

日時：9月5日（金）12:50～18:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「微生物学」（MP1-52～70）

MP1-52 「エリスリトール・硝酸カリウム併用が *Neisseria* 属増加を伴う健康型口腔フローラを形成する」赤津 友基¹、藤井 明彦¹、惣野 初美¹
(¹ 花王 ヒューマンヘルスケア研)

【目的】歯周病は口腔菌叢のdysbiosisが関与する。我々は軽度歯周病時の歯肉縁下では硝酸還元菌が減少するとともに、良好な歯周組織を保つ高齢者では硝酸還元菌が豊富な菌叢を形成していることを報告した。さらに、硝酸還元菌の一種*Neisseria*に歯周病菌の感染阻害作用があることを見出した。これらの知見を踏まえ、*Neisseria*に着目した健康型口腔フローラ形成方法の開発を検討した。

【検討1：歯垢BFモデル評価】歯垢*ex vivo* BFモデルと16S rRNA解析を用いて*Neisseria*を増加させる有効成分を探索した。その結果、エリスリトール（Ery）と硝酸カリウム（KN03）併用で*Neisseria*と*Haemophilus*属菌種の増加が認められた。このとき*Streptococcus*の減少を伴い、培養上清中の乳酸濃度低下とpH低下抑制も

確認された。

【検討2：ヒト有効性試験】花王（株）社員を対象に2週間の二重盲検RCTを実施した。Ery+KN03洗口剤の使用で唾液中の*Neisseria*が有意に増加し、*Prevotella*の減少が認められた。また、*Neisseria*の変化率は*Prevotella*、*Saccharibacteria*（TM7）[G-1]、*Streptococcus*等の変化率と負相関を示した（ $r < -0.4$ ）。

【考察】EryとKN03の併用は、*Neisseria*の増加を伴い歯周病菌やう蝕菌を抑制する可能性が示された。*Neisseria*は主要な硝酸還元菌の一種であることから、EryとKN03の使用は硝酸還元菌優位な健康型口腔フローラ形成を促し、予防歯科のさらなる発展に寄与する可能性がある。

MP1-53 「*Stenotrophomonas maltophilia* の口腔内からの分離と性状解析に関する包括的な報告」西濱 早紀¹、松尾 美樹²、柴 秀樹¹、小松澤 均²(¹ 広大院医系科学 歯髄生物、² 広大院医系科学 細菌)

*Stenotrophomonas maltophilia*は多剤抗菌薬耐性を有する院内感染の起炎菌として知られており、菌血症や呼吸器感染症における粗死亡率は時に50%を超える。我々の研究室では、第65回歯科基礎医学会学術大会にて、ヒト口腔に多剤耐性*S. maltophilia*が高い割合で常在することを報告した。これは、口腔多剤耐性*S. maltophilia*による血流感染や誤嚥性肺炎による敗血症を惹起する可能性を示唆している。本研究では、口腔由来多剤耐性*S. maltophilia*の特徴を解明する目的で、口腔から分離した臨床分離株30株の性状解析及びRNA sequence解析を行った。結果、全ての株はバイオフィルムを形成し、

形成量に多様性を認めた。自己凝集や人工唾液凝集は菌株特異性があり、*Streptococcus mutans*等の口腔内細菌と共凝集した。遺伝子発現解析の結果、バイオフィルム形成と凝集は、鞭毛やIV型線毛の形態と運動関連因子の遺伝子発現と関連する可能性が示唆された。本研究では口腔由来*S. maltophilia*の性状および関連因子に関して、知り得る限り初めての包括的報告を行った。本研究結果から、口腔は*S. maltophilia*がヒト感染症を引き起こす重大な潜伏先である可能性があり、口腔は感染制御において重要であることが示唆された。（会員外共同研究者：鈴木 優仁、Vo Minh Ngoc、川柳 智暉）

MP1-54 「口腔細菌叢の細菌構成と腸内細菌叢の多様性および細菌構成との関連性解析」

山 和馬¹、南木 悠²、堤 康太¹、翠川 優希²、近澤 貴士¹、牧 利一¹、竹田 綾²
(¹ライオン(株) 研究開発本部、²(株)サイキンソー)

【目的】口腔と腸の細菌叢の関係性を明らかにするため、先行文献に基づき分類した2タイプの口腔細菌叢とそれらに特徴的な5属、う蝕・歯周病関連菌に注目し、腸内細菌叢との関連を解析した。

