

論文内容の要旨

歯周病原細菌の歯肉上皮バリア突破能

(岩手医科大学歯学雑誌 第 42 巻、第 1 号、平成 29 年 4 月掲載予定)

たかはし しんべい
高橋 晋平

I. 研究目的

歯周炎は歯槽骨の吸収を伴う歯周組織の炎症性病変で、歯肉縁下プラーク中に存在するある種の嫌気性グラム陰性細菌に起因する疾患である。歯周病原細菌が歯周炎患者の病巣歯肉組織から検出されることは、我々を含む複数の研究グループから報告されており、このことは、歯周病原細菌が歯肉上皮のバリアを突破するということが歯周炎発症機序の重要なステップであることを示唆するものと考えられる。しかし、そのメカニズムの詳細については依然不明な点が数多く残されている。また、歯周病原細菌の組織内侵入経路としては細胞内を通過する transcellular ルートと細胞間隙を通過する paracellular ルートが挙げられており、種々の歯周病原細菌が保有するビルレンス因子に応じて上皮バリア突破能が異なる可能性が示唆されているものの、その詳細な侵入の分子メカニズムについても不明な点が残されている。そこで本研究では、歯周病原細菌の歯肉組織内侵入機構の全容を明らかにすることを目的に、重度慢性歯周炎の発症・進行と関連の強い 'red complex species' および侵襲性歯周炎の原因細菌種とされる *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の上皮バリア突破能と突破経路について、株化ヒト歯肉上皮細胞を用いた double-chamber culture 法により検討した。

II. 研究方法

株化ヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22) を上部チャンバーに培養した double-chamber culture 法を用い、3 日間前培養後、抗菌薬を含まない無血清培地に交換した。 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株、 *Tannerella forsythia* ATCC 43037 株、 *Treponema denticola* ATCC 33520 株および *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 株の菌液 (最終: 2.5 x 10⁷ CFU/ml) を上部チャンバーに添加し、菌種特異的 real-time PCR 法 (q-PCR) を用いて下部チャンバーへ通過した菌量から歯周病原細菌の上皮バリア突破能を検討した。歯周病原細菌による細胞間結合の破壊能については FITC-dextran の通過量から検討を行った。また、細胞層に付着、侵入した歯周病原細菌数についても q-PCR から検討した。

III. 研究成績

P. gingivalis は、培養 6 時間までに下部チャンバーへの通過菌数、FITC-dextran の通過量の有意な上昇を認めた。 *T. forsythia*、 *A. actinomycetemcomitans* も *P. gingivalis* 同様に培養 6 時間までに通過菌数の有意な上昇を認めたものの、FITC-dextran の有意な通過は見られなかった。これに対して、 *Trep. denticola* は培養 6 時間までに通過菌数、FITC-dextran 通過量の有意な変化を認めなかった。

IV. 考察及び結論

P. gingivalis は、培養 6 時間で transcellular、paracellular の両ルートを通じて上皮バリアを突破することが明らかとなった。また、 *T. forsythia*、 *A. actinomycetemcomitans* も *P. gingivalis* 同様に上皮バリア突破能を有しているものの、これら 2 菌種の上皮バリア突破経路は transcellular ルートのみであることが示唆さ

れた。これらの結果から、複数の歯周病原細菌は歯肉上皮バリアを突破するが、その侵入経路は菌種により異なることが強く示唆された。これに対して、*Trep. denticola* は他の3菌種と比較して単独での上皮バリア突破能が弱いことが示唆された。しかし歯周病原細菌は歯肉縁下プラークという細菌集合体/バイオフィームとして歯肉上皮バリアの突破を果たす。今後、個々の歯周病原細菌の歯肉上皮バリア突破機序の詳細を明らかにするとともに、歯肉縁下プラークという細菌集合体/バイオフィームの歯肉上皮バリア突破機序についても検討する必要があるものと思われる。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 佐々木 実 (微生物学講座 分子微生物学分野)
副査 教授 八重柏 隆 (歯科保存学講座 歯周療法学分野)
副査 教授 岸 光男 (口腔医学講座 予防歯科学分野)

歯周病原細菌が上皮バリアを通過し歯周炎患者の病巣歯肉組織内に侵入することは明らかにされているが、その詳細な侵入機構については未だ不明な点が残されている。歯周病原細菌の組織内侵入に関わる上皮バリア突破経路は、細胞内を通過する *transcellular* ルートと細胞間隙を通過する *paracellular* ルートが報告されている。しかし歯周病原細菌により保有するビルレンス因子が異なることから、菌種による上皮バリア突破能、突破経路が異なる可能性が推測されるものの未だ明らかではない。本研究では歯周病原細菌の組織内侵入機構の詳細を明らかにすることを目的として、重度歯周炎に関連の強い ‘*red complex species*’ に分類される *Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola* の3菌種および侵襲性歯周炎との関連があるとされる *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の上皮バリア突破能、突破経路について検討を行った。

歯周病原細菌の上皮バリア突破能、突破経路については、株化歯肉上皮細胞 (Ca9-22) を用いた *double-chamber culture* 法を用いて検討した結果、*P. gingivalis*、*T. forsythia* および *A. actinomycetemcomitans* は培養6時間で上皮バリアを突破することが明らかになったが、*Trep. denticola* は有意な上皮バリア突破能を認めなかった。また歯周病原細菌による細胞間結合組織破壊能を、FITC-dextran の細胞間隙通過量および蛍光ペプチド基質を用いたプロテアーゼ活性から検討した。その結果、*P. gingivalis* のみ有意な上皮細胞間隙の破壊能を認め、この破壊に関わるとされるトリプシン様プロテアーゼは *P. gingivalis* のみ有することが明らかとなった。

以上の結果から、*P. gingivalis* は上皮バリア突破能を有し、その突破経路としては *transcellular*、*paracellular* の両ルートを通じて突破することが示唆された。また *T. forsythia*、*A. actinomycetemcomitans* も *P. gingivalis* 同様に上皮バリア突破能を有しているものの、これら2菌種の上皮バリア突破経路は *transcellular* ルートのみであることが明らかとなった。一方、*Trep. denticola* は他の3菌種と比較して単独では上皮バリア突破能が弱いことが示唆された。また細胞間結合組織破壊に関わる細菌由来プロテアーゼという点からは、*P. gingivalis* のみが強いトリプシン様活性を有することが強く示唆された。以上のことから、歯周病原細菌により上皮バリア突破能および突破経路が異なることが強く示唆された。今後、個々の歯周病原細菌の歯肉上皮バリア突破機序の詳細を明らかにするとともに、歯肉縁下プラークという細菌集合体/バイオフィームの歯肉上皮バリア突破機序についても検討することにより、さらに効果的な歯周治療への展開、臨床応用が期待される。

試験・試問結果の要旨

本論文の概要について説明がなされた。研究背景、方法、結果の解釈ならびにその臨床的意義、臨床応用の可能性について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また歯周病の病態を踏まえ、今後の研究の展望も積極的に述べており、研究に対する十分な意欲が感じられたことから、学位に値する学識と研究能力を有するものと判定した。

参考論文 なし