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* の抗菌薬耐性獲得についての検討

Acquisition of antimicrobial resistance in *Streptococcus mutans* isolated from pediatric cancer patients following hematopoietic stem cell transplantation

○小川ひかり，後藤花奈，平野慶子，小林優子，仲野道代

Hikari Ogawa, Kana Goto, Keiko Hirano ,Yuko Kobayashi, Michiyo Matsumoto-Nakano

（岡大・医歯薬・小児歯）

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

【目的】

造血幹細胞移植は小児がんの治療法の一つである.移植前処置として大量化学療法や放射線療法を行うことから,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.本研究では,齲蝕原性細菌である *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,その中から抗菌薬耐性を持つ *S. mutans* に対して生物学的特性を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. 最小発育阻止濃度（MIC）の測定

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）液体培地で 37℃で一晩培養した後,5×10^4 CFU に調整し,薬剤感受性検査用ドライプレートの各ウェルに分注した.37℃で 24 時間培養し,MIC を測定した.

2. RNA シーケシング

抗菌薬耐性を持たない,および抗菌薬耐性を持つ *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.

3. 蛍光プローブによる細胞膜流動性の解析

日本人小児の口腔より分離された *S. mutans* MT 8148 株と抗菌薬耐性を持つ *S. mutans* を対数増殖期初期まで培養した後遠心分離し,塩化ナトリウムリン酸緩衝液にて吸光度 600 nm が 0.2 になるように調整した.蛍光プローブ N-Phenyl-2-naphthylamine を添加し,遮光して 30 分反応させた.その後,上清を取り除き 2 回洗浄し,96 穴蛍光測定用プレートに分注し,蛍光偏光度を励起光 355 nm/ 蛍光 460 nm で測定した.

【結果】

患児から分離された *S. mutans* 51 株中 MT8148 株と比較し,各種抗菌薬耐性を持つ株は 15 株であり,術前での抗菌薬耐性を持つ株の割合は 21.7%（5/23 株）,術後 1 か月は 100%（7/7 株）,術後 3 か月では 14.2%（3/21 株）であった.術後 1 か月に分離された全ての *S. mutans* では ,β ラクタム系合剤,ペニシリン系,セフェム系に 100%,カルバペネム系に 87.5%で耐性を認めた.また,抗菌薬耐性を持つ術後 1 か月の *S. mutans* において,抗菌薬耐性を持たない *S. mutans* と比較し,2 倍以上発現が上昇した遺伝子は,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.その中には,薬剤排出に関与する薬剤透過酵素をコードする遺伝子が含まれ,その発現が 47 倍上昇していた.さらに,抗菌薬耐性を持つ全ての *S. mutans* 株は MT8148 株と比較し有意に細胞膜流動性の低下を認めた.

【考察】

術後 1 か月の *S. mutans* では,RNA シーケシング解析の結果より,多くの ABC トランスポーターのおよび薬剤透過酵素の発現が上昇していたことから,細胞内の抗菌薬の排出が亢進している可能性が示される.一方で,細胞膜流動性が低下したことは,細胞外の抗菌薬を取り込みにくくなることで抗菌薬に対して耐性を獲得した可能性も考えられる.今後は更に *S. mutans* 抗菌薬耐性獲得メカニズムについて検討を行う予定である.

非アルコール性脂肪肝炎発症に関連する鉄存在下での *Streptococcus mutans* の性状変化の検討

Analysis of characteristic changes in *Streptococcus mutans* in presence of iron associated with development of nonalcoholic steatohepatitis

○中野聡大，田畑佳子，仲　周平，仲野道代

Sodai Nakano, Keiko Tabata, 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】

明らかな飲酒歴がないにも関わらず肝臓に脂肪が蓄積し，炎症性変化を伴う非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は，肝臓内に過剰な鉄が蓄積し生じる酸化ストレスにより病態が進行することが知られている。一方で，鉄は齲蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* などの細菌を含め，ほとんどの生物の生存と増殖に不可欠な微量栄養素である。

