

小児における歯周病重症化メカニズムの検討

Examination of the mechanism of periodontal disease severity in children

○宮井由記子，仲 周平，仲野道代

Yukiko Miyai, Shuhei Naka, Michiyo Matsumoto-Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯)

Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

【目的】

一般的に歯周疾患による歯の脱落には歯肉縁下の歯周病細菌叢が関与し、年齢と共に重度歯周病菌の割合が増加する。われわれはこれまでに全身的に健康であるが急速な歯周組織の破壊を伴い、歯根吸収がみられない乳歯の早期脱落を起こした患児の歯肉溝滲出液 (Gingival crevicular fluid : GCF) 中には成人の重度歯周炎で見られる *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* が認められ、*Actinomyces naeslundii* が健常児群と比較して有意に多く検出されたことを報告してきた。しかしながら、歯周病発症の契機と言われている *Fusobacterium nucleatum* は患児と健常児で有意な差は見られなかった。そこで本研究では歯周病の重症化における細菌叢の変化を検討した。

【対象と方法】

本研究は岡山大学倫理審査委員会の承認（研1810-028）を得て行った。患児のGCFから分離した *A. naeslundii* 82株, *F. nucleatum* 22株について分析した。

1. 最小発育阻止濃度の測定：McFarland = 1.0に調整した供試菌液を各種抗菌薬が添加されたドライプレート（栄研化学 DP53）に播種した。その後、37℃で嫌気培養をし、48時間後の菌の増殖を目視で確認した。

2. バイオフィルム形成能の測定：供試菌液を1%グルコース Brain heart Infusion 液体培地に希釈し、96穴プレートに分注し、37℃で嫌気培養し、24および48時間後に1%クリスタルバイオレット溶液で染色し、波長570 nmにおける吸光度を測定した。

【結果】

患児群のうち *P. gingivalis*, *T. forsythia* を認めた患児の場合、*Actinomyces* 属が *Veillonella* 属より有意に高い割合で検出された ($p < 0.01$)。そのため *Actinomyces* 属が *Veillonella* 属より多い患児群を Group1、少ない患児群を Group2 と

して各種抗菌薬の耐性およびバイオフィルム形成能を比較した。

1. 最小発育阻止濃度：*A. naeslundii* の抗菌薬に対する耐性株の割合はセフェム系 (Group1 vs. Group2 : 54.9 % vs. 82.7 %), オキサセフェム系 (13.9 % vs. 69.2 %), カルバペネム系 (8.3 % vs. 61.5 %) であった。一方、*F. nucleatum* ではペニシリソ系 (33.3 % vs. 75.0 %), セフェム系 (33.3 % vs. 62.5 %), リンコマイシン系 (66.7 % vs. 100 %) であった。いずれも抗菌薬に対する耐性株の割合が Group2 のほうが Group1 と比較して高かった。

2. バイオフィルム形成能：*A. naeslundii* では24時間後のバイオフィルム形成能は Group1 のほうが Group2 と比較して有意に高かった ($p < 0.001$)。一方、48時間後ではバイオフィルム形成能は Group1 のほうが Group2 と比較して有意に低くなっていた ($p < 0.001$)。また *F. nucleatum*においては24時間後に Group1 は Group2 と比較して有意に低く ($p < 0.001$), 48時間後は高かった ($p < 0.05$)。

【考察】

本研究では *Veillonella* 属の存在が重症化への因子となる可能性が示唆された。*Veillonella* 属が優位な場合、*Actinomyces* 属は高いバイオフィルム形成能を発揮し、抗菌薬耐性を持つことにより、徐々に *Actinomyces* 属が優位なバイオフィルムへと移行する。そこで *F. nucleatum* が出現し、強固なバイオフィルム形成をすることにより、重度歯周炎を発症する菌の出現を誘発している可能性が示唆される。今後は、*Actinomyces* 属をリスク因子とする重度歯周炎発症メカニズムを検討する必要がある。

○松岡大貴¹⁾, 仲 周平¹⁾, 後藤花奈¹⁾, 野村良太²⁾, 仲野和彦³⁾, 仲野道代¹⁾

Daiki Matsuoka¹⁾, Shuhei Naka¹⁾, Kana Goto¹⁾, Ryouta Nomura²⁾, Kazuhiko Nakano³⁾,

Michiyo Matsumoto-Nakano¹⁾

⁽¹⁾岡大・医歯薬・小児歯, ⁽²⁾広大・院・小児歯, ⁽³⁾阪大・院・小児歯

¹⁾Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.,

²⁾Dept. Pediatric Dent., Hiroshima Univ. Grad. Sch. Bio. Sci.,

³⁾Dept. Pediatric Dent., Osaka Univ. Grad. Sch. of Dent.

