

原 著

## 感染性心内膜炎発症における口腔内細菌の関与

獨協医科大学 口腔外科学

博多 研文 川又 均 今井 裕

**要 旨** 本研究では感染性心内膜炎 (infective endocarditis : IE) 発症における口腔内細菌の関与について検索した. IE 患者 47 名の血中から検出された細菌の 87.1% は口腔細菌であり, 61.7% の患者が口腔内感染巣を有するか, 抗菌薬予防投与なしで口腔内観血処置が施行されていた. また, IE 患者あるいは IE 発症リスク患者の 27 名の口腔細菌 (連鎖球菌とブドウ球菌) の薬剤感受性を検索したところ, 92.3% はペニシリン系薬剤に対して感受性を示した. さらに, IE 患者 9 名において血中細菌と口腔細菌の 16S rRNA の遺伝子配列を決定することにより細菌種の同定を行った. その結果, 血中から検出・同定された細菌は全て口腔に存在する *Staphylococcus epidermidis* と *Streptococcus mitis group* であった. また, 血中細菌と口腔細菌の遺伝子配列は 1 症例で 100% 一致し, 3 症例においては遺伝子配列の 100% の一致は見られなかったが, 細菌種グループまでは一致した.

以上の結果より, IE 発症には口腔内の連鎖球菌とブドウ球菌が原因菌として重要であることが明らかとなった. また, IE 発症の予防には, 口腔内感染巣の除去と日々の口腔ケアならびに口腔内の観血処置時には大量のペニシリン系薬剤の予防投与は有用であることが確認できた.

**Key Words** : 感染性心内膜炎, 薬剤感受性, 口腔細菌, 16S rRNA

### 緒 言

感染性心内膜炎 (infective endocarditis : IE) は, 弁膜や心内膜, 大血管内膜に細菌集簇を含む疣腫を形成する全身性敗血症性疾患である<sup>1)</sup>. IE の発症は年間 100 万人あたり 10~50 名とされ, 的確な診断の下, 適切な治療が施行されないと多くの合併症を引きおこし, 死に至る疾患である<sup>1)</sup>. 血管内への細菌の侵入経路の多くは口腔であるとされており, IE の原因菌の 49.5% が  $\alpha$ -溶血性連鎖球菌で, その約 80% が *Streptococcus viridans* であるとされている<sup>2)</sup>. アメリカ心臓協会 (American Heart Association : AHA) のガイドラインでは, 歯・口腔に対する手技・処置後に発症する IE の原因菌として最も多いのは *Streptococcus viridans* で, 予防に関しても, 特に *Streptococcus viridans* に対して行うことが推奨されている<sup>3)</sup>. AHA のガイドライン<sup>3)</sup> ならびに日本循環器学会 (JCS) のガイドライン<sup>1)</sup> では, 口腔内観

血処置を行う場合は, 処置 1 時間前にペニシリン系抗菌薬の投与 (アンピシリン 2g 静注あるいはアモキシシリン 2g 内服) が推奨されている. ただし, AHA のガイドラインでは, 抜歯時の抗菌薬予防的投与の有効性に対して抗菌薬の選択や投与量の決定に関する十分な科学的根拠がないことより, 効果とコストのバランスから抗菌薬の予防的投与はより深刻な病態になりうるような心疾患に限定し<sup>3)</sup>, 日々の口腔内清潔の維持は, 日常的に生じうる菌血症の頻度を減少させ, 口腔内観血処置の前の抗菌薬予防投与よりも IE の予防として重要であるとされている<sup>3)</sup>.

本邦においては, 口腔内観血処置後の感染予防として経口第三世代セフェム剤あるいはニューキノロン系抗菌薬が投与されることがある. その結果, 口腔常在菌も多くの抗菌薬に対して耐性を示し, 菌性感染の治療に苦慮することがある. 菊池らは口腔咽頭の常在菌として MRSA が約 30% 存在すると報告している<sup>4)</sup>. 我が国のこのような状況において, 口腔細菌が原因で発症する IE の予防にアンピシリンあるいはアモキシシリンのような古典的な合成ペニシリン製剤が有効であるかは疑問が残る.

以上のように, 口腔細菌が IE 発症に関与が高いとい

平成 25 年 11 月 15 日受付, 平成 25 年 11 月 29 日受理  
別刷請求先 : 博多研文

〒 321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880  
獨協医科大学 口腔外科学

表1 IE患者におけるIEリスクとなる心基礎疾患

心基礎疾患	症例数 (%)
僧房弁閉鎖不全症	17 (36.1)
大動脈弁閉鎖不全症	14 (29.6)
僧房弁閉鎖不全症 + 僧帽弁置換術後	2 (4.1)
僧房弁閉鎖不全症 + 僧房弁狭窄症	2 (4.1)
僧房弁閉鎖不全症 + 大動脈弁閉鎖不全症	2 (4.1)
僧房弁閉鎖不全症 + 三尖弁閉鎖不全症	1 (2.2)
僧房弁閉鎖不全症 + 三尖弁閉鎖不全症 + 僧房弁置換術後	1 (2.2)
僧房弁狭窄症 + 僧房弁閉鎖不全症 + 三尖弁閉鎖不全症	1 (2.2)
大動脈弁閉鎖不全症 + 大動脈弁置換術後	1 (2.2)
大動脈弁閉鎖不全症 + 三尖弁閉鎖不全症	1 (2.2)
大動脈弁閉鎖不全症 + 三尖弁閉鎖不全症 + 心室中隔欠損	1 (2.2)
僧房弁逸脱症	1 (2.2)
僧房弁逸脱症 + 心房中隔欠損	1 (2.2)
心房中隔欠損 + 心室中隔欠損	1 (2.2)
基礎疾患なし	1 (2.2)
合計	47 (100.0)

