

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18592011
 研究課題名（和文） 歯周病原菌産生短鎖脂肪酸による病原性バイオフィーム形成と細菌侵入性に及ぼす影響
 研究課題名（英文） Effects of Short-chain fatty acid on biofilm formation and bacterial invasion.
 研究代表者
 落合 邦康（OCHIAI KUNIYASU）
 日本大学・歯学部・教授
 研究者番号：50095444

研究成果の概要： 歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* の主な代謝産物短鎖脂肪酸、特に酪酸はヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤として様々な生物活性を持つ。我々は、酪酸を中心に、短鎖脂肪酸の口腔微生物のバイオフィーム形成に及ぼす影響を検討した。その結果、高濃度酪酸は正常口腔細菌であるレンサ球菌の増殖を阻害し、歯垢蓄積に關与する *Actinomyces* 属の増殖を促進し、病原性歯垢への遷移を促進していることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：短鎖脂肪酸、バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

我々は歯周病原細菌が産生する単鎖脂肪酸、特に酪酸の為害作用について、そのアポトーシス誘導性と歯周組織における解除機構について詳細に検討を行ってきた。すなわち：1) *Porphyromonas gingivalis*、*Prevotella intermedia* 及び *Fusobacterium nucleatum* などが大量に産生する短鎖脂肪酸は、マウスやヒト T 細胞や B 細胞に顕著にアポトーシスを誘導し、歯周局所の免疫応答に異常をきたす (J. Dent. Res., 1995, Infect. Immun., 1997, Dentistry in Japan, 2003)；2) その作用は、酪酸で最も強いことから、酪酸による T 細胞アポトーシス誘導機序を検討し解明した (J. Immunol., 2003, J. Dent.

Res., 2000, Clini. Diag. Labo. Immunol., 2001)；3) 直接酪酸と接する口腔粘膜上皮細胞や歯肉線維芽細胞は、酪酸に対し極めて強い抵抗性を持ち何ら細胞変性を生じない；4) 低濃度の酪酸により口腔上皮細胞や線維芽細胞の発育は促進される。また、T 細胞は線維芽細胞の産生する、IL-8、IL-11 の作用によりこのアポトーシスを回避する (Infect. Immun., 2002)；5) 酪酸存在下の共存培養により、線維芽細胞に付着する T 細胞数は急激に増加する。付着 T 細胞は、ほぼ完全に酪酸誘導アポトーシスを回避することができる。その付着には CD44、CD49b 及び CD49 を仲介とする (Infect. Immun., 2004, Biosci. Microflora., 2005)。このように一

連の実験を通し、酪酸を中心とした短鎖脂肪酸の組織内浸潤は、歯周組織に様々な影響をあたえ、特に、高濃度の酪酸は歯周組織を破壊し局所免疫の破綻を誘導することを解明してきた。

しかし、腸内で細菌が産生する短鎖脂肪酸、特に酪酸は、腸内環境維持およびガン予防など極めて多くの有効性が認められている。それを元に、健康食品やヨーグルトに代表されるプレバイオティクス、プロバイオティクスの考えが広く浸透している。では、「なぜ同一個体において、単純物質・酪酸は、腸管粘膜では有益物質であり、口腔粘膜では病原因子なのか？この相違、矛盾はどのような理由によるものか？」。我々は、一連の研究結果をもとに世界の腸管研究グループにこの問題を提示し続けた。近年、我々の研究が引用され、酪酸を大量に産生する菌が潰瘍性大腸炎から分離されることが報告され、腸管における酪酸の有害作用が報告され始めた(J. Gastro. Hepat., 2002, Gut, 2003, J. Intesti. Microbiol., 2005)。

歯垢は、典型的バイオフィームであるが、このバイオフィームは、単一細菌で形成される血管内バイオフィームと異なり、膨大な数と種類の細菌からなる凝集塊である。歯周病発症の原因となる歯肉溝内病原性口腔バイオフィーム形成は、正常口腔バイオフィーム形成菌から、何らか理由により病原性へと遷移する。しかし、遷移を誘導する物質については何ら検討がなされていない。また、その物質が歯周組織にも有害性を持つ物質であることも考えられる。特に、短鎖脂肪酸はスピロヘータなどの歯周病原細菌の発育を著しく増加させると共に、低分子で組織にも浸透しやすく、組織回復性を阻害し、gingipainなどのタンパク分解酵素やLPSの有害性をより確実なものとするのが考えられる。

