

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592620

研究課題名（和文） 歯周病原細菌由来 FDF の細胞への影響及び歯周炎病態への関与の解析

研究課題名（英文） Analysis of the influence on the host cells of FDF derived from periodontopathic bacteria and the contribution in the pathogenesis of periodontitis

研究代表者

荒川 真一（ARAKAWA SHINICHI）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：20302888

研究成果の概要（和文）：FDFは細胞内に取り込まれ（侵入し）、ミトコンドリアに到達後酸化膜電位を上昇させ、最終的に IL-8 の産生を亢進することが明らかになった。歯周炎患者・健常者（各 21 名）から歯肉溝滲出液を採取し、抗 FDF 抗体価を検討した。その結果、抗体価は健常者群と比較して歯周炎患者群で有意に高い値を示した。さらに、ポケット深さ・Clinical Attachment Level (CAL)、Bleeding on probing の割合の 3 臨床パラメータと抗 FDF 抗体価とが有意な相関を示し、病態との関連性が認められた。

研究成果の概要（英文）：The FDF was taken in (or invade) a cell and raised oxidation membrane potential after reaching to mitochondria, and it was revealed that the FDF finally aggravated production of IL-8. The gingival crevicular fluid from periodontitis patients and normal subjects (for each 21) was isolated, and measured the anti-FDF antibody titer each. As a result, the antibody titer of periodontitis patients showed significantly higher than that of control group. Furthermore, 3 clinical parameters (Pocket depth, Clinical Attachment Level (CAL) and Bleeding on probing) are correlated with the anti-FDF antibody titer. These results suggest that the titer was associated with the condition of patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700000	210000	910000
2010 年度	1500000	450000	1950000
2011 年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療学

キーワード：歯周免疫機能学・歯周病原細菌

1. 研究開始当初の背景

Tannerella forsythia (*T. forsythia*) は、*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* と並び歯周病原細菌“red complex”のメンバーである。*T. forsythia* の超音波破砕物をへ

パリンカラムにて精製した結果、Flow through 分画と Binding 分画に分離した。前者については細胞死誘導因子 (Cytocidal toxin:CCT) として申請者らは世界で始めて報告し詳細な研究を行ってきた。さらに後者は、接着細胞

を剥離させる作用があり、FDF (Forsythia Detaching Factor) と命名した。後者についての基礎的性質、歯周炎の臨床症状と関連については未解明であった。

2. 研究の目的

歯周病原細菌の1つである *T. forsythia* は、病原因子が明確となっていない。そこで、病原性因子の一つと考えられる当該細菌由来 FDF の宿主細胞への影響の解明及び歯周病態との関連性を解明する。

3. 研究の方法

① 基礎研究

FDF をヒト線維芽細胞 (TIG-3) に作用させた後、細胞質・ミトコンドリア・その他の分画に分けた。さらに各分画に対して抗 FDF ポリクロナール抗体を1次抗体として Western blot 分析を行った。特にミトコンドリア分画に対して、NAD 還元酵素活性を計測した。また、蛍光基質: dihydrotetramethylrosamine を用い、フローサイトメトリーを用いてミトコンドリアの酸化膜電位を検討した。さらに、ELISA 法を用いて培養細胞上清中の IL-8 濃度を計測した。

② 臨床研究

実験に供した患者および健常者と GCF およびプラークサンプル

東京医科歯科大学歯学部附属病院歯周病外来を訪れた37名の歯周炎患者を本研究に供した。歯周炎患者は残存歯20本以上を有し、1/2顎において少なくとも2歯以上に4mm以上の歯周ポケットを有する者とした。30名の健常者を対照群とした。両グループにおいて除外基準を免疫反応に影響を及ぼす可能性のある重度な全身疾患の既往がないこと、過去6カ月に歯周治療歴がない者、過去3か月に抗生物質を服用していない者とした。本研究は本学倫理委員会の承認を得ており、すべての参加者から文書により同意を得た。GCFの採取は歯周炎患者より健常部位 (PPD ≤ 3 mm) と歯周炎部位 (PPD ≥ 4 mm) の2か所から行った。健常者においてはアタッチメントロスが認められず、プロービング時の出血がない部位より GCF を採取した。GCF はペリオペーパーを用いて採取した。GCF 量は Periotron-6000[®] を用いて測定した後、Tween 添加リン酸緩衝生理食塩水を用いてペリオペーパーから GCF を溶出した。

