

P-045

造血幹細胞移植患者の口腔内より分離した細菌叢の継時的変化

Sequential change of bacterial flora isolated from oral cavity of hematopoietic stem cell transplant patients

○高島由紀子, 吉田衣里, 平野慶子, 角田陽子, 仲野道代

Yukiko Takashima, Eri Yoshida, Keiko Hirano, Yoko Tsunoda, Michiyo Matsumoto-Nakano

(岡山大・医歯薬・小児歯)

Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】

血液がんの治療のため造血幹細胞移植を受ける患者では、移植に際し抗がん剤や抗生物質等、様々な薬剤が投与されており、この移植前後に重度の歯肉炎が発生することが多く認められる。これは、移植前の免疫抑制剤投与による好中球が減少するため、からだの抵抗力が減弱することに起因すると考えられている。歯肉炎は、小児に認められる歯周組織疾患のうち最も多いものであり、原因としては口腔内のプラーク中の細菌が関連していると考えられているが、齶蝕と比較して発症頻度は低い。このことから、造血幹細胞移植を受ける患者では、口腔内の細菌叢の変化が起こり、歯肉炎の発症に関与している可能性が高い。本研究では、移植前後での口腔内細菌叢の継時的変化について調べることで歯肉炎発症との関連について検討したので、これを報告する。

【対象と方法】

本研究は、岡山大学生命倫理審査委員会の承認を受け行った。保護者の同意が得られた9名の患児(6.5歳~17.0歳)の口腔内診査を行った後、唾液を採取した。採取した唾液より通法を用いて染色体DNAを抽出し、それらをテンプレートとし、6種類の口腔レンサ球菌と10種類の歯周病原細菌の存在を Polymerase-Chain Reaction (PCR) 法を用いて行った。また、採取した唾液を各菌の選択培地に播種し、得られたコロニー数の比較を行った。

【結果】

PCR法による細菌種同定を行った結果、口腔レンサ球菌は全てのサンプルにおいて認められたが、*Streptococcus mutans* は一部の症例からのみ検出された。移植前後で最もよく検出されたのは *Streptococcus oralis*、その次に *Streptococcus*

salivarius が検出された。検出される口腔レンサ球菌の種類は、移植後のほうが移植前よりも減少していることが明らかとなった。DMF指数が高いサンプルからは *S. mutans* と *Streptococcus sobrinus* が検出された。歯周病原細菌においては、移植後に最も検出されたものは、*Capnocytophaga ochracea* であり、続いて *Capnocytophaga sputigena* だった。コロニー数の比較では、口腔レンサ球菌数は、3サンプルにおいて移植前と比較して移植後1か月で増加し、他の6サンプルでは移植後に減少していることが明らかとなった。一方で、ミュータンスレンサ球菌の検出頻度を確認すると、移植前や移植後1か月で検出頻度が高い症例では、移植後3か月では検出頻度が下がった。乳酸桿菌の検出頻度を確認すると、5症例を除いた症例において移植後1か月で乳酸桿菌の検出が認められた。

【考察】

通常、小児で歯周病原細菌が検出されることは稀であることから全身状態により、口腔内の細菌叢が変化することで、歯周病原細菌の増加が起きていると考えられる。このような歯周病原細菌の存在は、歯肉炎の進行にとって重要な因子であると考えられる。そのため、継続的な口腔内の清掃等の歯科的管理を行い、歯周病原細菌の増加を防ぐことが、移植を受ける小児において特に重要であると考えられる。今後は、口腔内全体の総菌数に対してミュータンスレンサ球菌や乳酸桿菌の検出頻度がどのような状態であるかも同時に調べていく予定である。また、症例によってこれまでの治療内容が異なるため、歯周炎発症との関連について検討する予定である。

P-138

歯周病菌 *Porphyromonas gulae* 線毛遺伝子多型とヒト歯肉上皮細胞への付着・侵入能の解析
 Adhesion and invasion of gingival epithelial cells by *Porphyromonas gulae* with different types of fimbriae

○吉田 翔, 稲葉裕明*, 野村良太**, 仲野和彦**, 仲野道代*

Sho Yoshida, Hiroaki Inaba*, Ryota Nomura**, Kazuhiko Nakano**, Michiyo Nakano*

(岡大病院・小児歯, *岡大・医歯薬・小児歯, **阪大・歯・小児歯)

Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. hospital, *Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ.,