う報告は多いが、直接の関与を遺伝子レベルで検索し、さらに口腔細菌によるIE発症の予防に古典的合成ペニシリンの大量投与が有効であることを示した研究は少ない。本研究では、(1) IE患者の血液培養で検出された細菌種の同定と薬剤感受性の検索、(2) IE患者における菌血症をおこしうる口腔病変あるいは口腔内観血処置についての後ろ向き検討、(3) IE患者あるいはIE発症リスク患者の口腔細菌のうち連鎖球菌とブドウ球菌の薬剤感受性の検索、(4) IE患者において血液培養で検出された菌と口腔細菌が同一クローンであるかを遺伝子レベルで検索した。

### 対象および方法

**1. 検討項目 (1)** ならびに対象は、IE患者における、血中細菌の同定とその薬剤感受性、ならびにIE発症原因について検討を行った。対象は、2000年1月から2010年12月までに獨協医科大学病院、心臓・血管内科ならびに循環器・腎臓内科においてIEと診断された患者47症例を対象とした。その内訳は、性別は男性28例、女性19例で、年齢は22歳から79歳で、平均55.6歳であった。対象患者のIEリスクとなる心基礎疾患は一人で複数の疾患を有する患者が多かったが(表1)、延べ数で僧房弁疾患を有する患者が28例、大動脈弁疾患を有する患者が17名、弁置換術後患者が4名、心房中隔欠損あるいは心室中隔欠損患者が3名であった。基礎疾患を有していないがIEを発症した患者が1名みられた。

**2. 検討項目 (2)** ならびに対象は、IE患者あるいは

IE発症リスク患者の口腔細菌の同定とその薬剤感受性について検討を行った。対象は、2012年1月から3月までに当科口腔ケア外来を受診したIE患者ならびにIE発症リスク患者27症例を対象とした。その内訳は、性別は男性17例、女性10例で、年齢は40歳から87歳で、平均67.6歳であった。対象患者のIEリスクとなる心基礎疾患は、延べ数で僧房弁疾患を有する患者が12例、大動脈弁疾患を有する患者が7名、ペースメーカー埋入患者が5名、弁置換術後患者が3名、心房中隔欠損あるいは心室中隔欠損患者が5名であった(表2)。そのうち、既にIEを発症した患者が4名であった(表2)。

**3. 検討項目 (3)** ならびに対象は、IE患者の血中細菌と口腔細菌遺伝子配列の検討とそのコロナリティーについて検討を行った。対象は、2006年1月から2013年3月までに血液培養が陽性で、その細菌が凍結保存されていた患者9症例を対象とした。その内訳は、性別は9例全症例が男性であり、年齢は35歳から80歳で、平均51.3歳であった(表3)。対象患者のIEリスクとなる基礎疾患は、延べ数で僧房弁疾患を有する患者が4例、大動脈弁疾患を有する患者が4名、弁置換術後患者が2名、心房中隔欠損あるいは心室中隔欠損患者が2名であった(表3)。なお、この9症例に対しては、検出された細菌の遺伝子検索を行うために院内倫理委員会の承認を得て、インフォームドコンセントを得られた患者に行った。

表 2 IE 患者あるいは IE 発症リスク患者の IE リスクとなる心基礎疾患

心基礎疾患	症例数 (%)	IE 発症例
僧房弁閉鎖不全症	7 (26.0)	1
ペースメーカー埋入	5 (18.5)	
大動脈弁閉鎖不全症	5 (18.5)	
僧房弁閉鎖不全症 + 僧房弁置換術後	3 (11.1)	1
僧房弁閉鎖不全症 + 心房中隔欠損	2 (7.4)	1
心室中隔欠損	2 (7.4)	
大動脈弁閉鎖不全症 + 大動脈弁置換術後	2 (7.4)	1
心房中隔欠損	1 (3.7)	
合計	27 (100.0)	

表 3 血中細菌と口腔細菌のクローナリティーの検索を行った患者の IE リスクとなる基礎疾患

症例	性別	年齢	基礎疾患
症例 1	男性	75	大動脈弁閉鎖不全症 + 弁置換術後
症例 2	男性	64	化膿性脊椎炎, アミロイド苔癬
症例 3	男性	64	僧房弁逸脱症 + 心房中隔欠損
症例 4	男性	66	僧房弁閉鎖不全症 + 弁置換術後
症例 5	男性	41	心房中隔欠損
症例 6	男性	53	大動脈弁閉鎖不全症
症例 7	男性	80	大動脈弁閉鎖不全症 + 僧房弁閉鎖不全症
症例 8	男性	48	僧房弁閉鎖不全症
症例 9	男性	35	大動脈弁閉鎖不全症

#### 4. 細菌の培養方法

##### 1) 口腔細菌

シードスワブ  $\gamma$ 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した. 細菌検査室にて, 血液寒天培地に検体を接種した後, 炭酸ガス培養法にて 35°C で培養を行った<sup>20)</sup>. グラム染色を行うと同時にコロニーの形態から  $\alpha$ -溶血性連鎖球菌とブドウ球菌の純培養を行った. その後, 生化学的性状を BD BBLCRSTAL GP 同定検査試薬 (BD メディカル) で検索し菌種を同定した.

##### 2) 血液中の細菌

IE 患者の静脈血を無菌的に 8~10 ml 採取し, BD BACTEK (日本ベクトン・ディギンソン) の好気培養用ボトルと嫌気培養用ボトルに分注した. 同時に, 異なった部位の静脈あるいは動脈から無菌的に 8~10 ml の血液を採取し, 同様に 2 本のボトルに分注した. 細菌検査室にて BD バクテック FX システムにて 35°C で培養ボトルを 6 日間観察し, ボトル内で菌の生育が認められた場合は血液寒天培地に検体を接種した後, 炭酸ガス培養法にて 35°C で培養を行った. その後の菌の同定は口腔細菌と同様に行った.

