

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10270

研究課題名(和文)「複数菌の病原性を抑えて混合感染症を制御する」に向けた試み

研究課題名(英文) Control mixed infections by suppressing the virulence of multiple bacteria

研究代表者

西口 美由季 (NISHIGUCHI, MIYUKI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10253676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：誤嚥性肺炎に関連する口腔常在細菌で、新生児から高齢者まで検出される *Prevotella melaninogenica* について解析を行った。本菌は口腔感染症検体から多く分離されるとともに、婦人科領域感染症の原因菌ともなる。病原因子分泌装置変異株では赤血球凝集能、動物実験で病原性が著しく低下していた。本菌を用いた歯周病感染マウスモデルの構築を試みた。マウス口腔への歯周病細菌の接種法、接種量、接種回数を検討した。歯周病細菌接種後に、感染群、非感染群の上顎を摘出し、薄切標本を作成し、HE染色をおこなうとともに、炎症性サイトカインに対する免疫染色を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は糖尿病など全身疾患の重症性に関わる重大な口腔疾病である。本課題においては、歯周病感染マウスモデルの構築を行った。今後の研究において、この動物モデルを用いて、共同研究者が混合感染症における病態を観察し、どの菌の組み合わせが生体にとって組織炎症が起こりやすいのか検証する。また、本課題において静菌候補分子を得ることができており、今後この動物感染モデルを用いて、病原性抑制の可能性を検討し、歯周病や粘膜障害軽減等、臨床での応用を模索する。本研究成果は今後の歯周病に対する予防治療の確立に大いに貢献出来る成果であったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed *Prevotella melaninogenica*, an oral commensal organism associated with aspiration pneumonia and found in newborns and the elderly. *Prevotella melaninogenica* is frequently isolated from specimens with oral infections and is also a causative agent of gynecological infections. Pathogenic factor secretion apparatus mutants showed markedly reduced erythrocyte aggregation ability and virulence in animal studies. We attempted to construct a mouse model of periodontal infection using this bacterium. The method of inoculation of periodontal bacteria into the oral cavity of mice, the amount of inoculum, and the number of inoculations were investigated. After inoculation with periodontal disease bacteria, maxillae of infected and uninfected groups were excised, thin sections were prepared, and HE staining and immunostaining for inflammatory cytokines were performed.

研究分野：小児歯科学

キーワード：誤嚥性肺炎 口腔常在細菌

1. 研究開始当初の背景

P. melaninogenica は、乳児から高齢者の口腔や上気道の正常な菌叢の中で頻繁に見出され、しばしば誤嚥性肺炎との関連が報告される。また、病巣部位からの検出事例や全菌体成分を用いた免疫学的な実験から、誤嚥性肺炎やその他の感染性疾患の病原菌として特定されている。所属教室では、誤嚥性肺炎の既往がある脳性麻痺児から、高頻度で同菌が検出されることを報告した(星野ら、日本口腔ケア学会誌、2015)。*Prevotella* 属細菌は誤嚥性肺炎患者から検出率が高いことに加え、ラクタマーゼ産生性やバイオフィーム形成から抗菌薬に抵抗性を示し、難治性であることが多い。

バクテロイデーテス門に属する歯周病細菌には共通する病原因子分泌装置を用いて病原因子を分泌していることが知られる。ゲノム解読を行い、*P. melaninogenica* にもバクテロイデーテス門に共通する病原因子分泌装置のすべての既知オルソログが存在していたことから、本菌においても機能的な病原因子分泌装置が存在することが示唆された。病原因子分泌装置の主要構成タンパク質をコードする遺伝子の欠損株を *P. melaninogenica* GAI 07411 において構築した。病原因子分泌装置欠損株では、赤血球凝集とバイオフィーム形成が減少していた。また野生型株と病原因子分泌装置欠損株の培養上清を精製し、プロテオーム解析を行ったところ、病原因子分泌装置欠損株からの分泌タンパク質の数が減少していた。感染実験では、病原因子分泌装置欠損株を接種したマウスの死亡率は、野生型株と比較して統計的に有意に減少していた (Kondo et al. Microbiol Immunol. 62(9):554-566, 2018)。これらの結果から、*P. melaninogenica* が病原因子分泌装置を介して、この細菌の病態形成に関与することが示唆された。

2. 研究の目的

口腔内には *P. melaninogenica* と同じくバクテロイデーテス門に属し、病原因子分泌装置を用いて病原性を発揮していると考えられる菌種が多く存在する。歯周病細菌の *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* であり、これらの菌種の病原因子分泌装置からは数十種類のタンパク質が分泌され、病原因子分泌装置欠損株ではプロテアーゼの活性や、赤血球凝集能、組織障害性プロテアーゼ分泌の低下等の病原性に関わる分子活性低下の表現系を示す。

目的は、下記の3つとなる。

これらの病原細菌のタンパク質分泌装置が生体内での病原性発揮に関与しているの否か、動物感染モデルを用いて検討する。

病原細菌のタンパク質分泌装置を制御することにより、混合感染症の病原性の制御ができる可能性があるか否かを検討する。

天然微生物抽出物から、歯周病細菌の病原因子分泌装置の機能を抑える分子を探索する。

3. 研究の方法

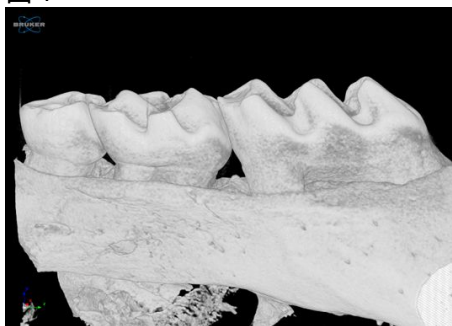
マウス歯周炎モデル作製のために、マウス口腔への歯周病細菌の接種法、接種量、接種回数を検討した。感染群として歯周病細菌を接種し、非感染群として Phosphate-buffered saline(PBS)をマウスの口腔に接種した。接種後、感染群および非感染群の上顎を摘出した。上顎をパラフォルムアルデヒドに浸漬固定し、脱灰後、パラフィンで包埋した。薄切標本作製し、HE 染色を行った。さらに、薄切切片を用いて炎症性サイトカインに対する免疫染色をおこなった。光学顕微鏡を用いて HE 染色標本を観察し、形態学的に評価した。また、感染群、非感染群の上顎歯槽骨に対してマイクロ CT を用いた解析を行い、上顎歯槽骨破壊を評価した。生化学的評価としては、感染群、非感染群の感染部位にあたる歯周組織を摘出し、炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6等)の遺伝子発現量をリアルタイム PCR を行い定量比較した。

4. 研究成果

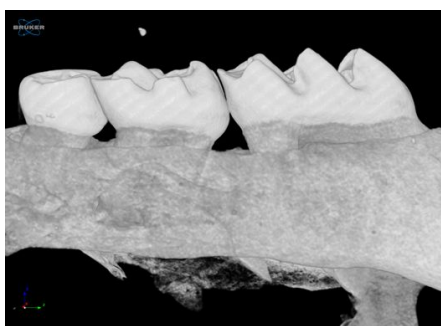
感染群および非感染群の上顎骨薄切切片の HE 染色から、非感染群と比較して、歯周病細菌感染群の、歯周病細菌接種部位の歯肉上皮は肥厚しているのが観察された。マイクロ CT を用いた解析では、PBS を投与した非感染群と比較して、歯周病細菌感染群の上顎歯槽骨吸収はごく僅かだった(図1)。これらの結果から、組織学的には、初期的な歯周炎を発症するマウス歯周炎モデル作製に成功しているといえる。炎症性サイトカインの遺伝子発現量をリアルタイム PCR で検討したところ、非感染群と比較して、細菌感染群では炎症性サイトカイン産生量が増加していた。

今後は、歯周病細菌の接種回数を増やす等、組織学的な歯周組織の病態が観察される条件をみつける。

图 1



感染群



非感染群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kondo Yoshio, Ohara Kenichi, Fujii Ryoji, Nakai Yudai, Sato Chikara, Naito Mariko, Tsukuba Takayuki, Kadowaki Tomoko, Sato Keiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Transposon mutagenesis and genome sequencing identify two novel, tandem genes involved in the colony spreading of <i>Flavobacterium collinsii</i> , isolated from an ayu fish, <i>Plecoglossus altivelis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2023.1095919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Keiko, Naya Masami, Hatano Yuri, Kasahata Naoki, Kondo Yoshio, Sato Mari, Takebe Katsuki, Naito Mariko, Sato Chikara	4. 巻 22
2. 論文標題 Biofilm Spreading by the Adhesin-Dependent Gliding Motility of <i>Flavobacterium johnsoniae</i> : 2. Role of Filamentous Extracellular Network and Cell-to-Cell Connections at the Biofilm Surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6911~6911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22136911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Keiko, Naya Masami, Hatano Yuri, Kondo Yoshio, Sato Mari, Nagano Keiji, Chen Shicheng, Naito Mariko, Sato Chikara	4. 巻 22
2. 論文標題 Biofilm Spreading by the Adhesin-Dependent Gliding Motility of <i>Flavobacterium johnsoniae</i> . 1. Internal Structure of the Biofilm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1894~1894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Keiko, Naya Masami, Hatano Yuri, Kondo Yoshio, Sato Mari, Narita Yuka, Nagano Keiji, Naito Mariko, Nakayama Koji, Sato Chikara	4. 巻 11
2. 論文標題 Colony spreading of the gliding bacterium <i>Flavobacterium johnsoniae</i> in the absence of the motility adhesin SprB	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79762-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimatsu Masako, Kawashita Yumiko, Soutome Sakiko, Murata Maho, Sawayama Yasushi, Kurogi Tadafumi, Nakao Noriko, Miyazaki Yasushi, Umeda Masahiro, Ukai Takashi	4. 巻 31
2. 論文標題 Hangeshashinto for prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a randomized phase II study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Supportive Care in Cancer	6. 最初と最後の頁 1087-1095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00520-023-08175-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimatsu Masako, Kitaura Hideki, Morita Yukiko, Nakamura Takuya, Ukai Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of anti-mouse RANKL antibody on orthodontic tooth movement in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 1087 ~ 1095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2022.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 近藤 好夫, 澤瀬 萌々, 伊藤 李香, 白倉 佳奈, 木下 莉沙子, 西口 美由季, 田上 直美
2. 発表標題 表層タンパク質の糖鎖修飾は細菌の滑走運動とバイオフィーム形成に關与する
3. 学会等名 第61回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西俣 はるか, 伊藤 李香, 木下 莉沙子, 白倉 佳奈, 西口 美由季, 田上 直美
2. 発表標題 歯ブラシ外傷にて頬部膿瘍を生じた1例(会議録)
3. 学会等名 第41回日本小児歯科学会九州地方会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 啓子、近藤 好夫、佐藤 主税、内藤 真理子、門脇 知子
2. 発表標題 滑走運動細菌 <i>Flavobacterium collinsii</i> のコロニー拡張
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤啓子、納屋昌実、近藤好夫、武部克希、内藤真理子、鈴木守、今田勝巳、石川岳 佐藤主税
2. 発表標題 歯周病細菌叢の病原性を抑える試み
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤啓子、近藤好夫、門脇知子
2. 発表標題 歯周病細菌の病原因子分泌
3. 学会等名 第44回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する吸収シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤啓子、近藤好夫、内藤真理子、門脇知子
2. 発表標題 滑走運動細菌によるバイオフィルム拡張
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤好夫、内藤真理子、門脇知子、佐藤啓子
2. 発表標題 滑走細菌の病原性
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鵜飼 孝 (Ukai Takashi) (20295091)	長崎大学・病院(歯学系)・教授 (17301)	
研究分担者	近藤 好夫 (Kondo Yoshio) (30581954)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------