【方法】247名から唾液と糞便を採取し16S rRNA遺伝子V1-V2領域を測定。各属・種の組成比とシャノン多様性指数を算出し、関連性を解析した。

【結果】先行知見と同様に口腔細菌叢は、*Veillonella*属やう蝕関連細菌*S.mutans*の比率が高いタイプ1と、*Neisseria*属比率が高いタイプ2に分類された。各タイプと腸内細菌叢の多様性(腸内では多様性が高いと安定的で良いとされる)との関連解析の結果、タイプ1であると多様性が低く、タイプ2は多様性が高い関係を

見出した。また、タイプ1に特徴的な*Veillonella*は、口腔で比率が高いと腸内から検出されやすく、腸内の多様性が低いこと、*S.mutans*は、口腔で検出されると腸内でも検出されやすいことを明らかにした。一方、タイプ2に特徴的な*Neisseria*は、腸内でほとんど検出されず、口腔で比率が高いと腸内の多様性が高い関係を明らかにした。これら結果は、口腔の細菌構成と腸内の多様性が関連する可能性を示しており、先行文献にて*Neisseria*が特徴的なタイプは口腔疾患リスクが低い可能性が示されていることを考慮すると、口腔疾患リスクが低い状態と、腸内の多様性が高く安定的な状態が関連する可能性が考えられる。

MP1-55 「D- アミノ酸によるう蝕・歯周病原細菌のバイオフィーム形成抑制に関する検討」

川野 亜希¹、八木 孝和¹、黒野 剛²、吉村 徹²、吉田 幸恵¹
(¹神常大 口腔保健、²D アミノ酸ラボ株式会社)

生体内のアミノ酸は主にL体で構成されているが、近年、D体アミノ酸も様々な生理機能を持つことが報告されている。特に、D-セリンは神経伝達、D-アスパラギン酸はホルモン調節に関与し、D-アラニンやD-トリプトファンは免疫応答や感染防御に関与することが注目されている。本研究では、D-アミノ酸が歯科疾患の主要な原因菌に与える影響を明らかにし、う蝕・歯周病に対する新たな治療法の可能性を検討した。供試菌には*Streptococcus mutans* (*S. m.*) および*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) を使用し、D-セリン、D-アラニン、D-アスパラギン酸を用いて、最小発育阻

止濃度(MIC)および最小殺菌濃度(MBC)を測定した。さらに、クリスタルバイオレット染色法によりバイオフィーム形成能への影響を評価した。その結果、D-アスパラギン酸は両菌種に対して濃度依存的に抗菌およびバイオフィーム形成阻害効果を示し、*S. m.*ではMICが12.5 mM、MBCが250 mM、*A. a.*ではMICが31.3 mM、MBCが250 mMと推定された。一方、D-セリンおよびD-アラニンには有意な効果は認められなかった。これらの結果から、D-アスパラギン酸は歯科領域における細菌感染症に対する新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。なお、本研究成果は特許出願中である。

MP1-56 「口腔細菌 *Streptococcus oralis* の単一感染モデルマウスが引き起こす膀胱炎症の病態生理学的解析」

飯岡 康太¹、森崎 弘史²、深町 はるか²、立川 哲史¹、増田 陸雄¹、桑田 啓貴²
(¹昭医大 歯 全身管理 麻酔、²昭医大 歯 口腔微生物)

【目的】口腔内常在細菌である*Streptococcus oralis*は、プラーク形成に寄与する初期定着菌として知られている。一方で、観血的処置や誤嚥により血中や気道に侵入し、心内膜炎や誤嚥性肺炎を引き起こす可能性が示唆されているが、*S. oralis*単独での病態誘導の仕組みは不明である。本研究では、*S. oralis*を用いたノトバイオートモデルマウスを作成し、宿主への影響、特に膀胱炎

症への影響を調べた。

【方法】*S. oralis*を無菌Balb/cマウスに投与し、生まれた仔マウスをノトバイオートマウスとした。各臓器における菌の分布および腸管粘膜の組織学的評価を行った後、膀胱の組織学的評価と排尿パターンを調査した。膀胱組織の遺伝子発現変化は、次世代シーケンサーによるRNAシーケンスおよびqRT-PCRで評価し、膀胱

粘膜下の免疫細胞はフローサイトメトリーで解析した。

【結果と考察】*S. oralis*単独定着マウスでは、口腔に加えて腸管でも菌が検出されたが、血中、肺、膀胱では検出されなかった。軟便や頻尿などの症状が観察され、病理学的解析により膀胱組織の萎縮や浮腫が確認され

