

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

○小川ひかり，後藤花奈，森川優子，仲野道代

【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、*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。

【方法】

1. バイオフィーム形成能

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

S. mutans 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 μ l ずつ分注し、37°C で 24 時間培養後、最小発育阻止濃度を測定した。

3. RNA シーケシング

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】

バイオフィーム形成能は術前と比較して、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 か月と比較して、術後 1 か月では β ラクタム系合剤などの抗菌薬に対する耐性を認めた。抗菌薬耐性のある *S. mutans* において発現が上昇した遺伝子は、膜輸送体に関連する遺伝子であった。

【考察】

術前と比較して術後においてバイオフィーム形成能や抗菌薬耐性の上昇を認めた。これは RNA シーケシングの結果から、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、*S. mutans* の抗菌薬耐性獲得メカニズムを解明する予定である。

非アルコール性脂肪肝炎患者から分離した *Streptococcus mutans* の
増殖能に鉄イオンが及ぼす影響について

○中野聡大¹, 田畑佳子¹, 仲 周平², 仲野道代¹
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児歯科学分野¹
岡山大学病院 小児歯科²

【目的】

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、血液中の過剰鉄が肝臓に蓄積し生じる酸化ストレスを介し発症すると考えられている。これまでに、齧蝕原性細菌 *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) の両方を有する Cnm⁺/PA⁺ 株が、NASH 発症に関与している可能性を報告した。本研究では、NASH 患者口腔内より分離した *S. mutans* 株の増殖能に鉄イオンが及ぼす影響について検討した。

【方法】

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) の承認後実施した。市立奈良病院で NASH と診断された患者から分離した *S. mutans* KT3 (Cnm⁺/PA⁺), MT8148 (Cnm⁻/PA⁺), および TW295 (Cnm⁺/PA⁻) を実験に供試した。Todd Hewitt (TH) 液体培地にてあらかじめ培養した菌液を各種濃度の塩化鉄 (III) 六水和物を添加した 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。

【結果】

KT3 は、MT8148 および TW295 と比較して増殖速度の遅延を認めた。1 μM 以上の塩化鉄を添加した場合には、KT3 および TW295 の増殖速度は添加していない場合と比較していずれも上昇を認め、MT8148 と同程度となった。一方で、MT8148 は、塩化鉄を添加した場合に増殖速度に変化は認められなかった。

【考察】

本研究の結果より、血中や肝臓組織中に鉄イオンが豊富にある環境において、血液中に侵入した Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* 株の増殖能が高くなることが、NASH 発症に何らかの関連を持つ可能性が示唆された。

Streptococcus mutans の抗菌薬耐性メカニズムに関連するオペロンの解析

○松浦沙久矢¹, 浅海春華², 後藤花奈², 仲野道代¹

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児歯科学分野¹
岡山大学病院 小児歯科²

【目的】

齧蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* は歯面に付着し菌体外マトリックスを生成し、バイオフィルムを形成する。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。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するとされるが、その詳細は明らかでない。本研究では、バイオフィーム形成菌における遺伝子発現を RNA シーケシングを用いて調べ、そのメカニズムに関連すると推定される遺伝子を抽出し、解析を行ったので報告する。

【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. RNA シーケシング解析：供試菌を、1% スクロース含有 Todd Hewitt 液体培地に播種後、37°C で 24 時間培養した。その後、形成されたバイオフィームを剥離、遠心分離しバイオフィー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。その後 RNA シーケシング解析を行い、遺伝子発現状況を確認した。
3. ABC トランスポーター関連遺伝子のオペロンの解析：供試菌を培養し、RNA 抽出を行った。得られた cDNA を鋳型として、*SMU_919* から *SMU_925* の各プライマー、*SMU_1091* から *SMU_1098* の各プライマーを使用し PCR アッセイを行った。

【結果】

バイオフィーム形成菌では、ABC トランスポーターやホスホトランスフェラーゼシステム関連遺伝子、2 成分調節因子の関連遺伝子である *comC* の発現量が上昇していた。また ABC トランスポーター関連遺伝子と推測される *SMU_922*, *SMU_1094* の発現が上昇していた。PCR アッセイより、*SMU_921*, *SMU_922*, *SMU_923* と *SMU_1095*, *SMU_1096*, *SMU_1097* がそれぞれオペロンを形成していることが明らかとなった。

【考察】

これらの結果よりバイオフィーム形成菌において 2 成分調節因子システムが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おり、これらは何らかの機能を持つ可能性があることが示唆された。