##### 3) 薬剤感受性試験

分離培養された細菌で *Staphylococcus* 属, *Streptococcus* 属に関しては, ドライプレート栄研 (栄研化学株式会社) を使用して, 薬剤感受性試験を行った<sup>17)</sup>. それ以外の細菌については, MicroScan<sup>®</sup> (SIMENS) を使用し薬剤感受性試験を行った<sup>18)</sup>.

一般的にアンピシリンの薬剤感受性は *Streptococcus* 属においては, 感受性: 0.25  $\mu$ g/ml 以下, 中等度感受性: 0.5~4  $\mu$ g/ml, 耐性: 8  $\mu$ g/ml 以上で, *Staphylococcus* に対しては, 感受性: 0.25  $\mu$ g/ml 以下, 耐性: 0.5  $\mu$ g/ml 以上である<sup>16)</sup>.

#### 5. Broad-range PCR 法

口腔細菌ならびに, 血液中から分離された細菌を Broad-range PCR 法を用いて 16S rRNA 遺伝子の配列を検索した. すなわち, 種々の細菌に共通な 16S rRNA の保存領域にプライマーを設定し PCR を施行した (図 1, 表 4). これらのプライマーで増幅される遺伝子断片は 16S rRNA をコードする遺伝子のほぼ全領域 (1,500 bp) を含んでおり, これらの遺伝子断片の配列を決定し, 可変領域の配列を比較することによりクローンを同定することができる<sup>5)</sup>.

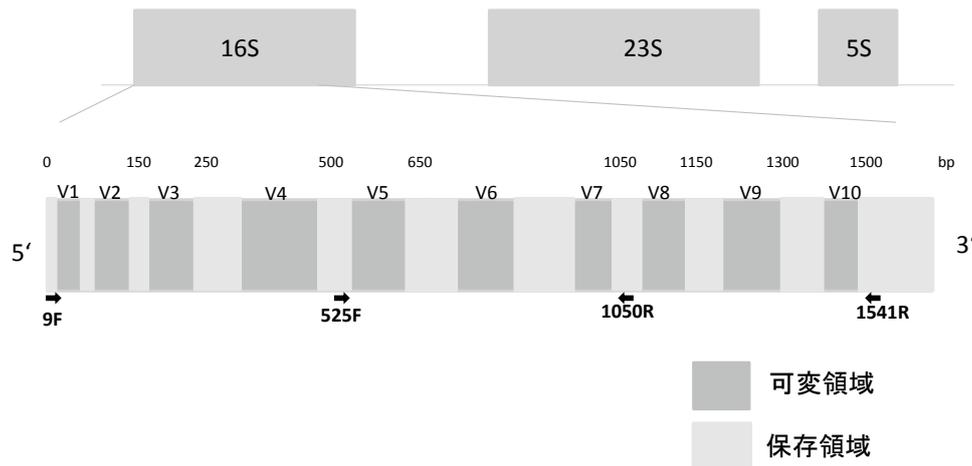


図1 細菌のリボソーム RNA の構成と 16S rRNA の配列

大楠清文：16S リボソーム RNA 保存領域研究の進展. 日本臨床微生物学雑誌 14：1-13 より改変

表4 プライマー

Primer	
UP stream	
16s9F	5'-GAGTTTGATYCTGGCTCAG-3'
16s525F	5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTA-3'
DOWN stream	
16s1050R	5'-CACGAGCTGACGAC-3'
16s1541R	5'-GAAGGAGGTGWTCCARCCGCA-3'

PCR はテンプレートとして煮沸した菌の混濁液を用い、各プライマー 25 pM, dNTPs 2.5 mM (Roche), Expand High Fidelity Enzyme mix (Thermostable Taq DNA polymerase, Tgo DNA polymerase, Thermostable DNA polymerase with proofreading activity の混合酵素) 1.5 Units (Roche) を加えた 45  $\mu$ l の反応系で、PCR 反応サーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Gradient: TaKaRa) にて増幅を行った。反応は 94 $^{\circ}$ C 5 分 1 サイクル, 98 $^{\circ}$ C 4 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 2 分 45 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 7 分 1 サイクルで行った。なお、PCR に使用したプライマーは、UP stream 2 種類と DOWN stream 2 種類を使用して 4 通りのセットを試みた (図1, 表4)<sup>7-9,14,15)</sup>。

PCR 産物は 5  $\mu$ l を 2% アガロースゲルで、100V 30 分間の電気泳動を行うことにより増幅産物の有無を確認した。

#### 6. 16S rRNA 遺伝子配列の決定

得られた PCR 産物を精製後 1  $\mu$ l をテンプレートとして遺伝子断片の増幅に用いたのと同じのプライマー (表4) をシーケンシングプライマーとして使い、Big-Dye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI 日

本) を用いて反応を行なった。Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザー (ABI 日本) にてキャピラリー電気泳動を行うことにより塩基配列を決定し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) による相同性検索を行った<sup>7,19)</sup>。

## 結 果

### 1) IE 患者の血中細菌の同定と薬剤感受性ならびに、IE 発症原因の検索

IE 患者 47 名の血液培養試験から同定された細菌は、*Streptococcus* 属 20 例, *Staphylococcus* 属 8 例, *Enterococcus* 属 2 例であり、口腔内に常在すると言われていた菌種が約 87.1% を占めていた (図2)。それ以外の細菌は、*Enterococcus faecalis* 2 例, *Streptococcus hominis* 1 例が認められた (図2)。これらのうち、1 例は *Campylobacter fetus* が認められたが、この患者は牛の生レバーを摂食した際に、伝播された細菌が口腔内で増殖し血中に入り IE が発症したと考えられた<sup>6)</sup>。