我々はこれまでに，*S. 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）を保有する菌株が，NASH 増悪化に関与する可能性を報告してきた。本研究では，重度 NASH 患者口腔内から分離した *S. mutans* の鉄存在下における性状の変化を検討した。

【材料および方法】

1. 供試菌 ： 本研究は，市立奈良病院倫理委員会（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。供試菌として，重度 NASH 患者口腔分離株である *S. mutans* KT3 (Cnm^+/PA^+)，日本人小児口腔由来分離株 MT8148 (Cnm^-/PA^+)，および抜歯後の菌血症患者からの血液分離株 TW295 (Cnm^+/PA^-）を用いた。

2. 増殖能の検討 ： 各供試菌を，Todd Hewitt（TH）液体培地 あるいは 1, 2.5, 5, 10 μM に調整した塩化鉄（III）溶液を添加した TH 液体培地に播種し，濁度を波長 550 nm の吸光度で 1 時間毎に測定した。

3. 鉄存在下での Cnm および PA の発現量の検討 ：KT3 を同様に調整した塩化鉄（III）溶液を添加した TH 液体培地にて対数増殖期まで培養後，RNA 抽出を行った。 抽出した全 RNA から 染色体 DNA を除

去し，逆転写により cDNA を合成した。作製した cDNA を用いて，各供試菌の Cnm をコードする遺伝子 *cnm* および PA をコードする遺伝子 *pac* の増幅過程を Real-time Reverse transcription-PCR（RT-PCR）法により調べ，定量的遺伝子解析を行った。

【結果】

塩化鉄（III）溶液を添加した KT3 群および TW295 群では，濃度別では有意な差は認められなかったものの，添加していない群と比較して，増殖速度の増加が認められた（$P < 0.05$, $P < 0.01$）。一方で，塩化鉄（III）溶液を添加した MT8148 群と添加していない群では，培養後 5 時間目までは増殖速度に有意な差は認められず，塩化鉄（III）溶液の濃度別でも有意な差は認められなかった。また，KT3 群における *cnm* の発現量は，10 μM の塩化鉄（III）溶液を添加した群が塩化鉄（III）溶液を添加していない群のものと比較して有意に低い値を示した（$P < 0.05$）。さらに，*pac* の発現量は，5 および 10 μM の塩化鉄（III）溶液を添加した群が塩化鉄（III）溶液を添加していない群のものと比較して有意に低い値を示した（$P < 0.05$）。

【考察】

本研究の結果より，鉄存在下において，Cnm を保有する *S. mutans* 株の増殖速度が有意に高くなることが明らかとなった。しかし， *cnm* の発現量は，塩化鉄（III）溶液を添加した群が，塩化鉄（III）溶液を添加していない群と比較して有意に低い値を示したことから，Cnm の発現量が低下することでその他の菌体表層タンパクの発現量が増加し，増殖能が高くなる可能性が示唆された。今後は，Cnm を保有する *S. mutans* 株の鉄存在下での変化を分子生物学的解析を行い検討する予定である。

Streptococcus mutans におけるサイクロデキストランの酵素活性阻害効果のメカニズムの検討

Mechanism of cyclodextran for inhibition of *Streptococcus mutans* enzyme activity

○松浦沙久矢，浅海春華，仲野道代

Sakuya Matsuura , Haruka Asaumi , Michiyo Matsumoto-Nakano

（岡大・医歯薬・小児歯）

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

【目的】

齲蝕の予防法として，スクロースの代わりとなる代用糖の利用があげられるが，少量でもスクロースが存在していると齲蝕発生のリスクが残る．環状イソマルトオリゴ糖であるサイクロデキストラン（Cycloisomaltooligosaccharide；CI）は，7～12 個のグルコースがα-1,6 結合で環状に連結した構造を示す．齲蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* はグルカン合成酵素（Glucosyltransferase; GTF）を産生し，そのうちの GTFB をコードする *gtfB* 遺伝子には，スクロースをグルコースとフルクトースに加水分解する酵素活性中心となる触媒領域（CAT）と，分解されたグルコース残基が結合するグルカン結合領域（GBD）が存在し，スクロースから不溶性グルカンを合成する．これまでの研究において，CI を添加すると，CI は不溶性グルカンの合成を阻害しバイオフィルムの形成量が低下することが明らかにされている．本研究では，スクロース存在下での CI の酵素活性阻害効果のメカニズムについて検討したのでこれを報告する．