た。膀胱組織のbulk RNA発現解析では、慢性炎症関連遺伝子の発現上昇と抗酸化関連遺伝子の発現低下が認められた。以上の結果から、無菌マウスへの*S. oralis*単独感染により、間質性膀胱炎様症状が誘発されることが示唆された。

MP1-57 「*Streptococcus mutans* 感染における自然免疫応答の解析」

岩沼 青葉^{1,2}、豊永 憲司^{1,3}、永尾 潤一^{1,3}、岸川 咲吏^{1,3}、岡 暁子^{2,3}、
田中 芳彦^{1,3}

(¹ 福歯大 機能生物 感染生物、² 福歯大 成長発達 小児歯、³ 福歯大 口腔医学 研究セ)

口腔内に様々な病原微生物が存在していることは広く知られているが、宿主免疫を介してう蝕や歯周病などの病態に至る機構には不明な点が多い。病原体感染に対する宿主防御応答では、まずマクロファージや樹状細胞といった自然免疫細胞が重要な役割を担うが、これらの細胞には病原体センサーとして様々な自然免疫受容体が発現している。これらの受容体はPAMPsと呼ばれる病原体に特徴的な繰り返し構造を認識することから、パターン認識受容体 (PRRs) とも呼ばれる。その解析はToll様受容体 (TLRs) を中心に展開されて

きたが、NOD様受容体 (NLRs) やRIG-I様受容体 (RLRs) などいくつかの受容体ファミリーも加わり、認識するリガンドに関してもタンパク質や核酸、糖鎖など多岐にわたることが明らかとなってきた。

我々は、う蝕原性細菌として知られるミュータンス連鎖球菌*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) による自然免疫活性化に、アダプタータンパク質CARD9が寄与していることを見出した。本演題では、CARD9上流の*S. mutans*認識受容体やそのリガンド、およびう蝕形成におけるCARD9の役割について議論したい。

MP1-58 「*mfa2* 挿入変異により伸長した Mfa1 線毛を発現する *Porphyromonas gingivalis* トランスポゾン変異体の同定」

三輪 尚慶^{1,2}、藤本 実結菜^{1,2}、榮 宏太郎²、岩瀬 智彦²、廣畑 誠人²、内記 良一²、
西川 清²、名和 弘幸¹、長谷川 義明²

(¹ 愛院大 歯 小児歯、² 愛院大 歯 微生物)

【目的】*Porphyromonas gingivalis*はmfa1-5オペロンにコードされるMfa1~Mfa5から構成されるMfa1線毛を有する。Mfa1をコードするmfa1はその配列の多様性により70A型、70B型、及び53型に分類され、70A型Mfa1は約70-kDaの分子量を示す。70A型に分類される標準株のMfa1線毛は100nm程度の長さで菌体表面に強固に結合している。近年、我々は73-kDaのMfa1を発現するD83T3株を新たに同定した。本研究では同株におけるMfa1線毛の特徴を明らかにし、mfa1型分類法の確立に資することを目的とした。

【方法】菌体及び培養上清中のMfa1をウエスタンブロット法により検出した。菌体におけるMfa2の発現や精製線毛中に含まれるMfa3~Mfa5の検出も行った。精製Mfa1線毛を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。

D83T3株ドラフトゲノムで未決定であったmfa1下流領域の塩基配列をダイターミネーター法により決定した。

【結果】D83T3株では、73-kDaのMfa1が培養上清中で強く検出された。TEM観察では1μm以上に伸長した線毛構造が確認された。Mfa2の発現は著しく低下しており、精製線毛中にMfa3~Mfa5は検出されなかった。塩基配列解析の結果、D83T3株のmfa1-mfa2間にトランスポゾンが逆向き挿入されていた。

【考察】D83T3株では、トランスポゾン挿入によりmfa2が不活化され、それに伴い異常に長いMfa1線毛が形成されたと考えられる。本株の特徴は、Mfa1線毛の構造形成におけるMfa2の重要性を示唆している。

MP1-59 「マクロライド誘導体 EM982 の Toll-like receptor 2 シグナルに対する作用解析」

齋藤 瑠郁^{1,2}、土門 久哲^{1,3}、磯野 俊仁¹、寺尾 豊^{1,3}(1)新潟大 院医歯 微生物、²新潟大 院医歯 う蝕、³新潟大 院医歯 高度口腔)