**Dept. of Pediatric Dent., Osaka Univ. Grad. Sch. of Dent.

【目的】

動物由来歯周病菌 *Porphyromonas gulae* は、*Porphyromonas* 属の新種として、ヒト以外の動物から分離された¹⁾。*P. gulae* はヒト由来歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* と同様に線毛を有しており、本菌の様々な病原性の発揮に関与していると考えられている。我々はこれまで、フィブリリタンパク (FimA) をコードする *fimA* 遺伝子の塩基配列の違いに基づき3つの遺伝子多型 (A/B/C型) に分類し、C型 *fimA* 保有 *P. gulae* 株の病原性と臨床的相関を報告した。しかしながら、*fimA* 型の相違と歯肉上皮細胞への付着侵入との関連については十分な検討が加えられていない。本研究では、*fimA* 遺伝子の異なる *P. gulae* の歯肉上皮細胞への付着侵入と *fimA* 遺伝子多型との関連を評価したので、これを報告する。

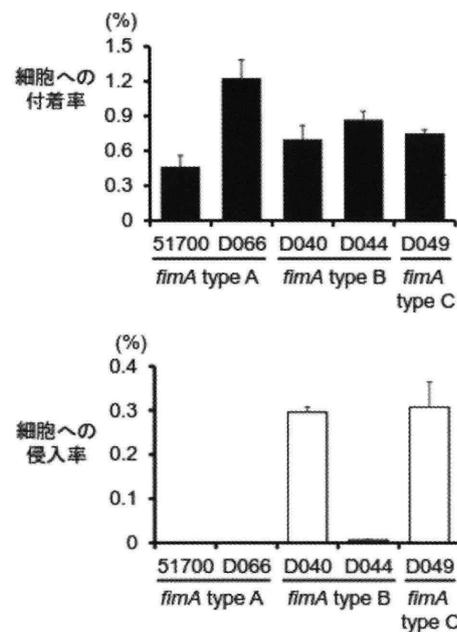
【方法】

fimA 遺伝子型の異なる *P. gulae* 5株、*P. gingivalis* 株2株を実験に供試した。ヒト歯肉上皮細胞 Ca9-22株への付着能ならびに侵入能を評価するため、ゲンタマイシン/アンピシリンプロテクションアッセイにより解析を行った。

【結果と考察】

歯肉上皮細胞 Ca9-22株に対する *P. gulae* 付着能は、A型 *fimA* 保有 D066株のみ高いものの、線毛遺伝子多型による差は認められなかった。一方、B型 *fimA* 保有 D040株とC型 *fimA* 保有 D049株は同程度の侵入が認められ、A型ならびに他のB型保有株と比較して、高い侵入効率を示した。さらに、D049株は歯周病の進行と強い相関を持つ、II型線毛保有株 *P. gingivalis* より高い細胞付着能を持ち、同程度の侵入効率が認められた (図1)。

本研究結果より、C型線毛保有 *P. gulae* 株が持つ歯肉上皮細胞への高い細胞侵入能は、歯周炎発症ならびに進行に関与していることが示唆された。*P. gulae* が細胞内へ侵入することで、食食や殺菌から逃れ、歯周病の慢性化を引き起こす可能性が示唆された。



<図1> *P. gingivalis* と *P. gulae* による付着侵入能の比較

【文献】

- 1) Fournier D, et al. *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, gram-negative cocco-bacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. Int J Syst Evol Microbiol. 51:1179-1189, 2001.

P-027

小児口腔より分離されたラクトバシラスが *Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成に与える影響

Effects of Lactobacillus strains isolated from children on biofilm formation by *Streptococcus mutans*

○ 森本節代, 高島由紀子, 仲野道代

○ Setsuyo Morimoto, Yukiko Takashima, Michiyo Matsumoto-Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯)

Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】

Streptococcus mutans は齲蝕の主要な病原性細菌であり、その齲蝕原性の代表的なものとしてグルコシルトランスフェラーゼおよびグルカン結合タンパクによるバイオフィーム形成が挙げられる。一方、齲蝕の発症および進行にラクトバシラスが関連しており、*S. mutans* と混合するとその齲蝕原性能が高まることが報告されている。今回我々は小児口腔の健全部位および齲蝕部位よりラクトバシラスを分離し、*S. mutans* の齲蝕原性能およびバイオフィーム形成に与える影響について検討を加えたので、これを報告する。

【対象と方法】

本研究は、岡山大学医歯薬学総合研究科の倫理委員会の承認のもと、岡山大学病院小児歯科を受診された患児の口腔内の齲蝕部位および健全部位よりブラークを採取し、ラクトバシラスの分離および菌種の同定を行った。これらのラクトバシラスを用いて、スクロース依存性平滑面付着能およびバイオフィーム形成能の測定を行った。またラクトバシラスが *S. mutans* MT8148 に及ぼす影響を検討するため 2-コンパートメントシステムを用いてセルカルチャーインサート内の液体培地にラクトバシラスを播種し、コンパニオンプレート内の *S. mutans* と同時に培養した。培養後の *S. mutans* バイオフィームの構造を共焦点レーザー顕微鏡にて観察するとともに、バイオフィームの全 RNA を抽出しグルコシルトランスフェラーゼおよびグルカン結合タンパクをコードする遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法にて解析した。

