

14) 内軟骨性骨化における破(軟)骨細胞阻害剤 Bisphosphonateの影響

○奥山 典子, 櫻井 裕子, 杉浦 淳子
伊東 博司, 山崎 章
(奥羽大・歯・口腔病態解析制御)

【目的】内軟骨性骨化は、まず骨端軟骨最先端部軟骨小腔への血管の侵入によって先導される。これに先立ち、軟骨小腔隔壁の吸収は破(軟)骨細胞の働きによるものとされているが、これに関しては疑問点が多い。本研究では、この点を明らかにするために、bisphosphonateによって破骨細胞の機能を阻害したマウスを用いて形態学的に検索したので報告する。

【方法】雌雄のddyマウス、B6C3F1マウスを用い、生後5日、または10日からamino-bisphosphonateであるincadronateを1 mg/kg/dayで5日間、または10日間投与した。またincadronateの代わりにPBSを投与したものを対照群とし、投与終了日の翌日に脛骨および大腿骨を採取し、固定、脱灰、パラフィン包埋し、連続切片を作製した。HE染色、TRAP染色およびType II collagen, VEGF, MMP-9の免疫染色を行った。

【結果】incadronateを投与したマウスではPBSに比べて、骨端軟骨より伸展した一次海綿骨が著しく伸長しており、その効果は生後5日から10日間投与したもので最も顕著であった。しかし骨端-骨幹端境界面ではPBSと同様に軟骨小腔横隔壁が吸収されており、血管の侵入が認められた。また、一次海綿骨への移行についてもincadronate投与による変化が見られなかった。PBS, incadronate投与ともに、骨端-骨幹端境界面には大型で多核のTRAP陽性細胞が見られず、VEGFやMMP-9の陽性反応が強く見られた。

【結論】incadronateを投与して破骨細胞の機能を阻害しても、軟骨小腔横隔壁の吸収には変化が見られなかったため、軟骨小腔の開放に一義的役割を演じているのはMMP-9やVEGFに誘導された血管侵入であり、破骨細胞は関与しないと考えられた。

15) *Streptococcus salivarius*とprolineによる*Candida albicans*の菌糸体形成の誘導

○橋本 勝一, 阿部 行洋, 清浦 有祐
(奥羽大・歯・口腔病態解析制御)

【目的】酵母形から菌糸形に転換する*Candida albicans*の特性は、宿主の防御能に対抗して*C. albicans*の宿主組織内侵襲を有利にし、病原性の発揮に関与するものと考えられている。その菌糸形成の誘導に影響を及ぼす因子については多くの検討がなされているが、口腔内に存在している他の菌種による*C. albicans*の菌糸形成への影響についての報告は少ない。すでに*C. albicans*の菌糸形成が*Streptococcus salivarius*によって誘導されることを報告したが、本誘導にprolineの共存が必須であることが判明したので報告する。

【方法】菌糸形成の被検菌として*C. albicans* A207 (*C. a* A207と略す) および*C. albicans*と共存させる細菌として*S. salivarius* ATCC 7073 (以下*S. s* 7073と略す)の菌株を使用した。*C. a* A207に添加する*S. s* 7073の培養菌体の一部は加熱して死菌とし凍結乾燥を行い全菌体試料とした。残りの菌体はオートクレーブ処理後、遠心により上清と沈渣にわけて凍結乾燥を行った。その上清を*S. s* 7073の菌体抽出成分とし、沈渣を抽出後の残差菌体とした。*C. a* A207の菌糸体形成の観察のための培養には丸底96穴のマイクロプレートを使用した。そのウエルに*C. a* A207の生菌、*S. s* 7073の加熱死菌の全菌体ないし抽出液およびproline含有塩類溶液を加えて培養した。菌糸形成の定量的表現法としてウエル内に付着形成された菌糸の伸長した長さを測定した。菌糸の伸長はウエル側壁よりウエルの中心部に向かう傾向をもちウエル内壁の全面を覆うようになり、その菌糸の集合体はウエル内面に層を形成したように観察される。この層の厚さはウエル側壁から伸長した菌糸の長さに相当するので、顕微鏡下でウエル側壁に張り付いている菌糸層の最上部の部位に焦点を合わせウエル側壁から菌糸の最先端までの長さをマイクロメーターを用いて測定した。

