

第5回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会 プログラム

会期：平成 25 年 2 月 1 日(金)

会場：長崎大学医学部ポンペ会館 1 階 セミナー室

第5回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会

会期：平成25年2月1日（金）13:30-17:35

会場：長崎大学医学部ポンペ会館1階 セミナー室

15分発表、5分討論

時間	座長	演者	演題
13:30-13:35			イントロダクション
13:35-13:55	中山 浩次教授 (長崎大)	小林奈穂 (東京医歯大)	歯周病原細菌感染が循環器疾患の進行に与える影響
13:55-14:15		竹下徹 (九州大学)	口腔細菌叢の構成と口腔ならびに全身の健康との関連性
14:15-14:35		有松 圭 (新潟大)	<i>Porphyrromonas gingivalis</i> 口腔感染マウスモデルの脂肪組織における炎症性サイトカイン及びCTRP9の遺伝子発現変動
14:35-14:55		近藤智之 (徳島大)	自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫システムの解析
14:55-15:15		福井暁子 (広島大学)	口腔粘膜上皮細胞,線維芽細胞におけるウイルス認識機構 RIG-I の発現と機能
15:15-15:35		平井公人 (岡山大)	<i>Methanobrevibacter oralis</i> およびヒトのグループ II シャペロニンに対する免疫応答の解析
15:35-15:50		休憩	
15:50-16:10	大原 直也教授 (岡山大)	本多真理子 (大阪大)	ヒト補体免疫系回避機構における <i>Streptococcus pyogenes</i> 分泌型プロテアーゼ SpeB の機能解析
16:10-16:30		藤島 慶 (鹿児島大)	<i>Streptococcus sanguinis</i> の産生する過酸化水素への PerR を介した <i>Streptococcus mutans</i> の酸化ストレス耐性機構の解析
16:30-16:50		佐伯 歩 (北海道大)	口腔レンサ球菌によるインフラマゾームの活性化
16:50-17:10		福島 梓 (東北大)	<i>S. mutans</i> 人工バイオフィルムによるチタンの生物学的腐食
17:10-17:30		長野史子 (長崎大)	ラットにおけるグラム陽性細菌の感作および歯肉溝内滴下は歯周組織破壊を促進する
17:30-17:35			まとめ

歯周病原細菌と循環器疾患の関連の解明を目指す臨床研究

○小林奈穂 鈴木淳一 青山典生 高村千智 芦垣紀彦 関西明日香 始平堂由佳 金子誠
磯部光章 和泉雄一

東京医科歯科大学医歯学総合研究科歯周病学分野

【背景】

歯周炎は歯肉の炎症と歯周支持組織の喪失を特徴とする感染性疾患である。抜歯や歯周病治療などの歯科治療だけでなく歯のブラッシング後にも、口腔細菌が血中から検出されている。最近の研究から、歯周病が複数の全身疾患と関わりがあることが示されてきている。これまでに我々は基礎研究から、特定の歯周病菌感染が大動脈瘤、血管傷害後の内膜肥厚、心筋虚血後の心臓の線維化を促進させることを示した。しかしながら、世界的にも歯周病の罹患細菌の違いに伴う心血管疾患発症への影響の差は示されていない。

【目的】

本臨床試験の目的は、循環器疾患の病態において歯周病罹患状態や歯周病原細菌がどのように関与しているかを明らかにすることである。

【材料と方法】

被験者として、東京医科歯科大学医学部附属病院にて循環器疾患の治療を受ける入院症例の男女成人患者のうち、臨床試験参加の意思を有する者を対象とした。検査項目としては、入院加療に関わる一般的な医科学的検査、および詳細な歯周病学的検査を行う。その後、統計学的に循環器疾患ごとに関連の強い歯周病学的検査マーカー（喪失歯数、プロービングポケット深さ、臨床的アタッチメントレベル、個人最大 CPI スコア）を解析していく。なお、本研究課題は東京医科歯科大学医学部附属病院および歯学部附属病院における倫理審査委員会の承認を受けている。

