

原 著

歯周病原細菌の歯肉上皮バリア突破能

高橋 晋平¹⁾, 下山 佑²⁾, 石河 太知²⁾, 佐々木大輔¹⁾, 木村 重信³⁾,
八重柏 隆¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学歯学部歯科保存学講座歯周療法学分野

(主任：八重柏 隆 教授)

²⁾ 岩手医科大学微生物学講座分子微生物学分野

(主任：佐々木 実 教授)

³⁾ 関西女子短期大学歯科衛生学科

(主任：木村 重信 教授)

(受付：2016年12月12日)

(受理：2016年12月29日)

抄 録

'Red complex species'をはじめとする歯周病原細菌が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、その詳細な侵入の分子メカニズムについては未だ不明な点が残されている。本研究では歯周病原細菌の歯肉上皮バリア突破機構について、細胞内を通過する transcellular ルートと、細胞間隙を通過する paracellular ルートから検討を行った。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、*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* を添加した。歯周病原細菌の上皮バリア突破能は菌種特異的 real-time PCR 法 (q-PCR) により下部チャンバーへ通過した菌量から検討した。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。その結果、*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

Invasive ability of periodontopathic bacteria across gingival epithelial barrier
Shinpei TAKAHASHI¹⁾, Yu SHIMOYAMA²⁾, Taichi ISHIKAWA²⁾, Daisuke SASAKI¹⁾, Shigenobu KIMURA³⁾,
Takashi YAEGASHI¹⁾

¹⁾ Division of Periodontology, Department of Conservative Dentistry, School of dentistry, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Takashi YAEGASHI)

²⁾ Division of Molecular Microbiology, Department of Microbiology, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Minoru SASAKI)

³⁾ Department of Dental Hygiene, Kansai Women's College

(Chief: Prof. Shigenobu KIMURA)

¹⁾ 1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan.

²⁾ 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwagun, Iwate 028-3694, Japan.

³⁾ 3-11-1 Asahigaoka, Kashiwara, Osaka 582-0026, Japan.

¹⁾ 岩手県盛岡市中央通 1-3-27 (〒 020-8505)

²⁾ 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1 (〒 028-3694)

³⁾ 大阪府柏原市旭ヶ丘 3-11-1 (〒 582-0026)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 42 : 1-11, 2017

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ことが明らかとなった。しかし, 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。

緒 言

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^{1,3)}。歯周病原性の細菌種についてはこれまで多くの研究^{4,6)}がなされてきたが, 大規模な DNA-DNA ハイブリダイゼーション解析の結果, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* の3菌種の偏性嫌気性グラム陰性細菌が重度の(慢性)歯周炎と強く関連することが明らかにされた⁷⁾。この3菌種は 'red complex species' と呼ばれ, 現在では歯周炎の主要な原因細菌種, 歯周病原細菌と考えられている。ただし, 'red complex species' 以外にも歯周病原性を発揮する細菌は存在し, 特に侵襲性歯周炎の場合には *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* が原因細菌種と考えられている^{8,9)}。

我々を含む複数の研究グループにより, 歯周炎患者の病巣歯肉組織から歯周病原細菌が検出されることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。このことは, 歯周病原細菌による歯肉上皮のバリア突破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が, 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。歯周病原細菌のうち *P. gingivalis* の組織内侵入については, Katzら¹³⁾が, *P. gingivalis* の主要ビルレンス因子である Arg-gingipain と Lys-gingipain により歯肉上皮細胞間隙を破壊して組織侵入することを示唆する報告を行っている。しかし, gingipains を有さない他の歯周病原細菌も歯周病患者の病巣歯肉組織に侵入していることが明らかとなっている¹⁰⁻¹²⁾ ことからすれば, 細胞間隙を通過する paracellular ルート以外の組織侵入ルートも存在するものと考えら

れる。我々の研究グループでは, 培養上皮細胞を用いた研究から, *P. gingivalis* が上皮細胞内へ侵入すること, 侵入程度は *P. gingivalis* が保有する線毛タイプにより大きく異なることを明らかにしている¹⁴⁾。また一旦, 上皮細胞への侵入が成立すると組織破壊につながる上皮細胞の機能障害が起こり, 結果として, 他の歯周病原細菌の組織内侵入に関与する可能性も明らかにしている⁵⁾。これらの成績は, *P. gingivalis* が歯肉上皮細胞内を通過する transcellular ルートを介して組織内侵入する可能性を強く示唆するが, paracellular ルートの組織内侵入を否定するものではなく, また, その関連性も明らかではない。*P. gingivalis* 以外の歯周病原細菌については, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* で transcellular ルートを介する組織内侵入については報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾ が, いずれも paracellular ルートについては検討されておらず, したがって侵入経路を含めた歯周病原細菌の組織内侵入の全容は明らかにはされていない。

近年, 歯周病原細菌のゲノム DNA が感染性心内膜炎^{5, 18)}, 急性冠症候群¹⁹⁻²¹⁾, 腹部大動脈瘤²²⁾などの心血管疾患の病巣から検出され, また, 関節リウマチ²³⁾や糖尿病²⁴⁾においても歯周病原細菌感染の関連が指摘されていることから, 歯周病原細菌の歯肉組織内への侵入/感染は全身感染症の発症・進行に関わる重要なリスクファクターともなる可能性がある。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, 'red complex species' および *A. actinomycetemcomitans* の上皮バリア突破能と突破経路について, 培養歯肉上皮細胞を用いた double-chamber culture 法により検討した。

