

平成22年 3月 31日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19390543

研究課題名（和文）：口腔バイオフィーム誘発性全身疾患に対する新しい予防法の開発

研究課題名（英文）：Development of preventive measures against systemic diseases caused by oral biofilm

研究代表者

於保 孝彦 (OHO TAKAHIKO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50160940

研究成果の概要（和文）：口腔バイオフィームによって誘発される全身疾患の機序を調べ、予防法の開発を目指した。膿瘍病巣から回収される口腔レンサ球菌の唾液タンパク質との反応を解析し、口腔内定着の機序を明らかにした。感染性心内膜炎から回収される口腔レンサ球菌は、血管内皮細胞に侵入し、炎症性サイトカインの産生を誘導することが認められた。肺炎から回収される口腔日和見菌は、唾液被覆気道チューブおよびカフへの付着を生じることが認められた。

研究成果の概要（英文）：Mechanisms of systemic diseases caused by oral biofilm were examined to develop new preventive methods against the diseases. Interaction between oral streptococci recovered from abscess lesion and salivary proteins was clarified. Human aortic endothelial cells were invaded by oral streptococci recovered from infective endocarditis and produced more inflammatory cytokines than non-invaded cells. Oral opportunistic bacteria recovered from pneumonia lesion showed capability to bind to saliva-coated endotracheal tubes and cuffs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯学、微生物、感染症、歯垢

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化社会の到来とともに長期入院療養、介護を必要とする患者が増え口腔ケアの重要性が強調されている。口腔内には無数の細菌が棲息し、口腔バイオフィームであるデン

タルプラークを形成している。このデンタルプラークは齲蝕や歯周疾患などの口腔内感染症のみならず、心臓、肺、肝臓、脳、腎臓などにしばしば重篤な感染症を引き起こすことが臨床的に報告されている。従来の報告

は、主に臨床細菌学的知見に基づいて、深部病巣から口腔内に存在する菌が同定されるがゆえに口腔内細菌を感染源とする間接的なものであった。またデンタルプラーク中には雑多な菌が棲息しているにもかかわらず、深部感染巣から検出される菌は特定の菌種に限定されている場合がほとんどであり、なぜ混在する菌の中から、比較的限定された菌種のみが深部局所に感染、定着し得るのかについても未だ不明である。そこで申請者らはこれまでにデンタルプラークによる全身疾患誘発能を明らかにするために、ヒトのプラークそのものを用いてマウスおよびラットにおける膿瘍、感染性心内膜炎、誤嚥性肺炎誘発実験を行い、その発症頻度の検討および感染部位から菌の分離、同定を行った。

(2) マウスを用いた膿瘍形成実験では、プラーク懸濁液を皮下注入したマウスの 89% に膿瘍が形成され、その病巣からは *Streptococcus anginosus* group に属する菌が主として回収されることを確認した。これらの菌種はプラーク中での占有率は低いにもかかわらず、プラークを用いた場合の方がこれらの菌種の純培養株を用いた場合と比較して膿瘍形成能はより高く、プラークという多種多様の菌種の集合体のもつ潜在的な病原性が示唆された。

(3) あらかじめ心臓動脈弁に損傷を与えたラットに、プラーク懸濁液を尾静脈から注入すると 96% のラットに感染性心内膜炎を発症することを認めた。感染病巣からは、*Streptococcus oralis* をはじめとするレンサ球菌が主として回収された。

(4) マウスの気管内にプラーク懸濁液を注入すると、全てのマウスに肺炎が発症し、感染病巣からは種々の口腔細菌が回収されることが認められた。

(5) これらの研究成果に基づき、膿瘍、感染性心内膜炎、肺炎について、それぞれの病巣から回収された菌による炎症誘発の機序を調べ、これらの疾患の予防法の開発を行うという着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 膿瘍病巣から主として回収された *S. anginosus* group に属する菌はヒトの主な口臭原因物質の 1 つである硫化水素 (H_2S) を他のレンサ球菌より多く産生することを我々は認めている。 H_2S は細胞毒性を有する気体であり、生体防御因子である好中球やリンパ球等の障害を引き起こすことによって、同グループの菌が病巣に生き延びる可能性がある。実際、このグループの菌は多形核白血球の貪食作用に強い抵抗性を示すことを我々は確認している。同グループの菌について H_2S 産生酵素欠失株を作製し、膿瘍形成との関連性について検索を行う。また同菌の唾液タン

パク質を介した口腔内定着機構についても検索を行う。

(2) 心内膜炎病巣からは *S. oralis* を主体とするレンサ球菌が回収された。またレンサ球菌の菌体表層多糖欠失株を用いると同疾患の発症率が減少したことから、菌体表層多糖がこの疾患の発症に関与していることが推察された。一方で我々はレンサ球菌が菌体表層に持つ糖鎖構造の違いにより他種菌体との反応性が異なることを認めている。そこで心内膜への菌体付着に関わる菌体表層の糖鎖構造を調べる。また心内膜炎原因菌の 1 つである *Granulicatella adiacens* 表層のフィブロネクチン結合物質について分子生物学的解析を行う。