酵素結合免疫吸着法を用いた抗 FDF IgG 抗体の定量

GCF 中の抗 FDF 抗体レベルの測定は ELISA 法を用いて行った。要約すると、アビディン結合 ELISA プレートにビオチン化 FDF でコートし、希釈した GCF サンプルを添加後、1/20,000 に希釈したラビット抗ヒト HRP 結合

IgG 抗体を室温にて1時間振動下でインキュベートを行った。テトラメチルベンジジン基質溶液を加えた後、2 M H₂SO₄ を加え反応を停止した。吸光度を測定し、サンプル中の抗 FDF 抗体量については抗ラビット FDF ポリクロナール抗体から得られた検量線から抗 FDF 抗体濃度を算出した。抗 FDF 抗体濃度 (ng/μl) を以下の式により計算した: 総抗 FDF 抗体量 (ng) / GCF 量 (μl)。本研究においては IgG 濃度を IgG レベルと標記した。

細菌学的検討

歯肉縁下プラークは両グループにおいて GCF を採取した部位と同一部位より滅菌ペーパーポイントを用いて採取した。各サンプルから核酸を抽出後、*T. forsythia* 16SrRNA および *fdi* のプライマーを用いて PCR を行った。

4. 研究成果

① FDF の局在

上述の3分画に対して Western blot 分析を行った結果、FDF はミトコンドリアに ky 九剤していることが明らかになった。

作用機序の解明

FDF は、NAD 還元酵素を抑制し、その結果ミトコンドリア酸化膜電位が上昇することが明らかとなった。さらに、酸化膜電位の上昇によって、炎症性サイトカインである IL-8 の産生が亢進されることが明らかとなった。以上の意結果から、*T. forsythia* 由来 FDF は歯周組織における炎症の発症と進行に深く関連していることが示唆された。

② 歯周炎患者 (歯周炎部位及び健常部位) と健常者における抗 FDF 抗体レベル

37名の歯周炎患者の歯周炎部位 (37 部位) と健常部位 (29 部位)、30名の健常者の健常部位 (30 部位) より GCF を採取した。歯周炎患者における歯周炎部位および健常部位の抗 FDF 抗体レベルの平均値は、両者とも、健常者の健常部位の抗体レベルより有意に高値を示した ($p < 0.05$)。歯周炎患者の歯周炎部位と健常部位の比較では歯周炎部位よりも健常部位において有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

歯周炎患者における GCF 中抗 FDF 抗体レベルと臨床パラメーターの相関関係

抗 FDF 抗体レベルとサンプル採取部位の臨床パラメーターとの相関関係を Pearson's correlation coefficient を用いて分析した。表3に歯周炎患者の歯周炎部位と健常部位の抗 FDF 抗体レベルと PPD, CAL との相関関係を示した。抗 FDF 抗体レベルと採取部位 PPD 及び CAL の相関係数はそれぞれ -0.444 と -0.437 であり、有意な負の相関が認められた ($p < 0.05$)。

ポリメラーゼ連鎖反応による *T. forsythia* 16S rRNA と *fdi* 遺伝子の検出

T. forsythia 16S rRNA と *fdf* 遺伝子は全ての健常者において検出されなかった。一方、歯周炎患者においては *T. forsythia* 16S rRNA は歯周炎部位では 37 部位中 18 部位において、健常部位では 29 部位中 5 部位において検出された。さらに *fdf* 遺伝子については歯周炎部位で 37 部位中 19 部位、健常部位で 29 部位中 7 部位において検出された。次に歯周炎患者における全てのサンプル採取部位を *T. forsythia* 16S rRNA と *fdf* 遺伝子の有無により 2 つのグループに分けたところ、平均 PPD と CAL は *T. forsythia* 16S rRNA と *fdf* 遺伝子の陽性部位において陰性部位よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。 *T. forsythia* 16S rRNA と *fdf* 遺伝子の陽性部位における抗 FDF 抗体レベルは両陰性部位のそれより有意に低い抗体レベルを示した ($p < 0.05$)。