材料および方法

1. 歯周病原細菌の調整

歯周病原細菌として *P. gingivalis* ATCC 33277 株 および *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 株は既報²⁵⁾ に従い培養した。すなわち、5 μg/ml の hemin (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), 0.5 μg/ml の menadione (SIGMA-ALDRICH) 含有の Anaerobic bacteria culture media (コンプリートメディウム) (栄研化学, 東京) を用いた。*T. forsythia* ATCC 43037 株の培養はコンプリートメディウムに 10 μg/ml N-acetylmuramic acid (SIGMA-ALDRICH) および 0.1% L-cystein (SIGMA-ALDRICH) を添加した培地を用い、*Trep. denticola* ATCC 33520 株の培養は *T. forsythia* の培養に用いた培地に 5% ウサギ血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添加した培地を用いた。各菌を 37°C, 嫌氣的条件下で、48 時間培養した後、遠心分離 (2,400 xg, 8 分間, 4°C) により回収し、Minimum Essential Medium *a* (*a*-MEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA) を用いて洗浄・再懸濁したのち、OD₆₀₀=0.2 に濁度を調整し、歯周病原細菌液とした。

2. 歯肉上皮細胞層の作製

株化ヒト歯肉上皮細胞は市販の Ca9-22 細胞を用いた。Sumitomo^{26, 27)}, Fujita²⁸⁾ の方法に準じ、double-chamber culture 法を用いて歯肉上皮細胞層を作製した。すなわち、3 μm 径のミリセルセルカルチャーインサート (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を上部チャンバー、24 穴培養プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) を下部チャンバーとし、上部チャンバーに 1% ウシ胎児血清, 100 U/ml penicillin (SIGMA-ALDRICH) および 100 μg/ml streptomycin (SIGMA-ALDRICH) を添加した *a*-MEM 培地に懸濁した Ca9-22 細胞を 1.0 x 10⁵ cells/ml の密度で播種し、37°C, 5% CO₂-95% 大気中で 3 日間培養した。培養終了後、*a*-MEM で 5 回洗浄した後、上部チャンバーおよ

び下部チャンバーの培地を抗菌薬を含まない無血清培地 (*a*-MEM) に置換し、歯肉上皮細胞層として実験に供した。

3. 歯周病原細菌の上皮バリア突破能および上皮細胞間結合の破壊状態

歯周病原細菌の上皮バリア突破能は、上部チャンバーに歯周病原細菌の懸濁液を添加し、Ca9-22 細胞層を通過した下部チャンバーの細菌数から判定した。すなわち、上部チャンバーに歯周病原細菌懸濁液 (最終: 2.5 x 10⁷ CFU/ml) を 100 μl 添加し、一定時間培養後、上部チャンバーおよび下部チャンバーの歯周病原細菌液を回収した。菌液を遠心分離して得られた菌体より DNA を抽出²⁹⁾ し、既報³⁰⁻³²⁾ に従い菌種特異的 real-time PCR を行った。菌種特異的 real-time PCR は、DNA 溶液 1 μl, 1 x SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (タカラバイオ, 草津), 0.4 μM 菌種特異的プライマー (表 1) の混合液を、Thermal Cycler Dice[®] Real Time System Single (タカラバイオ) を用いて行った。

表 1 Real-time PCR に使用したプライマー

ターゲット遺伝子	配列 (5' to 3')	Product length (bp)
<i>P. gingivalis</i> 16SrDNA	tgtatgatgactgatggtgaaacc acgtcatccccaccctctc	197
<i>T. forsythia</i> 16SrDNA	agcgatggtagcaatacctgtc ttccgccgggtatccctc	88
<i>Trep. denticola</i> 16SrDNA	ccgatgtgctcattacataaagg gataccaccatcgttgccttgg	122
<i>A. actinomycetemcomitans</i> 16SrDNA	cggttaccggttagccgtgtga gcccggaatcgttctatatctc	288

上下部チャンバーの歯周病原細菌液の回収、洗浄後、Ca9-22 細胞間結合の破壊状態を検討する目的で、既報²⁶⁻²⁸⁾ に従い上部チャンバーに 1 mg/ml FITC-dextran (分子量 4 kDa) (SIGMA-ALDRICH) 液を 4 μl 添加し、リン酸緩衝液 (PBS) で満たした下部チャンバーへ移行した FITC-dextran 量を励起波長 485 nm, 蛍光波長 535 nm にて分光蛍光光度計 F-2000 (HITACHI, 東京) を用いて測定した。

その後、セルカルチャーインサート上の Ca9-22 細胞を洗浄、回収後、burst させて上皮細胞

中の菌周病原細菌量を real-time PCR により測定した¹⁴⁾.

