

造血幹細胞移植における抗菌薬曝露が *Streptococcus mutans* の
薬剤耐性および性状に及ぼす影響

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻

小児歯科学分野

小川ひかり

(令和 7 年 12 月 5 日受付)

緒言

造血幹細胞は骨髓に存在し、細胞分裂を繰り返すことで赤血球・白血球・血小板などの血球へと分化する多分化能を有している¹⁾。同時に自己と同一の造血幹細胞を複製する自己複製能も持ち合わせており²⁾、これらの機能により一生を通じて全身の血液成分を安定的に供給し続ける重要な役割を担っている³⁾。造血幹細胞移植（hematopoietic stem cell transplantation : HSCT）は、白血病・悪性リンパ腫・多発性骨髓腫・神経芽腫などの血液悪性腫瘍⁴⁾に加え、近年では先天性免疫不全症や代謝性疾患などにも適応が拡大している⁵⁾。HSCT には自家移植と同種移植があり、特に小児領域では同種移植が選択されることが多い⁶⁾。移植前処置として高用量の化学療法や放射線照射によって腫瘍細胞を壊滅的に減少させた後、あらかじめ採取・保存しておいた自家または同種の造血幹細胞を移植することで、造血機能を回復させる²⁾。移植の約1週間前から行われる移植前処置は腫瘍細胞の根絶を目的とする一方で、正常造血幹細胞も障害されるため、一時的な汎血球減少に伴う高度な免疫抑制状態（易感染状態）が生じる²⁾（図1A）。そのため、持続的な抗菌薬投与やクリーンルームでの無菌的な管理が不可欠である⁴⁾。また、抗菌薬の広域使用により、血液腫瘍患者における耐性菌の発生も問題となっている⁷⁾。移植後2～3週間で造血幹細胞は骨髓に生着し、造血機能は回復するが、移植後、正常な造血が回復するまでの間は感染症の予防

と管理が治療経過において極めて重要である²⁻⁴⁾. HSCT と口腔疾患の関連性を図1B に示す. 移植後には慢性移植片対宿主病に伴う唾液腺障害により唾液分泌量が著しく減少することが知られている⁸⁾. また, 移植前処置として行われる高用量の化学療法や放射線療法は, 高頻度で患者に口腔粘膜炎を引き起こし, 強い疼痛やそれに伴う口腔衛生管理の困難を招く. 従来と同種移植においては, 潰瘍形成を伴う粘膜炎は約50%に発症するとの報告もある⁹⁻¹¹⁾. これらの要因により, 移植後には齲蝕の発症リスクが高まることが報告されている¹²⁾. 齲蝕は患児の生活の質 (QOL) の低下に直結するだけでなく, 口腔細菌が菌血症や全身感染の起点となり得るため¹³⁾, HSCT 後管理において歯科的視点からの介入が極めて重要である¹¹⁾.

Streptococcus mutans はグラム陽性通性嫌気性細菌であり, ヒト口腔内に存在する齲蝕原性細菌である¹⁴⁾. *S. mutans* は歯面に付着し¹⁵⁾, グルカン合成酵素によりスクロースからグルカンを合成することでバイオフィルムを形成する¹⁶⁾. 成熟したバイオフィルム中でスクロースを分解して酸を産生し, 歯表の脱灰を介して齲蝕の発生・進行に関与する¹⁷⁾. HSCT および移植前処置, ならびに周術期の持続的抗菌薬投与が, *S. mutans* の動態や病原性に与える影響は, 現時点で十分に解明されていない. 本研究では, HSCT を予定する小児患児から *S. mutans* を分離し, 移植前処置および抗菌薬曝露が *S. mutans* の生物学的特性に与える

変化を検討し、移植後の齲蝕リスクおよび口腔ケアの必要性に関する新たな示唆を得ることを目的とした。

材料ならびに方法

1. 供試菌株と培養条件

本研究は岡山大学倫理審査委員会（研 1508-016）の承認のもと，保護者から同意を得た上で実施した．調査対象は岡山大学病院にて血液腫瘍と診断された造血幹細胞移植予定の 40 名のうち，同意未取得の 1 名を除く全 39 名（男児 24 名，女児 15 名，平均年齢 8 歳 10 か月）であり，疾患内訳は図 2 に示す．

患児より移植前，移植 1 か月後，移植 3 か月後に唾液およびプラークを採取した．対象者の登録および各時点の採取した人数を図 2 に示す．全 39 例で全時点の検体を得ることができなかった理由として，非協力，唾液分泌量不足，退院後の通院困難，そして体調不良などが挙げられる．

Mitis-Salivarius (MS) 寒天培地 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に Bacitracin (0.2 unit/mL ; 和光純薬，大阪) および 15%スクロース (和光純薬) を添加した MSB 寒天培地に検体を播種し，37°C で 48 時間，嫌気培養した．

2. 染色体 DNA の抽出

MSB 寒天培地上の各コロニーをプレート上で光学顕微鏡下にて観察し，形態学的に *S. mutans* に類似するコロニーを選別して釣菌した．釣菌コロニーを 10 mL の Brain Heart

Infusion (BHI) 液体培地 (Becton Dickinson) に接種し、37°Cで 18 時間培養後に実験に用いた。細菌 DNA の抽出は、Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて行った。培養した供試菌を遠心分離して回収し、250 μ L の Glu-TE 緩衝液 (1 M グルコース, 10 mM tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1 mM EDTA ; 和光純薬) に懸濁した。この懸濁菌液 250 μ L に、62.5 μ L の N-acetylmuramidase SG (2.0 mg/mL ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) とリゾチーム (10 mg/mL ; 和光純薬) 0.25 μ L を加え、37°Cで 90 分間反応させた。Cell Lysis Solution (QIAGEN) 600 μ L を添加し 80°Cで 5 分間反応させ、RNase (10 μ g/mL ; QIAGEN) 3 μ L を添加した。37°Cで 30 分間反応させた後、Protein Precipitation Solution (QIAGEN) を 200 μ L 添加し、ボルテックスを行い懸濁させた。この反応液を遠心分離して得た上清に、600 μ L のイソプロパノール (和光純薬) を添加して混和し、再度遠心分離を行った。得られた沈殿を 70%エタノール (Sigma-Aldrich) にて洗浄して乾燥後、DNA Hydration Solution (QIAGEN) 100 μ L に溶解した。得られた染色体 DNA 溶液は、Nano Photometer 微量分光光度計 N50 (Implen, Muenchen, Germany) を用いて OD260 で濃度を測定したのち 20 μ g/mL に調整し、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた *S. mutans* の同定に使用した。