【対象と方法】

1.CAT 領域の断片タンパクの作成

本研究は，岡山大学組換え DNA 実験安全管理委員会の承認（課題番号: 20098）を得て行った．*S. mutans* MT8148 株の *gtfB* 遺伝子 の CAT 領域を GST 融合タンパク発現用ベクター pGEX6P-1® に挿入したプラスミドを作製し，このプラスミドをタンパク発現用大腸菌 *Esherichia coli* BL21 に形質転換し，得られたコロニーを Luria-Bartani 液体培地にて大量培養した. 遠心分離によって得られた菌体を PBS にて懸濁し，超音波発生器にて破砕した．遠心分離により得られた上清をカラムクロマトグラフィーにて精製し，得られたタンパクをリコンビナント CAT (rCAT) として使用した.

2．ソモギー・ネルソン法を用いた還元糖の定量

2.5% スクロースを滅菌精製水に添加し， rCAT と CI を最終濃度が 0～1% となるように段階希釈したものと混合し，1 時間反応させた．各反応液にソモギー銅液を添加し，20 分煮沸した後，ネルソン液を添加し，15 分間静置した後，吸光度 500 nm を測定し，還元糖を定量した．また，滅菌精製水に rCAT と CI を最終濃度が 0%，0.25%，0.5%，1% となるように混合し 1 時間反応させ，1%スクロース，1% マルトース, および 1% フルクトースを添加した各反応液を，上記と同様の方法を用いて還元糖を定量した.

【結果】

2.5% スクロースを添加した rCAT に CI を添加すると，還元糖の産生量は濃度依存的に有意に低下した．また，rCAT と CI を混合した反応液に 1% マルトース，1% フルクトースを添加した場合は，還元糖は産生された．しかしながら 1% スクロースを添加した場合では，いずれの濃度の CI でも還元糖は産生されなかった.

【考察】

rCAT と CI を反応させると，還元糖の産生量が低下したことから，CI は CAT 領域に結合することで，阻害効果を発揮する可能性が示唆された．また，CI とスクロースがともに存在することで，阻害効果が増強されることが示された．このことから，スクロースとともに CI を摂取することで，齲蝕の発生を抑制する効果が得られることが示唆された.

コラーゲン結合タンパク Cnm とヒト免疫グロブリンの結合に関する分子生物学的検討

Binding of human immunoglobulin with collagen-binding protein Cnm – molecular biological investigation

○末原佳奈[1)]，松岡大貴[1)]，仲 周平[1)]，野村良太[2)]，仲野和彦[3)]，仲野道代[1)]

Kana Suehara[1)], Daiki Matsuoka[1)], Shuhei Naka[1)], Ryouta Nomura[2)], Kazuhiko Nakano[3)], Michiyo Matsumoto-Nakano[1)]

([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】

齲蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* の表層には、その病原性に強く関与するコラーゲン結合タンパク（Cnm)、グルカン合成酵素（GTFs)、グルカン結合タンパク（Gbps）が存在する。IgA 腎症は慢性糸球体腎炎の中で最も頻度が高く、糸球体メサンギウム領域への免疫グロブリンの 1 つである IgA の沈着に伴うメサンギウム細胞増多と基質の増生を特徴としており、我々はこれまでの研究でその病態発症に Cnm 陽性 *S. mutans* が関与していることを報告してきた。また、IgA 腎症においては、IgA のサブクラスである IgA1 の沈着が IgA2 よりも有意だとされているが、IgG の顆粒状沈着も報告されている。本研究では、IgA 腎症発症メカニズムの解明のため、*S. mutans* が保有する菌体表層タンパクとヒト免疫グロブリンとの結合を検討した。

