

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 05 月 30 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592660

研究課題名（和文） 歯科バイオマテリアルへの歯周病原細菌の付着機構と特異的抗体による阻害に関する研究

研究課題名（英文） A study for the adherence of pathogens for the periodontal disease to the dental materials and for the inhibition effect of specific antibodies to the bacteria.

研究代表者

安井 利一（YASUI TOSHIKAZU）

研究者番号：20146252

研究成果の概要（和文）：

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) の線毛を General Electric 社の GE ATKA prime plus を使用し、線毛の精製を行っているが、精製が過程で線毛のロスが著しく、現在も、精製法の確立を目指して、実験を継続している。また、その精製線毛の生物活性を検討した結果、細胞付着能、サイトカイン誘導能などを有することを確認し、また、新たな生物活性として単球の細胞死抑制作用を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We have been purified the fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) by using GE ATKA plus purchased from General Electric Company. However, we can not obtain the significant amount of the fimbriae for research, and then, we continue to establish methods of purification of the fimbriae; because it is clearly essential to establish the procedure of the purified fimbriae in the study of pathogenic mechanisms of the bacteria. It was demonstrated that the purified fimbriae bind to the cell and induced the inflammation cytokine, on the other hand, we found the new biological activity of the fimbriae that inhibit the apoptosis of the monocyte like cells, in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2010 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 200,000 | 900,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 107,000 | 4,670,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学 予防歯科学

キーワード：予防歯科学・病原細菌・線毛・歯周疾患

1. 研究開始当初の背景

歯周炎に罹患している患者の口腔内には、既に金属を中心としたバイオマテリアルが装着されているケースが多いが、その金属と歯周炎との関連性に注目した研究は少ないので、その点について検討することは意義あ

ることと考えた。また、歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は、線毛を有し、また、線毛強発現株は、病原性が非常に高いことが報告されている。そこで、本菌が、歯科の金属材料に付着するか否か検討し、その付着に、本菌線毛を介するか否かにつ

いて検討を加えることは意義あることと考え、実験を行った。

2. 研究の目的

わが国では、歯周炎患者が増加している。歯周炎に罹患している患者の口腔内には、既に金属を中心としたバイオマテリアルが装着されているケースが多いが、その金属と歯周炎との関連性に注目した研究は少ない。そこで、本研究では、歯科用バイオマテリアルが歯周炎の発症と進行に、密接に関係するリスクファクターになる可能性について研究を行う。さらに、そのリスクを軽減する方策についても検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

P. gingivalis は、ATCC33277 株を使用した。

(2) *P. gingivalis* 線毛の抽出と精製法の確立

P. gingivalis ATCC33277 株を培養後、遠心にて回収し、物理的に線毛を菌体から剥離させる。線毛を含む上清画分に40%飽和硫酸アンモニウムを加え、タンパク質を塩析させた後、透析したものを、タンパク質画分として、DEAE Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare) に吸着させ、0 から 1 M の NaCl 直線濃度勾配溶出法で精製線毛を分画し、得られた線毛を、SDS-PAGE の気泳動で、単一バンドであることを確認した。GE 社の GE ATKA prime plus を使用し、線毛の精製を行っているが、精製が過程で線毛のロスが著しく、現在も、精製法の確立を継続している。

(2) 精製した *P. gingivalis* 線毛の生物活性の検討

精製した *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 線毛は、強いサイトカイン誘導作用を有している。そこで、精製した線毛が、その活性を有していることを確認する目的で、マクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞のサイトカイン誘導能について確認した。

また、単球様細胞として M1 細胞を用いて、*P. gingivalis* 線毛の細胞死に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) *Porphyromonas gingivalis* (*P.*

gingivalis) 線毛の抽出と精製法の確立

培養した *P. gingivalis* から DEAE Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare) を使用し、得た精製線毛を分画し、得られた線毛を、SDS-PAGE の気泳動で、単一バンドであることを確認した。