3. *S. mutans* の同定

調整した DNA 溶液を用い、PCR 法にて *S. mutans* を同定した。 *S. mutans* 特異的プライマーである MKD-F および MKD-R の配列を補足表 S1 に示す¹⁸⁾。 PCR には T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) および TaKaRa Ex Taq[®] (タカラバイオ, 滋賀) を用いた。 増幅条件は 98°C で 10 秒間の熱変性, 70°C で 1 分間のアニーリング／伸張を 1 サイクルとして, 30 サイクル行った。 PCR 産物はアガロース電気泳動によりバンドの有無を確認した。 電気泳動用のゲルは, TAE 緩衝液 [40 mM Tris (和光純薬), 40 mM 酢酸 (和光純薬), 1 mM EDTA (pH 8.0) (ニッポンジーン, 東京)] に 1.5% アガロース S (ニッポンジーン) を加え, 加熱溶解したものを使用した。 泳動用緩衝液には TAE 緩衝液を用い, 100 V 定電圧で電気泳動を行った。 DNA サイズマーカーは, 100 bp ラダー (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を使用した。 泳動用ゲルを臭化エチジウム (0.5 µg/mL ; 和光純薬) 溶液で 10 分間の染色, 続いて 10 分間水洗した後, 波長 312 nm の紫外線で DNA のバンドを可視化した。

4. バイオフィーム形成量の測定

患児から検出された *S. mutans* を 10 mL の BHI 液体培地にて 37°C で 24 時間培養後, 培養した供試菌液 10 µL を 990 µL の 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 (FALCON, Franklin Lakes, NJ, USA) の各ウェルに 100 µL

分注した。37℃で 48 時間嫌氣的に培養し、各ウェルの浮遊菌液を取り除いた後に、25 μ L の 1%クリスタルバイオレット溶液（Sigma-Aldrich）を加えて 15 分間室温に静置し、蒸留水で 6 回洗浄を行った。その後、95%エタノールを加えて洗浄し、乾燥後、蒸留水を加えて波長 570 nm における吸光度を測定した。

5. 最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration ; MIC）の測定

移植前後に投与された抗菌薬が MIC 試験の結果に影響を及ぼす可能性を検討するため、*S. mutans* が検出された各患児における抗菌薬使用の詳細を確認した。本試験には、3種類のドライプレート（DP53, DP44, DPD2 ; 栄研化学, 東京）を用いた。各プレートにはグラム陽性菌および口腔内細菌に対して臨床的に使用頻度の高い抗菌薬が異なる組合せで収載されており、3種のプレートを併用することで、複数系統の抗菌薬に対する感受性を包括的に評価した。各プレートに含まれる抗菌薬および濃度は補足表 S2-S4に示す。MIC の測定は、Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）が定めた薬剤感受性検査法に関する基準に従い、微量液体希釈法で行った¹⁹⁻²¹⁾。分離した *S. mutans* と日本人小児の口腔より分離された *S. mutans* MT8148株²²⁾を BHI 液体培地にて37℃で一晩培養したものを供試菌液とした。供試菌液は滅菌生理食塩水で McFarland 標準濁度液1（栄研化学）と同じ濁度に調整した。混濁液25 μ L をストレプト・ヘモサプリメント（栄研化学）1 mL を添加したミューラー

ヒントンブイヨン（栄研化学）に加え，均等に浮遊させて接種用菌液とした．接種用菌液を100 μ L ずつ，各種抗菌薬が添加されたドライプレートに播種し，37°Cで24時間培養した．混濁または直径1 mm 以上の沈殿を認めた場合もしくは沈殿物の直径が1 mm 未満であっても沈殿塊が2個以上認められた場合を発育陽性と判定し，最小発育阻止濃度を測定した．

6. RNA シーケンス解析と Real-time RT-PCR による検証

抗菌薬耐性を持つ移植 1 か月後に採取された *S. mutans* (*S. mutans* Resistance 1w : *S. mutans* R-1w) と抗菌薬耐性を持たない移植前に採取された *S. mutans* (*S. mutans* Sensitive 0w : *S. mutans* S-0w) に加え，標準株 *S. mutans* MT8148 株を RNA シーケンス解析に供し，各株の遺伝子発現を比較した．供試菌を，BHI 液体培地で 37°C，18 時間培養後，新鮮な同液体培地に継代し，OD550 で対数増殖期後期まで培養した．培養液を 890 $\times$ g，4°Cで 10 分間遠心し，菌体を回収した．得られた菌体を UltraPure™ Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水 (BioDynamics Laboratory, 東京) で懸濁し，Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) に菌液を移し，TRI Reagent (Sigma-Aldrich) を 900 μ L 添加した後，Fast Prep (Bio-Rad) を用いて菌体を破碎した．破碎菌体を含む懸濁液を遠心し，クロロホルム (和光純薬) を混和させた後，上清の全 RNA をイソプロパノール (和光純薬) を用いて沈殿させ，回収を行った．RNA 試料はドライアイスを用いて大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験セ

ンターゲノム解析室に冷凍状態で発送し、RNA シーケンシング解析を外部委託した。RNA シーケンスデータに基づく遺伝子発現量の比較においては、符号つき Fold Change を用いた。

