

第2回「口腔環境制御研究」カテゴリー一集会

期日：平成22年2月10日（水）

場所：長崎大学医学部良順会館2階ボードウインホール

第2回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会

期日：平成22年2月10日（水）

場所：長崎大学医学部良順会館2階ボードウィンホール

1:30-1:35		イントロダクション
1:35-1:55	1	松田 悠佑（鹿児島大学） 口腔内の抗菌性ペプチドの役割について
1:55-2:15	2	平松 美菜子（広島大学） 固定化抗菌剤の開発と応用
2:15-2:35	3	青山 典生（東京医科歯科大学） 血管病変に対する歯周病原細菌感染の影響
2:35-2:55	4	多部田 康一（新潟大学） マウス <i>P. gingivalis</i> 口腔感染モデルにおける動脈硬化性変化の解析
2:55-3:15	5	近藤 好夫（長崎大学） <i>P. gingivalis</i> の TPR タンパク A (TprA) 結合性タンパクの病原性
3:15-3:35	6	小川 泰治（大阪大学） 再発性化膿レンサ球菌性咽頭炎からの臨床分離株の性状解析
3:35-4:20		休憩（熱帯医学ミュージアム（熱帯医学研究所）等の見学など）
4:20-4:40	7	森山 雅文（九州大学） ドライマウス患者における口腔粘膜障害と口腔内細菌叢の変化
4:40-5:00	8	安彦 友希（東北大学） 高齢者の歯肉縁下プラークバイオフィルム微生物叢の特徴
5:00-5:20	9	Haque Mohammad Shamsul（北海道大学） The TLR2 ligand FSL-1 is internalized via clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2.
5:20-5:40	10	遠藤 康正（岡山大学） 歯周病と酸化ストレス
5:40-6:00	11	渡邊 恵（徳島大学） ニッケルアレルギーモデルマウス樹状細胞におけるシグナル伝達の解析

なお、演題1～4は中山（長崎大学）、演題5～8は大原教授（岡山大学）、演題9～11は山崎教授（新潟大学）が座長を務めます。時刻はPMです。

口腔内の抗菌性ペプチドの役割について

松田悠佑^{1, 2}、松尾美樹¹、神原賢治¹、於保孝彦³、宮脇正一²、小松澤均¹

1. 鹿児島大学医歯学総合研究科 口腔微生物学分野
2. 鹿児島大学医歯学総合研究科 歯科矯正学分野
3. 鹿児島大学医歯学総合研究科 予防歯科学分野

自然免疫機構の一因子である抗菌性ペプチドは、体腔表面、皮膚、免疫担当細胞や臓器等の様々な部位に存在している。口腔内においてもディフェンシンをはじめとする抗菌性ペプチドの存在が確認されている。抗菌性ペプチドは、クローン病やアトピー性皮膚炎などの疾患における細菌感染症との関連性についても報告されており、微生物感染の防御機構として重要な役割を果たしていると考えられている。私達は抗菌性ペプチドと口腔内疾患との関連性を調べる目的で唾液中の抗菌性ペプチドの同定を試みている。また近年、口腔内常在菌のいくつかの菌種において、抗菌性ペプチドに抵抗性を示すことが報告されている。口腔内常在菌の抗菌性ペプチド抵抗性機構を明らかにすることは、口腔疾患ならびに全身疾患発症メカニズムの解明につながると考えられる。このような抗菌性ペプチドへの適応に重要な役割を示している因子として、細菌特有の情報伝達系である二成分制御系に着目している。今回、う蝕原性菌である *Streptococcus mutans* の二成分制御系の抗菌性ペプチド耐性機構への関与および唾液中の抗菌性ペプチドの同定・定量法について、現時点での知見をご報告したい。

固定化抗菌剤の開発と応用

平松 美菜子・二川 浩樹（広島大学）

我々は、4級アンモニウム塩とシラン化合物を合成し、新たな固定化抗菌剤 **Etak** を開発しました。歯面に固定化をする試みを行っています。この一方で、**Etak** は、布類などには室温で数分の処理で固定化が可能であるために、病院リネンなどに応用し、その表面に固定化することにより院内感染のリスクを下げるのが可能になるのではないかと考えています。また、**Etak** をエタノールを溶媒として希釈して用いることで、種々の表面に対して、噴霧するだけで固定化が可能になり、さらに固定化時間を短縮できるようになりました。

4級アンモニウム塩のスペクトルには、エンベロップを持つウイルスをあげることができ、その中にインフルエンザウイルスがあることから、抗インフルエンザウイルスの処理のできるスプレーや抗インフルエンザウイルスの衣類への応用開発を行い、昨年末には製品化されましたので、ご紹介いたします。

血管病変に対する歯周病原細菌感染の影響

青山典生 和泉雄一（東京医科歯科大学）

目的：近年、歯周病と循環器系疾患の関連が指摘されてきている。循環器系疾患の中でも、特に腹部大動脈瘤組織から複数の歯周病原細菌が検出されている。そこで本研究では、腹部大動脈瘤形成に関わる歯周病原細菌感染の影響を解析した。

方法：マウス腹部大動脈に CaCl_2 を塗布することにより、実験的に大動脈瘤を形成した。マウスに 10^8CFU の *Porphyromonas gingivalis*(*P.g.*)0.1ml を週に 1 回の割合で注入した。大動脈瘤形成開始から 4 週間後、大動脈サンプルを解析した。

結果：術後の大動脈直径は、対照群では術前径の約 1.5 倍に拡張したのに対し、*P.g.*感染させた実験群において約 1.8 倍の拡張を示し、両群で有意差を認めた。免疫染色から、実験群では腹部大動脈壁における MMP レベルが有意に高いことが観察された。

結論：本研究より、歯周病原細菌感染が MMP の発現を増加させることで腹部大動脈瘤形成を促進させる可能性があることが示唆された。

マウス *P. gingivalis* 口腔感染モデルにおける動脈硬化性変化の解析

多部田 康一（新潟大学）

動脈硬化性疾患と歯周炎の関連についてマウスモデルを用いた病因論に対するアプローチが行われている。動脈硬化症を自然発症する Apolipoprotein E ノックアウトマウス (ApoE KO マウス)を用いた *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 感染モデルにおいては、感染が動脈硬化病変を進行させるという報告で一致している。しかし、病因には不明な点が多く、血管壁における細菌の存在が病変進行に中心的役割を果たすと考察されるも明確ではない。我々は細菌が血中に移行する可能性の低い口腔感染による *P. gingivalis* (W83)感染マウスモデル (C57BL/6,ApoE KO) について短期 (4 週)、長期 (32 週) にわたり考察した。用いた感染方法では動脈組織に細菌は検出されなかった。感染は大動脈に動脈硬化性の遺伝子発現変化を起こすが、動脈硬化病変の発症よりも進行に影響を及ぼすと考えられた。動脈硬化促進方向への血清脂質変動も認めた。この変化は ApoE KO マウスの長期感染にて著しいもので、感染の作用は動脈硬化病変の進展と密接に関連することが示唆された。

***P. gingivalis* の TPR タンパク A (TprA) 結合性タンパクの病原性**

近藤好夫 (長崎大学 口腔病原微生物学分野)

偏性嫌気性菌 *P. gingivalis* は歯周疾患の原因菌と考えられている。宿主内での本菌の病原因子を明らかにすることを目的に、マウスに接種した菌と培地で培養した菌の菌体蛋白質のプロテオーム解析を行ってきた。TprA は宿主内で発現の上昇する蛋白質で、TprA 変異株はマウス膿瘍試験において病変形成率が低下しており、TprA は病原性に強く関与していることを示した。そこで TprA 変異株の遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法で解析し、TprA 変異株では TapA, B, C の発現量が野生株と比較して著明に減少していることが明らかになった。また TPR ドメインは蛋白質の結合に関与することから、TprA は他の蛋白質と結合して機能発現していると推測した。そこで TprA と相互作用を示す蛋白質のスクリーニングを行い、候補分子として TapB に着目した。免疫沈降法や Biacore を用いて分子間相互作用を解析した結果、両者の間に特異的な結合が認められた。また同様に TprA と TapA の結合についても確認できた。そこで TapA, B, C それぞれの変異株をマウスに接種したところ、すべての変異株において死亡率が野生株と比べ低下しており、これらの遺伝子が TprA と協調して病原性に関与していることが示唆された。

再発性化膿レンサ球菌性咽頭炎からの臨床分離株の性状解析

○小川泰治¹, 寺尾 豊¹, 大國壽士², 二宮恵子³, 坂田 宏⁴, 川端重忠¹

(阪大院・歯・口腔細菌¹, メデカジャパン², 二宮こどもクリニック³, 旭川厚生病院小児科⁴)