【結果】

齲蝕部位から採取した全てのブラークからラクトバシラスが分離されたが、健全部位からは 30% の検出率であった。齲蝕部位からは、*Lactobacillus*

salivarius が最も多く検出された。分離された菌を用いて行ったスクロース依存性平滑面付着では、*Lactobacillus brevis* において最も高く、*Lactobacillus fermentum* と *L. salivarius* がそれに続いた。バイオフィーム形成も *L. brevis* において最も高く、*L. salivarius* および *Lactobacillus plantarum* がそれに続いた。一方、ラクトバシラスと MT8148 を同時に培養した実験において、*L. salivarius* と MT8148 を同時に培養した時、MT8148 単独の場合と比較して有意にバイオフィーム形成量が増加した。またスクロース依存性付着能は *L. salivarius* および *L. plantarum* と MT8148 を同時に培養した時、MT8148 単独の場合と比較して有意に付着率が増加した。リアルタイム PCR 法の結果、MT8148 単独の場合と比較して、*L. plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis*, および *L. brevis* が共存した場合 *gtfB* の発現が増加した。また、*L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. brevis* および *L. salivarius* が共存した場合 *gbpC* の発現が増加した。共焦点レーザー顕微鏡におけるバイオフィーム構造観察の結果、バイオフィームの厚さは *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. salivarius* において、MT8148 単独の場合と比較して高かった。また、バイオフィームの密度は *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. brevis* において MT8148 株単独の場合と比較して高かった。

【考察】

ラクトバシラスは齲蝕の発症および進行に深く関与している可能性が示唆された。さらに、*L. rhamnosus*, *L. brevis* では *gbpC* および *gtfB* の発現の双方が増強されたため、*S. mutans* の齲蝕原性への関与も示唆された。

Streptococcus mutans における分子シャペロン DnaK の役割
Role of molecular chaperon DnaK by *Streptococcus mutans*

○吉田衣里, 松三友紀, 高島由紀子, 仲野道代

Eri Yoshida, Yuki Matsumi, Yukiko Takashima, Michiyo Matsumoto-Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯)

Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】

口腔内の様々なストレス下で菌が生存し続けるためには、ストレス応答タンパクが大きく関与している。そのうちのひとつである分子シャペロン DnaK は、齶蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* において新たなタンパクの生成や変化を誘発するために重要な役割を担っており、*S. mutans* の特性の一つである耐酸性に関連することが報告されている。今回我々は、このストレス応答タンパクである分子シャペロン DnaK のストレス応答機能について検討を行ったので報告する。

【対象と方法】

1. 供試菌: 日本人小児由来の *S. mutans* MT8148 株 (血清型 c) を実験に用いた。
2. *dnaK* 変異株の作製: スペクチノマイシン耐性遺伝子をもつシャトルベクター pDL278 を、制限酵素 *Bam*H I および *Hind*III で消化し、DnaK をコードする遺伝子 *dnaK* のセンス鎖とアンチセンス鎖を挿入したプラスミドを作製した。これを MT8148 株に形質転換することにより、*dnaK* 過剰発現変異株 (DnaK-o) および *dnaK* 発現抑制変異株 (DnaK-s) を作製し、実験に供試した。
3. 増殖能: 供試菌を Todd Hewitt (TH) 液体培地にて 37°C で培養後、pH5.5 および 7.0 に調整した TH 液体培地、0.5% 塩化ナトリウムを添加した TH 液体培地にそれぞれ播種し、波長 600nm の吸光度を経時的に測定し、増殖能を比較した。
4. 耐酸性能: 供試菌を Yeast Extract 含有 Todd Hewitt (THYE) 液体培地にて培養後、菌液を新鮮な THYE 液体培地に播種し、波長 600 nm で濁度が 0.4~0.5 になるまで 37°C で培養した。培養後、3000 回転、4°C 下で 10 分遠心分離を行い、得られたペレットに、pH 5.0 に調整された THYE 液体培地 2 ml を加え、37°C で 2 時間振盪培養を行った。培養後、1 ml は段階希釈後、THYE 寒天培地

に播種し、37°C で 48 時間、嫌氣的に培養した。残りの 1 ml に、pH 3.5 に調整された THYE 液体培地 9 ml を加え、37°C で 3 時間振盪培養を行い、同様に THYE 寒天培地に播種し、37°C で 48 時間、嫌氣的に培養した。培養後、pH 5.0 の寒天培地上のコロニー数に対する pH 3.5 の寒天培地上のコロニー数の割合をその菌の耐酸性を示す指標として算出した。