我々の組織破壊および歯周病発生機序に関する仮説は、ある程度炎症が進み、酪酸などの短鎖脂肪酸の浸透が容易な状態で明確な説明が可能と考えられがちである。確かに、上皮細胞は酪酸抵抗性を持ち、酪酸により上皮のtight junctionは閉鎖する結果が得られている(平成16~17年度基盤研究C成果)。従って、生体は、歯肉溝内の細菌叢の変化を酪酸により感知し、外来病原因子の侵入を防御している可能性がある。つまり、正常組織においては、歯肉溝上皮から組織内への酪酸の浸透は困難と思われる。しかし、①上皮のtight junctionの閉鎖性は、高濃度酪酸により徐々に低下する(浸透性増加の可能性)。②正常歯垢構成レンサ細菌の一部に脂肪酸により発育阻害される菌種が存在する(細菌叢遷移の促進)。③一部の歯周病原菌において、脂肪酸

がその発育を促進するため病原性菌により上皮組織破壊が起こる(病原細菌の増加・増殖)可能性が考えられる。

そこで申請者は、酪酸を中心に、歯垢バイオフィーム中の短鎖脂肪酸感受性菌の有無とその菌種を検討すると共に、短鎖脂肪酸により発育増殖が認められる新たな歯周病原菌をスクリーニングする。これらの結果をもとに、短鎖脂肪酸による正常口腔バイオフィームから病原性バイオフィームへの遷移とその機序を解明することが重要である。

2. 研究の目的

歯周病発症の原因となる歯肉溝内病原性バイオフィーム形成は、何らかの物質の増加により、正常歯垢バイオフィーム形成菌から病原性菌垢に変化すると考えられる。この細菌叢遷移を誘導する物質の存在について短鎖脂肪酸を中心に検討する。更に、見いだされた物質による病原性バイオフィーム誘導機序を解明する。その結果、形成される病原性バイオフィームの組織有害作用と全身疾患誘導機序を検討する。本研究は、この細菌の遷移を誘導する物質の解明と、遷移の阻害による感染予防を目的としている。

3. 研究の方法

1) 短鎖脂肪酸の微生物に及ぼす影響

(1) 歯垢バイオフィーム構成微生物の発育に及ぼす影響:

短鎖脂肪酸、特に酪酸は、histone deacetylase 阻害剤として染色体に種々の影響を及ぼすが、低濃度により細胞の核酸合成を促進し、高濃度において阻害することが知られている。そこで、短鎖脂肪酸の種類と濃度が微生物の発育および酵素産生性に及ぼす影響を検討し、バイオフィーム形成に及ぼす影響を調べる。

①正常歯垢バイオフィーム構成菌への影響: 歯垢バイオフィーム構成菌であるレンサ球菌(Mitisグループ、Anginosusグループ、Mutansグループ)およびActinomyces属菌より代表的菌株を選択し、酪酸、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸などの短鎖脂肪酸がその発育に及ぼす影響を検討する。種々の濃度で供試菌株の培養液に添加し、その発育に及ぼす影響を濁度法およびDNA量測定により検討する。②微生物産生物質への影響: Sucrose依存性付着による口腔バイオフィーム形成上重要なMutansレンサ球菌のグルカン合成酵素、GTaseの産生性に及ぼす影響をPCRにて分子生物学的に検討する。③歯周病原細菌の発育に及ぼす影響: 歯周病原細菌とされる黒色色素産生グラム陰性桿菌として、P. gingivalis、P. intermedia等を用い、そのほかの病原性菌Aggregatibacter actinomycetemcomitans,

などから代表的菌株を選択し、各種短鎖脂肪酸濃度の発育・増殖に及ぼす影響を前述の方法で検討する。脂肪酸産生菌については、脂肪酸既存下における発育を検討する。*Campylobacter* 属、*Fusobacterium* 属についても同様の検討を行う。④歯周病原菌の病原因子産生性への影響：脂肪酸添加時の病原因子産生性に及ぼす影響として、各種遺伝子および酵素産生性の変化について分子生物学的に検討する。