【背景】マクロライド系薬は免疫調節作用を有し、非細菌性の炎症疾患に対しても有効である。しかし、抗菌薬であるが故に頻用には耐性菌出現のリスクが伴う。エリスロマイシン誘導体のEM982は、抗菌性を有さない構造に改変したため、耐性菌を誘発させるリスクが少ない。一方で、マクロライド系薬としての免疫調節作用は保持しており、Toll-like receptor (TLR) 4下流のシグナル伝達分子のリン酸化を抑制、転写因子NF- κ Bの活性化を調節する。本研究ではさらに、TLR2シグナルに対するEM982の影響を解析した。

【方法と結果】TLR2を強制発現するHEK293細胞に、EM982とPam3CSK4 (TLR2/1リガンド) またはFSL-1 (TLR2/6リガンド) を混合添加して培養し、NF- κ Bの活性化に伴い分泌されるアルカリホスファターゼ (SEAP) の活性

を測定した。その結果、各リガンドを単独添加した群と比較して、EM982を混合添加した群ではSEAP活性が有意に低かった。続いて、THP-1細胞にEM982と各TLR2リガンドを混合添加して培養し、培養上清中のサイトカイン濃度をELISAで測定した。その結果、各リガンドを単独添加した群と比較して、EM982を混合添加した群において、炎症性サイトカインIL-6、TNF- α およびIL-8濃度が有意に低かった。

【考察】EM982はTLR2下流のNF- κ B活性化を抑制し、炎症局所のサイトカイン産生を調整することが示唆された。

会員外共同研究者:砂塚敏明、廣瀬友靖、池田朱里 (北里大学)

MP1-60 「*Filifactor alocis* による骨芽細胞からの IL-6 産生と破骨細胞分化誘導」鶴田 侑万^{1,2}、Tongxin Liu^{1,3}、横井 春奈^{1,4}、西岡 貴志^{5,6}、多田 浩之¹(1)東北大 院歯 口腔微生物・免疫、²東北大 病院 卒後研修セ、³東北大 歯、⁴獨協医大埼玉医療セ 共同研究セ、⁵東北大 院歯 リエゾン、⁶東北大 病院 顎口腔画像)

【緒言】歯周病原細菌*Filifactor alocis*は、破骨細胞の活性化により歯周炎の病態形成に関わるが、本菌による骨芽細胞への影響は不明である。本研究は、*F. alocis*による骨芽細胞の炎症誘導ならびに*F. alocis*による骨芽細胞の活性化を介した破骨細胞分化誘導について検討した。

【材料と方法】マウス骨芽細胞株MC3T3-E1をアスコルビン酸含有培地で骨芽細胞へと分化させた。*F. alocis*をBHI培地で嫌気培養した。*F. alocis*生菌、凍結乾燥全菌体およびextracellular vesicles (EVs) 刺激による同細胞のサイトカイン産生をELISA、mRNA発現をRT-qPCRで測定した。また、マウス骨髄細胞由来マクロファージをM-CSF、RANKLとともに*F. alocis*で刺激した骨

芽細胞の培養上清で処理し、破骨細胞分化誘導をTRAP染色で検出した。

【結果】*F. alocis*は骨芽細胞のIL-6 mRNA発現ならびにTLR2依存的にIL-6産生を著明に誘導した。興味深いことに、セルカルチャーインサートを用いて*F. alocis*と骨芽細胞の物理的接触を遮断してもIL-6産生は観察された。また、*F. alocis*で刺激した骨芽細胞の培養上清は破骨細胞分化を著明に誘導した。

【考察】*F. alocis*は骨芽細胞のIL-6産生ならびに骨芽細胞を介した破骨細胞分化を誘導する。歯周炎において、*F. alocis*は骨芽細胞に炎症を誘導し、破骨細胞分化を誘導する可能性が示唆される。

MP1-61 「マクロファージ分泌タンパク質 AIM が肺炎球菌に及ぼす影響の解析」

安井 惟人^{1,2}、平山 悟¹、土門 久哲^{1,3}、寺尾 豊^{1,3}(1)新潟大 院医歯 微生物、²新潟大 院医歯 歯周診断・再建、³新潟大 院医歯 高度口腔)

【目的】わが国では、誤嚥性肺炎を含む肺炎により毎年10万人以上が死亡する。肺炎重症化機序を解明するた

め、肺炎球菌感染マウスの肺胞洗浄液をプロテオーム解析し、感染時に増加する宿主タンパク質群を同定し

た。その中から、マクロファージ由来のAIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) に着目した。AIMは様々な疾患に関連することが知られているが、肺炎球菌性肺炎との関連については報告がない。本研究では、肺炎球菌感染におけるAIMの機能を検索した。

