

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15766

研究課題名(和文) プロバイオティクスを利用した歯周病原細菌によるバクテミア予防のための基礎的研究

研究課題名(英文) The basic research for the prevention of periodontitis induced bacterimia by using probiotics

研究代表者

栗原 英見 (Kurihara, Hidemi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：40161765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では歯周炎が腸内細菌叢に与える影響を関節リウマチモデルマウスで検討する。さらに腸内細菌叢の破綻が歯周病原菌である*P. gingivalis*感染で引き起こされることが、様々な全身疾患の原因となっていると仮定して研究を行った。その結果、*P. gingivalis*感染が腸内菌叢の変化を引き起こし、粘膜免疫を活性化していることが明らかになった。特に*P. gingivalis*は直接糞便から検出されないが、*Bacteroides*属の増加とIgAに産生増加、そのクラススイッチに関与する酵素AIDの誘導をきたし、関節リウマチ増悪に関与していた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the involvement of periodontitis (periodontopathogenic bacteria, *Porphyromonas gingivalis* infection) in the progression of rheumatoid arthritis (RA) was determined by using the model mouse of RA (SKG mouse). The oral infection of *P. gingivalis* induced RA strongly in SKG mice same as the intraperitoneal infection (Yamakawa et. al. 2015 CEI). The dysbiosis by *P. gingivalis* showed the increase of population of bacteroides bacteria by analyzing Miseq (illumina). The elevation of IgA in feces was observed in the group of *P. gingivalis* infected RA mouse. The enzyme AID for the class-switching of iGM to IgA was also upregulated in peyer's patches. These findings indicates that the infection of *P. gingivalis* via oral cavity might cause of induction of systemic disease by changeng the bacterial environment in gut.

研究分野：歯周病態学

キーワード：歯周炎 バクテリミア 腸内細菌叢

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎やう蝕は口腔内の細菌による感染症である。う蝕は進行すると歯髄に細菌が感染し、全身に感染した細菌が移行する。また歯周炎は細菌により微小構造が破壊され、炎症を伴うことで局所の血管が拡張し、細菌が血液に侵入する状態『バクテミア(菌血症)』を呈する(Support Care Cancer. 2013 Jun;21(6):1621-7.)。このバクテミアを予防するための方法は、ブラッシングによる機械的プラーク除去、洗口剤などによる化学的な除去である。しかし、これらは非特異的で一時的な方法であるため、継続して行わなければならない(J Periodontol. 2007 Apr;78(4):654-60.)。さらに口腔内由来細菌の感染(バクテミア)は様々な全身疾患の原因となることも知られている。また、バクテミアに続く全身の機能障害が原因の2次的な機械的プラーク不良をきたす(Sci Rep. 2014 May 6;4:4828.)。本研究課題では生物学的プラークコントロール(プロバイオティクス)の有効性について、メタゲノム解析を用いて検討する。さらに腸内細菌叢の破綻が歯周病原菌である *P. gingivalis* 感染で引き起こされることが、様々な全身疾患の原因となっていると仮定して研究を行った。

### 2. 研究の目的

健康者および歯周炎患者の唾液をサンプルとして採取し、口腔内細菌叢についてメタゲノム解析する

*P. gingivalis* 感染歯周炎モデルマウスにおける口腔内、腸管細菌叢をメタゲノム解析する

マウスとヒトの口腔内細菌叢について、その種属の比較を行う。

歯周炎モデルマウス、健康マウスの口腔内に定期的な機械的、化学的プラークコントロールまたは乳酸菌 L8020 株を用いたプロバイオティクス〔研究分担者(広島大学 口腔健康科学科 二川浩樹教授)が開発〕を行い、口腔内細菌叢の変化をメタゲノム解析で比較する。

### 3. 研究の方法

*P. gingivalis* 感染歯周炎モデルマウスの確立

以前報告した、*P. gingivalis* 腹腔感染モデルより、より実際の生理学的状態を反映した、口腔艦船モデルの確立を目指した。

プロバイオティクスの評価のベースラインとして *P. gingivalis* 感染歯周炎モデルマウスの口腔内細菌叢のメタゲノム解析を行う

モデルマウスの糞便から DNA を抽出し、16s rRNA をターゲットにメタゲノム解析を行う。

*P. gingivalis* 感染歯周炎モデルマウスの腸内環境の解析  
細菌叢の変化と、それに対応する粘膜免疫の変化を、組織学的に検討する。

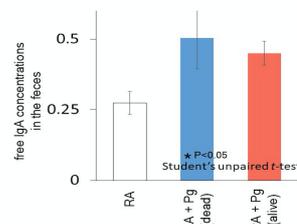
### 4. 研究成果

通常の SKG マウスで laminarin を投与して誘導した関節リウマチマウスと比較して、*P. gingivalis* 腹腔感染を伴うと、早期に関節リウマチが悪化することが明らかとなった。