4. 上皮バリア突破に関わる菌周病原細菌の gingipain 活性

菌周病原細菌のプロテアーゼ活性の比較検討は既報^{33, 34)}に従い, 蛍光ペプチド基質 4-methylcoumaryl-7-amide (MCA 基質) を用いて検討した. すなわち, 培養した菌周病原細菌を回収, 洗浄後, PBS に懸濁し OD₆₀₀=0.2 に濁度を調整した. 菌液 5 μl を, 50 mM sodium phosphate (pH 7.5), 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 20 μM MCA 溶液と 37°C, 5 分間反応させ, 分光蛍光光度計により蛍光強度を測定した (励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm). MCA 基質としては Boc-Phe-Ser-Arg-MCA および Boc-Val-Leu-Lys-MCA (ともにペプチド研, 大阪) を用いた.

5. 統計解析

本研究における統計解析はすべてスチューデントの *t* 検定を用いて行い, すべての結果において有意水準は 0.05 未満とした.

結 果

1. 菌周病原細菌の上皮バリア突破能と上皮バリア突破経路

Ca9-22 細胞を用いた上皮細胞層に破綻のないこと, また, 無血清培地の培養で上皮細胞層が維持される時間について, 添加 FITC-dextran の通過量から検討した (図 1). その結果, 培養 6 時間までは 0.5 時間培養の値と比較して FITC-dextran の有意の通過は見られず, Ca9-22 を用いた上皮細胞層は維持されていること, また, 培養 8 時間以降は上皮細胞層が破綻していることが明らかとなり, 以下の菌周病原細菌の上皮バリア突破能の検討は培養 6 時間までで行った.

両侵入経路の総和としての菌周病原細菌の上皮バリア突破能における transcellular ルートの関与を明らかにする目的で, 4 菌種の菌周病原

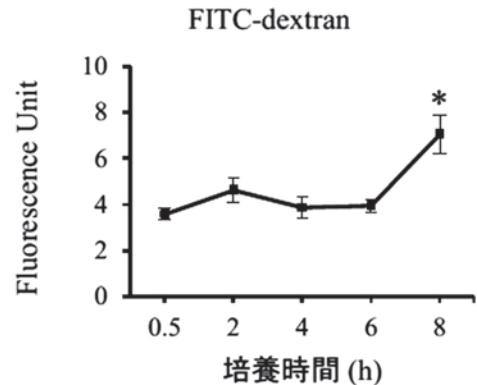


図 1 : 歯肉上皮バリア形成の確認

培養終了後, 下部チャンバーへ移行した FITC-dextran の蛍光強度を示す (n ≥ 3). 平均値 ± 標準誤差を図に示す. (*) は有意な差 ($p < 0.05$) を示す.

細菌添加後の, 上部チャンバー内の菌数, 上皮細胞層中の菌数および下部チャンバーに通過した菌数の経時的変動について 0.5 時間培養の値と比較して検討した (図 2). その結果, *P. gingivalis* の場合, 上部チャンバー内の菌数は培養 6 時間まで徐々に減少し, 逆に下部チャンバー内の菌数は培養 4 時間で増加し, 培養 6 時間で有意の増加を認めた ($p < 0.05$). また, 上皮細胞層中の菌数も時間の経過とともに増加し, 培養 2 時間以降, 有意に増加した ($p < 0.05$) (図 2 A). *T. forsythia* の場合も同様に, 上部チャンバー内の菌数は培養 6 時間まで徐々に減少し, 下部チャンバー内の菌数は培養 4 時間以降, 有意に増加することが明らかとなった ($p < 0.05$). 上皮細胞層中の菌数も培養 2 時間以降, 有意に増加した ($p < 0.05$) (図 2 B). *A. actinomycetemcomitans* の場合も, 上部チャンバー内の菌数が培養 6 時間まで徐々に減少し, 下部チャンバー内および上皮細胞層中の菌数が培養時間の経過とともに増加したが, ともに培養 6 時間時点でのみ有意の増加を認めた (いずれも $p < 0.05$) (図 2 D). 一方, *Trep. denticola* の場合は, 上部チャンバー内の菌数は培養 6 時間まで徐々に減少したが, 下部チャンバー内の菌数は培養 6 時間時点においても有意の増加は

