

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2010年10月7日(07.10.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/113627 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/14 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)  
A61K 45/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
A61P 7/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/054364

(22) 国際出願日: 2010年3月15日(15.03.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2009-088239 2009年3月31日(31.03.2009) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人浜松医科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HAMAMATSU UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) [JP/JP]; 〒4313192 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号 Shizuoka (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 梅村和夫(UMEMURA, Kazuo) [JP/JP]; 〒4313192 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号 国立大学法人浜松医科大学内 Shizuoka (JP). 外村和也(HOKAMURA, Kazuya) [JP/JP]; 〒4313192 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号 国立大学法人浜松医科大学内 Shizuoka (JP). 仲野和彦(NAKANO, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 大嶋隆(OOSHIMA, Takashi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 野村良太(NOMURA, Ryota) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山

田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 和田孝一郎(WADA, Koichiro) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 葛和清司, 外(KUZUWA, Kiyoshi et al.); 〒1620067 東京都新宿区富久町8番21号 T & Tビル 葛和国际特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: HIGHLY SENSITIVE DETECTION METHOD FOR HIGHLY VIRULENT ORAL CAVITY BACTERIA

(54) 発明の名称: 高病原性口腔細菌の高感度検出法

(57) Abstract: Provided is a method that involves the detection of protein antigens (PA) and/or collagen-binding proteins (CBP) of oral cavity bacteria in a sample, and in which oral cavity bacteria that exacerbate hemolysis are detected for and/or subjects at high-risk for hemolysis aggravation are screened and/or the level of risk of the hemolysis aggravation in a subject is assessed if a PA is not detected and/or a CBP is detected in the sample. Also provided are a detection reagent and kit for use in the method.

(57) 要約: 本発明は、試料中の口腔細菌のタンパク質抗原であるPAおよび/またはコラーゲン結合タンパク質であるCBPを検出することを含み、PAが検出されないことおよび/またはCBPが検出されることにより、出血増悪口腔細菌の検出および/または出血増悪の危険性が高い対象のスクリーニングおよび/または対象における出血増悪の危険性の判定を行う方法、ならびにかかる方法に用いるための検出試薬およびキットを提供する。



WO 2010/113627 A1

## 明 細 書

### 発明の名称：高病原性口腔細菌の高感度検出法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、出血増悪を引き起こす口腔細菌を検出する方法、出血増悪の危険性が高い対象のスクリーニング方法、対象における出血増悪の危険性の判定方法、これらの方法に用いるための検出試薬およびキットに関する。

#### 背景技術

[0002] 血管の損傷による出血を伴う状態として、外傷や圧力による血管の破綻による出血、出産時の出血、脳内出血などが挙げられ、例えば脳内出血の場合、出血に伴う脳の圧迫や壊死による神経組織の損傷、またはくも膜下出血などの場合は出血により誘導される大脳血管攣縮による神経症状などにより、重度の障害を生じる可能性がある。出血の予後を改善するためには、効果的な出血の治療（止血）のみならず、出血の増悪の予防が必要であり、また、出血が増悪するリスクを診断することも重要である。

[0003] 出血を伴う疾患の診断においては、例えば、脳卒中の可能性を診断するマーカーとして、Apo C-III、血清アミロイドA、Apo C-I、アンチトロンビンIIフラグメント、Apo A-Iなど（特許文献1）、脳卒中および脳損傷の予後を診断するマーカーとして、アデニレートキナーゼなどの脳虚血の脳脊髄液マーカー、 $\beta$ -トロンボグロブリン、血管細胞接着因子（VCAM）、ナトリウム利尿ペプチド、また、後に起こる脳血管痙攣を予測するマーカーとして、フォン・ビルブラント因子（vWF）、血管内皮増殖因子（VEGF）およびマトリクスメタロプロテアーゼ-9（MMP-9）など（特許文献2）が用いられている。しかし、これらはいずれも生体内において既に起こっている出血を検出するためのマーカーであり、出血の増悪のリスクを診断することはできない。

[0004] したがって、出血の増悪を引き起こすリスクや、かかるリスクを有する個体を判定またはスクリーニングするための方法、および出血の増悪を予防または治療する方法の確立が必要とされている。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0005] 特許文献1：特表2007-502401号公報  
特許文献2：特表2005-522669号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

- [0006] したがって、本発明の課題は、出血の増悪を引き起こす原因因子を同定し、出血の増悪リスクを有する患者を迅速且つ容易に特定できるシステムを構築することにある。また、本発明の別の課題は、かかるリスクを有する個体において、出血の増悪を防止することにある

#### 課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を行う中で、特定の株の*S. mutans*に感染した対象において、出血が悪化するという知見を得た。本発明者らによるさらなる研究により、最も重篤な出血増悪の病原性を発揮するのは、主要な菌体表層タンパクであり分子量約190kDaのタンパク質抗原であるPA（Protein Antigen、別名PAc、SpaP、antigen I/II、antigen B、SR、IF、P1、MSL-1）を保有せず、かつ分子量約120kDaのコラーゲン結合タンパクであるCBP（Collagen Binding Protein、別名Cnm）を保有する菌株であるという知見を得るとともに、かかる病原性菌株が、いずれも低い細胞表面電荷を有することも見出した。*S. mutans*が出血に及ぼす影響についてはこれまで全く報告されておらず、*S. mutans*の特定の株が出血の予後を悪化させること、またPAおよびCBP、さらには細胞表面電荷がかかる病原性に関与しているという発見は、驚くべき結果であった。本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を進めた結果、CBP陽性菌が血小板凝集抑制能を有することなどを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0008] すなわち、本発明は、出血増悪口腔細菌を検出する方法であって、試料中の口腔細菌のPAおよび／またはCBPおよび／または細胞表面電荷を検出

することを含み、PAが検出されないことおよび／またはCBPが検出されることおよび／または細胞表面電荷が陰性であることにより、出血増悪口腔細菌が存在すると判断する、前記方法に関する。

[0009] また、本発明は、出血増悪の危険性が高い対象のスクリーニング方法であって、対象から得られた生体試料中の口腔細菌のPAおよび／またはCBPおよび／または細胞表面電荷を検出することを含み、PAが検出されないことおよび／またはCBPが検出されることおよび／または細胞表面電荷が陰性であることにより、出血増悪の危険性が高いと判断する、前記方法に関する。

[0010] あるいは、本発明は、対象における出血増悪の危険性の判定方法であって、対象から得られた生体試料中の口腔細菌のPAおよび／またはCBPおよび／または細胞表面電荷を検出することを含み、PAが検出されないことおよび／またはCBPが検出されることおよび／または細胞表面電荷が陰性であることにより、前記対象において出血増悪の危険性が高いと判断する、前記方法に関する。

[0011] また、本発明は、出血が破綻性出血である、前記いずれかの方法に関する。

本発明はまた、口腔細菌が、*Streptococcus mutans*である、前記いずれかの方法に関する。

本発明はさらに、PAが、

(1) 配列番号1、17、19、21または23で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(2) (1)のポリペプチドに対して1または2以上の変異を含むが、(1)のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

(3) 配列番号2、18、20、22または24で表される核酸配列もしくはその相補配列またはその断片にストリンジェントな条件下においてハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつ(1)のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

(4) 配列番号 1、17、19、21 または 23 で表されるアミノ酸配列と 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、  
からなる群より選択される、前記方法に関する。

本発明はさらに、PA が、配列番号 1、17、19、21 または 23 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、前記方法に関する。

[0012] 本発明はまた、CBP が、

(1) 配列番号 5、9、27 または 31 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(2) (1) のポリペプチドに対して 1 または 2 以上の変異を含むが、(1) のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

(3) 配列番号 6、10、28 または 32 で表される核酸配列もしくはその相補配列またはその断片にストリンジントな条件下においてハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつ (1) のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

(4) 配列番号 5、9、27 または 31 で表されるアミノ酸配列と 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、  
からなる群より選択される、前記方法に関する。

本発明はまた、CBP が、配列番号 5、9、27 または 31 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、前記方法に関する。

[0013] また、本発明は、口腔細菌の PA 検出剤および/または CBP 検出剤を含む、出血増悪口腔細菌の検出用試薬に関する。

また、本発明は、出血増悪口腔細菌の検出のための、口腔細菌 PA 特異的抗体に関する。

[0014] さらに、本発明は、

PA 検出試薬、および

CBP 検出試薬

を少なくとも含む、出血増悪口腔細菌の検出および/または出血増悪の危険性が高い対象のスクリーニングおよび/または対象における出血増悪の危険

性の判定のためのキットに関する。

[0015] また、本発明は、口腔細菌 P A タンパク質または P A タンパク質をコードする核酸を含む、止血剤に関する。

また、本発明は、口腔細菌 P A タンパク質または P A タンパク質をコードする核酸に結合する物質を含む、血小板凝集抑制剤に関する。

また、本発明は、口腔細菌 C B P または C B P タンパク質をコードする核酸に結合する物質を含む、出血増悪抑制剤に関する。

[0016] あるいは、本発明は、口腔細菌 C B P を含む、組織におけるコラーゲン露出部位の検出剤に関する。

また、本発明は、口腔細菌 C B P を含む、コラーゲン露出部位への物質送達用担体に関する。

[0017] 本発明はまた、口腔細菌 C B P および止血剤を含む、出血治療剤に関する。

さらに、本発明は、コラーゲンに対する血小板の感受性が低い対象のための、上記出血治療剤に関する。

また、本発明は、口腔細菌除去剤を含む、出血増悪予防剤に関する。

### 発明の効果

[0018] 本発明により、個体が出血増悪を引き起こすリスクを迅速且つ簡易に診断することが可能となる。また、本発明の方法により、唾液やプラークなどの容易に入手可能な生体試料を用いて、特別な分析機器を使用することなく、出血増悪の原因因子を検出することが可能となる。これにより、出血増悪のハイリスク集団を特定し、この集団に属する個体に対して原因菌の除菌や歯科衛生指導などの措置を行うことにより、出血増悪を効果的に予防することができる。

### 図面の簡単な説明

[0019] [図1] 図 1 は、出血増悪をもたらし得る *S. mutans* 株を唾液から検出する系のフローチャートである。

[図2] 図 2 は、*S. mutans* の培養方法および検出方法のスキームである。

[図3] 図3は、PA欠失*S. mutans*およびCBP保有*S. mutans*の検出方法のスキームである。

[0020] [図4] 図4は、マウスに*S. mutans*株を感染させ、脳出血増悪を誘導した結果を示した図である。(a~b) 脳出血を誘導し、PBS (コントロール) または*S. mutans* TW295株を投与した24時間後のマウス脳の全体(a) および(b) 冠状スライスの代表的マクロ像である。矢頭は出血部位を示す。(c) 種々の*S. mutans*株の感染による出血面積の相違を示すグラフである。各コラムは、独立した10~21回の実験からの平均値±SEMを表す(\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。(d) 出血誘導の3時間後にコントロールまたはTW295投与マウスから単離した血管損傷側半球の典型的な顕微鏡写真である。拡大像は、微小血管出血を示す。(e) 菌投与の24時間後にサンプルを回収し、MMP-9活性をゼラチンゲルザイモグラフィにより検出した。MMP-9活性は、TW295投与群の血管損傷側半球において、コントロール群に比べ一貫して高かった(lps: 脳の血管損傷側半球、Ctr: 対側半球)。

[0021] [図5] 図5は、投与菌の損傷血管への集積および血管周囲のコラーゲンとの相互作用を示した図である。(a) TW295株を感染させたマウスにおける24時間後の各臓器において、感染菌の細胞DNAを特異的に検出するプライマーを用いたPCRで検出した。各レーンのラベルは、それぞれ、M: 分子マーカー(100bpラダー)、Std: 陽性対照(TW295株から抽出したゲノムDNA)、lps: 脳の血管損傷側半球、Ctr: 脳の対側半球である。(b) 損傷領域および非損傷領域から単離した組織を、*S. mutans*を採取するために培養ディッシュにプレーティングした。単離回収した菌数をCFU/タンパク質mgで示す。(c) TW295株を投与して3時間後に摘出した脳組織から作製したサンプルにおいて観察された損傷血管と感染細菌細胞との相互作用を示す代表的なin vivo走査型電子顕微鏡画像。右のパネルは枠部の拡大像である。白矢頭は、損傷部位において、集積した菌が血管外部に漏出していることを示す。(d) 損傷半球における菌と血管周囲のコラーゲン線維との相互作用を示すin vivo走査型電子顕微鏡画像。白矢頭は、コラーゲン線維と相互作用している菌を示す。

- [0022] [図6] 図6は、損傷脳領域に集積した細菌のグラム染色による検出を示した図である。白矢頭は、集積した細菌を示す。スケールバー：25  $\mu$ m。
- [図7] 図7は、コラーゲン結合タンパク質（CBP）の存在およびタンパク質抗原（PA）の発現の病原性に対する効果をまとめた図である。
- [0023] [図8] 図8は、CBPを発現する*S. mutans*がコラーゲン結合活性および脳出血に与える効果を示した図である。（a）種々の*S. mutans*株のコラーゲン結合活性を、2mgのI型コラーゲンと $1 \times 10^{10}$ 個の細菌細胞の一定条件下において評価した。各株についての結果を、TW871株を100%とした場合のパーセンテージで表した。（b）TW295、TW295から作製したTW295CND株、MT8141またはMT8141から作製したMT8141PD株を感染させた場合のマウスにおける出血領域の大きさ。各コラムは、11～16の独立した実験の平均値 $\pm$ SEMを表す。（c）コラーゲン結合活性と合計出血面積との相関関係。
- [0024] [図9] 図9は、種々の*S. mutans*株におけるコラーゲン結合活性と血小板凝集との関係を示した図である。（a）種々の*S. mutans*株の血小板凝集活性。アッセイは、マウス全血と血小板凝集計を用いて、4  $\mu$ gのコラーゲンおよび細菌細胞数 $1 \times 10^7$ 個の一定条件下において行った。各株についての結果を、コラーゲンを含むが細菌細胞を含まない場合を100%とした場合のパーセンテージで表す。（b）コラーゲン結合活性と血小板凝集との相関関係。
- [0025] [図10] 図10は、種々の*S. mutans*株による血小板凝集に対する効果を示した図である。（a）種々の細胞数の標準株MT8148または病原性株TW871の添加による血小板凝集率。*S. mutans*の添加後にマウス全血の凝集を測定し、パーセンテージで表した。（b～c）58種の臨床株における血小板凝集率を（a）と同じ方法により評価した。結果を、（b）その血清型（c；n=20、e；n=15、f；n=10、およびk；n=13）、または（c）単離株のソース（口腔；n=45、血液；n=13）により表した。白丸および黒丸は、それぞれ口腔および血液単離株を示す。水平の太いバーは、各群の平均値を示す（\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ ）。（d）ヒト多血小板血漿を用いた血小板凝集アッセイの典型的チャート。MT8141



またはTW871の細菌細胞（ $10^7$ CFU）とヒト多血小板血漿とをインキュベーションし、5分後にコラーゲン（ $4\mu\text{g}$ ）を添加した。（e）アラキドン酸誘導血小板凝集に対する細菌の効果。全血凝集において、コラーゲンの代わりにアラキドン酸を凝集試薬として用いた。各コラムは、8～14の独立した実験からの平均値 $\pm$ SEMを表す。

[0026] [図11] 図11は、細菌細胞表面の状態の相違とコラーゲン誘導血小板凝集との関係を示した図である。（a）*S. mutans*株および血小板のコラーゲンに対する反応の走査型電子顕微鏡による代表的な所見。コラーゲンと反応させた後で、血小板画分を回収して走査型電子顕微鏡で観察した。（b）*S. mutans*株のゼータ電位値。基準株MT8148およびそのアイソジェニック変異株MT8148PDのゼータ電位値を測定し、mVで表した。さらに、7種の口腔単離株および7種の血液単離株も測定した。各コラムは、3～5の独立した実験からのデータを表す。（c）細菌表面の透過型電子顕微鏡所見。（d）細菌表面の走査型電子顕微鏡所見。

[0027] [図12] 図12は、血小板凝集とゼータ電位値との相関関係を示した図である。各点は、1細菌株を表す。

[図13] 図13は、細菌表面の3次元再構成画像を示した図である。TEMコンピュータ断層撮影法により作成した3次元再構成画像を用いて、細菌膜を比較した。（a）MT8148のペプチドグリカン層は、TEMにより得られた3次元画像において透明で非常に滑らかな層として観察される。（b）病原性株であるTW295の細菌表面のペプチドグリカンは、不透明でその外形が不明瞭である（矢頭）。

[0028] [図14] 図14は、ヒト脳卒中患者から単離した細菌の、コラーゲン結合活性および血小板凝集に対する効果を示した図である。（a）脳卒中患者から単離した*S. mutans*株（SMH2およびSMH4）のコラーゲン結合活性。活性は、 $2\text{mg}$ のI型コラーゲンおよび細菌細胞数 $1 \times 10^{10}$ 個の一定条件下で評価した。各株についての結果を、TW871を100%とした場合のパーセンテージとして表す。（b）脳卒中患者から単離した*S. mutans*株の血小板凝集活性。アッ

セイは、マウス全血を用いた、血小板凝集計でのインピーダンス法により、 $4 \mu\text{g}$ のI型コラーゲンおよび細菌細胞数 $1 \times 10^7$ 個の一定条件下で行った。各株についての結果を、コラーゲンを添加したが細菌細胞を添加しない条件を100%とした場合のパーセンテージとして表す。

[0029] [図15] 図15は、脳卒中患者から単離したCBPを発現する*S. mutans*の、脳出血に対する効果を示した図である。(a) 脳卒中患者から単離したSMH4を投与した、脳出血発症24時間後のマウス脳全体の代表的マクロ像。(b) SMH4を投与したマウスの脳切片の代表的マクロ像。(c) 脳卒中患者から単離したCBPを発現する*S. mutans* (SMH2およびSMH4)を感染させたマウス群の脳出血領域のサイズ。各コラムは、11~16の独立した実験の平均値 $\pm$ SEMを表す(\* $p < 0.05$ )。

[0030] [図16] 図16は、*S. mutans*細胞による脳出血増悪の想定されるメカニズムを表した模式図である。(a) 内皮細胞損傷部位において血小板凝集により誘導される正常な止血。(b) 高い負の電荷を有する*S. mutans*細胞が、露出した正の電荷を有するコラーゲン上に集積し、コラーゲン結合タンパク質を有する*S. mutans*細胞は、露出コラーゲンに対して高いアフィニティーを有するため、これらの両方により、内皮細胞損傷部位においてMMP-9の活性化および血小板凝集の障害がもたらされ、持続的な出血を引き起こす。

[0031] [図17] 図17は、マウスの中脳動脈上皮細胞に光化学的に傷害を誘導する実験プロトコルの模式図である。(a) 仮説および実験プロトコルの模式図。(b) 実験手順のタイムスケジュール。

[0032] [図18] 図18は、PA欠失*S. mutans*およびCBP保有*S. mutans*の存在を判定する分析結果の例を示した図である。

[図19] 図19は、*S. mutans*を培養する際の至適条件(好気条件/嫌気条件での培養、抗生物質濃度、栄養濃度)の検討結果を示すグラフである。

[図20] 図20は、病原性*S. mutans*を検出するために使用可能な唾液の保存期間を検討した結果を示すグラフである。

**発明を実施するための形態**

- [0033] 本発明は、出血増悪口腔細菌を検出する方法を提供し、該方法は、試料中の口腔細菌のPAおよび／またはCBPおよび／または細胞表面電荷を検出することを含み、PAが検出されないことおよび／またはCBPが検出されることおよび／または細胞表面電荷が陰性であることにより、出血増悪口腔細菌が存在すると判断する。
- [0034] 本発明は、別の態様において、出血増悪の危険性が高い対象のスクリーニング方法を提供し、該方法は、対象から得られた生体試料中の口腔細菌のPAおよび／またはCBPおよび／または細胞表面電荷を検出することを含み、PAが検出されないことおよび／またはCBPが検出されることおよび／または細胞表面電荷が陰性であることにより、出血増悪の危険性が高いと判断する。
- [0035] 本発明は、さらに別の態様において、対象における出血増悪の危険性の判定方法を提供し、該方法は、対象から得られた生体試料中の口腔細菌のPAおよび／またはCBPおよび／または細胞表面電荷を検出することを含み、PAが検出されないことおよび／またはCBPが検出されることおよび／または細胞表面電荷が陰性であることにより、前記対象において出血増悪の危険性が高いと判断する。
- [0036] 齲蝕の主要な病原細菌である口腔細菌、ミュータンスレンサ球菌*Streptococcus mutans*には、4つの血清型（c、e、fおよびk）が公知である。*S. mutans*はまた、菌血症および感染性心内膜炎の起炎菌としても知られており、また、心臓弁および大動脈瘤検体から*S. mutans*の細菌DNAが検出されたことから、循環器疾患との関連性についても報告されている（Nakano et al., 2008, Japanese Dental Science Review, 44: 29-37）。しかしながら、*S. mutans*と他の疾患との関連性、例えば脳血管疾患などに与える影響については、これまで全く検討されていなかった。
- [0037] 本明細書において開示する本発明者らの研究により、*S. mutans*のいくつかの異なる株を静脈投与すると、中大脳動脈損傷により軽度の脳出血を誘導した場合に、自発的な止血作用を阻害し、出血の増悪を引き起こすことが明らか

かとなった。口腔から一般的に単離されるMT8148株（血清型c）（Minami et al., 1990, Oral Microbiol. Immunol., 5: 189-194）は、かかる作用を引き起こさないが、血清型kの中には出血増悪を引き起こす株があり、特にTW295株およびTW871株（Nakano et al., 2004, Journal of Clinical Microbiology, 42(1): 198-202）、SA53株（Nakano et al., 2007, J. Clin. Microbiol., 45: 2614-2625）、ならびにLJ32株（Nakano, K. et al., 2008, J. Dent. Res. 87: 964-968）は、著しい出血増悪を引き起こす。

[0038] 本発明者らは、これらの高病原性の*S. mutans*株が、主要な菌体表層タンパク質であるPAを欠失していることを見出した。また、本発明者らは、PAを欠失する株の中でも、別の菌体表層タンパク質であるCBPを保有する株の病原性が特に高いことを見出した。さらに、本発明者らは、遺伝子操作によりTW295株のCBPをコードする遺伝子を欠失させた場合、TW295株のような出血増悪を示さないこと、および、MT8148株のPAをコードする遺伝子を欠失させた株は、出血増悪を示すことを確認し、CBPおよびPAが*S. mutans*の出血増悪作用に関与することを確認した。本発明者らはさらに、ヒト出血性脳卒中患者の口腔においてCBPを保有する*S. mutans*株が検出されることを見出し、さらに、かかる患者から単離されたCBP保有*S. mutans*株が、*in vivo*で脳出血の増悪を引き起こすことを確認した。本発明者らはさらにまた、高病原性の*S. mutans*株の細胞表面電荷が陰性であることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、これらの菌体表層タンパク質および細胞表面電荷が、出血を増悪させる*S. mutans*株の検出のため、出血増悪の危険性が高い対象のスクリーニングのため、および対象における出血増悪の危険性の判定のための有用なマーカーとして利用できることを実証した。

[0039] 本発明の方法により検出される口腔細菌は、あらゆる出血を増悪させる可能性があるが、特に、外傷や潰瘍、動脈瘤破裂などにより血管壁に損傷が生じることにより起こる破綻性出血を増悪させるものである。破綻性出血の代表的な例としては、脳出血（脳内出血、くも膜下出血、慢性硬膜下血腫）、外傷もしくは圧力による出血、分娩後出血、疾患に関連する皮下出血などが