【目的】

齲歯の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* には、その病原性に関連する数種類の表層タンパクが存在しており、その一つにコラーゲン結合タンパク (Cnm) が挙げられる。IgA 腎症は慢性系球体腎炎の中で最も頻度が高く、その病態発症には Cnm が関与していることが明らかになっている。われわれはこれまでに、Cnm が *S. mutans* の菌体表層に突起状に存在し、細菌の宿主への侵入や接着に関わる重要な病原因子であることを報告してきた。本研究では、Cnm とヒト IgA の結合を検討することにより Cnm の IgA 腎症における病態発症メカニズムについて検討を行った。

【対象と方法】

- リコンビナント Cnm (rCnm) タンパクの作製 : *S. mutans* TW871 株の Cnm をコードする *cnm* 遺伝子を PCR 法により增幅し、グルタチオンセファローストランスフェラーゼ融合タンパク発現用ベクター pGEX6p-1[®] に挿入した後、*Escherichia coli* BL21 に形質転換した。Luria-Bertani 液体培地で大量培養し、集菌後、沈殿をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で懸濁し、超音波破碎した。遠心分離後、グルタチオンセファロース 4B カラムにより rCnm を得た。
- 抗 Cnm 抗体の作製 : 精製した rCnm をアジュバントを加えて乳化し、2 週間ごとに 4 回、ウサギ (New Zealand White, メス) の筋肉内に注射し、抗 Cnm 抗体を作製した。
- rCnm と IgA との結合の検討 : 96 穴マイクロプレートの各ウェルにヒト IgA を固定後、rCnm を添加し、1 時間静置した。抗 Cnm 抗体にて反応させた後、染色し、波長 430 nm での吸光度を測定した。さらに、ニトリルセルロースメンブレンに、バイオドット[®] を用いて rCnm を固定し、

濃度を段階調製したヒト IgA を添加した。30 分静置し、自然ろ過した後、抗 Cnm 抗体を添加し、1 時間反応させた。発色後、得られた画像は ImageJ で染色強度を測定し数値化した。

4. ラット動物モデル : Specific Pathogen Free の Sprague-Dawley 系ラット (4 週齢、オス) に全身麻酔後、頸静脈から PBS および rCnm 200 µg を投与した。投与後 45 日に屠殺し、腎臓を摘出した。摘出した腎臓組織をホルムアルデヒド固定し、組織切片を作製した後、抗 IgA 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

【結果】

IgA をプレートに固定し、rCnm を添加したウェルのみ発色を示した。また、rCnm を固定したメンブレン上では、混和する IgA の濃度を増加させると、染色強度の減少が認められた。さらに、免疫蛍光染色では、PBS 投与群と比較して、rCnm 投与群の腎糸球体メサンギウム領域に IgA の沈着が有意に多く認められた。

【考察】

本研究の結果から、Cnm は IgA に対する結合能を有していることが示された。これより、Cnm が IgA と結合し、腎糸球体に沈着することで、IgA 腎症様腎炎が誘発されていると考えられ、Cnm が IgA 腎症発症メカニズムにおいて重要な因子となっている可能性が示唆された。

○平野慶子，仲野道代

Keiko Hirano, Michiyo Matsumoto-Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯)

Dept. Pediatric Dent.,Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

【目的】

進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia ossificans progressiva : FOP) は発生率は 200 万人に 1 人の極めて稀な疾患であり、その遺伝様式は常染色体優性遺伝である。FOP の進行に伴い軟組織が骨化し、肢体や四肢の可動域の減少や変形が非可逆的に生じる。その進行の特徴は炎症などの刺激により軟組織の硬化がまず生じ（これを flare up と称する）、その部位から骨化が進行することである。根本的な治療方法はなく、主として flare up を予防するためにステロイドなどの投薬が行われている。今回 FOP の患者に遭遇したのでこれを報告する。