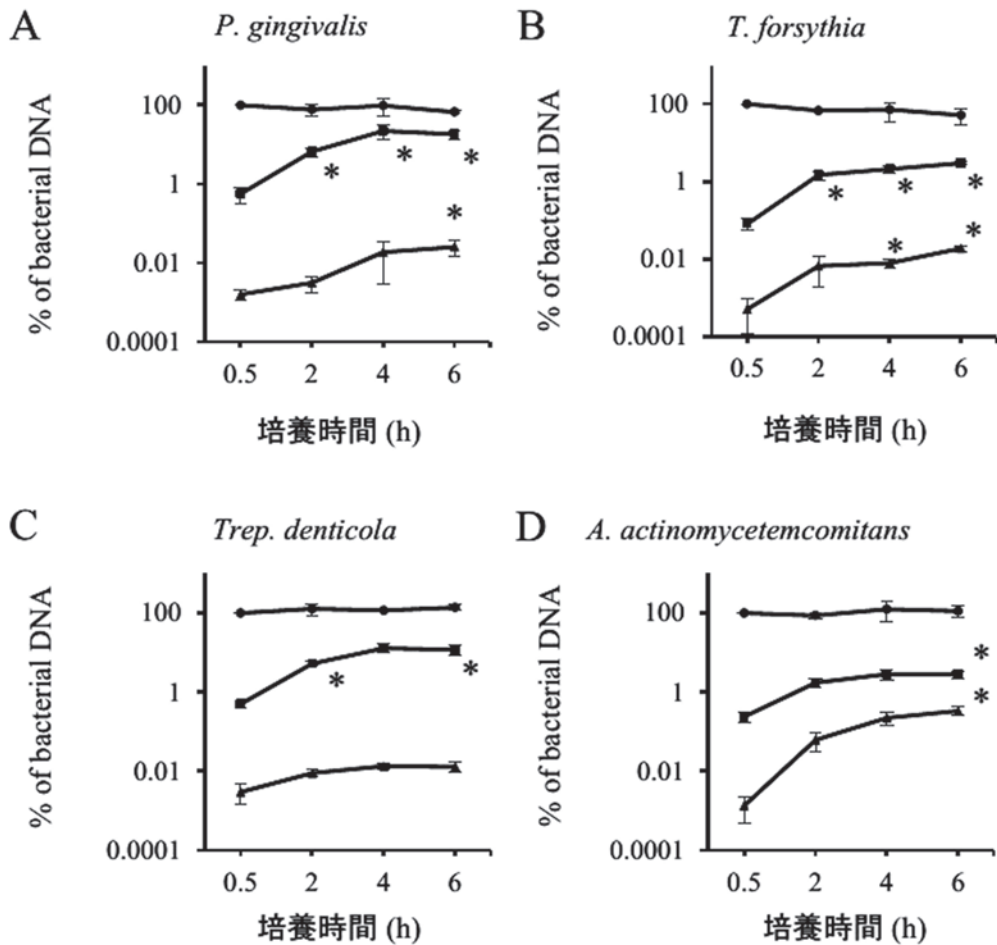


図2：菌肉上皮バリア突破能における菌数定量

上部チャンパー (●), 下部チャンパー (▲) および上皮細胞層 (■) に侵入または付着した細菌数の割合を示す (A: *P. gingivalis*, B: *T. forsythia*, C: *Trep. denticola*, D: *A. actinomycetemcomitans*) (n ≥ 3). 平均値 ± 標準誤差を図に示す. (*) は有意な菌数の差 (p < 0.05) を示す.

観察されなかった. しかし上皮細胞層中の菌数については培養2時間および培養6時間の時点で有意の増加を認めた (いずれも p < 0.05) (図2 C).

次に, 上皮細胞層の細胞間結合破壊による paracellular ルート形成の有無について, 上下部チャンパーの菌周病原細菌液の回収, 洗浄後, 上部チャンパーに添加した FITC-dextran の下部チャンパーへの通過量から検討した (図3). その結果, *P. gingivalis* 菌液添加群では, 菌液除去後に添加した FITC-dextran の下部チャン

パーへの通過は培養4時間までは0.5時間培養の値と比較して認められなかったが, 培養6時間の時点で有意の通過を認めた (p < 0.05) (図3 A). 一方, *T. forsythia*, *Trep. denticola* および *A. actinomycetemcomitans* の場合には, 菌液除去後に添加した FITC-dextran の下部チャンパーへの通過が観察されず, 上皮細胞層の細胞間結合破壊による paracellular ルート形成は認められないことが強く示唆された (図3 B-D).