S. mutans R-1w vs *S. mutans* MT8148 株および *S. mutans* S-0w vs *S. mutans* MT8148 株の各遺伝子の Fold Change 値を算出し、Fold Change が正の値の場合は、そのまま上昇倍率とした。Fold Change が負の値の場合は、その絶対値の逆数を取り低下倍率と定義し、*S. mutans* R-1w と *S. mutans* S-0w の相対的な発現変化量を算出した。RNA シーケンス解析で発現上昇を示した遺伝子の中から MDR (multidrug-resistant) permease をコードする遺伝子 *SMU_1605*²³⁾ と Immunity protein をコードする遺伝子 *SMU_1913c*²³⁾ を抽出した。RNA シーケンス解析に用いた分離株を対象に Matsumoto-Nakano と Kuramitsu (2006) の方法²⁴⁾ に準じて Real-time RT-PCR (RT-PCR) を用い、抽出した遺伝子の発現変動の再現性を検証した。その際、目的遺伝子を増幅する特異的なプライマーを設計し実験に使用した (補足表 S1)。RNA 抽出を行った後、回収した全 RNA から染色体 DNA を除去するため、RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) を 37°C で 15 分間反応させた。この mRNA サンプルから SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。作製した cDNA を鋳型として、*SMU_1605* の及び *SMU_1913c* の発現を SYBR

green[®] (Bio-Rad) を用いた Real-time RT-PCR により調べた。Real-time RT-PCR の条件は添付の指示書に従い設定した。また、目的遺伝子の発現量は、16S rRNA を内部コントロールとして補正した。さらに、*SMU_1605* については、抗菌薬耐性を持つその他の臨床分離株を用いて発現変動の再現性を評価することとした。

7. 各種菌株の遺伝子発現解析

RNA シーケンス解析に用いた移植前の *S. mutans* S-0w に加え、移植 1 か月後に分離された抗菌薬耐性株 7 株および移植 3 か月後に分離された抗菌薬耐性株 2 株（計 10 株）を解析対象とし、*SMU_1605* の発現変動を Real-time RT-PCR により調べた。対象株数が多いため測定は 3 回に分けて実施し、各測定には *S. mutans* S-0w を同時に測定した。目的遺伝子の発現量は 16S rRNA で正規化し、*S. mutans* S-0w を 1 とした相対発現量として示した。本研究では、複数回測定できた菌株群を解析に用いた。

8. ペニシリン存在下における *SMU_1605* 遺伝子の発現解析

MIC 試験の際、*S. mutans* R-1w はドライプレートに含まれるペニシリン (0.06–4.0 µg/mL) では全濃度で増殖が認められたため、2倍段階希釈によるセカンダリーMIC 試験 (0–256 µg/mL) を実施した。OD550による増殖評価の結果、64 µg/mL 付近から増殖抑制が顕著となった（補足図 S1）。その1/2濃度である32 µg/mL を本研究のサブ致死濃度（sub-MIC）と定

義した. *S. mutans* R-1w を BHI 液体培地で一晚培養後, *SMU_1605* の発現の濃度依存性を評価するため, sub-MIC を基準として 0 (対照), 8 (1/4 sub-MIC), 16 (1/2 sub-MIC) $\mu\text{g/mL}$ のペニシリンを添加した BHI 液体培地に継代, 先述の手順に従い RNA を抽出し cDNA を合成したのち, Real-time RT-PCR により *SMU_1605* の発現量を定量し, ペニシリンによる *SMU_1605* の誘導が濃度依存的に生じるかを検討した.

9. 蛍光プローブによる細胞膜透過性の解析

MIC 試験の結果, *S. mutans* MT8148 株と比較して抗菌薬耐性獲得が認められた, 移植前 (5 株), 移植 1 か月後 (7 株) および移植 3 か月後 (3 株) から分離された *S. mutans* を Todd Hewitt (TH) 液体培地 (Becton Dickinson and Company) で 37°C で一晚培養し, 培養した供試菌液を TH 液体培地に播種し, 濁度が OD550 nm で 0.4 になるまで培養した. その後遠心分離し, 上清を取り除いた後, 塩化ナトリウム含有リン酸緩衝液で洗浄し, 同緩衝液でそれぞれ濁度が波長 600 nm で 0.2 になるように調整した. 調整後の菌液 1 mL に蛍光プローブ N-Phenyl-2-naphthylamine (NPN: 和光純薬) を 0 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ および 20 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加し, 遮光して室温で 30 分反応させた. 反応後 890 $\times g$, 4°C で 5 分間遠心し, その後上清を取り除き塩化ナトリウムリン酸緩衝液で 2 回洗浄し, 500 μL の同緩衝液にて再懸濁後, 96 穴蛍光測定用プレート (NuncloTMn Delta Surface ; NuncTM, Roskilde, Denmark) の各

穴に 100 μ L ずつ分注し，蛍光偏光度を蛍光分光光度計（Gemini XPSOK microplate spectrofluorometer；Molecular Devices Co, Japan）を用いて，励起光355 nm/蛍光460 nm で測定した．株数が多いため測定は複数回に分けて実施し，各回では *S. mutans* MT8148株を同時測定した．測定日時の変動を補正するため，各回の MT8148株の蛍光偏光度を基準値（1.0）として正規化し，移植前の株，移植1か月後の株および移植3か月後の株の相対値として算出した．得られた正規化後の相対値を統合して解析した．

10. 統計処理

得られたデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で，または箱ひげ図（中央値および四分位範囲）で示した．多群比較には一元配置分散分析（One-way ANOVA）を用い，事後検定には Tukey-Kramer 検定を行った．二群比較には Student *t* 検定を用いた（等分散性が担保されない場合は Welch の *t* 検定を用いた）．有意水準は $P < 0.05$ とした．統計解析には GraphPad Prism 8（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を使用した．