【方法と結果】 AIMと肺炎球菌の結合性を調べるため、菌体に組換えAIMを添加し、菌体画分をウェスタンブロット (WB) した。AIMをCa²⁺及びBSAと共に添加した場合のみ、菌体画分からAIMが検出された。次に、U937マクロファージ細胞に肺炎球菌を添加し、貪食された菌数をコロニーカウント法で測定した。AIM添加

群では非添加群に比較して有意に多くのコロニーを確認した。肺炎球菌は好中球を傷害しエラスターゼ (NE) を漏出させることが知られている。AIMとNEを混合しWBすると、AIMは検出されなかった。

【考察】 AIMはCa²⁺とBSAの存在下で肺炎球菌と結合し、マクロファージによる貪食を促進することが示唆された。また、肺炎球菌感染に伴い放出されるNEは、AIMを分解することが示された。これらの結果から、感染時にAIMを補充することで、肺炎球菌の除去を促進し、肺炎重症化を抑制できる可能性が考えられる。

MP1-62 「空間トランスクリプトミクスによる細菌性肺炎の重症化機構の解析」

石本 由祐^{1,2}、工藤 保誠³、田中 栄二²、住友 倫子¹

(¹ 徳大 院医歯薬 口腔微生物、² 徳大 院医歯薬 顎顔面矯正、³ 徳大 院医歯薬 口腔生命)

高齢者はインフルエンザなどのウイルス感染症に罹患した後、口腔や鼻咽腔に常在する細菌による細菌性肺炎を合併することが多い。また、糖尿病や慢性肺疾患などの加齢関連疾患は、肺炎重症化のリスク因子となる。我々はこれまでに、気道上皮の表層に誘導されるGP96が細菌性肺炎の増悪因子であることを証明した。しかし、感染肺組織におけるGP96の発現や炎症には空間的不均一性が認められ、肺炎病態の解明には感染局所における細胞間のミクロな相互作用の理解が重要であると考えた。本研究では、肺炎の重症化と病態形成につながる分子機構を空間トランスクリプトミクスにより検討した。

ヒト病理検体を用いた空間トランスクリプトーム解析において、GP96の強い発現と免疫細胞浸潤が認めら

れた領域では、炎症応答を促進させる経路に関わる遺伝子群の発現増加を認めた。一方で、細菌のクリアランスに重要なCXCL1とCXCL2の発現は著しく低下した。また、GP96の高発現領域では、炎症老化で注目される線維芽細胞の増殖とコラーゲンの産生を促す創傷治癒経路の活性化を認めた。さらに、プレオマイシン誘発性肺線維症マウスモデルに肺炎球菌を経鼻感染させたところ、コントロール群と比較して、細菌の下気道への伝播と定着、ならびに炎症細胞の浸潤にともなう組織傷害が亢進した。

以上の結果から、炎症老化にともなう気道組織の線維化が高齢者肺炎の重症化の一因である可能性が示唆された。

MP1-63 「変異型 *metK* を有する PAS 耐性結核菌の SAM 合成活性解析」

西谷 悠希^{1,2}、武部 克希³、土佐 郁恵²、中山 真彰²、有村 友紀¹、岡元 邦彰³、大原 直也²

(¹ 岡大 院医歯薬 口腔再建外科、² 岡大 院医歯薬 口腔微生物、³ 岡大 院医歯薬 歯科薬理)

【目的】 結核は日本において減少傾向であるが、世界的には脅威である。これまで、抗結核薬であるPAS人工耐性株をワクチン株BCGにて作製し、*S*-adenosylmethionine (SAM) 合成タンパクをコードする*metK*に点変異が生じていることを明らかにした。本研究では、点変異がMetKの活性にもたらす影響を検証することとした。

【材料と方法】 1) *metK*の変異によるSAM合成量の変化を、菌のライセートを用いて[³⁵S]Met標識にて測定した。2)

野生型および変異型*metK*でスメグマ菌を形質転換し、アフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換カラムを用いて菌体からMetK組換えタンパクを精製した。3) 同定された点変異とMetKの酵素活性との関連を分子動力学計算にて検証した。

【結果と考察】 ライセートを用いたSAM合成量の測定結果より、MetK変異株では野生株に比べてSAM合成量が減少し、MetKの活性の低下が示唆された。MetK変異株

で見られた点変異は、分子動力学計算より、ATP結合ポケットの開閉に影響を与えることで、ATP取り込み、およびSAMの解離への関与が示唆された。最後にスメグマ菌にて野生型および変異型MetK組換えタンパクを