【結果と考察】

被験者のうち最大 CPI 値が 3 以上あるいは無歯顎の者の割合は約 70%となっており、循環器疾患治療のための入院患者における歯周組織状態の悪化が認められた。また循環器疾患別に見ると、心筋梗塞患者群で他の循環器疾患患者よりも歯周病状態の悪化が認められた。さらに、冠動脈疾患患者群において *Porphyromonas gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の歯周病菌検出や抗体価の高値が認められたが、不整脈患者群に関してはそのような傾向は認められなかった。

【結語】

本研究結果から、特定の歯周病原細菌が特定の循環器疾患と関連していることが示唆された。今後さらに詳細なメカニズムが明らかになれば、歯周病原細菌の検索が特定の循環器疾患のリスク診断へとつながる可能性がある。

口腔細菌叢の構成と口腔ならびに全身の健康状態との関連性

○竹下 徹、山下 喜久
九州大学大学院歯学研究院
口腔保健推進学講座口腔予防医学分野

ヒトの体表面には自身の細胞数の 10 倍を超える細菌が様々な部位に常在細菌叢 (フローラ) を構築し生息している。近年 16S rRNA 遺伝子を用いた細菌群集解析法の確立により培養を経ずに構成を把握することが可能になったことで、この複雑な常在フローラと宿主の健康状態との関わりが徐々に明らかになってきている。本研究では、「健康な」デンタルプラーク細菌叢の特定を目指し、20 代の被験者のプラーク形成過程を観察した。う蝕未経験群 9 名と経験群 10 名からハイドロキシアパタイトディスクを接着したマウスピースを用いて 1、2、3、4、5、7 日間蓄積したプラークを採取し、定量 PCR 法およびバーコードパイロシーケンス法を用いてそれぞれの細菌量、細菌構成を解析した。

総菌数の増加、検出菌種数の増加、好気性細菌優勢から嫌気性細菌優勢の細菌叢へのシフトといった経時的変化はどの被験者においても共通して認められた。一方でう蝕未経験群の初期プラークは経験群に比べ *Neisseria* 属、*Gemella* 属、TM7 属の細菌が優勢な、より複雑な構成を示した。さらに経験群で認められる *Actinomyces* 属、*Granulicatella* 属、*Veillonella* 属の後期プラークにおける劇的な増加が未経験群では認められなかった。本研究からう蝕の経験がない成人に特有のプラーク構築パターンが存在することが明らかとなり、口腔常在フローラの個人差がう蝕感受性に関わっていることが示唆された。

Porphyromonas gingivalis 口腔感染マウスモデルの
脂肪組織における炎症性サイトカイン及び CTRP9 の遺伝子発現変動

○有松圭, 山崎和久

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命福祉学専攻 口腔保健学講座
摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野

【目的】動脈硬化性疾患や糖尿病は歯周疾患と強い関連を持つことが報告されている。インスリン抵抗性はいずれの疾患に対してもリスク因子として作用することが明らかとなっている。しかし歯周疾患のインスリン抵抗性誘発メカニズムの詳細は明らかになっていない。我々は *P. gingivalis* 口腔感染がインスリン標的臓器において炎症を引き起こすことでインスリン抵抗性を誘発するという仮説を立て、これを検証した。

【材料および方法】6 週齢雄の C57BL/6 マウスに CM セルロースに懸濁した *P. gingivalis* W83 株あるいは基剤のみを週 2 回口腔より接種した。5 週間後に脂肪組織を採取し、炎症性サイトカイン、アディポネクチンの相同性分子である CTRP9 の発現、またインスリンと CTRP9 の標的遺伝子である GLUT4 等の糖代謝関連遺伝子発現を解析した。

【結果および考察】感染群の脂肪組織において炎症性サイトカインの発現は上昇し、CTRP9 の発現は低下していた一方、血中の糖を取り込むことで血糖値を下げる作用を持つ GLUT4 の遺伝子発現は有意に低下していた。

以上のことから、*P. gingivalis* 口腔感染により、脂肪組織において炎症性サイトカインが誘導され、CTRP9 の発現が低下し、糖代謝関連遺伝子の発現が変化することにより、インスリン抵抗性が惹起される可能性が示唆された。