結果

1. 移植前後における *S. mutans* の検出率の推移

本研究では、39名の小児患者を対象とした。移植前には36例からサンプルを採取でき、移植1か月後は33例、移植3か月後は22例から採取可能であった。各検体について MSB 培地より釣菌したコロニーから抽出した DNA を *S. mutans* 特異的プライマー（MKD）を用いて PCR 解析し、アガロース電気泳動にて PCR 産物の有無を確認した結果、移植前には36例中6例（16.6%）、移植1か月後には33例中2例（6.06%）、移植3か月後には22例中5例（22.7%）に *S. mutans* に特異的なバンドが確認された。*S. mutans* の検出率は移植前と比較し、移植1か月後に一時的に低下したが移植3か月後には再び上昇が認められた（図3）。本研究において *S. mutans* が分離された小児 HSCT 患者の臨床的特徴については表1に示す。なお、灰色で示した症例は、分離株に抗菌薬耐性が認められた症例である。

2. バイオフィルム形成量の測定

患者の唾液より分離した *S. mutans* 株を用いて、バイオフィルム形成量を各時点で比較した結果、移植前および移植1か月後に比べて、移植3か月後の株においてバイオフィルム形成量は有意に高かった（One-way ANOVA, $*P < 0.05$ ）（図4）。

3. MIC の測定

S. mutans 分離例における小児 HSCT 患者の抗菌薬曝露概要を表2に示す。移植前には、多くの症例でセフェム系抗菌薬が使用されており、これに加えてペニシリン系およびキノロン系が併用される症例も多く認められた。一方、移植後においてもセフェム系は広く使用されていたが、カルバペネム系やポリペプチド系の投与が新たに増加していた。移植前後の各時点における、少なくとも1種類の抗菌薬に耐性を示す *S. mutans* 分離株の割合を示す(図5)。DP53プレートでは、移植前26%、移植1か月後100%、移植3か月後9.5%であった。DP44プレートでは、移植前17.4%、移植1か月後100%、移植3か月後0%であった、DPD2プレートでは、移植前21.7%、移植1か月後100%、移植3か月後9.5%であった。いずれのプレートにおいても、耐性株の割合は移植1か月後で最大となり、移植3か月後には移植前と同程度以下まで低下した。移植1か月後株では、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系など複数系統の抗菌薬に対する耐性が高頻度に認められ、多剤耐性傾向を示した。また患児の抗菌薬投与歴と耐性が認められた薬剤は概ね一致していた。一方、移植前および移植3か月後株では耐性株の検出頻度および耐性薬剤数はいずれも低い傾向にあった。抗菌薬耐性を獲得していた患児の臨床背景について表1(灰色で表示)に示す。特に広域にわたって耐性を獲得していたのは、症例9および10の患児であり、いずれも移植1か月後に採取を行ったサンプルであった。

4. RNA シーケンス解析による発現上昇遺伝子の同定と Real-time RT-PCR による検証

移植1か月後に採取された *S. mutans* R-1w と移植前に採取された *S. mutans* S-0w の遺伝子発現を RNA シーケンス解析により調べたところ、*S. mutans* S-0w と比較し、*S. mutans* R-1w において2倍以上変化を示した遺伝子は合計138種類であり、そのうち発現が上昇していたのは ABC トランスポーターをコードする遺伝子を含む94種類（68.1%）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。その中でも顕著に発現が上昇していた遺伝子を補足表 S5に示す。一方、44種類（31.9%）の遺伝子は低下していた。その中でも顕著に発現が減少していた遺伝子を補足表 S6に示す。

RNAシーケンシング解析により *S. mutans* S-0w と比較して *S. mutans* R-1w で発現上昇が認められた遺伝子のうち、MDR permease をコードする遺伝子 *SMU_1605* と Immunity protein をコードする遺伝子 *SMU_1913c* を選択し、Real-time RT-PCR により検証した。*S. mutans* S-0w の発現量を基準（1.0）とした場合、*S. mutans* R-1w における *SMU_1605* の発現量は約 256.7 倍であり有意な上昇を示した（Student *t* 検定, *** $P < 0.001$; 図 6A）。同様に、*SMU_1913c* の発現量も約 623 倍に増加し、有意な上昇が認められた（Student *t* 検定, *** $P < 0.001$; 図 6B）。

さらに、RNAシーケンス解析に用いた移植前の*S. mutans* S-0wに加え、移植 1 か月後に分離された抗菌薬耐性株を対象として、*SMU_1605* の発現変動をReal-time RT-PCRにより解析した。複数回測定できた菌株群 (*S. mutans* S-0w, 移植 1 か月後 3 株, 移植 3 か月後 2 株) を解析した結果、移植後 1 か月および 3 か月後に分離された複数の耐性株において、*S. mutans* S-0w と比較して*SMU_1605* 発現の一貫した上昇傾向が認められた (探索的解析, Welchの*t*検定; 補足図S2)。

5. ペニシリン存在下における*SMU_1605* 遺伝子の発現解析

セカンダリーMIC 試験で得られた sub-MIC を基準として 0 (対照), 8 (1/4 sub-MIC), 16 (1/2 sub-MIC) $\mu\text{g/mL}$ のペニシリンを添加された BHI 液体培地で培養した *S. mutans* R-1w の *SMU_1605* の発現変動を Real-time RT-PCR にて調べたところ, *S. mutans* R-1w (0 $\mu\text{g/mL}$) の発現量を基準 (1.0) とした場合, *SMU_1605* の発現量は濃度依存的に上昇した (One-way ANOVA, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; 補足図 S3)。

6. 蛍光プローブによる細胞膜透過性の解析

抗菌薬耐性を示した移植1か月後株に対する RNA シーケンス解析では、薬剤排出輸送系や膜関連遺伝子群の発現上昇が認められた。これらの分子変化は、移植1か月後株が「耐性 (生存) モード」にあるという本研究の解釈を支持する補助所見である。そこで、分子学

