

表1 ■ *M. oralis* Cpn (Cpn-1, Cpn-2) とヒト CCT のアミノ酸配列の相同性 (%)

Cpn サブユニット	CCT1	CCT2	CCT3	CCT4	CCT5	CCT6	CCT7	CCT8
Cpn-1	36.6	33.1	37.8	37.4	36.4	28.8	34.1	35.1
Cpn-2	37.4	33.4	38.4	40.0	39.0	31.4	38.1	33.3

chaperonin containing TCP1 (CCT) の別名で知られており、各サブユニットタンパク質は CCT1~CCT8 と表記される。塩基配列解析の結果、*M. oralis* の Cpn はヒトの各 CCT サブユニットタンパク質と 28.8~40.0% のアミノ酸配列の相同性があり(表 1)、4~8 残基にわたって同一のアミノ酸配列が連続している領域を確認することができた。すなわち、構造解析の結果から、*M. oralis* とヒトの Cpn には分子相同性部分 (molecular mimicry) が存在し、両者の間に交差反応が起こる可能性のあることが明らかになった⁽¹⁸⁾。

古細菌 *M. oralis* の保有する Cpn 分子の抗原性

M. oralis の Cpn とヒトの Cpn が類似した構造であることはわかったが、実際にこの分子に対する免疫応答がヒトの生体内で起こっているのだろうか? 筆者らは、*M. oralis* の組換え Cpn タンパク質を構築・精製した。そして、歯周病患者 36 人から血液を採取し、血清中に *M. oralis* の Cpn に対する抗体が存在するかどうかを調べた。その結果、30 人ならびに 29 人の歯周病患者において、2 種類のサブユニットタンパク質それぞれに対する IgG 抗体が産生されていることが明らかになった⁽¹⁸⁾。この結果は、*M. oralis* が歯周病患者に感染すると、Cpn を標的とした免疫応答が惹起されることを意味する。いいかえると、古細菌菌体の構成成分のなかで、Cpn 分子は抗原性の高い分子のひとつであることが明らかとなった。

ヒトと古細菌 Cpn の交差反応性

古細菌が歯周炎局所に定着すると、ヒトの生体内では古細菌、そして古細菌の保有する Cpn 分子に対する免疫応答が誘導される。そして、古細菌の Cpn 分子のアミノ酸配列はヒトの Cpn と比較的高い相同性をもっていることも明らかとなった。仮説どおりに、交差反応が起こる条件は整ってきたわけであるが、筆者らは市販されている抗 CCT 抗体と *M. oralis* の組換え Cpn タンパク質の反応性から両者の交差反応性を調べてみた。その結果、抗ヒト CCT3 抗体ならびに抗 CCT8 抗体が組換えタンパク質と反応することが明らかになった⁽¹⁸⁾。ヒト

CCT3 ならびに CCT8 サブユニットタンパク質に対して産生された抗体が *M. oralis* の Cpn と反応するというこの結果は、両分子が共通のエピトープをもつ交差抗原であることを意味する。すなわち、実験的には、古細菌の Cpn に対する免疫応答がヒト CCT に交差反応し、自己免疫応答の誘導につながる可能性を示唆することができた(図 5)。

まとめと今後の展望

これまで、古細菌は病原性がない、疾患と関連のない微生物という捉え方が一般的だった。ところが、*M. oralis* とその類縁菌種が歯周病の病態に関与しているという報告が相次ぎ、その関連性が注目されている。また、最近では、根尖性歯周炎と古細菌の関連性も報告されるようになってきている。今後の研究は、病態への関与の仕方、メカニズムへと発展していくことが予想される。古細菌は水素化合物を利用することでプラーク細菌叢に影響を与えることができる。また、その菌体表層には強いアジュバント活性をもった膜脂質が存在する。そして、古細菌の菌体成分には免疫応答を誘導する抗原分子が存在する。その抗原分子のひとつは、これまで感染症との関連性においてまったく着目されることのなかったグループ II Cpn であり、グループ I Cpn と同様にその交差反応性から自己免疫応答を誘導できるポテンシャルをもっている。ほとんどの健常者では、免疫学的寛容* から自己免疫応答が誘導されることはないだろう。しかし、自己免疫疾患患者のように免疫システムに何らかの異常がある宿主では、グループ II Cpn をトリガーとした自己免疫応答が誘導され、歯周病や全身疾患に影響を与える可能性が十分に考えられる。たとえ自己免疫応答が誘導されないとしても、抗原性の強い Cpn は炎症性サイトカインを誘導して歯周組織の破壊に関与しているかもしれない。もちろん、古細菌 *M. oralis* が保有している抗原分子は Cpn のみではなく、膜タンパク質など、一般的に抗原性が高い分子の解析も必要となるだろう。歯周病による組織破壊は、比較的に病原性の弱い細菌が、歯周ポ

*免疫系が自己構成成分など特定の抗原に対して反応性を示さない状態。自己と反応する免疫担当細胞は胎生期から新生期にかけて排除され、自己抗原に対する免疫応答は起こらなくなる。

ケットという特殊な環境に慢性的に定着，細菌叢を形成し，持続的な炎症をひき起こすことで進行する。古細菌の病原性解析はまだまだこれからの段階であるが，この微生物は大変興味深い性質と特徴のある抗原分子を保有している。歯周ポケットに定着した古細菌にどのような免疫応答が誘導されているのか，今後の解析が待たれる。

文献

- 1) 古賀洋介, 亀倉正博 編: “古細菌の生物学”, 東京大学出版会, 1998.
- 2) R. Cavicchioli, P. M. Curmi, N. Saunders & T. Thomas: *Bioessays*, **25**, 1119 (2003).
- 3) S. S. Socransky, A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith & R. L. Jr. Kent: *J. Clin. Periodontol.*, **25**, 134 (1998).
- 4) B. J. Paster *et al.*: *J. Bacteriol.*, **183**, 3770 (2001).
- 5) P. W. Lepp, M. M. Brinig, C. C. Ouverney, K. Palm, G. C. Armitage & D. A. Relman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6176 (2004).
- 6) T. Koutouzis, D. Haber, L. Shaddox, I. Aukhil & S. M. Wallet: *J. Periodontol.*, **80**, 625 (2009).
- 7) C. R. Woese & G. E. Fox: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088 (1977).
- 8) C. R. Woese, O. Kandler & M. L. Wheelis: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576 (1990).
- 9) L. Krishnan, S. Sad, G. B. Patel & G. D. Sprott: *J. Immunol.*, **166**, 1885 (2001).
- 10) H. Hori & S. Osawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 381 (1979).
- 11) N. Belay, R. Johnson, B. S. Rajagopal, E. C. de Macario & L. Daniels: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 600 (1988).
- 12) D. A. Karlin, R. D. Jones, J. R. Stroehlein, A. J. Mastromarino & G. D. Potter: *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**, 573 (1982).
- 13) K. Yamabe, H. Maeda, S. Kokeguchi, I. Tanimoto, N. Sonoi, S. Asakawa & S. Takashiba: *FEMS Microbiol. Lett.*, **287**, 69 (2008).
- 14) U. Feige & W. van Eden: *EXS.*, **77**, 359 (1996).
- 15) R. Kiessling, A. Grönberg, J. Ivanyi, K. Söderstrom, M. Ferm, S. Kleinau, E. Nilsson & L. Klareskog: *Immunol. Rev.*, **121**, 91 (1991).
- 16) H. Maeda, M. Miyamoto, H. Hongyo, A. Nagai, H. Kurihara & Y. Murayama: *FEMS Microbiol. Lett.*, **119**, 129 (1994).
- 17) S. Yokota, D. Hirata, S. Minota, T. Higashiyama, M. Kurimoto, H. Yanagi, T. Yura & H. Kubota: *Cell Stress Chaperones*, **5**, 337 (2000).
- 18) K. Yamabe, H. Maeda, S. Kokeguchi, Y. Soga, M. Meguro, K. Naruishi, S. Asakawa & S. Takashiba: *Mol. Oral Microbiol.*, **25**, 112 (2010).

プロフィール

秋 庸 裕 (Tsunehiro Aki) <略歴>
1994年広島大学大学院工学研究科工業化学専攻博士課程後期修了/1996年同大学工学部助手/2001年同大学大学院先端物質科学研究科助教授/2007年同准教授, 現在にいたる。この間, 1994年米国 NIH 国立がん研究所博士研究員<研究テーマと抱負>脂質とアレルギーの応用生化学<趣味>各種スポーツ, 囲碁

石川 冬木 (Fuyuki Ishikawa) <略歴>
1982年東京大学医学部医学科卒業/同年同大学医学部付属病院研修医/1984年同大学医学部第3内科医局員/同年国立がんセンター研究所発がん研究部研究員/1987年東京大学医学部付属病院第3内科助手/1992年東京工業大学生命理工学部助教授/1998年同教授/2002年京都大学大学院生命科学研究科教授, 現在にいたる。この間, 1990年米国コロラド大学化学生物学部博士研究員<研究テーマと抱負>細胞内外

の環境変化に対するクロマチン反応<趣味>愛犬モモちゃんとベルちゃんと鴨川を散歩すること

石崎 文彬 (Ayaaki Ishizaki) <略歴>
昭和36年九州大学農学部農芸化学科卒業/同年味の素(株)/60年九州大学農学部食糧化学工学科(微生物工学)教授/平成13年(有)新世紀発酵研究所代表取締役社長, 現在, マレーシア・サラワク州にてサゴヤシからのエタノール工場パイロットプラント建設中

一條 秀憲 (Hidenori Ichijo) <略歴>
1985年東京医科歯科大学歯学部歯学科卒業後, 同大学大学院修了, スウェーデン留学, 東京医科歯科大学助手, (財)癌研究会癌研究所研究員, 東京医科歯科大学教授を経て, 2002年東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>細胞がストレスを感じる仕

