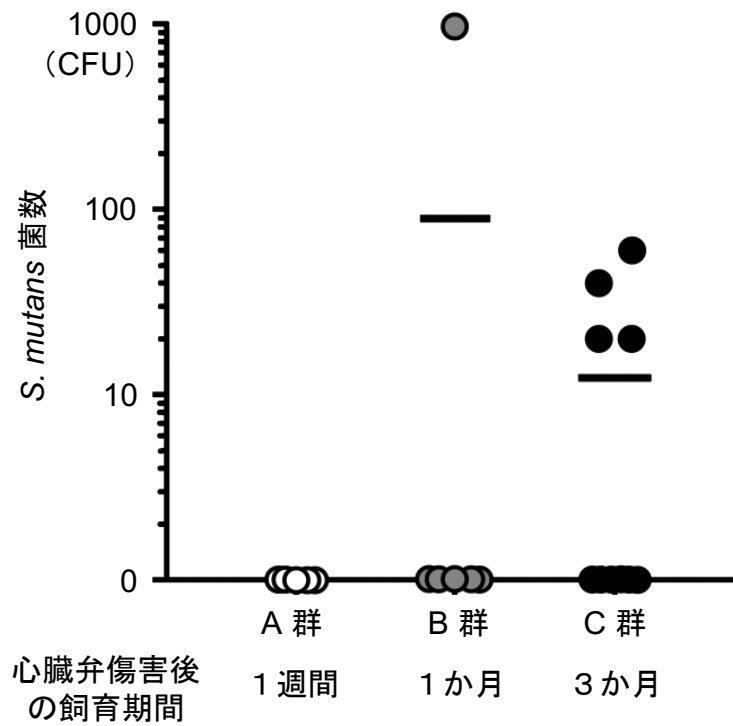


図11 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いによる心臓検体から分離された *S. mutans* 菌数の比較 (バー: 平均値)  
 A 群からは菌が分離されず、B 群のうち 1 検体のみから 1000 CFU の菌が分離された。また、C 群では 20 ~ 100 CFU の菌が分離された。

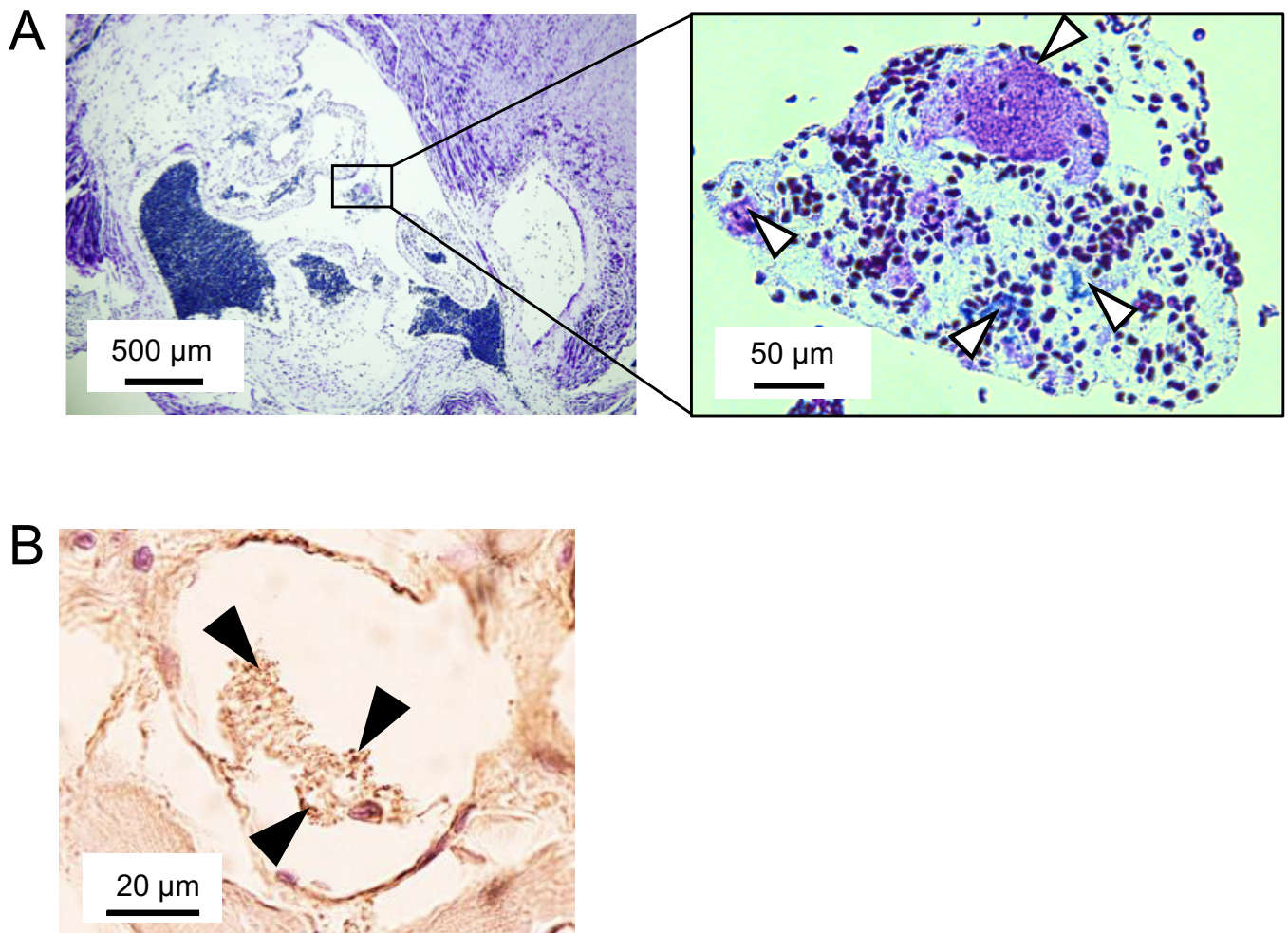


図12 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける心臓検体から *S. mutans* が分離されたラットにおける心臓の病理組織像

- (A) グラム染色に陽性反応を示す心臓の病理組織像（白矢頭：グラム陽性細菌）
- (B) CBP 抗体を用いた免疫染色に陽性反応を示す心臓の病理組織像（黒矢頭：CBP 抗体陽性細菌）