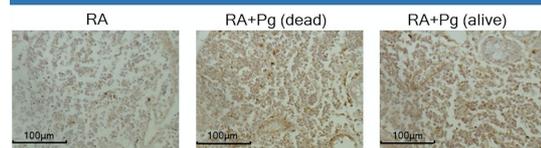
*P. gingivalis* は口腔内から消化管を通して、腸管粘膜に到達する。ヒトは日に 1-1.5 L の唾液を飲み込むことから、より、*P. gingivalis* 感染をヒトの病態と近くするため、*P. gingivalis* 口腔感染モデルを確立した。*P. gingivalis* 口腔感染が、腹腔感染と同様に関節リウマチ症状を悪化させ、T cell の分布を検討してみると、Th17 の増加、制御性 T cell の減少が認められた。口腔感染であるため、当然歯周組織の炎症、歯槽骨吸収も認められた。

同モデルの腸管粘膜の解析を行った。まず、糞便から DNA を精製し、腸内細菌叢のメタゲノム解析を行った。*P. gingivalis* 感染で Bacteroides 属の増加が優位に認められた。また、腸管の粘膜炎症をして IgA そして、IgM IgA へのクラススイッチに關与する酵素 AID に着目した。*P. gingivalis* 感染マウスでは、糞便中の IgA 量の増加が認められた(図上段)。また、IgA 産生細胞(B cell)のクラススイッチが盛んに行われているパイエル板の AID 陽性細胞を免疫染色で検討したところ、*P. gingivalis* 感染マウスでは、陽性細胞が優位に増加した(図下段)。

Results (free IgA concentrations in the feces)



Results (immunohistochemistry of AID)



Antibody: anti-AID polyclonal antibody  
color development: DAB substrate

以上のことから、腸内細菌叢の破綻が *P. gingivalis* 感染で引き起こされることが示唆され、関節リウマチを始めとする全身疾患発症に影響していると予想される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Miyagawa T, Fujita T, Yumoto H, Yoshimoto T, Kajiya M, Ouhara K, Matsuda S, Shiba H, Matsuo T, Kurihara H.  
Azithromycin recovers reductions in barrier function in human gingival epithelial cells stimulated with tumor necrosis factor- $\alpha$ .  
Arch Oral Biol. 査読有り  
2016 Feb;62:64-9.  
doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.11.015.

Yamakawa M, Ouhara K, Kajiya M, Munenaga S, Kittaka M, Yamasaki S, Takeda K, Takeshita K, Mizuno N, Fujita T, Sugiyama E, Kurihara H.  
Porphyromonas gingivalis infection exacerbates the onset of rheumatoid arthritis in SKG mice.  
Clin Exp Immunol. 査読有り  
2016 Nov;186(2):177-189.  
doi: 10.1111/cei.12847.

Takeda K, Obinata Y, Konishi A, Kajiya M, Matsuda S, Mizuno N, Sasaki S, Fujita T, Kurihara H.  
Brain-Derived Neurotrophic Factor Inhibits Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Interleukin-1  $\alpha$ -Treated Endothelial Cells.  
Cell Biochem Biophys. 査読有り  
2016 Sep;74(3):399-406.  
doi: 10.1007/s12013-016-0749-2.

Ouhara K, Iwasaki Y, Kajiya M, Savitri IJ, Kitagawa M, Tokunaga N, Shintani T, Ogawa I, Hino T, Fujita T, Shiba H, Kurihara H.  
The differential expression of mgl mRNA by Porphyromonas gingivalis affects the production of methyl mercaptan.  
Oral Dis. 査読有り  
2015 Jul;21(5):626-33.  
doi: 10.1111/odi.12326.

〔学会発表〕(計3件)

宗永修一、應原一久、山川真宏、山崎聡士、杉山英二、栗原英見  
歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 感染の関節リウマチへの影響についての検討  
第60回日本リウマチ学会総会・学術大会  
2016.4.21-23  
パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)

山川真宏、應原一久、高田隆、栗原英見  
*Porphyromonas gingivalis* infection exacerbated rheumatoid arthritis in mice model  
2016 国際歯科学会  
2016.6.20-26  
ソウル、大韓民国

佐藤陽子、應原一久、宗永修一、加治屋幹人、水野智仁、藤田剛、栗原英見  
The oriental medicine, magnoliaceae, inhibits the production of methylmercaptan via mgl mRNA inhibition  
第145回日本歯科保存学会秋季学術大会  
2016.10.27-28  
キッセイホール(長野県 松本市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

栗原 英見 (KURIHARA, Hidemi)  
広島大学大学院・医歯薬保健学研究院  
(歯)・教授  
研究者番号: 40161765

(2)研究分担者

二川 浩樹 (NIKAWA, Hiroki)

広島大学大学院・医歯薬保健学研究院

(歯)・教授

研究者番号： 10228140

應原 一久 (OUHARA, Kazuhisa)

広島大学大学院・医歯薬保健学研究院

(歯)・助教

研究者番号： 80550425

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

藤田 剛 (FUJITA, Tsuyoshi)

広島大学大学院・医歯薬保健学研究院

(歯)・准教授

杉山 英二 (SUGIYAMA, Eiji)

広島大学大学院・医歯薬保健学研究院

(医)・教授