自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫システムの解析

○近藤智之、工藤保誠、石丸直澄

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子病態学分野

【目的】自己免疫反応は自己の細胞や組織に対する免疫反応であり、腫瘍免疫もまた自己に発生した腫瘍細胞に対する免疫反応であることから、自己免疫と腫瘍免疫には何らかの共通点あるいは相違点が想定されるが詳細については不明な点が多い。腫瘍免疫ではNK細胞や活性化マクロファージが重要な役割を果たしていることがよく知られている。一方、自己免疫疾患においても、ある段階ではマクロファージが病態発症に重要であることが報告されている。本研究では、シェーグレン症候群を含む自己免疫疾患モデルマウスであるB6/*lpr* マウスを用いて腫瘍移植実験を行うことにより、マクロファージによる腫瘍免疫制御機構を明らかにすることを目的とする。

【材料及び方法】C57BL/6 (B6)マウスとB6/*lpr* マウス（自己免疫疾患モデル）に対し悪性黒色腫細胞(B16F10)及びGM-CSFを強発現するB16F10の移植実験を行い、腫瘍の増殖、各種免疫細胞分画を病理学的あるいは免疫学的手法を用いて検討した。

【結果及び考察】B6/*lpr* マウスに移植したB16F10の増殖は対照群に比較して亢進傾向が見られた。また、B6/*lpr* マウスに移植したGM-CSFを強発現するB16F10の増殖は対照群に比較して有意に亢進していた。B16F10を移植されたB6/*lpr* マウスのマクロファージ数は対照群に比較して減少傾向にあったが、GM-CSFを強発現するB16F10を移植されたB6/*lpr* マウスのマクロファージ数は対照群に比較して有意に上昇していた。これにより、B6/*lpr* マウスで増殖したマクロファージは腫瘍に対する免疫反応に寄与していないものが増加していることが考えられる。自己免疫反応は腫瘍免疫システムに何らかの機能不全をもたらす可能性が示された。

口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞におけるウイルス認識機構 RIG-I の発現と機能

○福井暁子, 太田耕司, 鎌田伸之

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻

顎口腔頸部医科学講座口腔外科学教室

【目的】

細菌やウイルスの感染に対し宿主細胞は, その侵入を検知し自然免疫などの生体防御システムを発動させる。病原体の構成成分を認識する細胞レセプターとして Toll-like receptor (TLR) が同定され, 様々な報告がなされているが, TLR 以外の病原体認識機構の存在も考えられている。RIG-I(Retinoic acid inducible gene-I)はウイルスを認識し機能する細胞内タンパク質である。しかしながら, 口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞における RIG-I を介した免疫応答に関しては不明な点が多い。そこで, 我々は不死化口腔粘膜上皮細胞(RT7)と不死化歯肉線維芽細胞 (GT1) を用い, RIG-I の発現と RIG-I ligand による I 型インターフェロン, 炎症性ケモカインの発現調節とそのシグナル伝達経路について検討した。

【材料及び方法】

RT7 と GT1 の全 RNA を抽出, cDNA を作製し, RIG-I mRNA の RT-PCR を行った。RIG-I 抗体を用いた細胞蛍光免疫染色を行った。また RT7 と GT1 に二本鎖 RNA である RIG-I ligand 処理を行い, 同様に cDNA を作製し, IFN- α , β , 炎症性ケモカインの定量的 RT-PCR を施行した。RIG-I ligand 処理による STAT1, IRF-3 等のリン酸化蛋白を Western blotting にて検出した。

【結果】

RT7, GT1 で RIG-I mRNA の発現を認めた。RIG-I 蛋白は細胞膜内に認められた。RIG-I ligand の添加により, 両細胞で IFN- α , β , IL-8, CCL20, CXCL10 mRNA 発現の増加が認められた。両細胞において RIG-I ligand 処理によって STAT1, IRF-3 リン酸化蛋白の誘導が認められた。

【結論】

口腔粘膜上皮細胞, 線維芽細胞は, 細胞膜に存在する RIG-I を介して, ウイルスを認識し, STAT1, IRF-3 の蛋白のリン酸化により, 抗ウイルス作用を持つ I 型インターフェロンや, CXCL10 の発現が誘導されることが示された。