*S. mutans* が分離された心臓検体に CBP 抗体に陽性反応を示すグラム陽性細菌が認められた。

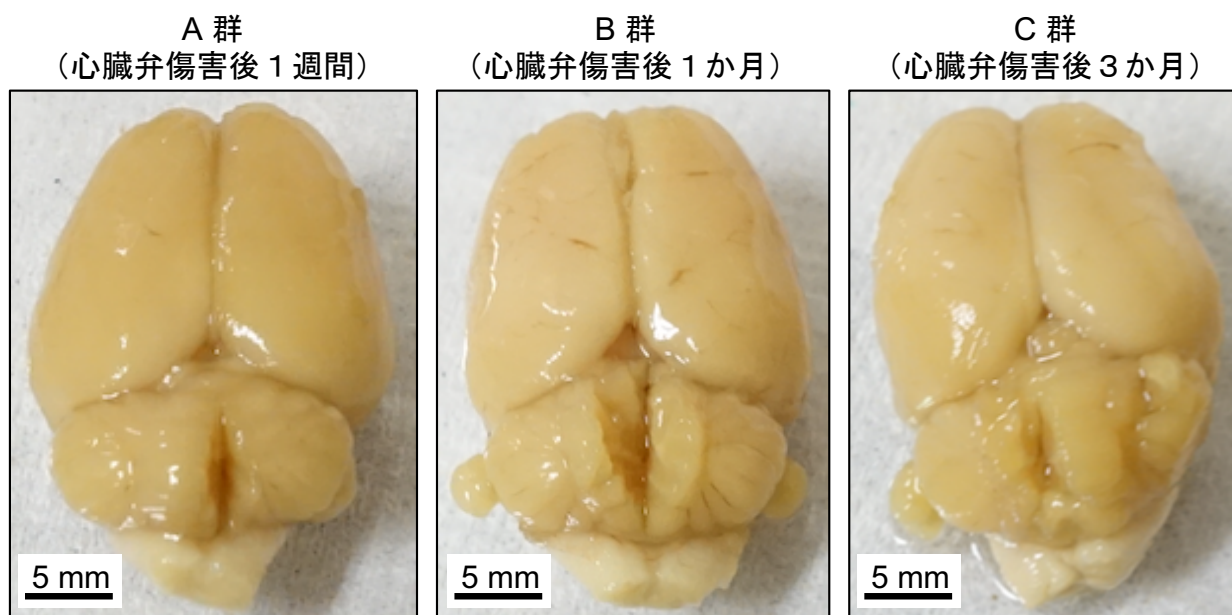


図13 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いによる脳検体の比較  
どの群においても明確な異常所見は認められなかった。

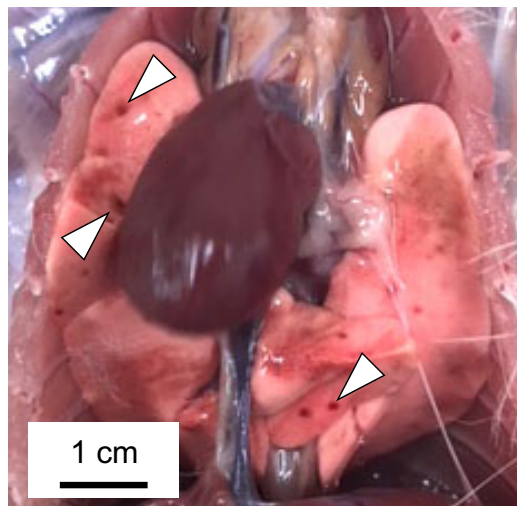


図14 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットの肺検体の肉眼所見の1例

重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおいて、約半数のラットから肺の点状出血（白矢頭）が認められた。

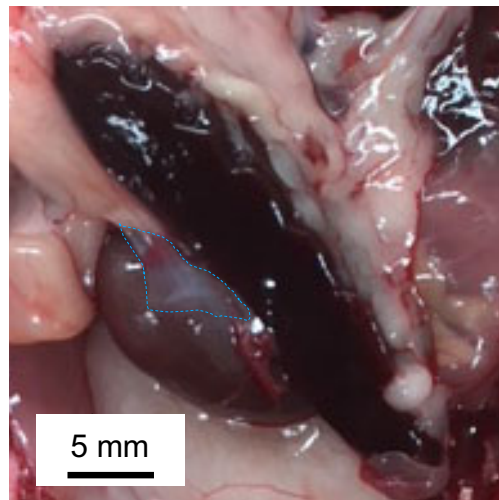
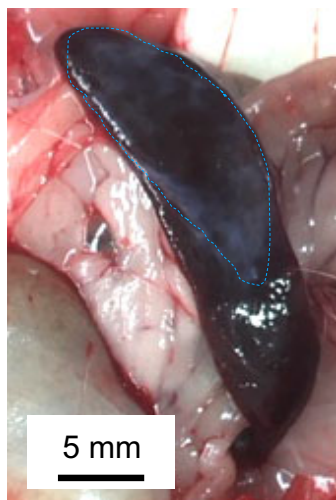


図15 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットの脾臓検体の肉眼所見の1例  
重度う蝕の誘発を行った後心臓弁の傷害を行ってから1か月飼育したラットにおいて、  
白色組織（青破線）が認められた。

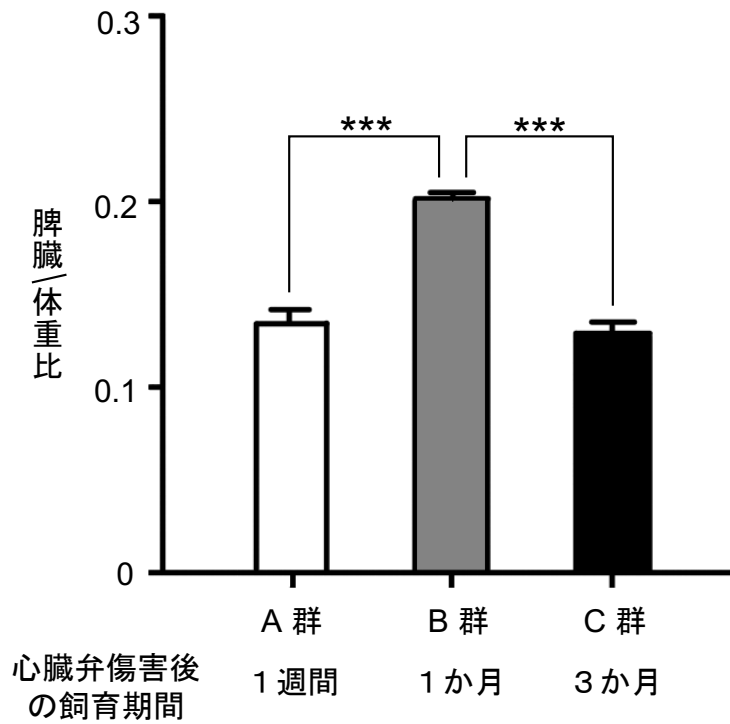


図16 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける飼育期間の違いによる体重に対する脾臓重量比の比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*\*\*  $P < 0.001$ )  
 B 群において脾臓重量比が最大であり、他の2群と比較して有意に高い値を示した。