【症例】

患児：初診時年齢 3 歳 1 か月、女児。

主訴：齶歎処置希望。

現病歴：岡山大学病院小児科にて齶歎を指摘され当科を紹介され来院。

既往歴：FOP。

家族歴：特記事項なし。

投薬：プレドニゾロン（ステロイド）、オノン（プロランカスト水和物）、カルボシスティン（L-カルボシスティン）。

【処置および経過】

初診時の現存歯は

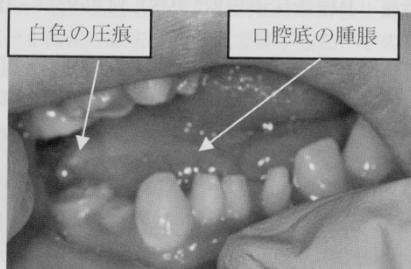
EDBA|ABDE であり BA|AB は栓状歯であった。

また BA|A の唇側に C2 を認めた。

全身状態は四肢を動かすことが不可能であり、開口量は少なく口唇圧が強かった。発語はないが、保護者よりある程度の理解力はあるとのことだった。疾患の特徴として軟組織に強い刺激を与えると flare up を起こす可能性があるため、無理な開口や強い刺激を与えることは禁忌であった。このため BA|A の C2 はまずフッ化ジアンミン銀で進行抑制を行い、4 歳 1 か月時にグラスアイオノマーにて充填を行った。その後、1 か月に 1 度の定期検診を行った。9 歳 7 か月時に 6 の咬合

面に C2 を認めたためグラスアイオノマー充填を行い、12 歳 7 か月には齶歎による歯冠破折のため D を拔歯した。また永久歯の交換が遅延していると判断し、デンタルエックス線や斜位法撮影を行い、11 歳 1 か月時に 32|3 および 321|23 は先天性欠損と診断した。その後 13 歳 1 か月時に口腔底粘膜全体の腫脹を認めた（図 1）。

また E と接触する部分に白色の圧痕を認めたため E の咬合性外傷と考え、E の舌側咬頭を研磨したが、顕著な変化は認められなかった。小児科において血液検査、CT 検査等を行い、flare up の疑いとの診断にてプレドニゾロンの增量と経口栄養剤の処方が行われた。腫脹の発生より 2 か月後では形状の変化は認めないが、やや軟化が認められた。



〈図 1〉 口腔底粘膜の腫脹

【考察】

口腔底粘膜の腫脹は、触診では硬さは変化しているが消失は困難と考えられた。このため増悪や膿瘍等他の疾患への変化等に備えて形状の経過観察を行うとともに、口腔底粘膜の腫脹周囲の歯牙の口腔衛生状態についても注意が必要であると考えている。

○吉田 翔¹⁾, 稲葉裕明¹⁾, 野村良太²⁾, 仲野和彥³⁾, 仲野道代¹⁾Sho Yoshida¹⁾, Hiroaki Inaba¹⁾, Ryota Nomura²⁾, Kazuhiko Nakano³⁾, Michiyo Matsumoto-Nakano¹⁾⁽¹⁾岡大・医歯薬・小児歯, ⁽²⁾広大・院・小児歯, ⁽³⁾阪大・院・小児歯)¹⁾Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.,²⁾Dept. Pediatric Dent., Hiroshima Univ. Grad. Sch. of Biomed. & Health Sci.,³⁾Dept. of Pediatric Dent., Osaka Univ. Grad. Sch. of Dent.

【目的】

動物由来歯周病菌 *Porphyromonas gulae* は、ヒト以外の動物から分類される *P. gingivalis* 類似細菌の新種として発見された。菌体表面には線毛が存在し、線毛遺伝子が A/B/C 型の 3 つの型に分類される。中でも線毛遺伝子 Type C 保有 *P. gulae* 株は歯周病変部位から高頻度で検出され、細胞傷害性や強い歯周病原性を有することが報告されている。細菌が保有する線毛は宿主への付着、細菌同士で凝集塊を形成することでバイオフィルムの形成に関与することが知られているが、*P. gulae* 線毛とバイオフィルム形成の関連性は明らかでない。本研究では *P. gulae* 線毛遺伝子型とバイオフィルム形成とその特徴を検討した。