【目的】わが国では年間約 10 万人が、化膿レンサ球菌 (GAS) による咽頭炎を発症すると推計されている。本症に対してはペニシリン等の化学療法剤が用いられるが、再発率が 5-30%と報告されている。本研究では、咽頭炎の再発機構を解明するため、再発性咽頭炎患者から分離した GAS の性状を分子レベルで解析した。

【方法】再発性咽頭炎患者由来 臨床分離 GAS の 141 株を用い、各菌株の *emm* 型別、バイオフィーム形成能の定量と共焦点蛍光レーザー顕微鏡によるバイオフィーム形態の観察、およびヒト上皮細胞に対する細胞侵入能を解析した。

【結果と考察】*emm6* 型株では、バイオフィーム形成能が他の型に比べ、有意に高かった。また、バイオフィーム内部に存在する菌は、化学療法剤に抵抗性を示すことが明らかになった。ヒト上皮細胞に対しては、*emm12* 型株が高い侵入性を示した。細胞に侵入した GAS は、培地から化学療法剤を除去すると再び上清に移行し生育した。さらに、初感染時と再発時で、菌の *emm* 型の異なる再感染症例も散見された。以上の結果から、GAS は、*emm* 型により異なるメカニズムで咽頭炎の再発を引き起こす可能性が示唆された。

ドライマウス患者における口腔粘膜障害と口腔内細菌叢の変化

森山雅文（九州大学病院 顎顔面口腔外科）

【目的】ドライマウス患者では唾液の減少により、様々な口腔粘膜疾患および歯性疾患が生じるが、原因として口腔内微生物叢の変化が考えられる。ドライマウス患者の口腔粘膜疾患としては口腔カンジダ症が多く、さらに歯性疾患である齲蝕や歯周疾患も増加するが、ドライマウスとの関連はいまだ明らかではない。そこで本研究では、ドライマウス患者における *Candida* 菌と臨床症状との関連および口腔内細菌叢の解析を行った。

【対象・方法】2006年から2009年に当科を受診し、本研究に対して同意が得られた口腔乾燥症患者48例とし、対照群は健常者15例とした。口腔内真菌叢の解析には、制限酵素断片長多型（RFLP）法を用い、菌数はコロニー形成数（CFU）にて算出した。また口腔内細菌叢の解析には、末端蛍光修飾制限酵素断片多型性（T-RFLP）法を用いた。

【結果】ドライマウス患者では口腔カンジダ症が高頻度で発症しており、検出された *Candida* 菌数および菌種が健常者と比較すると多かった。また病変局所に存在する菌種の同定を行ったところ、舌粘膜からは *C. albicans*、口角部からは *C. glabrata*、頬粘膜からは *C. krusei* が高頻度に同定された。口腔内細菌叢を検索した結果、ドライマウス患者では、特定の菌種の割合が有意に高かった。

【考察】これらの結果から、ドライマウス患者においては、唾液の減少により口腔内微生物叢が変化し、種々の口腔疾患が惹起されている可能性が示唆された。特に、ドライマウス患者の口腔カンジダ症においては、病変の部位で増加する菌種が異なっている可能性が示唆された。

高齢者の歯肉縁下プラークバイオフィルム微生物叢の特徴

安彦友希，佐藤拓一，高橋信博（東北大・院歯・口腔生化学）

歯周炎の発症は加齢と共に高まるが、高齢者の歯肉縁下プラークバイオフィルム微生物叢の構成については不明な点が多い。そこで、高齢者の歯肉縁下プラークにおける歯周病関連菌の構成をリアルタイムPCR法で解析した。

60歳以上の自立高齢者95名（ 67.2 ± 4.5 歳）と口腔疾患のない健康な若年者12名（ 26.4 ± 1.8 歳）を対象とし、歯周病関連菌として *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)、*Tannerella forsythia* (*Tf*)、*Eubacterium saphenum* (*Es*)、歯面初期付着細菌として *Streptococcus oralis* (*So*) の菌量と全菌量を定量した。

Pg、*Tf*及び *Es* は若年者よりも高齢者で検出率が高く、歯周炎のない高齢者からも検出された。全菌量に占める *Pg* および *Tf* の割合も同様に、高齢者で高かった。一方、*So* の割合は若年者で高かった。歯周炎のない高齢者でも *Pg*、*Tf* が常在しており、これは高齢者の特徴であることが示唆された。