血液培養から同定された菌に対する薬剤感受性について検討を行った。アンピシリンに対して感受性を示した菌は 27 例中 21 例 (75.0%)、ベンジルペニシリンに対して感受性を示した菌は 27 例中 20 例 (74.0%) であった。ペニシリン以外の抗菌薬に対しては、クリンダマイシン：27 例中 24 例 (92.3%)、セフトロレン：23 例中 20 例 (87.0%)、フロモキセフ：23 例中 22 例 (95.7%)、レボフロキサシン：28 例中 24 例 (85.7%)、セフォチアム：23 例中 22 例 (95.7%)、セフォタキシム：20 例中 20 例 (100%)、セファゾリン：26 例中 22 例 (84.6%)、エリスロマイシン：26 例中 19 例 (73.0%)、パニペナム：20 例中 20 例 (100%)、バンコマイシン：27 例中 27 例

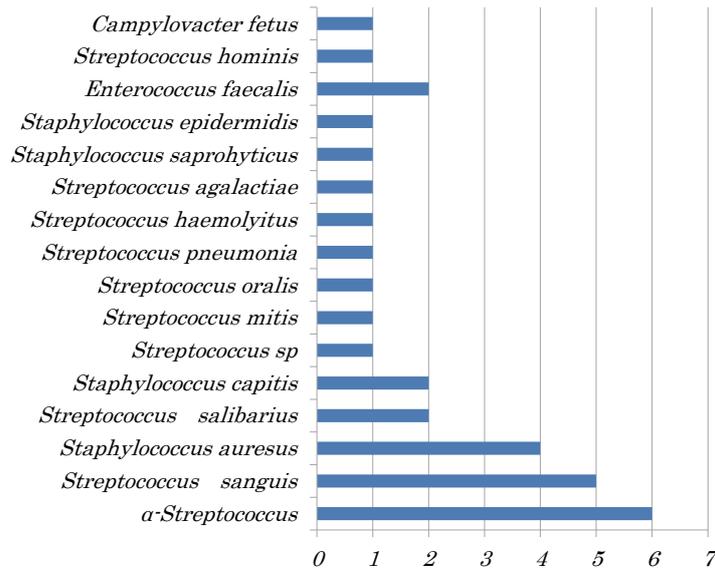


図2 IE患者の血中から検出された細菌

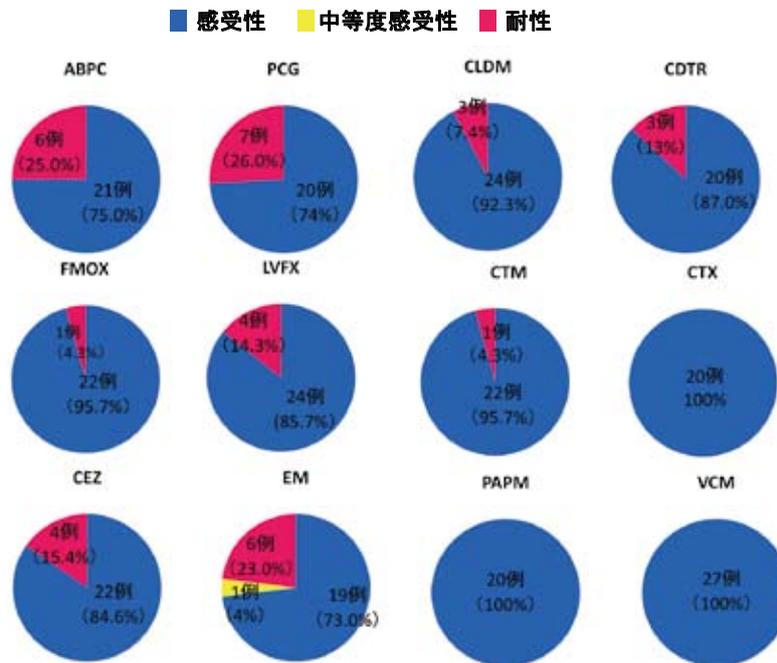


図3 IE患者の血中から検出された細菌に対する薬剤感受性

(100%)であった(図3)。

IE発症の原因となりうる因子(菌血症の原因となりうる因子)を後ろ向きに検討したところ、IE患者47名のうち口腔外科を受診し、口腔診査ならびに画像所見によりIE発症の原因となりうる因子が検討可能であったものは28名であった。残りの19名は、内科カルテを詳細に検討することにより、IE発症の原因となりうる因子を推定した。その結果、口腔内感染巣を有する患者は21例(61.5%)、処置前に抗菌薬投与を行わないで施行された口腔内観血的処置が8例(17.0%)であった(図

4)。その他、CV感染、犬猫咬傷が各2例(4.4%)、針治療、未治療子宮筋腫が各1例(2.2%)、IE発症の原因となりうる因子が同定できなかった症例が12例(25.3%)であった(図4)。

### 2) IE患者あるいはIE発症リスク患者の口腔細菌の同定とその薬剤感受性の検索

好気培養にて検出された細菌は、*Streptococcus*属が35例で最多であり、*Neisseria*属19例、*Micricoccus*属9例、*Staphylococcus*属8例であった(図5)。