的变化が膜機能の変化としても観察されるかを確認する目的で、蛍光プローブ NPN を用いて細胞膜透過性を評価した。NPN は通常、細胞膜の外側に存在する際は蛍光を示さないが、細胞膜の脂質二重層内部に取り込まれると蛍光が著明に増強する性質を有する²⁵⁾。このため、NPN を用いた解析は細胞膜透過性の変化を反映するとされており²⁶⁻²⁸⁾、本研究においても RNA シーケンスで得られた膜関連遺伝子群の発現変動と、実際の膜透過性の変化との関連を検証することを目的として採用した。*S. mutans* MT8148 株の蛍光偏光度と比較したところ、抗菌薬耐性を獲得した株はいずれも蛍光偏光度が低値を示し、特に移植前および移植3か月後の株と比較して移植1か月後の株は著しく低値であった (One-way ANOVA, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 図6C)。

考察

本研究では、造血幹細胞移植周術期という強い環境変化のもとで、抗菌薬曝露および移植前処置が齲蝕関連細菌である *S. mutans* の検出動態「量」と性状「質」に及ぼす影響を、移植前、移植 1 か月後および移植 3 か月後の 3 時点で縦断的に評価し、口腔内の齲蝕関連リスクに及ぼす影響を検討した。主な知見として、*S. mutans* 検出率は移植 1 か月後に一過性に低下したのち、移植 3 か月後に回復したこと、移植 1 か月後株では多剤耐性獲得が高頻度にみられた一方、移植 3 か月後株ではバイオフィーム形成能が亢進していたことである。さらに、移植 1 か月後の耐性株では薬剤排出・膜関連遺伝子の発現上昇と膜透過性の変化が観察された。これらのことから、移植後は抗菌薬曝露および移植前処置により *S. mutans* の「量」だけでなく「質」を変化させ得ることが示唆された。

日本人小児の *S. mutans* の検出率については検出方法により幅があるものの、プラーク検体・PCR 法では 60%と言われている²⁹⁾。本研究においては、移植前の検出率は 16.7%であったが、移植 1 か月後には 6.1%に低下し、その後、移植 3 か月後には 22.7%と再び上昇した。健常小児の報告よりも明らかに検出率が低値であった理由として、造血幹細胞移植が予定されている患児では、移植前の感染源コントロールが極めて重要視されることから¹¹⁾、治療前の段階で徹底した口腔ケアや感染源除去が実施されることが多いため、健常小児と

比較して *S. mutans* などの齲蝕関連細菌が事前に大幅に減少している可能性が高い。また、移植 1 か月後に認められた *S. mutans* 検出率の一過性の低下は、移植前処置（高用量化学療法）による口腔粘膜障害、唾液分泌低下、免疫抑制といった急性期の宿主環境変化に加え、予防的および治療的な抗菌薬投与が重なることで口腔細菌叢の攪乱や菌交代現象の一側面を反映していると考えられる³⁰⁾。造血幹細胞移植患者の口腔微生物叢の経時的解析では、移植後早期に *Streptococcus* 属や *Neisseria* 属などの健康時に優勢な常在菌が減少し、*Staphylococcus* 属や *Pseudomonas* 属などが相対的に増加することが報告されている³¹⁾。さらに *Streptococcus* 属は β -ラクタム系、とりわけペニシリン系抗菌薬に対して高い感受性を示すことが知られており³²⁾、移植前後に行われる予防的および治療的抗菌薬投与によって *Streptococcus* 属が相対的に抑制される可能性が高い。その後、生着に伴う白血球回復と抗菌薬投与の減少もしくは終了、ならびに口腔環境の回復により、移植 3 か月後には再定着が進行した。また、この時期は口腔内の嫌気性共生菌を含む細菌叢の完全な回復は遅れている可能性があり、その結果として競合菌の少ない環境下で、スクロース利用能や酸耐性に優れた *S. mutans* が優位化して歯面への定着性を高めたと解釈できる。このことは、抗菌薬終了後においても齲蝕リスクが再上昇し得ることを示唆しており、周術期のみならず移植後中長期にわたる口腔管理の重要性を裏付ける所見である。

MIC 試験では移植 1 か月後株で複数系統の抗菌薬に対する耐性が高頻度に認められ、多剤耐性傾向を示した。耐性株検出頻度は各プレートで移植 1 か月後に最大となり、移植 3 か月後に移植前同程度以下へ低下した。また患児の抗菌薬投与歴と耐性が認められた薬剤が概ね一致していた点は、周術期の抗菌薬曝露が耐性獲得の選択圧として作用したことを支持する。さらに RNA シーケンス解析では、移植 1 か月後の耐性株において薬剤排出関連遺伝子や膜関連遺伝子の発現上昇が示され、代表遺伝子として *SMU_1605* (MDR permease) の発現上昇が Real-time RT-PCR で確認された。加えて、ペニシリン曝露下で *SMU_1605* の発現が濃度依存的に誘導されたことから（補足図 3）、抗菌薬曝露が薬剤排出能の活性化を促進する機構が存在する可能性が高い。これらの所見は、耐性獲得を単なる遺伝子変異としてではなく、抗菌薬曝露環境で生き残るために性状を切り替える適応的表現型変化として捉える枠組みを強く支持する。一方で、バイオフィーム形成量は移植 1 か月後と比較して *S. mutans* の再定着過程である移植 3 か月後に分離された *S. mutans* 株において亢進しており、移植 1 か月後株では低下していた。移植前処置に伴う高用量化学療法では活性酸素種（ROS）が産生することが知られており³³⁾、これに起因する酸化ストレスに加え、移植前および造血幹細胞が生着までの期間における抗菌薬の持続的な投与、さらには宿主側の栄養状態の変動および免疫能低下といった多様な環境ストレスが *S. mutans* に持続的に加