組みと疾患<趣味>ゆったりキャンプ

植田 浩史 (Hirofumi Ueda) <略歴>
2005年東北大学薬学部総合薬学科卒業/2010年同大学大学院薬学研究科博士課程後期3年修了/同年同助教, 現在にいたる<研究テーマと抱負>複雑な骨格を有する天然アルカロイドの合成<趣味>温泉めぐり, スノーボード, 映画鑑賞

宇野 茂之 (Shigeyuki Uno) <略歴>
1993年日本大学農獣医学部農芸化学科卒業/1995年同大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士前期課程修了/1998年同博士後期課程修了/同年同大学医学部助手/2006年同講師, 現在にいたる。この間, 2000~2002年米国シンシナティ大学メディカルセンター客員研究員<研究テーマと抱負>CYP1ファミリー酵素本来の役割<趣味>スキー, 機器いじり

教育講演Ⅲ

メタン産生古細菌 *Methanobrevibacter* の口腔疾患への関わり

苔口 進、山部 ころろ*、前田 博史*

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

口腔微生物学分野、*歯周病態学分野

要 旨

歯垢は現在ではヒト口腔内の700種を超える細菌種からなる複雑な細菌バイオフィームとして認識されている。口腔内細菌叢の変化はう蝕や歯周病を誘発する病原性を示し、さらに最近の研究によって歯周病と糖尿病や心臓血管障害さらには細菌性肺炎などの健康障害との関連が明らかになってきている。一方、メタン生成古細菌、とりわけ *Methanobrevibacter* 種はしばしばヒト腸管や腔や口腔内からも分離されることから、メタン生成古細菌がヒトの健康や疾病に及ぼす役割について最近、関心が高まっている。そこで我々は古細菌 16S リボソーム RNA 遺伝子を指標に PCR 法で *Methanobrevibacter* 種の日本人の歯周病患者における流行や広がりについて調べた。その結果、歯周ポケット内の *Methanobrevibacter* 種のレベルと歯周病の重症度には相関が認められた。また、ここでは歯周病患者血清 IgG によって認識される *Methanobrevibacter oralis* の分子量 60–70 kDa 免疫原性菌体蛋白 (Group II シャペロニン) の性状や歯周病における役割についても概説したい。今後、*Methanobrevibacter* 種を含む口腔細菌叢の研究を通じて、口腔疾患の治療や予防に、そして健康増進に貢献してゆきたい。

検索用語：メタン生成古細菌 *Methanobrevibacter oralis* 歯周病

はじめに

健康な食生活を支える口腔は消化管（胃、腸管）へと通じる食物の入り口であることから、健康の窓（入り口）として取り上げられている。咀嚼や唾液分泌などの健全な口腔機能は食物の消化吸収を支え、ひいては全身健康や脳機能までも影響を及ぼしていることが最近の研究では示されている。一方、歯の喪失に関わる口腔二大疾患としてう蝕と歯周病が挙げられるが、中でも歯周病は口腔局所の慢性炎症疾患だけでなく、糖尿病、心臓・血管疾患、妊娠障害や誤嚥性肺炎をはじめとして様々な全身疾患や健康にも影響することが現在、注目されている。歯周病の病因菌が生息する歯肉縁下プラークを構成する複雑な細菌叢については、これまでは嫌気培養法を中心に解析が進められてきた。その結果、Socransky らは *Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia* というトリプシン様蛋白分解酵素を産生するグラム陰性偏性嫌気性細菌の

3 菌種 (Red Complex) を最も歯周病に関わる細菌群として提唱している。また現在では、細菌系統分類のひとつの基準である 16S ribosomal RNA 遺伝子 (16S rDNA) を標的に、polymerase chain reaction (PCR) 法などに代表される分子生物学的手法を駆使して口腔細菌叢解析研究が進められている。その結果、歯肉縁下プラークには 700 菌種以上の多くの未知の難培養細菌や *Methanobrevibacter oralis* に代表される古細菌 (archaea) の存在が明らかとなった。これまで嫌気培養法により特定された歯周病細菌種に加えて、これらの難培養細菌や古細菌などの細菌種がいかに口腔環境の恒常性の維持あるいはプラークの病原性、さらには歯周病の発症と進行に関与しているのかについての解明が急がれている¹⁾。

そこで、ここでは、1) 日本人歯周病患者と健康者の歯肉縁下プラークにおける古細菌の分布様態、2) 古細菌 *M. oralis* や *Methanobrevibacter smithii* 菌体抗原と反応する歯周病患者と健康者血清における

抗体の存在、3) 歯周病患者血清抗体が反応する *M. oralis* 菌体抗原の性状の3項目に絞ってこれまでの私達の古細菌 *M. oralis* についての研究成果を紹介したい^{2,3,4)}。

古細菌とは

古細菌はこれまでに原始地球環境に近い、熱水や塩湖や深海などの極限環境から多く分離されていたことから、生物の起源(祖先)にあたる細菌として捉えられていた時期もあり、古細菌あるいは始原菌(archaebacteria)と称されていた。しかしながら現在では、菌体の膜脂質構造に特徴的な構造をもつことや、16S rDNA塩基配列に基づく系統解析では、細菌よりもむしろ真核生物に類似することが明らかとなり、細菌とも真核生物とも異なる第3のドメインとして分類されている⁵⁾(図1)。

古細菌は極限環境だけでなく、水田などの土壌、また植物さらにはヒトを含めた動物の体内にも広く分布、生息している。古細菌はヒトの腸管、膣や口腔内から分離・同定されることが報告されているが、常在菌としての性状やその病原性さらには様々な疾患との関連性については不明な点が多く、議論の分かれるところである⁶⁾。とりわけ、近年、歯内(根管、根尖)病変や歯周病病巣からの古細菌の分離・同定の報告が相次ぎ、口腔疾患との関わりがにわかになら注目されてきている。これまでに口腔内からは古細菌の一種である *Methanobrevibacter* 属が分離・同定されていたが、Leppらによって古細菌が歯周病の病態に関与している可能性が示唆された⁷⁾。それは歯周病患者の36%から古細菌の16S rDNAが検出されること、リアルタイムPCR法を応用したプラーク微生物の定量解析の結果、進行した歯周病病巣では、総菌数に対する古細菌の割合が20%近くを占めること、また、プラーク中の総微生物数に占める古細菌の割合は慢性歯周炎の重症度に関係しているというものであった。特に、口腔内は複雑な細菌叢から構成されており、古細菌と他の嫌気性細菌との栄養共生関係についても興味深い知見が示されている⁸⁾。さらに歯周病は現在、生活習慣病のひとつとしても取り上げられているので、まずはLeppらの報告にあるアメリカと食生活や生活習慣も異なる日本における歯周病患者から古細菌を検出・同定

することを試みた。

日本人歯周病患者と健常者の歯肉縁下プラークにおける古細菌の分布様態

まず、Leppらの報告⁷⁾に従い、以下のように古細菌16S rDNAを指標にPCR法により歯周病患者の歯肉ポケットからのプラークサンプルについて調べた³⁾。

1) プライマーと古細菌16S rDNA増幅反応: 古細菌16S rDNA増幅のためのプライマーは、古細菌16S rDNAに特異的配列を示す領域を選択し、forward primer (5'-TCCAGGCCCTACGGG-3') および reverse primer (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3') を合成し、使用した。増幅反応はAmpliTaq (Applied Biosystem) を用いたPCR法で行った。反応は95℃(30秒)、58℃(30秒)、72℃(1分)を1サイクルとし、これを35回繰り返して古細菌16S rDNAの増幅を行った。なお、あわせて歯周病菌 *P. gingivalis* 16S rDNAの検出もPCR法で行なった。

2) 被験者とプラークサンプル: 被験者は岡山大学病院歯周科を受診した歯周病患者49名(侵襲性歯周炎患者17名ならびに慢性歯周炎患者32名)であり、初診時に歯肉縁下プラークを採取した。プラークサンプルは歯肉ポケット111カ所(歯肉ポケット深さ2mm-14mm)からペーパーポイントを用いて採取した。なお17名の健常者口腔内の30カ所からプラークサンプルを同様に採取した。

3) DNA抽出: プラークサンプルからのDNA抽出はInstaGene Matrix (Bio-Rad) を用いて説明書に従い行った。抽出したDNAはPCR法による古細菌16S rDNA増幅反応のために鋳型として使用した。陽性対照は *M. oralis* DSM 7256からのDNAを用いた。

4) 増幅16S rDNAの検出と菌種の同定: PCR産物は1.5%アガロースを用いて電気泳動し、臭化エチジウム染色によって推定される約600bpの増幅断片を検出した。さらに、増幅された遺伝子断片はゲルから抽出・精製してTAクローニングベクターに組み込み、塩基配列を決定した。この塩基配列をGenBankデータベースと照合して古細菌種を同定した。

その結果、

1) 歯周病患者プラークサンプルから古細菌 16S rDNA 断片 (約 600bp) の増幅を確認した (図 3)。古細菌は侵襲性 (若年性) 歯周炎患者 (17名) の 5名 (29.4%) のプラークサンプルから、また慢性歯周炎患者 (32名) のうち 6名のプラークサンプル (18.8%) から検出された。一方、健常者 (17名) のプラークサンプルからは古細菌は検出されなかった (表 1)。

2) 古細菌は侵襲性 (若年性) 歯周炎患者 5名の歯周ポケット 8カ所のプラークサンプルから、また慢性歯周炎患者 6名の歯周ポケット 7カ所のプラークサンプルの計 15カ所のプラークサンプル (13.5%) から検出された。一方、歯周病細菌である *P. gingivalis* は健常者のプラークサンプルからも 46.8%の割合で検出され、歯周病患者のプラークサンプルにおいては 81.1%と高い割合で検出された。