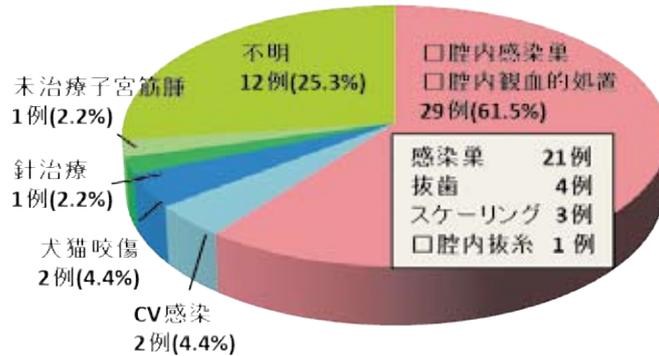


図4 IE患者のIE発症の原因となりうる因子

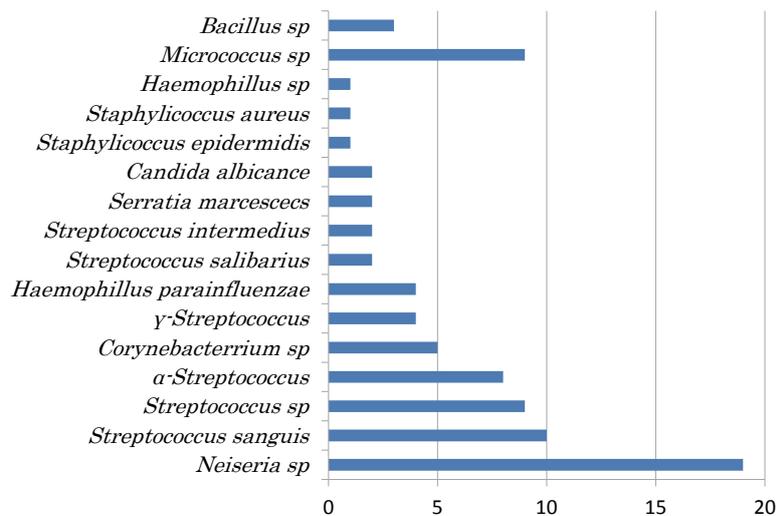


図5 IE患者あるいはIE発症リスク患者の口腔細菌

これらのうち、連鎖球菌とブドウ球菌に対して薬剤感受性を検討したところ、アンピシリンに対して感受性を示したのは26例中19例(73.0%)、中等度感受性を示したのは26例中5例(19.3%)で合わせて92.3%であった。またベンジルペニシリンに対して感受性を示したのは26例中17例(65.4%)、中等度感受性を示したのは26例中7例(26.9%)で合わせて92.3%であった。ペニシリン以外の抗菌薬における薬剤感受性は、感受性と中等度感受性を合わせて、クリンダマイシン：26例中24例(92.3%)、セフジトレン：26例中25例(96.2%)、フロモキシセフ：26例中18例(69.2%)、レボフロキサシン：26例中22例(84.6%)、セフォチアム：26例中19例(73.1%)、セファゾリン：26例中22例(84.6%)、エリスロマイシン：26例中12例(56.1%)、パニペナム：26例中25例(96.2%)、バンコマイシン：26例中26例(100%)であった。カルバペナム系抗菌薬(PAPM)に対して耐性を示した口腔細菌は*Staphylococcus epidermidis*であり、この患者はIE発症歴があり三尖弁、僧帽弁の置換術が施行されており、これまでに多くの種

類の抗菌薬が大量に使用されていた。(図6)。

なお、IE発症リスク患者に対して、スケーリング、抜歯などの観血的処置に対し、IE予防として、サワシリン2g経口投与または、アンピシリン2gとゲンタマイシン40mg静脈内投与し施行したが、これらの症例でIEを発症した症例は認められなかった。

### 3) IE患者における血中細菌と口腔細菌遺伝子配列の検索とそのクローナリティーの検索

まず、血中細菌の遺伝子配列は、*Staphylococcus epidermidis*が6例(症例1, 2, 3, 4, 5, 8)、*Streptococcus mitis group*の細菌が3例(症例6, 7, 9)であった(表5)。*Streptococcus mitis group*には*Streptococcus mitis*、*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus gordonii*、*Streptococcus pseudoneumoniae*等が含まれる。これらの細菌はそれぞれに対して95%以上のホモロジーを示すため、遺伝子配列のホモロジー検索をしても細菌種の決定には至らず、全て*Streptococcus mitis group*として扱った<sup>12,13)</sup>。