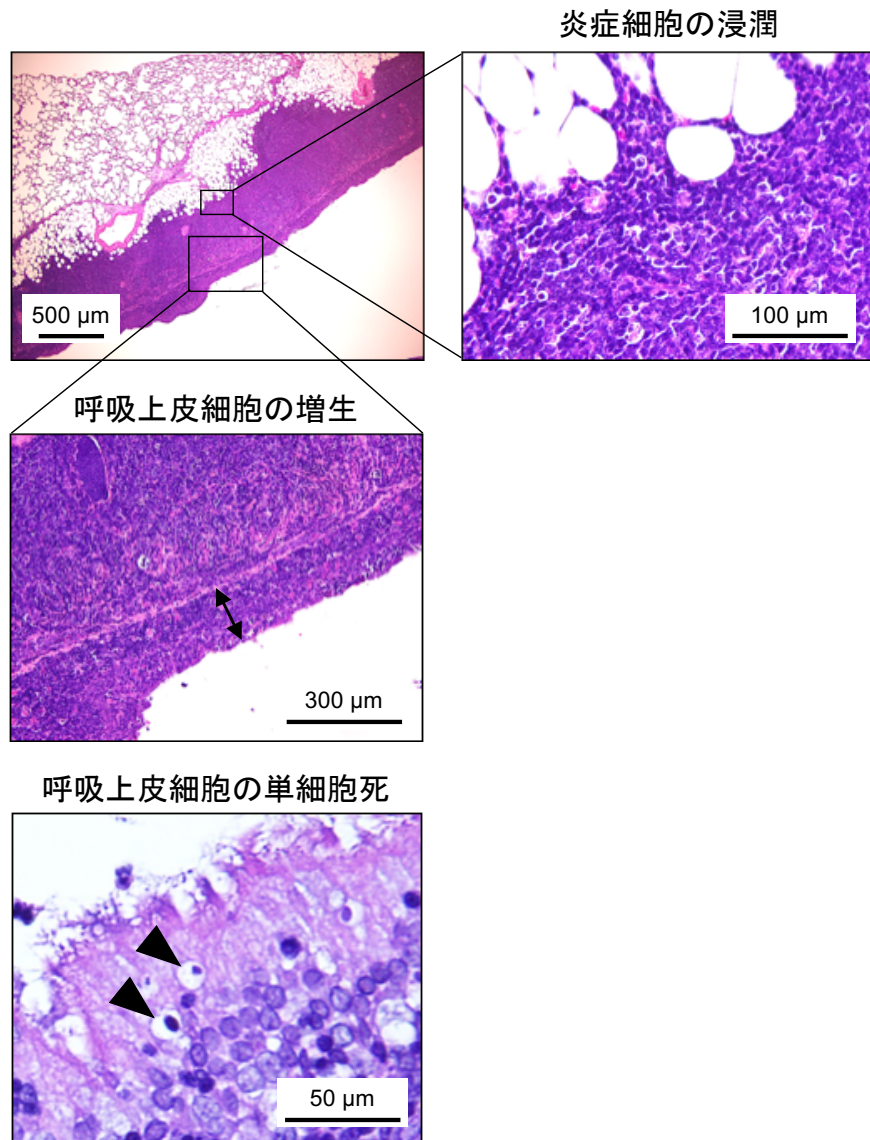


図17 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットの肺検体の病理組織像の1例  
(ヘマトキシリン・エオジン染色)

重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおいて、軽度から中等度の炎症細胞の浸潤、呼吸上皮細胞の増生（矢印）および単細胞死（矢頭）が認められた。

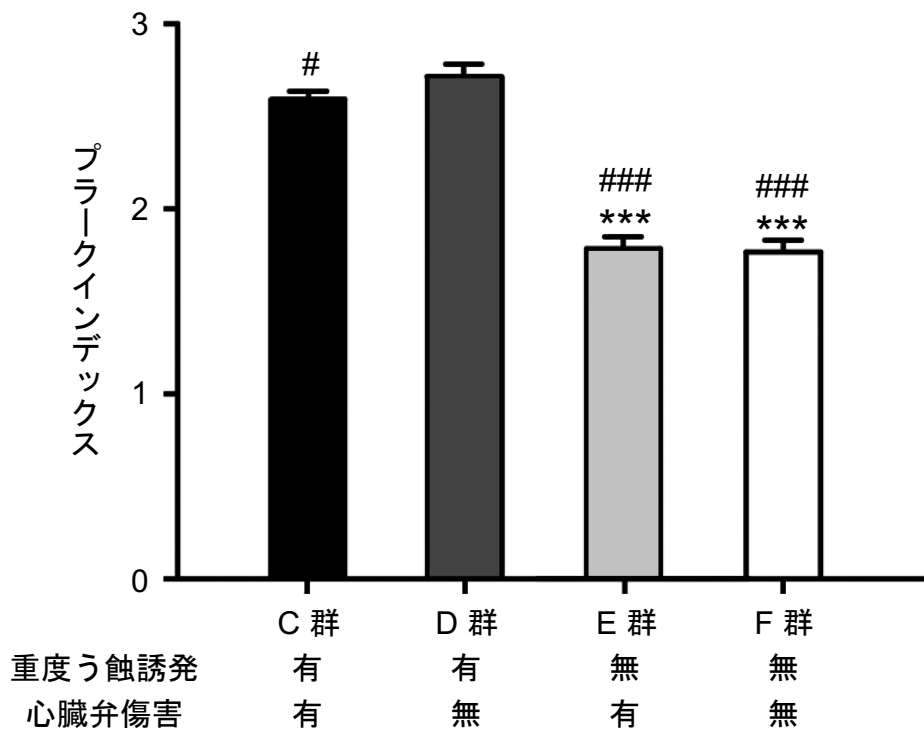


図18 6か月飼育したラットにおける重度う蝕誘発および心臓弁傷害の有無のプラークインデックスへの影響の比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*\*\*  $P < 0.001$ : C 群と比較, #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$ : D 群と比較)