【対象と方法】

1. *S. mutans* 菌体表層タンパク: リコンビナント Cnm (rCnm)、GTFB (rGTFB) および GbpC (rGbpC) を実験に供試した。

2. ヒト免疫グロブリン: ヒト免疫グロブリンとして、ヒト由来 IgA1、ヒト由来 IgA2 およびヒト由来 IgG を実験に供試した。

3. *S. mutans* 菌体表層タンパクと IgA1 との結合の検討: 96 穴マイクロプレートの各ウェルに IgA1 を固定後、rCnm、rGTFB、rGbpC を添加し、3 時間静置した。それぞれ抗 Cnm 抗体、抗 GTFB 抗体および抗 GbpC 抗体にて反応させた後、nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate p-toluidine salt (NBT/BCIP) を用いて染色し、波長 570 nm での吸光度を測定した。4. rCnm とヒト免疫グロブリンとの結合の検討: 96 穴マイクロプレートの各ウェルに IgA1、IgA2、IgG を固定後、rCnm を添加し、3 時間静置した。抗 Cnm 抗体にて反応させた後、NBT/BCIP を用いて染色し、波長 570 nm での吸光度を測定した。

【結果】

プレート上の IgA1 に PBS および各表層タンパクを作用させた結果、rCnm とのみ結合が認められ、PBS、rGTFB、rGbpC では結合は認められなかった。プレート上の IgA1、IgA2 および IgG に rCnm を作用させた結果、IgA1 との結合が最も強く認められ、IgA2 および IgG との結合の程度は、IgA1 と比較して約 50% 程度であった。

【考察】

本研究の結果より、*S. mutans* の保有する菌体表層タンパクのうち Cnm のみが IgA1 との特異的な結合能を有していることが明らかとなった。これにより、コラーゲン結合能を有する Cnm と IgA が結合して免疫複合体を形成することで糸球体メサンギウム領域に沈着し、IgA 腎症発症に寄与している可能性が示唆された。

【会員外共同研究者】

三﨑太郎（聖隷浜松病院腎臓内科）
長澤康行（兵庫医科大学総合内科）
伊藤誓悟（自衛隊入間病院診療部内科）

Streptococcus mutans のバイオフィルム形成におけるコンクール F® の抑制効果の検討

Mechanism of ConcoolF® for suppression of biofilm formation by *Streptococcus mutans*

○薬師寺麻里奈，後藤花奈，仲野道代

Marina Yakushiji, Kana Goto, Michiyo Matsumoto-Nakano

（岡大・医歯薬・小児歯）

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

【目的】

齲蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* の表層には、グルコシルトランスフェラーゼ（Glucosyltransferase；GTF）が存在し、GTF はスクロースを分解し、グルカンを合成する。合成されたグルカンは菌の歯面への付着を促し、堆積することでバイオフィルムが形成される。成熟したバイオフィルムの中では、*S. mutans* がスクロースを分解し、酸を産生することで歯の表面が脱灰され、齲蝕が発生する。含嗽剤であるコンクール F® は、*S. mutans* の増殖を抑制することが報告されている。本研究では、コンクール F® とその主要な構成成分を用いて、*S. mutans* によるバイオフィルム形成抑制効果について検討したのでこれを報告する。

【対象と方法】

１．コンクール F® とその構成成分の調整

コンクール F®（ウエルテック株式会社より提供）を、0.1、0.25、0.5、1.0%に希釈し用いた。また、この構成成分であるグルコン酸クロルヘキシジンを、コンクール F® 中に含まれる濃度を 100%とし、同様に希釈し使用した。