【結果】*C. a* A207は*S. s* 7073全菌体ないし加熱抽出液をprolineを加えた塩類溶液内で培養した場合に限り菌糸体を形成した。

【考察】口腔内には*S. salivarius*とproline rich proteinの存在が認められているが、*C. albicans*の菌糸形成にこれらの口腔内での影響力については、さらに検討が要される。今回の実験結果は*C. a* A207は*S. s* 7073の2菌株間における*C. albicans*の菌糸体の形成を示しているが、*C. albicans*および*S. salivarius*の分離菌株間の影響については検討中である。

【結論】本研究における培養系では*C. a* A207の菌糸体形成に*S. s* 7073の菌体成分に加えてprolineの作用が必須であることが判明した。

16) 歯周病細菌の誤嚥性肺炎への関与

○岡田 萌, 小平 杏子, 鈴木 奈央¹, 阿部 行洋¹
安部 仁晴², 中川 敏浩², 山本 茂久², 清浦 有祐¹
(奥羽大・歯・3年, 口腔病態解析制御¹, 生体構造²)

【目的】歯周病細菌が高齢者の誤嚥性肺炎に関与する可能性が考えられているが、明確ではない。そこで、高齢の肺炎患者の唾液と喀痰中の歯周病細菌をPCR法によって検出し、さらにその病原性についてマウスモデルを使用して検討した。

【材料及び方法】高齢者肺炎患者の唾液と喀痰から抽出したDNAを鋳型として、6種類の歯周病細菌*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*を、各種特異プライマーによってPCR検出した。さらに歯周病細菌をICRマウスに経口および経鼻感染させて、それぞれの菌の*in vivo*における病原性を検討した。

【結果】

1. 高齢者肺炎患者の喀痰と唾液における歯周病細菌の検出

高齢者肺炎患者17名中12名について、喀痰から歯周病細菌が検出された。喀痰中の各種歯周病細菌の検出率は、*P. gingivalis* 29% (5例), *P. intermedia* 11% (2例), *T. forsythia* 52% (9例), *F. nucleatum* 52% (9例), *T. denticola* 23% (4例), *A. actinomycetemcomitans* 35% (6例)であった。唾液と喀痰の検出結果は必ずしも同じではなく、喀痰採取時における唾液混合の問題はないことを確認した。

2. 歯周病細菌の病原性の検討

*P. gingivalis*と*T. forsythia*を同時に感染させた場合には単独感染の場合よりもそれぞれの菌の定着が促進された。

【考察】高齢者肺炎患者の喀痰中に主要な歯周病細菌が認められた。さらに混合感染で菌の定着が促進されたことから、高齢者のような易感染性宿主では複数菌種の歯周病細菌の誤嚥によって肺炎がおこる可能性が示唆された。

17) PCRを用いた*Streptococcus pneumoniae*の遺伝子型分類に関する研究

○阿部 行洋, 鈴木 奈央, 清浦 有祐
(奥羽大・歯・口腔病態解析制御)

【目的】肺炎レンサ球菌*S. pneumoniae*は口腔領域に常在し、日和見感染源として重要である。近年、*S. pneumoniae*の病原遺伝子*lytA*, *ply*を持つ口腔細菌が出現し、誤診を招くとして問題になっている。我々はこれまでに、*S. pneumoniae*に特異性の高い2つのPCRプライマー (spn9802, spn9828)を開発した。本研究では、*lytA*, *ply*, spn9802, spn9828を用いて唾液と喀痰に含まれる細菌をPCR検出し、新しい*S. pneumoniae*のPCR鑑別法を評価した。

【方法】幼児30名, 成人32名, 高齢者30名, 肺炎患者20名の唾液及び肺炎患者の喀痰を採取した。DNAを抽出し、*lytA*, *ply*, spn9802, spn9828によるPCR検出を行った。

【結果】肺炎患者の喀痰のPCRとオプトヒン感受性試験の結果を比較したところ、*lytA*, *ply*, spn9802, spn9828陽性試料からはオプトヒン感受性(典型的な*S. pneumoniae*の性質)を示す分離株が分離された。一方、*lytA*, *ply*, spn9802陽性試料ではオプトヒン抵抗性を示す分離株が分離された。*lytA*, *ply*陽性及び*lytA*, *ply*, spn9828陽性は認められなかった。次に唾液を用いた評価では、4種陽性は、幼児10%, 成人3.1%, 高齢者6.6%, 肺炎患者20%であった。*lytA*, *ply*, spn9802陽性は、26%, 6.2%, 6.6%, 20%であった。*lytA*, *ply*陽性は、20%, 12%, 23%, 0%であった。*lytA*, *ply*, spn9828陽性は認められなかった。