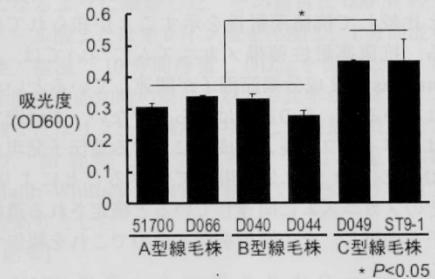
【対象と方法】

線毛遺伝子型の異なる *P. gulae* 6 株を実験に供試した。供試菌株を前培養後、りん酸緩衝生理食塩水に懸濁し、96 穴マイクロプレートに播種した。24 時間嫌気培養後、クリスタルバイオレット (CV) 染色法により、バイオフィルム形成量を測定した。バイオフィルム構造は、チャンバーグラス上で形成されたバイオフィルムをヘキシジウムイオダイトで染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。菌株間の結合力を観察するため、6 穴プレート上で形成された供試菌株のバイオフィルムの破碎試験を行った。破碎後、残存したバイオフィルムを CV で染色し、95% エタノールで CV を溶出させた。さらに 96 穴プレートに移し、マイクロプレートリーダーを用いてバイオフィルム残存量を測定した。

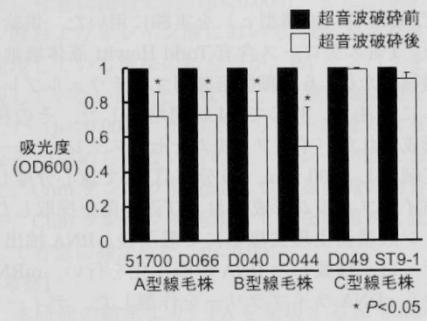
【結果】

C 型線毛保有株は A ならびに B 型線毛保有株と比較して有意に高いバイオフィルム形成能を有した (図 1)。さらに共焦点レーザー顕微鏡像から、C 型線毛保有株は密度の高いバイオフィルム

が形成されることが観察された。また超音波破碎試験により C 型線毛保有株は有意に高い抵抗性を有することが明らかになった (図 2)。



〈図 1〉 バイオフィルム形成量の比較



〈図 2〉 バイオフィルム抵抗性的比較

【考察】

P. gulae C 型線毛保有株が保有するバイオフィルム形成能とその強い菌体間結合力は、口腔常在菌との共生関係を崩壊させるバイオフィルムの高病原化をもたらす一因であることを示すとともに、同菌の線毛遺伝子多型と歯周病原性との関連性があることが推測された。

Analysis of operons associated with *Streptococcus mutans* antimicrobial resistance mechanisms

○松浦沙久矢, 浅海春華, 後藤花奈, 仲野道代 田古○

Sakuya Matsuurra, Haruka Asaumi, Kana Goto, Michiyo Matsumoto-Nakano 田古

(岡大・医歯薬・小児歯) (岡大・医歯薬・大園)

Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

【目的】

齲歯原生細菌 *Streptococcus mutans* は歯面に強固に付着し菌体外マトリックスを生成し、厚いバイオフィルムを形成する。その中で、*S. mutans* はスクロースを代謝することによって酸を产生し、歯面を脱灰することで齲歯が発生する。歯面に付着したバイオフィルム形成菌は、浮遊菌と比較して抗菌薬耐性を示すことが知られている。抗菌薬耐性獲得メカニズムについては、*S. mutans* の 2 成分調節因子が関連しているといわれているが、その詳細は明らかでない。本研究では、バイオフィルム形成菌における遺伝子発現を RNA シーケンシングを用いて調べることにより、そのメカニズムに関連していると推定される遺伝子を抽出し、その解析を行ったのでこれを報告する。

【対象と方法】

供給菌として日本人小児由来の *S. mutans* MT8148 株（血清型 c）を実験に用いた。供給菌を、1%スクロース含有 Todd Hewitt 液体培地に播種した後、6 穴細胞培養用マルチウェルプレートに分注し、37°C で 24 時間培養した。その後、形成されたバイオフィルムをセルスクレーパーにて剥離し 3000 rpm、10 分、4°C にて遠心分離し、バイオフィルム形成菌および浮遊菌を採取した。リン酸緩衝生理食塩水にて懸濁後、RNA 抽出を行った。精製した RNA の断片化を行い、mRNA から cDNA ライブライマーを作製した。ディープシークエンスを行い、*S. mutans* UA159 株の既知の配列をもとにしたマッピングにより、遺伝子の発現状況を確認した。

【結果】

バイオフィルム形成菌と浮遊菌の遺伝子の発現量を比較したところ、バイオフィルム形成菌では、ABC トランスポーターやホスホトランヌフェラーゼシステム関連遺伝子の発現量の上昇が認められ、ABC トランスポーター遺伝子の発現は上昇した全遺伝子の 8.1% であった。加えて 2 成分