(3) 肺炎については特定の菌種でなく様々な菌が発症に関与していることが認められたため、プラーク中に存在する日和見病原菌に絞り唾液被覆気道チューブおよびカフへの付着について検索を行う。

(4) 口腔細菌による動脈硬化症誘発機序を調べるため血管内皮細胞への菌の侵入および炎症関連因子の産生を調べる。

(5) これらの結果から、疾病誘発に関わる菌体のタンパク質因子および糖質因子の機能領域をもとにペプチドや糖鎖を設計し、疾病発症の予防剤として応用する。

3. 研究の方法

(1) *S. anginosus* group による膿瘍形成機序を解明するため、菌体のもつ硫化水素産生酵素遺伝子 *Icd* を失活した変異株を作製し、L-システインを基質として同酵素の活性を調べた。

(2) *S. anginosus* group の唾液タンパク質を介した口腔内定着機構を調べるため、このグループに属する *S. intermedius* の線毛遺伝子をクローニングし、4 つの ORF に着目した変異株を作製した。唾液タンパク質による菌体凝集を菌体懸濁液の濁度の変化で調べ、唾液タンパク質で被覆したプラスチックプレートへの付着を RI ラベルした菌体を用いて調べた。

(3) *S. oralis* 菌体表層多糖の心内膜炎発症への関与を調べるため、同菌の表層糖鎖欠失株を作製した。その後、菌体を蛍光物質でラベルして、細胞外マトリックスタンパク質への付着能を ELISA 法で調べた。

(4) 心内膜炎原因菌の 1 つである *G. adiacens* 表層のフィブロネクチン結合物質を同定するため、*Streptococcus pyogenes* のフィブロネクチン結合物質の塩基配列を基にプライマーを設計し PCR を行った。得られた PCR 断片をプローブにして *G. adiacens* のライブラリーをスクリーニングして、当該遺伝子の全塩基配列を決定した。

(5) 口腔日和見病原菌による人工呼吸器関

連肺炎の誘発機序を解明するため、菌体を蛍光ラベルし、唾液被覆気道チューブおよびカフへの付着を調べた。また高い付着能を示した *Klebsiella pneumoniae* については、抑制実験を行い付着に関わる線毛のタイプを決定した。

(6) 口腔細菌による動脈硬化症誘発機序を調べるため、口腔レンサ球菌のヒト動脈内皮細胞への侵入を antibiotic protection assay で評価した。次にレンサ球菌が侵入した内皮細胞からの炎症性サイトカインの産生を ELISA 法で調べた。さらにリアルタイム PCR 法で炎症性サイトカインの mRNA の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 膿瘍病巣から多く回収された *S. anginosus* group のもつ高い硫化水素産生能に起因する病原性を調べるため、様々な手法を用いて同グループに属する *S. anginosus* および *S. intermedius* の硫化水素産生酵素遺伝子 *Icd* を失活させた変異株の作製に努めた。ガスクロマトグラフで変異株の硫化水素産生量を調べたところ、野生株より低い値を示すものの完全に失活をしなかったことから、*Icd* 以外にコードされる硫化水素産生機序を有することが考えられ、この菌種の持つ特異的な硫化水素産生機序が推測された。また *S. intermedius* の線毛遺伝子をクローニングし、唾液タンパク質との反応を解析することにより同菌の口腔内定着機序を調べた。その結果、C 末端側の Saf3 領域が唾液タンパク質による凝集に関与し、他の領域は唾液タンパク質への結合に関与することが明らかになり、唾液タンパク質との反応を介した口腔バイオフィーム形成機序が示された。

(2) 感染性心内膜炎病巣から多く回収された *S. oralis* について、同菌の表層糖鎖欠失株を用いて細胞外マトリックスタンパク質への結合能を調べた。*S. oralis* の 1Gn 型および 3G 型レセプター多糖を失活させた変異株のフィブロネクチン、I 型コラーゲン等への結合能は野生株と差が無く、この表層多糖は結合に関与しないことが明らかとなった。

(3) 心内膜炎原因菌の 1 つである *G. adiacens* 表層のフィブロネクチン結合物質の同定、解析を行った。この物質は、1 単位 345 bp の繰り返し配列 9 個を含む全長 6,708 bp からなるタンパク質であり、*Streptococcus gordonii* のフィブロネクチン結合タンパク質 CshA と高い相同性を示すことが認められた。またこの遺伝子は数種類の *G. adiacens* 株および *Abiotrophia* 属でもその存在が確認された。

(4) 口腔日和見病原菌による人工呼吸器関連肺炎の誘発機序を解明するため、菌体の気道チューブおよびカフへの付着能を調べた。6

種類の日和見病原菌を含む 13 種類の口腔内細菌を用いて、ヒト唾液で被覆した気道チューブおよびカフへの付着能を調べたところ、日和見病原菌はレンサ球菌と同等もしくはそれ以上の高い付着能を示した。このうち高い付着能を示した *K. pneumoniae* については、spermidine でその付着が特異的に抑制されることから、菌体表層に存在する type 3 fimbriae が付着に関与していることが明らかとなった。

