

P-011

感染性心内膜炎を発症した小児の血中から分離された口腔細菌に関する

分子生物学的解析

Molecular biological analysis on oral bacteria isolated from the blood of child with infective endocarditis

○仲 周平, 吉田衣里, 平野慶子, 高島由紀子, 仲野道代

Shuhei Naka, Eri Yoshida, Keiko Hirano, Yukiko Takashima,
Michiyo Matsumoto-Nakano(岡大・医歯薬・小児歯)
Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent

【目的】

感染性心内膜炎 (infective endocarditis; IE) は、心疾患有する患者の心内膜や弁膜表層への細菌感染により発症すると言われている。その感染経路の多くは不明とされているが、口腔レンサ球菌が検出されるため歯科処置が原因の一つとして考えられている。本研究では、IE 患者血液中より分離された口腔レンサ球菌と唾液から分離した菌が同一であるかを分析し、IE 発症との関連性について検討を行ったので報告する。

【患者情報】

2歳5か月の女児。無脾症、単心室症、肺動脈閉鎖、総肺静脈還流異常のため、岡山大学病院小児科通院加療中である。今回、IE 発症のため、血液培養細菌検査を行った結果、血液中より *Streptococcus oralis* が検出されたため、口腔内精査のため当科に紹介来院。口腔内診査を行ったところ、特に齲歯や処置歯などの所見は認められなかったが、口腔衛生状態の不良による歯肉炎症を認め、ブラッシングの際には出血が認められた。

【材料と方法】

患者および保護者の同意のもと血液培養液および口腔サンプルとして採取した唾液を *Mitis-salivarius* 寒天培地に播種し、37°Cで48時間培養後、菌の分離を行った。血液培養液中からは24株 (B1~B24株)、唾液中からは23株 (S1~S23株) を分離した。各分離株を Brain Heart Infusion 液体培地に37°Cで24時間培養した後、Puregene DNA Isolation Kits®によってDNAの抽出を行った。口腔レンサ球菌のハウスキーピング遺伝子である *gdh*, *sod* に対する特異的なプライマーを使用し、Polymerase-chain reaction (PCR) 法により目的遺伝子の増幅を行った。増幅された遺伝子は、電気泳動を行い、バンドのパターンによってレンサ球菌種の同定を行った。また、分離された菌が同一菌種であるかを調べるために、Random amplified

polymorphic DNA (RAPD) 法を用いて検討した。血液培養中および唾液中から分離され同一のフィンガープリントパターンを示した菌においては、抽出した細菌 DNA を使用し、16S ribosomal RNA (rRNA) を増幅する特異的なプライマーを用いて、Broad-range PCR 法を行った。さらに増幅した 16S rRNA の遺伝子配列により菌種を特定し 97% 上の相同性で同一属とし、99% 以上の相同性で同一種属とした。

【結果】

PCR 法を行った結果、血液培養液中から分離された菌は 24 株/24 株 (100%) が *Streptococcus mitis* と同定された。一方で、唾液中の分離された菌は、14 株/23 株 (60.1%) が、*S. oralis* と同定された。残りの 9 株はいずれのプライマーで陰性を示し、同定されなかつた。血液培養液中より分離され、*S. mitis* と同定された 24 株と唾液中から分離され *S. oralis* と同定された 14 株に対して、RAPD 法を行った結果、S7 株、S8 株、S21 株、S22 株が同一の遺伝子型を示す結果となつた。これら 4 株に関して、遺伝子配列の検索により同定を行った結果、S7、S8 株は *S. mitis*, *S. oralis* と配列が 100%一致した。一方で、B21、B22 株は *S. mitis* と配列が 100%一致した。

【考察】

本研究の結果、唾液からの分離株 *S. oralis* 2 株と血液中からの分離株 *S. mitis* 2 株が同一の遺伝子型を示し、遺伝子配列の検索を行った結果、唾液および血液中のいずれからも検出された菌株は *S. mitis* と 100%の配列一致を認めたため、本患者における IE は口腔内の *S. mitis* による可能性が考えられた。