3) 歯周病患者の歯周ポケットの深さと古細菌の検出についてみてみると、古細菌は、歯周ポケット 3mm 以下の部位 (28カ所) からは検出されず (0%)、4mm 以上 6mm 未満の中等度歯周ポケットでは 15カ所中 1カ所から検出され (6.7%)、6mm 以上の重度な歯周病病巣では 68カ所中 14カ所から検出された (20.6%) (表 2)。

4) 検出された古細菌 16S rDNA 塩基配列は、すべてメタン生成古細菌である *M. oralis* や *Methanobrevibacter* に属する Phylotype SBGA-1 と 100%の相同性であった。

以上の結果、日本人歯周病患者においても歯周病の重度な病変部位から *M. oralis* とその類縁菌種が、高頻度に検出されることが明らかとなった。健常者歯肉縁下プラークからは古細菌は検出されなかったが、古細菌の検出頻度は軽度な歯周炎部位に比べ、重度な歯周炎病巣において高く、古細菌も歯周病の進行やその病態に関連する可能性が示された³⁾。

日本人歯周病患者においては、古細菌の検出頻度は Lepp らの検出頻度 (36%) に比べ低い結果であったが、この差は欧米人との食生活や生活習慣あるいは口腔細菌叢の相違などによるものかもしれない。

古細菌 *M. oralis* や *M. smithii* 菌体抗原と反応する歯周病患者と健常者血清における抗体の存在

これまで古細菌についてはヒトの健康や疾病にど

のように関わっているのかは不明であった。少なくとも、日本人歯周病患者においても歯周病の病状の重症化に伴って *M. oralis* とその類縁菌種が検出されることが明らかとなり、古細菌が歯周病の病原因子のひとつになりうることを示唆された。これは歯肉縁下プラーク細菌叢における多数の細菌による栄養共生などの複雑な相互作用によって古細菌が増加しているのかもしれない⁶⁾。Lepp らは歯周病変部のプラーク細菌叢を定量解析し、重度な歯周病変部では *M. oralis* あるいはその類縁菌種が細菌叢の主体となっていることを報告している⁷⁾。彼らは *M. oralis* 量が多いプラークにおいては、歯周病細菌 *T. denticola* の割合が少なくなること、一方 *M. oralis* の量が少ない細菌叢では *T. denticola* の割合が高くなることを見出している。この現象は両菌が生育に必要な水素や炭酸化合物を競合するために起こると考えられるが、*M. oralis* が歯肉縁下プラーク細菌叢の構成にも影響を与えていることを示唆するものである (図 2)。

これまでの研究によって、歯周病患者においては病巣局所における歯肉縁下プラーク細菌叢中で増加する歯周病細菌に対しては、血清中の免疫グロブリン G (IgG) 抗体価上昇すなわち、体液性免疫応答が惹起されていることが明らかにされている。*P. gingivalis* をはじめとする各種歯周病細菌に対する血清 IgG 抗体価は歯周病の診断にも活用されはじめている⁹⁾。

そこで、歯周病患者における *M. oralis* に対する体液性免疫応答について *M. oralis* 菌体抗原と歯周病患者血清との反応性を以下のようにウエスタンブロット法で調べた³⁾。

1) 菌体抗原：*M. oralis* DSM 7256 および *M. smithii* DSM 861 全菌体を用いた。

2) 被験者および血清試料：岡山大学病院歯周科を受診した歯周病患者 11名および健常者 4名から採血して試験血清試料を調製した。歯周病患者血清には健常者に比べて *P. gingivalis* 超音波破碎抗原に対して血清 IgG 抗体価の有意な上昇を認めるものを選択して使用した。

3) SDS-PAGE、ウエスタンブロット法：*M. oralis* DSM 7256 および *M. smithii* DSM 861 それぞれの全菌体を SDS-PAGE で展開して、ニトロセ

ルロース膜に転写した。膜上の菌体抗原分子と患者血清とを反応させた後、ウエスタンブロットの検出二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いて発色させ、歯周病患者血清 IgG と反応する *M. oralis* DSM 7256 および *M. smithii* DSM 861 における抗原分子を特定した。

その結果、

- 1) ヒト腸管に生息している *M. smithii* からの全菌体抗原に対して、歯周病患者および健常者血清 IgG 抗体も分子量 78kDa 以上の数種類の抗原と反応したが、歯周病患者および健常者では差異は認められなかった。
- 2) 歯周病患者および健常者血清 IgG は *M. oralis* 全菌体抗原に対しては *M. smithii* 全菌体抗原とは異なる反応様態を示した。
- 3) 健常者と比べて歯周病患者血清の中には分子量 15kDa と 17kDa の低分子抗原や分子量 60 から 70kDa の *M. oralis* 菌体抗原と反応する IgG 抗体を認めた。

M. oralis 全菌体抗原と健常者および歯周病患者血清 IgG 抗体とのウエスタンブロット解析によって、歯周病患者血清 IgG 抗体と反応する *M. oralis* 菌体抗原分子が特定できた。歯周病患者血清 IgG 抗体は数種類の *M. oralis* 菌体抗原とも反応するが、特に分子量 60 から 70kDa の *M. oralis* 菌体抗原分子とは明瞭な反応性を示した (図 4)。

これらの結果や *M. smithii* との反応性の違いなどから、古細菌 *M. oralis* は歯周病病巣局所で単に分布増加しているだけでなく、他の歯周病細菌と同様に宿主免疫応答を惹起誘導し、歯周病の病態を修飾している可能性が示唆された。

歯周病患者血清抗体の反応する *M. oralis* 菌体抗原の性状

日本人歯周病患者においても *M. oralis* やその類縁の古細菌種が病状の進行した歯周ポケットの深い部位から高頻度に検出されること、さらにまた *M. oralis* の菌体には歯周病患者血清と反応する抗原分子が存在することが明らかとなった³⁾。これらの結果は古細菌も歯周病における病因細菌のひとつである可能性を裏付けるものであった。しかしながら、ゲノム解析が終了している古細菌 *M. smithii* の

ゲノム遺伝子情報を参照、検索しても、これまで歯周病細菌で知られているような蛋白分解酵素や毒素などの病因遺伝子は見当たらない。

そこでまず、*M. oralis* と歯周病患者血清との反応性を調べたウエスタンブロット解析の結果、複数の歯周病患者血清が明瞭な反応性を示す抗原バンドの分子量が 60 から 70 kDa であることに着目した。一般的に細菌菌体内での発現量が多く、さらに抗原性が高い分子量約 60 kDa の細菌抗原分子としては Heat Shock Protein (HSP) に代表されるシャペロン分子 (Cpn) がまず挙げられる。HSP は多くの生物でよく保存され、そのアミノ酸配列は種を超えて高い相同性を示す蛋白であり、それは蛋白質の高次構造形成を補助する Cpn として機能している。Cpn は 2 つに分けられ、細菌はグループ I、古細菌はグループ II、ヒトはその両方を有している¹⁰⁾。ヒトのグループ II Cpn は、Chaperonin containing TCP I (CCT) の別名で知られ、8 つのサブユニット (CCT1 ~ 8) で構成されている。

特に細菌の HSP60 (グループ I) は高い抗原性を示す細菌の共通抗原として様々な感染症における主要な免疫原となっている¹¹⁾。細菌 HSP60 (グループ I) によって惹起される宿主の免疫応答が時に自己抗体を介してヒト HSP60 (グループ I) との交差反応を誘発し、リウマチなどの自己免疫疾患や動脈硬化などの炎症性疾患の病態に関与することが示唆されている^{12,13)}。

P. gingivalis の HSP60 については歯周病に関連するだけでなく¹⁴⁾、その交差反応性から動脈硬化も促進する事が示唆されている¹⁵⁾。一方、これまでグループ II Cpn 分子に関しての知見はほとんどない。そこで古細菌 *M. oralis* のグループ II Cpn が抗原性をもち、ヒト Cpn (CCT) と交差反応することで自己免疫応答を誘導し、歯周病や他の自己免疫疾患の病態を修飾するという仮説を立てた。*M. oralis* からグループ II Cpn を検出・同定し、その抗原性特にヒト Cpn (CCT) との交差反応性について以下のように解析を進め、調べた^{2,4)}。

- 1) 供試菌：*M. oralis* DSM 7256
- 2) Cpn 遺伝子のクローニング：*M. oralis* のゲノム DNA を鋳型とし、PCR 法ならびに Genome Walker 法により Cpn 遺伝子断片を増幅した。増幅

した遺伝子断片は TA クローニングベクターに組み込み、塩基配列を決定した。なお PCR のプライマーは Cpn 遺伝子の保存配列ならびに類縁の古細菌種の塩基配列をもとにグループ I とグループ II Cpn のそれぞれに対して設計した。

3) 組換え Cpn 蛋白質 (rCpn): pET Directional TOPO[®] Expression Kit (Invitrogen) ならびに Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen) を用いて rCpn を構築し、精製した。

4) *M. oralis* Cpn の抗原性の解析: *M. oralis* rCpn と歯周病患者血清さらには抗ヒト Cpn (CCT) 抗体との反応性をウエスタンブロット法で調べた。