(5) 口腔レンサ球菌による動脈硬化症誘発機序を解明するために、同菌のヒト血管内皮細胞への侵入を調べた。9 種類 10 系統の菌について調べたところ、同じ侵入時間であれば菌と内皮細胞数の比率 (MOI) が異なっても菌は同程度の侵入率を示した。一方、MOI が同じであれば、侵入時間が長くなる程、菌の侵入率は増加することが明らかとなった。また菌が侵入したヒト血管内皮細胞の炎症性サイトカイン産生を調べたところ、数種類の菌は、IL-6、IL-8、MCP-1 等の産生を誘導することがタンパク質および遺伝子レベルで認められた。このサイトカイン産生は特定の菌種に認められ、侵入した菌数には無関係であった。また菌体表層多糖欠失株を用いることによって、表層多糖が血管内皮細胞への侵入、サイトカイン産生に関与することが認められた。今後、血管内皮細胞の各種炎症マーカーの動態を調べ、口腔レンサ球菌による炎症誘発機序の解明を継続して行う計画である。

本研究で得られた結果は、近年注目されている口腔ケアの意義を裏付ける重要な基礎的知見となり、「口腔衛生の実践は口腔疾患の予防のみならず、全身の健康管理のために重要である」ことの科学的エビデンスとすることができる。また本研究で対象とした疾病のみでなく、口腔バイオフィームによって誘発される様々な全身疾患の新しい予防法の開発に繋げることが可能であり、広く国民の健康に寄与するものと考えられる。

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 13 件)

- (1) Yamaguchi, T., Matsumoto, M., Sugimoto, Y., Soutome, S., and Oho, T.: Gene cloning and characterization of *Streptococcus intermedius* fimbriae involved in saliva-mediated aggregation and adherence. Res. Microbiol., 160: 809-816, 2009. 査読有り.
- (2) Kitada, K., de Toledo, A., and Oho, T.: Increase in detectable opportunistic bacteria in the oral cavity of orthodontic

patients. Int. J. Dent. Hygiene, 7: 121-125, 2009. 査読有り.

(3) 長田恵美, 於保孝彦: 口腔バイオフィルムによる全身疾患の誘発. 日本歯科評論, 795: 157-159, 2009. 査読なし.

(4) Yoshida, Y., Ito, S., Sasaki, T., Kishi, M., Kurota, M., Suwabe, A., Kunimatsu, K., and H. Kato: Molecular and Enzymatic Characterization of β C-S lyase in *Streptococcus constellatus*. Oral Microbiol. Immunol., 23: 245-253, 2008. 査読有り.

(5) Fukushima, R., Nagata, E., Inoue, M., and Oho, T.: Antibacterial activity of sodium fluoride against the *Streptococcus anginosus* group and Abiotrophia and Granulicatella species. Dentistry in Japan, 43: 95-98, 2007. 査読有り.

[学会発表] (計 15 件)

(1) 長田恵美, Toledo Andreia, 於保孝彦: 口腔レンサ球菌のヒト動脈内皮細胞への侵入能力および炎症反応誘導について. 第 58 回日本口腔衛生学会総会, 2009 年 10 月 11 日, 長良川国際会議場 (岐阜).

(2) 山口泰平, 於保孝彦: 口腔レンサ球菌のカルシウム依存性唾液凝集反応の解析. 第 58 回日本口腔衛生学会総会, 2009 年 10 月 11 日, 長良川国際会議場 (岐阜).

(3) Toledo Andreia, 長田恵美, 吉田康夫, 於保孝彦: *Streptococcus oralis* のヒト動脈内皮細胞への侵入および炎症反応誘導における RPS の役割. 第 58 回日本口腔衛生学会総会, 2009 年 10 月 10 日, 長良川国際会議場 (岐阜).

(4) 佐藤節子, 於保孝彦: 唾液 NADH oxidase に関する研究. 第 57 回日本口腔衛生学会総会, 2008 年 10 月 4 日, 大宮ソニックシティ (さいたま).

(5) 於保孝彦: 特別講演 *Streptococcus mutans* と唾液凝集素の反応を阻害するラクトフェリン・ドメイン. 第 1 回 歯周病・ラクトフェリンフォーラム, 2008 年 4 月 27 日, 大宮ソニックシティ (さいたま).

(6) 長田恵美, 於保孝彦: *Streptococcus gordonii* のヒト動脈内皮細胞への侵入能力の検討. 第 56 回日本口腔衛生学会総会, 2007 年 10 月 5 日, 船堀タワー (東京).

(7) 五月女さき子, 山口泰平, 於保孝彦: *Granulicatella adiacens* 表層のフィブロネクチン結合物質の同定、解析. 第 56 回日本口腔衛生学会総会, 2007 年 10 月 5 日, 船堀タワー (東京).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

於保 孝彦 (OHO TAKAHIKO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 50160940

(2) 研究分担者

山口 泰平 (YAMAGUCHI TAIHEI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 80230358

北田 勝浩 (KITADA KATSUHIRO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 90195264

長田 恵美 (NAGATA EMI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 00304816

吉田 康夫 (YOSHIDA YASUO)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 10315096

佐藤 節子 (SATOU SETSUKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 70145514