単離・精製した。得られた組換えタンパクを用いて、HPLCにてSAMの合成量を測定し、MetKの比活性を算出し、変異と活性の直接的な関係を検証した。会員外共同研究者：飯島洋(日大 薬)

MP1-64 「肺炎球菌感染における High-Mobility Group Box 1 の解析」

滝澤 史雄^{1,2}、土門 久哲^{1,3}、平山 悟¹、前川 知樹^{1,2,3}、齋藤 瑠郁^{1,4}、
安井 惟人^{1,2}、遠藤 愛^{1,2}、寺尾 豊^{1,3}

(¹新潟大 院医歯 微生物、²新潟大 院医歯 歯周診断・再建、³新潟大 院医歯 高度口腔、⁴新潟大 院医歯 う蝕)

【背景】ダメージ関連分子パターン (DAMPs) は、細胞死や炎症性刺激に伴って細胞外へ放出される分子群であり、パターン認識受容体に結合し炎症反応などを誘導する。本研究では、肺炎球菌感染時に宿主細胞から漏出したDAMPsが、過剰な炎症反応を誘導するという仮説を立て検索を進めた。

【方法と結果】肺炎球菌感染マウスから気管支肺胞洗浄液を採取し、定量プロテオーム解析を行った。その結果、High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) を含む様々なDAMPsの増加が確認された。そこで、肺炎球菌感染マウスの肺組織切片を作製し、ハマトキシリンエオジン染色およびAlexa488標識によるHMGB1などのDAMPs免疫蛍光染色を行った。それらの結果、肺炎球菌感染マ

ウスでは非感染マウスと比較して、肺組織の損傷、損傷部位における多型核白血球の浸潤およびHMGB1の緑染が観察された。続いて、肺炎球菌の膜孔形成毒素ニューモリシン (Ply) をヒト好中球に添加して培養後、培養上清を採取し、Western blottingで解析した。その結果、非添加群と比較してPly添加群でHMGB1が検出された。次に、RAW264.7細胞に組換えHMGB1を添加培養し、培養上清中のTNF- α 濃度をELISAで測定した。その結果、HMGB1添加群では、非添加群と比較してTNF- α の濃度が有意に高かった。

【考察】HMGB1は、肺炎球菌Plyにより好中球の細胞外へ漏出し、周囲マクロファージのTNF- α 産生を増大させ、肺炎の重症化を引き起こすことが示唆された。

MP1-65 「緑膿菌の外膜透過性制御に関わる遺伝子の網羅的解析」

小林 零¹、邱 辰軒¹、永野 恵司¹

(¹北医療大 歯 微生物)

緑膿菌の高い自然耐性の一因として、低い外膜透過性が挙げられる。外膜透過性を亢進させることで、既存の抗菌薬の効果を増強させる可能性がある。本研究では、ランダム変異導入法を用いて、外膜透過性の制御に関わる遺伝子の網羅的探索を試みた。ラフィノース代謝関連遺伝子を導入した緑膿菌PA01株に、トランスポゾンを用いてランダム変異を誘発した。得られた変異株を、ラフィノース（三糖）を唯一の炭素源とする最小培地で連続培養し、増殖速度の速い変異株を選抜した。これらの変異株は、グルコース（単糖）を唯一の炭素源とする最小培地では、親株と増殖速度に差異はみられなかったが、ラフィノースおよびスタキ

オース（四糖）を含む培地では顕著な増殖促進を示した。さらに、変異株は、複数の抗菌薬に対する最小発育阻止濃度 (MIC) が親株の1/2 ~ 1/4に低下した。DNA配列解析により、解析した変異株はすべて、cyclic di-GMP受容体MorAをコードする*morA*遺伝子にトランスポゾンの挿入が確認された。これらの結果は、MorAが緑膿菌の外膜透過性の調節に関与することを示唆する。一方、ラフィノースなどの高分子物質の外膜透過性の制御に関わるOprFポーリンのタンパク質発現量に明確な変化はみられなかった。今後、OprFポーリンの構造変化を含む外膜透過性の亢進機序について、さらに研究を進める予定である。

MP1-66 「壊死性筋膜炎マウスモデルにおいて化膿レンサ球菌の感染が病態形成と腎障害に与える影響」

森 あり沙^{1,2}、広瀬 雄二郎¹、坂東 絢子¹、池田 恵莉¹、大野 誠之^{1,3}、川端 重忠^{1,4}
(¹ 阪大 院歯 口腔細菌、² 阪大 院歯 口外 2、³ 阪大 院歯 バイオインフォ、⁴ 阪大 CiDER)