その結果

1) *M. oralis* ゲノムには group I Cpn は検出されなかったが、グループ II Cpn 遺伝子が 2 種類 (Cpn-1 および Cpn-2) 存在した。それぞれをクローニングし、全長の塩基配列を明らかにした (DNA Data Bank of Japan 登録番号 Cpn-1 遺伝子: AB376229 および Cpn-2 遺伝子: AB455150)。Cpn-1 遺伝子の open reading frame(ORF) は全長 1,641bp (546 アミノ酸)、また Cpn-2 遺伝子の ORF は全長 1,614bp (537 アミノ酸) であった。Cpn-1 および Cpn-2 ともに遺伝子上の 4 つの領域に Cpn ファミリーに特異的で保存されている ATP 結合ドメイン配列 (ATP binding motif) を確認した。また塩基配列から推測される *M. oralis* の Cpn アミノ酸配列は、*M. smithii* に存在する 2 種類の Cpn と 84 から 91% の高い相同性を示した。*M. oralis* Cpn-1 および Cpn-2 はヒトグループ II Cpn 分子であるヒト CCT の 8 つのサブユニット (CCT1 ~ 8) に対してはそれぞれ 29 から 40% の相同性を示し、グループ I Cpn 分子であるヒト HSP60 には 18 から 21% の相同性を示した。次に *M. oralis* の 2 種類の Cpn-1 および Cpn-2 についてそれぞれ組換え蛋白 42kDa rCpn-1 および 40kDa rCpn-2 を精製し (図 5)、ヒト血清との反応性について調べた。

2) *M. oralis* の精製 rCpn (42kDa rCpn-1 および 40kDa rCpn-2) についてそれぞれ歯周病患者血清ならびに抗 CCT 抗体との反応を調べた結果、rCpn-1 には 36 人の歯周病患者血清の中では 30 人の血清が反応性を示した。一方、rCpn-2 に対する反応では歯周病患者 36 人中 29 人が反応性を示した。また、

6 人の健常者血清の中にもそれぞれに反応性を示すものがあつた (rCpn-1 には 2 人、rCpn-2 には 3 人) (図 6)。

3) 抗ヒト CCT 抗体 (抗 CCT1、3、5、6、8) と rCpn-1 との反応性を調べた結果、抗ヒト CCT 抗体の中では、抗 CCT3 抗体ならびに抗 CCT8 抗体が rCpn-1 に対して反応性を示した。一方、rCpn-2 はいずれの抗ヒト CCT 抗体とも反応しなかった。

ヒトに生息する古細菌が健康にどのように関わり、また様々な疾病において病原因子のひとつであるのかどうかについてはまだ不明の点が多い。しかしながら、歯周病患者血清 IgG 抗体や抗ヒト CCT 抗体は古細菌 *M. oralis* の Cpn (グループ II) と明瞭に反応することが明らかとなった。さらに *M. oralis* の Cpn はヒト Cpn (CCT) とも相同性を示すことなどから、歯周炎局所において古細菌 Cpn に対して惹起された免疫応答がヒト Cpn への交差反応を介して、自己免疫応答のトリガーとなる可能性が示唆された^{2,4)} (図 7)。

1967 年に川崎富作博士が発見した「急性熱性皮膚粘膜リンパ節症候群: 川崎病」は乳幼児において高熱や目の充血、発疹、指先の皮がむけるなどの臨床症状の特徴を示し、重篤な後遺症として冠動脈瘤を引き起こす原因不明の難病である。順天堂大学の研究グループは「川崎病」は複数の細菌感染とそれに伴い HSP60 を介した免疫応答の結果によって起きる可能性が高いことを報告した¹⁶⁾。それはまず、腸管や口腔内の毒性の低い複数のグラム陽性球菌やグラム陰性桿菌が体内で増殖して免疫反応が高まり、高熱や腫れの原因になる。さらに細菌が血管内皮細胞に HSP60 という特殊な蛋白質を作らせ、これが免疫細胞の標的となり、冠動脈では過剰な免疫反応が起きる。また炎症を抑える血液製剤を大量に投与しても効果がない患者 7 人に ST 合剤という抗菌薬を投与したところ、6 人が回復した。というものである。

このように、ヒト HSP60 に対する自己抗体がリウマチや動脈硬化をはじめさまざまな疾患の病態に関与することが報告されている¹¹⁻¹⁶⁾。多くの研究では、自己免疫応答の発症機序と感染症とを結びつける鍵となる分子はグループ I Cpn と考えられ、主に HSP60 を対象として展開されてきた。この様に自

己抗体の産生機序に関する研究が細菌のグループ I Cpn を中心に展開してきた背景は、これまでグループ II Cpn を保有する微生物すなわち古細菌による感染症についての知見がなかったためであろう。ヒト CCT (グループ II) に対する自己抗体が自己免疫疾患の病態に関係しているということも明らかにされつつある¹⁷⁾。歯肉縁下プラークにおいて古細菌を含めて複雑な細菌種による慢性感染炎症である歯周病は、ヒト CCT (グループ II) の役割やグループ II Cpn を保有する古細菌 *M. oralis*、さらにはヒト CCT (グループ II) に対する自己抗体がどのように自己免疫疾患に関わるのかを解析する絶好の疾患モデルとなろう。

おわりに

古細菌と歯周病との関連性について歯周病巣局所での分布状態さらに宿主免疫応答の観点から調べた。その結果、重度な歯周病変部には古細菌が生息分布すること、また歯周病患者血清 IgG が *M. oralis* の菌体成分の分子量約 60 から 70 kDa の抗原分子 (グループ II Cpn) と反応することが明らかとなった。さらに古細菌 *M. oralis* が有するグループ II Cpn はヒト Cpn (CCT) との交差反応を介して自己免疫応答を誘導し、歯周病や自己免疫疾患の病態を修飾する可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) 荅口進、前田博史：FFI Journal, 210 (4) : 348-360, 2005.
- 2) 山部こころ：岡山歯学会雑誌, 28 (1) : Thesis 1-18, 2008.
- 3) Yamabe K, Maeda H, Koikeguchi S, *et al.*: FEMS Microbiol. Lett., 287(1): 69-75, 2008.
- 4) Yamabe K, Maeda H, Koikeguchi S, *et al.*: Mol. Oral Microbiol., 1(1): *in press*, 2010.
- 5) 山岸明彦：蛋白質核酸酵素, 54(2) : 108-113, 2009.
- 6) Conway de Macario E, Macario AJ: Int. J. Med. Microbiol., 299(2): 99-108, 2009.
- 7) Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(16): 6176-6181, 2004.
- 8) Vianna ME, Holtgraewe S, Seyfarth I, *et al.*: J. Bacteriol., 190(10): 3779-3785, 2008.
- 9) 前田博史、高柴正悟：臨床歯周病学. 吉江弘正ら編, 医歯薬出版, 東京, 2007, 234-241.
- 10) Large AT, Lund PA. Front Biosci., 14: 1304-1324, 2009.
- 11) Zügel U, Kaufmann SH: Clin. Microbiol Rev., 12(1): 19-39, 1999.
- 12) Mandal K, Jahangiri M, Xu Q: Autoimmun. Rev., 3(2): 31-37, 2004.
- 13) Matsuura E, Kobayashi K, Matsunami Y, *et al.*: J. Clin. Immunol., 29(6): 714-721, 2009.
- 14) Maeda H, Miyamoto M, Koikeguchi S, *et al.*: FEMS Immunol. Med. Microbiol., 28 (3) : 219-224, 2000.
- 15) Ford PJ, Gemmell E, Timms P, *et al.*: J. Dent. Res., 86(1): 35-40, 2007.
- 16) Nagata S, Yamashiro Y, Ohtsuka Y, *et al.*: Immunology, 128(4): 511-520, 2009.
- 17) Yokota S, Hirata D, Minota S, *et al.*: Cell Stress Chaperones, 5(4): 337-346, 2000.

Understanding the Relationship between Methanogenic Archaea, *Methanobrevibacter* and Oral Diseases

Kokeguchi Susumu, Yamabe Kokoro*, Maeda Hiroshi*

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Department of Oral Microbiology, *Department of Periodontal Science

Dental plaque is now recognized as a complex bacterial biofilm consisted of over 700 different bacterial species in human oral cavity. The changes of oral microflora may have pathogenic activities to induce dental caries or periodontal diseases. Recent research has shown the association between periodontal diseases and health problems, such as diabetes, cardiovascular disease and bacterial pneumonia. Methanogenic archaea, *Methanobrevibacter* species have been frequently isolated from the human colon, vagina, and oral cavity. The possible roles for methanogenic archaea in human health and disease has recently increased attention. We assessed the prevalence and distribution of *Methanobrevibacter* species in Japanese patients with periodontal diseases by polymerase chain reaction on archaeal 16S ribosomal RNA gene. We revealed the significant associations between levels of *Methanobrevibacter* species in periodontal pockets and severity of periodontal disease. Here, we also present an overview of the characteristics and possible roles of the approximately 60-70 kDa immunoreactive protein in *Methanobrevibacter oralis* (Group II chaperonin) on periodontal disease, which was recognized by IgG antibodies in the periodontitis patients' sera. We would contribute to the improvement of treatment and prevention for oral diseases and health promotion through the study on oral microflora including *Methanobrevibacter* species.

