

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

岩瀬 智彦

論文題目

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* を用いた  
マウス誤嚥性肺炎モデルによる病原性の検討：線毛  
遺伝子型の異なる菌株での比較

**緒言**

慢性歯周炎は口腔細菌の混合感染により引き起こされる慢性炎症性疾患であり、近年、全身性疾患との関連も指摘されている。歯周組織の炎症は口腔常在菌のバランス失調により起こると考えられているが、特に *Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、*Treponema denticola* などの細菌が歯周病原細菌として注目されている。*P. gingivalis* は宿主の自然免疫を錯乱させ、ディスバイオーシスを引き起こすキーストーン病原体と見なされている。本菌はジンジパイン、リポ多糖 (LPS)、線毛などの病原因子を保有しており、過去の研究では肺炎の原因菌としても関与していることが報告されている。高齢者において、歯周ポケットを有する歯数の増加と誤嚥性肺炎による死亡率との関連が報告されているが、*P. gingivalis* が誤嚥性肺炎を引き起こすメカニズムについてはまだ解明されていない。これまでの症例報告や動物モデルは、*P. gingivalis* が誤嚥性肺炎の発症、増悪化に関与する可能性を示唆しているが、詳細な病原因子は不明である。

*P. gingivalis* は FimA 線毛と Mfa1 線毛の 2 つの線毛を持つことが知られており、主要成分を構成する FimA あるいは Mfa1 タンパク質をコードする遺伝子には多様性が認められる。*fimA* 遺伝子には I ~ V の 5 つの型があり、II および IV 型が歯周病患者から高頻度に分離され、I 型は健常者や軽度の歯周病患者に多く見られることが明らかにされている。しかし、*fimA* 型と

歯周炎の症状との関連性については一致しない報告も存在し、本菌の病原性の評価には *fimA* 型分類のみでは不十分であることが指摘されている。*mfal* 遺伝子についても、その多様性が報告されており、最近の研究では 84 株の *P. gingivalis* 株において *mfal*<sup>53</sup>、*mfal*<sup>70A</sup>、*mfal*<sup>70B</sup> の 3 つの *mfal* 遺伝子型が確認された。これらの遺伝子型は Mfal タンパク質の抗原性に違いがあり、*P. gingivalis* の病原性と関連している可能性が考えられている。本研究では、異なる遺伝子型を有する 2 つの *P. gingivalis* 株を使用し、新しいマウス誤嚥性肺炎モデルを確立し、両菌株の病原性を比較することを試みた。

## 対象及び方法

### 1) 菌種および培養条件

*P. gingivalis* は ATCC 33277 株 (*fimA* I 型、*mfal*<sup>70A</sup> 型)、1439 株 (*fimA* II 型、*mfal*<sup>70B</sup> 型)、および JI-1 株 (ATCC 33277 株由来 *fimA* 欠損株) を使用した。5% ヒツジ血液、ヘミン (2.5 µg/mL)、メナジオン (5.0 µg/mL) を添加したブルセラ HK 寒天培地を用いて、37°C にて嫌気培養した (10% [vol/vol] CO<sub>2</sub>, 10% [vol/vol] H<sub>2</sub>, and 80% [vol/vol] N<sub>2</sub>)。GAM 液体培地を用いて 37°C で 48 時間嫌気培養したものを実験に使用した。

### 2) 実験動物

実験動物は雌性 C57BL/6J マウスを用いた。すべてのマウスは、特定病原体を含まない条件で飼育され、8 週齢から 12 週齢の間に使用した。

### 3) 実験動物のデザイン

誤嚥性肺炎を誘発するため、三種混合麻酔をマウスの腹腔内に投与した。頭部を後屈させ、下顎をピンセットで挙上させた後、経気道挿管を行い、気管内に細菌懸濁液を投与した。コントロール群にはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を気管内に投与した。その後、1 週間の観察期間でマウスの生存率を評価した。また、感染後 24 時間でマウスを屠殺し、血液と肺を採取した。

### 4) 感染後生存率

コントロール群 (n=6)、ATCC 33277 株群 (n=30) および 1439 株群 (n=32) にて 1 週間飼育し、マウスの生存時間の分布を Kaplan-Meier 法により評価した。