壊死性筋膜炎を主たる病変とする劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、化膿レンサ球菌の感染によって引き起こされる致死率の高い疾患である。本研究では、マウス壊死性筋膜炎モデルを用い、化膿レンサ球菌が産生する主要な溶血毒素streptolysin S (SLS) およびstreptolysin O (SLO) が病態形成および腎障害に与える影響を検討した。

まず、化膿レンサ球菌5448株を親株 (WT) として、SLS欠失株 ($\Delta sagA$)、SLO欠失株 (Δslo)、およびSLS・SLO二重欠失株 ($\Delta sagA\Delta slo$) を作製した。各菌株を定常期まで培養し、PBSに再懸濁後、マウス後肢に筋

肉注射した。感染24時間後のマウス後肢には明らかな病変は認めなかったが、感染48時間後にはWT感染群および Δslo 感染群で $\Delta sagA\Delta slo$ 感染群と比較して重度な病変を認めた。血中IL-6、TNF α 、IL-1 β 、横紋筋融解の指標であるミオグロビンおよび腎障害の指標であるBUN濃度は、感染24時間後の時点で非感染群および $\Delta sagA\Delta slo$ 感染群に比べてWT感染群において有意に上昇していた。

以上の結果から、SLSおよびSLOは壊死性筋膜炎モデルにおいてサイトカインストーム、横紋筋融解、それに伴う腎障害に寄与している可能性が示唆された。

MP1-67 「病原真菌 *Candida albicans* のバイオフィルムに対する抗真菌薬と消毒薬の効果の検証」

浦崎 奈緒^{1,2}、永尾 潤一^{2,3}、岸川 咲吏^{2,3}、田中 芳彦^{2,3}
(¹ 福歯大 口腔歯学部 リサーチスチューデント、² 福歯大 機能生物 感染生物、³ 福歯大 口腔医学研究セ)

病原真菌*Candida albicans* (*C. albicans*) は、歯科補綴物などの医療器具にバイオフィルムを形成することで口腔カンジダ症の原因となる。超高齢社会がより深刻になっていく我が国において、口腔カンジダ症の患者数は近年増加しており、社会的関心は高い。口腔カンジダ症は高齢者や免疫不全患者などの生体防御能が著しく低下した易感染宿主において発症する。*C. albicans*のバイオフィルムは、酵母形と菌糸形で形成され、その周囲に多糖を主成分とする細胞外マトリックスが存在する。形成されたバイオフィルムは抗真菌薬

などに対して耐性を示すことが報告されており、治療が困難となるため問題とされている。本研究では、*in vitro*において*C. albicans*のバイオフィルム形成を評価する系を構築し、薬剤 (抗真菌および消毒薬) によるバイオフィルム形成阻害活性および形成されたバイオフィルムに対する抗バイオフィルム活性を評価することを目的とする。我々はこれまでに、いくつかの薬剤がバイオフィルム形成阻害活性あるいは抗バイオフィルム活性を示すことを明らかにしたので報告する。

MP1-68 「口腔 *Rothia* 属による硝酸塩・亜硝酸塩代謝に関する生化学的性質の検討」

柴田 怜^{1,2}、鷲尾 純平¹、江副 和子¹、金高 弘恭²、高橋 信博¹
(¹ 東北大 院歯 口腔生化、² 東北大 院歯 顎口腔矯正)

【目的】ヒト口腔マイクロバイオーーム (OMB) 構成細菌が緑黄色野菜や唾液に含まれる硝酸塩 (NO₃⁻) を抗菌や血管拡張効果を持つ亜硝酸塩 (NO₂⁻) へと代謝変換し、細菌性口腔疾患や循環器疾患の抑制に寄与することに注目が集まっている。我々は、OMB中のNO₃⁻代謝菌を網羅的に探索し、*Actinomyces*属、*Veillonella*属、

*Neisseria*属、*Rothia*属などが主なNO₂⁻産生菌であること、また、*Actinomyces*属や*Veillonella*属のNO₂⁻産生・分解活性が様々な口腔環境因子により影響されることを明らかにしてきたが、その影響は菌種により異なっていた。そこで、多様な代謝能を持ちながらもあまり研究されてこなかった*Rothia*属のNO₂⁻産生・分解活性に

