

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21792153

研究課題名(和文)

フゾバクテリウムの揮発性硫化物産生における共凝集による影響

研究課題名(英文)

The influence of coaggregation for a volatile sulfide production of Fusobacterium

研究代表者 福井 誠 (FUKUI MAKOTO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50325289

研究成果の概要(和文)：

歯周病原細菌の一つであるFusobacterium nucleatumと他菌体との共凝集によるF. nucleatumの揮発性硫黄化合物(VSC)産生への影響を明らかにすることを目的とした研究を行った。F. nucleatumは歯周病原細菌であるP. gingivalisと共凝集し、また、共培養した場合にはVSC産生がF. nucleatum単独で培養した場合より増強することが示された。P. gingivalisの培養上清、死菌体あるいは生菌体をそれぞれF. nucleatumに添加し、培養を行ったところ、P. gingivalisの生菌体と共培養した場合にF. nucleatumの硫化水素産生に関する酵素の遺伝子発現が増強する傾向にあることが示された。

研究成果の概要(英文)：

The aim of this study was to clarify the influence of coaggregation between Fusobacterium nucleatum, a periodont pathogenic bacteria, and other microorganisms for production of volatile sulfur compound (VSC) by F. nucleatum. The coaggregation reaction was observed between F. nucleatum and Porphyromonas gingivalis, and shown that the production of VSC was significantly enhanced by incubation with live P. gingivalis compared to incubation F. nucleatum solely. It was also observed that the gene expression of F. nucleatum enzyme related with VSC production was tended to be enhanced by incubation with live P. gingivalis together whereas no effect was shown when incubated with heat-killed microorganism or supernatant of medium of P. gingivalis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：口臭, Fusobacterium nucleatum, 歯周病原細菌, 揮発性硫黄化合物

1. 研究開始当初の背景

近年、衛生意識の向上により、人々の口臭への関心が高まっている。口臭の原因物質として最も重要なものは、硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルサルファイドなどの揮発性硫黄化合物(VSC)であり、これらの物質は主として口腔内において嫌気性細菌がシステインやメチオニンを代謝する時に産生することが知られている。嫌気性細菌は病的歯周ポケットにおいて増加し、歯周病原性に深く関与しているが、舌苔にも多数存在することが最近の研究で明らかにされつつある。

舌苔の形成過程は、プラークと同様に、Streptococcus属を中心とした通性嫌気性菌が早期に定着し、その後、舌苔が成熟するに従い後期定着細菌として偏性嫌気性菌であるFusobacterium属、Porphyromonas属、Prevotella属などが構成細菌に加わる。この偏性嫌気性菌が口臭原因物質の産生の主因となる。歯周病原性細菌の一つであるFusobacterium nucleatum (F. nucleatum)は、VSCなどの口臭原因物質を産生する一方で、早期定着細菌および後期定着細菌の両方に対する菌体表層レセプターを持ち、菌体間凝集の中心となる細菌であり、舌苔の成熟過程においての中心的な役割を演じている存在と考えられている。

F. nucleatumはL-methionine- γ -deamino- γ -mercaptomethan-lyase (METase) あるいはL-cysteine desulphydraseによりVSCを産生することが知られており、F. nucleatumやその他の歯周病原細菌の各々単独によるVSC産生に関する研究は行われてきているものの、バイオフィルムにより近い形態である共凝集状態によるVSC産生機序に関する研究は行われておらず、F. nucleatumの他の菌との共凝集状態がVSC産生に影響するのかどうかは不明である。

2. 研究の目的

F. nucleatum と他細菌との共凝集状態でのF. nucleatumのMETaseおよびL-cysteine desulphydraseの発現およびVSCの測定、共凝集F. nucleatumおよび単独培養F. nucleatumのMETaseおよびL-cysteine desulphydraseの発現、VSC産生の測定、比較を行い、F. nucleatumにおける、共凝集によるVSC産生へどのような影響をおよぼす可能性があるのかを検討した。