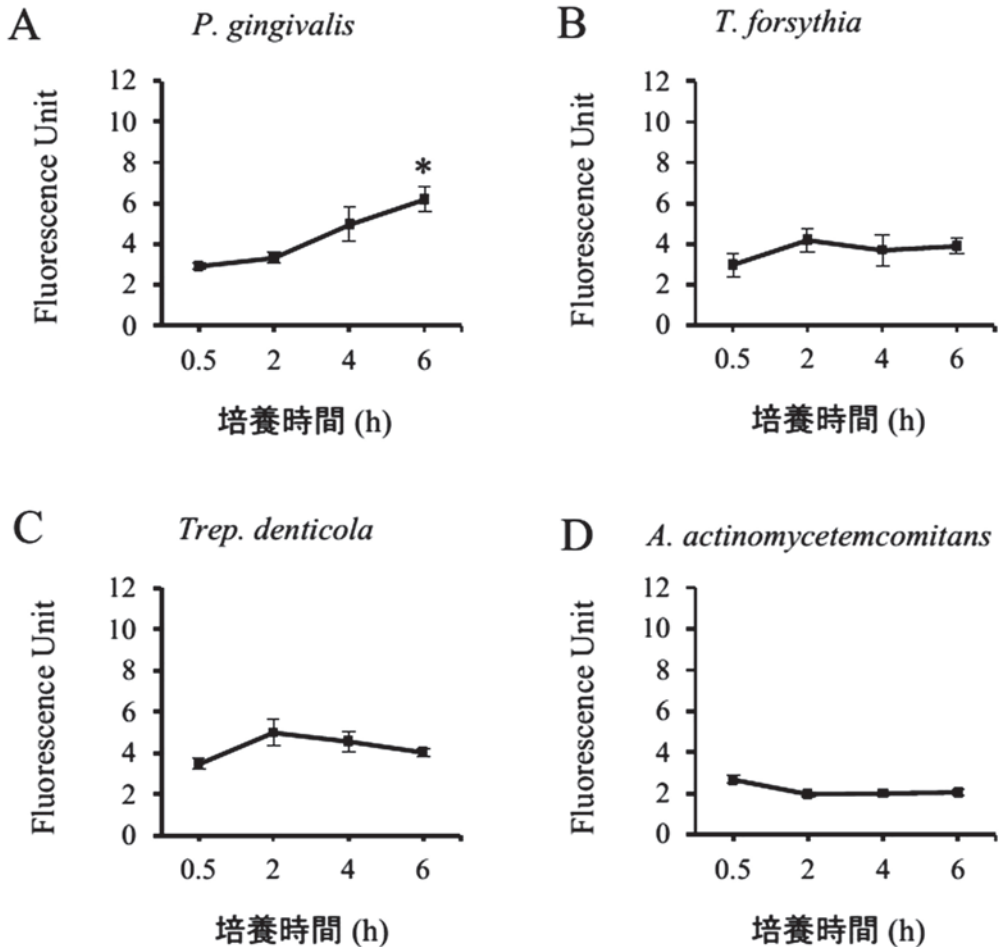


図3：歯肉上皮バリア突破経路における上皮細胞間結合の破壊

培養終了後、下部チャンバーへ移行した FITC-dextran の蛍光強度を示す。

A : *P. gingivalis*, B : *T. forsythia*, C : *Trep. denticola*, D : *A. actinomycetemcomitans* を示す (n ≥ 3) . 平均値 ± 標準誤差を図に示す. (*) は有意な差 (p < 0.05) を示す.

2. 歯周病原細菌の gingipain 活性

Paracellular ルート形成に関わる *P. gingivalis* による細胞間結合タンパクの分解は, *P. gingivalis* の保有する主要ビルレンス因子である gingipains に起因することが示唆されている¹³⁾ ことから, 今回用いた 4 菌種の Arg- gingipain 活性および Lys-gingipain 活性について検討した. その結果, *P. gingivalis* が Arg-gingipain 活性および Lys-gingipain 活性を有すること (それぞれ 394.6 および 104.8 nM/min) が確認され, *T. forsythia*, *Trep. denticola* ならびに *A.*

actinomycetemcomitans はいずれの gingipain 活性も認められないこと (いずれも 1.3 nM/min 以下) が強く示唆された (図 4) .

考 察

歯周病原細菌が歯周炎患者の病巣歯肉組織に侵入することは, 病理組織学像から歯周病原細菌の存在を示した Frank の報告³⁵⁾ により示唆されていたが, 示された病巣歯肉組織中の細菌数が予想以上に少なかったことから, 長らく議論があった. その後, 病理組織学観察^{12, 36)} に

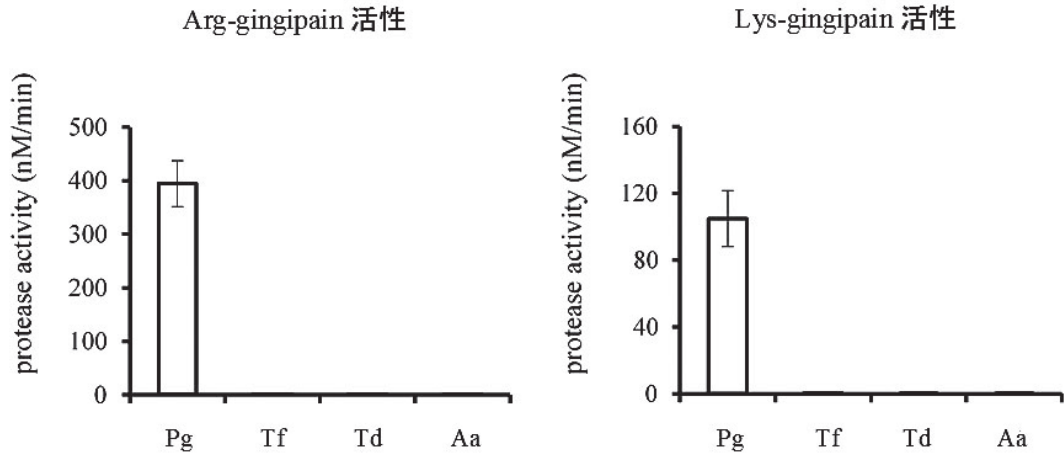


図4：歯肉上皮バリア突破に関わるプロテアーゼ活性
 蛍光ペプチド基質 A : Boc-Phe-Ser-Arg-MCA, B : Boc-Val-Leu-Lys-MCA を用いたプロテアーゼ活性の蛍光強度を示す (n= 3) . Pg : *P. gingivalis*, Tf : *T. forsythia*, Td : *Trep. denticola*, Aa : *A. actinomycetemcomitans* 平均値±標準誤差を図に示す.