今回の結果から、観血的な歯科処置を行った際に、血中へ侵入し IE が発症すると考えられていたが、口腔内の衛生状態が不良であり、さらに乳歯萌出中の歯肉炎に伴う出血等によつて、血中に原因菌が侵入し、発症した可能性も考えられるため、IE 発症の予防には、口腔内を清潔に保つための日々の口腔ケアが重要であることが示唆された。

P-078

Lennox-Gastaut 症候群の患児に対して舌突出癖の治療を行った 1 例

Treatment of tongue thrusting habit in child with Lennox-Gastaut Syndrome – Case report

○齊藤一誠, 澤味 岐, 野上有紀子, 村上大輔, 岩瀬陽子, 辻井 利弥, 香西克之**, 山崎要一**

○平野慶子, 仲野道代

Keiko Hirano, Michiyo Nakano 東原誠, 奈央槻共士○

Issei Saitoh, Tadashi Sawami, Yukio Hayashi, Daisuke Murakami*,

Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

新潟大・院医歯・小児歯・口腔外・歯科疾患・歯科材料・歯科臨床・歯科研究・歯科教育

【目的】

精神発達遅滞を認める小児において歯科矯正は困難であることが多い。今回、口腔習癖により開咬が認められた Lennox-Gastaut 症候群の患児を矯正歯科、摂食嚥下外来歯科と連携し、タングクリップおよび Castillo-Morales 口蓋床型装置の使用を試み、8 歳から 16 歳まで咬合管理を行ったので報告する。

【症例】

主訴：常に舌を突き出している。

現病歴：初診 1 歳 4 か月時に岡山大学病院小児科より口腔内精査のため紹介され来院された。齶歯予防処置を行っていたが、8 歳 9 か月時に舌突出癖により摂食状態が悪いため、その改善を希望された。

既往歴：Lennox-Gastaut 症候群。てんかん発作、重度精神発達遅滞を認め、抗てんかん薬の服用。5 歳 8 か月で高インスリン性低血糖症のため脾臓尾部切除。発語は少なく意思疎通および開口状態の維持が困難。2 歳 11 か月より摂食嚥下外来にて訓練を受けている。

【処置および経過】

開咬、上下顎前歯部の唇側傾斜あり。U1 to SN は 2 SD, L1 to Md は 1 SD を超えて大きかった。8 歳 10 か月時に可撤式タングクリップ装置を装着。しかし舌突出癖が改善されないため 9 歳 5 か月時に通常の固定式タングクリップを装着した。これにより舌の突出は消退し、オーバージェットはやや改善したが開咬が治癒しないため当院矯正歯科へ相談するも精神発達遅滞があるため、矯正歯科医の助言のもと小児歯科での治療を継続することとなった。10 歳 8 か月頃からタングクリップを装着した状態において舌突出癖が再発し、11 歳 0 か月時では U1 to SN は 1 SD, L1 to Md も 1 SD を超えて大きかった。11 歳 5 か月時にタングクリップを装着したまま上顎前歯の唇側にレジンボタンを

装着し、上顎 E 頬側のフックからパワーチェーンにて舌側に傾斜移動を行った。13 歳 2 か月時にタングクリップを除去。14 歳 4 か月時には保護者の希望によりワイヤー固定を除去したが上顎前歯の後戻りにより口唇閉鎖が困難となり、摂食嚥下外来で指導されている MFT の訓練にも支障をきたすようになっていた（図 1）。

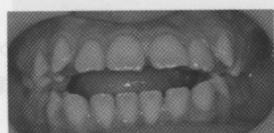


図 1. 14歳5か月時

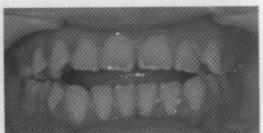


図 2. 16歳9か月時

このためブラケットを上顎前歯部に装着し、ナンスの装置により再治療を行い、15 歳 4 か月時に再度ワイヤー固定を行った。15 歳 7 か月時に Castillo-Morales 口蓋床型のリティナーを装着したところ舌突出癖はほとんど認められなくなった、16 歳 5 か月時に装置のビーズを除去し、口蓋部分はレジン床のみとした。下顎前歯のスペースが閉鎖し、舌突出癖が改善した（図 2）。摂食の際には床装置を入れなくても舌の突出は認めないが、通常の状態で床装置を入れないと舌突出癖を認めた。そのため今後、Castillo-Morales 口蓋床型装置はビーズの形態を変化させた方が舌突出癖再発の予防になるとと考えビーズ部分の再装着を予定している。