２．バイオフィルム形成量の検討

日本人小児由来の *S. mutans* MT8148 株（血清型 *c*）を供試菌として使用した。コンクール F® およびグルコン酸クロルヘキシジンの最終濃度が 0～1.0%となるように段階希釈し、0.5%もしくは 1%スクロース含有 Todd-Hewitt（TH）液体培地に播種した後、プレートにて 37℃で 48 時間培養した。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、吸光度 570 nm で測定した。

３．バイオフィルム構造の観察

コンクール F® およびグルコン酸クロルヘキシジンの最終濃度が 0～0.5%となるように添加した 0.5%スクロース含有化学合成培地にヘキシジウムイオダイドを用いて染色した供試菌を懸濁し、OD を 0.1 に調整した。この菌液をヒト唾液タンパクでコーティングしたチャンバースライドに分注し、37℃で 24 時間培養後、共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察し、ImageJ® を用いて密度を算定した。また、供試菌を SYT® 9 green fluorescent nucleic acid で染色した後、Alexa Fluor® 647-labeled dextran を加えた 0.5%スクロース含有化学合成培地で調整した。コンクール F® またはグルコン酸クロルヘキシジンの最終濃度が 0.1～0.5%になるように添加し、37℃で 24 時間培養し、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。

【結果】

バイオフィルム形成量は、コンクール F® およびグルコン酸クロルヘキシジンの添加に伴い、濃度依存的に減少した。コンクール F® およびグルコン酸クロルヘキシジンともに、非添加の場合と比較して、0.25%

以上の添加により減少率は最大となった。また、バイオフィルム構造は、コンクール F® およびグルコン酸クロルヘキシジンを 0.1%添加することで、密度は有意に減少していた。さらに、バイオフィルム中のグルカン量はコンクール F® およびグルコン酸クロルヘキシジンの濃度が上昇するにつれて著明に減少していた。

【考察】

以上の結果より、コンクール F® およびグルコン酸クロルヘキシジンは、バイオフィルム形成を抑制することが明らかになった。さらに量的変化だけでなく、構造も変化していることが示された。今後はこのメカニズムについて検討する予定である。

Porphyromonas gulae 線毛とバイオフィルム形成能の関連性

Relationship between *Porphyromonas gulae* FimA and biofilm formation

○吉田翔[1)]，稲葉裕明[1)]，野村良太[2)]，仲野和彦[3)]，仲野道代[1)]

Sho Yoshida[1)], Hiroaki Inaba[1)], Ryota Nomura[2)], Kazuhiko Nakano[3)], Michiyo Matsumoto-Nakano[1)]

([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* は犬や猫の歯周病変部位だけでなく，伴侶動物を飼育する人の歯周病変部位から検出されることから，*P. gulae* の感染がヒトの歯周病の発症との関連が示唆されている．歯周病は歯肉縁下に存在する偏性嫌気性グラム陰性菌によるバイオフィルム感染症の 1 つとされる．バイオフィルム内での他の細菌との結合に必要な細菌の病原因子として，線毛が知られている．しかしながら，*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．本研究では歯周病菌 *P. gulae* 線毛とバイオフィルム形成の関連性を検討した．

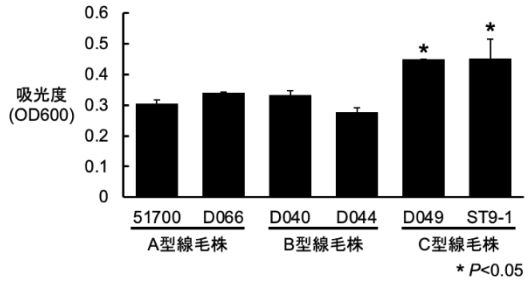
【対象と方法】

P. gulae 51700, D040, D044, D049, D066, ST9-1, D049 線毛欠損株ならびに相補株を供試株とした．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 24 時間嫌気培養した．バイオフィルム形成量は，バイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色し，95%エタノールでクリスタルバイオレットを溶出させ，マイクロプレートリーダーで測定した．バイオフィルム構造は，チャンバースライド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ドで染色後，共焦点レーザー顕微鏡で観察した．バイオフィルム耐久性は，6 穴プレート上で形成された供試菌株バイオフィルムの破砕試験を行い，クリスタルバイオレット法で，バイオフィルム残存量を測定した．