(2) 静止系バイオフィーム形成実験：

刺激唾液を採取後フィルター滅菌し、96-well microtiter plate に加え 4°C で 1 時間培養し唾液を well に固着させる。PBS にて洗浄し、唾液処理 Plate とする。唾液処理および未処理 plate に Mutans グループおよび *P. gingivalis* の菌液を接種し、0.25% sucrose 含有または非含有 TSB 培地、またはヘミン・メナジオン含有 BHI 培地とともに 16 時間嫌気下で培養する。種々の濃度で短鎖脂肪酸を加え同様に培養し、対照群と比較しその、バイオフィーム形成に及ぼす影響を検討する。滅菌 PBS にて洗浄、乾燥後、サフラニン溶液にて染色し、乾燥後、付着菌量を測定する計測する。

形成されたバイオフィームの構成菌、形態および構成菌生死状態について各種蛍光染色液を用い染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用い検討する。

(3) 短鎖脂肪酸の流路系バイオフィーム形成に及ぼす影響：

口腔内を想定し、緑膿菌研究で用いられバイオフィーム形成実験法で成果を上げた流路系実験法を口腔用変法とし一部改良して用いる。静止系バイオフィーム実験結果より、特徴あるバイオフィーム形成の認められた口腔レンサ球菌および歯周病原菌を選択し、供試菌株として本実験に用いる。口腔レンサ球菌グループでは、接種するフローセルには、前述の方法で調整した滅菌唾液をセル内に加え室温下にて唾液処理フローセルを用いる。一方、歯周病原菌に対しては、歯肉溝を想定し唾液未処理条件下で検討する。Sucrose 依存性付着を排除するため、mutans グループには低濃度 sucrose 含有 TSB 培地、歯周病原菌には、ヘミン・メナジオン含有 BHI 培地を用いバイオフィーム形成およびそのプロセスを検討する。また、形成されるバイオフィームの状態について、LIVE/DEAD 染色液にて染色後、共焦点レーザー顕微鏡にてセル表面の蛍光を計測する。これらの結果をもとに、流路系バイオフィーム形成条件を設定する。

設定条件後、実験系に供試短鎖脂肪酸を種々の濃度で添加し、非添加分とのバイオフィーム形成速度およびバイオフィーム性状における短鎖脂肪酸の影響を検討する。

2) バイオフィーム形成分子および遺伝子の検討：

S. mutans、*P. gingivalis* および変化のみられた細菌のバイオフィーム形成細菌細胞および洗浄後遊離してきた細菌（プランクトニック細胞）より mRNA を抽出する。逆転写酵素およびランダムプライマーなどを用いて cDNA を作製し、*S. mutans* のグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) に加えて *ComA*、*B*、*C*、*D*、*E* 等のクオラムセンシング関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR で検討し、バイオフィーム内での細菌相互作用について詳細に検討する。*P. gingivalis* では、gingipain および EPS、CPS、LPS 等のバイオフィーム構成成分の発現を、回収された細胞の超音波、トライトン処理液を用いて SDS-PAGE およびウエスタンブロット等にて検討する。

3) 短鎖脂肪酸の歯周組織に及ぼす影響：

短鎖脂肪酸添加時における粘膜上皮および線維芽細胞に及ぼす影響を検討し、細菌の細胞内侵入の条件設定のため、細胞接着を電気抵抗により計測する。

4. 研究成果

歯肉縁上および縁下正常細菌叢は、レンサ球菌を中心としたグラム陽性菌により形成されるが、歯肉縁下では歯垢の蓄積と共にグラム陰性桿菌が増加し歯周病原性へと遷移するがその誘導物質について検討した。その結果、高濃度の酪酸処理により、正常歯垢構成菌のレンサ球菌では、Mitis グループの *Streptococcus mitis*、*S. sanguinis* および *S. gordonii* において発育抑制効果がみられた。特に、*S. mitis* と *S. gordonii* において 1.25 mM 以上の濃度でその抑制効果がみられた。一方、多くの細菌と共凝集能を持ち歯垢の蓄積に深く関わる *Actinomyces* 属菌では発育が促進された。供試した 3 株のいずれの *A. naeslundii* においても 1.25 から 5 mM で発育促進作用がみられた。しかし、供試した他の短鎖脂肪酸ではそれらの効果は認められなかった。また、静止系バイオフィーム形成実験において御も同様の結果が得られた。Sucrose 非存在下ではいずれの菌種においても変化がみられなかった。しかし、*S. mutans* は、低濃度酪酸処理によりバイオフィーム形成が促進された。しかし、濃度が上昇すると共に抑制された。一方、発育が促進された *A. naeslundii* においては、酪酸濃度約 6 mM でバイオフィーム形成が著しく促進された。しかし、その他の濃度および短鎖脂肪酸では特に影響は見られず、特定の酪酸濃度によりバイオフィーム形成が促進されるという興味ある結果が得られた。歯垢蓄積と共に増加する酪山量との関連性を検討する必要がある。