しかしながら、精製が過程で線毛のロスが著しく、現在も、精製法の確立を継続している。

しかしながら、精製過程で線毛のロスが著しく、採取できた本菌線毛量もわずかであった。本菌線毛の精製を確認するために、IODON-BEADS iodination reagent で標識した本菌線毛のオートラジオグラフィによって確認を行った (図 1)。現在も、精製法の確立を継続している。

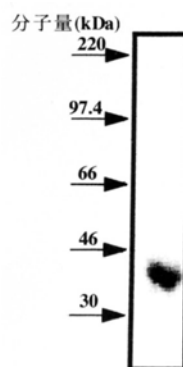
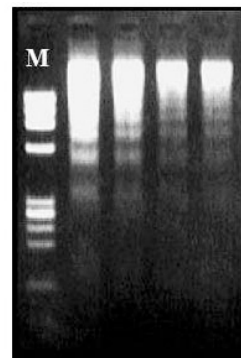


図 1 *P. gingivalis* 線毛

(1) *P. gingivalis* 線毛の生物活性の検討

P. gingivalis 線毛は、強いサイトカイン誘導作用を有していることが示されている。そこで、精製した線毛が、その活性を有していることを確認する目的で、マクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞のサイトカイン誘導能について確認した。



— 1 5 10
P.gingivalis fimbriae (µg/ml)

図 2 *P. gingivalis* 線毛の細胞死抑制作用

また、単球様細胞への分化能を有する M1 細胞を用いて、本菌線毛の生物活性につい

て検討を行った際に、その線毛の細胞死抑制作用を見出した。この作用は、本菌線毛の新たな生物活性であることから、この点も検討を加え、本細胞のアポトーシスの阻害であることを示した（図2）。

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10件）

- ① Murayama R, Kobayashi M, Takeshita A, Yasui T, and Yamamoto M; MAPKs, activator protein-1 and nuclear factor- κ B mediate production of interleukin-1 β -stimulated cytokines, prostaglandin E₂ and MMP-1 in human periodontal ligament cell; J Periodontal Res, 査読有, 46(5), 2011, 568-75 (DOI; 10. 1111/j. 1600-0765. 2011. 01374. x)
- ② 杉 陽子、清水良昭、深井智子、竹下 玲、高橋明子、松本 勝、柴田えり子、宮澤 慶、末續真弓、永井明子、半澤明子、流石知佳、上田智恵、兼定幸代、仲筋宣子、安井利一；中学生・高校生を対象として試作した「あごの健康診断チャート」の学校歯科保健活動における有用性、査読有、明海歯科医学 41(1)、2011年、20-33
- ③ 末續真弓、松本 勝、竹下 玲、深井智子、杉 陽子、流石知佳、田口耕平、宮寄至洋、鈴木普久、安井利一；3歳児う蝕有病状況からみた2歳児歯科健康診査の必要性、査読有、口腔衛生学会誌 61(5)、2011年、589-593
- ④ 深井智子、野村圭介、松本 勝、流石知佳、高橋明子、福浦えり子、安井利一；女子高生へ提案する生活習慣改善プログラムの基礎資料、査読有、明海歯科医学 39(1)、24-33、2010
- ⑤ 竹下 玲、江端 淳、末續真弓、流石知佳、中川和弘、小山主之、田中園治、遠藤浩正、田中 入、柏崎秀一、熊倉 学、元治茂樹、大高義文、杉山卓司、佐藤 豊、河野 哲、川俣富貴子、佐藤淑郎、中林靖雄、中筋宣子、杉山義祥、深井智子、安井利一；*Porphyromonas gingivalis*線毛はマウス単球性骨髄性白血病細胞株 M1細胞のアポトーシスを抑制する、査読有、明海歯科医学 40(1)、67-83、2011
- ⑥ 高野安紀子、竹下 玲、末續真弓、篠田寛幸、松本 健、永井明子、岡安麻里、大井迪、長谷川紘也、土居孝資、桃井知子、高橋明子、安井利一、鐘ヶ江晴秀；マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7細胞における一酸化窒素誘導性細胞死に対する酪酸の抗アポトーシス作用、明海歯科医学 38