重度う蝕を誘発させた群は、他の2群と比較して有意に高いプラークインデックスを示した。

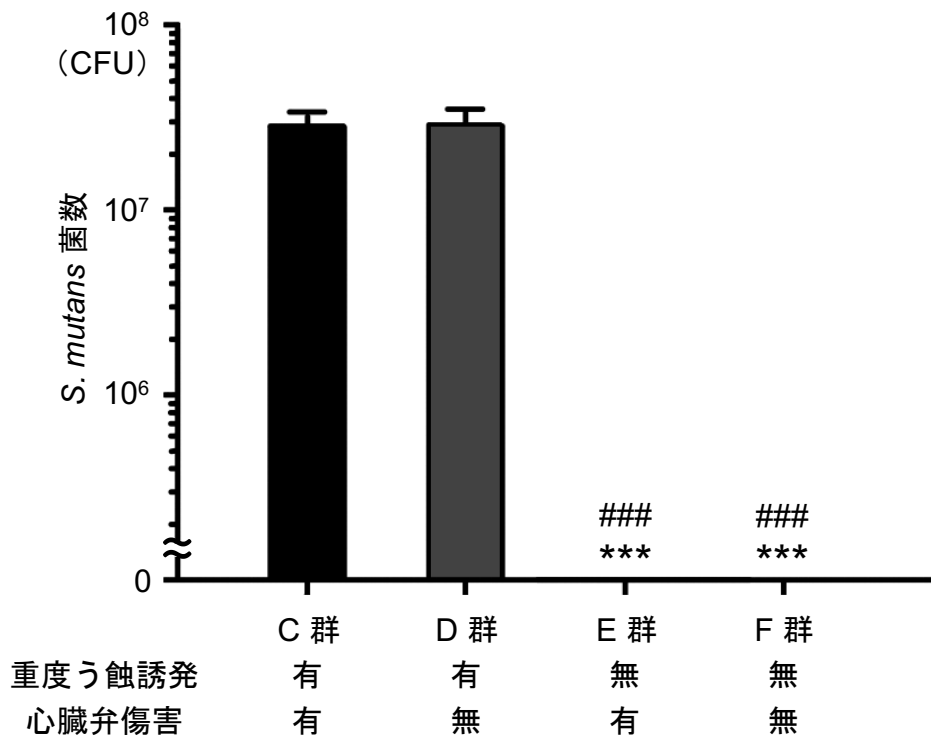
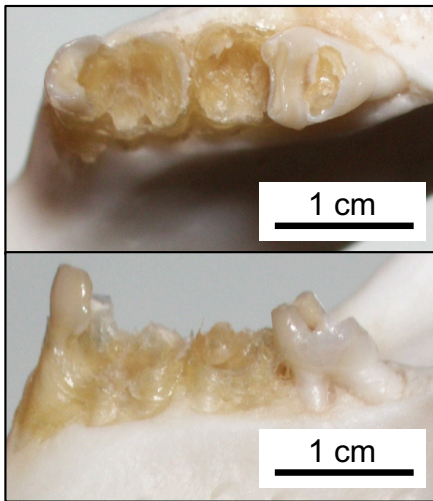
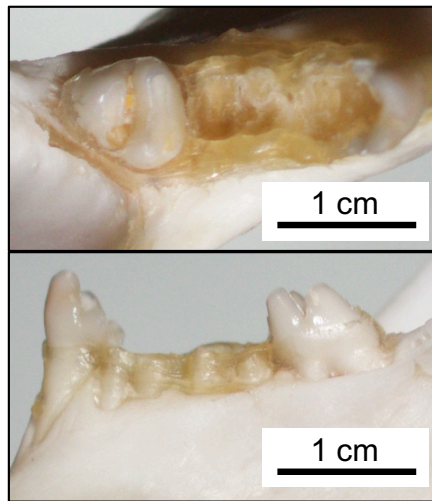


図19 6か月飼育したラットにおける重度う蝕誘発および心臓弁傷害の有無の顎骨検体から分離された *S. mutans* 菌数への影響の比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*\*\*  $P < 0.001$ : C 群と比較, ###  $P < 0.001$ : D 群と比較)  
C 群と D 群の間に有意差は認められず、E 群および F 群では菌は分離されなかった。

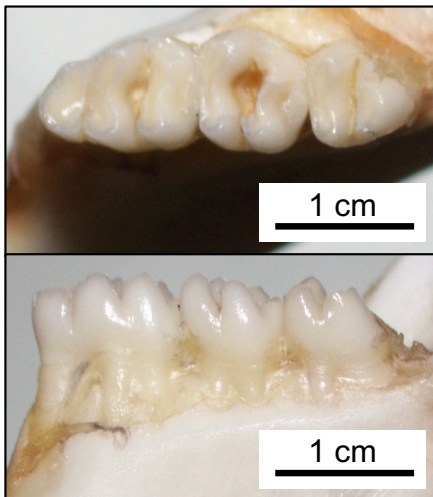
C 群  
(重度う蝕誘発および心臓弁傷害)



D 群  
(重度う蝕誘発のみ)



E 群  
(心臓弁傷害のみ)



F 群  
(非処置)

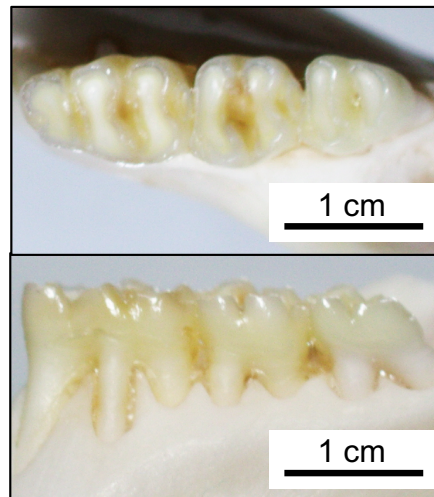


図20 6か月飼育したラットにおける重度う蝕誘発および心臓弁傷害の有無のう蝕誘発への影響の比較

それぞれの群の代表的な1例を示す。C 群および D 群では、歯冠の崩壊を含む重度う蝕を呈した。一方で、重度う蝕を誘発させなかった群は咬耗および軽度のう蝕を認めるにとどまった。