3. 研究の方法

(1) F. nucleatum と他細菌との共凝集率の測定

共凝集に用いる他菌種として、

Streptococcus intermedius (S. intermedius) およびPorphyromonas gingivalis (P. gingivalis)を用いた。

F. nucleatum、S. intermedius および P. gingivalis はBHI broth (supplemented with 0.5% yeast extract, 0.001% vitamin K1, and 0.0005% hemin) 10 ml に各保存菌体を懸濁、37°C、36時間嫌気培養後、3,500 rpm で遠心を行い、上清を捨てた後、リン酸緩衝液 (PBS) 10 ml で2回洗浄を行い、Coaggregation bufer (CB, 1 mM Tris containing 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 0.15 M NaCl, pH 8.0) 5 ml に懸濁し、OD_{600nm}=1.0 に調整後、各調整菌液を1.0ml ずつ混和し、0. D. 600 nm 値を測定し、室温にて60分放置後再度0. D. 600 nm 値を測定し共凝集率を算定した。共凝集率は次の式により算定した。

$$\text{Coaggregation \%} = \left[\frac{\text{time-zero value} - \text{sample value}}{\text{time-zero value}} \right] \times 100$$

(2) F. nucleatum、P. gingivalis、S. intermediusの単独培養とF. nucleatumと各菌体との共培養によるVSC産生への影響

PBSにて各菌を0. D. 600 nm=1.0に調整後、各菌液あるいはBlankとしてPBSを添加したBHI brothをガスクロバイアルに培養液 (BHI broth 4.5 ml, 菌液0.5 ml, 合計5.0 ml) を37°C、24時間嫌気培養を行い、ガスクロマトグラフィでガスクロバイアルのヘッドスペース中の空気1 mlを採取後、1/1,000に希釈した空気1 ml中のVSC濃度を測定した。

(3) 培養菌液中の菌数の測定

単独培養、あるいは共培養液中の菌体数をF. nucleatum菌数測定にはF. nucleatum 16S rRNA遺伝子に対するプライマーを、P. gingivalis菌数測定にはP. gingivalis 16S rRNA遺伝子に対するプライマーを、S. intermedius菌数測定にはS. intermedius ily geneに対するプライマーを使用し、各菌に特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCR法により測定した。

(4) F. nucleatumのMETaseあるいはL-cysteine desulphydrase遺伝子の発現に対する共培養の影響

F. nucleatum、P. gingivalis菌体を回収後、PBSにて各菌を0. D. 600 nm=1.0に調整後、各菌液あるいはP. gingivalis菌液を80°C、10分間熱処理したもの(死菌体)あるいはP. gingivalis培養上清を0.22 μ mフィルターによる濾過滅菌を行ったもの(培養上清)あるいはBlankとしてPBSを添加した培養液 (BHI

broth 4.5 ml , 菌液0.5 ml, 合計5.0 ml) を 37°C、24時間嫌気培養を行った。ガスクロマトグラフィでガスクロバイヤルのヘッドスペース中の空気1 mlを採取後、1/1,000に希釈した空気1 ml中のVSC濃度を測定した。菌液から RNeasy Mini kit (QIAGEN社)のプロトコールに従い、totalRNAを回収後、iScript cDNA Synthesis kit (BIO-RAD社)による逆転写酵素反応を行い、cDNAを得た。これに対してF. nucleatumのMETaseおよびL-cysteine desulphydrase遺伝子あるいはF. nucleatumの16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCRを行い、F. nucleatumのMETaseおよびL-cysteine desulphydrase遺伝子の発現に関する解析を行った。各条件毎の遺伝子転写量はF. nucleatumの16S rRNA遺伝子を内在性コントロールとした相対発現量を算出し比較した。

4. 研究成果

(1) F. nucleatum と他細菌との共凝集率

F. nucleatumは約50%程の自己凝集能を有し、P. gingivalisおよびS. intermediusとそれぞれ約20%ほどの共凝集能を有することが示された。(図1、図2)

(2) F. nucleatum、P. gingivalis、S. intermediusの単独培養とF. nucleatumと各菌体との共培養によるVSC産生への影響

P. gingivalisとF. nucleatumの共培養を行ったところ、F. nucleatum単独培養に比較して、約3倍のVSC産生が見られた。

P. gingivalisとF. nucleatumの共培養の結果、P. gingivalisとF. nucleatumの菌数はそれぞれの単独培養時よりもやや増殖していたが、菌数の増殖による単純なVSC産生以上にこの組合せによりVSC産生の増強が見られた。S. intermediusとF. nucleatumの共培養を行ったところ、VSC産生はほとんど見られなかった。ただし、S. intermediusとF. nucleatumの共培養時にはF. nucleatumの増殖が抑制されている様子が見られていた。(図3、図4)

以上の結果より、F. nucleatumとP. gingivalisには凝集が見られ、共培養した場合には単独培養のF. nucleatumあるいはP. gingivalisにおけるVSC産生よりも増強する傾向にあることが示された。

(3) F. nucleatumのVSC産生におけるP. gingivalisの影響

P. gingivalisの培養上清、あるいは熱処理により死菌体としたもの、そしてP. gingivalisの生菌体をそれぞれF. nucleatumに添加し、培養を行い、F. nucleatumの産生するVSCを測定し、F. nucleatum単独培養のもの

との比較を行ったところ、P. gingivalisの生菌体を添加して培養した場合、特に硫化水素の産生量が増加していたが、培養上清あるいは菌体を添加したものはF. nucleatum単独培養と比較してVSC産生量には差はみられなかった。(図5)

また、各条件でのF. nucleatumのMETaseおよびL-cysteine desulphydraseの遺伝子発現をRT-リアルタイムPCRで確認したところ、P. gingivalisの生菌体を添加して培養した場合、L-cysteine desulphydraseの遺伝子発現が有意ではなかったが増強している傾向にあることが示された。(図6)

以上の結果より、F. nucleatumとP. gingivalisを共培養した場合、それぞれ単独培養したものに比べてVSCの、特に硫化水素の産生量が増加することが示され、F. nucleatumのVSC産生に関する遺伝子の発現については硫化水素産生に関わるL-cysteine desulphydraseの発現は有意ではないが増強していることが示された。そのため、VSC産生の増強はF. nucleatumのみに起因するものではなく、P. gingivalisのVSC産生機構の影響も考えられる。本研究ではF. nucleatumのVSC産生関連遺伝子のみを対象としたが、P. gingivalisの同様の遺伝子もまた分析対象とする必要があると思われる。

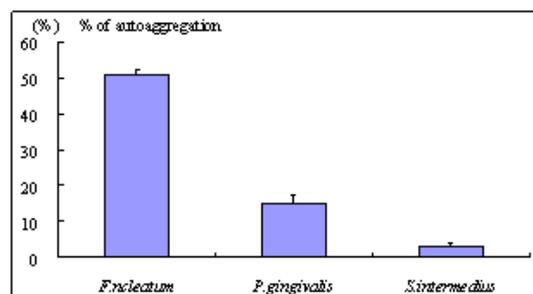


図1. F. nucleatum, P. gingivalis および S. intermedius の自己凝集率

F. nucleatumは約50%程の自己凝集能を有し、P. gingivalis およびS. intermediusはそれぞれ15%、3%の自己凝集率を示した。

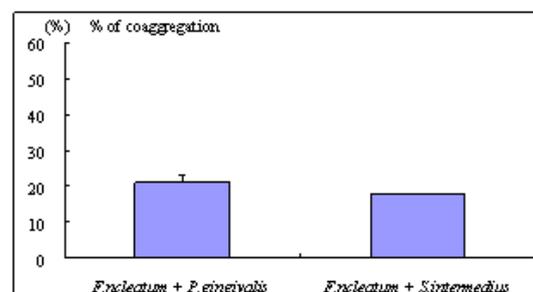


図2. F. nucleatumとP. gingivalisおよびS. intermediusとの共凝集率

F. nucleatumはP. gingivalisおよびS. intermediusとそれぞれ約20%ほどの共凝集率を示した。

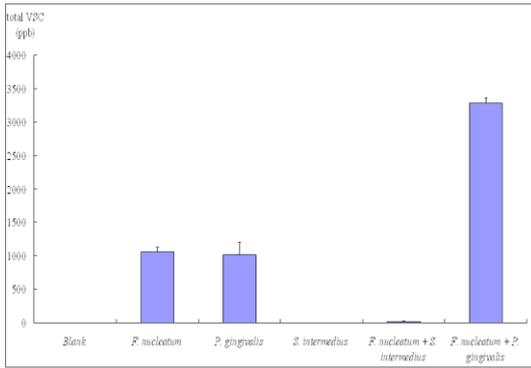


図 3. *F. nucleatum*、*P. gingivalis*、*S. intermedius* の単独培養と *F. nucleatum* と各菌体との共培養による VSC 産生量

P. gingivalis と *F. nucleatum* の共培養を行ったところ、*F. nucleatum* 単独培養と比較して、約 3 倍の VSC 産生が見られた。

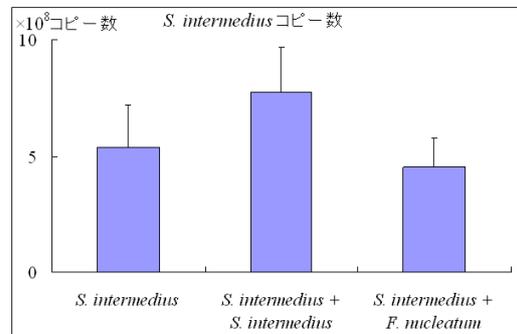
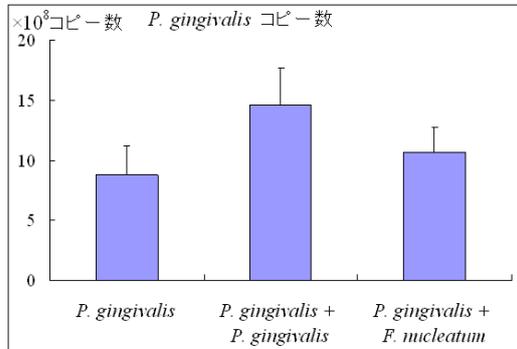
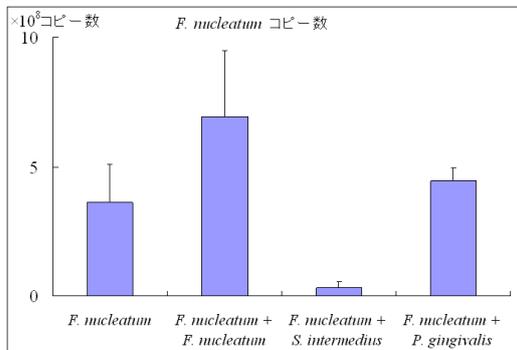


図 4. 単独培養、あるいは共培養液中の *F. nucleatum*、*P. gingivalis* あるいは *S. intermedius* の菌数

F. nucleatum 単独培養時に比べて *P. gingivalis* との共培養時には菌の増殖が増加する傾向にあったが、*S. intermedius* との共培養時には *F. nucleatum* の増殖が抑制されている様子が見られていた。

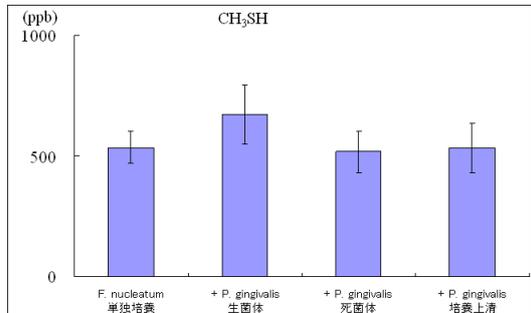
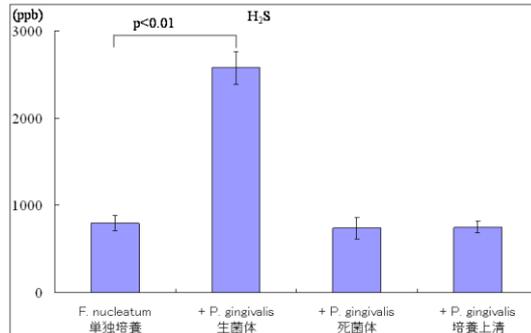
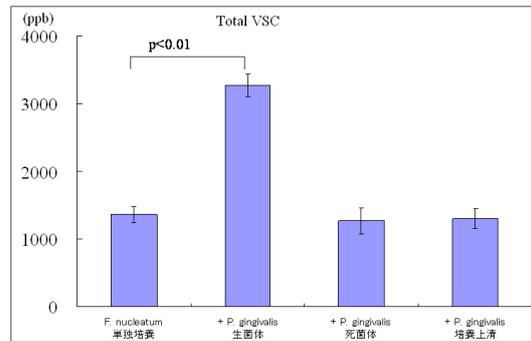


図 5. 各条件による *P. gingivalis* との共培養による *F. nucleatum* の VSC 産生量

F. nucleatum 単独培養のものとの比較を行ったところ、*P. gingivalis* の生菌体を添加して培養した場合、特に硫化水素の産生量が増加していたが、培養上清あるいは菌体を添加したものでは *F. nucleatum* 単独培養と比較して VSC 産生量には差はみられなかった。

(有意差は Bonferroni の多重比較検定による)

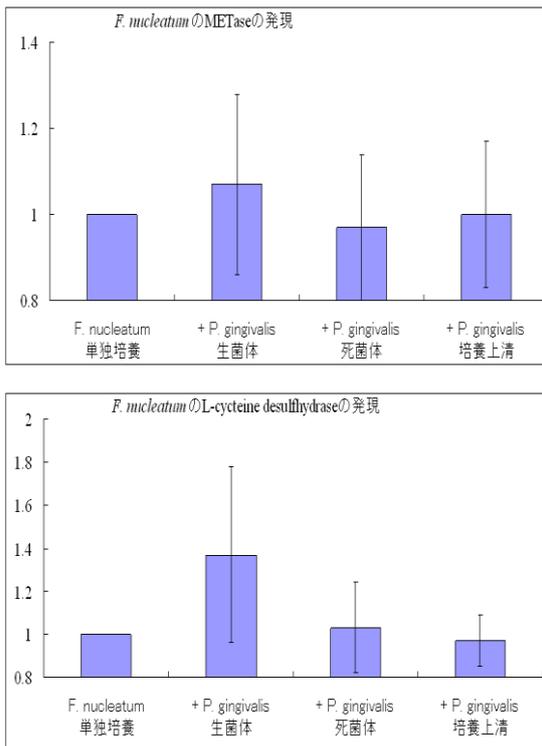


図6. 各条件による *P. gingivalis* との共培養による *F. nucleatum* の METase および L-cysteine desulphydrase の遺伝子発現

F. nucleatum 単独培養のものを 1 とし、*P. gingivalis* の生菌体を添加して培養した場合、L-cysteine desulphydrase の遺伝子発現が有意ではなかったが増強している傾向にあることが示された。

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 3 件)

(1) 福井 誠 : 特定波長光の照射による *Porphyromonas gingivalis* の増殖抑制効果. 四国歯学会雑誌, 23(2): 91-96, 2011. 査読無し

(2) Takahashi E., Kataoka K., Fujii K., Chida J., Mizuno D., Fukui M., Ito H-O., Fujihashi K., Kido H. : Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus. *Microbes Infect* 12(10):778-783, 2010. 査読有り

(3) Fukui M., Hinode D., Yokoyama M., Yoshioka M., Kataoka K., Ito, H-O. : Levels

of salivary stress markers in patients with anxiety about halitosis. *Arch Oral Biol.* 55 (11): 842-847, 2010. 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

(1) Makoto Fukui, Masaaki Mani, Kazuko Uno, Kosuke Kataoka, and Hiro-O Ito.