(1)、151-165、2009

- ⑦ 末續真弓、竹下 玲、松本 健、高橋明子、流石知佳、安井利一；マクロファージ様細胞株 RAW264.7細胞における transforming growth factor- α による一酸化窒素誘導性アポトーシスの増強効果、査読有、明海歯科医学 38(1)、166-181、2009

〔学会発表〕（計23件）

- ① 竹下 玲、末續真弓、広瀬公治、高野安紀子、岡本和彦、福浦えり子、上田知恵、下島孝裕、藤沢政紀、荒木久生、安井利一；単球前駆細胞様 M1細胞のアポトーシスに関する *Porphyromonas gingivalis*線毛の阻害作用における beta2-integrin・CD11/CD18の重要性の解析、第60回日本口腔衛生学会・総会、新潟、2011年10月
- ② 竹下 玲、末續真弓、廣瀬公治、高野安紀子、福浦えり子、高橋明子、流石知佳、上田知恵、松本 勝、清水良昭、下島孝裕、荒木久生、安井利一；単球様細胞への分化能を有する M1細胞のアポトーシスに関する *Porphyromonas gingivalis*線毛の阻害機構の解析、第59回日本口腔衛生学会・総会、新潟、2010年10月
- ③ 市村 葉、片山伊九右衛門、竹下 玲、岡田嘉代、安井利一、片山 直；ツボ刺激を応用した口腔乾燥症へのアプローチ、日本歯科東洋医学第28回学術大会、郡山市、2010年11月
- ④ 高橋明子、清水良昭、安井利一；頸部輪郭抽出法における喉頭運動の検出、第7回日本口腔ケア学会総会・学術大会、大阪市、2010年11月
- ⑤ 竹下 玲、末續真弓、廣瀬公治、高野安紀子、高橋明子、流石知佳、福浦えり子、宮澤 慶、永井明子、松本勝、清水良昭、鐘ヶ江晴秀、安井利一；単球様細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞 M1細胞の細胞死を *Porphyromonas gingivalis*線毛は阻害する、第58回日本口腔衛生学会・総会、岐阜市、2009年10月
- ⑥ 深井智子、福浦えり子、竹下 玲、安井利一；学校安全教育学習素材としての「歯と口腔の外傷予防」の有用性を検討する縦断的疫学研究、第8回明海歯科医学会、坂戸市、2009年6月
- ⑦ 末續真弓、竹下 玲、深井智子、杉 陽子、田口耕平、宮寄至洋、新保秀樹、鈴木普久、安井利一；3歳児のう蝕有病状態に関する2歳児歯科健康診査の有効性の評価、平成22年口腔衛生関東地方研究会総会・学術大会、千代田区、2010年3月

〔図書〕（計4件）

- ① 安井利一；学校保健；スタンダード衛生・公衆衛生、末高武彦、米満正美、神原

正樹、安井利一、荒川浩久 編集、株式会社学建書院、2011、171-188

② 竹下 玲、松本 勝：2章 食生活と栄養；生活健康 -測定と評価法-、荒川浩久、広瀬公治、安井利一 編集、第4版、株式会社学建書院、2011、67-80

③ 竹下 玲、真野 博、和田政裕、安井利一：第3節口腔環境解析バイオチップ；第3章ヘルスケア分野への応用；バイオチップ実用化ハンドブック：金子周一、堀池靖浩 監修、株式会社エヌ・ティイー・エス、2010、287-297

[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

安井 利一 (YASUI TOSHIKAZU)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号：21592660

(2) 研究分担者

竹下 玲 (TAKESHITA AKIRA)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：70236454

日比野 靖 (HIBINO YASUSI)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：20238322

村上幸生 (MURAKAMI YUKIO)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：00286014

松本 勝 (MATSUMOTO MASARU)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：90206219

清水良昭 (SIMIZU YOSIAKI)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：00209652

(3) 連携研究者

浜田信城 (HAMADA NOBUSHIRO)
神奈川歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20247315