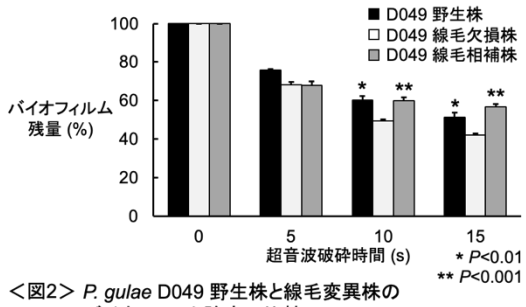
【結果】

C 型線毛保有株は A と B 型線毛保有株と比較して有意にバイオフィルム形成量が高く，厚く高密度のバ

イオフィルムが観察された（図１）．また C 型線毛保有株は物理的刺激に対し，有意に抵抗性を示した．D049 株を用いた線毛欠損株では，バイオフィルム形成量が低下すると共に，物理的刺激の抵抗性も減少した（図２）．



＜図1＞ *P. gulae* 各株のバイオフィルム形成量の比較



＜図2＞ *P. gulae* D049 野生株と線毛変異株の
バイオフィルム強度の比較

【考察】

本研究では，*P. gulae* が形成するバイオフィルムには菌の線毛の存在が不可欠であると共に，線毛遺伝子多型がバイオフィルム形成に寄与することが明らかになった．また病原性が強いと報告されている C 型線毛保有株のバイオフィルムは形成量ならびに物理的刺激抵抗性が高く，C 型線毛保有株が歯周病発症に深く関与している可能性が示唆された．

Streptococcus mutans の膜輸送における新規 ABC トランスポーターの解析

Analysis of novel ABC transporter in *Streptococcus mutans* membrane transport

○後藤花奈, 松浦沙久矢, 仲野道代

Kana Goto,　Sakuya Matsuura, Michiyo Matsumoto-Nakano

（岡大・医歯薬・小児歯）

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

【目的】

齲蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* は、口腔内のバイオフィルム形成において重要な細菌である。この菌は、ヒト口腔内においてあらゆる環境に対応し生育し続け、バイオフィルムを形成し続けることが可能である。これには、必要な栄養素を取り込み、不要な物質の侵入阻害と排出などを行う膜輸送が関与しており、菌の細胞膜上の膜輸送タンパクが重要な働きを担っている。そのタンパクの１つに ATP-binding cassette（ABC）トランスポーターがあり、主として、生育に必要なアミノ酸やイオンの輸送に関与していることが報告されている。本研究では、 *S. mutans* のアミノ酸配列より ABC トランスポーターをコードすると推定される *SMU_1519* 遺伝子を抽出し、機能解析を行ったので報告する。

【対象と方法】

1. *SMU_1519* 欠失変異株の作製

S. mutans UA159 株のデータベースから、ABC 膜輸送体をコードすると推定される *SMU_1519* 遺伝子を抽出した。*SMU_1519* の上流および下流領域、およびスペクチノマイシン耐性カセット断片を PCR にて増幅した。オーバーラップ PCR で 3 つの DNA 断片を連結させ、精製した。PCR 産物を MT8148 株に形質転換することにより *SMU_1519* 欠失変異株（Δ*1519* 株）を作製し、実験に供試した。

2. 蛍光プローブによる細胞膜流動性の解析

対数増殖期初期まで培養した供試菌を遠心分離し、塩化ナトリウムリン酸緩衝液にて吸光度 600 nm が 0.2 になるように調整した。蛍光プローブ N-Phenyl-2-naphthylamine を添加し、遮光して 30 分反応させた。その後、上清を取り除き２回洗浄し、96 穴蛍光測定用プレートに分注し、蛍光偏光度を励起光 355 nm/ 蛍光 460 nm で測定した。