挙げられる。また、出血傾向を生じる疾患として、結合組織異常（アレルギー性紫斑病など）、血小板の減少（播種性血管内凝固症候群、再生不良性貧血など）もしくは血小板異常（血小板無力症など）、または凝固系障害（肝臓病関連凝固異常、ビタミンK欠乏症など）などが挙げられる。内因性または外因性の循環抗凝固物質（ループスアンチコアグラント、VIII因子抗凝固物質など）により出血傾向を生じる場合もある。

[0040] 本明細書において、出血増悪とは、かかる内因性または外因性の要因により起こる出血に対する自発的な止血作用が、正常な対象と比較して、遅延するか、低下するか、または失われることを意味する。また、出血増悪の危険性が高い対象とは、当該対象において、内因性又は外因性の要因により出血が起こった場合に、血小板による自発的な止血作用が、正常な対象と比較して、遅延するか、低下するか、または失われる可能性が高いことを意味する。

[0041] PA (Protein Antigen) は、*S. mutans*の野生株であるMT8148株において見出された約190 kDaの表面タンパク質であり、PAc (Protein Antigen c)、SpaP、抗原I/II (Antigen I/II) および抗原B (Antigen B)、P1 およびMSL-1などの多くの別名が公知である。PAポリペプチドは、N末端側に3つのアラニンリッチな反復ドメイン (A領域)、中央部に3つのプロリンリッチな反復ドメイン (P領域) を含み、C末端に細胞壁-細胞膜貫通ドメインを有し、A領域が菌体の歯への付着に関与することが報告されている (Matsumoto-Nakano et al., 2008, Oral Microbiology and Immunology, 23:265-270)。また、PAが*S. mutans*による感染性心内膜炎に関与すること (Nakano et al., 2008, Japanese Dental Science Review, 44: 29-37)、PAに対する抗体が菌体のヒドロキシアパタイト基質への付着を阻害すること (Kawato et al., 2008, Oral Microbiology and Immunology, 23:14-20)、およびPAに対する抗血清が齶蝕のワクチンとして有用であることが報告されている (Okahashi et al., 1989, Molecular Microbiology, 3(2): 221-228)。PAのA領域とP領域との間には株間でのアミノ酸配列の変化に富

む領域（例えばMT8148株では残基679～827）が存在するが、反復ドメインや細胞膜貫通ドメインは株間において保存性が高い。

- [0042] また、感染性心内膜炎の患者において多く検出される血清型 k の株は、P A を欠失している率が高く、この血清型では、菌体の疎水性が低く、食作用（貪食）に対する感受性も低いことが報告されている（Nakano et al., 2008, Journal of Dental Research, 87(10): 964-968）。
- [0043] 既知の P A としては、例えば血清型 c の MT8148 の P A（DDBJ アクセション番号：X14490、アミノ酸：配列番号 1、核酸：配列番号 2）、LJ23 株の P A（DDBJ アクセション番号：AB364261、アミノ酸：配列番号 17、核酸：配列番号 18）、SA98 株の P A（DDBJ アクセション番号：AB364285、アミノ酸：配列番号 19、核酸：配列番号 20）の他、antigen I/II の spaP 遺伝子（DDBJ アクセション番号：X17390、Kelly et al., 1989, FEBS Lett. 258(1), 127-132、アミノ酸：配列番号 21、核酸：配列番号 22）、髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* の鉄結合タンパク質 fbp 遺伝子（X53469、Berish et al., 1990, Nucleic Acid Research, 18(15): 4596-4596、アミノ酸：配列番号 23、核酸：配列番号 24）などが知られている。
- [0044] *S. mutans* の別のアンカータンパク質である C B P（C n m と記載される）は、分子量約 120 k D a の I 型コラーゲン結合タンパク質であり、コラーゲン結合ドメイン（C B D、残基152～316）、B 反復ドメイン（残基328～455）および LPXTG モチーフ（残基507～511）を有する（Sato et al., 2004, Journal of Dental Research, 83(7): 534-539）。*S. mutans* の C B P 遺伝子保有頻度は、約 10～20% であり、C B P 陽性株は血清型 f および k において主に発現する（Nakano et al., 2007, J. Clin. Microbiol., 45: 2616-2625）。
- [0045] 本発明者らの研究により、血清型 k の TW295 株の C B P（DDBJ アクセション番号：AB102689、アミノ酸：配列番号 3、核酸：配列番号 4）について、C B D（アミノ酸：配列番号 5、核酸：配列番号 6）および LPXTG モチーフは株間（例えば TW871、SA53、LJ32 株など）での保存性が高いが、B 反復ドメイ

ンの反復（リピート）の数は株によって異なることが明らかとなった（Nomura et. al., 2009, J. Med. Microbiol., 58:469-75）。

[0046] 本発明の一態様において、PAは、

（１）配列番号１、１７、１９、２１または２３で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

（２）（１）のポリペプチドに対して１または２以上、好ましくは１～２０個、１～１５個、１～１０個、１または数個の変異を含むが、（１）のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

（３）配列番号２、１８、２０、２２または２４で表される核酸配列もしくはその相補配列またはその断片にストリンジントな条件下においてハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつ（１）のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、または

（４）配列番号１、１７、１９、２１または２３で表されるアミノ酸配列と７０％以上、好ましくは８０％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ（１）のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、  
として定義される。

好ましくは、PAは、配列番号１、１７、１９、２１または２３で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む。より好ましくは、PAは、配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む。

[0047] 本発明の方法において用いることができるPAは、配列番号２、１８、２０、２２または２４で表される核酸配列（PAタンパク質をコードする核酸配列）もしくはその相補配列またはその断片にストリンジントな条件下においてハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつ配列番号１、１７、１９、２１または２３で表されるアミノ酸配列（PAタンパク質のアミノ酸配列）を含むポリペプチドと同等の機能を有する限り、１または２以上のアミノ酸の変異（欠失・置換・付加）を含むポリペプチドであってもよい。変異は、天然のものであっても、既知の任意の手法

、例えば、制限酵素による核酸の切断または挿入、部位特異的変異導入、放射線もしくは紫外線の照射などにより作製されたものであってもよい。また、変異アミノ酸の数は、例えば1～20個、1～15個、1～10個、1または数個であってもよい。

[0048] また、本発明の一態様において、CBPは、

(1) 配列番号5、9、27または31で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(2) (1)のポリペプチドに対して1または2以上、好ましくは1～20個、1～15個、1～10個、1または数個の変異を含むが、(1)のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

(3) 配列番号6、10、28または32で表される核酸配列もしくはその相補配列またはその断片にストリンジントな条件下においてハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつ(1)のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、または

(4) 配列番号5、9、27または31で表されるアミノ酸配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ(1)のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

として定義される。

[0049] 本発明の方法において用いることができるCBPポリペプチドは、配列番号6、10、28または32で表される核酸配列 (*S. mutans* TW295株、TW871株、SA53株またはLJ32株のCBDをコードする核酸配列) もしくはそれらの相補配列またはその断片にストリンジントな条件下においてハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつ配列番号5、9、27または31で表されるアミノ酸配列 (*S. mutans* TW295株、TW871株、SA53株またはLJ32株のCBDアミノ酸配列) を含むポリペプチドと同等の機能を有する限り、1または2以上、例えば、1～20個、1～15個、1～10個、1または数個のアミノ酸の変異(欠失・置換・付加)を含むポ



リペプチドであってもよい。

[0050] 例えば、CBPポリペプチドは、配列番号4、8、26または30で表される核酸配列 (*S. mutans* TW295株、TW871株 (DDBJアクセス番号AB469914)、SA53株 (同AB465299) またはLJ32株 (同AB465263) のCBPをコードする核酸配列) もしくはそれらの相補配列またはその断片にストリンジェントな条件下においてハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつ配列番号3、7、25または29で表されるアミノ酸配列 (*S. mutans* TW295株、TW871株、SA53株またはLJ32株のCBPタンパク質のアミノ酸配列) を含むポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドであってもよい。

好ましくは、CBPは、配列番号5、9、27または31で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む。

[0051] PAまたはCBPの変異体がPAまたはCBPと同等の機能を有するか否かは、公知の手段を用いて確認することができる。例えば、PAの変異体が菌体をヒドロキシアパタイト基質へ付着させる能力については、公知の方法により変異体ペプチドに対する特異的抗体を作製し、Kawato et al., 2008, *Oral Microbiology and Immunology*, 23:14-20に記載の方法により、該抗体菌体のヒドロキシアパタイトへの付着の阻害を判定することができる。あるいは、CBPの変異体のI型コラーゲンへの結合性は、Nomura et al., 2009, *J. Med. Microbiol.*, 58(4): 469-475に記載のコラーゲン結合アッセイにより判定することができる。かかる手段により、変異体が有する機能を、適切な陰性対照や、陽性対照としてのPAまたはCBPと比較することによって評価することができる。例えば、ある変異体において、上記の少なくとも1つの機能が陰性対照より優れている場合、例えば、10%以上、25%以上、50%以上、75%以上、さらには100%以上優れている場合、および/または、同機能が陽性対照の1/100以上、1/50以上、1/25以上、1/10以上、1/5以上、さらには1/2以上である場合、この変異体を機能的変異体に含める。

[0052] 本発明の方法において、細菌細胞の表面電荷は、既知の任意の方法、例えば、ゼータ電位測定法などにより測定できる。ゼータ電位は、界面動電位ともいい、互いに接している固体と液体とが相対運動を行なったときに両者の界面に生じる電位差であり、細菌細胞の表面電荷を表す指標の1つとして用いることができる。ゼータ電位は、細菌細胞の電気泳動移動度からSmoluchowskiの公式：

$$\zeta = \eta u / \varepsilon_0 \varepsilon_r$$

式中、 $\zeta$ はゼータ電位、 $\eta$ は溶媒の粘度、 $u$ は電気泳動移動度、 $\varepsilon_0$ は真空の誘電率、 $\varepsilon_r$ は溶媒の誘電率を示す、

で求めることができる。ゼータ電位測定に適した電気泳動法としては、泳動する細菌細胞の速度を測定できるものであれば特に限定されず、例えば、キャピラリー電気泳動法、顕微鏡電気泳動法、回転回折格子法、レーザー・ドップラー電気泳動法などが挙げられる。

[0053] 本発明の方法においては、細菌細胞の表面電荷が陰性であることが、高病原性口腔細菌の指標となり、出血増悪口腔細菌の存在および出血増悪の危険性の判定基準となる。すなわち、損傷血管内に露出しているコラーゲン線維は正電荷を有するところ、細菌細胞の表面電荷が陰性であると、細菌細胞が露出しているコラーゲン線維と相互作用し易くなり、血小板凝集抑制等による出血の増悪をもたらす。典型的には、ゼータ電位として測定した表面電荷が-1.0mV以下、より好ましくは-3.0mV以下、さらに好ましくは-4.0mV以下、より一層好ましくは-5.0mV以下、特に好ましくは-8.0mV以下である場合に、口腔細菌が高病原性であると判断する。

[0054] 上記の本発明の方法において、口腔細菌のPA、CBPおよび細胞表面電荷は、そのそれぞれを単独で用いても、組み合わせて用いてもよい。したがって、PAのみ、CBPのみ、または細胞表面電荷のみを検出しても、PA、CBPおよび細胞表面電荷の任意の組み合わせ、すなわち、PAとCBPの両方、PAと細胞表面電荷の両方、CBPと細胞表面電荷の両方、または、PA、CBPおよび細胞表面電荷の全てを検出してもよい。また、判断基準

も、上記検出項目に合わせて、PAが検出されないこと、CBPが検出されることおよび細胞表面電荷が陰性であることのそれぞれを単独で用いても、組み合わせて用いてもよい。

[0055] 出血増悪口腔細菌として同定される主な菌としては、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、ストレプトコッカス・ソブリヌス (*Streptococcus sobrinus*)、ストレプトコッカス・クリセツス (*Streptococcus cricetus*)、ストレプトコッカス・ラッタス (*Streptococcus rattus*)、ストレプトコッカス・ダウネイ (*Streptococcus downei*)、などのミュータンス連鎖球菌 (*mutans streptococci*)、ストレプトコッカス・サンギニス (*Streptococcus sanguinis*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*)、ストレプトコッカス・ゴルドニ (*Streptococcus gordonii*)、ストレプトコッカス・サリバリウス (*Streptococcus salivarius*)、などが挙げられる。特に、*S. mutans*のTW295株、TW871株、SA53株、およびLJ32株は、重篤な出血増悪を引き起こす。

[0056] 出血増悪を引き起こし得る他の細菌のスクリーニングは、NCBIのGenBank (登録商標)、DDBJ (DNA Data Bank of Japan: 日本DNAデータバンク、<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)、EMBLなどのデータベース、およびBLASTなどの一般に公開された公衆が利用可能な検索ツールを利用して行うことができる。

[0057] 本発明は、一態様において、口腔細菌のPA検出剤および/またはCBP検出剤を含む、出血増悪口腔細菌の検出用試薬を提供する。

一態様において、PA検出剤は、口腔細菌PA特異的抗体を含む。本発明者らにより開発されたPA特異的抗体を用いて、高病原性の*S. mutans*の存在または非存在を、迅速且つ容易に検出することができる。PA特異的抗体は、好ましくは、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその免疫原性断片によって誘導される抗体またはそのフラグメントである。あるいは、PA特異的抗体は、配列番号1、17、19、21または23のアミノ酸配列に対し、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%

以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有し、かつ配列番号1、17、19、21または23のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有するポリペプチドによって誘導される抗体またはそのフラグメントであってもよい。例えば、上記ポリペプチドを含むリコンビナントPA（例えば、Nakano et al., 2006, *Microbes and Infection*, 8: 114-121を参照）を抗原として、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を得ることができる。

[0058] 一態様において、CBP検出剤は、I型コラーゲンによりコートされた基材（マイクロプレート、試験管、スライドグラスなど）を含む。CBPのI型コラーゲンへの結合性（Nomura et al., 2009, *J. Med. Microbiol.*, 58(4): 469-475）を利用して、CBPを発現する菌体をI型コラーゲンによりコートされた基材へ付着させ、容易に検出することができる。

[0059] 別の態様において、CBP検出剤は、口腔細菌のCBPに対する特異的抗体を含む。CBP特異的抗体は、CBPのコラーゲン結合ドメインに対する特異的抗体であってもよく、好ましくは、配列番号5、9、27または31のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその免疫原性断片によって誘導される抗体またはそのフラグメントである。あるいは、CBP特異的抗体は、配列番号5、9、27または31のアミノ酸配列に対し、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有し、かつ配列番号5、9、27または31のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有するポリペプチドによって誘導される抗体またはそのフラグメントであってもよい。

本発明において、抗体のフラグメントは、例えば限定されずに、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv（ジスルフィド安定化V領域断片）、およびCDR含有断片などの種々の機能的断片を含む。

[0060] 本発明は一態様において、出血増悪口腔細菌の検出および／または出血増悪の危険性が高い対象のスクリーニングおよび／または対象における出血増悪の危険性の判定のためのキットを提供する。キットは、PA検出試薬およ

びCBP検出試薬を少なくとも含む。

一態様において、キットは、PA検出試薬として、口腔細菌PA特異的抗体を含む。

一態様において、キットは、CBP検出試薬として、I型コラーゲンによりコートされた基材（マイクロプレート、試験管、スライドグラスなど）を含む。

別の態様において、キットは、CBP検出試薬として、CBP特異的抗体を含む。

[0061] 本発明のキットは、*S. mutans*の培養のための以下の1または2以上をさらに含んでもよい：

一 唾液採取スピッツなどの唾液採取用器具（滅菌で採取および播種しやすいものであれば材質や形状は特に限定されない）。

一 唾液を10 $\mu$ l程度採取することができるスポイトなどの採取器具。

一 *S. mutans*選択培地（専用培地A）。例えば、滅菌基材に、MSB寒天培地（Mitis-salivarius寒天培地（Difco Laboratoriesなど）に抗生物質（例えば、バシトラシン（SIGMA-ALDRICHなど））とスクロース（和光純薬など）とを添加したものをコートしたもの。基材は、ディッシュやウェルプレートであれば特に限定されないが、典型的には、24ウェル程度のプレート（例えば24 well with Lid MICROPLATE（IWAKI）など）を用いる。バシトラシンは、好ましくは約100 unit/mlで用いる。スクロースは、好ましくは約15%で用いる。

一 アネロパックやCO<sub>2</sub>チャンバーなどの、嫌気条件下において培養を行うための密封および／または脱酸素装置。

一 菌のコロニーをピックアップするための、滅菌棒（つまようじやチップのようなもの）。

一 ピックアップしたコロニーを培養するための液体培地（専用培地B）。例えば、ディスポーサブルの試験管に、滅菌したBrain Heart Infusion（BHI）液体培地（Difco Laboratories）を加えたもの。

[0062] 本発明のキットは、*S. mutans*の検出のための以下の1または2以上をさらに含んでもよい：

- － 菌液を10  $\mu$  l程度採取できるスポイトなどの採取器具。
- － *S. mutans*検出のための専用培地（専用培地C）。例えば、基材に、スクロース（和光純薬）含有BHI溶液100  $\mu$  lを添加したもの。基材は、ウェルプレートや試験管などであれば特に限定されないが、典型的には、96ウェルプレート（例えばMULTI WELL PLATE for ELISA（スミロン）など）を用いる。スクロースは、約1%で用いる。
- － 洗浄液（洗浄液A：PBS溶液または滅菌水を用いることができるが、好ましくはPBS溶液を用いる。）
- － グラム陽性菌検出試薬（バッファー1：例えば、滅菌蒸留水にグラム陽性菌検出試薬として約0.5%のクリスタルバイオレット（和光純薬など）を加えた溶液）。
- － 媒染試薬（バッファー2：前記菌検出試薬に応じて好適な媒染試薬を選択することができる。例えばクリスタルバイオレットに対しては、7%酢酸（和光純薬など）溶液または滅菌水を用いることができるが、好ましくは酢酸溶液を用いる。）

[0063] 本発明のキットは、PA欠失*S. mutans*の検出のための以下の1または2以上をさらに含んでもよい：

- － PA欠失*S. mutans*の検出のためのプレート。滅菌のウェルプレートであれば特に限定されないが、典型的には96ウェルプレート（MICROTEST U-Bottom（BECTON DICKINSON）など）を用いる。
- － 洗浄液（洗浄液B：PBS溶液または滅菌水にTriton X-100（和光純薬など）などの界面活性剤を約0.05%添加した溶液。好ましくはPBS溶液を用いる。）
- － バッファー（バッファー3：pH6.8のトリス塩緩衝液、100mM ジチオスレイトール（和光純薬など）、20%グリセリン（和光純薬など）を混合したもの。）

- － ブロッキング液（バッファー４：PBST溶液にスキムミルク（BECTON DICKINSONなど）を約５％加えた溶液。）
- － 一次抗体（バッファー５：PBSTに抗PA抗血清を約0.1％添加した溶液）
- － 二次抗体（バッファー６：PBSTに一次抗体宿主の免疫グロブリンに対する抗体（Dakopattsなど）を約0.1％添加した溶液。）
- － 発色試薬（バッファー７：AP（100mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチルー1, 3-プロパンジオール、5mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウム）緩衝液に、NBT溶液（和光純薬）を終濃度0.6％で、BCIP溶液（和光純薬）を終濃度0.33％で加えた溶液。）

[0064] 本発明のキットは、CBP保有*S. mutans*の検出のための以下の１または２以上をさらに含んでもよい：

- － CBP保有*S. mutans*の検出のための専用培地（専用培地D：分析3で使用した専用プレートに、0.6％酢酸を添加した滅菌蒸留水とI型コラーゲン（Sigma）を9：1の割合で混合した溶液を添加したもの。）
- － 洗浄液（洗浄液A：PBS溶液または滅菌水を用いることができるが、好ましくはPBS溶液を用いる。）
- － バッファー（バッファー8：洗浄液Aに約5％ウシアルブミン（Sigma）を加えたもの。）
- － 洗浄液（洗浄液C：PBS溶液または滅菌水に約0.01％のTween 20（和光純薬）などの界面活性剤を加えた溶液。好ましくはPBS溶液を用いる。）
- － 固定液（バッファー9：例えば滅菌蒸留水に約25％のホルムアルデヒド（和光純薬）を加えたもの。）
- － グラム陽性菌検出試薬（例えば上記バッファー1：滅菌蒸留水に、グラム陽性菌検出試薬として約0.5％のクリスタルバイオレット（和光純薬）を加えた溶液）
- － 媒染試薬（例えば上記バッファー2：7％酢酸（和光純薬など）溶液

または滅菌水を用いることができるが、好ましくは酢酸溶液を用いる。)

[0065] 当業者は、上記の成分、例えば抗血清、二次抗体、ホルムアルデヒド、クリスタルバイオレットなどの濃度を、実験条件に応じて至適濃度になるように適宜調整することができる。

[0066] 本発明の出血増悪口腔細菌の検出方法は、具体的には例えば図1～3に示すように、以下の4つのステップを含むスキームにおいて行う。

分析1. *S. mutans*の培養

分析2. *S. mutans*の検出

分析3. PA欠失*S. mutans*の検出

分析4. CBP保有*S. mutans*の検出

[0067] 分析1において、菌の培養は、例えば上述のキット中のミュータンスレンサ球菌の培養のための器具および試薬を用いて、以下の手順において行う。

唾液採取スピッツで被験者の唾液を少量採取する。スポイトで唾液をスピッツから10 $\mu$ l採取し、*S. mutans*選択寒天培地（例えば上記の専用培地A）に播種して、37 $^{\circ}$ Cで48時間、好ましくは嫌気条件下において培養を行う。培養後、菌のコロニーが生えていることを肉眼で確認し、コロニーをピックアップして液体培地（例えば上記の専用培地B）に加えて、37 $^{\circ}$ Cで18時間培養し、以下の分析2、3、4に使用する。*S. sobrinus*がスムーズコロニーを形成するのに対して*S. mutans*はラフコロニーを形成するので、好ましくはラフコロニーをピックアップする。

[0068] 分析2において、*S. mutans*の検出は、例えば上述のキット中の*S. mutans*の検出のための器具および試薬を用いて、以下の手順において行う。

培地（例えば上記の専用培地C）に分析1の方法により培養した菌液を10 $\mu$ l加えて、37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートする。前記培地を洗浄液（例えば上記洗浄液A）で3回洗った後、3回目の洗浄液を加えた状態で約15分静置する。洗浄液を除去し、再度前記培地を洗浄液Aで1回洗った後、グラム陽性菌染色試薬を含むバッファー（例えば上記バッファー1）を加え、1分静置する。洗浄液で3回洗浄し、媒染剤を含むバッファー（例えば上記



バッファー2)を加える。培地の色が変化した場合、*S. mutans*陽性と判定し、培地の色に変化がない場合、*S. mutans*陰性と判定する。染色試薬と媒染剤が既に組み合わされた形態の試薬を用いてもよい。

[0069] 分析3において、PA欠失*S. mutans*の検出は、例えば上述のキット中のPA欠失*S. mutans*の検出のための器具および試薬を用いて、以下の手順において行う。