Methanobrevibacter oralis およびヒトのグループ II シャペロニンに対する 免疫応答の解析

○平井公人, 前田博史, 高柴正悟

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野

【目的】 重度の歯周炎局所で検出率の高い古細菌である *Methanobrevibacter oralis* (*M. oralis*) のシャペロニン (Cpn) とヒトのグループ II の Cpn である Chaperonin containing T-complex polypeptide (CCT) が相同性の高い分子であることから, *M. oralis* の Cpn が自己免疫応答を誘導している可能性ある。これまでにグループ I の Cpn である熱ショックタンパク (HSP60) に関しては分子相同性が高いことから交差反応が起こる可能性が報告されてきた。しかしグループ II に関してはほとんど報告がない。そこで本研究では, *M. oralis* の Cpn ならびにヒト CCT サブユニットに対する免疫応答性を解析した。

【材料および方法】

1. 被験者血清：歯周病患者 30 人, 自己免疫疾患患者 31 人, 健常者 18 人から採取した。(承認番号 624)
2. 抗原：市販されているサブユニット CCT1, CCT5, CCT6, そして HSP60, さらに下記の方法で合成した CCT3, CCT4, CCT8, および *M. oralis* の Cpn を使用した。
3. リコンビナントタンパクの構築：コムギ胚芽無細胞タンパク合成技術により合成した。
4. 免疫応答の解析：Dot blot 法と Western blot 法により免疫応答の解析を行った。
5. 統計処理：2 群間の優位差の検定は Student's *t*-test を用いた。また, 2 群間の相関性の解析は Pearson's product-moment correlation coefficient を用いて解析した。*p* 値は 0.05 以下を有意差ありと判定した。

【結果】

1. Dot blot 法において, 歯周病患者は CCT4 ならびに CCT8 に対して健常者群よりも強い反応性を示した。自己免疫疾患患者は CCT3 ならびに CCT8 に対して強い反応性を示した。
2. *M. oralis* の Cpn と各 CCT サブユニットに対する血清反応性は, 歯周病患者群で全体的に正の相関を示し, 特に CCT3, CCT5, CCT6, そして CCT8 は相関が強かった ($p < 0.05$)。
3. Western blot 法においては, 歯周病患者群ならびに自己免疫疾患患者群は CCT4 に対して健常者群よりも強い反応性を示した。
4. *M. oralis* の Cpn に対しては, 健常者群と患者群ともに強い反応性を示したが, 被験者群間にその反応性の違いは無かった。
5. HSP60 に対しては, 患者群ならびに健常者群ともにほとんど反応性を示さなかった。

【考察】CCT に対する自己免疫応答が誘導されており、その中でもサブユニット CCT3, CCT4, そして CCT8 が自己抗体の標的となっていることが示唆された。さらに, HSP60 では被験者血清においては, 血清反応がほとんど確認できなかったことから, HSP60 よりも CCT の方が自己免疫応答を誘導しやすいことが考えられる。一方で, 患者群と, *M. oralis* が口腔内にほとんど生息していないと考えられる健常者群の両群ともに, *M. oralis* の Cpn に対する反応性が非常に強いのは, *M. oralis* の Cpn が口腔内以外の全身に分布する他の類似古細菌の Cpn とのアミノ酸類似性が高く, これらの類似古細菌が保有する Cpn との交差反応の結果と考えられる。

今回の結果は, *M. oralis* に対する抗 Cpn 抗体が CCT との間で交差反応が起こっているかを直接的に示せるものではない。しかし, *M. oralis* の Cpn に対する血清反応性と各 CCT サブユニットに対する血清反応性の相関を解析したところ, 歯周病患者群においては正の相関があった。これは, CCT に対する自己抗体の産生には *M. oralis* の Cpn に対する抗体産生が関連している可能性を示唆するものとする。

ヒト補体免疫系回避機構における *Streptococcus pyogenes* 分泌型プロテアーゼ SpeB の機能解析

○本多 真理子¹, 寺尾 豊², 住友 倫子¹, 中田 匡宣¹, 川端 重忠¹

¹ 阪大院・歯・口腔細菌, ² 新潟大院・医歯・微生物感染

【目的】*Streptococcus pyogenes* は多様な病原因子を発現し、自然免疫を回避すると考えられている。本研究ではヒト補体系に着眼し、補体系タンパク群と *S. pyogenes* 病原因子との相互作用について解析した。