3. 最小発育阻止濃度（MIC）の測定

供試菌を 37℃で一晩培養した後、1 ウェルあたり 3×10^5 CFU になるよう調整した。96 穴プレートにて各種抗菌薬をミューラーヒントン培地で段階希釈した後、供試菌を添加した。37℃で 24 時間培養し、MIC を測定した。

4. 透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope；TEM）による細胞表層の観察

供試菌を 37℃で一晩培養した後、細胞を 0.1M のリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で洗浄し、2.5% グルタルアルデヒドで固定した。脱水後、細胞を Epon に包埋し、超薄切片を作製し、H-300 電子顕微鏡を使用し、観察を行った。

【結果】

蛍光プローブによる細胞膜の流動性は、MT8148 株と比較して Δ*1519* 株では有意に低かった。また、MIC の測定では Δ*1519* 株は MT8148 株と比較し、バンコマイシン、クロラムフェニコール、およびテトラサイクリンに対し感受性の上昇を認めた。さらに、TEM における細胞表層の観察において MT8148 株と比較し、Δ*1519* 株は細胞壁の厚さが減少していた。

【考察】

以上の結果から、*SMU_1519* がコードするタンパクは細胞膜上に存在する ABC トランスポーターであることが示唆された。今後は、*SMU_1519* の詳細な機能についてさらに検討を行う予定である。

ラット IgA 腎症モデルにおける各種臓器での遺伝子発現の網羅的解析
Comprehensive analysis of gene expression in organs of IgA nephropathy rat model

○松岡大貴 [1)], 末原佳奈 [1)], 仲　周平 [1)], 野村良太 [2)], 仲野和彦 [3)], 仲野道代 [1)]
Daiki Matsuoka[1)], Shuhei Naka[1)], Ryouta Nomura[2)], Kazuhiko Nakano[3)], Michiyo Matsumoto-Nakano[1)]

([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】

齲蝕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、そのひとつにコラーゲン結合タンパク（Cnm）が挙げられる。IgA 腎症は慢性糸球体腎炎の中で最も頻度が高く、その病態発症には Cnm 陽性 *S. mutans* が関与していることが報告されている。IgA 腎症の発症機序の詳細は未だ不明であるが、過剰産生された IgA が糸球体メサンギウム領域に沈着して発症することが明らかとなっている。本研究では、ラット動物モデルを用いて Cnm タンパクを投与した際の、腎臓および IgA の主要な産生部位である小腸と脾臓における遺伝子発現の変化を検討した。

【対象と方法】

1. 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 およびリコンビナント Cnm (rCnm) 200 μg を投与した。投与後 45 日に屠殺し、腎臓、小腸および脾臓を摘出した。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 抗体を用いて免疫染色を行った。

2. 各臓器からの RNA 抽出: 免疫染色により rCnm 投与群で糸球体メサンギウム領域に IgA の沈着が認められたラットおよび PBS 投与群のラットから摘出した腎臓、小腸、脾臓より、通法を用いて RNA 抽出を行った。

3. RNA シークエンス: ライブラリの調製は、SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian を用いて行い、NovaSeq 6000 シーケンサーにより RNA シークエンスを行った。各遺伝子発現の変動の解析は遺伝子発現比により行い、発現比が 2.0 以上の遺伝子を発現量増加、-2.0 以下の遺伝子を発現量減少とした。

【結果】

腎臓糸球体の免疫蛍光染色において、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。RNA シーケンスでは、PBS 投与群と比較して rCnm 投与群では全 17312 個の遺伝子のうち 2601 個（15.0%）の発現の増加と 2463 個（14.2%）の減少が認められた。さらに、腎臓では腎炎のバイオマーカーである ケモカインの発現が増加しており、小腸および脾臓ではインテグリン、デコリンなどのコラーゲン結合活性に関わる遺伝子の発現が増加していた。また、腎臓では インターフェロン、小腸ではディフェンシン、腎臓、小腸および脾臓では C 型レクチン受容体などの免疫応答に関与する遺伝子の発現の減少が認められた。