加え、培養細胞を用いた研究¹³⁻¹⁷⁾から、歯肉上皮細胞内を通過する transcellular ルートを介して歯周病原細菌が組織内侵入する可能性が明らかにされた。さらに、PCR など遺伝学的手法により病巣歯肉組織中に歯周病原細菌の存在が示される¹⁰⁻¹²⁾に至って、歯周病原細菌が歯肉上皮バリアを突破して歯周炎病巣歯肉組織に侵入することが明らかとなった。しかし、Katz ら¹³⁾の示唆した paracellular ルートの組織侵入ルートの関与は依然明らかではない。*Salmonella typhimurium* の組織侵入は paracellular ルートを經由することが示唆されている³⁷⁾ことからすれば、*P. gingivalis* 以外の歯周病原細菌の歯肉上皮バリア突破機序においても関与する可能性は残されている。そこで本研究では、double-chamber culture 法を用いて、transcellular ルートおよび paracellular ルートの総和としての上皮バリア突破能を下部チャンバーへの通過菌数から、transcellular ルートの関与を上皮細胞層中の菌数から、ならびに paracellular ルートの関与を上皮細胞層の細胞間結合破壊状態から検討した。歯周病原細菌としては 'red complex species' および培養細胞内への侵入能が高いことが示されている^{14, 15)} *A.*

actinomycetemcomitans を用いた。

本研究ではまず、Ca9-22 細胞を用いた上皮細胞層に破綻のないこと、また、無血清培地の培養で上皮細胞層が維持される時間について検討した。その結果、菌液添加時点で上皮細胞層に破綻のないこと、無血清下の培養でも6時間までは上皮細胞層が維持されることが明らかとなった(図1)。

'Red complex species' および *A. actinomycetemcomitans* の上皮バリア突破能については、*Trep. denticola* を除く3菌種の歯周病原細菌で下部チャンバー内の菌数の有意の増加が観察された(図2)ことから、*P. gingivalis*, *T. forsythia* および *A. actinomycetemcomitans* は、単独で歯肉上皮細胞バリアを突破し得ることが強く示唆された。この結果は歯周炎患者病巣歯肉組織を対象にPCRにより歯周病原細菌の存在を示した藤本¹⁰⁾、遠藤¹¹⁾の成績を支持する。

しかし、上皮バリア突破経路からみれば、*P. gingivalis* では transcellular ルート(図2A)のみならず、培養6時間の時点で上皮細胞層の細胞間結合破壊が見られたことから paracellular ルートも関与することが強く示唆

された(図3A)。歯周病原細菌のgingipain活性を検討した結果、今回用いた4菌種では*P. gingivalis*のみがArg-gingipain活性およびLys-gingipain活性を有することが明らかとなり(図4)、paracellularルートに関与する細胞間結合タンパクの分解は*P. gingivalis*の保有するgingipainsによることが強く示唆された。この結果は、*P. gingivalis*のgingipainsにより細胞間結合タンパクの一つであるE-cadherinの分解がoccurり、paracellularルートが形成されるとのKatzら¹³⁾の報告を支持するもので、さらにこれらの成績から、全身感染症のリスクファクターともなる歯肉組織内への侵入/感染能という面でも*P. gingivalis*が高い病原性を有していることが示唆された。

*T. forsythia*および*A. actinomycetemcomitans*では、培養6時間時点で上皮細胞層の細胞間結合破壊が見られない(図3B, 図3D)にもかかわらず、下部チャンバー内および上皮細胞層中の菌数が有意に増加した(図2B, 図2D)。この結果から、*T. forsythia*および*A. actinomycetemcomitans*はtranscellularルートを介した経路で上皮バリアを突破することが示唆された。

しかし*Trep. denticola*では、下部チャンバー内の菌数に有意の増加は観察されず(図2C)、単独では歯肉上皮細胞バリア突破能が認められないことが示唆された。ただし、上皮細胞層中の菌数については培養2時間および培養6時間時点で有意の増加を認めた(図2C)ことから、上皮細胞内には侵入し得ることが示唆された。本菌の場合、*P. gingivalis*の上皮細胞層の細胞間結合破壊を利用して、あるいはまた、他の歯周病原細菌とともに歯肉組織内への侵入/感染を起こすのかもしれない。事実、*Trep. denticola*は*P. gingivalis*のArg-gingipain, Lys-gingipain, 赤血球凝集素HagAにより*P. gingivalis*と共凝集すること³⁸⁾、*T. forsythia*の表層タンパクであるBspAにより*T. forsythia*と共凝集すること³⁹⁾が報告されている。さらに上述したように、上皮細胞への*P. gingivalis*の

侵入が成立すると上皮細胞の機能障害が起こる可能性があり⁵⁾、その結果として、上皮細胞内に侵入した*Trep. denticola*が歯肉組織内への侵入/感染する可能性もある。

本研究の結果、歯周病原細菌により歯肉上皮バリア突破能が異なること、その歯肉上皮バリア突破経路は*T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*ではtranscellularルートのみを利用する可能性が高いが、*P. gingivalis*においてはtranscellularルートとparacellularルートの両方を利用して歯肉上皮バリアを突破する可能性が高いことから、歯周病原細菌が保有するプロテアーゼ等の病原因子により歯肉上皮バリア突破経路が異なる可能性が強く示唆された。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/バイオフィル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/バイオフィル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。