Cytokine profiles in human saliva and its relationship with that in blood.

9th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry 2010 (Kuala Lumpur, Malaysia) November 9-11, 2010.

(2) 福井 誠, サプタ・ムルヤトノ, バータルジャフ・ツェルメグ, 片岡 宏介, 林田 秀明, 川崎 浩二, 齋藤 俊行, 伊藤 博夫.

ヒト血中および唾液中の抗ホスホリルコリン抗体の存在実態.

第 59 回日本口腔衛生学会総会 (新潟), 2010 年 10 月 6 日~8 日

(3) 片岡 宏介, 関根 伸一, Tselmeg Baaatarjav, Sapta Mulyatono, 福井 誠, 金川 裕子, 伊藤 博夫.

遺伝子改変植物による歯周病原細菌定着阻害能を有するヒト唾液タンパク質スタセリンペプチドの発現.

第 59 回日本口腔衛生学会総会 (新潟), 2010 年 10 月 6 日~8 日

(4) 福井 誠, サプタ・ムルヤトノ, バータルジャフ・ツェルメグ, 片岡 宏介, 伊藤 博夫.

ヒトの唾液中および血中に存在する抗ホスホリルコリン抗体の検出

第 21 回日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方会総会 (松江) 2010 年 6 月 20 日

(5) 片岡 宏介, 福井 誠, 金川 裕子, 伊藤 博夫.

ヒト唾液タンパク質由来ペプチドの歯周病原菌定着阻害効果

第 21 回日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方会総会 (松江) 2010 年 6 月 20 日

(6) Kataoka K., Baatarjav T., Fukui M., Fujihashi K., Ito H-O.

Induction of PC-specific T15 idiotypic Ab in mucosal secretions by Flt3 ligand plasmid as a mucosal adjuvant.

第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 2009 年 12 月 2 日~4 日

(7) 片岡 宏介, 福井 誠, バータルジャフ・ツェルメグ, ムルヤトノ・サプタ, 金川 裕子, 伊藤 博夫.

唾液タンパク質由来のペプチド複合体による歯周病原菌定着阻害能の検討.

第 58 回日本口腔衛生学会総会 (岐阜), 2009 年 10 月 8 日~10 日

(8) 高松 夏子, 福井 誠, 片岡 宏介, 泉 福 英信, 伊藤 博夫.

歯根面う蝕発生における唾液中抗 PAc(361-386) IgA 抗体の役割.

第 58 回日本口腔衛生学会総会 (岐阜), 2009 年 10 月 8 日~10 日

(9) 福井 誠, 万井 正章, 宇野 賀津子, 伊藤 博夫.

唾液中サイトカイン測定の実用性に関する研究.

第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会・学術集会 (京都), 2009 年 6 月 26 日~27 日

(10) 福井 誠, 日野出 大輔, 横山 正明, バータルジャフ ツェルメグ, 片岡 宏介, 伊藤 博夫.

フゾバクテリウム反応性唾液 sIgA 抗体と舌苔との関連性.

第 20 回日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方会総会 (広島) 2009 年 6 月 21 日

(11) バータルジャフ ツェルメグ, 片岡 宏介, 福井 誠, 伊藤 博夫.

肺炎球菌抗原と DNA アジュバント経鼻投与による粘膜免疫応答の解析.

第 20 回日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方会総会 (広島) 2009 年 6 月 21 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者

福井 誠 (FUKUI MAKOTO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号: 50325289