歯周炎患者における抗 FDF 抗体レベルは健常者より有意に高い値を示し、これは過去の報告と一致しているものであった。さらに我々は歯周炎患者における歯周炎部位と健常部位の抗 FDF 抗体レベルの比較を行った。その結果、健常部位においては歯周炎部位におけるそれより有意に抗 FDF 抗体レベルが高いことが明らかとなった ($p < 0.05$)。これらの結果は歯周炎患者と健常者における比較の結果と一見、矛盾していると考えられる。Kinane らにより GCF 中の *P. gingivalis* と *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* に対する特異的 IgG、IgA、IgM 抗体を ELISA にて定量し、歯周ポケットが深い部位ほど又、炎症が強い部位ほど抗体レベルが低くなっていることが報告されている。このメカニズムに関する考察としては、Killian らによって *P. gingivalis* によりヒト IgG と IgA が破壊されることが報告されたが、これは細菌により破壊されたことにより GCF 中の IgG 抗体レベルが低下した可能性を示唆するものである。FDF に対する血清由来及び局所産生 IgG 抗体は歯周炎患者の歯周炎部位においてプロテアーゼなどにより破壊されているが、健常部位では破壊されていない可能性が示唆される。歯周炎部位の IgG レベルは健常部位より有意に低かった。さらに *fdf* 遺伝子が検出されなかった健常者より歯周炎患者の歯周炎部位、健常部位の両方において抗体レベルが高い値を示した。また抗 FDF 抗体レベルと PPD、CAL は負の相関関係を示した。これらの事実から、FDF により中和抗体の産生が誘導されている可能性が示唆される。しかし、抗 FDF 抗体の中和活性については現在 GCF サンプルとリコンビナント FDF タンパクを用いて検討中である。歯周ポケット内の *fdf* 遺伝子の検出を試みた結果、*fdf* 遺伝子は歯周炎に関連していることが示唆され、この結果は以

前の報告と一致するものであった。次に我々は歯周炎患者群における *T. forsythia* 16S rRNA と *fdf* 遺伝子の有無による歯周組織および抗 FDF 抗体レベルの違いを検討した。その結果、平均 PPD と CAL は *T. forsythia* 16S rRNA と *fdf* 遺伝子の陽性部位において陰性部位よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$) が *T. forsythia* 16S rRNA と *fdf* 遺伝子の陽性部位の抗 FDF 抗体レベルは両陰性部位より有意に低い抗体レベルを示した ($p < 0.05$)。これらの結果により IgG 抗体が細菌由来因子により何らかの方法で破壊されていること、あるいは IgG 産生が減少していることが示唆される。

本研究により GCF 中の抗 FDF 抗体レベルと歯周炎患者および健常者の歯周組織の状態の関連が示され、FDF が歯周炎に関係する主要な抗原であることが示唆された。しかし抗 FDF 抗体レベルが歯周炎の診断及び予後の推定のマーカーとして有効であるか否かを証明するにはさらなる大規模な患者数による調査が必要である。

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 荒川真一、早雲彩絵、眞野喜洋、和泉雄一、オゾンナノバブル水 (NBW3) の殺菌効果と安全性について.、日本口腔機能水学会誌, 12, 42-43, 2011.

② 早雲彩絵、荒川真一、眞野喜洋、和泉雄一、オゾンナノバブル水の歯周治療への応用.、日本口腔機能水学会誌, 12, 44-45, 2011.

③ Hidetomo Onishi, Shinichi Arakawa, Takumi Nakajima, Yuichi Izumi. Levels of specific immunoglobulin G to the forsythia detaching factor of *Tannerella forsythia* in gingival crevicular fluid are related to the periodontal status. J Periodontal Res. 45: 672-680, 2010. IF: 2.128.