謝 辞

本研究の一部は文部科学省科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)(基盤研究C, 課題番号;15K11020, 研究代表者:木村重信)の助成を受けて行った。

利益相反

本研究において、公表すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Gary, C. A.: Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000, 34: 9-21, 2004.
- 2) Bruce, L. P., Bryan, S. M. and Newell, W. J.: Periodontal diseases. *Lancet*, 366: 1809-1820, 2005.
- 3) Domenico, R. and José, F. S. Jr.: Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J. Endod.*, 36: 1277-1288, 2010.
- 4) Kishi, M., Ohara-Nemoto, Y., Takahashi, M., Kishi, K., Kimura, S. and Yonemitsu M.: Relationship between oral status and prevalence of periodontopathic bacteria on the tongues of elderly individuals. *J. Med. Microbiol.*, 59: 1354-1359, 2010.
- 5) Kimura, S., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Sasaki, M.: Pathogenesis and treatment of periodontitis. 1st ed., Intech, Rijeka, pp3-18, 2012.
- 6) Endo, A., Watanabe, T., Ogata, N., Nozawa, T., Aikawa, C., Arakawa, S., Maruyama, F., Izumi, Y. and Nakagawa, I.: Comparative genome analysis and identification of competitive and cooperative interactions in a polymicrobial disease. *ISME J.*, 9: 629-642, 2015.
- 7) Socransky, S. S., Smith, C. and Haffajee, A. D.: Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 29: 260-268, 2002.
- 8) Newman, M. G. and Socransky, S. S.: Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J. Periodontal Res.*, 12: 120-128, 1977.
- 9) Fine, D. H., Markowitz, K., Furgang, D., Fairlie, K., Ferrandiz, J., Nasri, C., McKiernan, M. and Gunsolley, J.: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J. Clin. Microbiol.*, 45: 3859-3869, 2007.
- 10) 藤本淳：成人型歯周炎における歯周病関連細菌と臨床的パラメーターとの関連—PCR法による病変部歯肉および歯肉縁下プラークからの検出—。 *日歯周誌*, 40: 389-399, 1998.
- 11) 遠藤憲行：成人性歯周炎患者の病変部歯肉組織からの歯周病原性細菌の検出。 *日歯周誌*, 43: 33-42, 2001.
- 12) Kim, Y. C., Ko, Y., Hong, S. D., Kim, K. Y., Lee, Y. H., Chae, C. and Choi, Y.: Presence of *Porphyromonas gingivalis* and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. *Oral Dis.*, 16: 375-381, 2010.
- 13) Katz, J., Sambandam, V., Wu, J. H., Michalek, S. M. and Balkovetz, D. F.: Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect. Immun.*, 68: 1441-1449, 2000.
- 14) Nakagawa, I., Amano, A., Kuboniwa, M., Nakamura, T., Kawabata, S. and Hamada, S.: Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect. Immun.*, 70: 277-285, 2002.
- 15) Asakawa, R., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Yamada, S., Goncalves, R. B., Izumi, S., Fujiwara, T., Nakano, Y., Suzuki, N., Uchida, Y., Ouhara, K., Shiba, H., Taubman, M. A., Kurihara, H. and Sugai, M.: Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol. Microbiol.*, 50: 1125-1139, 2003.
- 16) Inagaki, S., Onishi, S., Kuramitsu, H. K. and Sharma, A.: *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "*Tannerella forsythia*". *Infect. Immun.*, 74: 5023-5028, 2006.
- 17) Amano, A., Furuta, N. and Tsuda, K.: Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oral pathogens. *Periodontol.* 2000, 52: 84-93, 2010.
- 18) Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Endocarditis. 1st ed., Intech, Rijeka, pp75-96, 2012.
- 19) Renvert, S., Pettersson, T., Ohlsson, O. and Persson, G. R.: Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome. *J. Periodontol.*, 77: 1110-1119, 2006.
- 20) Sakurai, K., Wang, D., Suzuki, J., Umeda, M., Nagasawa, T., Izumi, Y., Ishikawa, I. and Isobe, M.: High incidence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection in acute coronary syndrome. *Int. Heart J.*, 48:663-675, 2007.
- 21) Ohki, T., Itabashi, Y., Kohno, T., Yoshizawa, A., Nishikubo, S., Watanabe, S., Yamane, G. and Ishihara, K.: Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am. Heart J.*, 163: 164-167, 2012.
- 22) Kurihara, N., Inoue, Y., Iwai, T., Umeda, M., Huang, Y. and Ishikawa, I.: Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 28: 553-558, 2004.
- 23) Ziebolz, D., Pabel, S. O., Lange, K., Krohn-Grimberghe, B., Hornecker, E. and Mausberg, R. F.: Clinical periodontal and microbiologic parameters in patients with rheumatoid arthritis. *J. Periodontol.*, 82: 1424-1432, 2011.
- 24) Teeuw, W. J., Gerdes, V. E. and Loos, B. G.: Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and me-