(1) サンプル調整

上記分析1の方法により培養した菌液に適当なバッファー(例えば上記バッファー3)を加えて、沸騰した湯に10分間浸漬した後、保存する場合は冷凍保存する。

[0070] (2) PA欠失*S. mutans*の検出

1) 上記(1)により作製したサンプルをプレートに加え、4℃で一晩静置する。

2) プレートを洗浄液(例えば上記洗浄液B)で3回洗浄した後、スキムミルク(例えば上記バッファー4)を加え、常温で1時間静置する。

3) プレートを洗浄液で3回洗浄した後、一次抗体(例えば上記バッファー5)を加え、常温で1時間反応させる。

4) プレートを洗浄液で3回洗浄した後、標識二次抗体(例えば上記バッファー6)を加え、常温で1時間反応させる。

5) プレートを洗浄液で3回洗浄した後、発色試薬(例えば上記バッファー7)を加え、適切な時間の経過後、液の色の変化を観察する。液の色が変化した場合、PA陽性と判定し、液の色が変化しない場合、PA陰性と判定する。

[0071] 分析4において、CBP保有*S. mutans*の検出は、例えば上述のキット中のCBP保有*S. mutans*の検出のための器具および試薬を用いて、以下の手順において行う。

(1) 培地(例えば上記用培地D)を洗浄液(例えば上記洗浄液A)で3回洗浄した後、アルブミンを含むバッファー(例えば上記バッファー8)を加

え、37°Cで1時間静置する。

(2) 界面活性剤を含む洗浄液（例えば上記洗浄液C）で3回洗浄した後、上記1の方法により培養した菌液を加え、37°Cで2時間インキュベートする。

(3) 洗浄液（例えば上記洗浄液A）で3回洗浄した後、固定液（例えば上記バッファー9）を加え、常温で30分静置する。

(4) 洗浄液で3回洗浄した後、グラム陽性菌染色試薬（例えば上記バッファー1）を加え、1分静置する。

(5) 洗浄液Aで3回洗浄した後、媒染剤（例えば上記バッファー2）を加える。

液の色が変化した場合、CBP陽性と判定し、液の色が変化しない場合、CBP陰性と判定する。

[0072] 上記いずれの検出方法においても、菌の濃度は、1CFU以上であれば検出可能である。

また、*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. oralis*、*S. gordonii*、および*S. salivarius*などの培養物をコントロールとして用い、分析1では*S. mutans*および*S. sobrinus*以外の菌が生育しないことを、分析3ではPA保有*S. mutans*以外の菌が陽性反応を示さないこと、また、分析4ではCBP保有*S. mutans*以外の菌が陽性反応を示さないことを、それぞれ確認することができる。

[0073] 当業者は、本発明の方法を、目的に応じて適宜改変することができる。例えば、PA欠失*S. mutans*を検出するために、PAまたはCBPに対する特異的抗体を結合させた基材と、菌液を接触させた後、洗浄して基材と結合していない菌を除去し、基材に結合した菌のみを、グラム陽性菌染色試薬により検出してもよい。あるいは、PAまたはCBPをコードする核酸に対するプライマーまたはプローブを用いて、培養した菌がPAまたはCBPの遺伝子を有するか否かを検出してもよい。

[0074] 本発明の好ましい態様において、PA欠失口腔細菌の検出における陽性対照として、および／または、CBP保有口腔細菌の検出における陰性対照と

して、*S. mutans* MT8148株を用いてもよい。PA欠失口腔細菌の検出における陽性対照として、検出方法に応じて、単離されたPAタンパク質、PAをコードするDNAまたはそのフラグメントを含む核酸もしくはベクター、該ベクターにより形質転換された細胞などを用いることもできる。また、CBP保有口腔細菌の検出における陰性対照として、TW295株のCBPをコードする遺伝子を欠失させたCND株、CBPを発現しないグラム陽性細菌などを用いることもできる。

[0075] 本発明は、一態様において、口腔細菌PAタンパク質またはPAタンパク質をコードする核酸を含む、止血剤を提供する。対象がPAを欠失する高病原性菌に感染している場合に、PAタンパク質を補うか、または対象もしくは菌においてPAを発現させることにより、血小板凝集を誘導することによる止血効果がもたらされる。

したがって、本発明はまた、口腔細菌PAタンパク質またはPAタンパク質をコードする核酸の止血剤の製造への使用、さらには、口腔細菌PAタンパク質またはPAタンパク質をコードする核酸を投与する工程を含む止血方法を提供する。

[0076] 本発明は、別の態様において、口腔細菌PAタンパク質またはPAタンパク質をコードする核酸に結合する物質を含む、PA発現口腔細菌による血小板凝集の抑制剤を提供する。対象がPAを発現する口腔細菌に感染している場合、PAタンパク質に結合する物質により菌体表層のPAをブロックするか、またはPAタンパク質の発現を阻害する物質により菌体のPA産生を阻害することにより、細菌の血小板凝集作用を抑制することができる。

したがって、本発明はまた、口腔細菌PAタンパク質またはPAタンパク質をコードする核酸に結合する物質のPA発現口腔細菌による血小板凝集の抑制剤の製造への使用、さらには、口腔細菌PAタンパク質またはPAタンパク質をコードする核酸に結合する物質を投与する工程を含む、PA発現口腔細菌による血小板凝集を抑制する方法を提供する。

[0077] 本発明は、別の態様において、口腔細菌CBPまたはCBPタンパク質を

コードする核酸に結合する物質を含む、出血増悪抑制剤を提供する。対象がCBPを発現する出血増悪口腔細菌に感染している場合、例えばCBP特異的抗体などのCBPタンパク質に結合する物質により、菌体表層のCBPタンパク質をブロックし、菌体がコラーゲン露出部位（すなわち、血管内皮の損傷部位）に結合することを阻害し、これにより出血増悪を処置または予防することができる。あるいは、CBPタンパク質をコードする核酸に結合する物質（例えばsiRNA、アンチセンス核酸など）により、菌体によるCBP産生を阻害し、菌体がコラーゲン露出部位に結合することを阻害することができる。

したがって、本発明はまた、口腔細菌CBPまたはCBPタンパク質をコードする核酸に結合する物質の出血増悪抑制剤の製造への使用、さらには、口腔細菌CBPまたはCBPタンパク質をコードする核酸に結合する物質を投与する工程を含む、出血増悪抑制方法を提供する。

[0078] 本発明は、別の態様において、口腔細菌CBPを含む、組織におけるコラーゲン露出部位の検出剤を提供する。血管内皮の損傷などにより結合組織のコラーゲンが露出している場合、本発明の検出剤を用いることにより、損傷部位を検出することができる。特に本発明の検出剤により、例えば頭部などの出血部位を特定することが困難な領域であっても、非侵襲的に損傷部位を検出することができる。本検出剤には、検出の便宜のために、種々の標識を付すことができる。標識は、既知の任意のもの、例えば、任意の放射性同位体、磁性体、前記成分に結合する物質（例えば抗体）、ビオチン、蛍光物質、フルオロフォア、化学発光物質、核磁気共鳴する元素（水素、リン、ナトリウム、フッ素など）および酵素などから選択することができる。

したがって、本発明はまた、口腔細菌CBPの組織におけるコラーゲン露出部位の検出剤の製造への使用、さらには、口腔細菌CBPを投与する工程を含む、組織におけるコラーゲン露出部位の検出方法を提供する。

[0079] また、本発明は、さらに別の態様において、口腔細菌CBPを含む、コラーゲン露出部位への物質送達用担体を提供する。本発明の止血剤または他の

薬剤（例えば、抗生物質または抗炎症剤など）を前記輸送用担体に組み込み、生体に投与することにより、止血剤や薬剤を損傷部位に標的化することができ、損傷部位特異的な治療を行うことが期待される。担体は、例えば、CBPタンパク質またはそのコラーゲン結合ドメイン（CBD）と融合させたリポソームであってもよい。本発明の担体には、本発明の止血剤または他の薬剤を組み込んでよい。あるいは、本発明の担体はCBPタンパク質自体であってもよく、この場合、治療剤とCBPタンパク質またはCBDとを直接的に結合させて用いることができる。

[0080] 本発明は、別の態様において、口腔細菌CBPおよび止血剤を含む、出血治療剤を提供する。本発明の出血治療剤は、コラーゲンに対する血小板の感受性が低い対象において、特に有用である。コラーゲンに対する血小板の感受性が低い対象として、再生不良性貧血、急性白血病、血小板減少性紫斑病、播種性血管内凝固症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデス、血小板無力症、ストレージ・プール症候群などを罹患する対象が挙げられる。また、本発明の出血治療剤は、血友病などの凝固因子異常による疾患などを罹患する対象において、特に有用である。

[0081] 本発明のコラーゲン露出部位への物質送達用担体および出血治療剤に用いるためのCBPは、例えばCBP遺伝子を含む核酸構築物を好適な発現ベクターに組み込み、好適な宿主細胞においてCBPタンパク質を発現させることによって得ることができる。かかる技術は当該分野において周知であり、例えば、例えば、CBPの遺伝子を含むプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス、YAC、BACのベクター系を、種々の核酸導入法、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、超音波導入法、電気穿孔法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法、リポソーム法（例えば、カチオン性リポソームによるもの）、コンピテントセル法、プロトプラスト法などにより、宿主細胞に導入し、CBP遺伝子を発現させることができる。また、CBPは、CBP陽性菌自体であってもよく、CBP陽性菌のCBP含有成分であってもよい。かかる成分は、例えば、CBP陽性菌を溶菌およ

び／またはホモジェナイズし、I型コラーゲンでコートした基材に曝すことにより単離することができる。CBP陽性菌自体を用いる場合、同菌は、慣用の方法で不活化されていてもよい。

[0082] また、本発明は、別の態様において、口腔細菌除去剤を含む、出血増悪予防剤に関する。本発明の方法により出血増悪口腔細菌が検出された場合、出血増悪の危険性を軽減し、出血増悪を予防するために、出血増悪口腔細菌を対象から除菌することが求められる。口腔細菌除去剤としては、βラクタム系抗菌薬などを用いることができる。βラクタム系抗菌薬としては、例えばペニシリン、メチシリン、セファロスポリン、セファマイシン、カルバペネムなどが挙げられる。

[0083] 本発明の止血剤、血小板凝集抑制剤、出血増悪抑制剤、出血増悪予防剤、出血治療剤、コラーゲン露出部位の検出剤およびコラーゲン露出部位への物質送達用担体等は、経口および非経口の両方を包含する種々の経路、例えば、限定することなく、経口、口腔内、静脈内、筋肉内、皮下、局所、直腸、動脈内、門脈内、心室内、経粘膜、経皮、鼻内、腹腔内、肺内および子宮内等の経路で投与してもよく、各投与経路に適した剤形に製剤してもよい。かかる剤形および製剤方法は任意の公知のものを適宜採用することができる（例えば、標準薬剤学、渡辺喜照ら編、南江堂、2003年等を参照）。

[0084] 例えば、経口投与に適した剤形としては、限定することなく、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤、ゲル剤、シロップ剤等が挙げられ、また非経口投与に適した剤形としては、溶液性注射剤、懸濁性注射剤、乳濁性注射剤、用時調製型注射剤等の注射剤が挙げられる。非経口投与用製剤は、水性または非水性の等張性無菌溶液または懸濁液の形態であることができる。具体的には、例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせ、適切な単位投与形態に製剤化することができる。これら製剤における有効成分量は、処置に有効な用量を想定された投与回数で対象に供給できるように適宜設定

することができる。

- [0085] 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等が挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80、HCO-50等と併用してもよい。
- [0086] 油性液としてはゴマ油、大豆油等が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤等と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプル、バイアル、チューブ、ボトル、パック等の容器に充填する。
- [0087] 本発明の止血剤、血小板凝集抑制剤、出血増悪抑制剤、出血増悪予防剤、出血治療剤、コラーゲン露出部位の検出剤およびコラーゲン露出部位への物質送達用担体等の対象の体内への投与は上記いずれの経路によってもよいが、好ましくは非経口投与、より好ましくは局所投与または静脈内投与、特に好ましくは門脈内もしくは腫瘍内投与である。投与回数は1回が好ましいが、状況に応じて複数回投与することもできる。また、投与時間は短時間でも長時間持続投与でもよい。本発明の組成物は、より具体的には、注射によりまたは経皮的に投与することができる。注射による投与の例としては、例えば、局所注射、静脈内注射、動脈内注射、選択的動脈内注入、門脈内注入、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、腫瘍内注射、髄腔内注射、関節内注射、脳室内注射等によるものが挙げられるが、これらに限られない。静脈内注射等の場合、通常の輸血の要領での投与が可能となり、対象を手術する必要がなく、さらに局所麻酔も必要ないため、対象および術者双方の負担を軽減することができる。また手術室以外での投与操作が可能である点で有利である。

[0088] さらに本発明は一態様において、対象へ上記止血剤、出血増悪抑制剤、出血増悪予防剤および／または出血治療剤の有効量を投与することを含む、出血の処置方法に関する。また、本発明は一態様において、対象へ上記血小板凝集抑制剤の有効量を投与することを含む、血小板の凝集による疾患状態の処置方法に関する。血小板の凝集による疾患状態として、血栓症、播種性血管内凝固症候群などが挙げられる。

また、本発明は一態様において、対象へ上記コラーゲン露出部位の検出剤を投与することを含む、出血部位の診断のための方法に関する。さらに、本発明は一態様において、対象へ上記コラーゲン露出部位への物質送達用担体の有効量を投与することを含む、出血に関連する疾患の処置方法に関する。

[0089] 本発明の処置または診断の方法において、本発明の処置または診断用組成物の対象への投与は、例えば、上述の投与方法に従って好適に実施することができる。また、医師または獣医師においては、上記投与方法を適宜改変して、本発明の剤を対象へ投与することが可能である。ここで、有効量とは、上記止血剤、出血増悪抑制剤および／または出血治療剤については、出血を抑制、軽減または防止する量であり、上記血小板凝集抑制剤については、血小板の凝集による疾患状態の発症を低減し、症状を軽減し、または進行を防止する量である。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は、培養細胞等を用いたin vitro試験や、マウス、ラット、イヌまたはブタ等のモデル動物における試験により適宜決定することができる。

[0090] 本発明の処置または診断の方法において投与する本発明の処置または診断用組成物の具体的な用量は、処置を要する対象に関する種々の条件、例えば、症状の重篤度、対象の一般健康状態、年齢、体重、対象の性別、食事、投与の時期および頻度、併用している医薬、治療への反応性、および治療に対するコンプライアンス等を考慮して決定され得るため、一般的な有効量と異なることもあるが、かかる場合であっても、これらの方法はなお本発明の範囲に含まれる。



[0091] 投与経路としては、経口および非経口の両方を包含する種々の経路、例えば、経口、口腔内、静脈内、筋肉内、皮下、局所、腫瘍内、直腸、動脈内、門脈内、心室内、経粘膜、経皮、鼻内、腹腔内、髄腔内、関節内、脳室内、肺内および子宮内等の経路が含まれる。

投与頻度は、用いる組成物の性状や、上記のような対象の条件によって異なるが、例えば、1日多数回（すなわち1日2、3、4回または5回以上）、1日1回、数日毎（すなわち2、3、4、5、6、7日毎等）、1週間毎、数週間毎（すなわち2、3、4週間毎等）であってもよい。

[0092] また、本発明の出血の処置法においては、本発明の止血剤、出血増悪抑制剤および／または出血治療剤のほか、上述の出血関連疾患の処置に有効な他の薬剤を併用することができる。また、本発明の血小板の凝集による疾患状態の処置法においては、本発明の血小板凝集抑制剤のほか、血小板の凝集による疾患状態の処置に有効な他の薬剤を併用することができる。

本発明における用語「対象」は、任意の生物個体を意味し、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体である。

## 実施例

[0093] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によって制限されるものではない。

### 材料と方法

#### 動物実験およびヒト被験者

本研究中の全ての動物実験は、米国国立衛生研究所（NIH）により公開される実験動物の管理と使用に関する指針（the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）に従い、大阪大学大学院歯学研究科および浜松医科大学の動物管理使用委員会の承認を得て行った。

ヒトの試料を用いる研究プロトコルについては、大阪大学大学院歯学研究科、浜松医科大学、および市立吹田市民病院の倫理委員会による承認を受けた。全ての被験者について、本研究への参加前に、プロトコルについて説明した上で同意書への署名を得た。

[0094] S. mutans菌株および培養条件

本研究において用いる主要な*S. mutans*株を表1に示す（文献11、21、24、25、29）。さらに、58種の臨床*S. mutans*株（血液から単離したもの：n=13、口腔から単離したもの：n=45）を、本研究において用いた。全ての株を、Brain Heart Infusion (BHI) ブロス (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中で培養し、変異株の選択のためにエリスロマイシンを添加した。各アッセイ毎に細菌細胞をPBSで洗浄し、希釈して細胞数を調整した。

## [0095] [表1]

表1. 使用された *S. mutans* 株

株	血清型	タンパク質発現	特徴	参考文献
TW295	<i>k</i>	PA (-) CBP (+)	抜歯後に菌血症となった日本人患者の血液から単離	Fujiwara et al. (2001)
TW295-CND	<i>k</i>	PA (-) CBP (-)	TW295 から構築した CBP 欠損アイソジェニック変異体	Nakano et al. (2010)
TW871	<i>k</i>	PA (+) CBP (+)	感染性心内膜炎を罹患しくも膜下出血を合併した日本人患者の血液から単離	Fujiwara et al. (2001)
MT8148	<i>c</i>	PA (+) CBP (-)	日本人被験者の口腔から単離	Ooshima et al. (1983)
MT8148-PD	<i>c</i>	PA (-) CBP (-)	MT8148 から構築した PA 欠損アイソジェニック変異体	Nakano et al. (2006)
SA53	<i>k</i>	PA (-) CBP (+)	フィンランド人被験者の口腔から単離	Nakano et al. (2008)
LJ32	<i>f</i>	PA (-) CBP (+)	日本人被験者の口腔から単離	Nakano et al. (2008)

[0096] コラーゲン結合アッセイ

変異株および親株のコラーゲン結合特性を、文献27に記載される方法の変法（文献22）により評価した。各株についての結果を、TW871の結合を100%として、これと比較したパーセンテージとして表した。

### 血小板凝集アッセイ

血小板凝集アッセイを、マウス全血を用いて、血小板凝集計 (Whole-blood aggregometer C540, Baxter Ltd., Tokyo, Japan) によるインピーダンス法で行った。簡単に述べると、マウス (ICR、オス、8週齢、体重35~40g、CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) から全血を採取し、全血と、種々の量 ( $10^3$ 、 $10^5$ または $10^7$ CFU) の細菌細胞との混合物を37°Cで5分間インキュベートした後、4.0 $\mu$ gのコラーゲン (未変性コラーゲン原線維 (I型)、Chrono-log Co., Havertown, PA, USA) を添加した。各株についての凝集率を、細菌細胞を添加した場合と添加しない場合とのインピーダンス ( $\Omega$ ) 値により計算し、ビヒクル (コラーゲンのみを加えた場合) を100%として、これに対するパーセンテージとして表した。また、58種の臨床株および3種のMT8148のアイソジェニック変異株の血小板凝集特性を、 $10^7$ 個の細菌細胞の存在下で分析した。

#### [0097] 菌体表面電荷 (ゼータ電位) の評価

供試菌の菌体表面の電荷を、ゼータ電位分析器 (ELSZ-2, Otsuka Electronics, Co., Ltd., Hirakawa, Osaka, Japan) を用いて測定した。前記分析器は、Smoluchowskiの公式を用いて、電気泳動移動度からゼータ電位を自動的に計算する。一晚培養した細菌細胞を、PBSで洗浄し、 $10^7$ CFUになるように調整し、分析器にかけ、5個の標準点で細胞のゼータ電位を自動的に測定した。結果を平均値として表す。

#### [0098] マウス脳動脈損傷モデル

マウスにおいて、既述の光化学的方法の変法 (文献12、28、図17) を用いて、中大脳動脈の血管内皮細胞に損傷を誘導した。BALB/c系マウス (8週齢オス、体重20~30g) に、 $1 \times 10^7$ CFU/マウスの供試菌懸濁液を頸静脈より感染させ、その後、Rose Bengalを投与し、熱吸収フィルターを備えたキセノンランプ (0.04W/cm<sup>2</sup>、波長540nm、Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) とマイクロマニピレータ上に設置した1.5mm直径の光ファイバーとを用いて、10分間、光増感反応によって片側

の中大脳動脈に損傷を与え、軽度の脳出血を発症させた。菌感染の24時間後に動物を安楽死させ、摘出した脳組織を一定間隔ごとにスライスして、既述の方法に従い、コンピューター分析により、全ての脳切片からの総出血部位の面積を $\text{mm}^2$ 単位で定量化した（文献12、28、DPコントローラ、モデルDP70、OLYMPUS）。

[0099] マトリックスメタプロテアーゼ（MMP-9）の活性化

既述の方法の変法によりゼラチンゲルザイモグラフィを行った（文献13）。簡単に述べると、供試菌またはビヒクルの投与の24時間後に回収した組織サンプルを、プロテアーゼ阻害剤を添加した、50mMのTris-HCl、150mMのNaCl、1%のNonidet P-40、0.1%のSDSおよび0.1%のデオキシコール酸、pH7.4の緩衝液中でホモジナイズした。次いで、ゼラチンザイモ電気泳動キット（Cosmo Bio., Tokyo, Japan）を用いて、サンプルを分離した。

[0100] in vivo電子顕微鏡観察

脳出血誘導の3時間後に、マウスから脳組織を摘出し、脳出血領域を電子顕微鏡観察した。簡単に述べると、出血が生じた脳を、2%のグルタルアルデヒドで固定し、障壁（obstacle）の一部を含むようにカットし、1%の四酸化オスミウムで再度固定し、エタノール系列で脱水した。サンプルを凍結し、液体窒素を満たした凍結切断デバイスにより2~4片に切断した。切断面は、大脳表面に対して垂直であり、出血部位を含んでいた。切断サンプルをt-ブチルアルコールでフリーズドライ装置により乾燥させ、切片が上になるように伝導性のペーストを用いてサンプルステージに接着し、伝導性を与えるためにオスミウムでコートした。試料をSEMで観察した。

[0101] 透過型電子顕微鏡を用いた菌体の三次元コンピューター断層撮影

細菌膜を、TEMのCT（JEM 1220：JEOL Co., Tokyo）により作成した三次元再構成画像を用いて比較した。菌体のTEM画像を150,000倍の倍率で、 $-60^\circ \sim +60^\circ$ の傾斜範囲で $1^\circ$ ずつ撮影した。三次元再構成のCT画像は、Radonトランスフォームソフトウェアを用いて作成した。これ

らのCT画像は、あらゆる方向で表示することができる。

[0102] 組織サンプル中の細菌の検出

いくつかの器官における感染細菌の検出を、以下のようにPCRにより行った。脳の損傷半球、非損傷半球、肺、肝臓および腸などの摘出組織から全DNAを抽出し、以下の*S. mutans*特異的プライマー（文献9）を用いたPCR法にて検討した。

*S. mutans*特異的プライマー：

フォワード：5' -GGC ACC ACA ACA TTG GGA AGC TCA GTT-3'（配列番号11）

リバーズ：5' -GGA ATG GCC GCT AAG TCA ACA GGA T-3'（配列番号12）

細菌の検出限界は、各試料において、細胞数5～50個であった。組織中に生菌が存在することを確認するために、摘出した各組織を滅菌PBS中で圧搾し、原液および希釈液を、*S. mutans*用の選択培養寒天プレートであるバシトラシン（100単位/ml；Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）含有Mitis-Salivarius寒天プレート（Difco）上で画線培養した。

[0103] 5. CBP遺伝子欠損株（CND株）：TW295CDの作製

TW295株のCBPをコードする*cnm*遺伝子全配列（配列番号4：DDBJアクセス番号AB469913）に基づき設計した以下のプライマーにより、TW295株の*cnm*遺伝子断片を増幅した。