調節因子の関連遺伝子である *comC* 遺伝子の発現量が大きく上昇していた。一方、浮遊菌では、リン酸化酵素の発現量が上昇していた。バイオフィルム形成菌において発現量が上昇した遺伝子の中でも、ABC トランスポーター関連遺伝子と推測される *SMU_922* 遺伝子、*SMU_1094* 遺伝子の発現が大きく上昇していることがわかった。そのため、それぞれの遺伝子の上流と下流の遺伝子を含め、PCR アッセイを行ったところ、*SMU_921* 遺伝子、*SMU_922* 遺伝子、*SMU_923* 遺伝子がオペロンを形成し、*SMU_1095* 遺伝子、*SMU_1096* 遺伝子、*SMU_1097* 遺伝子がオペロンを形成していることが確認された。

【考察】

浮遊菌と比較して、バイオフィルム形成菌において *comC* 遺伝子の活性が高かったことは、2 成分調節因子システムが抗菌薬耐性獲得に関与している可能性が示された。また、今回スクリーニングした遺伝子のうち *SMU_921-SMU_923* と *SMU_1095-SMU_1097* がそれぞれオペロンを形成していることから、これらが何らかの機能を持つ可能性があることが示唆された。今後は抽出した ABC トランスポーター遺伝子の機能解析を進めていくことにより、これらの遺伝子がバイオフィルム形成および抗菌薬耐性メカニズムにどのような役割を担っているかを解明し、バイオフィルムの破壊および再形成を抑制するための新たな方法の発見を目指していく予定である。

【参考】

齲歯原生細菌 *S. mutans* の耐性メカニズムに関する研究
（1回）

◎ 非アルコール性脂肪肝炎患者口腔内から分離した *Streptococcus mutans* の
脂肪酸との結合に関する検討

Fatty acid binding capability of *Streptococcus mutans* organisms isolated from the oral cavity of nonalcoholic patients with nonalcoholic steatohepatitis

○ 中野聰大, 田畠佳子, 仲 周平, 仲野道代

Sodai Nakano, Keiko Tabata, Shuhei Naka, Michiyo Matsumoto-Nakano

Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

Toshihisa Nakano, Keiko Tabata, (岡大・医歯薬・小児歯)

Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

【目的】

日本消化器病学会・日本肝臓学会のガイドラインによると、近年、肥満人口の増加に伴い非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD) の有病率が上昇していることがいわれている。NAFLD は、飲酒歴がないにもかかわらず肝臓に脂肪が蓄積する病態を呈し、病態の進行が稀な非アルコール性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver : NAFL) と進行性の非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis : NASH) からなる。これまでに、齧歎の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* のうち、菌体表層にコラーゲン結合タンパク (Cnm) および高分子タンパク抗原 (PA) を保有する株が、高脂肪食を摂取し脂肪が蓄積したマウス肝臓から検出され、これらの菌株の NASH 増悪化への関与が報告されている。その原因の一つとして、*S. mutans* が肝臓内の脂肪酸に結合する可能性が示唆されている。本研究では、NAFLD 患者の口腔内から分離した *S. mutans* の脂肪酸との結合能を評価した。

【対象と方法】

1. 対象：なお本研究は、同病院倫理委員会（番号 32）および岡山大学病院倫理委員会（研 1707-021）の承諾を得た後実施した。市立奈良病院で NAFLD と診断され肝生検を行った 40 名の患者 (NASH : 20 名, NAFL : 20 名) を対象とし唾液を採取した。NAFLD 患者唾液中から *S. mutans* を分離し、*S. mutans* の特異的プライマーを用いた polymerase chain reaction (PCR) 法により菌を同定した。*S. mutans* と同定された菌の Cnm の発現を cnm の特異的なプライマーを用いた PCR 法により調べ、PA の発現を Western blotting 法で確認した。

2. 脂肪酸結合試験：不飽和脂肪酸であり、必須

脂肪酸であるリノール酸と必須脂肪酸ではないオレイン酸を実験に供試した。各供試菌を Brain Heart Infusion 液体培地にて 37°C で 16 時間培養した。その後、遠心分離して回収し、OD₅₅₀ = 0.6 になるように調整した。その菌液に 600 μl のリノール酸またはオレイン酸を添加し、1 分間混和後、室温で 10 分間静置し OD₅₅₀ を測定した。各脂肪酸非添加時の濁度に対する比率からオレイン酸またはリノール酸層に移動した菌量の比率を求め、結合率とした。統計学的有意差は、Mann-Whitney U 検定を用いて、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