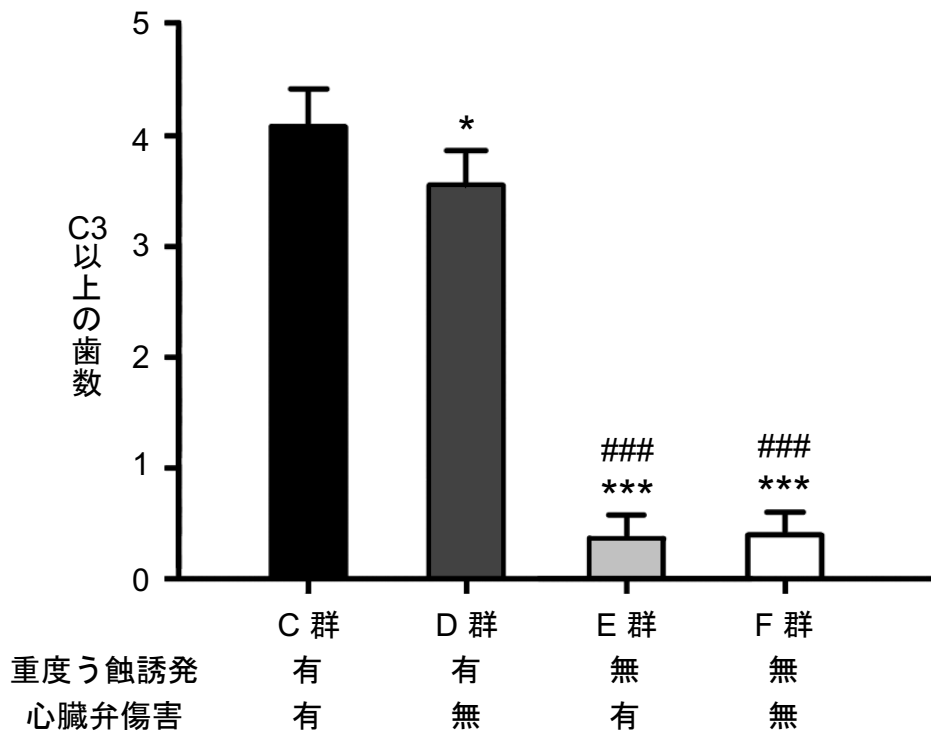


図21 6か月飼育したラットにおける重度う蝕誘発および心臓弁傷害の有無の C3 以上の歯数への影響の比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ : C 群と比較, ###  $P < 0.001$ : D 群と比較)  
 C 群および D 群は E 群および F 群と比較して有意に高い C3 以上の歯数を認めた。また、C 群は D 群と比較して有意に高い値を示した。

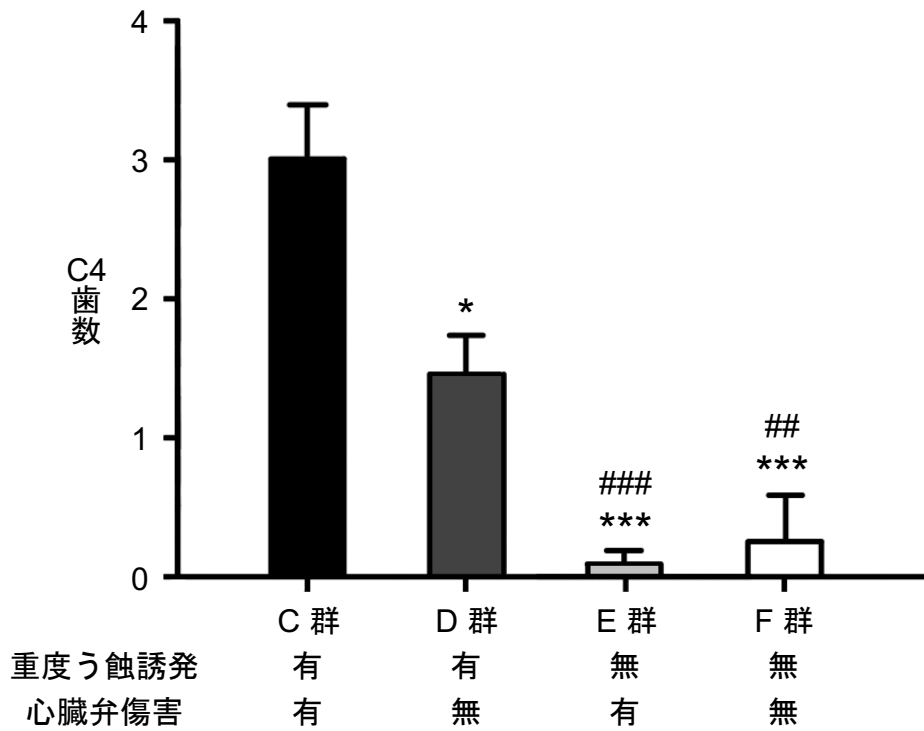


図22 6か月飼育したラットにおける重度う蝕誘発および心臓弁傷害の有無の C4 歯数への影響の比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ : C 群と比較, ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ : D 群と比較)

C 群および D 群は E 群および F 群と比較して有意に高い C4 歯数を認めた。また、C 群は D 群と比較して有意に高い値を示した。

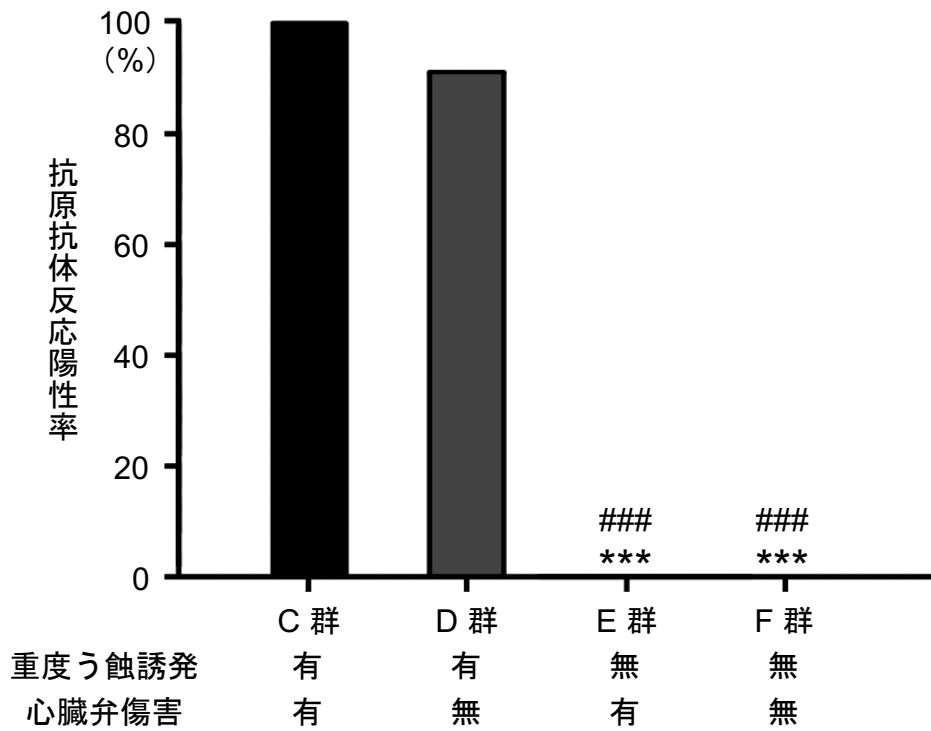


図23 6か月飼育したラットにおける重度う蝕誘発および心臓弁傷害の有無の抗原抗体反応への影響の比較（カイニ乗検定; \*\*\*  $P < 0.001$ : C 群と比較, ###  $P < 0.001$ : D 群と比較）

C 群および D 群のほとんどの血清が CBP 陽性 *S. mutans* の培養液と凝集反応を示したが、E 群および F 群は凝集反応を示さなかった。

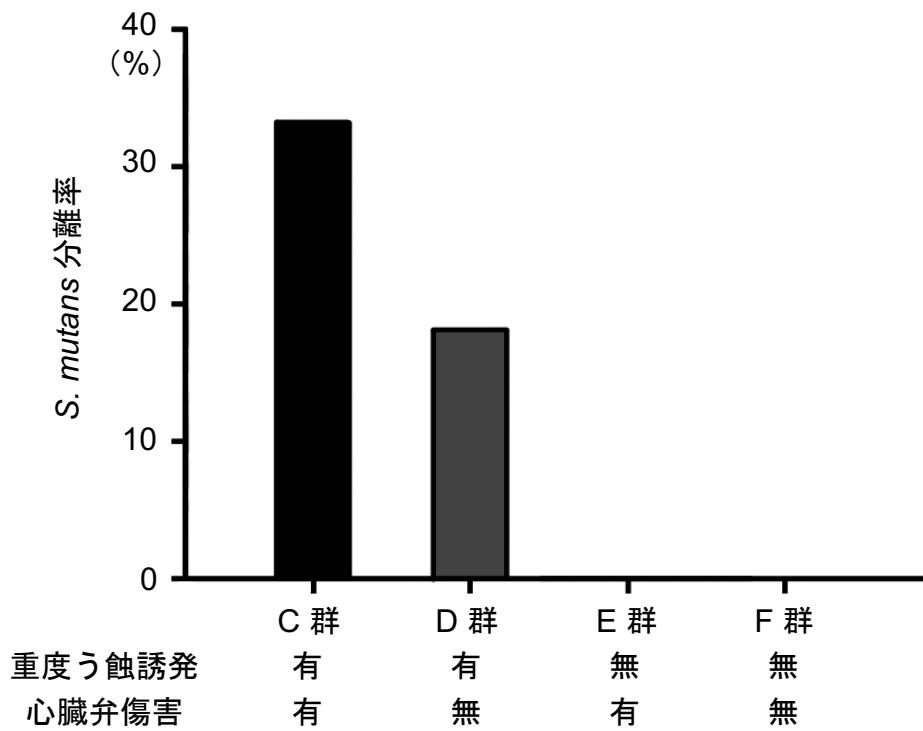


図24 6か月飼育したラットにおける重度う蝕誘発および心臓弁傷害の有無の心臓からの *S. mutans* の分離への影響の比較

*S. mutans* の分離率は、D 群は C 群の約半数にとどまり、E 群および F 群からは *S. mutans* が分離されなかった。

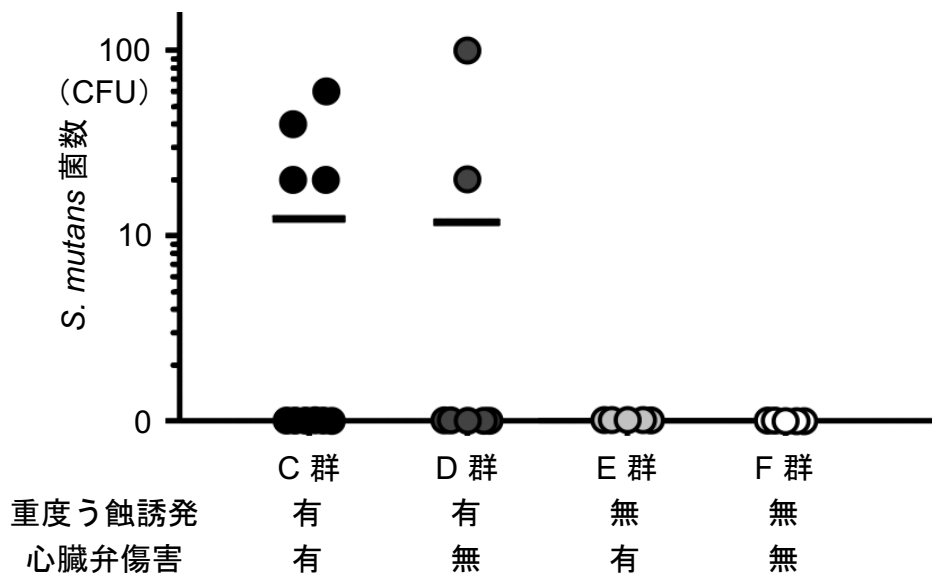


図25 6か月飼育したラットにおける重度う蝕誘発および心臓弁傷害の有無の心臓検体から分離された *S. mutans* 菌数への影響の比較 (バー: 平均値)  
 C 群および D 群では10 ~ 100 CFU の菌が分離され、E 群および F 群からは *S. mutans* が分離されなかった。

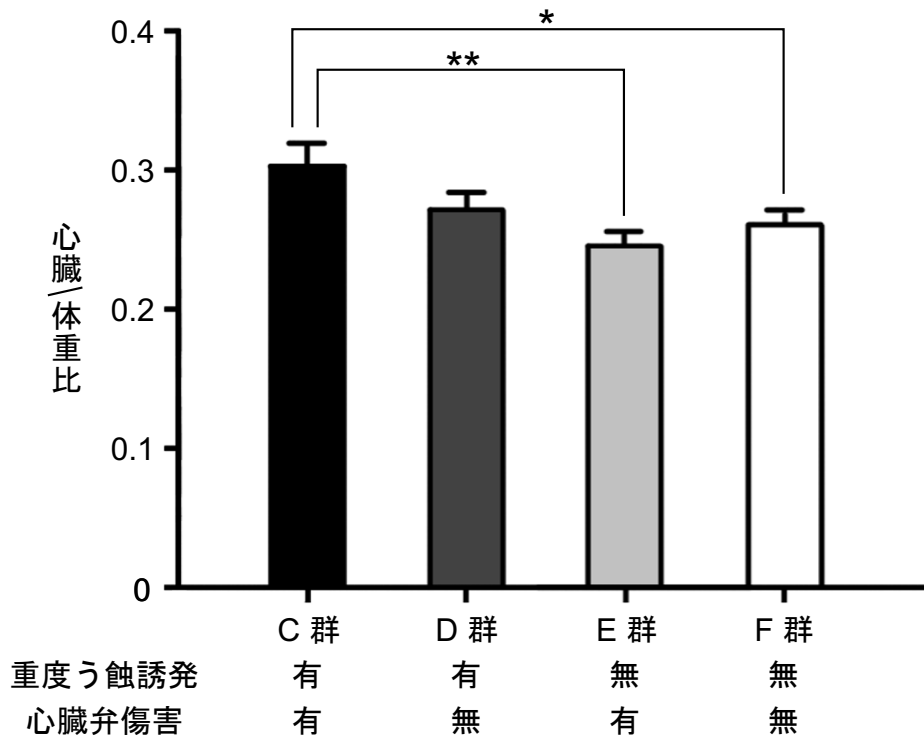


図26 6か月飼育したラットにおける重度う蝕誘発および心臓弁傷害の有無の体重に対する心臓重量比への影響の比較 (ANOVA の後 Bonferroni 法; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