*cnm*増幅用プライマー：

*cnm1F* 5' -GAC AAA GAA ATG AAA GAT GT-3'（配列番号13）

*cnm1R* 5' -GCA AAG ACT CTT GTC CCT GC-3'（配列番号14）

[0104] 増幅された断片をpGEM-T Easyベクター（Promega, Madison, WI, USA）に組み込み、プラスミドpTN11を作製した。pTN11を制限酵素BsmIで処理し、*cnm*のオープンリーディングフレーム（Open reading frame）の中央部あたりを消化し、プラスミドpKN100から取り出したエリスロマイシン耐性遺伝子断片を組み込んだプラスミドpTN12を作製した。制限酵素PstIを用いて、pTN12を一本鎖にした後、馬血清を用いた化学的手法によってTW295株に相同組み換え

を行った。cnm遺伝子中央部にエリスロマイシン耐性遺伝子を有する株（CND株）のスクリーニングは、エリスロマイシン含有の*S. mutans*選択培地を用いた。作製した株は、サザンハイブリダイゼーションとコラーゲン結合能の測定で確認した。

[0105] PA遺伝子欠損株（PD株）：MT8148PDの作製

Nakano et al. *Microbes Infect.* 2006 8(1):114-21に記載の方法に従い、MT8148株のPAをコードするpac遺伝子全配列（配列番号2：DDBJアクセス番号X14490）に基づいたプライマーを用いて、上記CND株と同様の方法により、PD株を作成し、確認を行った。

pac増幅用プライマー

pac-F 5' -GCG CGC ATG CTT TAT TCA GAT TTG GAG GAT-3' （配列番号15）

pac-R 5' -GCG AAA GCG CAT GCT GTG ATT TAT CGC TTC-3' （配列番号16）

[0106] 統計学的分析

統計学的分析は、Prism 4ソフトウェア（GraphPad Software Inc., San Diego, CA., USA）により行った。Fisher's PLSD、Studentのt-検定、回帰分析およびANOVAを行った。p<0.05である場合、結果を有意差があるものとみなした。

[0107] *S. mutans*の菌体表層タンパク質の保有頻度の統計

2002年～2003年に大阪大学歯学部小児歯科を受診した小児患者170人から分離した170株の*S. mutans*について、PAおよびCBPの保有頻度を調べた。また、代表的な菌株における出血増悪の悪性度を、マウス脳出血モデルにおいて判定した。

[0108] 結果

例1. マウス脳出血モデルにおけるStreptococcus mutansの病原性の検討：

脳出血発症の24時間後の時点において、全く菌を投与しないコントロール群において、血管損傷側半球の中大脳動脈の下流において軽度の脳出血が

認められた（図 4 a および 4 b）。この大脳出血は大脳梗塞を引き起こす（文献 1 2）。MT8148株を感染させた群においては、ビヒクルコントロールと比較して脳出血の悪化は認められなかった（図 4 c）。一方、くも膜下出血患者から分離された血清型 k の TW871株を投与した群では、脳出血の劇的な悪化が認められた（図 4 c）。同様に、他の血清型 k 株である TW295、SA53または LJ32株を感染させた群のマウスにおいても、コントロール群および MT8148株を感染させた群と比較して有意な出血面積の増大を認めた（図 4）。TW295 および SA53株は、最大の大脳出血面積の増大を引き起こした。しかし、TW295株の投与自体によっては、血圧、心拍数および脳血流には何ら変化は観察されなかった（表 2、3）。顕微鏡観察により、脳出血誘導の 3 時間後において、TW295株を感染させたマウスにおいて明らかな出血を確認した（図 4 d）。

[表2]

表 2. 循環のパラメーター

パラメーター	投与前	投与後の時間(分)					
		5	10	15	20	30	40
収縮期血圧 (mmHg)							
対照	83.0 ± 2.5	77.3 ± 3.7	76.0 ± 2.0	79.7 ± 2.8	80.3 ± 2.6	79.0 ± 1.5	78.0 ± 2.5
TW295	75.5 ± 1.3	74.3 ± 4.6	76.0 ± 1.0	74.3 ± 1.4	73.3 ± 1.4	74.5 ± 0.9	73.8 ± 0.6
拡張期血圧 (mmHg)							
対照	73.3 ± 2.4	66.7 ± 3.5	66.7 ± 1.9	70.7 ± 2.8	70.0 ± 2.3	68.7 ± 1.9	66.7 ± 2.2
TW295	66.0 ± 1.4	66.3 ± 4.1	66.8 ± 1.1	65.3 ± 1.5	64.8 ± 1.3	65.5 ± 0.3	64.5 ± 0.3
平均血圧 (mmHg)							
対照	76.0 ± 2.1	71.7 ± 3.4	72.7 ± 2.4	72.7 ± 2.3	73.3 ± 1.8	72.3 ± 1.5	71.0 ± 2.1
TW295	69.0 ± 1.0	68.8 ± 4.7	70.0 ± 0.4	68.5 ± 1.2	67.3 ± 1.3	68.8 ± 0.9	67.3 ± 1.1
心拍(拍動/分)							
対照	428.3 ± 30.6	403.0 ± 33.8	409.3 ± 32.7	409.3 ± 29.8	407.7 ± 29.8	403.0 ± 28.0	399.3 ± 28.1
TW295	439.0 ± 14.5	426.0 ± 9.3	425.5 ± 10.9	424.6 ± 11.6	421.3 ± 11.3	414.5 ± 12.4	411.5 ± 14.5

平均値 ± SEM (n = 3-4).

[表3]

表3. 脳血流

パラメーター	対照	TW295
閉塞時間(秒)	396.7 ± 126.7	469.0 ± 101.8
合計血流時間(秒)	1612.0 ± 644.9	1749.3 ± 287.6

平均値 ± SEM (n = 3-4).

[0109] さらに、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -9の活性化に対するTW295株の効果を調べた。活性化されたMMP-9による血管障壁の破壊は、さらなる出血を引き起こす重要な増幅経路である (文献12、13)。図4eに示されるように、損傷したマウス脳の血管損傷側半球において、MMP-9の活性化が確認された。TW295株の投与は、コントロールと比較して、血管損傷側半球におけるMMP-9のさらなる活性化を刺激した。しかし、大脳動脈損傷のないマウスにおけるTW295株の投与は、脳出血発症の24時間後においても、マウスの組織に何らのダメージも与えなかったことは注目すべきである (図4aおよび4b)。これらの結果から、脳血管イベントと血清型kの細菌の存在との両方が、脳出血の増悪に必要なことが示唆される。

[0110] 例2. コラーゲン結合活性と脳出血との関係についての検討

投与された菌が損傷部位に特異的に局在化しているという仮説を証明するために、マウス脳出血モデルにおいて、菌の投与後の損傷組織におけるS. mutansの局在を調べた。PCR法によって各臓器への菌の移行を検討したところ、投与されたTW295株は、血管損傷と同側の半球にのみ移行が観察され、脳の他の部位や他の器官においては検出されなかった (図5aおよび5b)。さらに、in vivo電子顕微鏡観察 (図5c) および光学顕微鏡観察 (図6) により、菌体が、血管内皮が損傷し、コラーゲン線維が露出している損傷半球の血管に局在していることを確認した。さらに、損傷を受けた血管において菌体と



コラーゲン線維との結合を確認した（図5d）。これらの結果は、投与された菌が、*in vivo*で、特に露出されたコラーゲン線維を介して、損傷を受けた血管と特異的に相互作用していることを示唆している。

[0111] したがって、本発明者らは、血清型kの*S. mutans*とコラーゲン線維との直接相互作用に着目した。内皮細胞の破断により損傷された血管の表面に露出コラーゲン線維が存在し、コラーゲン線維と血小板との相互作用が血小板凝集にとって重要であることは知られている。最近になって、細胞表面の120kDaのコラーゲン結合タンパク質（CBP、別名としてコラーゲン結合アドヘシンまたはCnmなどがある）が*S. mutans*において同定され、そのコード遺伝子（*cnm*）がクローニングされて配列が明らかとなった（文献14）。*S. mutans*臨床株のうちCBPを有するものは約10%であり、その分布は血清型kまたはf株において優勢である（文献15および16）。興味深いことに、後述するヒト脳出血症例において観察された高病原性株（TW871、TW295、SA53およびLJ32、図4cを参照）の全てが、この表面タンパク質を有する（図7）。実際に、*in vitro*での高病原性株のコラーゲン結合活性は、MT8148株よりも劇的に高いことが示された（図8a）。さらに、血小板凝集もまた、*in vitro*で血液を高病原性菌で処理すると、MT8148株と比較して低下することも明らかとなった（図9a）。

[0112] 本発明者らは、TW295株から、コラーゲン結合アドヘシンの発現に欠損を有する変異株（TW295CND、表1）を作製した。TW295株において観察される血小板凝集の抑制は、TW295CND株において完全に回復した（図9a）。これらの結果は、TW295株のコラーゲン結合活性および血小板凝集抑制活性に、コラーゲン結合タンパク質が必要であることを示している。

[0113] 次いで、本発明者らは、TW295CND株をマウス脳出血モデルに投与した。図8bに示すとおり、TW295CNDを投与したマウスにおける脳出血面積は、TW295株を投与したものと比較して劇的に小さかった。コラーゲン結合活性と出血面積（図8c）、およびコラーゲン結合活性と血小板凝集の阻害能（図9b）との間にそれぞれ明らかな相関関係が認められた。これらの結果は、血清

型 k の *S. mutans* におけるコラーゲン結合タンパク質が、この血清型の菌の脳出血における高病原性の主要な原因であることを示すものである。また、*S. mutans* 標準株である MT8148 から誘導された PA 欠損変異株 (MT8148PD) は、コントロールと比較して脳出血を増悪させた (図 8 b)。この結果は、PA 発現の欠損が、コラーゲン結合タンパク質を発現する高病原性株による脳出血の増悪に関与していることを示すものである。

[0114] 3. 血清型 k の *S. mutans* による血小板凝集の阻害

血小板凝集は、血管の損傷後の止血への最も重要な段階である。マウス全血を用いて、コラーゲンにより誘導される血小板凝集に対する種々の血清型の *S. mutans* の効果を調べた。標準株である MT8148 株は、ビヒクル対照と比較して、全血における血小板凝集阻害作用を全く示さなかった (図 10 a)。これに対し、血清型 k の TW871 株は、 $10^7$  個の細胞を全血に添加した場合に血小板凝集の有意な阻害を示した (図 10 a)。

[0115] また、臨床で単離された 58 種の他の *S. mutans* 株の血小板凝集に対する作用について調査した。血清型 k 株を添加した場合の血小板凝集率は、他の血清型のものより有意に低かった ( $p < 0.05$ ; 図 10 b)。これらのうちで、TW295 株が最も強力な血小板凝集阻害を示した。興味深いことに、血液から単離された株を添加した場合の血小板凝集率は、口腔から単離された株のものよりも有意に低いことが明らかとなった ( $p < 0.001$ ; 図 10 c)。TW871 株を多血小板血漿を用いた血小板凝集系に添加した場合も、同様の結果が観察された。また、マウスに TW295 株を投与した後に、出血時間が長くなる傾向が観察された (データは示さず)。

[0116] しかしながら、アラキドン酸により誘導される血小板凝集は、TW295 株の投与によっては阻害されなかった (図 10 e)。本発明者らは、TW295 株がコラーゲンを妨害し、その結果血小板凝集を阻害するという仮説を立てた。図 11 a の走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像が示すとおり、コラーゲンによる刺激の後で血小板画分を回収すると、血小板の活性化をもたらす血小板とコラーゲンとの相互作用が観察された (左パネル、ビヒクル)。ビヒクル対照群

において、例えば仮足や血小板の接着などの血小板凝集に関係する形態学的変化が観察された。MT8148株の添加は、対照と比較して、血小板とコラーゲンとの相互作用に何ら影響を示さなかった（図 1 1 a、右パネル）。これに対し、TW295株の添加は、血小板とコラーゲンとの相互作用を明らかに抑制し、血小板の活性化の阻害をもたらすことが示された（図 1 1 a、中央パネル）。これらの結果は、TW295がコラーゲンに結合することにより血小板とコラーゲンとの相互作用が阻害され、その結果凝集が阻害されることを明確に示すものである。

[0117] 4. 菌表面のイオン電荷の評価

血小板の表面イオン電荷は、損傷血管の露出したコラーゲン線維との相互作用を導く重要な因子の一つである。血小板表面のアニオン性は、コラーゲンのカチオン電荷との相互作用をもたらす（文献 17～19）。したがって、コラーゲンとの相互作用に影響を及ぼし得る菌体表面のイオン電荷を測定した。生理食塩水中に溶解したMT8148細胞のゼータ電位（細胞表面イオン電荷の指標として用いる）の平均値は、 $-0.75\text{mV}$ であり、ほぼ非イオン性であった（図 1 1 b）。これに対して、TW295株およびTW871株などの血清型 k 株のゼータ電位は、それぞれ $-13.51\text{mV}$ および $-8.42\text{mV}$ と、MT8148株のものよりはるかに低い値を示し、血清型 k 株の細胞表面の条件がアニオン性であることが明らかとなった（図 1 1 b）。ゼータ電位値と血小板凝集率との回帰分析は、有意な正の相関を示した（図 1 2）。

[0118] *S. mutans*の表面タンパク質抗原について、その齲蝕の病原因子としての役割を明らかにするために研究が行われており、190kDaのタンパク質抗原（PA）が、歯の表面への初期の付着と関連することが知られている（文献 20）。PA発現欠損株は、PAを正常に発現する株と比較して抗原性が低下しており、そのため菌血症がより長期間持続することが示されている（文献 21）。MT8148から作製したPA発現欠損アイソジェニック変異株（MT8148PD、文献 21）の細胞表面の状態を測定した。MT8148PDのゼータ電位の平均値は、MT8148株よりもはるかに低かった（図 1 1 b）。これらの分子の存在ま

たは不在は、血清型 k の *S. mutans* の表面イオン電荷の決定に関与していると考えられる。

[0119] 透過型電子顕微鏡観察 (TEM、図 11c) および SEM 観察 (図 11d) により、MT8148 株と、TW295 株などの血清型 k 株との間での細胞表面の顕著な違いが示された。MT8148 株から作製された PA 発現欠損株は、TW295 株のものと非常に類似した表面状態を示した (図 11c)。超薄切片の TEM による細菌膜の構造は、観察方向により変化することがある。加えて、超微細構造の観察においては、切片の厚みを考慮する必要がある。したがって、細菌膜を、TEM のコンピューター断層撮影法 (CT) により再構成した 3 次元画像を用いて比較した。MT8148 のペプチドグリカン層は、3 次元 TEM 画像において透明で滑らかな層として観察される (図 13a) のに対して、TW295 のペプチドグリカン層は、不透明で境界が曖昧であった (図 13b)。これらの結果は、ペプチドグリカン層を含む菌表面が、PA の欠損または存在に依存して大きく異なり、これが血清型 k の *S. mutans* のイオン性に荷電された表面状態をもたらすことを明確に示している。

[0120] 5. ヒト脳卒中患者から単離される *S. mutans* 株

CBP 遺伝子を発現する *S. mutans* の感染が脳卒中の危険因子であるという仮説を証明するために、口腔サンプルを用いて、脳卒中患者におけるコラーゲン結合タンパクを有する *S. mutans* の出現頻度を検討した。結果を表 4 に示す。

[0121]

[表4]

表 4. 脳卒中患者におけるコラーゲン結合タンパク質保有 *S. mutans* の検出頻度

症例	年齢	性別	診断	主要な合併症	<i>S. mutans</i>	CBP
1	64	M	脳出血	高血圧、高脂血症	+	ND
2	75	M	脳出血	高血圧、狭心症	+	+
3	58	M	脳梗塞	胃癌	ND	ND
4	84	M	脳梗塞	胃痛	+	+
5	67	M	脳出血	貧血、腎不全	ND	ND
6	83	M	脳梗塞	高血圧	ND	ND
7	75	M	脳出血	高血圧	ND	ND
8	58	M	脳梗塞	高血圧、糖尿病	+	ND
9	63	F	脳梗塞	高脂血症	+	ND
10	80	F	脳梗塞	高血圧、糖尿病	+	ND
11	81	M	くも膜下出血		ND	ND
12	76	F	脳梗塞	高血圧	+	+
13	70	F	脳梗塞	高血圧、糖尿病	+	ND
14	51	F	脳出血	高血圧、高脂血症	ND	ND
15	67	M	脳出血	高血圧、高脂血症	+	+
16	62	M	脳梗塞	高血圧	+	ND
17	49	M	脳出血		+	+

ND : 検出感度 (10 CFU/ml) 以下

[0122] 17症例の脳卒中患者のうち、11症例において患者から*S. mutans*が単離された。このうち、5症例は、CBP遺伝子を発現する*S. mutans*に感染していた(5/11、45.5%、表4)。これは、健常人においてコラーゲン結合タンパク質保有*S. mutans*が検出される頻度(10%)と比較してはるかに高い。これらの結果は、CBP遺伝子発現*S. mutans*の感染が脳卒中の危険因子である可能性を示唆している。

[0123] さらに、単離されたCBP遺伝子発現*S. mutans*の病原性をマウスにおいて試験した。脳卒中患者から単離されたCBP発現*S. mutans*株のうち、コラーゲン結合活性および血小板凝集阻害活性が野生型MT8148株と比較していずれも高い2株(SMH4およびSMH6、図14aおよび14b)を、マウス脳出血モ

デルにおいて検討した。SMH4株またはSMH6株のいずれかを投与されたマウスにおいて、コントロール（野生型MT8148株）と比較して劇的な脳出血の増悪が観察された（図15 a、15 bおよび15 c）。これらの結果は、脳卒中患者から単離された*S. mutans*株が、脳卒中を引き起こす危険因子であることを明確に示している。

[0124] 6. PAおよびCBP保有株の出現頻度と出血増悪の悪性度との相関関係

表5は、小児患者170人から分離した170株の*S. mutans*について、*S. mutans*の菌体表層タンパク質の保有頻度を調べた結果をまとめたものである。悪性度とはマウス脳出血モデルにおける各菌株が及ぼす出血領域の面積から推定している。

[0125] [表5]

表5. *S. mutans* の菌体表層タンパク質の保有頻度

口腔内における頻度	<i>S. mutans</i>	PA	CBP	悪性度
1.8%	+	-	+	100%
1.2%	+	-	-	50-70%
8.2%	+	+	+	40-60%
88.8%	+	+	-	0

[0126] PAを発現しない株は全体の3%であり、CBPを保有しない株は全体の90%を占めた。マウスモデルにおける各菌株が及ぼす出血領域の面積から、PAを保有せずCBPを保有する1.8%の株が、脳出血における悪性度が最も高いと判定し、これを悪性度100%と定義した。この定義に従い、PAを発現せずCBPを保有していない株（頻度=約1.2%）、およびPAを発現しCBPを保有している株（頻度=約8.2%）の悪性度を、それぞれ約50~70%および約40~60%と判定した。この結果は、PAおよびCBPの遺伝子欠損株を用いた上記の実験結果と一致する。

[0127] 考察

本研究において、CBPを発現する、および/またはPAを発現しない*S. mutans*が、出血を伴う疾患、特に出血性脳卒中の潜在的危険因子であること

が初めて示された。

本研究において、血清型 k の *S. mutans* 株による脳出血の増悪が確認された。さらに、感染性細菌が血管損傷側半球のみにおいて同定され、対側半球には見られなかったことから、血清型 k の *S. mutans* と損傷血管との相互作用が、脳出血の発症における重要なイベントであることが示された。これらの株は、共通するタンパク質発現パターンとして、コラーゲン結合タンパク質（CBP）の発現および／またはタンパク質抗原（PA）の欠損を示し、これらは脳出血の増悪に重要であり得ることが明らかとなった（図7）。血清型 k の *S. mutans* のコラーゲン結合タンパク質が脳出血の発症に関与するという本発明者らの仮説は、コラーゲン結合タンパク質欠損変異株 TW295CND が脳出血の増悪を引き起こさないという今回の結果により支持される。高病原性株 TW295、TW871、SA53 および LJ32 は、いずれもその表面にコラーゲン結合タンパク質を発現し、強力なコラーゲン結合特性を有する。したがって、強力なコラーゲン結合特性を有する菌株が露出したコラーゲン層に集積し、MMP-9 を活性化し、血小板凝集を阻害することにより、さらなる出血を引き起こすと推測される。このため、コラーゲン結合タンパク質を有する株は、脳出血の高病原性株とみなされるべきである。実際に、損傷を受けたマウス脳の血管損傷側の血管の *in vivo* SEM 画像により、感染細菌は存在したが、血小板凝集は生じていないことが観察された。

[0128] 別の潜在的な脳出血病原因子は、タンパク質抗原（PA）発現の欠損である。高病原性株 TW295、SA53 および LJ32 はいずれも、PA 発現に欠損が認められた。これに対し、TW871 は PA 抗原を発現し（図7および表1）、このため、TW871 株で処置したマウスにおける脳出血の面積は、他の高病原性株で処置したマウスにおける脳出血面積と比較してはるかに小さかった（図4c）。さらに、*S. mutans* 標準株である MT8148 から誘導された PA 欠損変異株（MT8148PD）は、コントロールと比較して脳出血の増悪を示した（図8b）。さらに、PA 発現を示さない株は、PA 発現を示す株と比較して、血小板凝集率が有意に低かった（データは示さず）。これらの結果は、PA 発現の欠損が

、コラーゲン結合タンパク質を発現する高病原性株による脳出血の増悪に  
関与していることを示すものである。

[0129] 一般に、コラーゲンは、生理学的条件下においてカチオン性であり、したがって、細菌の表面イオン特性は、露出されたコラーゲン線維との相互作用にとって重要であると考えられる。実際に、PA欠損アイソジェニック変異体は、最も低いゼータ電位値を示し、他のPA発現欠損株も、低いゼータ電位値をとる傾向があった。これは、PAがゼータ電位値に影響を及ぼすことを示すものである。ゼータ電位値とコラーゲン誘導血小板凝集率とが正の相関を示したため、低いゼータ電位値を有する株もまた、高病原性株と分類できる。これらのことから、*S. mutans*のコラーゲン結合タンパク質を発現する株が、露出されたコラーゲン線維に対して高いアフィニティーを有し、また、*S. mutans*における低レベルのPA発現が、細胞表面状態をアニオン性にし、これがさらにカチオン性のコラーゲン線維とのアフィニティーを増大することが考えられる。コラーゲン結合タンパク質の存在と190kDaのタンパク質の欠損との相乗効果により、コラーゲン線維への強力な結合が生じ、コラーゲンが露出した血管への高病原性細菌の集積がもたらされる。細菌の集積は、続いて、損傷血管におけるMMP-9の活性化および血小板凝集の阻害をもたらす出血の加速および出血性梗塞を生じる（図16）。

[0130] *S. mutans*に感染した患者のうちでコラーゲン結合タンパク質を発現する株に感染した者の割合は、8~10%と推測される（文献16、22）。これに対し、PAは、*S. mutans*の殆どの株において正常に発現し、発現を示さない株はわずか4%である（文献21）。したがって、コラーゲン結合タンパク質を発現し、PAの発現に欠損を有する*S. mutans*株、すなわち極めて高い病原性を有する株は、非常に希少であり、*S. mutans*菌血症による脳出血の増悪の潜在的危険因子となる株の数は限定されている。脳出血は、発症した後ではその治療的アプローチが限られるため、予防が最も重要なアプローチであると考えられる（文献23）。したがって、高病原性の*S. mutans*株に感染している患者を同定することは、脳出血の予防のために重要である。実際に



、本発明者らは、CBPを発現する、高病原性TW295型の*S. mutans*を脳卒中患者から極めて高い頻度で単離している。さらに、かかる株のいくつかは、マウス出血性梗塞モデルにおいても脳出血の増悪を引き起こしたが、これは出血性脳卒中の発症における高病原性*S. mutans*の関与を示すものである。

[0131] 以上より、高病原性の脳卒中を誘導する*S. mutans*の感染が、脳卒中の潜在的危険因子であることが結論付けられる。脳出血の重要な病原因子は、コラーゲン結合タンパク質の存在と、PA発現の欠損であり、これらは血清型kの臨床単離株の多くに共通する特徴である。したがって、*S. mutans*株によるPAおよび／またはCBPの保有の有無は、保菌者における出血時のリスクを判定する指標となり、脳出血の予防に役立てることができる。

[0132] 検出例 1. 出血時のリスクとなる菌体表層構造を有するStreptococcus mutansの検出

#### 材料と方法

供試菌：検出系の確立には以下の菌を用いた。

- S. mutans* MT8148株 (PA+／CBP-) / TW295株 (PA-／CBP+)
- S. sobrinus* B13株 / 6715株
- S. sanguinis* ATCC10556株
- S. oralis* ATCC10557株
- S. gordonii* ATCC10558株
- S. salivarius* HHT株

[0133] 分析 1. *S. mutans* (ミュータンスレンサ球菌) の培養方法

(操作時間約5分、待ち時間(菌の培養など)2日)

*S. mutans*の培養には以下のものを用いる：

- ・唾液採取スピッツ (滅菌で採取および播種しやすいものなら特に限定されない)
- ・唾液を10 $\mu$ l採取することができる専用スポイト
- ・専用培地A (寒天培地) (24ウェルプレート(例えば、24 well with Lid MICROPLATE (IWAKI) など、24ウェル程度のプレートであれば特に限定さ

れない)に、Mitis-salivarius寒天培地 (Difco Laboratories) にバシトラシン (100 unit/ml ; SIGMA-ALDRICH) と 15%スクロース (和光純薬) とを添加したMSB寒天培地をコートしたもの。アネロパックを添付することが好ましい。)

- ・菌のコロニーをピックアップするための、滅菌したつまようじのようなもの

- ・専用培地B (液体培地) (滅菌したBrain Heart Infusion (BHI) 液体培地 (Difco Laboratories) を加えたディスポーサルの試験管)

[0134] *S. mutans*の培養は以下の通り行う。

唾液採取スピッツで被験者の唾液を少量採取する。専用スポイトで唾液をスピッツから10 $\mu$ l採取し、専用培地Aに播種して、37 $^{\circ}$ Cで48時間、好ましくは嫌気条件下において培養を行う。培養後、菌のコロニーが生えていることを肉眼で確認し、コロニー (ラフコロニーが望ましい) をピックアップして専用培地Bに加えて、37 $^{\circ}$ Cで18時間培養し、以下の分析2、3、4に使用する。*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. oralis*、*S. gordonii*、および*S. salivarius*培養物をコントロールとして用い、分析1において、*S. mutans*および*S. sobrinus*以外の菌が生育しないことを確認する。

[0135] 分析2. *S. mutans* (ミュータンスレンサ球菌) の検出方法

(操作時間約15分、待ち時間 (菌の培養など) 約3時間)

上記分析1のミュータンスレンサ球菌培養法は、ミュータンスレンサ球菌群 (*S. mutans*/*S. sobrinus*) が生育しやすい条件を整えているが、バシトラシン耐性を有するミュータンスレンサ球菌以外の菌が生えることもあるため、このステップで確認を行う。

[0136] 検出には以下のものを用いる：

- ・菌液を10 $\mu$ l採取できる専用スポイト
- ・専用培地C (96ウェルプレート (例えばMULTI WELL PLATE for ELISA (スミロン)) に、1%スクロース (和光純薬) 含有BHI溶液100 $\mu$ lを添加したもの)

- ・洗浄液A（PBS溶液）
- ・バッファー1（滅菌蒸留水に0.5%クリスタルバイオレット（和光純薬）を加えた溶液）
- ・バッファー2（7%酢酸（和光純薬）溶液）

[0137] 検出は以下の通り行う。

専用培地Cに分析1の方法により培養した菌液を10 $\mu$ l加えて、37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートする。専用培地Cを洗浄液Aで3回洗った後、3回目の洗浄液Aを加えた状態で約15分静置する。洗浄液Aを除去し、再度専用培地Cを洗浄液Aで1回洗った後、100 $\mu$ lのバッファー1を専用培地Cに加え、1分静置する。洗浄液Aで3回洗浄し、バッファー2を200 $\mu$ l加える。

培地の色に変化した場合、*S. mutans*陽性と判定し、培地の色に変化がない場合、*S. mutans*陰性と判定する。

[0138] 分析3. PA欠失*S. mutans*の検出方法

（操作時間約30分、待ち時間（菌の培養など）約11時間30分）

PA欠失*S. mutans*を検出するために、以下のものを用いる：

- ・専用プレート（96ウェルプレート；MICROTEST U-Bottom（BECTON DICKINSON））
- ・洗浄液B（分析2で使用した洗浄液AにTriton X-100（和光純薬）を0.05%添加したPBST溶液）
- ・バッファー3（pH6.8のトリス塩緩衝液、100mM ジチオスレイトール（和光純薬）、20%グリセリン（和光純薬）を混合したもの）
- ・バッファー4（PBST溶液にスキムミルク（BECTON DICKINSON）を5%加えた溶液）
- ・バッファー5（PBSTにウサギ抗PA抗血清（当教室保有）を0.1%添加した溶液）
- ・バッファー6（PBSTにブタ抗ウサギ免疫グロブリン抗体（Dakopatts）を0.1%添加した溶液）

・バッファー7（AP（100mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチルー1, 3-プロパンジオール、5mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウム）緩衝液に、NBT溶液（和光純薬）を終濃度0.6%で、BCIP溶液（和光純薬）を終濃度0.33%で加えた溶液）

[0139] PA欠失*S. mutans*の検出を以下のとおり行う。

（1）サンプル調整

上記分析1の方法により培養した菌液100 $\mu$ lにバッファー3を加えて、沸騰した湯に10分間浸漬した後、保存する場合は冷凍保存する。

（2）PA欠失*S. mutans*の検出

1）上記（1）により作製したサンプルを専用プレートに100 $\mu$ l加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置する。

2）専用プレートを洗浄液Bで3回洗浄した後、バッファー4を100 $\mu$ l加え、常温で1時間静置する。

3）専用プレートを洗浄液Bで3回洗浄した後、バッファー5を100 $\mu$ l加え、常温で1時間反応させる。

4）専用プレートを洗浄液Bで3回洗浄した後、バッファー6を100 $\mu$ l加え、常温で1時間反応させる。

5）専用プレートを洗浄液Bで3回洗浄した後、バッファー7を100 $\mu$ l加え、15分後液の色の変化を観察する。液の色が変化した場合、PA陽性と判定し、液の色が変化しない場合、PA陰性と判定する。*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. oralis*、*S. gordonii*、および*S. salivarius*培養物をコントロールとして用い、分析3においてPA保有*S. mutans*以外の菌が陽性反応を示さないことを確認する。

[0140] 分析4. CBP保有*S. mutans*の検出方法

（作業時間約30分、待ち時間（菌の培養など）約3時間30分）

CBP保有*S. mutans*の検出には、以下のものを用いる

・専用培地D（分析3で使用した専用プレートに、0.6%酢酸を添加した滅菌蒸留水とI型コラーゲン（Sigma）を9：1の割合で混合した溶液を添

加したもの)

・洗浄液A (上記分析2 (S. mutansの検出方法) で使用しているものと同じもの)

・バッファー8 (洗浄液Aに5%ウシアルブミン (Sigma) を加えたもの)

・洗浄液C (洗浄液Aに0.01% Tween 20 (和光純薬) を加えたPBST溶液)

・バッファー9 (滅菌蒸留水に25%ホルムアルデヒド (和光純薬) を加えたもの)

・バッファー1 (上記分析2で使用しているものと同じもの)

・バッファー2 (上記分析2で使用しているものと同じもの)

[0141] CBP保有S. mutansの検出は、以下のとおり行う。

(1) 専用培地Dを洗浄液Aで3回洗浄した後、バッファー8を200 $\mu$ l加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置する。

(2) 洗浄液Cで3回洗浄した後、上記1の方法により培養した菌液を200 $\mu$ l加え37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートする。

(3) 洗浄液Aで3回洗浄した後、バッファー9を200 $\mu$ l加え、常温で30分静置する。

(4) 洗浄液Aで3回洗浄した後、バッファー1を200 $\mu$ lを96ウェルプレートに加え、1分静置する。

(5) 洗浄液Aで3回洗浄した後、バッファー2を200 $\mu$ l加える。

液の色が変化した場合、CBP陽性と判定し、液の色が変化しない場合、CBP陰性と判定する。S. sobrinus、S. sanguinis、S. oralis、S. gordonii、およびS. salivarius培養物をコントロールとして用い、分析4においてCBP保有S. mutans以外の菌が陽性反応を示さないことを確認する。

[0142] 分析例1

図11は、3個体の対象から採取した唾液サンプル(A、BおよびC)中のS. mutansがPAおよび/またはCBP保有株であるか否かを分析した結果の例である。分析1のステップにおいて、専用培地A (バシトラシン選択寒

天培地)で唾液サンプルを培養した結果、A、BおよびCのいずれも、コロニー形成を確認した。形成されたコロニーをピックアップし、専用培地B中で37°Cで18時間培養した。また、*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. oralis*、*S. gordonii*、および*S. salivarius*培養物をコントロールとして同様の培養を行い、分析1において、*S. mutans*および*S. sobrinus*以外の菌が生育しないことを確認した。

[0143] 次いで、分析2のステップにおいて、分析1で培養した菌液を専用培地Cに加え、37°Cで3時間インキュベートし、洗浄液Aで洗浄の後、クリスタルバイオレットを含むバッファー1で染色した。サンプルAおよびBを培養した培地においてバッファーが青紫色に変化したので、*S. mutans*が存在すると判定した。サンプルCを培養した培地においては、バッファーは透明なままであったので、*S. mutans*が存在しないと判定した。

[0144] 分析3のステップにおいて、分析1で培養したサンプルAおよびBの菌液を、バッファー3を加えて10分間煮沸し、冷凍保存したものを、専用プレート(96ウェルプレート:MICROTEST U-Bottom (BECTON DICKINSON))に加え、4°Cで一晩静置した。洗浄液Bで洗浄の後、バッファー4を加えて常温で1時間ブロッキングし、ウサギ抗PA抗血清を含むバッファー5を加えて常温で1時間反応させた。洗浄液Bで洗浄の後、ブタ抗ウサギ免疫グロブリン抗体を含むバッファー6を加えて常温で一時間反応させた。洗浄液Bで洗浄の後、アルカリホスファターゼ反応検出試薬を含むバッファー7を添加し、15分後に液の色の変化を観察した。サンプルAのプレートにおいては、液がピンク色に変化したので、PAを保有する*S. mutans*が存在するものと判定した。サンプルBについては、液の色は透明のままであったので、PAを保有する*S. mutans*は存在しないものと判定した。*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. oralis*、*S. gordonii*、および*S. salivarius*培養物をコントロールとして同様の分析を行い、PA保有*S. mutans*以外の菌が陽性反応を示さないことを確認した。

[0145] 分析4のステップにおいて、I型コラーゲン(Sigma)でコートした専用培

地Dに、5%ウシアルブミンを含むバッファー8を加えて37°Cで1時間静置した。洗浄液Cで洗浄の後、分析1で培養した菌液を加えて37°Cで2時間インキュベートした。洗浄液Aで洗浄の後、25%ホルムアルデヒドを含むバッファー9を加え、常温で30分間静置した。洗浄液Aで洗浄の後、バッファー1を加えて1分間静置した。洗浄液Aで洗浄の後、バッファーBを加えて液の色の変化を観察した。サンプルAを含むプレートにおいては、液の色は透明のままであったので、CBPを保有する*S. mutans*は存在しないものと判定した。サンプルBを含むプレートでは、液の色が青紫色に変化したので、CBPを保有する*S. mutans*が存在するものと判定した。*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. oralis*、*S. gordonii*、および*S. salivarius*培養物をコントロールとして同様の分析を行い、CBP保有*S. mutans*以外の菌が陽性反応を示さないことを確認した。

[0146] 例4. *S. mutans*培養の至適条件

上記分析2~4においてより精度の高い判定を得るためには、分析1においてできるだけ多くの*S. mutans*を培養し、かつできるだけ*S. mutans*以外の菌が混入していないことが重要であると考えられる。培養のための条件として、(1)好気条件/嫌気条件での培養、(2)抗生物質(バシトラシン)濃度、(3)栄養(スクロース)濃度について検討を行った。図12は、バシトラシンを、定法のMSB培地中のバシトラシンを1当量としたときの(a)1当量および(b)5当量で、スクロースを、定法のMSB培地中のスクロースを1当量としたときの1~4当量で、各々MSB培地に添加した場合に分離された菌全量に対する*S. mutans*の割合を示すグラフである。嫌気条件下において、1当量のバシトラシンおよび1当量のスクロースを用いた場合に、最も高い濃度で*S. mutans*が単離できることが明らかとなった。したがって、より精度の高い判定を得るためには、密封できる容器中で嫌気条件下において(例えばアネロパックを添付した密封パック中で)、通常のMSB培地中に含まれているものと同じ濃度のバシトラシン(100 unit/ml程度)およびスクロース(15%程度)を培地に添加して培養することが必要である

ことが明らかとなった。

[0147] 例 5. サンプルの保存期間

採取後時間が経過した唾液を用いて分析を行った場合に、例 4 で求めた至適条件下において、病原性 *S. mutans* を検出するために使用可能な唾液の保存期間を検討した。

図 13 は、採取した当日に滅菌生理食塩水で段階希釈した唾液を MSB 寒天培地に播種した場合に分離できた *S. mutans* の分離率を 100% として、採取してから 0~6 ヶ月間経過した唾液をサンプルとして分析 1 を行った場合の *S. mutans* の分離率を示すグラフである。唾液は採取後 -20°C で凍結保存したものをを用いた。サンプル数：N=8、ただし 1~2 ヶ月前のサンプルのみ N=6。結果から、サンプルとする唾液は、好ましくは 3 ヶ月以内、好ましくは 2 ヶ月以内、最も好ましくは 1 ヶ月以内に使用することが望ましいと考えられる。

[0148] 本明細書において使用したタンパク質、ポリペプチドおよび核酸などの配列については、添付の配列表に以下の通り記載する。



[表6]

表6. 配列対応表

配列番号	生物種・株	配列の内容
1	<i>S. mutans</i> MT8148	PA-アミノ酸
2	<i>S. mutans</i> MT8148	PA-DNA
3	TW295	CBP-アミノ酸
4	TW295	CBP-DNA-ORF
5	<i>S. mutans</i> TW295	CBD-アミノ酸
6	<i>S. mutans</i> TW295	CBD-DNA
7	<i>S. mutans</i> TW871	CBP-アミノ酸
8	<i>S. mutans</i> TW871	CBP-DNA-ORF
9	<i>S. mutans</i> TW871	CBD-アミノ酸
10	<i>S. mutans</i> TW871	CBD-DNA
11	Artificial	<i>S. mutans</i> -プライマーF
12	Artificial	<i>S. mutans</i> -プライマーR
13	Artificial	<i>S. mutans</i> -CBD-プライマーF (cnm1F)
14	Artificial	<i>S. mutans</i> -CBP-プライマーR (cnm1R)
15	Artificial	<i>S. mutans</i> -PAC-プライマーF (pac-F)
16	Artificial	<i>S. mutans</i> -PAC-プライマーR (pac-R)
17	<i>S. mutans</i> LJ23	PA-アミノ酸
18	<i>S. mutans</i> LJ23	PA-DNA
19	<i>S. mutans</i> SA98	PA-アミノ酸
20	<i>S. mutans</i> SA98	PA-DNA
21	<i>S. mutans</i>	antigenI/II-アミノ酸
22	<i>S. mutans</i>	antigenI/II 遺伝子 (spa) -DNA
23	<i>Neisseria meningitidis</i>	鉄結合タンパク質-アミノ酸
24	<i>Neisseria meningitidis</i>	鉄結合タンパク質遺伝子 (fbp) DNA
25	<i>S. mutans</i> SA53	CBP-アミノ酸
26	<i>S. mutans</i> SA53	CBP-DNA-ORF
27	<i>S. mutans</i> SA53	CBD-アミノ酸
28	<i>S. mutans</i> SA53	CBD-DNA
29	<i>S. mutans</i> LJ32	CBP-アミノ酸
30	<i>S. mutans</i> LJ32	CBP-DNA-ORF
31	<i>S. mutans</i> LJ32	CBD-アミノ酸
32	<i>S. mutans</i> LJ32	CBD-DNA

[0149] 参考文献一覧

[表7]

**References**

1. Murray, C. J. & Lopez, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **349**, 1269–1276 (1997).
2. Donnan, G. A., Fisher, M., Macleod, M. & Davis, S. M. Stroke. *Lancet* **371**, 1612-1623 (2008).
3. Broderick, J. *et al.* A guideline from the American Heart Association, American Stroke Association Stroke Council, High Blood Pressure Research Council, and the Quality of Care and Outcomes in Research Interdisciplinary Working Group. *Stroke* **38**, 2001–2023 (2007).
4. Woo, D. *et al.* Genetic and environmental risk factors for intracerebral hemorrhage: preliminary results of a population-based study. *Stroke* **33**, 1190-1195 (2002).
5. Emsley, H. C. & Tyrrell, P. J. Inflammation and infection in clinical stroke. *J. Cereb. Blood Flow: Metab.* **22**, 1399-1419 (2002).
6. Moreillon, P. & Que, Y. A. Infective endocarditis. *Lancet* **363**, 139-149 (2004).
7. Mylonakis, E. & Calderwood, S. B. Infective endocarditis in adults. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1318-1330 (2001).
8. Bayer, A. S. *et al.* Diagnosis and management of infective endocarditis and its complications. *Circulation* **98**, 2936-2948 (1998).
9. Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S. and 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.* **42**, 198-202 (2004).
10. Eishi, K. *et al.* Surgical management of infective endocarditis associated with cerebral complications. Multi-center retrospective study in Japan. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **110**, 1745-1755 (1995).
11. Fujiwara, T. *et al.* Biochemical and genetic characterization of serologically untypable *Streptococcus mutans* strains isolated from patients with bacteremia. *Eur. J. Oral Sci.* **109**, 330-334 (2001).

[0150]

## [表8]

12. Zhao, B. Q. *et al.* Essential role of endogenous tissue plasminogen activator through matrix metalloprotease 9 induction and expression on heparin-produced cerebral hemorrhage after cerebral ischemia in mice. *Blood* **103**, 2610-2616 (2004).
13. Gursoy-Ozdemir, Y. *et al.* Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J. Clin. Invest.* **113**, 1447-1455 (2004).
14. Sato, Y. *et al.* *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. *J. Dent. Res.* **83**, 534-539 (2004).
15. Nakano, K. *et al.* Detection of novel serotype *k* *Streptococcus mutans* in infective endocarditis patients. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1413-1415 (2007).
16. Nakano, K. *et al.* *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2616-2625 (2007).
17. Hampton, J. R. & Mitchell, J. R. A. Effect of aggregating agents on the electrophoretic mobility of human platelets. *Br. Med. J.* **1**, 1074-1077 (1966).
18. Hampton, J. R. & Mitchell, J. R. A. Modification of the electrokinetic response of blood platelets to aggregating agents. *Nature* **210**, 1000-1002 (1966).
19. Boisseau, M. R., Lorient, M. F., Born, G. V. R. & Michal, F. Change in electrophoretic mobility associated with the shape change of human blood platelets. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **196**, 471-474 (1977).
20. Okahashi, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Hamada, S. & Koga, T. Cloning of a surface protein antigen gene from serotype *c* *Streptococcus mutans*. *Mol. Microbiol.* **3**, 221-228 (1989).
21. Nakano, K., Tsuji, M., Nishimura, K., Nomura, R. & Ooshima, T. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. *Microbes Infect.* **8**, 114-121 (2006).
22. Nomura, R. *et al.* Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. *J. Med. Microbiol.* **58**, 469-475 (2009).

[0151]

## [表9]

23. Ariesen. M. J., Claus. S. P., Rinkel. G. J. & Algra. A. Risk factors for intracerebral hemorrhage in the general population: a systematic review. *Stroke* **34**, 2060-2065 (2003).
24. Ooshima. T., Izumitani. A., Sobue. S., Okahashi. N. & Hamada. S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. *Infect. Immun.* **39**, 43-49 (1983).
25. Nakano. K. *et al.* Protein antigens in serotype *k* *Streptococcus mutans* clinical isolates. *J. Dent. Res.* **87**, 964-968 (2008).
26. Nakano. K. *et al.* Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesin. *Arch. Oral Biol.* (in press).
27. Waterhouse. J. C. & Russell R. R. B. Dispensable genes and foreign DNA in *Streptococcus mutans*. *Microbiology* **152**, 1777-1788 (2006).
28. Suzuki. Y., Nagai. N. & Collen. D. Comparative effects of microplasmin and tissue-type plasminogen activator (tPA) on cerebral hemorrhage in a middle cerebral artery occlusion model in mice. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 1617-1621 (2004).
29. Nakano K, Nomura R, Taniguchi N, Lapirottanakul J, Kojima A, Naka S, Senawongse P, Srisatjaluk R, Grønroos L, Alaluusua S, Matsumoto M, Ooshima T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesin. *Arch Oral Biol.* 55(1):34-9, 2010.

## 請求の範囲

- [請求項1] 出血増悪口腔細菌を検出する方法であって、試料中の口腔細菌のPAおよび／またはCBPおよび／または細胞表面電荷を検出することを含み、PAが検出されないことおよび／またはCBPが検出されることおよび／または細胞表面電荷が陰性であることにより、出血増悪口腔細菌が存在すると判断する、前記方法。
- [請求項2] 出血増悪の危険性が高い対象のスクリーニング方法であって、対象から得られた生体試料中の口腔細菌のPAおよび／またはCBPおよび／または細胞表面電荷を検出することを含み、PAが検出されないことおよび／またはCBPが検出されることおよび／または細胞表面電荷が陰性であることにより、出血増悪の危険性が高いと判断する、前記方法。
- [請求項3] 対象における出血増悪の危険性の判定方法であって、対象から得られた生体試料中の口腔細菌のPAおよび／またはCBPおよび／または細胞表面電荷を検出することを含み、PAが検出されないことおよび／またはCBPが検出されることおよび／または細胞表面電荷が陰性であることにより、前記対象において出血増悪の危険性が高いと判断する、前記方法。
- [請求項4] 出血が破綻性出血である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] 口腔細菌が、*Streptococcus mutans*である、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [請求項6] PAが、
- (1) 配列番号1、17、19、21または23で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、
  - (2) (1)のポリペプチドに対して1または2以上の変異を含むが、(1)のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、
  - (3) 配列番号2、18、20、22または24で表される核酸配列もしくはその相補配列またはその断片にストリンジントな条件下に

においてハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつ（１）のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

（４）配列番号１、１７、１９、２１または２３で表されるアミノ酸配列と７０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ（１）のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

からなる群より選択される、請求項１～５のいずれかに記載の方法。

[請求項7] PAが、配列番号１、１７、１９、２１または２３で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、請求項６に記載の方法。

[請求項8] CBPが、

（１）配列番号５、９、２７または３１で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

（２）（１）のポリペプチドに対して１または２以上の変異を含むが、（１）のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

（３）配列番号６、１０、２８または３２で表される核酸配列もしくはその相補配列またはその断片にストリンジントな条件下においてハイブリダイズする核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含み、かつ（１）のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

（４）配列番号５、９、２７または３１で表されるアミノ酸配列と７０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ（１）のポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチド、

からなる群より選択される、請求項１～５のいずれかに記載の方法。

[請求項9] CBPが、配列番号５、９、２７または３１で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、請求項８に記載の方法。

[請求項10] 口腔細菌のPA検出剤および／またはCBP検出剤を含む、出血増悪口腔細菌の検出用試薬。

[請求項11] 出血増悪口腔細菌の検出のための、口腔細菌PA特異的抗体。

[請求項12] PA検出試薬、および

## C B P 検出試薬

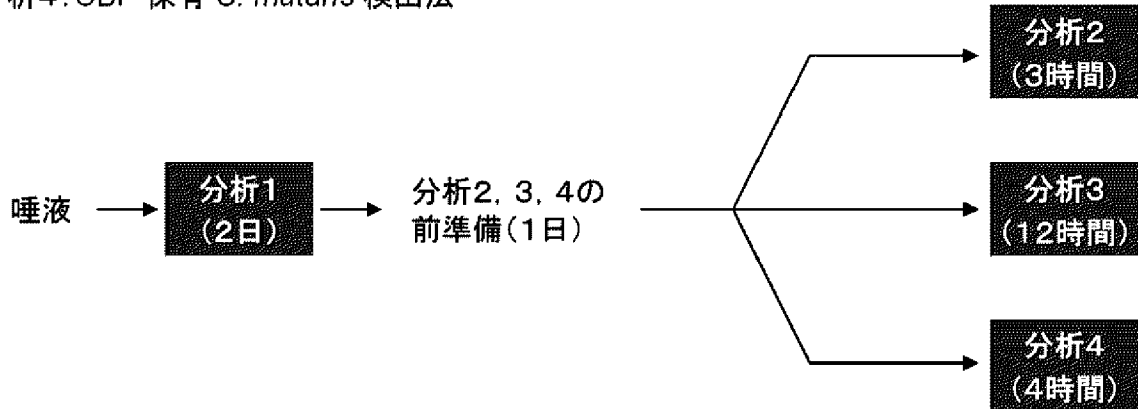
を少なくとも含む、出血増悪口腔細菌の検出および／または出血増悪の危険性が高い対象のスクリーニングおよび／または対象における出血増悪の危険性の判定のためのキット。

- [請求項13] 口腔細菌 P A タンパク質または P A タンパク質をコードする核酸を含む、止血剤。
- [請求項14] 口腔細菌 P A タンパク質または P A タンパク質をコードする核酸に結合する物質を含む、 P A 発現口腔細菌による血小板凝集抑制剤。
- [請求項15] 口腔細菌 C B P または C B P タンパク質をコードする核酸に結合する物質を含む、出血増悪抑制剤。
- [請求項16] 口腔細菌の C B P を含む、組織におけるコラーゲン露出部位の検出剤。
- [請求項17] 口腔細菌の C B P を含む、コラーゲン露出部位への物質送達用担体。
- [請求項18] 口腔細菌の C B P および止血剤を含む、出血治療剤。
- [請求項19] コラーゲンに対する血小板の感受性が低い対象のための、請求項 18 に記載の出血治療剤。
- [請求項20] 口腔細菌除去剤を含む、出血増悪予防剤。

[図1]

## 図1. 分析の流れ

分析1: *S. mutans* (ミュータンスレンサ球菌) 培養法  
 分析2: *S. mutans* (ミュータンスレンサ球菌) 検出法  
 分析3: PA 欠失 *S. mutans* 検出法  
 分析4: CBP 保有 *S. mutans* 検出法



( )内は分析に要する時間を示す

[図2]

## 図2 分析手順

分析1: *S. mutans* (ミュータンス  
レンサ球菌) 培養法

(操作時間約5分, 待ち時間約2日)

唾液採取

専用培地 A (寒天培地)  
への播種・菌の培養  
(操作時間約2分)  
(培養時間約2日)

専用培地 B  
(液体培地)  
への菌のコロニー  
ピックアップ  
(操作時間約3分)

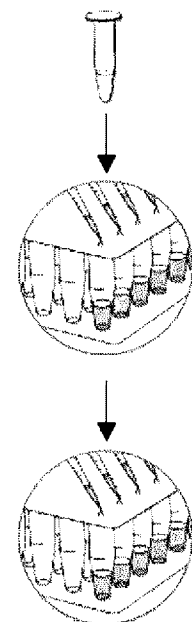
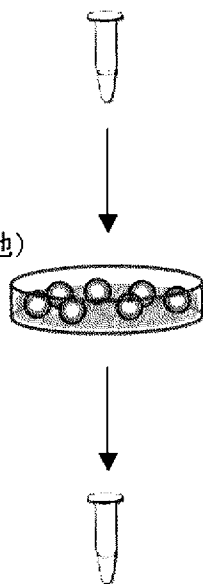
分析2: *S. mutans* (ミュータンス  
レンサ球菌) 検出法

(操作時間約15分, 待ち時間約3時間)

コロニーピックアップ  
・培養

専用培地 C に  
菌液を添加  
(操作時間約5分)  
(待ち時間約3時間)

Buffer1 を添加  
(染色)  
(操作時間約10分)



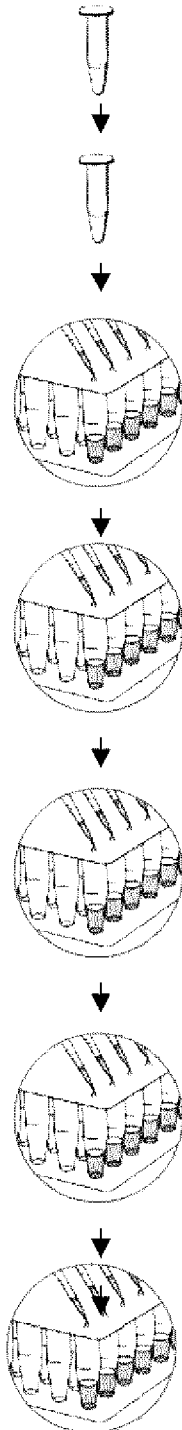


[図3]

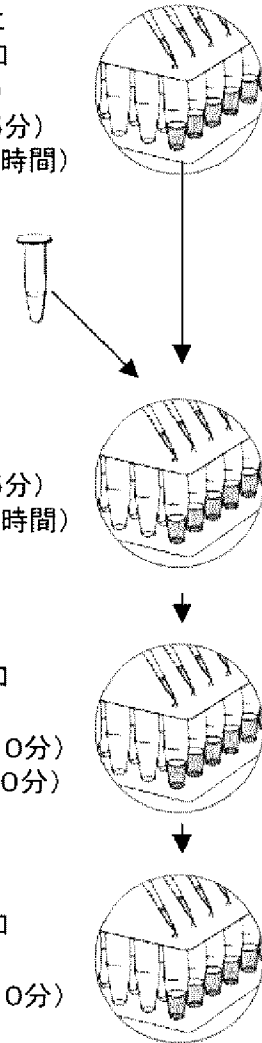
図 3

分析3: PA 欠失 *S. mutans* 検出法

(操作時間約30分, 待ち時間約11時間30分)

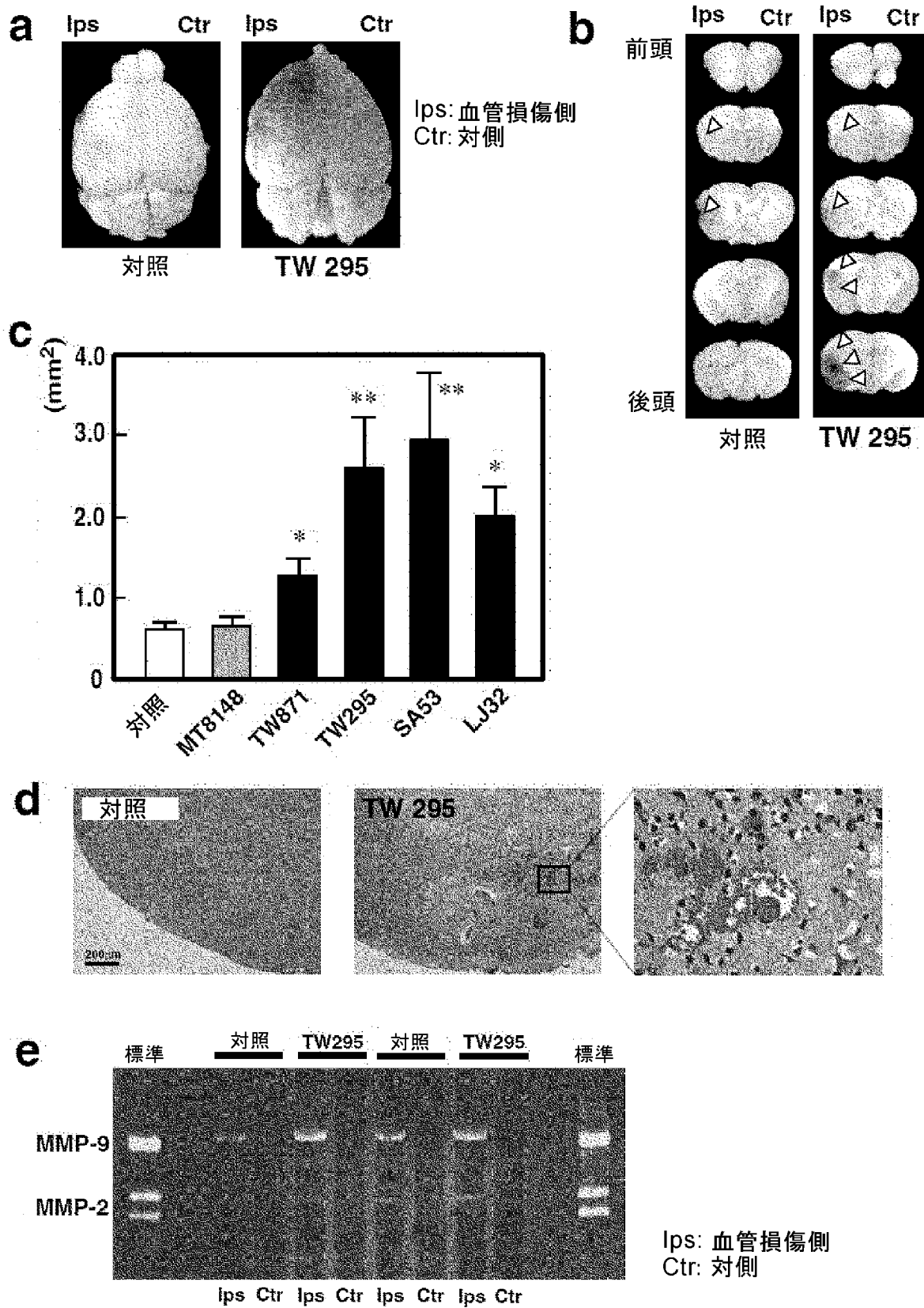
コロニーピックアップ  
・培養Buffer3 を添加し  
サンプル調整  
(操作時間約5分)  
(待ち時間約10分)専用プレートに  
サンプル添加  
(操作時間約5分)  
(待ち時間約8時間)Buffer4 添加  
(スキムミルク)  
(操作時間約5分)  
(待ち時間約1時間)Buffer5 添加  
(一次抗体)  
(操作時間約5分)  
(待ち時間約1時間)Buffer6 添加  
(二次抗体)  
(操作時間約5分)  
(待ち時間約1時間)Buffer7 添加  
(発色)  
(操作時間約5分)  
(待ち時間約20分)分析4: CBP 保有 *S. mutans* 検出法

(操作時間約30分, 待ち時間約3時間30分)

専用培地 D に  
Buffer8 を添加  
(ブロッキング)  
(操作時間約5分)  
(待ち時間約1時間)コロニーピック  
アップ・培養菌液添加  
(操作時間約5分)  
(待ち時間約2時間)Buffer9 を添加  
(固定)  
(操作時間約10分)  
(待ち時間約30分)Buffer1 を添加  
(染色)  
(操作時間約10分)

[圖4]

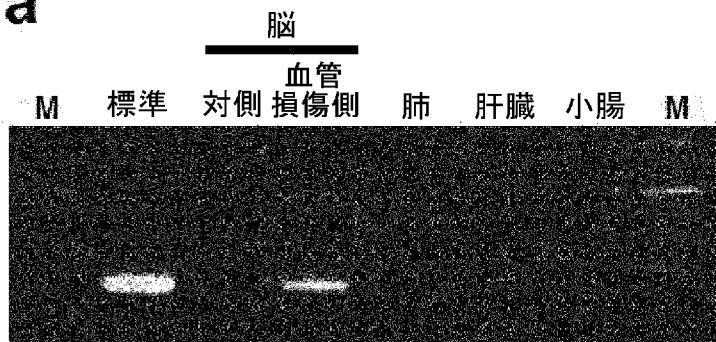
圖 4



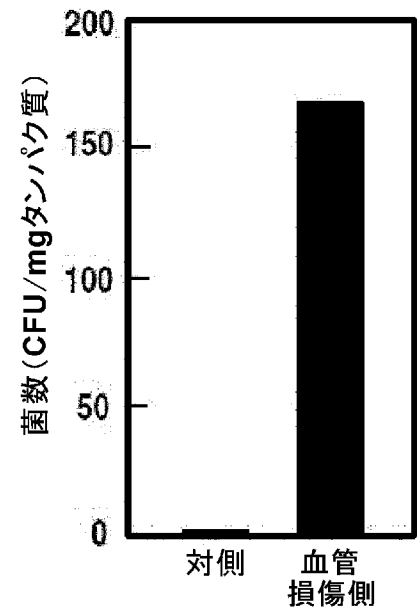
[図5]

図5

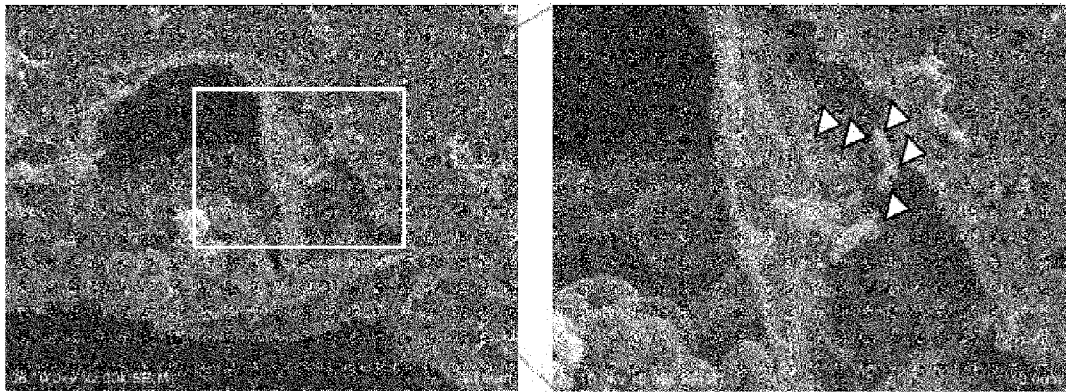
a



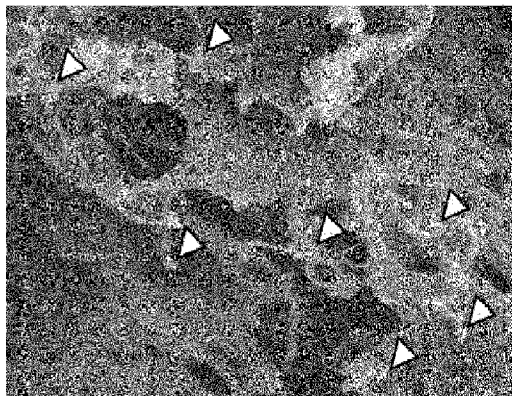
b



c

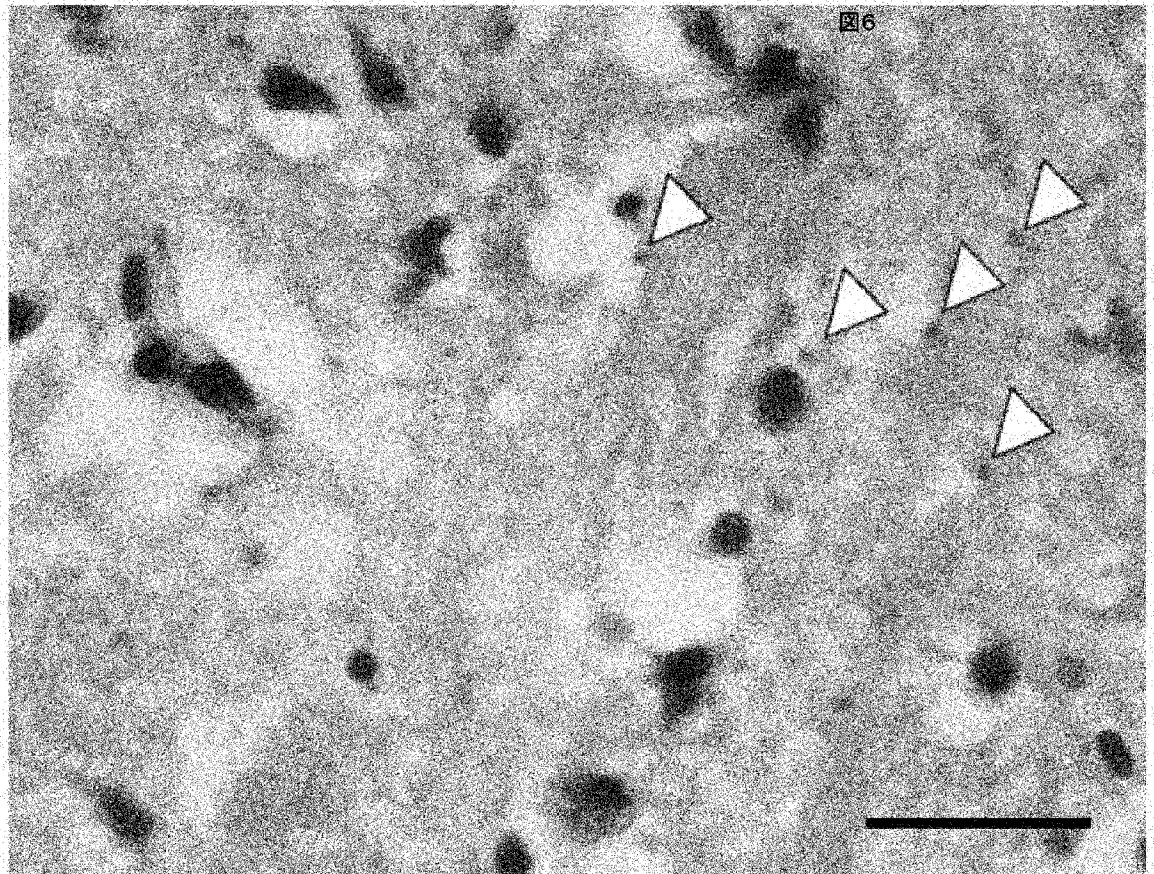


d



[図6]

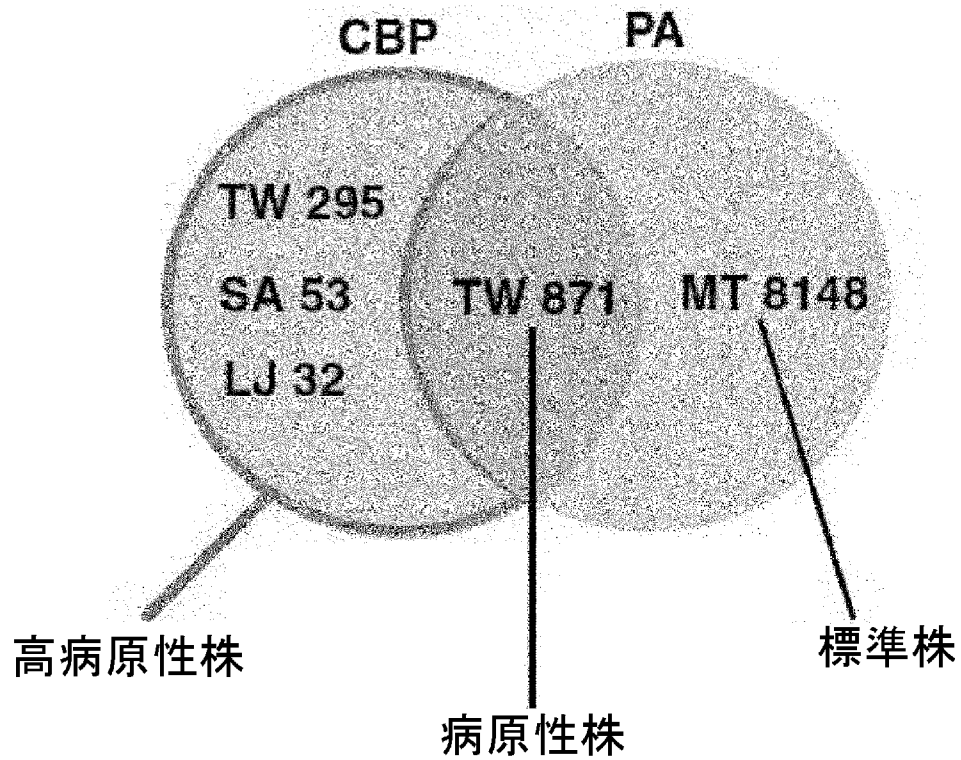
図6



[図7]

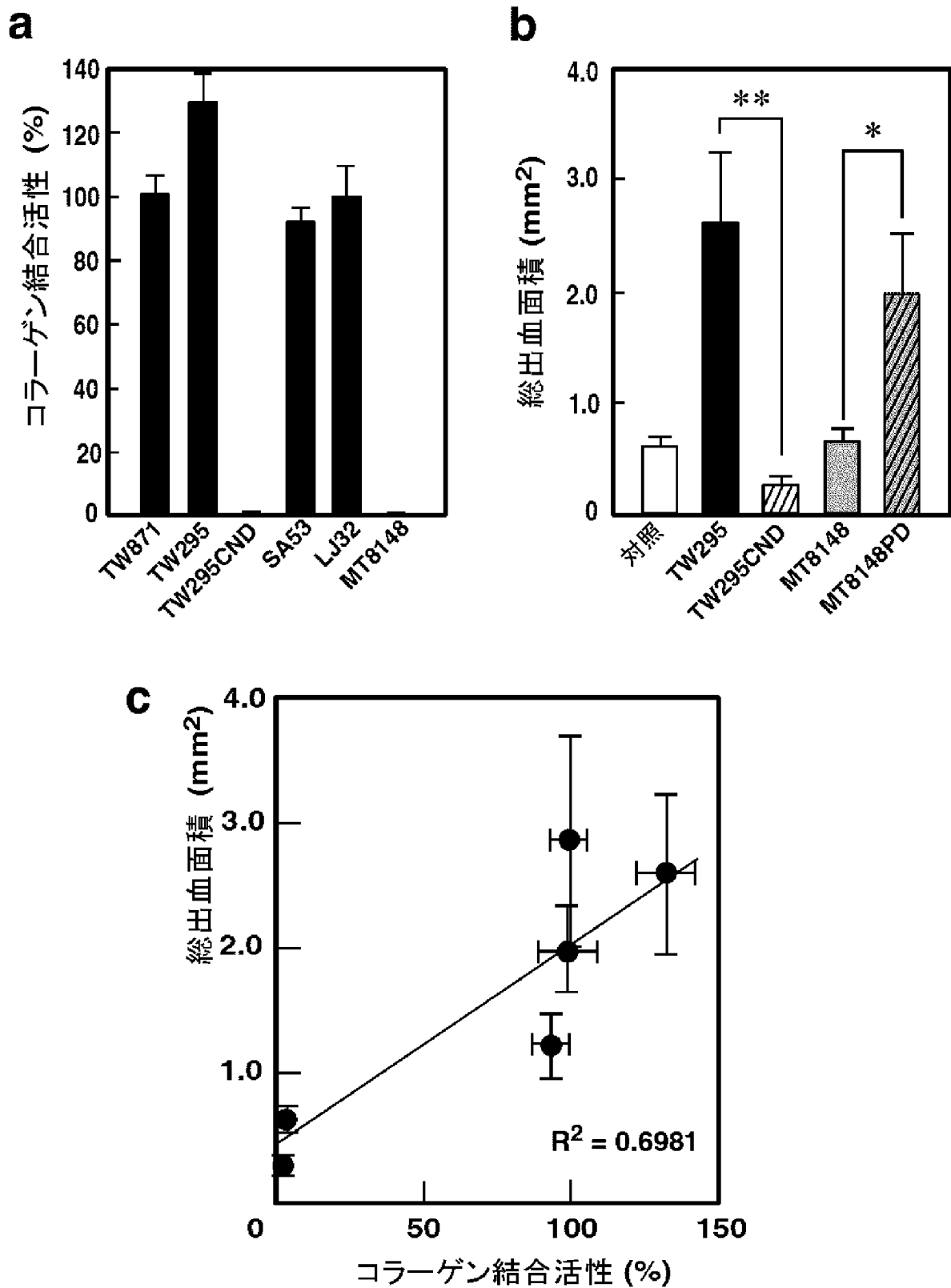
図7

株	CBP	PA
MT 8148	—	+
TW 871	+	+
TW 295	+	—
SA 53	+	—
LJ 32	+	—



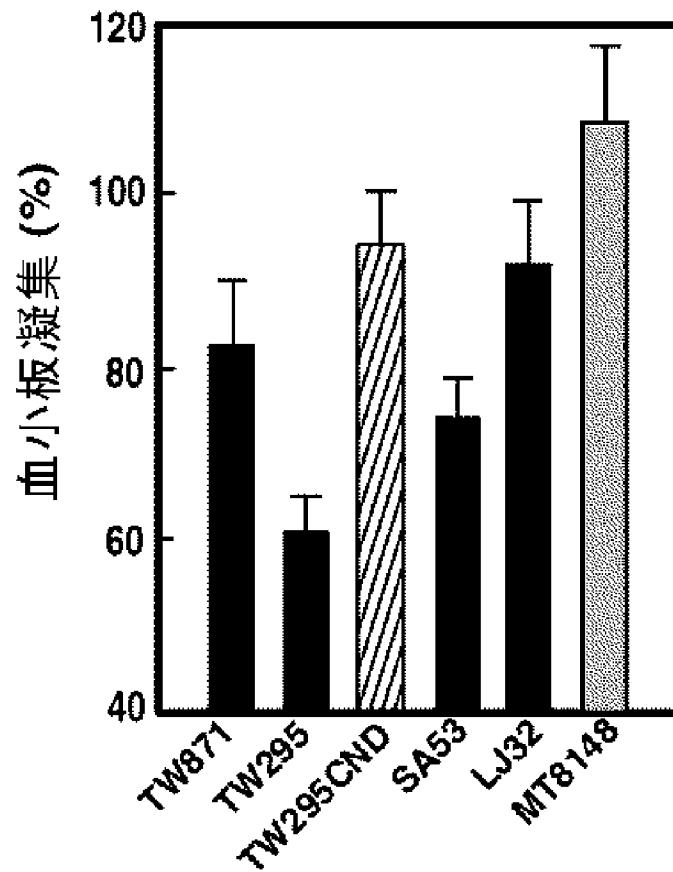
[図8]

図8

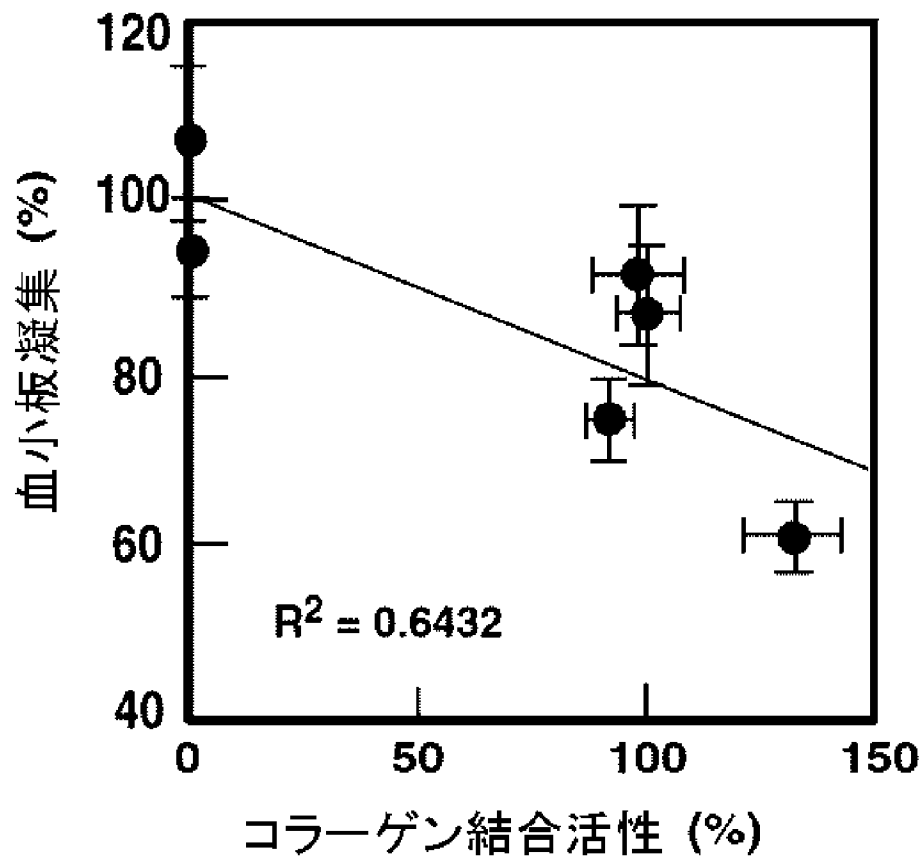


[図9]

図9 a

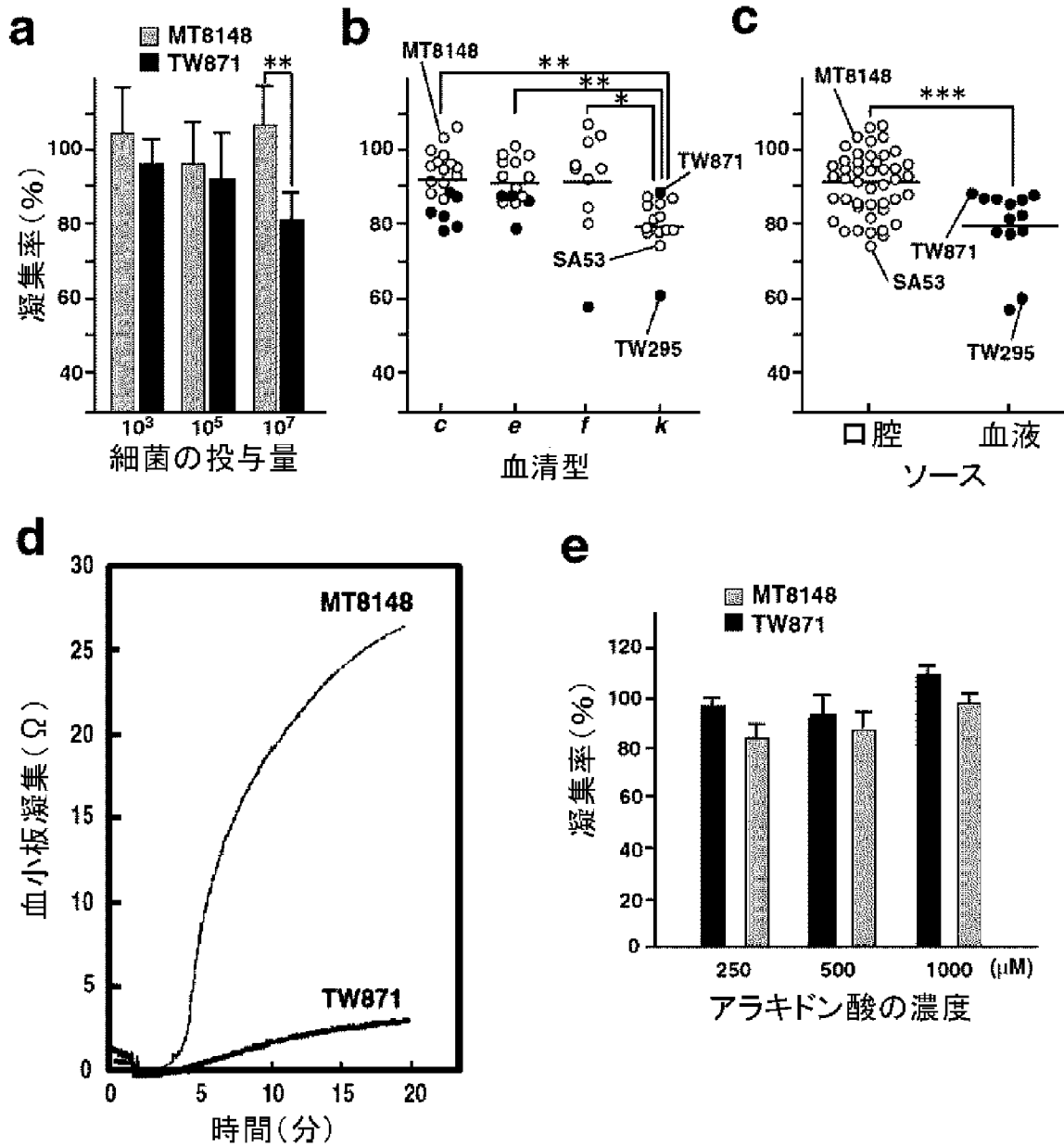


b



[図10]

図10





[図11]

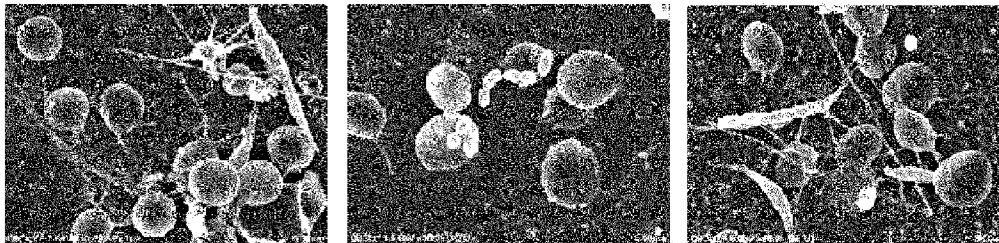
図11

a

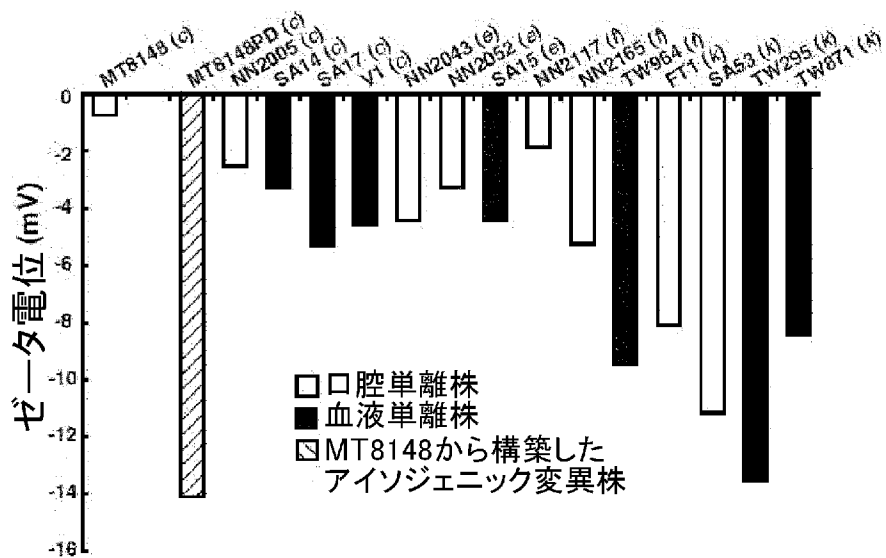
ビヒクル

TW 295

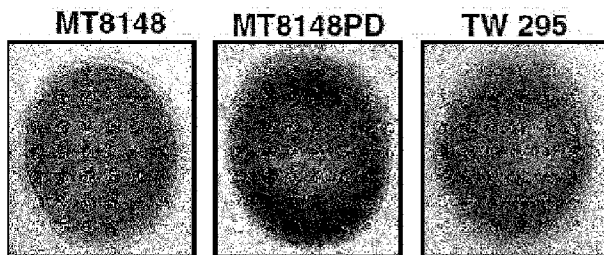
MT8148



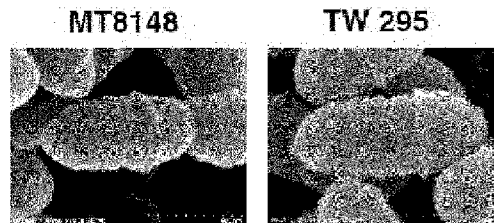
b



c

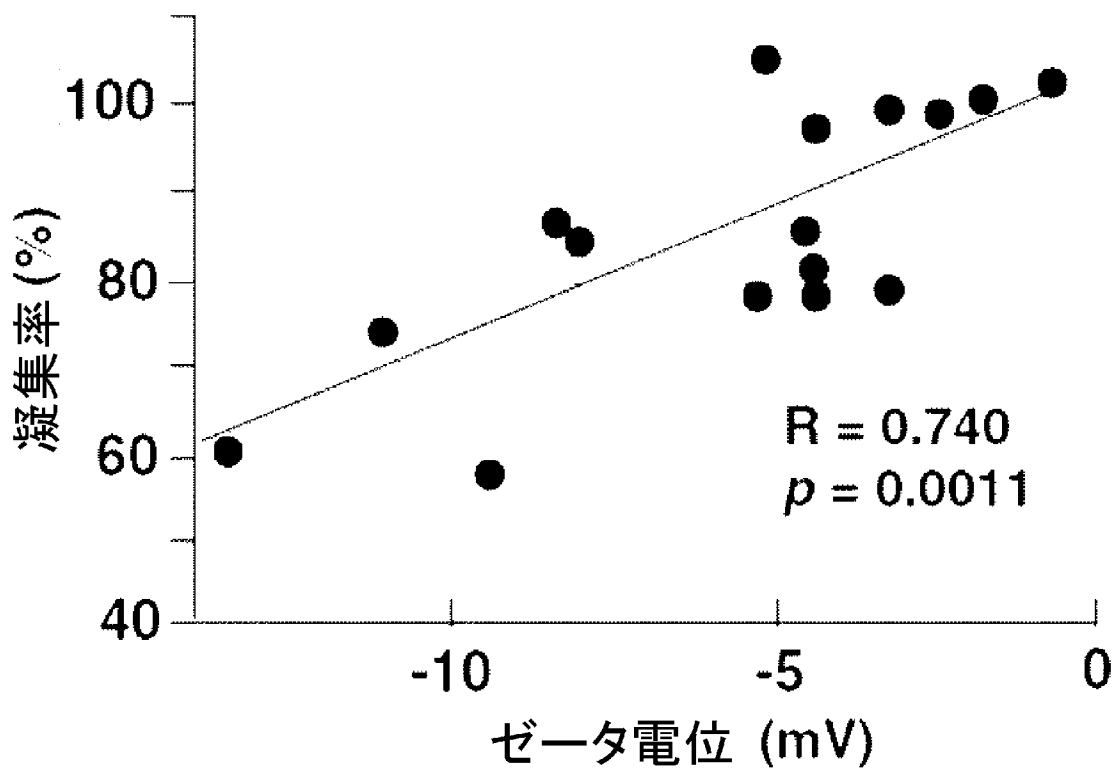


d



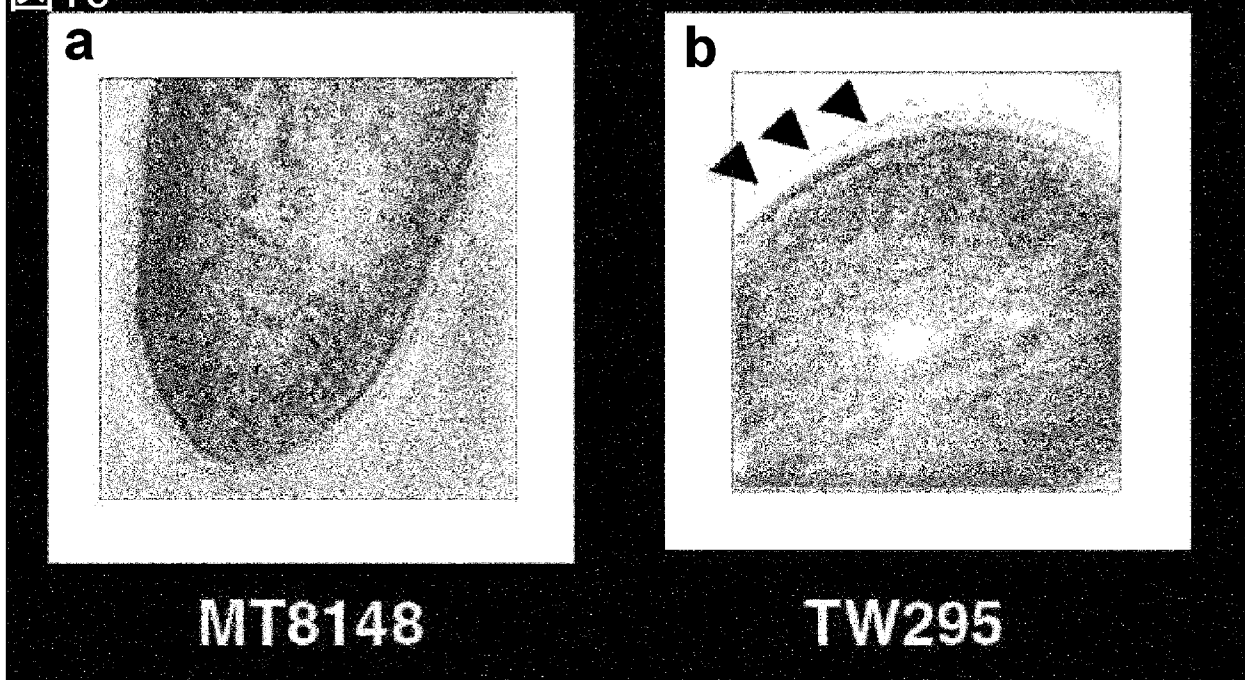
[図12]

図12



[図13]

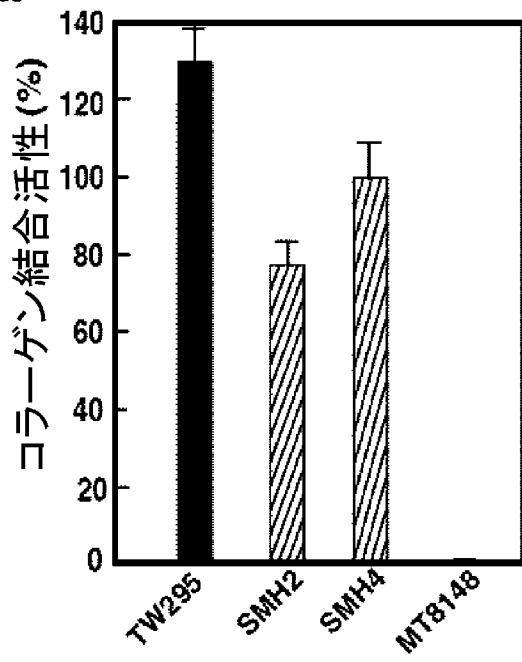
図13



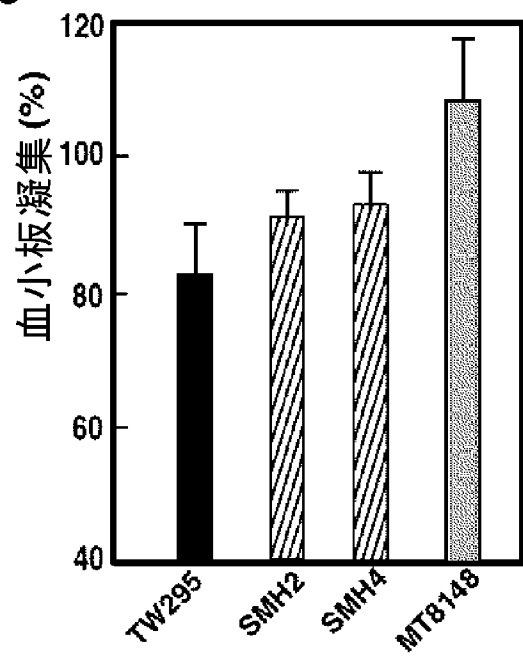
[図14]

図14

a



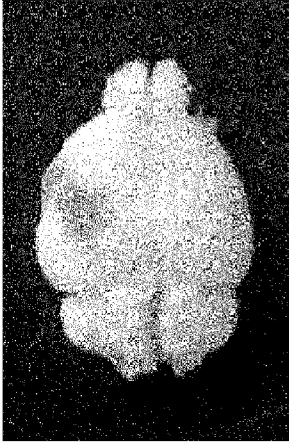
b



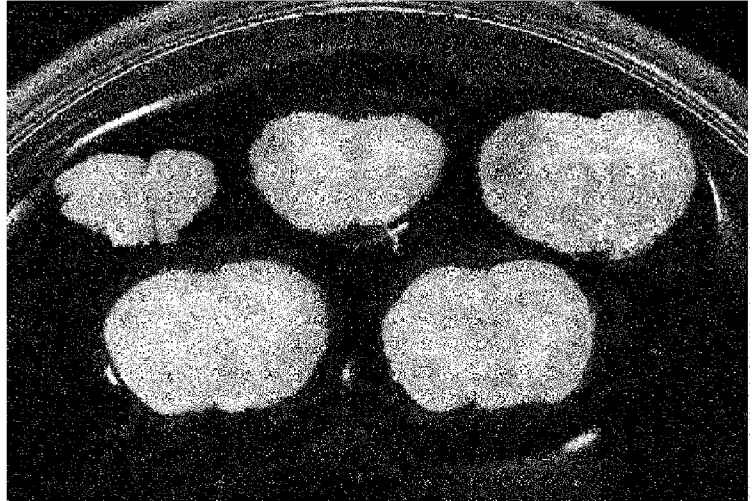
[図15]