NASH 患者から分離された *S. mutans* は、NAFL 患者と比較してリノール酸およびオレイン酸に有意に結合した ($p < 0.005$)。また、リノール酸およびオレイン酸において、PA タンパクを発現している菌株の結合率が、PA タンパクを発現していない菌株と比較して、有意に高い値を示した ($p < 0.001$)。一方で、リノール酸では有意な差が認められないものの、オレイン酸において、Cnm タンパクを発現している菌株の結合率が、Cnm タンパクを発現していない菌株と比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。

【考察】

本研究の結果より、PA を発現する *S. mutans* 株がオレイン酸やリノール酸などの不飽和脂肪酸に有意に結合し、Cnm を発現する *S. mutans* 株がオレイン酸により有意に結合したことから、PA および Cnm を保有する菌株が肝臓に蓄積した不飽和脂肪酸に結合し、NASH を誘発する可能性が示唆された。

造血幹細胞移植を受けた小児がん患者より分離された *Streptococcus mutans* の
生物学的特性の検討 Biological resistance mechanism
Biological characterization of *Streptococcus mutans* organisms isolated from pediatric cancer patients
undergoing hematopoietic stem cell transplantation

○小川ひかり, 後藤花奈, 森川優子, 伸野道代
Hikari Ogawa, Kana Goto, Yuko Morikawa, Michiyo Matsumoto-Nakano

Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.
(岡大・医歯薬・小児歯)

Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

【目的】

小児がん患者の治療法の一つである造血幹細胞移植では大量化学療法や放射線療法を併用するため、免疫機能が低下し易感染状態となる。そのため抗菌薬の投与を持続的に行うことが多く、これによる造血幹細胞移植後の多剤耐性菌による感染症の増加も問題となっている。また、口腔粘膜障害による刷掃困難や、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病によって唾液の減少が生じ、移植後は齧歯が多発することが知られている。本研究では、齧歯原性細菌である *Streptococcus mutans* に着目し、造血幹細胞移植を施行される患児から *S. mutans* を分離し、それらの生物学的特性について検討したので報告する。

【対象と方法】

本研究は岡山大学倫理審査委員会（研 1508-016）の承認を受けて行った。

1. バイオフィルム形成能

造血幹細胞移植前、術後 1か月および術後 3か月の患児の唾液から分離した *S. mutans* を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地にて 37°C で一晩培養した後、0.5% スクロース添加 Todd Hewitt 液体培地に播種し、96 穴細胞培養用マイクロプレートの各ウェルに分注し、37°C で 48 時間で培養した。1% クリスタルバイオレット溶液を加え染色し、波長 570 nm の吸光度を測定した。

2. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

供試菌を BHI 液体培地で 37°C で一晩培養した後、滅菌生理食塩水で 5×10^4 CFU に調整した。薬剤感受性検査用ドライプレートの各ウェルに供試菌液を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、37°C で 24 時間培養した。混濁または直径 1 mm 以上の沈殿を認めた場合は発育陽性と判定し、最小発育阻止濃度を測定した。

3. RNA シーケシング

抗菌薬耐性のない、および抗菌薬に耐性のある *S. mutans* を BHI 液体培地で対数増殖期まで培養後 RNA を抽出した。RNA シーケシング解析を行い、全遺伝子の発現状況を比較した。

【結果】

バイオフィルム形成能は術前の患児の *S. mutans* と比較して、術後 3か月において有意に上昇した。また、術前および術後 3か月の *S. mutans* と比較して、術後 1か月では β ラクタム系合剤、ペニシリン系、セフェム系やカルバペネム系抗菌薬に対する耐性を認めた。さらに、抗菌薬耐性のない *S. mutans* と比較し、抗菌薬耐性のある *S. mutans* において 2 倍以上発現が上昇した遺伝子は、ホスホトランスフェラーゼシステムに関連する遺伝子および ABC トランスポーターをコードする遺伝子を含む 94 種類であった。2 倍以上発現が抑制した遺伝子は、ストレス応答タンパクをコードする遺伝子を含む 44 種類であった。

【考察】

以上の結果より、造血幹細胞移植前と比較し術後においてバイオフィルム形成能は上昇し、術後 1か月の *S. mutans* では多くの抗菌薬に耐性を認めた。さらに糖代謝関連遺伝子を含む多くの遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。これは、多数の ABC トランスポーターの発現が上昇していたことから、抗菌薬の輸送に関連している可能性が示唆される。今後は、発現が変化している遺伝子に着目し、抗菌薬耐性獲得メカニズムについて検討する予定である。