- ta-analysis. *Diabetes Care*, 33: 421-427, 2010.
- 25) 石河太知: 分泌型白血球プロテアーゼインヒビターによる歯肉上皮細胞の *Porphyromonas gingivalis* 感染制御. 岩医大歯誌, 35: 29-41, 2010.
- 26) Sumitomo, T., Nakata, M., Higashino, M., Jin, Y., Terao, Y., Fujinaga, Y. and Kawabata, S.: Streptolysin S contributes to group A streptococcal translocation across an epithelial barrier. *J. Biol. Chem.*, 286: 2750-2761, 2011.
- 27) Sumitomo, T., Nakata, M., Higashino, M., Terao, Y. and Kawabata, S.: Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J. Biol. Chem.*, 288: 13317-13324, 2013.
- 28) Fujita, Y., Nakayama, M., Naito, M., Yamachika, E., Inoue, T., Nakayama, K., Iida, S. and Ohara, N.: Hemoglobin receptor protein from *Porphyromonas gingivalis* induces interleukin-8 production in human gingival epithelial cells through stimulation of the mitogen-activated protein kinase and NF- κ B signal transduction pathways. *Infect. Immun.*, 82: 202-211, 2014.
- 29) Birnboim, H. C. and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513-1523, 1979.
- 30) Kuboniwa, M., Amano, A., Kimura, K. R., Sekine, S., Kato, S., Yamamoto, Y., Okahashi, N., Iida, T. and Shizukuishi, S.: Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol. Immunol.*, 19: 168-176, 2004.
- 31) Saygun, I., Kubar, A., Şahin, S., Şener, K. and Slots, J.: Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 43: 352-359, 2008.
- 32) Matsui, M., Chosa, N., Shimoyama, Y., Minami, K., Kimura, S. and Kishi, M.: Effects of tongue cleaning on bacterial flora in tongue coating and dental plaque: a crossover study. *BMC Oral Health*, 14: 4, 2014.
- 33) Kadowaki, T., Yoneda, M., Okamoto, K., Maeda, K. and Yamamoto, K.: Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (Argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.*, 269: 21371-21378, 1994.
- 34) Nemoto, T. K., Ohara-Nemoto, Y., Bezerra, G. A., Shimoyama, Y. and Kimura, S.: A *Porphyromonas gingivalis* periplasmic novel exopeptidase, acylpeptidyl oligopeptidase, releases N-acylated di- and tripeptides from oligopeptides. *J. Biol. Chem.*, 291: 5913-5923, 2016.
- 35) Frank, R. M.: Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 15: 563-573, 1980.
- 36) Saglie, F. R., Smith, C. T., Newman, M. G., Carranza, F. A. Jr., Pertuiset, J. H., Cheng, L., Auil, E. and Nisengard, R. J.: The presence of bacteria in the oral epithelium in periodontal disease. II. Immunohistochemical identification of bacteria. *J. Periodontol.*, 57: 492-500, 1986.
- 37) McCormick, B. A., Colgan, S. P., Delp-Archer, C., Miller, S. I. and Madara, J. L.: *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J. Cell. Biol.*, 123: 895-907, 1993.
- 38) Ito, R., Ishihara, K., Shoji, M., Nakayama, K. and Okuda, K.: Hemagglutinin/adhesin domains of *Porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *Treponema denticola*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 60: 251-260, 2010.
- 39) Ikegami, A., Honma, K., Sharma, A. and Kuramitsu, H. W.: Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect. Immun.*, 72: 4619-4627, 2004.

Invasive ability of periodontopathic bacteria across gingival epithelial barrier

Shinpei TAKAHASHI¹⁾, Yu SHIMOYAMA²⁾, Taichi ISHIKAWA²⁾, Daisuke SASAKI¹⁾,
Shigenobu KIMURA³⁾, Takashi YAEGASHI¹⁾

¹⁾ Division of Periodontology, Department of Conservative Dentistry, School of dentistry, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Takashi YAEGASHI)

²⁾ Division of Molecular Microbiology, Department of Microbiology, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Minoru SASAKI)

³⁾ Department of Dental Hygiene, Kansai Women's College
(Chief: Prof. Shigenobu KIMURA)

[Received : December 12, 2016 : Accepted : December 29, 2016]

Abstract : It was demonstrated that periodontopathic bacteria including 'red complex species' could invade into the apical gingiva of periodontitis patients. The precise mechanism, however, remains to be elucidated. We assessed here the invasion mechanism of periodontal pathogens across the gingival epithelial barrier through two putative routes (transcellular and paracellular routes) . After preculture of a gingival epithelial cell line (Ca9-22) on a filter insert of the double-chamber culture system, the suspensions of the laboratory strains of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) , *Tannerella forsythia* (Tf) , *Treponema denticola* (Td) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) were added to the upper chamber on the layered cells. At appropriate times of incubation, the translocated bacteria into the lower chamber were quantified by real-time PCR (q-PCR) . Then, the disruption of cell-cell junctions in Ca9-22 was examined by the translocation of FITC-dextran. The bacteria which had invaded and persisted within Ca9-22 were also assessed by q-PCR. The results indicated that Pg invaded significantly at 6 hours of incubation through both transcellular and paracellular routes. Tf and Aa could also possess the invasive ability, although they utilized only the transcellular route. Consequently, many periodontal pathogens can invade significantly across the gingival epithelial barrier, whereas the translocation route may differ between the organisms.

Key words : periodontopathic bacteria, bacterial invasion, gingival epithelial barrier