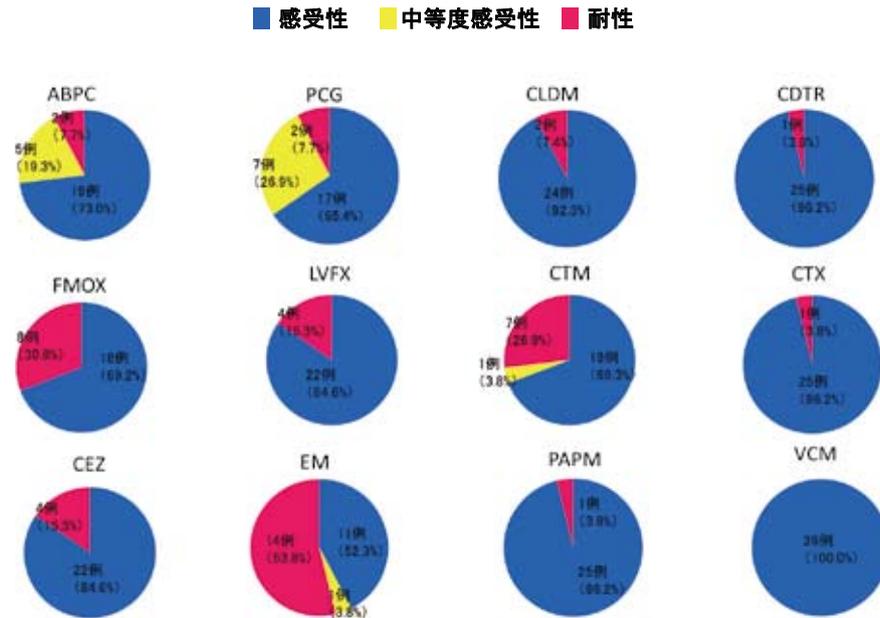


図6 IE患者あるいはIE発症リスク患者の口腔細菌の薬剤感受性

表5 血中から分離された細菌の培養で同定された菌種と遺伝子検索で同定された菌種の比較

症例	培養での同定	遺伝子検索での同定 (配列一致率* : %)
症例1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>a-streptococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (99.0)
症例2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (99.0)
症例3	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>a-streptococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (97.0)
症例4	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (99.0)
症例5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (99.0)
症例6	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis group</i> (95.0)
症例7	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus mitis group</i> (99.0)
症例8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (100)
症例9	<i>a-streptococcus</i>	<i>Streptococcus mitis group</i> (99.0)

\*データベースに登録されている既知の細菌の遺伝子配列と培養細菌から決定した遺伝子配列の一致率

その結果、培養結果により *Staphylococcus epidermidis* と同定されていた3症例 (症例1, 5, 8) は遺伝子検索の結果においても *Staphylococcus epidermidis* と同定され同様の結果であった。一方、*Staphylococcus aureus* と同定されていた2症例 (症例2, 3) と、*Staphylococcus capitis* と同定されていた1症例 (症例4) はいずれも *Staphylococcus epidermidis* であった。

ついで、口腔細菌の遺伝子配列では、*Streptococcus mitis group* が6例 (症例3, 5, 6, 7, 8, 9)、*Staphylococcus epidermidis* が1例 (症例1)、*Staphylococcus aureus* が1例 (症例2) であった。症例4に関してはPCRによる遺伝子断片の増幅が不可能であった (表6)。

培養により細菌種が、*Streptococcus sanguinis* あるいは *oralis* と同定されていた6症例は、*Streptococcus mitis group* と同定された。1症例 (症例9) に関しては、培養にて  $\alpha$  溶血性を示す *Streptococcus* であり、*Streptococcus mitis group* 内の菌である可能性があると考えられた。*Staphylococcus epidermidis* と同定されていた1例 (症例1) は遺伝子検索の結果も *Staphylococcus epidermidis* であった。一方、*Staphylococcus epidermidis* と同定されていた1例 (症例2) は、遺伝子検索の結果 *Staphylococcus aureus* であった (表6)。

血中細菌と口腔細菌のクローナリティーの検索に関しては、血中細菌と口腔細菌の遺伝子配列は、1例 (症例1)

表 6 口腔細菌の培養で同定された菌種と遺伝子検索で同定された菌種の比較

症例	培養での同定	遺伝子検索での同定 (配列一致率* : %)
症例 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (99.0)
症例 2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (99.0)
症例 3	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis group</i> (95.0)
症例 4	<i>Streptococcus sanguinis</i>	PCR (-)**
症例 5	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis group</i> (99.0)
症例 6	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mitis group</i> (98.0)
症例 7	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus mitis group</i> (97.0)
症例 8	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus mitis group</i> (97.0)
症例 9	<i>a-streptococcus</i>	<i>Streptococcus mitis group</i> (98.0)

\*データベースに登録されている既知の細菌の遺伝子配列と培養細菌から決定した遺伝子配列の一致率

\*\* PCR にて遺伝子断片が増幅されなかった。

表 7 血中細菌と口腔細菌の遺伝子配列により同定された菌種の比較

症例	血中細菌	口腔細菌
症例 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
症例 2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
症例 3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus mitis group</i>
症例 4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PCR (-)
症例 5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus mitis group</i>
症例 6	<i>Streptococcus mitis group</i>	<i>Streptococcus mitis group</i>
症例 7	<i>Streptococcus mitis group</i>	<i>Streptococcus mitis group</i>
症例 8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus mitis group</i>
症例 9	<i>Streptococcus mitis group</i>	<i>Streptococcus mitis group</i>

で 100%一致した。したがってこれらの細菌は同一のクローンである可能性が考えられた。また 3 例 (症例 6, 7, 9) では口腔内細菌と血中細菌は細菌種 (グループ) まででは一致したが、遺伝子配列は 100%の一致は見られず、同一のクローンであることは証明できなかった。症例 2 は細菌属 (*Staphylococcus*) まででは一致したが、細菌種 (*epidermidis* と *aureus*) は一致しなかった。症例 3, 5, 8 は細菌属も一致しなかった。

## 考 察

IE が発症するには IE を起こしうる細菌によって引き起こされる菌血症が持続することが必要であると考えられている。一時的な菌血症は、抜歯などの歯科処置に限らず、日々の歯ブラシ等による口腔内清掃や咀嚼などの日常生活にも起こっていると言われ<sup>10)</sup>、IE 発症の原因のうち、13~45.5%では歯科治療が原因であると報告されている<sup>2,21,22)</sup>。本研究において、IE 患者の血液培養から検出された細菌の 87.1%は口腔常在菌であり、これは、Nakatani<sup>2)</sup> らの報告における 81.2%が口腔常在菌であるとの報告とほぼ一致した。また、今回検討した

口腔領域における IE 発症の原因となりうる因子として、口腔内感染巣、口腔内観血的処置が考えられたこと、またリスク因子の軽減のために IE リスク患者に対する口腔ケアならびに、抗菌薬予防投与下に施行している口腔内観血的処置後に、IE を発症した症例を認めていないことから、JCS のガイドラインで推奨されている、日々の口腔ケア、IE ハイリスク患者あるいは、AHA の最高リスク患者に対する口腔内観血処置前の大量抗菌薬投与は有用であると考えられた<sup>1,3)</sup>。