【方法】既知の *S. pyogenes* プロテアーゼ組換え体とヒト血清を反応させ、補体因子分解能を有するプロテアーゼを、ウェスタンブロット法により検出した。野生株および同プロテアーゼ欠失株と、ヒト血清もしくは非働化ヒト血清を反応させ、血清中に含まれる補体系タンパクによる菌の増殖抑制作用への同プロテアーゼの影響を検討した。また、補体による菌体表層構造の変化に及ぼす同プロテアーゼの影響は、走査型電子顕微鏡により観察した。野生株および同プロテアーゼ欠失株への、膜侵襲複合体もしくは C9 の会合は、フローサイトメーターを用いて解析した。

【結果と考察】*S. pyogenes* プロテアーゼのなかで高い補体成分分解能を示したのは、システインプロテアーゼ SpeB であり、C1 インヒビター、C2、C3b、C4、C5a、C6、C7、C8、C9 をそれぞれ分解した。血清と反応させた SpeB 欠失株の生菌数は、野生株と比較して有意に減少した。一方、非働化血清と反応させた SpeB 欠失株では、反応前後における生菌数の変化は認められなかった。血清と反応させた SpeB 欠失株では、野生株と比較して菌体表層構造の破壊も多く認められた。さらに、血清と反応させた SpeB 欠失株への C9 の会合量は、野生株と比較して増加した。以上の結果から、SpeB は種々のヒト補体系タンパクを分解し、補体活性化経路を阻害することにより、*S. pyogenes* の宿主免疫機構に影響を及ぼす可能性が示唆された。

Streptococcus sanguinis の産生する過酸化水素に対するPerRを介した *Streptococcus mutans* の酸化ストレス耐性機構の解析

○藤島 慶^{1,2} 松尾 美樹¹ 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.歯科保存学分野

【目的】 *Streptococcus mutans* の口腔内定着機構の解明という観点から、*S. mutans* 同様、口腔常在菌でありプラーク中に高頻度に認められる*Streptococcus sanguinis*の産生する過酸化水素の影響に着目した。本研究では、*S. mutans*の*S. sanguinis*の産生する過酸化水素耐性機構の解明を行うことを目的とする。

【方法】 *S. mutans*は、酸化ストレス耐性因子として、AhpCF、Dpr、SODをもつことがこれまでに報告されている。これらの耐性因子の各欠損株を作製し、*S. sanguinis*及び過酸化水素に対する感受性を、competition assayおよび過酸化水素に対する生存率の定量化検証により検証した。また、他菌種において酸化ストレス耐性因子のrepressorとして知られているPerRとこれら酸化ストレス耐性因子との関連性について検証を行った。さらに実際の口腔内環境を想定し、*S. sanguinis* および*S. mutans* を共培養した際の各菌のポピュレーション解析を行った。

【結果】 competition assay において *dpr*、*sod* の欠損株では UA159 野生株より強い増殖阻害像が認められた。また、過酸化水素に対する生存率の定量化検証では、*dpr*、*sod* の欠損株で有意な生存率の低下が認められた。さらに、他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor として知られる PerR の欠損株を用いて同様の方法で検証を行った。その結果、*perR* 欠損株では過酸化水素に対する感受性の減少が認められた。また、*perR* 欠損株における *dpr* の発現量は UA159 野生株に比べ有意な増加を認めた。

S. mutans と *S. sanguinis* との共培養試験では、*S. sanguinis* とのいずれの混合比率においても、*S. mutans* の占める割合は UA159 野生株よりも *perR* 欠損株で高く、またその時の *dpr* の発現量は *perR* 欠損株において有意に増加していた。

【結論及び考察】 *S. mutans* は *dpr*、*sod*、*ahpC* の 3 つの酸化ストレス耐性因子を所有し、このうち *dpr* が耐性因子の本体であることが示された。*dpr* は過酸化水素から Fenton pathway により致命的酸化ストレスであるヒドロキシルラジカルが産生されることを抑制する因子である。他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor である PerR は、*S. mutans* においては *dpr* の発現を抑制することが認められた。本研究により、*dpr* の発現制御を調整する PerR を介した酸化ストレス耐性機構が明らかになった。