In vivo の歯垢形成を想定し *A. naeslundii*

および*S. gordonii*の両菌共存下のバイオフィルム形成の検討を行った結果、*S. gordonii*が酪酸による*A. naeslundii*のbiofilm形成作用を抑制した。特に、*S. gordonii*を先行付着させた場合その抑制効果は大きかった。この結果は、通常の口腔内ではレンサ球菌が他の細菌の付着増殖を抑制しているという既知の結果を裏付けているもので興味深い。

流路系バイオフィルム形成実験においても静止系と類似の結果が得られたが、酪酸存在下における*A. naeslundii*のバイオフィルム形成はより強固であった。

*A. naeslundii*を用いて heat shock タンパク及びバイオフィルム形成関連遺伝子発現の変化について検討を行った。また、同時に産生タンパクについて二次元電気泳動と遺伝子解析法にて検討を行った。その結果、4種の heat shock タンパク関連遺伝子の発現とタンパク産生増加が見られた。しかし、*S. mutans*のGTF関連遺伝子の増加は認められなかった。この点については、今後の検討が必要である。これらの結果から、歯垢の蓄積とともに増加する偏性嫌気性グラム陰性桿菌の代謝産物、酪酸は正常口腔バイオフィルム形成レンサ球菌の増加を抑制し、歯垢蓄積に関与する*A. naeslundii*の増殖を促進することにより、強固なバイオフィルムが形成されるものと思われる。この細菌叢における遷移により、嫌気度の強い環境で増殖する歯周病原菌が増加し病原性歯垢を形成すると思われる。歯周病原菌は自らの代謝産物・酪酸により生存環境を作り出していることが強く示唆される。

短鎖脂肪酸の歯周組織に及ぼす影響の検討では、酪酸処理においてはアポトーシスと同時にオートファジーが誘導されている結果が得られた。この結果は、アポトーシス阻害系においても完全に細胞死を阻害することが出来なかったという今までの細胞死誘導の機序解析における空白部分を埋めるもので興味深い。今後はこの結果をより詳細に検討する必要があるものと思われる。

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11件)

- ① M. Tamura, K. Ochiai; Zinc and copper play a role in coaggregation inhibiting action of *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol., 2009, 24, 56-63. (査読有り)
- ② S. Seto, T. Kurita-Ochiai, K. Ochiai; Increased susceptibility to tumor necrosis factor- α in butyric acid-induced apoptosis is caused by down-regulation

of FLIP expression in Jurkat T cells. Microbiol. Immunol., 2008, 52, 1-9. (査読有り)

- ③ T. Kurita-Ochiai, S. Seto, M. Yamamoto, K. Otsuka, K. Abe, K. Ochiai; Butyric acid induces apoptosis in human fibroblasts. J. Dent. Res. 2008, 87, 51-55. (査読有り)
- ④ R. Nakao, Y. Tashiro, N. Nomura, S. Kosono, K. Ochiai, H. Yonezawa, H. Watanabe, H. Senpuku; Glycosylation of the OMP85 homolog of *Porphyromonas gingivalis* and its involvement in biofilm formation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, 365, 784-789. (査読有り)
- ⑤ M. Kumada, H. Senpuku, M. Motegi, R. Nakao, H. Yonezawa, H. Yamamura, H. Watanabe, J. Tagami; Effects of *Enterococcus faecium* on *Streptococcus mutans* biofilm formation using flowcell system. J. Oral Biosci., 2008, 50, 68-76. (査読有り)
- ⑥ Y. Tashiro, N. Nomura, R. Nakao, H. Senpuku, R. Kariyama, H. Kumoh, S. Kono, H. Watanabe, T. Nakajima, H. Uchiyama. ; Opr86 is essential for viability and is a possible protective antigen in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 2008, 190, 3969-3978. (査読有り)
- ⑦ H. Yonezawa, H. Kuramitsu, S. Nakayama, J. Mitobe, M. Motegi, R. Nakao, H. Watanabe, H. Senpuku; Differential expression of the Smb bacteriocin in *Streptococcus mutans* isolates. Antimicrob Agents Chemother., 2008, 52, 2742-2749. (査読有り)
- ⑧ 田中一, 落合邦康; 歯周病原菌代謝産物・短鎖脂肪酸のプラーク形成菌遷移に及ぼす影響, 2008, 38, 120-123. Journal of Germfree Life and Gnotobiology, 38, 120-123. (査読無し)
- ⑨ 菊池邦好, 黒田亘一郎, 落合邦康; 口腔トレポネーマの膿瘍形成におよぼす短鎖脂肪酸の影響, J. Germfree Life Gnotobiology, 2007, 37, 74-77. (査読無し)
- ⑩ 落合邦康, 阿部和正, 落合智子; 歯周病における短鎖脂肪酸の為害作用, 日大歯学, 2007, 81, 213-221. (査読有り)
- ⑪ R. Nakao, H. Senpuku, H. Watanabe; *Porphyromonas gingivalis* gale is involved in lipopolysaccharide O-antigen synthesis and biofilm formation., Infect. Immun., 2006, 74, 6145-6153. (査読有り)