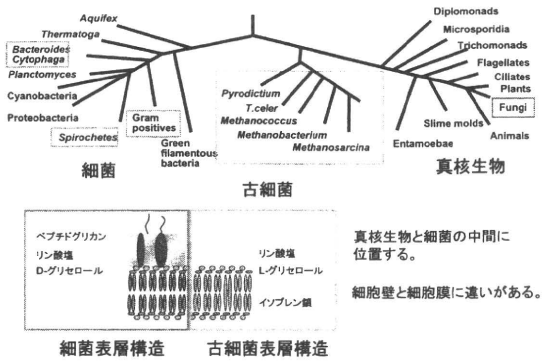


図1. 古細菌とは

16S rDNA 系統解析やその表層構造分析によって古細菌は真核生物とも細菌（真正細菌）とも異なる第3の生物グループとして分類されている。

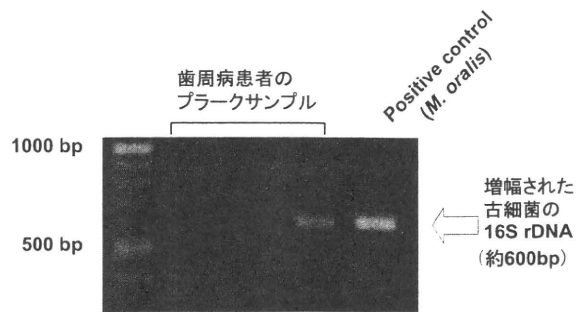


図3. PCR法による古細菌の検出

陽性コントロール (*M. oralis*) と同様に歯周病患者プラークサンプルからも古細菌 16S rDNA の増幅が確認できた。

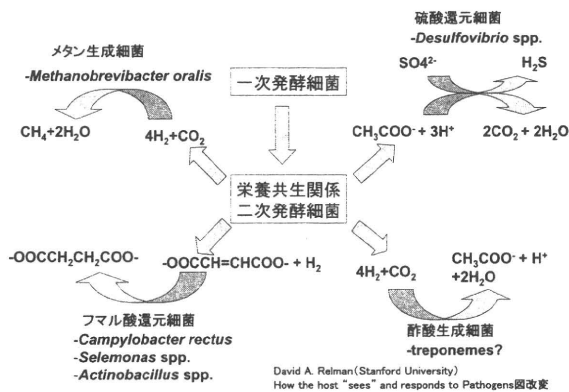


図2. 口腔内嫌気性細菌群の相互関連モデル

歯肉縁下口腔バイオフィルム中の嫌気性細菌群は1次発酵細菌から2次発酵細菌を経て産生される代謝産物を得る複雑な栄養共生・拮抗関係にある。古細菌 *M. oralis* は水素と炭酸ガスを利用してメタンを生成する。それは酢酸生成細菌など(歯周病細菌 *T. denticola*) と拮抗関係にある。

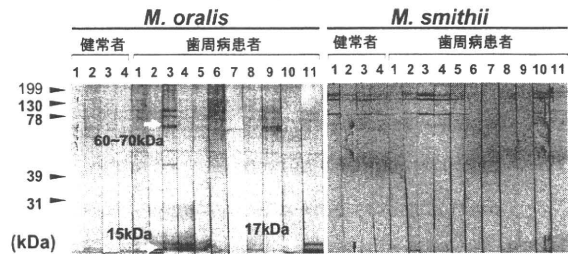


図4. 古細菌菌体蛋白の抗原性の検討

古細菌 *M. oralis* および *M. smithii* 菌体蛋白に対するヒト血清 IgG 抗体反応性をウエスタンブロットで調べた。*M. smithii* には健常者血清と歯周病患者血清は、複数の共通抗原分子と反応した。一方、*M. oralis* では健常者血清が反応を示さないのに対して、歯周病患者血清では分子量が約 60kDa と 20kDa 付近の菌体蛋白と明瞭な反応性を示した。

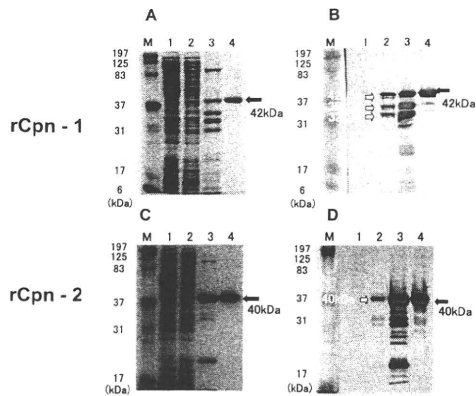


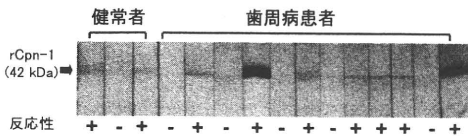
図5. 古細菌 *M. oralis* r-Cpn1 および r-Cpn2 の精製
 組換え蛋白 *M. oralis* r-Cpn1 および r-Cpn2 精製過程の SDS-PAGE (A, C) とウエスタンブロット (B, D) を示す。ウエスタンブロットには抗ヒスチンタグ抗体を使用した。分子量約 42kDa の rCpn-1 および約 40kDa の rCpn-2 の組換え蛋白をそれぞれ得た。M: マーカー; 1: コントロール *E. coli*; 2: 組換え *E. coli*; 3: 粗精製 r-Cpn 標品; 4: 最終精製 r-Cpn 標品。

表 1. 古細菌の病型別検出率

病型	平均ポケット深さ	検出数	(率)
健常者 (n=17)	—	0	(0%)
侵襲性歯周炎患者 (n=17)	6.98 ± 2.86 mm	5	(29.4%)*
慢性歯周炎患者 (n=32)	4.83 ± 2.04 mm	6	(18.8%)
総患者 (n=49)	5.72 ± 2.60 mm	11	(22.4%)

* 健常者との間に有意差が認められた (P=0.044 Fisher's exact test)

rCpn-1に対する患者血清の反応



rCpn-2に対する患者血清の反応

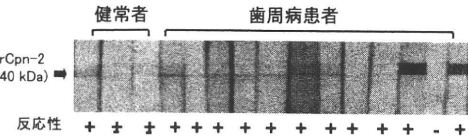


図6. 古細菌 *M. oralis* Cpn の抗原性の検討

組換え蛋白 *M. oralis* r-Cpn1 および r-Cpn2 と歯周病患者血清との反応性をウエスタンブロットで調べた。歯周病患者血清はいずれとも反応性を示した。

表 2. 古細菌のポケット深さ別検出率

ポケット深さ	古細菌検出 (率)	Pg** 検出 (率)
≤ 3mm (n=28)	0 (0%)	20 (71.4%)
4 ~ 5mm (n=15)	1 (6.7%)	11 (73.3%)
≥ 6mm (n=68)	14 (20.6%)*	59 (86.8%)
総数 (n=111)	15 (13.5%)	90 (81.1%)

* ≤ 3mm ポケットとの間に有意差が認められた (P<0.01: Fisher's exact test)

**Pg = *Porphyromonas gingivalis*

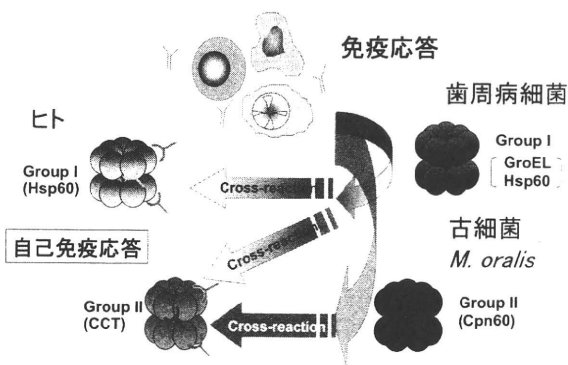


図7. Chaperonin 分子に対する免疫応答の概略図

歯周炎局所では、歯周病細菌 (グループ I) や古細菌 *M. oralis* (グループ II) のそれぞれのシャペロニンに対して免疫応答が惹起され、それらの交差反応性から自己免疫応答が誘導され、歯周病や自己免疫疾患の病態を修飾するかもしれない。

調査報告

歯科衛生士学校生における市中感染型メチシリン耐性ブドウ球菌の保菌調査を通しての感染予防対策教育の向上

Improvement in the Education for Infection Control through the Nasal Carriage Survey on Community-acquired Methicillin-resistant Coagulase Negative Staphylococci in Dental Hygienist Students

渡辺朱理^{1,2)}
Akari Watanabe

佐藤法仁³⁾
Norito Satoh

苔口 進³⁾
Susumu Kokeguchi

¹⁾ 岡山県歯科衛生士会

²⁾ 埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科口腔保健科学専攻

³⁾ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野

和文抄録

院内感染病原菌としてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) に加え、メチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (methicillin-resistant coagulase negative staphylococci; MRCNS) も、医療現場から広く分離されているのみならず、市中でも蔓延しており、臨床上問題になっている。

今回、我々は臨床実習中の歯科衛生士学校生の2年生82名〔2007年度2年生49名(平均年齢22.0歳)、2008年度2年生33名(平均年齢20.9歳)〕を対象者とした以下の調査を実施した。すなわち、各人の鼻腔におけるメチシリン耐性ブドウ球菌の保菌調査を行い、その分布状況と生化学的・遺伝学的特徴を調べた。さらにこの保菌調査と同時に、MRSAや病院感染についての意識調査を実施した。

その結果、MRSAは検出されなかったが、MRCNSが82人中53名(64.6%)から検出された。53名の分離菌株からメチシリン耐性遺伝子 *mecA* が検出され、そのすべてが *S. epidermidis* であった。さらに、MRCNS分離菌株53株すべてが市中感染型 SCC*mec* IV型であることが認められた。また、薬剤感受性試験においてもMRCNS分離菌株53株中48株(90.6%)がムピロシンを含め2～8剤の薬剤に対して耐性を示し、MRCNS分離菌株53株中18株(34.0%)にバイオフィーム形成能を認めた。

保菌調査後の意識調査では、MRSAの存在を知っている学生は、69.5%と高い割合であったが、MRSAに対して薬剤が効きにくい、治療が困難となるといった院内感染の原因となるMRSAの耐性機序などについての基礎知識は充分でないことが推測された。不十分な感染予防の知識のままでは、臨床現場において歯科衛生士学校生が感染源となる恐れもあり、院内感染を拡大させる危険性が懸念される。

今後、市中感染型MRCNSの動向を注意していくと共に、就学期間に最新の正しい感染予防の知識と技能を習得させるため、感染予防実習を含めた更なる感染予防対策教育の充実が必要であると考えられる。