【結果】

DnaK-s の増殖能は、親株 MT8148 と DnaK-o と比較して pH5.5 および pH7.0 ともに減少していた。また 0.5% 塩化ナトリウムを添加した場合、MT8148 株と DnaK-o 株と比較して DnaK-s の増殖能は低下した。MT8148 株と比較して DnaK-o 株において耐酸性能が上昇し、DnaK-s 株では耐酸性能は低下していた。

【考察】

以上の結果より、DnaK の発現を抑制させた変異株では、酸性・塩ストレス下での増殖能が親株と比較して減少し、耐酸性能も低下することが明らかとなったことから、DnaK はストレス応答に関与していることが示された。今後は、他のストレス因子に対する DnaK の発現状況を調べることにより、DnaK の機能をさらに検討する予定である。

マウス歯胚の歯根形成における遺伝子発現への抗がん剤の影響

Effect of anticancer drugs on genetic development in root formation of mouse tooth germ

○角田陽子, 大川玲奈*, 高島由紀子, 仲 周平, 仲野和彦*, 仲野道代

Yoko Tsunoda, Rena Okawa, Yukiko Takashima, Shuhei Naka, Kazuhiko Nakano,
Michiyo Matsumoto-Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯, *阪大・院・小児歯)

Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent. and Osaka Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】

乳幼児期に小児がんを発症し、治療を受けた患児では、永久歯胚の欠損および歯根あるいは歯冠の形態異常を起こすことが知られている。これらは、永久歯胚の形成期に抗がん剤やアルキル化剤の投与、さらに放射線照射を受けたことが原因であると考えられている。今回、我々は、マウスの歯胚を用いて歯の形成に対する抗がん剤の影響および歯の形成に関連する遺伝子の発現について検討したので報告する。

【対象と方法】

1. 器官培養：胎生 16 日齢 ICR マウスを抱水クロラルで全身麻酔後、腹部切開により胎児を取り出し、実体顕微鏡下で胎児マウスの下顎第一臼歯の歯胚を採取後、Trowell 変法で、0.5% アスコルビン酸および 0.5% ストレプトマイシンを添加した BGJb 培地を用いて 37°C、5% CO₂ 下にて培養を行った。培養 1 日目にシクロフォスファミドを各濃度で添加した。培養液の交換は隔日で行い、14 日あるいは 21 日間培養後、実験に供試した。
2. RNA 抽出：培養後の歯胚より、Acid-guanidinium-phenol-chloroform (AGPC) 法に基づいて、RNAgents® Kit を用いて全 RNA を抽出した。
3. RT-PCR 法：全 RNA から Super ScriptIII® Reverse Transcriptase、オリゴ (dt) プライマー、10mM dNTP および逆転写バッファーを用いて逆転写 (RT) 反応を行うことにより、cDNA を合成した。RT 反応は 65°C で 5 分のプレヒート、50°C で 60 分の伸展反応、および 70°C で 15 分インキュベーションによる反応停止の条件で行った。
4. Real-time qRT-PCR: 前述の方法を用いて作製した cDNA を鋳型として、SYBR green を用い

た Real-time qRT-PCR 法によって、Cytokeratin、Vimentin、Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT-1) の各タンパクをコードする遺伝子の発現状況を調べた。

5. 組織学的解析：下顎第一臼歯歯胚を中性ホルマリンにて浸漬固定し、エタノール上昇系列で脱水し、通法通りパラフィンに包埋した。この試料から 5 μm の薄切切片を作製し、シランコートスライドガラスに貼付した。その後、通法に従い、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) による病理組織学的検討を行った。

【結果】

HE 染色を行ったところ、シクロフォスファミド添加群では、低濃度で内エナメル上皮細胞の配列の乱れが認められた。また、濃度依存的に内エナメル上皮細胞の形態が変化し、外エナメル上皮細胞の配列の乱れも認められた。さらに高濃度の添加群では、エナメル質の形成量の低下が認められた。遺伝子発現の検討の結果、非添加群と比較して添加群では、DNA 合成を促進するタンパクとして知られている HPRT-1 の発現が低下する傾向が認められた。

【考察】

本研究の結果から、抗がん剤によるマウスの歯胚の形成への影響が明らかになり、ヒトにおいても、乳幼児期の抗がん剤の投与が歯冠の形成および歯根の形成に大きく関与している可能性が示唆された。しかしながら、本研究の条件下では、歯の形成に関連する遺伝子には明確な影響が認められなかったことから、実験条件の検討を行うとともに関連するその他の遺伝子の解析を行う予定である。