【考察】

当症例は IIIA 期より舌癖の改善を目的にタングクリップを装着したが下顎の垂直的な成長と共に舌突出癖が再発したと推測される。その後の治療では上顎前歯部の舌側傾斜移動と Castillo-Morales 口蓋床型装置による舌癖のコントロールが有効であった。

P-045

生体機能性材料 S-PRG フィラーが口腔バイオフィルム形成に与える影響

Effects of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler on oral biofilm formation

○高島由紀子, 森川優子, 森本節代, 稲葉裕明, 仲野道代

Yukiko Takashima, Yuko Morikawa, Setsuyo Morimoto, Hiroaki Inaba, Michiyo

Matsumoto-Nakano

Rena Okawa, Yutaro Nakase, Kazumi Kokomoto, Kaoruko Wato, Tamami Kadota,

Satoshi Yamaguchi, Dept. of Dent.

Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】

齲歯原性細菌 *Streptococcus mutans* は、菌が自ら産生するグルカン合成酵素 (Glucosyltransferase: GTF) によりグルカンを產生し、バイオフィルムを形成する。GTF は、GTFB、GTFC、および GTFD の 3 種が存在し、それぞれコードする遺伝子 *gtfB*、*gtfC*、および *gtfD* は、すでにクローニングされ、その塩基配列は決定している。これまでに、その *S. mutans* によって作成されたバイオフィルムを除去するためには機械的な方法しかないと考えられていた。本研究では、生体機能性材料である S-PRG フィラーによる様々な齲歯発生に関連する因子に対する効果を調べることにより、本材料による *S. mutans* のバイオフィルム形成に与える影響を検討したのでこれを報告する。

【材料と方法】

1. 供試菌：日本人小児由来の *S. mutans* MT8148 株（血清型 c）を実験に供試した。

2. 増殖速度：供試菌に S-PRG フィラーを添加し、可視分光光度計で波長 570 nm で菌液の濁度を 1 時間毎に経時的に測定した。

3. バイオフィルム形成量の測定：供試菌をスクロースおよび S-PRG フィラーを培地に添加した培地に播種し培養した。底面に付着した菌体をクリスタルバイオレット溶液にて染色し、波長 570 nm における吸光度を測定した。

4. バイオフィルム構造の観察

(1) バイオフィルム構造の確認：ヘキシジウムイオダイドを用いて染色した菌体を S-PRG フィラーを添加した培地にて培養した。形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察し、さらに ImageJ を用いて密度を算定した。

(2) バイオフィルム中のグルカンおよび菌量の

検討：菌体を SYTO®9 green fluorescent nucleic acid stain で染色した後、Alexa Fluor® 647-labeled dextran を添加した培地にて培養し、形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察した。

5. リアルタイム PCR による定量的遺伝子解析：供試菌を S-PRG フィラーを含む培地で培養後、全 RNA を回収し cDNA を得た。目的遺伝子の定量は、StepOne™ を用いて SYBR Green PCR protocol に従った。

【結果】

増殖速度について調べた結果、菌の増殖は濃度依存的に抑制された。また、バイオフィルム形成量は、S-PRG フィラーの濃度依存的に減少し、その構造は、濃度が上昇するにつれ、密度が疎となっており、厚みも減少していた。また、バイオフィルム中におけるグルカン量は顕著に減少していた。*gtfC* および *gtfD* の発現にはほとんど影響が認められなかつたが、*gtfB* の発現に対しては、濃度依存的に抑制効果が認められた。

【考察】

以上の結果より、S-PRG フィラーが菌の表層タンパクに何らかの作用をしていることが示唆される。さらに S-PRG フィラーは菌の増殖を抑制していることから、菌のイオンの取り込みに関与し、菌にとって必要な栄養素を取り込む膜輸送体に何らかの作用をしている可能性を示唆している。今後は、これらに焦点を当てて、S-PRG フィラーのバイオフィルム形成に対する抑制メカニズムを検討する予定である。

P-003

Porphyromonas gulae LPSによる歯肉上皮細胞の炎症性反応の評価

Inflammatory response of gingival epithelial cells stimulated

with *Porphyromonas gulae* LPS

○吉田翔、稲葉裕明*、Urmia Saki Alam*、野村良太**、仲野和彦**、仲野道代*

Sho Yoshida, Hiroaki Inaba*, Urmia Saki Alam*, Ryota Nomura**, Kazuhiko Nakano**, Michiyo Matsumoto-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. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., **Dept. of Pediatric Dent., Osaka Univ. Grad. Sch. of Dent.