キーワード メチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌, 市中感染型, 感染予防対策, 歯科衛生士教育, 保菌調査

【緒言】

現在、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) に加え、メチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (methicillin-resistant coagulase negative staphylococci; MRCNS) も院内感染のみならず市中でも蔓延し、注目されている。これらブドウ球菌のメチシリン耐性化には、ブドウ球菌種の間で移動できるメチシリン耐性遺伝子 (*mecA*) を運ぶ移動性遺伝子成分 *SCCmec* が関わっている¹⁾。MRSA のみならず、これまで皮膚や粘膜の常在菌として病原性は低いとされていたコアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase negative staphylococci; CNS) の中にも *mecA* を運ぶ *SCCmec* を獲得してメチシリン耐性化し、MRCNS へと変貌する可能性が指摘されている²⁻⁴⁾。

またこの CNS は輸液チューブなどの血管カテーテルや尿道カテーテルの表面へのバイオフィーム形成能が強く、メチシリン耐性を獲得し MRCNS となれば長期入院患者や易感染症患者においては、症状の重篤化が懸念されている⁵⁾。

これまでの著者らの研究においても、特に菌株間で容易に移動できる市中感染型 *SCCmec* IV 型を有する MRCNS を歯科医療従事者や歯学科学学生から分離し、バイオフィーム形成能も認めている⁶⁾。そこで今回、2007 年度と 2008 年度に、歯科衛生士学校生を対象に鼻腔におけるメチシリン耐性ブドウ球菌の保菌調査を行い、その分布状況と生化学的・遺伝学的特徴を調べた。さらにこの保菌調査において、各自の鼻腔からのサンプリング、培養培地への塗布植菌などの実習に学生自らが参加することで、学生が MRSA や院内感染について関心を持つことができたかどうかについてのアンケート調査を実施した。この調査を通じて、1) 歯科衛生士学校生における院内感染の病原菌として問題となる MRSA や MRCNS の分布状況を把握すること、2) 歯科衛生士学校生における MRSA に関する認知度や習熟度を把握すること、3) 学生参加型の実習方法を工夫することで、感染予防の知識と技能を教授できるような感染予防教育改善に取り組むことを目的とした。

【対象および方法】

対象者

調査研究に同意を得られた歯科衛生士学校の臨床実習中の 2 年生 82 人 [2007 年度 2 年生 49 名 (平均年齢 22.0 歳)、2008 年度 2 年生 33 名 (平均年齢 20.9 歳)] を対象者とした。

調査実施前に個人情報保護の説明および調査結果による個人の特定を行わない点などを説明し、同意を得た。なお、本研究は、岡山大学倫理委員会から承認を受けて実施した (承認番号 173)。

I. 歯科衛生士学校生におけるメチシリン耐性ブドウ球菌保菌調査

1. 検体採取

2007 年と 2008 年の 8 月に、某大学病院歯科臨床実習中の歯科衛生士学校生 2 年生を講義室に集めて検体の採取を行った。

採取には、MRSA スクリーニング用シードスワブ MRSA 栄研[®] (栄研化学、東京) を用いた。付属の滅菌綿棒を滅菌生理食塩水 (PBS: Invitrogen, New York, USA) で湿らせた後、調査対象者の学生自身で両方の鼻腔粘膜を擦過してもらい、鼻腔粘膜付着細菌を採取した。

2. MRCNS および MRSA の分離培養

鼻腔粘膜付着細菌を採取した綿棒は、マンニット食塩寒天平板培地 (日水製薬、東京) とメチシリン耐性ブドウ球菌選択用の MSO 寒天平板培地 (日水製薬、東京) のそれぞれに学生自身で塗布植菌した後、37℃で 20～24 時間培養した。さらに、鼻腔粘膜付着細菌を採取した綿棒は MRSA スクリーニング用シードスワブ MRSA 栄研[®] 付属の軟寒天培地にも穿刺し、37℃で 20～24 時間培養した。

3. 菌種同定

MRSA スクリーニング培養試験では、シードスワブ MRSA 培地の赤色から黄色への変化と、紫外線照射によって培地の蛍光発光が認められた場合には MRSA の存在を疑った。

マンニット食塩寒天平板培地、MSO 寒天平板培地に増殖したコロニー周囲の黄変の有無を観察

して、マンニット分解性を判定した。また、グラム染色によってグラム陽性球菌を確認して、カタラーゼ試験、コアグララーゼ試験（栄研化学、東京）、黄色ブドウ球菌鑑別用 PS ラテックス ‘栄研’[®]（栄研化学、東京）を用いて試験を行い、MRCNS あるいは MRSA と同定した。さらにブドウ球菌同定用 N-ID テスト・SP-18「ニッスイ」[®]（日水製薬、東京）のキットを使用し、それぞれの菌種を同定した。

4. メチシリン耐性遺伝子 *mecA* の検出

メチシリン耐性遺伝子 *mecA* は Murakami らの方法⁷⁾ に従って polymerase chain reaction (PCR) 法を行い検出した。増幅 DNA は 2% アガロースゲル電気泳動後、533bp のバンドを *mecA* の特異的遺伝子断片と判定した。

5. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は Bauer らの方法⁸⁾ に基づいて行った。すなわち、ニッスイ S/N ディスク[®]（日本製薬、東京）を用いる寒天平板ディスク法で試験し、寒天平板上の阻止円の直径により、分離菌の薬剤感受性を耐性 (R)、中間 (I)、感性 (S) で判定した。

用いた薬剤ディスクは、イミペネム (IPM)、エリスロマイシン (EM)、バンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC)、ミノサイクリン (MINO)、レボフロキサシン (LVFX)、セファゾリン (CEZ)、ゲンタマイシン (GM)、アミカシン (AMK)、アルベカシン (ABK)、ホスホマイシン (FOM)、ムピロシン (MUP) の 12 種類である。

6. バイオフィーム形成能試験

バイオフィーム形成能試験には、Christensen らの方法⁹⁾ によるスライム産生試験を適用した。培養培地を入れた滅菌プラスチック試験管でそれぞれの分離菌を培養し、プラスチック内面に付着する菌を 0.25% サフラニン液で染色してバイオフィーム形成の有無を判定した。

7. SCC*mec* 遺伝子型

SCC*mec* 遺伝子型別 (type-I ~IV) は、Oliveira と Lencastre の方法¹⁰⁾ に従って multiplex PCR 法を行い、増殖した遺伝子断片パターンから判定した。SCC*mec* 遺伝子型別の MRSA 標準株として *S.aureus* NCTC10442 (type-I SCC*mec*)、*S.aureus* N315 (type-II SCC*mec*)、*S.aureus*

表1 鼻腔内細菌検査アンケート

鼻腔検査（臨床実習）の前に

1. MRSA とは何かは知っていましたか。はい ・ いいえ
2. MRSA の正式名称（和名）をきちんと書けますか。はい ・ いいえ
はいと答えた方へ MRSA とは
正式名称 _____
3. MRSA の医療現場での問題点を挙げられますか。はい ・ いいえ
4. MRSA の耐性機序を説明できますか。はい ・ いいえ
5. 鼻腔検査をやってみて MRSA や院内感染防止対策について関心を持ってましたか。
関心を持った ・ どちらかと言えば関心を持った ・
どちらかと言えば関心は無い ・ 全く関心が無い
6. 鼻腔検査をやってみて MRSA や院内感染防止対策に役に立ちましたか。
役立った ・ どちらかと言えば役立った ・
あまり役立たなかった ・ 全く役立たなかった

85/2082 (type-III SCCmec), *S.aureus* JCSC4744, JCSC4784 (type-IV SCCmec) を用いた。

II. 鼻腔内メチシリン耐性ブドウ球菌保菌検査後における意識調査

ブドウ球菌保菌調査実施後に、MRSA や院内感染に関する意識調査をアンケートにて実施した。アンケートは、表1に示す質問項目で留置法により、無記名方式にて実施した（有効回答数82名）

【結果】

I. 歯科衛生士学校生におけるメチシリン耐性ブドウ球菌保菌調査

今回実施した保菌調査では、歯科衛生士学校生の鼻腔からMRSAは検出されなかった。一方、MRCNSの保菌者は2007年度2年生では49名中27名（MRCNS保菌率：55.1%）、2008年度2年生では33名中26名（MRCNS保菌率：78.8%）であった。総計では82人中53人の鼻腔からMRCNSが分離され、MRCNS保菌率は64.6%であった（図1）。

また、鼻腔からMRCNSが分離された学生53名からのMRCNS分離菌株のうち、学生1名について代表株をそれぞれ1株選択して、それぞれ53株のMRCNSの諸性状について調べた。53株の分離菌株すべてからメチシリン耐性遺伝子 *mecA* を確認し、菌種はすべて *S. epidermidis* で

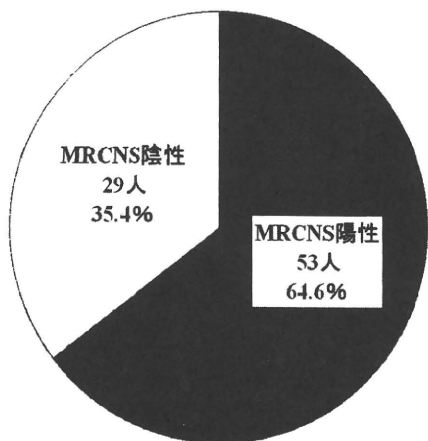


図1 歯科衛生士学校生におけるメチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌（MRCNS）の保菌状況（N=82）