ついて検討した。

【方法】*Rothia dentocariosa*の標準株を通法培地で好気培養し菌懸濁液を作成し、N03-またはN02-を加えた際のN02-産生および分解活性をGriess試薬にて評価した。さらに、諸環境因子（グルコース:Glu、乳酸:Lac、エタノール:Ethといった代謝基質、pH）による影響を解析した。

【結果・考察】Glu、Lac、Eth共存下でのN02-産生活性は、非共存下と比較し、それぞれ約3倍、6倍、1.6倍高かった。一方、pH 7とpH 5での活性はほぼ同じだった。一方、N02-分解活性は産生活性に比べ極めて低かった。以上の結果から、本菌がGlu、Lac、Ethという多様な基質の代謝と共役し、主にN02-産生菌として機能することが示唆された。

MP1-69 「口腔常在細菌 *Veillonella*、*Neisseria*、*Rothia* 属による赤色蛍光物質産生に関する生化学的検討」

志満 雅子^{1,2}、鷲尾 純平¹、江副 和子¹、田中 圭¹、金高 弘恭²、高橋 信博¹
(¹ 東北大 院歯 口腔生化、² 東北大 院歯 顎口腔矯正)

近年、口腔マイクロバイーム (OMB) や初期う蝕の易視覚化に、細菌が発する赤色蛍光 (RF) を利用するQLF法が用いられている。RFは細菌が産生するPorphyrin類に由来するとされているが、その代謝の詳細は不明である。予備実験にて、RF物質産生能を持つ細菌として*Veillonella*、*Neisseria*、*Rothia*属などの多種の常在菌を認めたことから、OMBのRF産生の有無は、必ずしも特定の細菌種によらない可能性が示された。そこで、細菌によるRF産生が、代謝環境中の基質により影響されるかを検討した。

実験には*V.atypica*、*N.mucosa*、*N.sicca*、*R.denticariosa*、*R.aeria*の標準株を用いた。各菌の懸濁液に0.05% 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を添加し、37℃でインキュベ

ト後のRFを410 nm励起光による蛍光スペクトラムで評価した。全菌種において630 nm付近のRFが検出され、RF責任物質はprotoporphyrin IXのようなporphyrin類と考えられた。5-ALAに代わりトリプトン (アミノ酸/ペプチド混合物) を添加すると、5-ALA添加時よりも低いものの同様のRFが検出され、そのRFはグルコースや乳酸の添加によって増加した。以上のことから、これらの細菌はアミノ酸とエネルギー基質から5-ALAを経由してRF責任物質であるporphyrin類を合成し、その合成は環境中の代謝基質により変化することが示され、RFが特定の細菌種によらず口腔内栄養環境によって変化することが示唆された。

MP1-70 「口腔細菌がマウスガード材料エチレンビニルアセテートの変色に及ぼす影響」

大石 明広¹、内記 良一¹、廣畑 誠人¹、西川 清¹、朝倉 正紀^{2,3}、林 裕基³、林 達秀²、近藤 尚知³、長谷川 義明¹
(¹ 愛院大 歯 微生物、² 愛院大 歯 理工、³ 愛院大 歯 冠橋義歯・インプラント)

【目的】歯や顎関節を保護するマウスガード (MG) は、様々な口腔細菌に曝露されることで汚染や変色が懸念される。本研究ではMGに広く使用されているエチレンビニルアセテート (EVA) の変色に及ぼす種々の口腔細菌の影響を検討した。

【方法】2種のグラム陰性嫌気性桿菌*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) 及び*Fusobacterium nucleatum*、3種のグラム陽性通性嫌気性球菌*Streptococcus mutans*、*Streptococcus oralis* 及び*Staphylococcus aureus*を用いた。加熱吸引がEVAの変色に与える影響を評価するため、石膏模型への加熱吸引の有無で比較した。EVAを各菌の培養液に1または2週間浸漬した。変色は色差計によるL*a*b*値の測定から

色差 (ΔE) で評価した。

【結果】*P.g.*との浸漬では1・2週間いずれにおいても ΔE は他菌に比べ有意に高く顕著な色調変化が認められた。また、*P.g.*の1週間の浸漬では加熱吸引の有無で差は認められなかったが、2週間では加熱吸引あり群が有意に高かった。

【考察】EVAの変色は*P.g.*に特異的に引き起こされることが、加熱吸引による加工は長期的にその影響を受けやすくなる可能性が示唆された。今後はEVA変色に関与する*P.g.*の代謝産物の同定を進め、より衛生的なMG使用に向けた基礎的知見の蓄積を目指す。