わっており、これらのストレス環境下での生存戦略として、バイオフィーム形成より、抗菌薬耐性獲得や薬剤排出系の活性化に重点が置かれていた可能性が考えられる。先行研究では *S. mutans* をグルコン酸クロルヘキシジンの sub-MIC で曝露した際、薬剤排出系（ABC トランスポーター等）の発現上昇、プリンヌクレオチド合成経路の変化、ストレス応答遺伝子の活性化といった代謝・ストレス応答関連の変動が生じ、耐性獲得につながり得る生理学的変化を誘導することが報告されている³⁴⁾。これは本研究の移植 1 か月後株の所見と整合する。

移植 1 か月後株では、蛍光プローブ NPN を用いた解析で蛍光偏光度が移植前および移植 3 か月後より低値であった。RNA シーケンスで示された薬剤排出関連遺伝子群の変動と合わせると、移植 1 か月後株では膜機能の変化が生じ、抗菌薬の透過性および排出動態に影響したと考えられる。すなわち、膜透過性の変化による薬剤の細胞内移行の抑制と、薬剤排出系の活性化という二層の機序が関与している可能性がある。これら分子学的および膜特性の変化は、移植 1 か月後株における抗菌薬曝露への適応を示唆しており、本研究で想定した「耐性（生存）モード」を補強する結果である。また、本研究での耐性獲得とバイオフィーム形成能が時間的に分離して観察された点は、HSCT 周術期における *S. mutans* の段階的・動的な性状変化の存在を示す重要な所見である。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、口腔細菌叢全体の構成変化を 16S rRNA 解析等により直接評価していない点が挙げられる。そのため、本研究で観察された *S. mutans* の変化は、細菌叢再編の影響を間接的に反映した結果として解釈する必要がある。第二に、遺伝子発現解析は代表的分離株を用いた探索的解析であり、すべての分離株に普遍的に当てはまることを示すものではない。しかしながら、同一の臨床背景を有する患児集団から分離された菌株において、耐性獲得、膜特性の変化、およびバイオフィーム形成能の亢進といった表現型変化が時系列的に一貫して観察された点は、本研究の知見の妥当性を一定程度支持すると考えられる。

以上の結果から、本研究は、*S. mutans* が HSCT 周術期における口腔細菌叢変動の直接的な原因菌であるというよりも、細菌叢の破綻と再構築の過程を鋭敏に反映する「指標菌 (sentinel organism)」として機能している可能性を示す結果である。すなわち、移植 1 か月後には抗菌薬曝露下で選択された耐性表現型を示し、移植 3 か月後には再定着およびバイオフィーム形成を通じて齲蝕リスクに関与するという、時間依存的な役割変化が示唆された。

したがって、HSCT 患児の口腔管理においては、移植後早期の感染対策のみならず、回復期以降に生じ得る *S. mutans* の再定着とバイオフィルム形成能の亢進を見据えた継続的な口腔ケアおよび長期的フォローアップが重要である。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の仲野道代教授に心から感謝致します．

また，様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます．

文献

- 1) Lee JY, Hong SH. Hematopoietic Stem cells and their roles in tissue regeneration. *Int J Stem Cells*. 2020; 13(1): 1-12.
- 2) 患者さんの情報 . 一般社団法人 日本造血・免疫細胞療法学会 .
https://www.jstct.or.jp/modules/patient/index.php?content_id=2 (最終アクセス 2025 年 11 月 5 日)
- 3) Hofmann J, Kokkaliaris KD. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells: life span dynamics and adaptation to acute stress. *Blood*. 2024; 144(1): 21-34.
- 4) Anna Sureda, Selim Corbacioglu, Raffaella Greco, Nicolaus Kröger, Enric Carreras (Editors). *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 8th Ed., Switzerland, Springer Nature, 2024.
- 5) Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006; 354(17): 1813-1826.
- 6) Aschan J. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook. *Br Med Bull*. 2006; 77-78: 23-36.
- 7) Mellouli A, Chebbi Y, El Fatmi R, Raddaoui A, Lakhal A, Torjmane L, Ben Abdeljelil N, Belloumi D, Ladeb S, Ben Othmen T, Achour W. Multidrug resistant bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Tunis Med*. 2021; 99(2): 269-276.
- 8) Kyyak S, Wagner-Drouet E, Goldschmitt J, Gielisch M, Heider J. Interplay of salivary function,

oral health, and psychological well-being in hematopoietic stem cell transplantation: a longitudinal cohort study. Clin Oral Investig. 2025; 29(8): 389.

- 9) Takahashi K, Soga Y, Murayama Y, Udagawa M, Nishimoto H, Sugiura Y, Maeda Y, Tanimoto M, Takashiba S. Oral mucositis in patients receiving reduced-intensity regimens for allogeneic hematopoietic cell transplantation: comparison with conventional regimen. Support Care Cancer. 2010; 18(1): 115-119.
- 10) 高橋郁名代, 杉浦裕子, 曾我賢彦. 造血幹細胞移植スタッフへの口腔ケアガイドンス, 2022 年改訂版. 岡山, 岡山大学病院, 2022. https://zouketsu.med.okayama-u.ac.jp/cms/wp-content/themes/zmo/assets/pdf/hand_book_me_01.pdf (最終アクセス 2025 年 11 月 5 日)
- 11) Hansen HJ, Estilo C, Owosho A, Solano AK, Randazzo J, Huryn J, Yom SK. Dental status and risk of odontogenic complication in patients undergoing hematopoietic stem cell transplant. Support Care Cancer. 2021; 29(4): 2231-2238.
- 12) Bulthuis MS, van Gennip LLA, Thomas RZ, Bronkhorst EM, Laheij AMGA, Raber-Durlacher JE, Rozema FR, Brennan MT, von Bültzingslöwen I, Blijlevens NMA, van Leeuwen SJM, Huysmans MDNJM. Caries progression after haematopoietic stem cell transplantation and the role of hyposalivation. Caries Res. 2022; 56(3): 187-196.
- 13) Graber CJ, de Almeida KN, Atkinson JC, Javaheri D, Fukuda CD, Gill VJ, Barrett AJ, Bennett JE. Dental health and viridans streptococcal bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell

transplant recipients. Bone Marrow Transplant. 2001; 27(5): 537-542.

- 14) Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. Lancet. 2007; 369(9555): 51-9
- 15) Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, Iwaki M. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. Infect Immun. 1990; 58(2): 289-296.
- 16) Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Med. 2003; 14(2): 89-99.
- 17) Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. Braz Oral Res. 2010; 24(2): 135-141.
- 18) Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004; 48(3): 195-199.
- 19) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI document M07-A11, 11th edition. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- 20) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. CLSI standard M11, 9th edition. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

- 21) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100, 30th edition. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- 22) Ooshima T, Izumitani A, Sobue S, Hamada S. Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. Jpn J Med Sci Biol. 1983; 36(4): 219-223.
- 23) National Center for Biotechnology Information.
Streptococcus mutans UA159 complete genome, GenBank accession no. AE014133.2.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AE014133> (最終アクセス 2026 年 2 月 22 日)
- 24) Matsumoto-Nakano M, Kuramitsu HK. Role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2006; 188(23): 8095-8102.
- 25) Helander IM, Mattila-Sandholm T. Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. J Appl Microbiol. 2000 ; 88(2):213-9.
- 26) Nieva-Gomez D, Gennis RB. Affinity of intact *Escherichia coli* for hydrophobic membrane probes is a function of the physiological state of the cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977; 74(5):1811-5.
- 27) Loh B, Grant C, Hancock RE. Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1984 ; 26(4): 546-51.

- 28) Ocaktan A, Yoneyama H, Nakae T. Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-oprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 1997 ; 272(35): 21964-9.
- 29) 蒔苗 剛, 下山 佑, 松本弘紀, 木村重信, 田中光郎. 小児プラークにおけるミュータンスレンサ球菌定着量と齲蝕罹患状況の関連. *小児歯科学雑誌*, 2017 ; 55(1) : 51-60.
- 30) Laheij AMGA, Rozema FR, Brennan MT, von Bültzingslöwen I, van Leeuwen SJM, Potting C, Huysmans MDNJM, Hazenberg MD, Brandt BW, Zaura E, Buijs MJ, de Soet JJ, Blijlevens NNM, Raber-Durlacher JE. Long-term analysis of resilience of the oral microbiome in allogeneic stem cell transplant recipients. *Microorganisms*. 2022; 10(4): 734.
- 31) Omori M, Kato-Kogoe N, Sakaguchi S, Komori E, Inoue K, Yamamoto K, Hamada W, Hayase T, Tano T, Nakamura S, Nakano T, Une H, Ueno T. Characterization of oral microbiota following chemotherapy in patients with hematopoietic malignancies. *Integr Cancer Ther*. 2023;22:15347354231159309.
- 32) Nakatani S, Ohara T, Ashihara K, Izumi C, Iwanaga S, Eishi K, Okita Y, Daimon M, Kimura T, Toyoda K, Nakase H, Nakano K, Higashi M, Mitsutake K, Murakami T, Yasukochi S, Okazaki S, Sakamoto H, Tanaka H, Nakagawa I, Nomura R, Fujiu K, Miura T, Morizane T; Japanese Circulation Society Joint Working Group. JCS 2017 Guideline on prevention and treatment of infective endocarditis. *Circ J*. 2019; 83(8): 1767-1809.

- 33) Ibrahim KM, Darwish SF, Mantawy EM, El-Demerdash E. Molecular mechanisms underlying cyclophosphamide-induced cognitive impairment and strategies for neuroprotection in preclinical models. *Mol Cell Biochem.* 2024; 479(8): 1873-1893.
- 34) Muehler D, Mao X, Czemm S, Geißert J, Engesser C, Hiller KA, Widbiller M, Maisch T, Buchalla W, Al-Ahmad A, Cieplik F. Transcriptomic stress response in streptococcus mutans following treatment with a sublethal concentration of chlorhexidine digluconate. *Microorganisms.* 2022; 10(3): 561.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 小児歯科学分野

(指導：仲野道代教授)

本論文の一部は，以下の学会において発表した．

- ・ 第 41 回日本小児歯科学会中四国地方会大会（2022 年 11 月：徳島）
- ・ 第 61 回日本小児歯科学会大会（2023 年 5 月：長崎）
- ・ 第 65 回韓国小児歯科学会大会（KAPD）（2024 年 4 月：韓国）
- ・ 第 62 回日本小児歯科学会大会（2024 年 5 月：横須賀）
- ・ 第 72 回国際歯科研究学会日本部会（IADR）（2024 年 11 月：鹿児島）
- ・ 第 63 回日本小児歯科学会大会（2025 年 5 月：新潟）
- ・ 第 34 回台湾小児歯科学会大会（2025 年 6 月：台湾）
- ・ 第 103 回 IADR/PER General Session & Exhibition（2025 年 7 月：バルセロナ）

表のタイトル

表 1. *S. mutans* が分離された小児 HSCT 患者の臨床的特徴

表 2. *S. mutans* 分離例における小児 HSCT 患者の抗菌薬曝露概要

補足表 S1. PCR およびリアルタイム RT-PCR 解析に使用したプライマー配列

補足表 S2. DP53 ドライプレートに含まれる抗菌薬と濃度

補足表 S3. DP44 ドライプレートに含まれる抗菌薬と濃度

補足表 S4. DPD2 ドライプレートに含まれる抗菌薬と濃度

補足表 S5. *S. mutans* S-0w と比較し, *S. mutans* R-1w において発現が増加した抗菌薬耐性に関連すると推定される遺伝子

補足表 S6. *S. mutans* S-0w と比較し, *S. mutans* R-1w において発現が減少した抗菌薬耐性に関連すると推定される遺伝子

図の説明

図 1. 研究デザインと周術期背景

A. 周術期の時間軸と検体採取時点

B. 周術期における口腔環境変化の概略

本研究の解析時点と造血幹細胞移植（HSCT）周術期における口腔環境変化の概略を示す。

造血幹細胞移植（HSCT）前処置として高用量化学療法および放射線照射が行われた後、白血球数は一時的に著しく減少するが、移植された造血幹細胞の骨髄生着に伴い、移植後 10～28 日頃より回復し、1～3 か月後には安定する。本研究では、移植前、移植 1 か月後および移植 3 か月後の 3 時点で唾液およびプラーク検体を採取した。

図 2. 研究対象者の登録および検体採取の流れ

研究対象者の登録および検体採取の流れをフローチャートで示す。本研究は岡山大学病院にて血液腫瘍と診断された HSCT 予定の患児 40 名の中から、最終的に同意を取得できた、移植前に 36 名、移植 1 か月後に 33 名、移植 3 か月後に 22 名から検体（唾液＋プラーク）を採取できた。

図 3. 移植前後の *S. mutans* 検出症例率

採取した唾液およびプラーク検体をバシトラシン含有 Mitis Salivarius 寒天培地に播種し、形成されたコロニーから DNA を抽出した。 *S. mutans* 特異的プライマー（MKD）を用いた PCR により *S. mutans* の有無を判定した。移植前後の各症例について、検体由来コロニーから *S. mutans* が検出された症例率を算出した。

図 4. 移植前後における *S. mutans* 分離株のバイオフィルム形成能

分離した *S. mutans* 株（図 3 参照）を 0.5%スクロース添加 Todd Hewitt 液体培地で培養し、96 穴プレート底面に形成されたバイオフィルムを 1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。波長 570 nm における吸光度を測定し、バイオフィルム形成能を定量的に評価した。供試菌株は、移植前 15 株、移植 1 か月後 7 株、移植 3 か月後 21 株（表 1 参照）とし、各菌株につき 5 ウェルで培養し、その平均値を解析に用いた。結果は箱ひげ図で示し、箱は四分位範囲、中央線は中央値、ひげは最大値および最小値を表す。実験は独立して 3 回実施し、再現性を確認した結果を示した（One-way ANOVA, $*p < 0.05$ ）。

図 5. 移植前後において抗菌薬に耐性を示した *S. mutans* 分離株の割合

分離した *S. mutans* 株（表 1 参照）および基準株（*S. mutans* MT8148 株）を BHI 液体培地で培養後、各種抗菌薬を含有する 3 種類のドライプレートに接種し、37°Cで 24 時間培養した。菌の増殖の有無を判定し、基準株と比較して少なくとも 1 剤に耐性を示した株の割合

(≥ 1 剤耐性) を算出した。各時点における耐性株の割合を示す。3 種類の抗菌剤プレート (DP53, DP44, DPD2) の詳細は、補足表 S2~S4 を参照。

図 6. 抗菌薬耐性 *S. mutans* 分離株における代表的発現分子および膜特性

A. *SMU_1605* の相対発現量

B. *SMU_1913c* の相対発現量

C. NPN プローブを用いた膜特性の評価 (細胞膜透過性指標)

抗菌薬耐性株 (*S. mutans* R-1w) および抗菌薬感受性株 (*S. mutans* S-0w) を用い、耐性表現型に関連する分子学的特性および膜特性を評価した。

統計解析は、A および B (A は $n=3$, B は $n=1$) については Student の t 検定を、C (n は図中のドット) については one-way ANOVA 後に Tukey の多重比較検定を用いた ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)。

補足図 S1. 抗菌薬耐性 *S. mutans* 分離株に対するペニシリンの亜致死濃度の決定

抗菌薬耐性株 *S. mutans* R-1w を用いて、ペニシリンに対する最小発育阻止濃度（MIC）を 2 倍段階希釈法（0–256 $\mu\text{g/mL}$ ）により再評価した。各濃度における菌の増殖を観察し、増殖抑制が認められ始める濃度域を確認した。本研究では、64 $\mu\text{g/mL}$ 付近から増殖抑制が顕著となったため、その 1/2 濃度である 32 $\mu\text{g/mL}$ を本研究の亜致死濃度と定義し、以降の抗菌薬曝露実験に用いた。各濃度群（ $n = 3$ ）の比較は、0 $\mu\text{g/mL}$ を対照として one-way ANOVA により解析した（* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ）。

補足図 S2. 追加臨床分離株における SMU_1605 発現変動の再現性評価

RNA シーケンス解析に用いた移植前の *S. mutans* S-0w（1 株）に加え、移植 1 か月後に分離された抗菌薬耐性株 3 株および移植 3 か月後に分離された抗菌薬耐性株 2 株を対象として、SMU_1605 の発現変動を Real-time RT-PCR 法により解析した。各株につき 5 well で測定し、その平均値を各株の代表値とした。発現量は非耐性である移植前の *S. mutans* S-0w を 1 とした相対値で示した。箱ひげ図は各独立分離株の値を示す（移植前 $n = 1$, 移植 1 か月後 $n = 3$, 移植 3 か月後 $n = 2$ ）。統計解析は探索的解析として株平均値を用いて実施し、*S. mutans* S-0w との比較に Welch の t 検定を用いた（* $P < 0.001$ ）。

補足図 S3. ペニシリン曝露下における抗菌薬耐性 *S. mutans* 分離株の SMU_1605 発現応答

抗菌薬耐性株 *S. mutans* R-1w を BHI 液体培地で一晚培養後，*SMU_1605* の発現の濃度依存性を評価するため，サブ致死濃度（32 $\mu\text{g/mL}$ ）を基準として 0（対照），8（1/4 sub-MIC），16（1/2 sub-MIC） $\mu\text{g/mL}$ のペニシリンを添加した BHI 液体培地に継代し，RNA を抽出した．Real-time RT-PCR により *SMU_1605* の相対発現量を測定した．*SMU_1605* の発現量はペニシリン濃度の上昇に伴う発現増加傾向が認められた（one-way ANOVA の Tukey 検定を用いた． $*P < 0.001$ ）．本図は探索的解析として得られた結果の一例を示す．