④ 荒川真一、オゾンナノバブル水・酸素ナノバブル水 —基礎的特質と臨床応用—.、東京医科歯科大学東京歯科同窓会 東京歯科同窓会雑誌 172, 28-36, 2011.

⑤ 和泉雄一、荒川真一、ナノバブル水の歯周治療への応用.、日本歯科医師会雑誌, 国際歯科ニュース, 64 (4), 94-96, 2011.

⑦ 和泉雄一、荒川真一、ストレスと歯周炎.、日本歯科医師会雑誌, 国際歯科ニュース, 64

(8) , 65-67, 2011.

⑧ 和泉雄一, 荒川真一, 南原弘美, 歯周炎と早産・低体重児出産との関わりに関する最近の話題., 日本歯科医師会雑誌, 国際歯科ニュース, 63 (12) , 72-74, 2011.

⑨ 荒川真一, 歯科医科連携が重要な疾患: 金属・レジナルアレルギー, 掌蹠膿疱症, 関節リウマチ. 歯科と医科のクロストーク, Progress in Medicine, 30, 2819-2823, 2010.

⑩ 荒川真一, 和泉雄一, くすりの使い方 2011-2014., デンタルダイヤモンド社, 2010.

⑪ 和泉雄一, 荒川真一, 医学最新情報 歯周炎による関節リウマチ (RA) 発症リスクの増加., デンタルダイヤモンド, 35 (15) , 62-65. 2010.

⑫ 荒川真一, 和泉雄一, 眞野喜洋. オゾン, 酸素ナノバブル水の臨床応用に向けて., 東京都病院薬剤師会雑誌, 58, 253-259, 2009.

⑬ 荒川真一, 和泉雄一, 眞野喜洋, 特集 マイクロ・ナノバブル (1) いろいろつかえる マイクロ・ナノバブル: ナノバブル水の歯周治療への応用, 月刊 Materials Integration, 22, 36-43, 2009.

[学会発表] (計 11 件)

① 杉澤 満, 荒川真一, インプラント周囲炎における PCR 法を用いた症例の検討, 第 14 回 先進インプラント医療学総会・学術大会 (東京), 2011 年 9 月 11 日.

② 荒川真一, 早雲彩絵, 眞野喜洋, 和泉雄一, オゾンナノバブル水 (NBW3) の殺菌効果と安全性について, 第 12 回 日本口腔機能水学会学術大会 (東京), 2011 年 7 月 30-31 日.

③ 早雲彩絵, 荒川真一, 眞野喜洋, 和泉雄一, オゾンナノバブル水の歯周治療への応用, 第 12 回 日本口腔機能水学会学術大会 (東京), 2011 年 7 月 30-31 日.

④ 大西英知, 荒川真一, 中島琢磨, 和泉雄一, 歯周炎患者由来歯肉溝滲出液が *Tannerella forsythia* FDF に与える影響, 第 54 回 春季日本歯周病学会 (福岡), 2011 年 5 月 19 日.

⑤ S. Hayakumo, S. Arakawa, H. Onishi, M. Komaki, I. Nakagawa, Y. Izumi, Effectiveness of ozone nano bubble water for periodontal therapy. Korean Association of Periodontology at Seoul, 50th anniversary meeting (Korea), November

26-28, 2010.

⑥ 早雲彩絵, 荒川真一, 中川一路, 和泉雄一, オゾンナノバブル水の歯周炎に対する効果の検討, 第 75 回 口腔病学会学術大会 (東京), 2010 年 12 月 4 日.

⑦ 礪波健一, 俣木志朗, 大林尚人, 橋本吉明, 荒川真一, 鶴澤成一, 釦持 郁, 比嘉りつ子, 森蘭立男, 桜井純蘭, 足達淑子, 森山啓司, 嶋田昌彦, 東京医科歯科大学歯学部附属病院 平成 21 年度患者満足度アンケート調査の分析結果, 第 75 回 口腔病学会学術大会 (東京), 2010 年 12 月 4 日.

⑧ 早雲彩江, 荒川真一, 大西英知, 和泉雄一. オゾンナノバブル水の歯周治療に対する効果の検討, 第 53 回 春季日本歯周病学会 (盛岡), 2010 年 5 月 14-15 日.