Pg の線毛の遺伝子型 (*fimA*) により歯周病原性が異なることが指摘されていることから、現在、高齢者の *Pg fimA* 型と歯周炎との関連について、解析を進めている。

The TLR2 ligand FSL-1 is internalized via clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2

Haque M. Shamsul, Akira Hasebe and Ken-ichiro Shibata (北海道大学)

Little is known about how Toll-like receptor (TLR) ligands are processed after recognition by TLRs. This study was therefore designed to investigate how the TLR2 ligand FSL-1 is processed in macrophages after recognition by TLR2. FSL-1 was internalized into murine macrophage cell line, RAW264.7. Both chlorpromazine and methyl- β -cyclodextrin, which inhibit clathrin-dependent endocytosis, reduced FSL-1 uptake by RAW264.7 cells in a dose-dependent manner, but nystatin which inhibits caveolae- and lipid raft-dependent endocytosis, did not. FSL-1 was colocalized with clathrin but not with TLR2 in the cytosol of RAW264.7 cells. These results suggest that internalization of FSL-1 is clathrin dependent. In addition, FSL-1 was internalized by peritoneal macrophages from TLR2-deficient mice. FSL-1 was internalized by human embryonic kidney 293 cells transfected with CD14 or CD36 but not by the non-transfected cells. In addition, knockdown of CD14 or CD36 in the transfectants reduced FSL-1 uptake.

In this study, we suggest that (i) FSL-1 is internalized into macrophages via a clathrin-dependent endocytic pathway, (ii) the FSL-1 uptake by macrophages occurs irrespective of the presence of TLR2, and (iii) CD14 and CD36 are responsible for the internalization of FSL-1.

歯周病と酸化ストレス

○遠藤康正¹ 玉木直文¹ 友藤孝明¹ 江國大輔¹ 山中玲子¹ 山本龍生² 大原直也³ 森田 学¹

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科予防歯科学分野

²神奈川歯科大学社会歯科学講座歯科医療社会学分野

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

近年、酸化ストレスと様々な疾患との関連性を検討する研究が数多くなされている。酸化ストレスとは、生体内において酸化力と抗酸化力とのバランスが崩れ、酸化力が過剰になった状態をいう。我々は過去の動物実験において、実験的に惹起させた歯周炎と全身性の酸化ストレスに関連があることを証明した。

更に、慢性歯周炎患者に対して非外科的歯周治療を行うことが、全身性の酸化ストレスにどのような影響を及ぼすかを検討するために臨床研究を行った。慢性歯周炎患者（4mm以上の歯周ポケットを4ヶ所以上有する者）と健常者において全身性の酸化ストレスの指標である血漿酸化ストレス度を比較した結果、慢性歯周炎患者は健常者に比べ有意に血漿酸化ストレス度が高かった。更に、慢性歯周炎患者に非外科的歯周治療を行ったところ、歯周状態及び血漿酸化ストレス度に改善がみられた。また、歯周治療開始1ヶ月後の評価において、プロービング時出血の改善量と血漿酸化ストレス度の減少量の間に関連のある正の相関がみられた。これらのことから、非外科的歯周治療は臨床指標及び全身性の酸化ストレスの改善に寄与することが示唆された。

ニッケルアレルギーモデルマウス樹状細胞におけるシグナル伝達の解析

渡邊 恵 (徳島大学大学院 HBS 研究部口腔顎顔面補綴学分野)

歯科材料開発の進展に伴い、生体親和性の高い歯科材料の開発が進んでいるが、現在の歯科治療で全ての患者にそのような材料を用いた治療を行うことは困難である。そのため現在でも金属を用いた歯科治療が主体であるが、歯科金属と金属アレルギーに強い因果関係があることはよく知られている。しかし補綴領域における金属アレルギー研究には疫学的なものや、口腔内に溶出した金属を分析するものが多く、アレルギー病態の本質に迫る研究は少ない。

我々は、金属アレルギーの発症機構を明らかにすることで、より正確で患者負担の少ない診断および治療法を開発していくことが重要であると考え、金属アレルギーの中でも特にアレルギー発症頻度の高いニッケル (Ni) に対するアレルギーモデルマウスを作製し、樹状細胞 (DC) を中心にその病態を解析してきた。Ni で刺激を加えた DC 上では p38MAPK のリン酸化が亢進することに着目し、MKK6/p38 シグナルを制御することによりモデルマウスの病態を制御することを試みたので報告する。