[学会発表] (計11件)

- ① 河原井武人; *Streptococcus mutans* グル

カン非依存的なバイオフィルム形成. 第 82 回 日本細菌学会総会, 2009年3月13日, 名古屋国際会館, 名古屋市.

② 泉福英信; 口腔バイオフィルム感染症、第 42 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会, 2009年1月23日, 神戸学院大学, 神戸市.

③ 米田早苗; 短鎖脂肪酸の *Actinomyces naeslundii* バイオフィルム形成に及ぼす影響, 第 81 回日本細菌学会総会, 2008年3月26日, 京都国際会館, 京都市.

④ 田中一; 歯周病原性菌代謝産物・酪酸が歯周病原性プラーク遷移におよぼす影響, 第 41 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会, 2008年1月25日, 神戸学院大学, 神戸市.

⑤ 落合邦康; 歯周病原性菌の産生する短鎖脂肪酸の作用と全身疾患, 第 41 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会, 2008年1月25日, 神戸学院大学, 神戸市.

⑥ K. Ochiai; Effects of short-chain fatty acid on cell-cell communication in inhibiting butyric acid induced T-cell apoptosis. 13th International Congress of Mucosal Immunology, 2007年6月10日, 品川プリンスホテル, 東京.

⑦ M. Tamura; Bactericidal effects of catechin-gel on dental plaque forming and periodontopathic bacteria. 13th International Congress of Mucosal Immunology. 2007年6月10日, 品川プリンスホテル, 東京.

⑧ H. Tanaka; Effects of short-chain fatty acid on the growth of Gram-positive bacteria associated with normal subgingival flora. 13th International Congress of Mucosal Immunology. 2007年6月10日, 品川プリンスホテル, 東京.

⑨ 田中一; 嫌気性菌代謝産物・短鎖脂肪酸のプラーク形成菌遷移に及ぼす影響、第 59 回日本大学歯学会総会、2007年5月17日, 日本大学歯学部, 東京.

⑩ 落合邦康; 歯周病原菌代謝産物・短鎖脂肪酸の粘膜・免疫組織に及ぼす影響—口腔細菌と腸内細菌研究の接点、第 48 回歯科基礎医学総会, 2006年9月22日, 鶴見大学歯学部, 横浜市.

⑪ 菊池邦好; 短鎖脂肪酸の口腔トレポネマ増殖におよぼす影響、第 48 回歯科基礎医学総会, 2006年9月22日, 鶴見大学歯学部, 横浜市.

[図書] (計 2 件)

①梅本敏夫, 小川知彦, 落合邦康, 上西秀則, 清浦有祐, 藤村節夫, 前田伸子編; 口腔微生物学 感染と免疫, 学建書院, 2006, P. 74-93, P. 230-285.

②天野 修編; 唾液腺, 落合邦康, 唾液の成分と作用, 学建書院, 2006, P. 45-48.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 邦康 (OCHIAI KUNIYASU)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号: 50095444

(2) 研究分担者

泉福 英信 (SENPUKU HIDENOBU)

国立感染症研究所・技官

研究者番号: 20250185

菊地 邦好 (KIKUCHI KUNIYOSHI)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号: 10169823

田中 一 (TANAKA HAJIME)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号: 40188321

田村 宗明 (TAMURA MUNEAKI)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 30227293

黒田 亘一郎 (KURODA KOUICHIRO)

日本大学・歯学部・助手

研究者番号: 70318450

(3) 連携研究者

()

研究者番号: