

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462880

研究課題名(和文) 歯周病原性細菌の定着機構の解明：嫌気性環境下での感染実験系の構築と線毛機能の解析

研究課題名(英文) Study on colonization mechanism of periodontal pathogens: preparation of infection experiment under anaerobic conditions and analysis of fimbrial functions for colonization

研究代表者

永野 恵司 (Nagano, Keiji)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：60367620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は、歯周組織に定着した細菌によって引き起こされる。一部は、歯肉上皮細胞に付着して定着するが、その機構は十分にはわかっていない。ところで、歯周病関連細菌の多くは、酸素の無い環境(嫌気環境)で生育する。しかし、歯肉上皮細胞への付着に関する研究は、酸素存在下で行われてきたものばかりである。そこで本研究では、嫌気環境下での感染実験系の確立を行った。さらに、歯周病関連細菌で、嫌気性でもあるトレポネーマ・デンティコラを複数株用い、上皮細胞付着性を含む、種々の病原性について比較解析した。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is caused by multi-species of bacteria colonizing the periodontal tissues. Some species directly adhere to the gingival epithelial cells, but the mechanism is not well understood. Periodontitis-associated bacteria generally grow in an oxygen-free (anaerobic) environment. However, studies on adhesion to gingival epithelial cells have been performed under aerobic conditions. Therefore, in this study, it was conducted to establish a method of the infection experiment under anaerobic conditions. In addition, several strains of periodontitis-associated and anaerobic bacterium *Treponema denticola* were comparatively analyzed for some typical pathogenicities including adhesive activity to the gingival epithelia.

研究分野：微生物学

キーワード：歯周病 歯肉上皮細胞 嫌気培養 付着 トレポネーマ 運動 べん毛

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、細菌が、歯肉上皮細胞などの歯周組織に、付着して定着するによって引き起こされる。また、歯周病の発症に関連する細菌の多くは、酸素の無い、嫌気性環境でのみ生育可能な嫌気性細菌である。ところが、歯周病関連細菌の歯肉上皮細胞への付着/侵入を検討した研究は、大気条件で行われているものばかりである。その理由は、動物細胞の培養に酸素が必要であるためだが、歯周病関連細菌の生息環境とは大きく異なり、適当な実験系とは云えない。

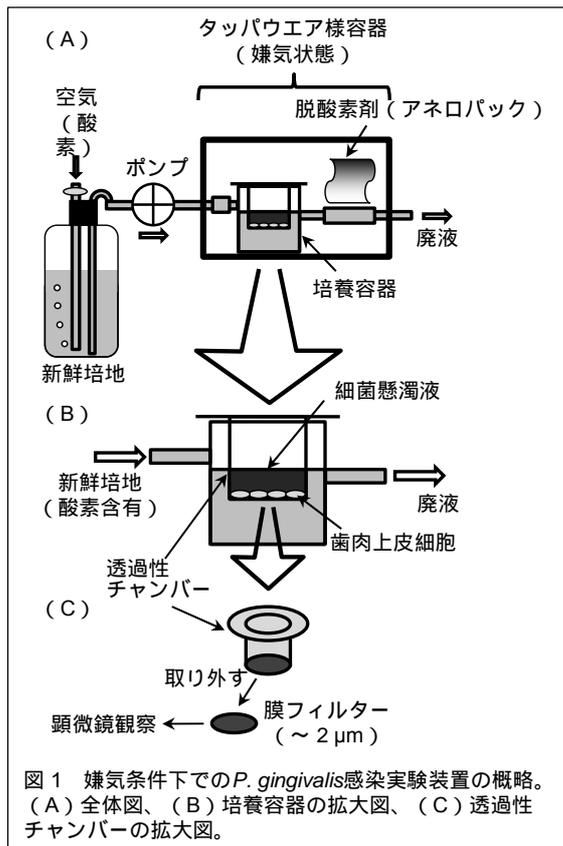
2. 研究の目的

歯周病関連細菌の付着/侵入性をより正しく評価するために、嫌気環境下での感染実験系の構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) 嫌気下感染実験系の構築

実験装置全体の概略図を図 1A に示す。酸素を含んだ新鮮培地を培養容器に送液した。歯肉上皮細胞 (Ca9-22 株) を透過性チャンパーに播種し、培養容器に浸漬させた (図 1B)。本チャンパーは底面が透過性の膜フィルターになっており、底面側から栄養分や酸素を吸収することができる。透過性チャンパー及び



培養容器は、脱酸素剤 (アネロパック) で嫌気状態にしたタップウエア様容器内に置いた (図 1A)。すなわち、上皮細胞の上面は嫌気 (無酸素) 状態である。供試細菌は嫌気環境下の上皮細胞の上面側に接種した。一定時間培養後、膜フィルターを回収した (図 1C)。免疫染色後、共焦点レーザー走査顕微鏡にて観察した。

(2) *Treponema denticola* の性状比較

4 株の *T. denticola* [ATCC 由来の 35404 (#04)、35405 (#05)、33520 (#20) および 33521 (#21)] を用いた。増殖は、600 nm 波長光における濁度で評価した。運動性は、位相差顕微鏡観察での回転速度、および軟寒天培地内の拡散性で評価した。形態は透過型電子顕微鏡観察で検討した。べん毛繊維構成タンパク質 (FlaB1、FlaB2 および FlaB3) の発現は、ウェスタンブロットおよび定量的逆転写 PCR 法で評価した。プロテアーゼ活性は発色基質を用いて測定した。歯肉上皮細胞 (Ca9-22) へ付着性は、3 時間共培養後、顕微鏡下で付着菌数を計数して評価した。

4. 研究成果

(1) 計画の変更点

当初は、代表的歯周病関連細菌の *Porphyromonas gingivalis* を用いた研究を計画していた。しかし、本菌は顕微鏡観察するには小さく、鮮明な像を捕らえることができなかった。そこで、他の歯周病関連細菌である *Treponema denticola* を用いることにした。本菌は、スピロヘータに属し、やや長い形態をしているので、容易に観察できた。また、本菌は培地中で回転運動を示すので、嫌気下感染実験において、その生存活性を容易に判定できた。

(2) 嫌気下感染実験系での成果

T. denticola は、本研究で確立した嫌気下感染実験系において、感染後 24 時間においても、活発な運動性を維持し、本実験系の有用性の証拠の一つとなった。同様に、上皮細胞の代謝活性も、24 時間後でも低下は認められなかった。*T. denticola* と上皮細胞の細胞数の比を 100:1 で播種した場合、1 時間後では、わずかな付着しか認められなかった。3 時間後では実質的な量の付着が認められ、再現性もよかった。6 時間後および 12 時間後と継時的に付

着菌数の増加が認められたが、菌数が多すぎて、定量的測定が困難となった。24 時間後では、明らかな上皮細胞の損傷がみられた。以上の結果から、付着実験は、3 時間培養後に評価することにした。

(3) *T. denticola* 株の比較性状解析

以下に示す結果は、現在論文準備中のため、詳細なデータの公表は控えさせてもらう。

結果

4 株の *T. denticola* の性状比較を行った。対数増殖期までは菌株間に差異はみられなかったが、定常期で、#05 および#20 の濁度が、#04 および#21 より高値に達した。#04 が最も活発な回転運動を示し、次に#21 が活発だった。#05 および#20 は、ほとんど運動していなかった。軟寒天培地での拡散性は、回転運動性とほぼ一致し、#04、#21、#20 および#05 の順に低下した。透過型電子顕微鏡観察で、#05 および#20 のべん毛は長く伸び、菌体端から突出したものが高頻度に見られた。FlaB1 発現は、菌株間に差異はみられなかった。FlaB2 発現は、#04 で低下がみられた。FlaB3 発現は、#05 および#20 で顕著に高く、次に#21 で、#04 の発現は低かった。また、#05 および#20 で、FlaB3 の翻訳後修飾の異常が示唆された。キモトリプシン様プロテアーゼ活性、および Ca²⁺-ATPase への付着性が、#04 および#21 に比して、#05 および#20 は、顕著に高値であった。

結論

高運動性（#04、#21）および低運動性（#05、#20）株が存在した。低運動性の理由の一つとして、FlaB2 および FlaB3 の発現量および翻訳後修飾の異常により、べん毛が異常伸長したためであることが示唆される。また、今回検討した種々の性状が、運動性と相関する傾向がみられた。

(4) その他の成果

当初計画していた *P. gingivalis* の線毛機能に関する研究として、本菌の新規線毛の特徴づけを行った。

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 4 件)

Goto T, Nagano K, Hirakawa H, Tanaka K, Yoshimura F. Draft Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain Ando expressing a 53-kilodalton-type fimbrilin variant of Mfa1 fimbriae. *Genome Announc.* 3: e01292-15 (2015).

doi:10.1128/genomeA.01292-15. (査読有)

Nagano K, Hasegawa Y, Yoshida Y, Yoshimura F. A major fimbrilin variant of Mfa1 fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res.* 94: 1143-1148 (2015). doi:

10.1177/0022034515588275. (査読有)

Abiko Y, Nagano K, Yoshida Y, Yoshimura F. Major membrane protein TDE2508 regulates adhesive potency in *Treponema denticola*. *PLoS One.* 9: e89051 (2014). doi:

10.1371/journal.pone.0089051 (査読有)

Abiko Y, Nagano K, Yoshida Y, Yoshimura F. Characterization of *Treponema denticola* mutants defective in the major antigenic proteins, Msp and TmpC. *PLoS One.* 9: e113565 (2014). doi:

10.1371/journal.pone.0113565. (査読有)

[学会発表](計 7 件)

Nagano K, Hasegawa Y, Yoshida Y, Yoshimura F. Comparative analysis of the motility, protease and adherence activity of *Treponema denticola* strains. 第 89 回日本細菌学会総会 (大阪・大阪) 2016.3.23.

吉村文信, 永野恵司, 長谷川義明, 吉田康夫. 口腔スピロヘータ *Treponema denticola* の株間における性状比較解析第 45 回東海乳酸菌研究会 (愛知・名古屋) 2016.2.6.

永野恵司 (特別講演・口頭) これまでの研究実績. 第 52 回日本細菌学会中部支部総会 (愛知・名古屋) 2015.10.24.

Nagano K, Hasegawa Y, Yoshida Y, Yoshimura F. Another fimbrilin of Mfa1 fimbriae in the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. 第 88 回日本細菌学会総会 (岐阜・岐阜) 2015.3.26.

永野恵司, 吉田康夫, 長谷川義明, 吉村文信. 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* の第三の線毛に関する研究. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (福岡・福岡) 2014.9.27.

永野恵司, 安彦友希, 吉田康夫, 長谷川義明, 吉村文信. 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* の第三の線毛に関する研究. 愛知学院大学歯学会第 84 回学

術大会（愛知・名古屋）2014.6.8.
永野恵司，吉田康夫，長谷川義明，吉村文信. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の第三の線毛（53K 線毛）に関する研究. 第 60 回日本薬学会東海支部総会・大会（三重・鈴鹿）2014.7.5.

永野恵司，吉田康夫，長谷川義明，吉村文信. 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* の第三の線毛（53K 線毛）に関する研究. 第 28 回 Bacterial Adherence & Biofilm 研究会学術集会（東京・文京）2014.7.9.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.aichi-gakuin.ac.jp/HP/biseibutsu/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永野 恵司 (Keiji Nagano)

愛知学院大学歯学部・准教授

研究者番号：60367620