あった。

薬剤感受性試験では、抗MRSA薬であるアルベカシン（ABK）、バンコマイシン（VCM）には、すべてのMRCNS分離菌株が感受性を示した。しかしながら、MRSAの鼻腔内除菌目的として使用されているムピロシン（MUP）には、MRCNS分離菌株53株中12株（22.6%）が耐性を示した。また、MRCNS分離菌株48株（90.6%）が2～8剤の薬剤に対して多剤耐性を示した（図2）。

バイオフィーム形成能試験は、ポリプロピレンチューブへの付着性を指標としてスライム産生性試験を行い、MRCNS分離菌株53株中18株（34.0%）にバイオフィーム形成能を認めた（図3）。

さらに、MRCNS分離菌株53株について、*mecA* がコードされている周辺遺伝子領域を含む SCCmec 遺伝子型別のPCR法を行った。その結

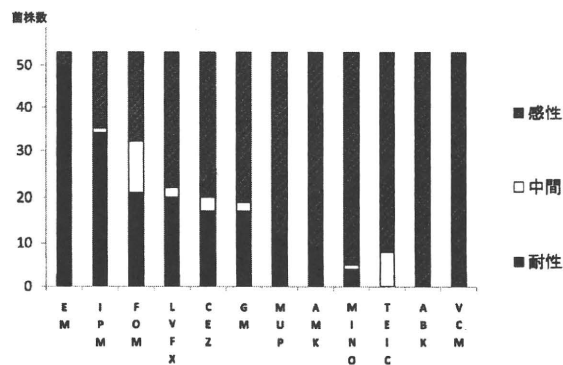


図2 MRCNS分離菌株（53株）の薬剤感受性試験結果

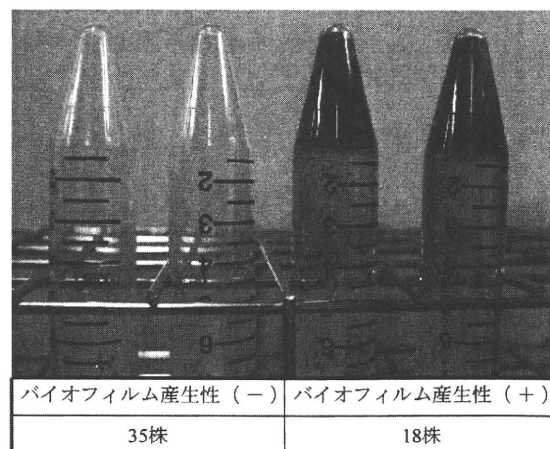


図3 MRCNS分離株（53株）についてのバイオフィーム形成能試験の代表例

果、今回調べた MRCNS 分離菌株 53 株からは市中感染型 SCCmec IV型が検出された (図4)。

II. 鼻腔内メチシリン耐性ブドウ球菌保菌検査後における意識調査

鼻腔内保菌状況調査後、82人中82人の歯科衛生士学校生から回答が得られた。その結果、質問①の「鼻腔内保菌状況調査前に MRSA とは何か知っているか」では、82人中57人(69.5%)が鼻腔内保菌状況調査前に「MRSA については知っていた」との回答であり、「知らなかった」との回答は25名(30.5%)であった。質問②の「MRSA の正式名称をきちんと書けるか」では、23名(28.0%)は正しく記入することができていた。質問③の「MRSA の医療現場での問題点を挙げられるか」との回答で、「問題点を挙げられる」と答えた学生は27人(32.9%)であったが「問題点を挙げられない」と答えた学生は55名(67.1%)であった。質問④の「MRSA のメチシリン耐性機序については説明できるか」との回答は、「説明できる」との回答は2名(2.4%)であり、「説明できない」との回答は80名(97.6%)であった。質問⑤の「鼻腔内保菌状況調査後、MRSA や院内感染防止対策について関心を持てたか」では、「関心を持てた」との回答が7名(8.5%),「どちらかといえば関心をもてた」との回答が44名(53.7%)で、「どちらかといえば関心がない」との回答が26名(31.7%),「全く関心がない」との回答が5名(6.1%)であった。質問⑥の「鼻腔内保菌状況調査後、院内感染防止対策に役に立ったか」では、「役に立った」との回答が7名

(8.5%),「どちらかといえば役に立った」との回答が26名(31.7%)であり、「あまり役に立たなかった」との回答が40名(48.8%),「全く役に立たなかった」との回答が9名(11.0%)であった(図5, 6)。

【考察】

今回の鼻腔内保菌調査の結果、MRSA は検出されなかったが、歯科衛生士学校生の MRCNS 保菌率は64.6%であり、半数以上の学生がメチシリン耐性遺伝子 *mecA* を保有する CNS を鼻腔に保菌していた。

一方、意識調査から69.5%の歯科衛生士学校生は MRSA が何であるかについては知っていた。しかしながら MRSA に対して、薬剤が効きにくい、治療が困難となる、院内感染の原因となる等の問題点など、医療現場での問題点の本質となる MRSA の耐性機序については半数以上の学生が

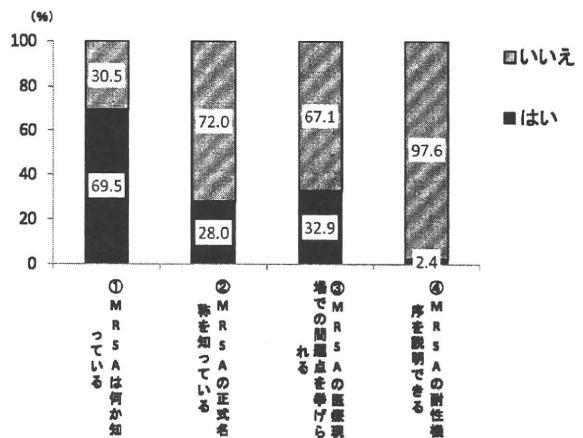


図5 鼻腔内細菌検査後アンケート調査結果(1)

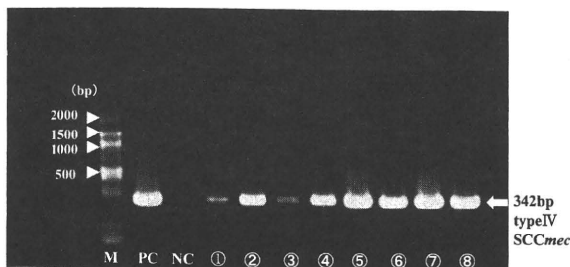


図4 PCRによるMRCNS分離株における市中感染型 SCCmec IV型の検出例

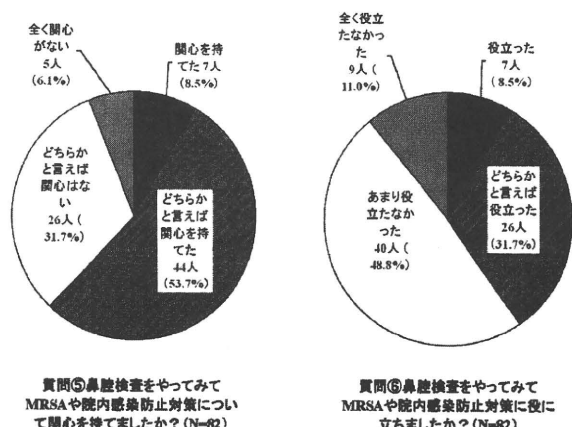


図6 鼻腔内細菌検査後アンケート調査結果(2)

理解していなかった。

私たちはこれまで歯学科学生に対してメチシリン耐性ブドウ球菌の保菌調査、及び保菌調査後に MRSA や院内感染に関する意識調査を行ってきた。前回の歯学科学生についての調査結果では、MRCNS 保菌率は 20.9%であった。また、保菌調査後に行った MRSA についての意識調査では、MRSA について知っている学生は 51.0%であったが、MRSA の正式名称をきちんと書ける学生は 97.4%であり、さらに MRSA の医療現場での問題点を挙げられる学生は 84.6%、MRSA 耐性機序を説明できる学生は 41.0%であった⁶⁾。このことから歯科衛生士学校生は、歯学科学生に比べると MRSA の存在を知っている割合が高いが、MRSA の耐性機序や医療現場での問題点に対する基礎知識は高くない。現在、歯科衛生士養成期間が 2 年間から 3 年間以上となり、歯科衛生士育成教育の新カリキュラムは大綱化され大きく変化している¹¹⁾。それによって、卒業後、専門職として臨床現場で活躍できるように臨地・臨床実習の単位数が増えている。そこで必要な専門基礎知識としての微生物学や病理学をはじめ多くの教育科目も再構築され、基礎的な面から臨床的な面までより豊富な知識と技能を教授できるように改善されていくことが期待される。

MRSA は、手指を介した直接的な接触が主要な感染経路である。MRSA に汚染された医療器具や環境表面に触れた医療従事者の手指を介しての感染拡大がしばしば問題となっている。また、私たちはこれまでの研究で、現在歯科臨床の現場で働く歯科衛生士に対し、感染予防対策の意識に加えて行動を把握するべく意識調査を行ってきた¹²⁾。その結果、感染予防対策に関する知識を有している歯科衛生士は半数以下であり、それに伴ってマスクの交換率は低く、また防護メガネの未着用も多く、歯科医療現場における一層の感染予防対策の充実が求められる。また診療中に、不潔グローブで清潔域に触れたことのある歯科衛生士は 94.4%であり、感染予防に対する意識がとぎれてしまうことが多く、その行動にもあらわれることが認められた。

臨床実習の現場においては直接患者に接触する

機会も多い。そして臨床現場においては、MRSA や MRCNS に限らず、B 型肝炎ウイルスをはじめ様々な病原微生物が存在する。診療の際には、歯科衛生士学校生が感染源となり院内感染を拡大させる危険性ばかりでなく、歯科衛生士学校生自身も感染のおそれがあることから十分な感染予防の知識と技能を身につけ実践することが求められる。