口腔レンサ球菌によるインフラマゾームの活性化

○佐伯 歩、柴田 健一郎

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔分子微生物学教室

【目的】

我々はこれまで口腔連鎖球菌の有するTLR2による認識を介した種々の生物活性について報告してきた。またリポタンパク質(LP)を欠損した*S. mutans*ならびに*S. gordonii*を作成し、野生株はTLR2で認識されるが、LP欠損株は認識されないことを明らかにした。

本研究では細胞内レセプターであるNOD2による口腔連鎖球菌の認識、マウス樹状細胞(XS-106細胞)におけるインフラマゾームの活性化について検証したので、その成果を報告する。

【材料と方法】

口腔連鎖球菌として、*Streptococcus mutans* 109c (Sm)ならびに *S. gordonii* Challis (Sg)の野生株 (WT) とリポタンパク質欠損株(dLP) ならびに *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 (Ss)を用いた。NOD2による認識はHEK293細胞にNOD2をNF- κ Bのレポーター遺伝子とともに導入し、ルシフェラーゼレポーター法で測定した。XS-106細胞によるIL-1 β の産生はELISA法、Western blot法で評価した。caspase-1ならびにNLRP3の発現はリアルタイムPCR法で調べた。

【結果ならびに考察】

SmならびにSgのWT株、dLP株共にNOD2を介してNF- κ Bを活性化した。このことから口腔連鎖球菌体の構成成分が何らかのメカニズムでHEK293細胞の細胞質に取り込まれ、細胞内のレセプターであるNOD2で認識されていることが示唆された。そこで、細胞内のセンサーであるインフラマゾームの活性化を検証した。Sm、SgならびにSsの生菌、熱処理した死菌ならびに菌体培養上清はXS-106細胞からのIL-1 β の産生を誘導した。Ssにより誘導されるIL-1 β の産生は、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤であるクロロプロマジン、pan-caspase阻害剤であるZ-VAD-FMKならびにcaspase-1と4の阻害剤であるz-YVAD-FMKにより抑制された。XS-106細胞のcaspase-1をRNAiによりノックダウンすると、Ss刺激によるIL-1 β の産生は抑制された。また、Ss刺激により、XS-106細胞におけるNLRP3の発現が上昇した。さらに、これら口腔連鎖球菌による刺激はXS-106細胞に細胞死を誘導した。

これらのことから、口腔連鎖球菌はクラスリン依存的にXS-106細胞の細胞内に取り込まれ、インフラマゾームを活性化し、pyroptosisを誘導する耐熱性の菌体構成成分を有していることが示唆された。さらに、インフラマゾームの活性化にはNLRP3が関与している可能性が示唆された。

S. mutans 人工バイオフィルムによるチタンの生物学的腐食

○福島梓^{1,2} 真柳弦³ 中條和子² 佐々木啓一¹ 高橋信博²

1.東北大学大学院歯学研究科 口腔システム補綴学分野

2.東北大学大学院歯学研究科 口腔生化学分野

3.東北大学大学院歯学研究科 インターフェイス研究事業

【目的】チタン・チタン合金は生体親和性、優れた安全性のため、インプラント材料や義歯床用材料として広く用いられている。しかし近年、アレルギーの発症や腐食・変色などの問題が懸念されており、改めてチタン・チタン合金の生物学的腐食性の評価が求められている。本研究では、チタン表面に *Streptococcus mutans* を用いた人工バイオフィルムを形成し、チタン表面の電気化学的变化（とくに腐食電流値）を、ポテンシオスタットを用いて測定した。さらに、溶出するごく微量のチタンを、高周波誘導結合質量分析装置 (ICP-MS) により、定量することを試みた。