### 5) 肺の細菌数

回収した肺をホモジナイズし、得られた組織液を PBS により段階的に希釈し、血液寒天培地に播種をして肺組織 1 g あたりの CFU を測定した。

## 6) 肺と血清の炎症性サイトカインの測定

回収した肺に 50  $\mu$ l の PBS を注入し、溢出した液を Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) とした。血液は遠心分離により血清と血球とに分離し、血清を保存した。BALF と血清に含まれる炎症性サイトカイン量 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6) を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて解析した。

## 7) 組織学的解析

回収した肺をホルマリン固定後、パラフィン包埋を行った後、連続組織切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、顕微鏡を用いて観察を行った。また、上記の得られた組織切片を使用し、実質と間質の比率による含気率を計測した。

## 8) Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

*P. gingivais* ATCC 33277 株、JI-1 株、および 1439 株の全菌体抽出液の SDS-PAGE を行った。

## 9) 統計学的分析

一元配置分散分析 (ANOVA) により P 値が < 0.05 の場合に統計学的に有意

であるとした。

## 結果

### 1) 生存率

コントロール群においては規定日数ではすべての個体が生存していた。一方、ATCC 33277 株群および 1439 株群では感染 1 日後から死亡する個体が認められた。1439 株群の生存率は ATCC 33277 群と比較して低かった。

### 2) 肺組織における *P. gingivalis* の菌数

1439 株群の感染マウスの肺組織 1 g あたりの CFU は、33277 株群と比較して有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

### 3) 肺組織におけるサイトカイン産生解析

*P. gingivalis* 感染群では、BALF における TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、および IL-6 に上昇が認められた。コントロール群ではこれらのサイトカインはほとんど検出されなかったが、TNF- $\alpha$  の産生量は、1439 群では、ATCC 33277 群に比べて有意に増加した ( $p < 0.05$ )。

血清ではどの群においても炎症性サイトカインの産生量は検出限界以下であった。

#### 4) 肺組織における病理組織学的所見

コントロール群では間質の肥厚、出血、炎症性細胞の浸潤などの炎症所見は認められなかったが、1439株群およびATCC 33277株群では、それらの炎症所見が認められた。

#### 5) 肺組織における含気率の計測

コントロール群と比較して1439株およびATCC 33277株群では含気率が有意に低下した。

#### 6) SDS-PAGEによるFimAタンパク質発現の解析

ATCC 33277株において明瞭に検出され、JI-1株において欠損している43-kDa FimAバンドは、1439株では検出されなかった。

### 考察

本研究では、異なる *mfal* 型の線毛を持つ *P. gingivalis* 株 (ATCC 33277株および1439株) を用い、口腔から経気道的に肺に感染する新しいマウス誤嚥性肺炎モデルを開発した。

*P. gingivalis* は病原因子を発現し、これらが宿主細胞を活性化して歯周炎や誤嚥性肺炎の病巣形成に寄与している。感染24時間後、特に1439株はATCC 33277株よりも好気性環境への適応能力が高く、感染に有利な素養

があることが示唆された。また、1439 株感染群ではより強い炎症の誘発があり、感染マウスの生存率が低下していることが示唆された。さらに 1439 株感染群では、炎症性サイトカインの上昇を認め、特に TNF- $\alpha$  の産生が有意に増加した。血清中のサイトカインの産生がほとんど認められないことから、感染初期では免疫応答は局所的であり、全身的な炎症反応は起こっていない可能性が示唆された。

*P. gingivalis* の FimA および Mfa1 線毛は TLR2 を介して宿主細胞に認識され、TLR2 が自然免疫活性化に影響を与える可能性がある。1439 株は、遺伝子上は *fimA* を持つが、実際は FimA タンパク質は発現していない可能性が示されたため、今回の実験では FimA 線毛の影響は考慮する必要はないと考えられる。

今回、モデルの確立に時間を要したこと、また感染による炎症の程度を確認するために、肺感染開始後 24 時間（感染初期）の検証を行ったが、長期的な効果は明らかとなっていないため、より長期の感染モデルを用いてさらに解析する必要がある。

## 結論

本研究では、口腔から経気道的に肺に感染する新しい誤嚥性肺炎モデルを開発した。本動物モデルを使用することにより、*P. gingivlis* 感染群において炎症が亢進しており、*mfa1*<sup>70B</sup>型を持つ 1439 株の方がより病原性が高



いことが示唆された。しかし、ATCC 33277 株と 1439 株の違いについては *mfa1* の配列が異なること、抗原性が異なること以外は不明である。今後は、1439 株のジンジパイン活性等を調べ遺伝子型と病原因子との関連を調査していく必要がある。