また、今回の MRCNS 分離菌株 53 株すべてが市中感染型 SCCmec IV 型であり、そのうち 34.0%の分離菌株に、バイオフィーム形成能を認めた。さらには、90.6%の分離菌株が 2～8 剤の薬剤に対して耐性であった。前回の研究結果でも、臨床実習中の歯学科学生の MRCNS 保菌率は 20.9%で、そのうち市中感染型である SCCmec IV 型とバイオフィーム形成能を 33.3%の割合で検出した。薬剤感受性試験では、66.7%の分離菌株が 2～3 剤の薬剤に耐性を示した⁶⁾。伊藤ら¹⁾は、総説の中で健康な一般人や小児から市中感染型の SCCmec IV 型の遺伝子を持つ MRSA や MRCNS を分離し、これらによる市中感染症を危惧している。健常人における MRCNS の保菌率、薬剤感受性やバイオフィーム形成能について今後も、モニタリングしていきたい。現在、歯科衛生士の活躍の場は、要介護高齢者や易感染性長期入院患者の口腔ケアなどへの領域に広がってきている。

将来、歯科衛生士学校生は歯科衛生士となり、臨床現場においてコメディカルスタッフとして歯科医師と協調して歯科診療および感染予防にも携わる機会がより多くなっていく。山本*¹³⁾はアメリカの歯科衛生士養成における進んだ感染予防教育の現状を紹介している。その中でアメリカと比べて我が国の歯科衛生士教育に感染予防についての教育が不足しており、3 年制への教育年限の延長に伴い、その充実が求められるとまとめている。就学期間内に最新の正しい感染予防の知識と技能を身につけるために、感染予防実習を含めた更なる感染予防対策教育が必要であろう。今回、座学での感染予防に関する知識の教授だけでなく、学生自身の鼻腔からメチシリン耐性ブドウ球菌を分離培養させるという実習を通して、感染予防の重要性を体験させることを試みた。MRSA スクリー

ニング用シードスワブ MRSA 栄研[®]は1検体あたりの検査価格は150円と安価である。また、これはMRSAのスクリーニングが簡便に実施できるキットであり、MRSAに関しては、学生実習や講義には十分に活用できる。ただし、このキットだけではMRCNSのスクリーニングは難しい。今回、このキットを用いての調査では、歯科衛生士学校生の鼻腔からMRSAが検出されなかったため、さらにメチシリン耐性ブドウ球菌を分離培養してその生化学的特徴や遺伝学的特徴等を分析してMRCNSを特定した。MRSAに加えてMRCNSまで含めて調査を行うには、技術面や費用面から見てどの教育施設でも容易に行えないという限界がある。また、保菌調査後の意識調査結果では、この実習を体験することで「MRSAや院内感染防止対策に関心を持った」とする回答が6割を超えたが、別の質問項目では、まだ臨床実習期間が短いためか「院内感染防止対策にあまり役立たなかった」との回答も約6割であった。

栄養士養成や助産師養成課程では、講義に加えて「手洗い実習」を通して、学生の感染予防に対する意識を向上させ、教育効果を上げる試みがされている^{14,15)}。また、歯科衛生士養成校においても歯科診療補助の実習の進行に合わせて、手洗いの状態を評価することで感染予防の知識習得に対する意識が向上している¹⁶⁾。そこで、現在実施している手指消毒、手指衛生に関する実習も併せて取り入れて、より良い感染予防対策教育効果を上げるように、この鼻腔におけるメチシリン耐性ブドウ球菌の保菌調査を改善していきたい。

【結論】

今回実施した調査では、歯科衛生士学校生のMRCNS保菌率は64.6%であった。市中において一般健康人にもすでにMRCNSが分離される状況となっていることが確認できた。また、MRCNSをはじめメチシリン耐性ブドウ球菌の中でも特に院内感染で問題となるMRSAについては、歯科衛生士学校生はMRSAの存在を知っている割合は高かったが、MRSAが院内感染の原因となるなどの基礎知識はまだまだ充分でないことがわかった。医科との連携によって看護、介護

の場における歯科衛生士の活躍の場も広がっている。歯科衛生士養成の就業年限が3年以上と延長されたことにより、感染予防教育の充実が求められている。今回のメチシリン耐性ブドウ球菌の保菌調査は、歯科衛生士学校生への感染予防についての認識方法としては効果が認められた。今後、手指消毒、手指衛生に関する実習も併せて行うことで、基礎教育および臨床実習においてより良い感染予防に関する教育効果を上げていきたい。

【謝辞】

稿を終えるにあたり本調査に御協力頂きました歯科衛生専門学校の先生方および学生の皆様に厚く御礼申し上げます。また、貴重なMRSA標準株を恵与頂きました伊藤輝代博士(順天堂大学医学部細菌学教室)に心から御礼申し上げます。

【文献】

- 1) 伊藤輝代, 桑原京子, 久田 研, 大熊慶湖, 崔 龍洙, 平松啓一: 市中感染型MRSAの遺伝子構造と診断(最新の知見), 感染症学雑誌, 78(6): 459-469, 2004
- 2) Ibrahim S, Salmenlinna S, Virolainen A, Kerttula AM, Lyytikäinen O, Jägerroos H, Broas M, Vuopio-Varkila J: Carriage of methicillin-resistant Staphylococci and their SCCmec types in a long-term-care facility, J.Clin. Microbiol, 47(1): 32-7, 2008.
- 3) Zhang Y, Agidi S, LeJeune JT: Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources, J. Appl. Microbiol, 107(4): 1375-83, 2009.
- 4) Fessler AT, Billerbeck C, Kadlec K, Schwarz S: Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis, J. Antimicrob. Chemother, 65(8): 1576-82, 2010.
- 5) James P.O, Hilary H: *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications, J. Med. Microbiol, 50: 582-587, 2001.
- 6) 渡辺朱理, 佐藤法仁, 苔口進, 福井一博: 歯学部学生のメチシリン耐性ブドウ球菌の保菌調査と院内感染に関する意識調査, 日本歯科衛生学会雑誌, 1(2): 25-33, 2007.
- 7) Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S: Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction, J. Clin. Microbiol, 29(10): 2240-2244, 1991.
- 8) Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, Am. J. Clin. Pathol, 45(4): 493-496, 1966.
- 9) Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH: Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces, Infect Immun, 37(1): 318-326, 1982.
- 10) Oliveira DC, de Lencastre H: Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and

- variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother*, 46(7): 2155-2161, 2002.
- 11) 吉田直美, 遠藤圭子: 歯科衛生士教員の研究経験ならびに研究に対する考え方, *日本歯科衛生学会雑誌*, 1(2): 84-88, 2007.
 - 12) 渡辺朱理: 歯科臨床における感染予防意識と行動についての現状と課題 - 某県歯科衛生士会会員に対する意識調査から -, *日本歯科衛生学会雑誌*, 4(2): 32-42, 2010.
 - 13) 山本智美: アメリカの歯科衛生士養成における感染予防教育について, *静岡県立大学短期大学部研究紀要*, 第18-W号: 1-19, 2004. <http://bambi.u-shizuoka-ken.ac.jp/~kiyou4228021/18w/18w12.pdf> (2010年8月7日アクセス)
 - 14) 渡邊竹美, 小川俊夫: 助産師学生の手洗い演習後の感染予防に対する概念の向上, *秋田大学医学部保健学科紀要*, 12(1): 98-104, 2004.
 - 15) 杉山章, 田久美子, 邊美咲: 蛍光ハンドローションによる手洗いテストをATP検査による細菌試験の前に導入した場合の手洗い技法改善に関する教育効果, *名古屋女子大学紀要*, 第52号(家・自): 19-23, 2006.
 - 16) 石川裕美子, 本俊伸, 久保皓太郎, 仁井谷善恵, 松本厚枝, 原久美子, 杉山勝, 天野秀昭: 歯科衛生士養成校での感染対策教育に伴う学生の感染対策に対する意識と手洗い技術の変化, *日本歯科衛生学会雑誌*, 5(1): 57-66, 2010.

著者への連絡先

渡辺朱理

〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮 820

埼玉県立大学

TEL: 048-973-4785

FAX: 048-973-4785

E-mail: watanabe-akari@spu.ac.jp

英文抄録

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MRCNS), which are two organisms of hospital-acquired infections, have not only spread widely in hospitals, but also in urban areas.

We performed nasal carriage survey on methicillin-resistant staphylococci in 82 dental hygienist students under clinical training in 2007 and 2008 (49 students aged 22.0 years in 2007 and 33 students aged 20.9 years in 2008).

In addition, we conducted a questionnaire survey to gain understanding of their grasp of knowledge concerning MRSA and hospital-acquired infection.

As for the result of nasal carriage survey, although MRSA was not detected, MRCNS was detected in 53 students (64.6%). All isolated MRCNS strains confirmed the presence of methicillin-resistance gene *mecA* and staphylococcal chromosomal cassette *mec* type IV (SCC*mec* type IV) by polymerase chain reaction. They were all *S. epidermidis*. Forty-eight MRCNS strains showed resistance to the 2-8 antibiotics including mupirocin (90.6%), and 18 isolates confirmed slime production (34.0%).

According to the questionnaire survey after the nasal carriage survey, 69.5% of the dental hygienist students knew of the existence of MRSA. However, their basic knowledge that MRSA causes a hospital-acquired infection for which medical treatment becomes difficult and that antibiotics cannot be very effective was not sufficient.

We are anxious about the risk of infection spreading and dental hygienist students becoming the source of the infection, if students lack adequate knowledge of infection control work at dental clinics.

We think that dental hygienist students need more training in dental infection control education in dental hygienist programs. Also, we will continue to pay attention to the prevalence of community-acquired MRCNS.