【方法】片面鏡面研磨したチタン (Commercially pure titanium (CPTi) ASTM Grade II (1×10×10 mm)) を底面としたアクリル製のウェル (直径 4 mm、深さ 2 mm) を作製し、バイオフィルムを模して *S. mutans* NCTC10449 の生菌あるいは死菌を緊密に填入した。細菌代謝活性によるチタンの腐食への影響を調べるために、生菌は複合培地で培養し使用直前まで代謝活性を維持させたものを、死菌はそれをオートクレーブ滅菌し代謝活性を失わせたものを用いた。*S. mutans* 上に 1% グルコース (G(+)) あるいは脱イオン水 (G(-)) 500 μ L を静かに滴下して 37°C で静置し、90 分間の pH 変化を微小イオン感受性電界効果型トランジスタ (ISFET) pH 電極を用いて測定した。90 分後、菌体を 2 mM リン酸緩衝液 (PPB、pH 7.0) 0.5 mL 中に回収し、ICP-MS を用いて菌体に溶出・移行したチタン量を測定した。また、チタン上にアクリル製のセル (直径 15 mm、深さ 20 mm、チタンの露出面積: 3.14 mm²) を作製し、菌体を填入する前後にポテンシオスタットを用いてチタン表面の電気化学的变化を測定し、分極曲線を得た。分極曲線から Tafel 外挿法により腐食電流値を算出した。

【結果】菌からなるバイオフィルムの存在下ではグルコースの有無によらず腐食電流値が有意に上昇し (G(+): 4.35±3.97 nA から 36.57±9.09 nA (p<0.01)、G(-): 0.93±0.45 nA から 52.0±5.13 nA (p<0.01))、腐食傾向が増加したが、死菌においては腐食電流値に変化はなく (0.30±0.14 nA から 0.31±0.17 nA (p=0.921))、腐食傾向の増加は認められなかった。溶出・移行チタン量は生菌、死菌ともに増加は認められなかった。

【考察】代謝の相違に関わらず、生菌からなるバイオフィルムの存在によってチタン表面の腐食性が増加することが示された。チタン溶出は認められなかったことから、表面酸化膜の変化等が生じたことが示唆される。本手法によって、チタンをはじめ各種金属系バイオマテリアルの生物学的腐食性の評価が可能であると考えられる。

ラットにおけるグラム陽性細菌の感作および歯肉溝内滴下は歯周組織破壊を促進する

○長野史子、金子高士、吉永泰周、鵜飼孝、藏本明子、高森雄三、野口恵司、原宜興
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病学分野

【目的】

ラットにおいて、歯周病原細菌とされていないグラム陽性細菌の菌体破砕物で感作さらに歯肉溝内滴下を行い、歯周組織破壊への影響を病理組織学的に検討した。

【研究手法】

菌体破砕物はグラム陽性細菌の *Staphylococcus aureus* (*S. a.*) またはグラム陰性細菌の *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) を 100℃で 10 分加熱した後に 1 分間超音波破砕したものを用いた。ラットはそれぞれの菌体破砕物で感作もしくは非感作群に分けた。感作群には菌体破砕物とフロイントの不完全アジュバントの混和物をラット腹腔内に投与し、28 日後に再度ブースター投与を行なった。非感作群にはフロイントの不完全アジュバントと PBS のみを、感作群と同じスケジュールで 2 度腹腔内投与した。その 24 時間後から、上顎第一臼歯口蓋側歯肉溝内にそれぞれの菌体破砕物 25μg/μl を 30 分間滴下し、24 時間ごとに 10 日間繰り返した。10 日目の滴下の 24 時間後に屠殺して上顎骨を摘出した。これをパラフィン包埋し、作製した頬舌的な連続切片に対して HE 染色、破骨細胞の道程のための TRAP 染色、免疫複合体を検出するための C1qB 染色を行った。感作の状態を確認するために、ラットの眼窩化静脈から採血を行った。

【結果】

血清中の *S. a.* または *A. a.* に対する IgG 抗体レベルは、*S. a.*、*A. a.* 感作群ともに滴下開始後 5 日目には上昇しており、屠殺直前にも上昇していた。それに対して非感作群では血清抗体レベルはほとんど変化していなかった。病理組織学的計測では、感作群は非感作群に比べて有意にアタッチメントロスが大きかった。また歯槽骨頂部の TRAP 陽性多核細胞は有意に増加しており、かつ歯槽骨レベルの低下も認められた。C1qB 染色では、感作群にのみ接合上皮および接合上皮周囲の結合組織に陽性反応が観察された。

【考察】

細菌で感作された状態で歯肉溝内に細菌が存在すれば、歯周病原細菌とされていないグラム陽性細菌でも歯周ポケット形成が促進される可能性が示唆された。