C 群は E 群および F 群と比較して有意に高い値を示した。

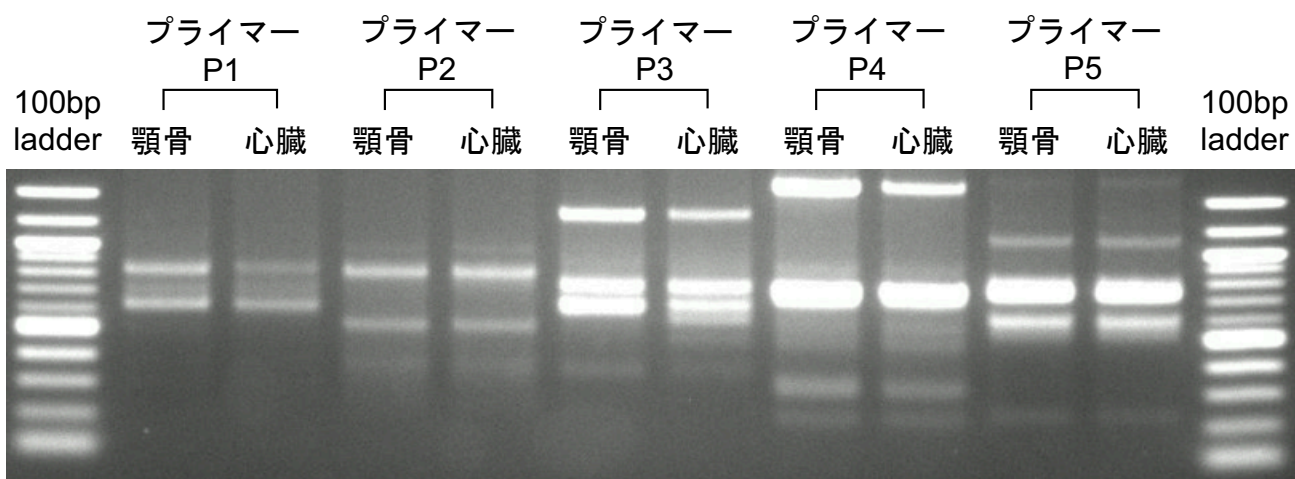


図27 RAPD 法による顎骨検体および心臓検体から分離した *S. mutans* における遺伝子増幅パターンの比較

顎骨検体および心臓検体由来の *S. mutans* 株の遺伝子増幅パターンはすべてのプライマーで完全に一致した。

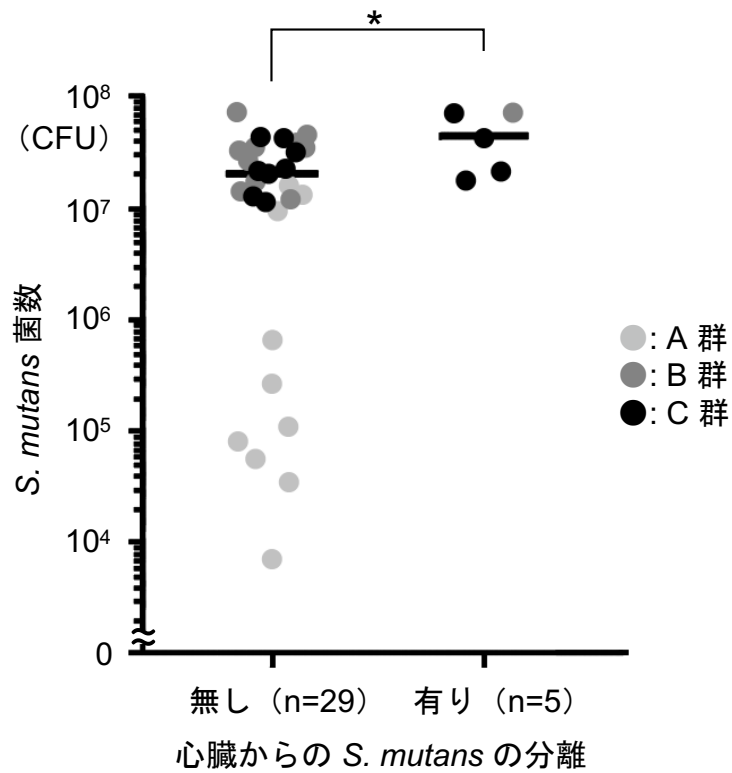


図28 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける心臓検体からの *S. mutans* の分離の有無と顎骨検体から分離された *S. mutans* 菌数との関連性  
(バー：平均値, Student の *t* 検定; \*  $P < 0.05$ )

心臓検体から *S. mutans* が分離されたラットでは、分離されなかったラットと比較して、顎骨検体中の *S. mutans* 菌数が有意に高い値を示した。

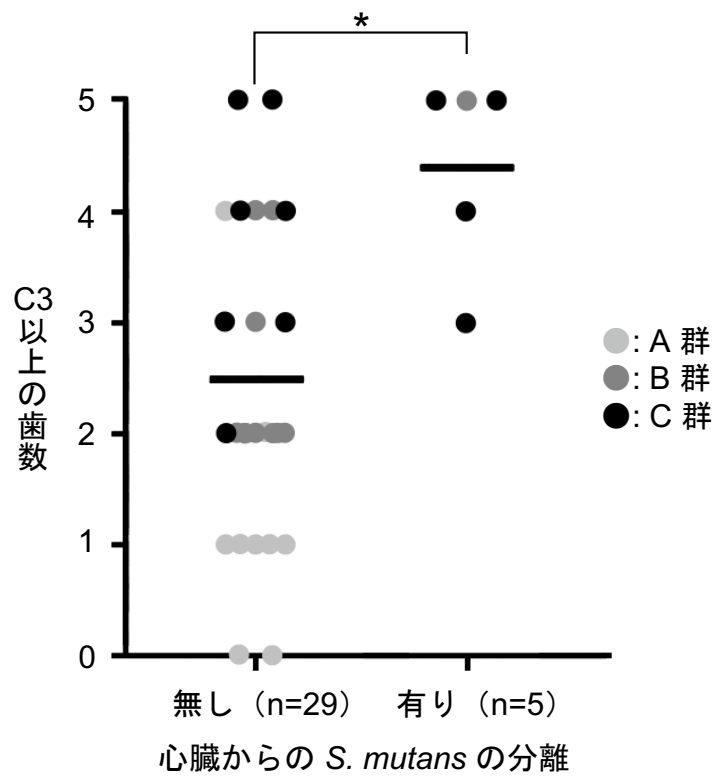


図29 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける心臓からの *S. mutans* の分離の有無と C3 以上の歯数との関連性 (バー: 平均値, Student の *t* 検定; \*  $P < 0.05$ )