【目的】

動物由来歯周病関連菌 *Porphyromonas gulae* は、*Porphyromonas* 属の新種として、ヒト以外の動物から分離され、犬などの伴侶動物あるいはヒト歯周病変部位からも検出される¹⁾。*P. gulae* はヒト由来歯周病原菌 *P. gingivalis* と同様に Lipopolysaccharide (LPS) 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。しかしながら、*P. gulae* の宿主細胞に対する病原性発揮の機序については十分な検討が加えられていない。本研究では *P. gulae* LPS 刺激に対するヒト歯肉上皮細胞株の炎症反応を評価した。

【対象と方法】

P. gulae LPS は LPS Extraction kit (iNtRON) を用いて *P. gulae* ATCC51700 株、D040 株、D049 株からそれぞれ精製した。ヒト歯肉上皮細胞を LPS で刺激後、Total RNA を通法を用いて抽出し、cDNA を合成した。Toll 様受容体である TLR2、TLR4、炎症性メディエーターである COX2 ならびに炎症性サイトカインである IL6、IL8、TNF- α 、および TGF- β それぞれの mRNA の発現を real-time polymerase chain reaction 法で確認した。

【結果】

P. gulae LPS は TLR2 と TLR4 mRNA 発現を濃度依存性に増強した。TLR2 mRNA は刺激後 5 分後にピークとなった。TLR4 mRNA は 5 分後にピークとなり、30 分後に再度上昇する二相性の反応を示した（図 1）。また、菌株の違いによる TLR2 と TLR4 mRNA の発現増強に違いは認め

られなかった。さらに、*P. gulae* LPS は COX2、IL6、IL8、TNF- α ならびに TGF- β mRNA 発現を顕著に増加させた。

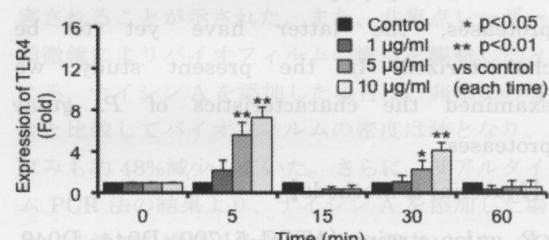
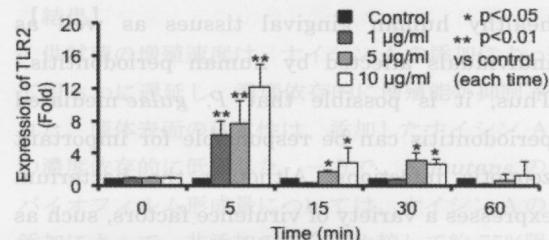


図 1. *P. gulae* LPS 刺激による TLR2 と TLR4 mRNA 発現

【考察】

動物由来 *P. gulae* LPS はヒト歯肉上皮細胞の TLR を介して認識され、炎症反応を発現誘導することが示唆された。本研究により、*P. gulae* が検出される歯周炎は、人獣共通感染症の 1 つである可能性が推測される。

【文献】

- 1) Fournier D, 他 : *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts, Int J Syst Evol Microbiol, 51(3):1179–1189, 2001.