本研究の IE 患者あるいは IE 発症リスク患者の口腔細菌の薬剤感受性の検索結果から、アンピシリンならびにベンジルペニシリンは、連鎖球菌ならびにブドウ球菌に対し、それぞれ感受性と中等度感受性を合わせて、92.3%有していた。また、アモキシシリン 2g 経口投与後の血中濃度は 1 時間 (7.6 µg/ml)、2 時間 (12.8 µg/ml)、4 時間 (8.3 µg/ml)、6 時間 (2.9 µg/ml) である<sup>16,18,19)</sup>。これらのことを勘案すると、アモキシシリン 2g を経口投与すると少なくとも 4 時間は感受性、中等度感受性を示す連鎖球菌あるいはブドウ球菌に対して、アンピシリンの発育阻止濃度以上の血中濃度を維持すると考えられ、

AHA, JCSのガイドラインに示された用量用法は, IE予防に有効であると思われた. ただし7~8%は耐性を示すことより, IE発症高頻度群であるAHAのhighest risk, JCSのclass I患者にはペニシリン耐性菌に効果を示す薬剤の併用も考慮しなければならないと思われた<sup>19)</sup>.

一方, IE患者あるいはIEリスク患者の口腔常在菌のうち, *Streptococcus*属と*Staphylococcus*属では, 口腔外科領域の菌性感染に頻用されているオキサセフェム(フロモキセフ)は8例(30.8%), ニューキノロン系抗菌薬(レボフロキサシン)に対する耐性菌も4例(15.3%)認められた. ただし第一世代セフェム(セファゾリン)・第二世代セフェム(セフォチアム)に対する耐性菌はともに7例(26.9%)と多いが, 第三世代セフェムであるセフトキシム, セフトレンの耐性菌はともに1例(3.8%)と比較的少なかった. また, クリンダマイシンに対する耐性菌は2例(7.4%)と少なく, ガイドライン<sup>1,3)</sup>でペニシリンアレルギーを有する患者にクリンダマイシンを投与することが推奨されているが, 本研究でも同様な結果であった. さらに, ガイドラインでは, マクロライド系抗菌薬をペニシリンアレルギーの患者に投与することも推奨しているが, 口腔内の連鎖球菌とブドウ球菌はマクロライド系抗菌薬(エリスロマイシン)に対し53.8%と高率に耐性を認めており, 効果が期待できないと思われた.

IEを既に発症している患者の血液培養で検出された細菌の抗菌薬感受性に関しては, 約25%はペニシリン耐性であった. この値はガイドライン<sup>1)</sup>の内容とほぼ一致し, IEの治療で血中細菌が検出されない場合は第一選択として種々の耐性菌に対する治療を考慮することが再確認できた<sup>1)</sup>.

口腔細菌あるいは血液中から培養された細菌の16S rRNA遺伝子の配列を検索すると, グラム染色, コロニーの形態, 生化学的性状で推定された菌種とは異なった菌であることが多かった. 伊藤らは培養で推定された細菌属の正確性は90%程度, 細菌種までの正確性になると60~70%程度であると報告しており<sup>11)</sup>, 本研究の結果も同様で, 細菌培養で推定された菌種名のみで, 異なった場所に存在する細菌の同一性を検索するときには注意が必要と思われた.

本研究で, 口腔細菌と血中細菌の16S rRNA遺伝子の配列が一致し, 同一クローンである可能性があると考えられたのは1症例(症例1:*Staphylococcus epidermidis*)のみであった. 症例6, 7, 9では口腔内細菌と血中細菌は細菌種(*Streptococcus mitis group*)までは一致したが, 遺伝子配列は100%の一致は見られず, 同一

のクローンであることは証明できなかった. その理由として口腔内の細菌はポリクローン(あるいはオリゴクローン)で存在しており, 分離培養の過程で単クローンのみが選択されたためと考えられた. 同様に症例2においては*Staphylococcus*の異なったクローンを純培養したことにより細菌種(*epidermidis*と*aureus*)が異なったと考えられた.

現在, 培養された細菌をクローン化することなく, 同一菌種あるいは同一菌属と考えられる細菌を複数個まとめて培養することにより, 多クローンあるいはオリゴクローンの細菌で異なった部位に存在する細菌の同一性の検索を進めている. 同時に手術で得られた心臓弁あるいは疣腫から抽出したDNAを用いて口腔細菌の存在を明らかにする検索を進めている.

## 結 論

IE発症の原因菌として口腔連鎖球菌とブドウ球菌が極めて重要な役割を演じていることが遺伝子検索の結果明らかとなった. IE発症の予防には, 徹底した口腔内感染巣の除去と日々の口腔ケア, 口腔内観血処置時には大量のペニシリン系薬剤の前投与が有効であることが確認できた.

謝 辞 稿を終えるにあたり, 臨床研究遂行にあたって多大な協力を頂きました循環器・腎臓内科, 石光俊彦教授, 感染制御・臨床検査医学講座, 吉田教学内准教授, 心臓・血管内科, 豊田茂学内准教授ならびに, 細菌培養でご協力頂きました臨床検査センター, 主任浅田道治氏, 遺伝子検索でご協力頂きました研究支援センター臨床医学研究部門感染症研究室, 小池幸子氏ならびに研究の円滑な発展のために特別のご配慮戴いた口腔外科学講座の教室員の方々に深謝いたします.

## 参考文献

- 1) 日本循環器学会, 日本胸部外科学会, 日本小児心臓病学会, 日本心臓病学会, 他: 循環器病の診断と治療に関するガイドライン(2007年度合同研究班報告). 感染性心内膜炎の予防と治療に関するガイドライン(2008年改訂版).
- 2) Nakanishi S, Mitsutake K, Hozumi T, et al: Current Characteristics of Infective Endocarditis in Japan — An Analysis of 848 Case in 2000 and 2001 —, *Circulation Journal* **67**: 901-905, 2003.
- 3) Wilson H, Taubert KA, Gewitz M, et al: Prevention of Infective Endocarditis: From the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki

- ki Disease Committee, Council on Cardiology, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation* **116** : 1736-1754, 2007.
- 4) 菊池賢 : MRSA/各種耐性菌の現状と対策. *日医雑誌* **129** : 347-352, 2002.
  - 5) 保科定頼 : 16S リボソーム RNA 保存領域研究の進展. *日本臨床微生物学雑誌* **14** : 1-13, 2004.
  - 6) Haruyama A, Toyoda S, Kikuchi M, et al : *Campylobacter fetus* as Cause of Prosthetic Valve Endocarditis. *Texas Heart Institute Journal* **38** : 584-587, 2011.
  - 7) 鈴木弘倫, 吉田敦, 樽川友美, 他 : 同定が困難ないし不確実であった血液培養由来菌の 16SrRNA を用いた再同定. *日本臨床腸内微生物学会誌* **11** : 47-50, 2009.
  - 8) Kawamura Y, Robert AW, Shin-Ei S, et al : Genetic approaches to the identification of the mitis group within the genus *Streptococcus*. *Microbiology* **145** : 2605-2613, 1999.
  - 9) Soumitesh C, Danica H, Michele B, et al : A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* **69** : 330-339, 2007.
  - 10) Peter BL, Michael TB, Howell CS, et al : Bacteremia Associated With Toothbrushing and Dental Extraction. *Circulation* **117** : 3118-3125, 2008.
  - 11) 伊藤英祐, 渡智久, 東由桂, 他 : 2機種による血液培養分離菌の同定成績について. *臨床病理* **61** : 382-389, 2013.
  - 12) N Klijn, AH Weerkamp, WN de Vos : Identification of mesophilic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* **57** : 3390-3393, 1991.
  - 13) Kawamura Y, Xiao-Gang Hou, Todome Y, et al : *Streptococcus peroris* sp.nov.and *Streptococcus infantis* sp. Nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48** : 921-927, 1998.
  - 14) Garnier F, Gerbaud G, Courvalin P, et al : Identification of Clinically Relevant Viridans Group Streptococci to the Species Level by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* Sept. **35** : 2337-2341, 1997.
  - 15) Hoshino T, Izumi T, Oouchi T, et al : Method for rapid identification of oral streptococci by PCR using 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer gene. *Pediatric Dental Journal* **15** : 185-190, 2005.
  - 16) Adnan S, Dajani RF, Michelle CB : Oral Amoxicillin as Prophylaxis for Endocarditis : What is the Optimal Dose?. *Clin Infect Dis* **18** : 157-160, 1994.
  - 17) Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI Nineteenth Informational Supplement. M100-S19, 2009.
  - 18) Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. Approved Guideline **26** : M45-A2.
  - 19) Masuda K, Nemoto H, Nakano K, et al : Amoxicillin-resistant oral streptococci identified in dental plaque specimens from healthy Japanese adult. *J Cardiol* **59** : 285-290, 2012.
  - 19) Mangala A, Nadkarni F, Elizabeth M, et al : Determination of bacterial load real-time PCR using a broad-rangeniversal) probe and primers set. *Microbiology* **148** : 257-266, 2002.
  - 20) Jorn AA, Bruce JP, Lauren NS, et al : Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology* **43** : 5721-5732, 2005.
  - 21) Thomas CI, Diz DP, Limeres PJ, et al : An update on-infective endocarditis of dental origin. *J Dent* **30** : 37-40, 2002.
  - 22) Inmaculada TC, Pedro DD, Crispian S, et al : An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Pract Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **93** : 660-670 2002.

## Implication of the Oral Bacteria on the Onset of Infective Endocarditis

Kembun Hakata, Hitoshi Kawamata, Yutaka Imai

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dokkyo Medical University School of Medicine*

In this study, we attempted to clarify the implication of the oral bacteria on the onset of infective endocarditis (IE). In the first experiment, oral bacteria could be found in the blood from 27 of the 47 patients (57.4%) with IE. Furthermore, 29 of the patients (61.7%) showed possible oral bacterial foci causing the bacteremia, and 8 of the patients (17.0%) received the oral surgery or the dental treatment accompanying bleeding. In the second experiment, we isolated the oral bacteria (*Staphylococci* and *Streptococci*) from the 27 patients with IE or with high risk for the onset of IE, and determined the susceptibility for several anti-biotics. Ninety two point three percent of the bacteria showed susceptibility against penicillin G and its derivatives. In the third experiment, we identified the bacterial species isolated from oral cavity and blood in nine patients with IE by determining the DNA sequence of the 16S rRNA. The bacterial species isolated from blood in the patients with IE were

*Staphylococcus epidermidis* or *Streptococcus mitis group*, which usually existed in the oral cavity. DNA sequence of the 16S rRNA in the bacteria (*Staphylococcus epidermidis*) from blood in one patient was completely identical to that from oral cavity. In three patients, although DNA sequence from blood was not completely identical to that from oral cavity, the species (*Streptococcus mitis group*) of the bacteria from blood and oral cavity were identical. These results suggest that oral *Staphylococci* and *Streptococci* play a crucial role on the onset of IE. Moreover, complete removal of the oral bacterial foci, daily oral care, and the administration of the large amount of penicillin before the oral surgery or the dental treatment accompanying bleeding might be effective to prevent the onset of IE.

**Key words** : Infective endocarditis, antibiotic sensitivity, oral bacteria, 16S rRNA