心臓検体から *S. mutans* が分離されたラットでは、分離されなかったラットと比較して、有意に高い C3 以上の歯数を示した。

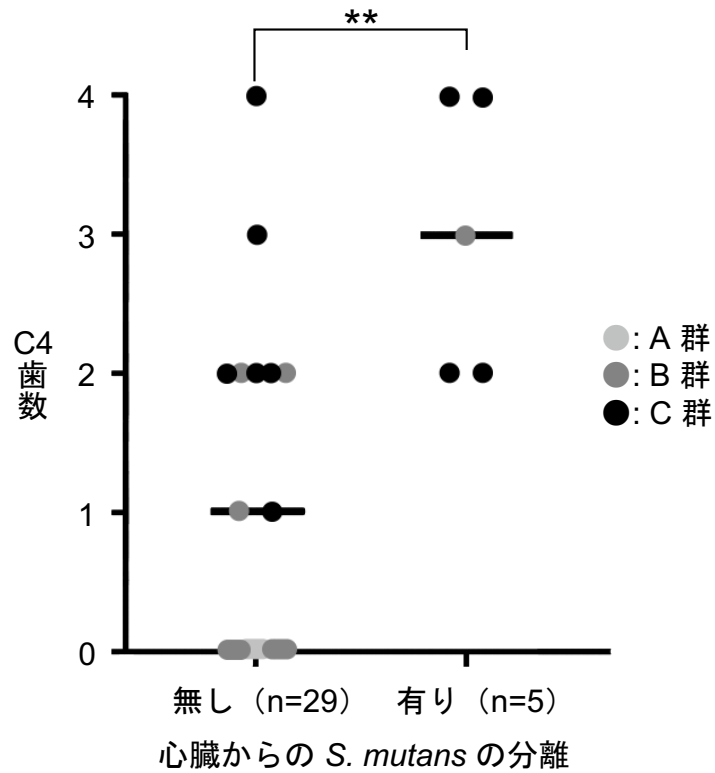


図30 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける心臓からの *S. mutans* の分離の有無と C4 歯数との関連性 (バー：平均値, Student の *t* 検定; \*\*  $P < 0.01$ )

心臓検体から *S. mutans* が分離されたラットでは、分離されなかったラットと比較して、有意に高いC4 歯数を示した。

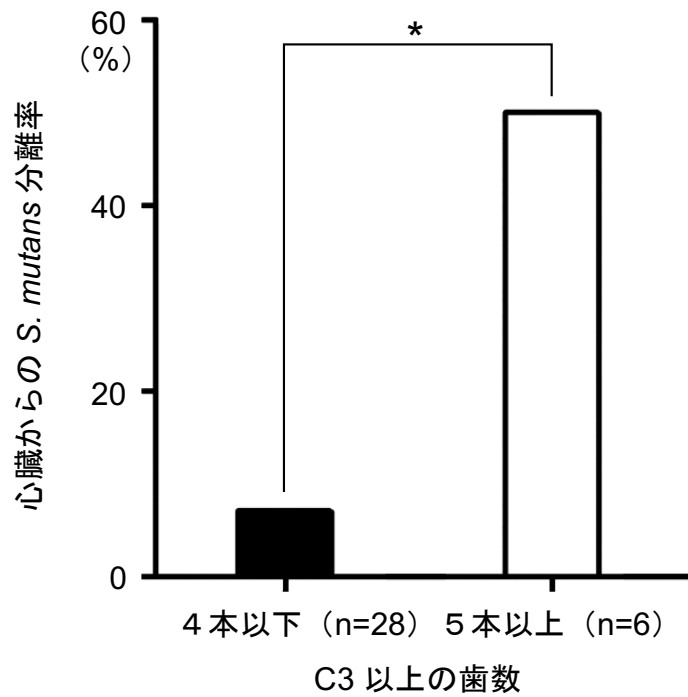


図31 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおけるC3以上の歯数と心臓からの *S. mutans* の分離率との関連性 (Fisherの正確確率検定; \*  $P < 0.05$ )  
 心臓検体からの *S. mutans* の分離率は、C3以上の歯数が片顎6臼歯中4本以下のラットと比較して、5本以上のラットにおいて有意に高い値を示した。

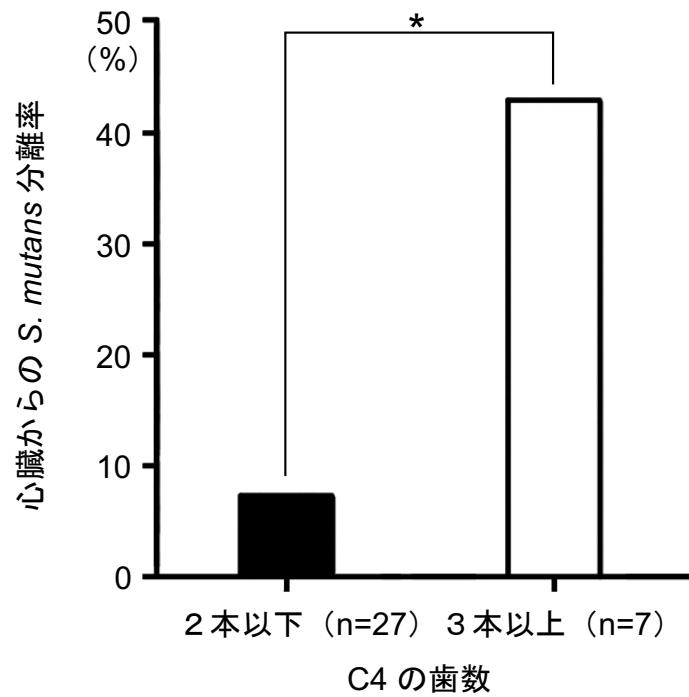


図32 重度う蝕の誘発および心臓弁の傷害を行ったラットにおける C4 歯数と心臓からの *S. mutans* の分離率との関連性 (Fisher の正確確率検定; \*  $P < 0.05$ )  
 心臓検体からの *S. mutans* の分離率は、C4 歯数が片顎 6 臼歯中 2 本以下のラットと比較して、3 本以上のラットにおいて有意に高い値を示した。