P-005

乳酸菌由来のバクテリオシンが *Streptococcus mutans* のバイオフィルム形成に与える影響 Effects of Lactobacillus bacteriocin on biofilm formation by *Streptococcus mutans*

○森本節代, 森川優子, 高島由紀子, 仲周平, 稲葉裕明, 仲野道代

Setsuyo Morimoto, Yuko Morikawa, Yukiko Takashima, Shuhei Naka, Hiroaki Inaba, and Michiyo Matsumoto-Nakano

Yoshinori Inoue, Takehiko Saito, Masaaki Matsubara, Toshiaki Yamada, Koichiro Ookubo, Masafumi Yasuda, Jiro Kondo, Shigenari Kimoto,
(岡山大学医歯薬学総合研究科小児歯科学分野)

Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】

齲歯病原性細菌 *Streptococcus mutans* は、自ら产生するグルコシルトランスフェラーゼの働きによりグルカンを产生することにより、歯面に強固に付着しバイオフィルムを形成することで、その病原性を發揮する。これまで *S. mutans* に抗菌作用を持つ可能性のある歯磨剤および洗口剤について広く研究されてきたが、今回我々は、乳酸菌のバクテリオシンであるナイシン A に着目し、これらの *S. mutans* への抗菌作用およびバイオフィルム形成能に対する影響について検討したので報告する。

【対象と方法】

S. mutans MT8148 を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地で継代培養したものを供試菌として用いた。はじめに、供試菌を 1/100 の濃度になるようにナイシン A を添加あるいは無添加の BHI 液体培地に播種し、1 時間毎に濁度を測定することで増殖能を評価した。次に、ヘキサデカン法を用いて供試菌の疎水性を評価した。尿素および硫酸マグネシウムを含むリン酸カリウム緩衝液で、波長 600nm における濁度が 0.1 となるように調整した供試菌懸濁液にヘキサデカンを加えて攪拌した。ヘキサデカン層に移行した菌量の割合を求めて菌体表面の疎水性を算出した。さらに、形成されたバイオフィルムをクリスタルバイオレットにて染色し、波長 570nm における吸光度を測定することでバイオフィルム形成能を評価し比較した。また、供試菌の菌体をヘキシジウムイオダイトにて染色し、0.5%スクロース含有化学合成培地にて波長 600nm における濁度が 0.1 となるよう調整した後培養しバイオフィルムを形成させた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて形成されたバイオフィルムの観察を行い、その構造および密度

Image J®を用いて比較した。最後に、バイオフィルムを形成した供試菌の全 RNA を抽出しグルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である *gtfB*、*gtfC*、および *gtfD* の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて解析し比較した。

【結果】

供試菌の増殖速度は、ナイシン A の添加によって明らかに遅延し、濃度依存的に増殖能が抑制された。菌体表面の疎水性は、添加したナイシン A の濃度依存的に低下した。一方で、*S. mutans* のバイオフィルム形成量については、ナイシン A の添加によって、非添加の場合と比較して約 75% 阻害されることが示された。また、共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィルムの構造を観察したところ、ナイシン A を添加した場合は、非添加の場合と比較してバイオフィルムの密度は疎となり、厚みも約 48% 減少していた。さらに、リアルタイム PCR 法の結果より、ナイシン A を添加した場合、非添加の場合と比較して、*gtfB* および *gtfD* の発現は濃度依存的に減少しており、*gtfC* の発現量も減少する傾向がみられた。

【考察】

以上の結果より、ナイシン A は、*S. mutans* の増殖能、疎水性およびバイオフィルム形成能を抑制することが明らかとなった。このことは、ナイシン A を作用させることによって齲歯の最も主要な原因菌の病原性が抑制されることを示唆している。乳酸菌由来のバクテリオシンは、齲歯の抑制の目的で歯磨剤や洗口剤の成分として応用できる可能性が示された。

P-006

Streptococcus mutans のバイオフィルム形成におけるDnaKの影響と役割Role of molecular chaperone DnaK in biofilm formation by *Streptococcus mutans*

○吉田衣里, 松三友紀, 森川優子, 仲周平, 高島由紀子, 仲野道代
Eri Yoshida, Yuki Matsumi, Yuko Morikawa, Syuhei Naka,

Yukiko Takashima, Michiyo Matsumoto-Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯)

Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】

ヒト齲歯の主要な病原性細菌であるグラム陽性細菌 *Streptococcus mutans* は、口腔内のバイオフィルム形成において重要な役割を果たしている。その口腔内は温度変化などの因子により環境が大きく変化するため、菌は多くのストレスにさらされており、このストレス下で菌が生育し続けるために様々なストレス応答タンパクが関与している。分子シャペロン DnaK はストレス応答タンパクの一員であり、*S. mutans* の耐酸性に関与することで酸性環境下でも *S. mutans* の生育を可能にすることが報告されている。このストレス応答タンパク DnaK が *S. mutans* のバイオフィルム形成に与える影響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. バイオフィルム構造の観察：すべての供試菌をヘキシジウムイオダイドにより蛍光染色を行い、0.25% スクロース含有化学合成培地で菌の濁度が波長 600 nm が 0.1 になるように調整した。この菌液をチャンバースライドシステムに播種し、嫌気下で 24 時間、37°C で培養し、バイオフィルムを形成させた。この形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察し、

imageJ (version 1.46r) により、バイオフィルムの構造の変化を検討した。

4. バイオフィルム中の菌および菌体外多糖の観察：供試菌を SYTO 9 により蛍光染色を行い、Alexa Fluor 647 を添加した 0.5% スクロース含有化学合成培地で波長 600 nm が 0.1 になるように調整した。この菌液をチャンバースライドシステムに播種し、嫌気下で 24 時間、37°C で培養し、バイオフィルムを形成させた。この形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察し、imageJ により、バイオフィルムの性状を検討した。

【結果】

バイオフィルム構造を観察したところ、MT-pDL 株では均一なバイオフィルムが形成されていた。MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株では著明な凝集塊が認められ、一方 DnaK-s 株においては MT-pDL 株と同様な構造が認められた。バイオフィルム中の菌および菌体外多糖の観察では、MT-pDL 株および DnaK-s 株において菌が底面に均一に付着し、その上方に菌体外多糖が合成されていた。一方で DnaK-o 株においては菌の付着の上方に菌体外多糖の著しい凝集が認められた。

【考察】

以上の結果より、DnaK を過剰発現させると菌体外多糖の産生が顕著に増加し、構造が大きく変化していることから、DnaK が *S. mutans* の表層タンパクに関与していることが示唆された。しかし、DnaK が表層タンパクを制御している機序については明らかとなっていないため、今後さらなる検討が必要である。

P-038

抗がん剤がマウス歯胚に及ぼす影響における免疫組織学的検討

Immunohistochemical examination of the effect on the mouse tooth germ by anticancer drugs

○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】

小児がん患者において、がん治療によって歯根あるいは歯冠の形成が阻害され、形態異常や欠損が起こる。これらは、歯胚の形成時期の抗がん剤やアルキル化剤などの投与や放射線照射が原因であると示唆されている。今回我々は、マウス歯胚を用いて、抗がん剤による歯根形成への影響について免疫組織学的検討と関連遺伝子の評価を行ったのでこれを報告する。

【対象と方法】

1. 器官培養：胎生 16 日齢のマウスより下顎第一臼歯の歯胚を採取後、0.5% アスコルビン酸および 0.5% ストレプトマイシン含有 BGJb Medium を用いて 37°C、5% CO₂ 下にて培養を行った。培養 1 日目の歯胚に 0.21mg/ml、0.42mg/ml、0.84mg/ml の各濃度に調整したシクロフォスファミドを添加し、14 日間および 21 日間培養後実験に供試した。

2. 病理組織学的評価：培養した下顎第一臼歯歯胚を中性ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋ブロックを作製して、薄切切片を作製後、ヘマトキシリソ・エオジン (HE) 染色を施し、歯胚の観察を行った。さらに、添加したシクロフォスファミドの上皮組織および間葉組織への影響を観察するため、抗サイトケラチン抗体および抗ビメンチン抗体を用いた免疫染色によって免疫組織学的検討を行った。

3. 関連遺伝子発現の評価：培養後の歯胚より Acid-guanidinium-phenol-chloroform 法に基づいて、RNAgent® Kit を使用して全 RNA を抽出し、cDNA の合成を行った。得られた cDNA を鑄型として、SYBR green を用いた Real-time qRT-PCR 法によって、サイトケラチンおよびビメンチンをコードする遺伝子の発現を調べた。