図15

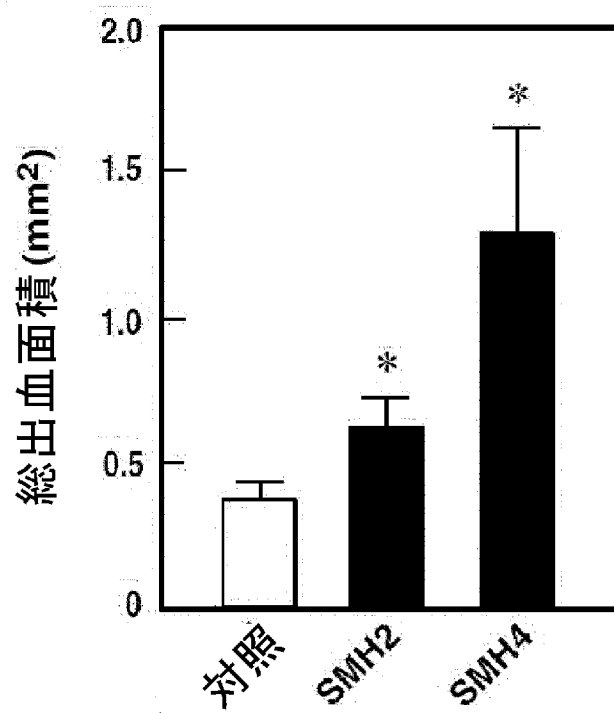
a



b

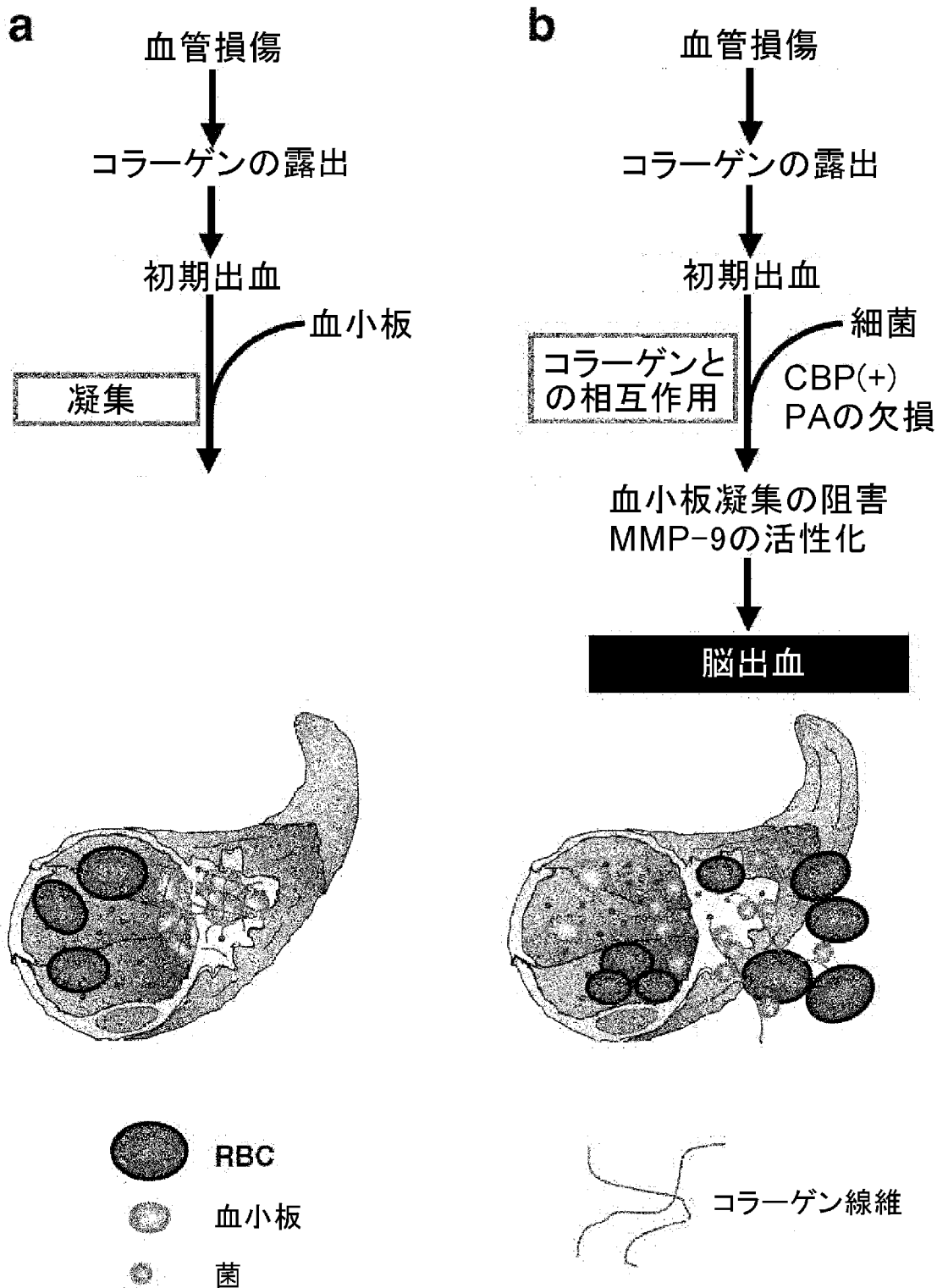


c



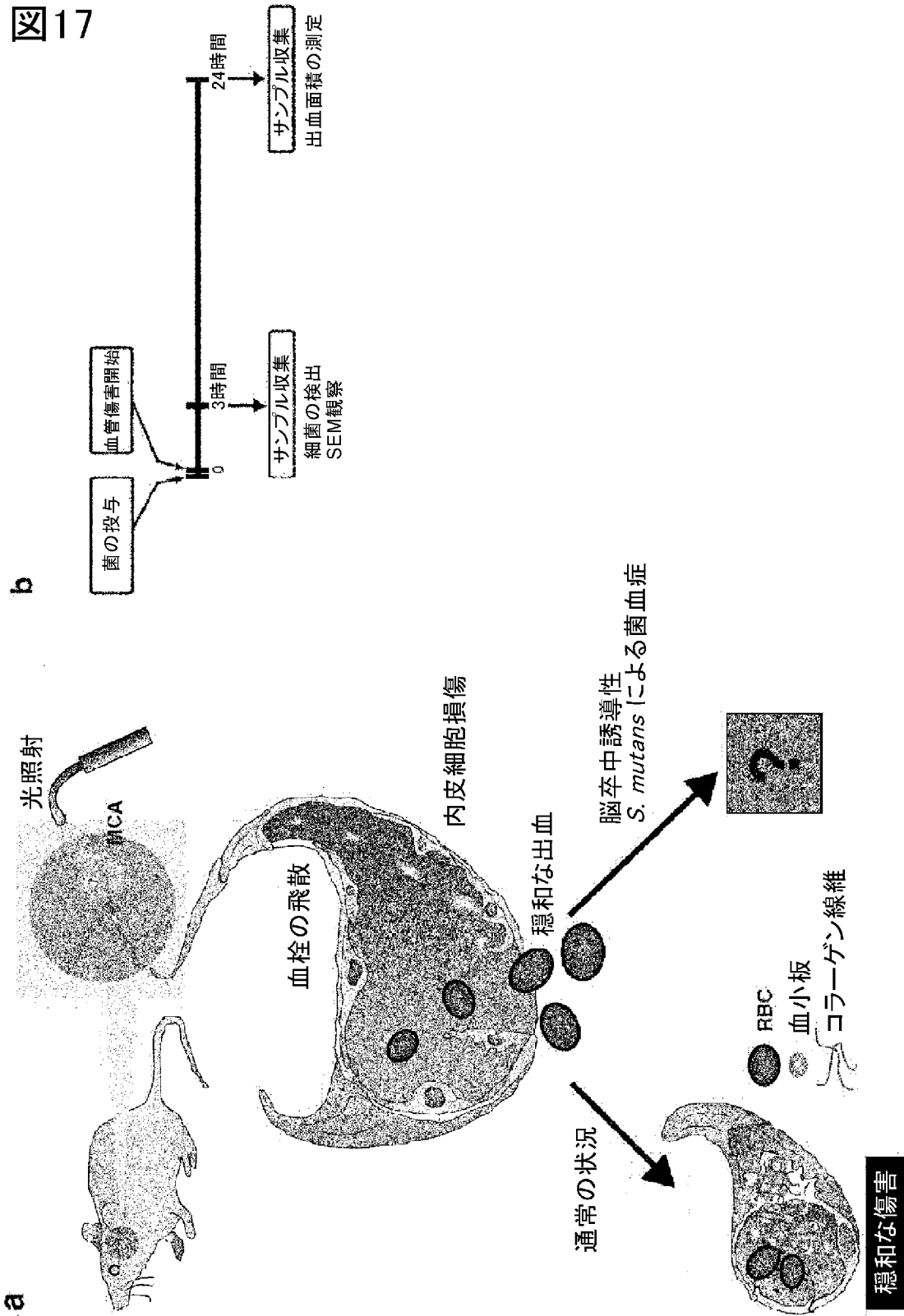
[図16]

図16



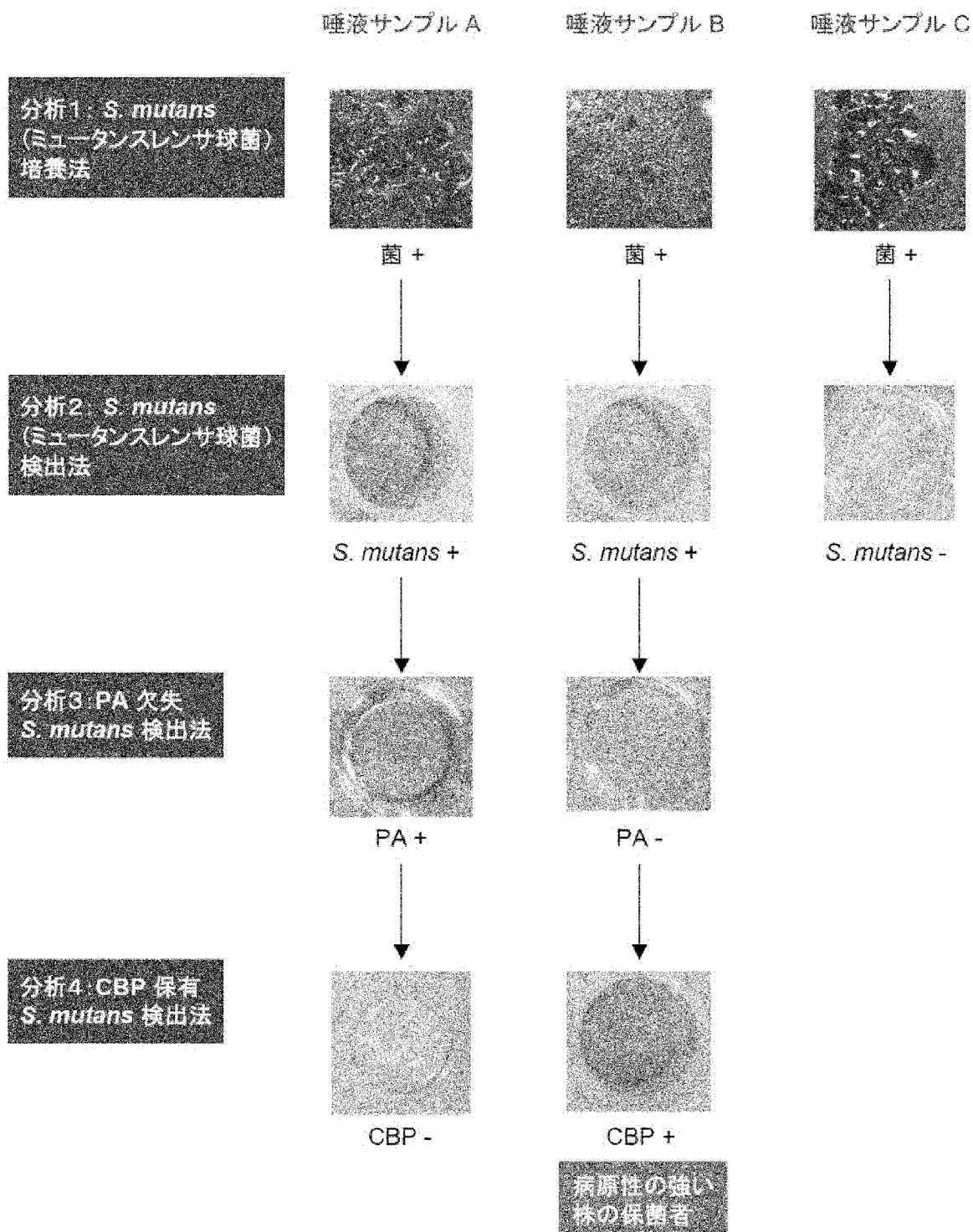
[図17]

図17

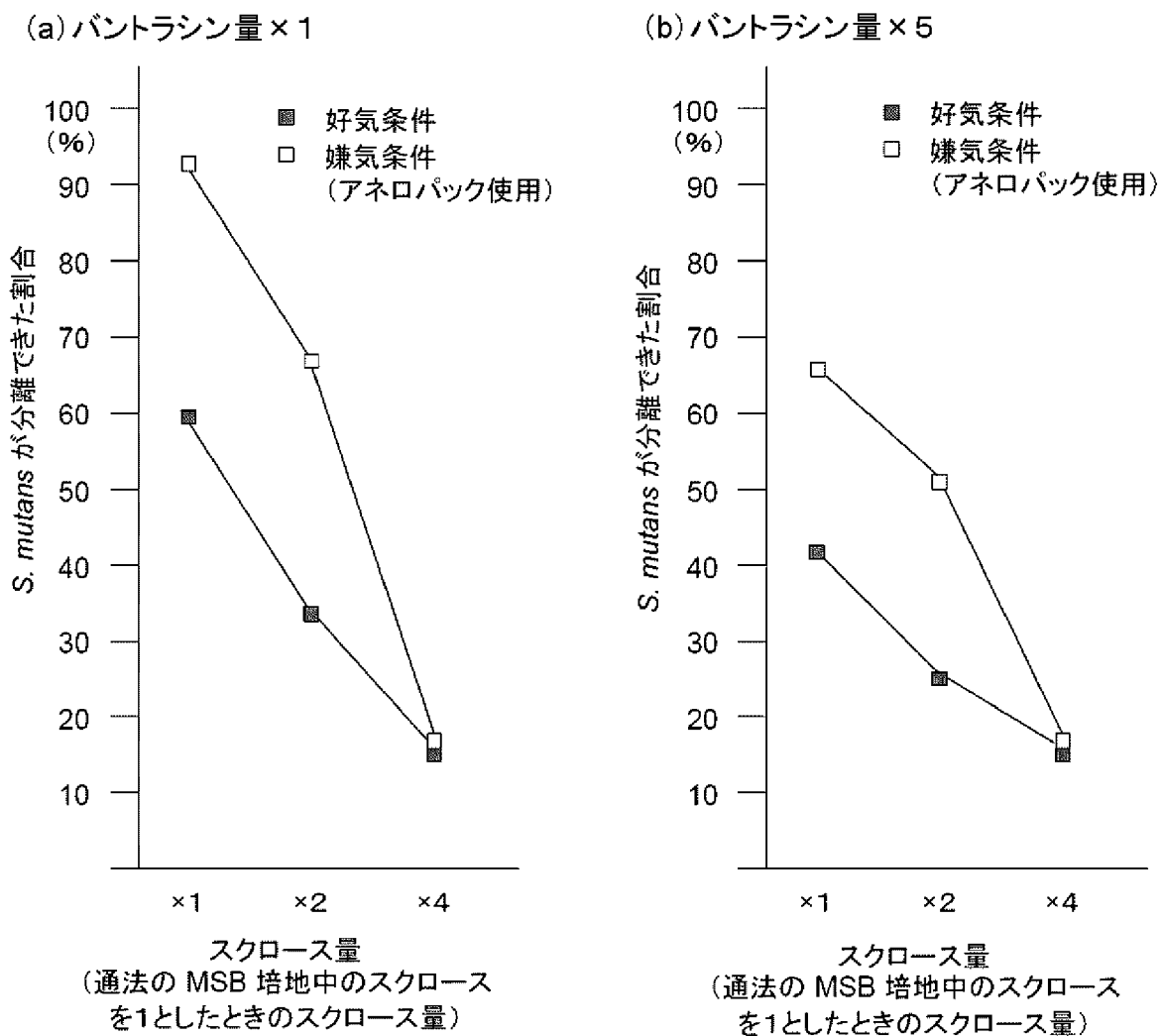


[図18]

図18. 分析結果の例



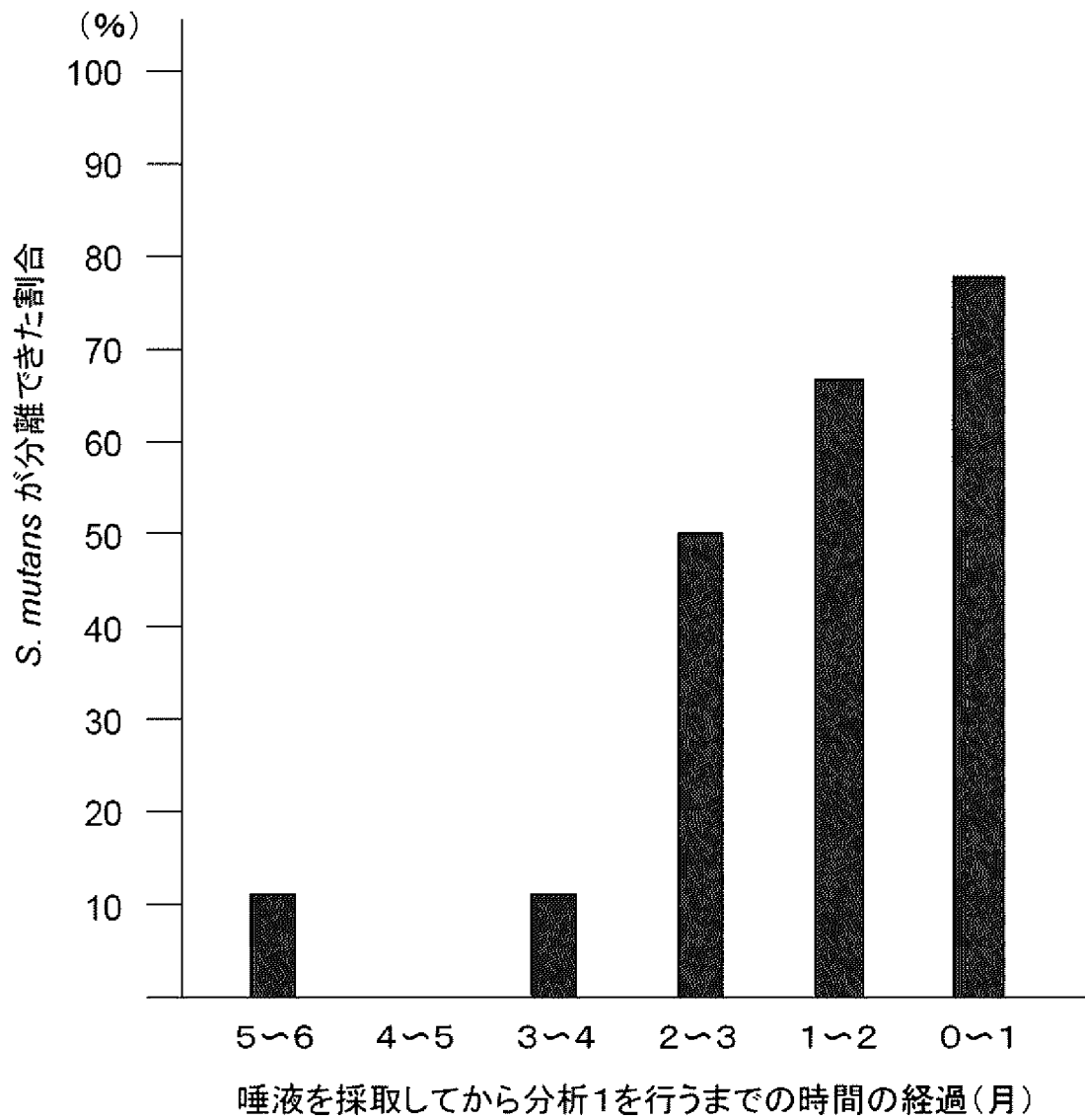
[図19]

図19. 分析1における *S. mutans* 培養の至適条件の検討



[図20]

図20. 唾液サンプルの保存可能期間の検討



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/054364

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/14(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P7/02(2006.01)i, A61P7/04(2006.01)i, C07K16/12(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/14, A61K31/7088, A61K38/00, A61K45/00, A61P7/02, A61P7/04, C07K16/12, G01N33/569, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, Y	Naho TANIGUCHI et al., "Mouse No Shukketsu Model ni Okeru Streptococcus mutans no Byogensei no Kento", The Japanese Journal of Pedodontics, 15 April 2009 (15.04.2009), vol.47, no.2, page 392, entire text	1-9 10, 12-15, 18-20
X Y	NAKANO K, et al., Protein Antigen in Serotype k Streptococcus mutans Clinical Isolates, J Dent Res, 2008, Vol.87, No.10, p.964-968, particularly, ABSTRACT, RESULTS, Molecular Characterization of Genes Encoding PA	11 1-10, 12-14, 20
X Y	NAKANO K. et al., Streptococcus mutans Clonal Variation Revealed by Multilocus Sequence Typing, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2007, Vol.45, No.8, p.2616-2625, particularly, page 2624, left column, lines 21 to 27	16, 17 1-10, 12, 15, 18-20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 April, 2010 (14.04.10)

Date of mailing of the international search report  
27 April, 2010 (27.04.10)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/054364

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	Kazuya HOKAMURA et al., "Kokunai Saikin S. mutans wa No Shukketsu o Zoo saseru", Dai 21 Kai The Japanese Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism Sokai Program · Shorokugo, 01 October 2009 (01.10.2009), vol.21, no.1, page 120, 0-32, entire text	1-20
P,Y	NAKANO K. et al., Molecular characterization of Streptococcus mutans strains containing the cnm gene encoding a collagen-binding adhesin, ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY, 2010.01, Vol.55, p.34-39, particularly, ABSTRACT, 3.Results	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/14(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P7/02(2006.01)i, A61P7/04(2006.01)i, C07K16/12(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/14, A61K31/7088, A61K38/00, A61K45/00, A61P7/02, A61P7/04, C07K16/12, G01N33/569, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X - P, Y	谷口奈穂、他、マウス脳出血モデルにおける <i>Streptococcus mutans</i> の病原性の検討, 小児歯科学雑誌, 2009.04.15, Vol.47, No.2, p.392, 全文参照	1-9 - 10, 12-15, 18-20
X - Y	NAKANO K, et al., Protein Antigen in Serotype k <i>Streptococcus mutans</i> Clinical Isolates, J Dent Res, 2008, Vol.87, No.10, p.964-968, 特に、ABSTRACT, RESULTS の Molecular Characterization of Genes Encoding PA	11 - 1-10, 12-14, 20

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.04.2010

国際調査報告の発送日

27.04.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 悠美子

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

4501

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X - Y	NAKANO K. et al., Streptococcus mutans Clonal Variation Revealed by Multilocus Sequence Typing, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2007, Vol. 45, No. 8, p. 2616-2625, 特に、第 2624 頁左欄第 21-27 行	16, 17 - 1-10, 12, 15, 18-20
P, Y	外村和也、他、口腔内細菌、S. mutans は脳出血を増悪させる, 第 21 回日本脳循環代謝学会総会プログラム・抄録号, 2009. 10. 01, Vol. 21, No. 1, p. 120, 0-32, 全文参照	1-20
P, Y	NAKANO K. et al., Molecular characterization of Streptococcus mutans strains containing the cnm gene encoding a collagen-binding adhesin, ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY, 2010. 01, Vol. 55, p. 34-39, 特に、ABSTRACT, 3. Results	1-20