【考察】

本研究の結果から、ラット静脈内に Cnm を投与することで IgA を産生する臓器での遺伝子発現が変化し、IgA 産生に関わる免疫系の変化が生じることにより、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。

非アルコール性脂肪肝炎患者由来 *Streptococcus mutans* の各臓器における分布とその特性に関する検討

Distribution and characteristics of *Streptococcus mutans* derived from nonalcoholic steatohepatitis patients in various organs

○田畑佳子，仲　周平，中野　聡大，仲野道代
Keiko Tabata, Shuhei Naka, Sodai Nakano, Michiyo Matsumoto- Nakano

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

【目的】

非アルコール性脂肪肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis; NASH）は，肝臓に脂肪が蓄積する非アルコール性脂肪肝（Non-alcoholic fatty liver; NAFL）に加えて，炎症性細胞浸潤や肝細胞障害を伴う病態を指す．NAFL は NASH へと病態が進行し，その機序として，肝組織内のみならず，脂肪組織などの肝外臓器との相互作用が注目されている．近年，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）を保有する齲蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* の，NASH 発症への関与が報告された．本研究では，NAFL および NASH 患者より分離した *S. mutans* をマウスモデルに投与し，肝臓および脂肪組織への付着を調べるとともに，それら菌株の分子生物学的解析を行った．

【材料および方法】

1. 動物実験：市立奈良病院で NAFL および NASH と診断された患者口腔内より分離し同定した *S. mutans* KT3（Cnm^+/PA^+）株，KT2（Cnm^+/PA^-）株，KT4（Cnm^-/PA^+）株，KT44（Cnm^-/PA^-）株を，6 週齢 C57BL/6J マウスに高脂肪食を 4 週間給餌後，頸静脈より投与した．菌投与 1 時間および 3 時間後に採血し，屠殺後，肝臓，内臓脂肪，および皮下脂肪を摘出した．各臓器を破砕後，Bacitracin 含有 Mitis – Salivarius 寒天培地に播種し，37℃ で 48 時間培養後， 培地上のコロニー数を計測した．全ての臓器は重量（g）で，血液は量（ml）で換算した．なお本研究は，同病院倫理委員会（番号 32）および岡山大学動物実験委員会（第 OKU-2022865）の承諾後，実施した．

2. 各供試菌の *cnm* および *pac* の発現量：各供試菌を BHI 液体培地にて吸光度 550 nm で対数増殖期後期まで培養後，全 RNA を回収した．逆転写により合成した cDNA を鋳型として，各供試菌の *cnm* および PA をコードする遺伝子 *pac* の発現量を Real-time Reverse transcription-PCR 法により調べた．

3. 各供試菌の増殖速度：各供試菌を Todd Hewitt (TH) 液体培地で 37℃，12 時間培養した後，継代培養し，菌液の濁度を吸光度 550 nm で 1 時間毎に測定した．

【結果】

全ての菌株が，全ての臓器から検出され，そのうち肝臓から検出される菌量が，他の臓器と比較して最も高かった（P <0.001）．また菌株別では，KT3 株の菌量がその他の菌と比較して有意に多かった（P<0.01）．各菌株の *cnm* 発現量および *pac* 発現量を比較検討したところ，KT3 株の *cnm* 発現量は KT2 株と比較して有意に低く（P <0.01），*pac* 発現量は KT4 株より有意に低かった（P <0.05）．また KT3 株の増殖速度は，KT2 株および KT44 株と比較して有意に高いことが明らかとなった（P<0.05）．

【考察】

以上の結果より，*cnm* 発現量および *pac* 発現量が低く，増殖能が高い *S. mutans* の方が血中に侵入した場合，より多くの菌が肝臓に侵入し付着することで NASH 発症に寄与する可能性が示唆された．今後は，各臓器に到達した *S. mutans* の生物学的変化を比較検討し，さらに詳細なメカニズムを明らかにする予定である．