【結果】

培養 1 日目の歯胚の免疫染色を行った結果、サイトケラチンおよびビメンチンの発現は認められなかった。培養 14 日目では、非添加群においてサイトケラチンおよびビメンチンの発現が認められた。一方で、シクロフォスファミド添加群においては、間葉系細胞の歯根形成部付近でサイトケラチンおよびビメンチンの発現が認められなかった。培養 14 日目における HE 染色像では、ヘルトビッヒ上皮鞘において、シクロフォスファミドの濃度が高くなるにつれて、象牙芽細胞とエナメル芽細胞の形態の変化や配列の乱れが認められた。さらに培養 21 日目において、0.21 mg/ml および 0.42 mg/ml のシクロフォスファミドを添加した群においては歯胚の形態異常が認められ、さらに 0.84mg/ml のシクロフォスファミドを添加した群では、前象牙芽細胞と前エナメル芽細胞の分化、象牙質の形成が認められなかった。培養 21 日目の免疫染色では、シクロフォスファミドの濃度が高いほど、歯根形成部においてサイトケラチンおよびビメンチンの発現は認められなかった。さらに Real-time qRT-PCR の結果より、0.42 mg/ml のシクロフォスファミドを添加した群では非添加群と比較して、いずれの遺伝子においても有意に発現の低下を認めた。

【考察】

本研究から、歯胚形成期における抗がん剤の投与により、上皮組織と間葉組織の双方に影響を与えることが示唆された。これにより、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。今後は、歯の形成に関与する他の遺伝子への影響について検討を行う予定である。

P-004

P-003

Examination of *Porphyromonas gulae* protease

*Porphyromonas gulae*が産生するプロテアーゼに関する検討

○Urmī Saki Alam, Sho Yoshida*, Hiroaki Inaba, Ryota Nomura**, Kazuhiko Nakano**, Michiyo Matsumoto-Nakano

○Urmī Saki Alam、吉田翔*、稻葉裕明、野村良太**、仲野和彦**、仲野道代

Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ., *Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Hospital, and

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

(岡大・医歯薬・小児歯, *岡大病院・小児歯, **阪大・歯・小児歯)

【Objects】

Porphyromonas gulae, a major periodontal pathogen in dogs, has also been detected in healthy human gingival tissues as well as individuals affected by human periodontitis.¹ Thus, it is possible that *P. gulae*-mediated periodontitis can be responsible for important zoonotic infections. Although the bacterium expresses a variety of virulence factors, such as fimbriae, lipopolysaccharide (LPS), and proteases, the latter have yet to be characterized. In the present study, we examined the characteristics of *P. gulae* proteases.

【Material & Methods】

P. gulae strains (ATCC 51700, D044, D049, D066, D077) and *P. gingivalis* ATCC 33277 were used. Enzymes possessed by the *P. gulae* strains were characterized with an API ZYM system. Protease activity was examined using a colorimetric Protease Assay Kit with the protease inhibitors antipain, PMSF, TLCK, and leupeptin. To evaluate the role of *P. gulae* protease activation, we examined activation of the precursor of MMP9 (proMMP9) activation using gelatin zymography.

【Results & Discussion】

All *P. gulae* strains exhibited enzymatic characterization and protease activity similar to those of *P. gingivalis* ATCC33277. Furthermore,

proteolytic activity of *P. gulae* ATCC 51700 was significantly reduced by pretreatment with antipain, PMSF, TLCK, and leupeptin in a dose-dependent manner (Fig. 1). Also, *P. gulae* increased processed the proenzyme to the active form of MMP9, suggesting that the bacterium expresses proteases comprised of arginine and lysine-specific trypsin-like serine proteinases.

【Conclusion】

These results suggest that *P. gulae* exhibits virulence characteristics similar to those of the human periodontal pathogen *P. gingivalis*, thus it may play a key role in development of periodontitis in humans and their companion animals.

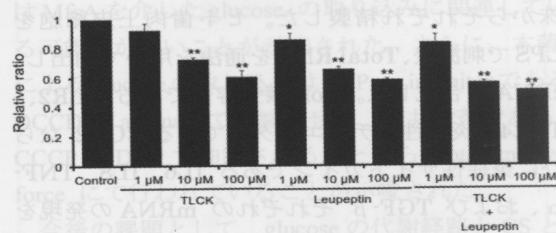


Fig. 1 Protease activity of *P. gulae* ATCC51700 in presence of TLCK and leupeptin.

【References】

- Yamasaki Y, Nomura R, Nakano K et al., (2012) Distribution of periodontopathic bacterial species in dogs and their owners. Arch Oral Biol. 57(9):1183-8.