⑨ Hidetomo Onishi, Shinichi Arakawa, Takuma Nakajima, Yuichi Izumi., Protective role of anti-FDF antibody in gingival crevicular fluid of periodontal patients. EuroPerio (Stockholm, Sweden), June 4-6, 2009.

⑩ 早雲彩江, 荒川真一, 大西英知, 和泉雄一, 歯周炎患者と健常者における歯肉溝滲出液中の抗 FDF 抗体価の比較, 第 51 回 秋季日本歯周病学会 (四日市). 2008 年 11 月 19 日.

⑪ 大西英知, 荒川真一, 中島琢磨, 和泉雄一. *Tannerella forsythia* 由来 Forsythia Detaching Factor: FDF の分離及び歯肉溝滲出液中に存在する抗 FDF 抗体価と歯周炎の病態との関連性の解析, 第 50 回 歯科基礎医学会学術大会: サテライトシンポジウム (東京). 2008 年 9 月 23-25 日.

[図書] (計 10 件)

① 和泉雄一, 荒川真一: 補綴臨床 別冊 長期経過症例から学ぶ 成功するインプラント治療戦略, 伊藤隆利/編集代表 九州インプラント研究会 (KIRG), 第 3 章 天然歯との共存, 128-131, 2011.

② 和泉雄一, 春日井昇平, 荒川真一, インプラント周囲炎を治療する: エビデンスに基づく診断・治療とリスクコントロール, インプラント周囲炎とは., 編著 和泉雄一, 吉野敏明, 医学情報社. 6-11, 2010.

③ 荒川真一, 和泉雄一, 眞野喜洋, 新材料・新素材シリーズ マイクロバブル・ナノバブルの最新技術 II, . 監修: 拓殖秀樹 株式会社 シーエムシー出版 3 オゾンナノバブ

ル水の歯周治療への応用, 252-257. 2010.

④ 和泉雄一, 荒川真一, 患者まで届いている再生誘導治療 第2章 生体シグナル因子の利用 1. 細胞増殖因子 9) 歯周組織: 歯周組織再生療法への応用, 遺伝子医学 MOOK 13, 第一版 田端康彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 126-130, 2009.

⑤ 荒川真一, 和泉雄一, 第4章 歯肉炎および慢性歯周炎における治療法 II. 4. 再生治療 エナメルマトリックスタンパク質, 第1版 第1刷 編著 和泉雄一. ザ・ペリオドントロジー, 永末書店, 177-179, 2009.

⑥ 荒川真一, 和泉雄一, 第4章 歯肉炎および慢性歯周炎における治療法 VI. 1. 高齢者の歯周治療, 第1版 第1刷 編著 和泉雄一, ザ・ペリオドントロジー, 永末書店, 221-225, 2009.

⑦ 荒川真一, 和泉雄一, 第6章 特殊な歯周疾患 6. Down 症候群と歯周炎, 第1版 第1刷 編著 和泉雄一, ザ・ペリオドントロジー, 永末書店, 244-246, 2009.

⑧ 荒川真一, 和泉雄一, 第7章 ペリオドンタルメディシン VI. 1. 歯周病のリスクファクター, 第1版 第1刷 編著 和泉雄一, ザ・ペリオドントロジー, 永末書店, 256-260, 2009.

⑨ 和泉雄一, 荒川真一, 進歩する歯周組織再生治療の分類と臨床: 1. 歯周組織再生治療の分類と基礎と臨床 3) 根面処理 化学的根面処理 (クエン酸等), 生物学的根面処理 (エムドゲイン処理), 季刊・歯科医療, 第一歯科出版株式会社, 19-23, 2009.

⑩ 和泉雄一, 荒川真一, 歯周治療と全治療分野編, モチベーションとプラークコントロールの実際, クインテッセンス イヤーブック 2009 現代の治療指針, クインテッセンス出版株式会社 190-191, 2009.

[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

荒川 真一 (ARAKAWA SHINICHI)

研究者番号: 20302888

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: