

厚生省科学研究費補助金
総括報告書

「高齢者の口腔衛生とQOLに関する研究」

1996年4月から1999年3月まで

主任研究者	奥田 克爾
分担研究者	安孫子宜光
	石川 烈
	岡田 宏
	古賀敏比古
	村山 洋二
	野口 俊英

1. 歯周病原菌の分子生物学的解析	1
1) <i>Porphyromonas gingivalis</i>	1
2) <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	7
3) <i>Campylobacter rectus</i>	10
4) <i>Treponema denticola</i>	18
2. 歯周病と全身疾患	23
1) 糖尿病への関わり	23
2) 肥満への関わり	32
3. 歯周病の免疫応答の特徴	51

1. 歯周病原菌の分子生物学解析

1) *Porphyromonas gingivalis*

歯周病の病態の発現や進行には、歯周病病原菌による直接的な宿主歯周組織の破壊、原因菌成分による宿主歯周組織の代謝異常の誘因、それと共に起こる免疫応答を含む宿主側の様々な応答が大きな要因を占めることが示唆されている。したがって、歯周病を予防するためには、一般的な感染症と同様に感染の第一ステップである原因菌の口腔内定着を阻止することが有効な手段ではないかと考えられる。

それでは、*Porphyromonas gingivalis*の口腔内定着は、どのような分子によって行われているのか？ これまでも多く議論されてきた問題である。口腔内定着に働く分子として、*P. gingivalis*の線毛、アドヘジン、共凝集因子、リポ多糖など名乗りをあげた分子は多い。中でも、*P. gingivalis*は強い赤血球凝集活性をもつことが注目されており、この赤血球凝集活性を担う分子、ヘマグルチニンが口腔内定着に関わる分子の一つであると示唆されてきた。

① *P. gingivalis*のヘマグルチニンとはどのような分子なのだろうか？

Okudaら¹⁾は、赤血球凝集活性を指標に培養上清中から関連分子を精製している。また、Moutonら²⁾は、赤血球凝集活性に関わる分子として赤血球膜付着因子に焦点を合わせ、HA-Ag2を同定している。これらの分子に対する抗体は、*P. gingivalis*の赤血球凝集活性を抑制したが、試料を菌体あるいはベジクルとしたImmuno-blotting実験では、これら単離した分子と同一サイズの分子のみを認識するのではなく、多くのタンパク質バンドを認識するという抗体であった。これらの抑制抗体が試料中の43, 49 kDaバンドを特に強く認識す

ることから、*P. gingivalis*のヘマグルチニンは、43, 49 kDaのタンパク質に関連した分子であろうと推定されていた。しかし、その後、Foxのグループは、赤血球凝集活性を担う分子として、約280 kDaのHagAの遺伝子クローニングに成功している。これらのことから、赤血球凝集に関わる分子ヘマグルチニンは巨大な分子で、精製段階で分解されるのではないかと、あるいは、広範囲な分子サイズをしめす多くの関連分子が存在するのではないかと推論されていた。筆者らの研究室で作製した赤血球凝集を抑制するモノクローナル抗体も、43, 49 kDaタンパク質バンドを強く認識し、さらにそれ以外にも複数のタンパク質バンドを認識した³⁾。

②赤血球凝集活性をもつプロテアーゼ

*P. gingivalis*の産生する種々のプロテアーゼ（コラゲナーゼ、グリシルプロリルエンドペプチダーゼおよびトリプシン様活性を示すシステインプロテアーゼが挙げられる）は、宿主生体のもつ正常なマトリックス代謝に影響を及ぼすと共に、歯周組織成分の直接的な破壊因子になること、また、補体成分や免疫グロブリン分子を分解することが報告されており、宿主の生体防御系にも影響を及ぼす可能性も示されている。したがって、これらのプロテアーゼが*P. gingivalis*のもつ病原性に深く関わっていることが示唆されている(表1)。

システインプロテアーゼは、分子中のアルギニン(Arg)やリジン(Lys)を認識してそのC-末端側で切断するプロテアーゼであり、それぞれ、Arg-gingipain (RGP)、Lys-gingipain (KGP)と呼ばれている。システインプロテアーゼについて精力的に研究を進めているYamamotoグループは、RGPとKGPはそれぞれ互いの活性化に関わることを示し、RGPは主に直接的な宿主組織の破壊酵素であり、KGPは菌自身の増殖に関わる酵素であることを示唆している。興味深いことに、これらのプロテアーゼを欠損させた変異株ではプロテアーゼ活性の減少と共に赤血球凝集活性が欠失するという結果を示した。これらの結果は、プロテアーゼが本菌の赤血球凝集活性と深く関連することを示唆するものであった⁴⁾。ではプロテアーゼ活性と赤血球凝集活性とはいったいどのように関連するのであろうか。この疑問は、分子生物学的手法の進展と共にやがて明かとなった。すなわち、これらのシステインプロテアーゼ等を含む、*P. gingivalis*菌体成分の遺伝子クローニングの結果、赤血球凝集活性と深い関連が見られるプロテアーゼは、同一遺伝子に由来する酵素ドメインと、それに付属した赤血球膜付着に関わるドメインとで構成されていたのである。

③ヘマグルチニン部位をもつ分子は一分子ではない。

図1に現在報告されているシステインプロテアーゼおよびヘマグルチニンを6群に分類し表記した。第I~III群のプロテアーゼのヘマグルチニン部を比較した結果、抑制抗体が認識する部位（筆者らのクローニングした抑制抗体認識分子から決定した部位で赤血球膜に結合する部位と推定）は、赤血球凝集活性を併せ持つ*P. gingivalis*のプロテアーゼに共通して存在していた³⁾。この抗体認識部位が1菌体中の複数分子に1~2カ所存在することは、抑制抗体が複数のタンパク質バンドを認識することの原因と思われる。また、これらの分子群は、ヘモグロビンを結合する部位“HGP15”を内在している。実際に、KGPを欠損した*P. gingivalis*では、ヘモグロビン獲得とそれに続くヘミンの含量が減少することが報告されている⁵⁾。この事実は、*P. gingivalis*のヘマグルチニン部位をもつ分子は、ヘモグロビン獲得に深く関わる分子である可能性が推察される。*P. gingivalis*はその増殖や病原性に強いヘミン要求性を示す細菌であり、*P. gingivalis*のヘマグルチニン部の機能は、口腔内組織細胞への付着以外に、“ヘミン獲得のための赤血球を標的とした付着”なのではないかと考えられる(図2)。しかし、特にシステインプロテアーゼにヘマグルチニンドメインの必要な意味や、このプロテアーゼの真の標的分子は何かなど不明なことは多い。

では、なぜこれほどまでに、*P. gingivalis*は、赤血球凝集ドメインを複数持ち得たのであろうか。興味深い結果として、筆者らが報告したヘマグルチニンドメインの下流に、第2のORFとしてIS1126に相同性の高い遺伝子が存在している事実があげられる(図3)。このISの存在は、W83の*tla*遺伝子の赤血球凝集ドメインの下流に存在することも報告されている。今までにGenBank等に報告されている赤血球凝集ドメインを持つ分子の遺伝子の下流は十分な長さで報告されていないが、IS1126と近い配列部分が存在しているものもある。このことは、*P. gingivalis*のヘマグルチニン部位は、ISに近接して存在している可能性を示唆しており、*P. gingivalis*のヘマグルチニン部位は、*P. gingivalis*がより良い生存状態を維持するために、必須な分子として複数獲得された機能分子ドメインではないかと推測される。*P. gingivalis*の赤血球凝集関連分子は、ヘモグロビンあるいはヘミン獲得に関わる分子群に、赤血球膜への付着に関わる機能ドメインとして存在する可能性が考えられる。

*P. gingivalis*の口腔内定着は、どのような機構で行われているのか？口腔内定着に働く分子として挙げられた分子の機能的役割を考慮したとき、定着・付着が第一義的の目的というよりも、それぞれの分子の機能発現のために必

要な過程として強い付着性が出現したのではないだろうか。ともあれ、*P. gingivalis*の赤血球凝集活性を抑制することによって本菌の口腔内定着・増殖を阻止することができるならば、歯周病予防の一つの手段として期待は大きい。

- 1) Okuda K, Yamamoto A, Naito Y, Takazoe I, Slots J, Genco RJ: Purification and properties of hemagglutinin from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.*, 54: 659-665, 1986.
- 2) Mouton C, Bouchard D, Deslauriers M, Lamonde L: Immunochemical identification and preliminary characterization of a nonfimbrial hemagglutinating adhesin of *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.*, 57: 566-573, 1989.
- 3) Shibata Y, Hayakawa M, Takiguchi H, Shiroza T, Abiko Y: Determination and characterization of the hemagglutinin-associated short motifs found in *Porphyromonas gingivalis* multiple gene products. *J. Biol. Chem.*, 274: 5012-5020, 1999.
- 4) Yoneda M, Kuramitsu HK: Genetic evidence for the relationship of *Porphyromonas gingivalis* cysteine protease and hemagglutinin activities. *Oral Microbiol. Immunol.*, 11:129-134, 1996.
- 5) Okamoto K, Nakayama K, Kadowaki T, Abe N, Ratnayake DB, Yamamoto K: Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.*, 273: 21225-21231, 1998.

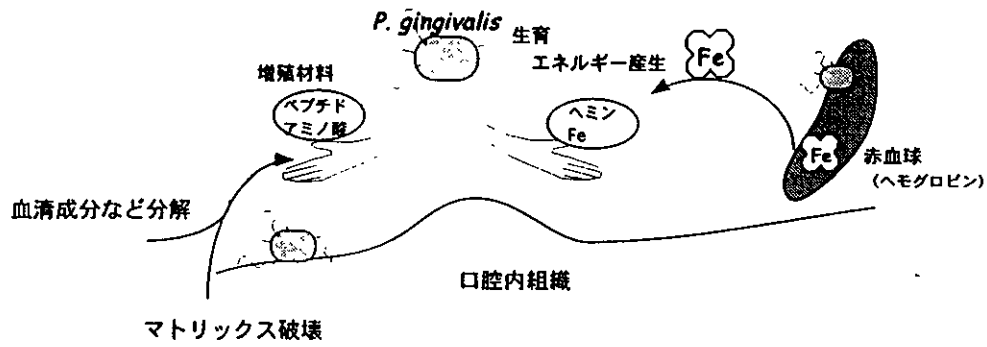


図2. *P. gingivalis* の生育に関わるヘマグルチニンおよびプロテアーゼ (推測)

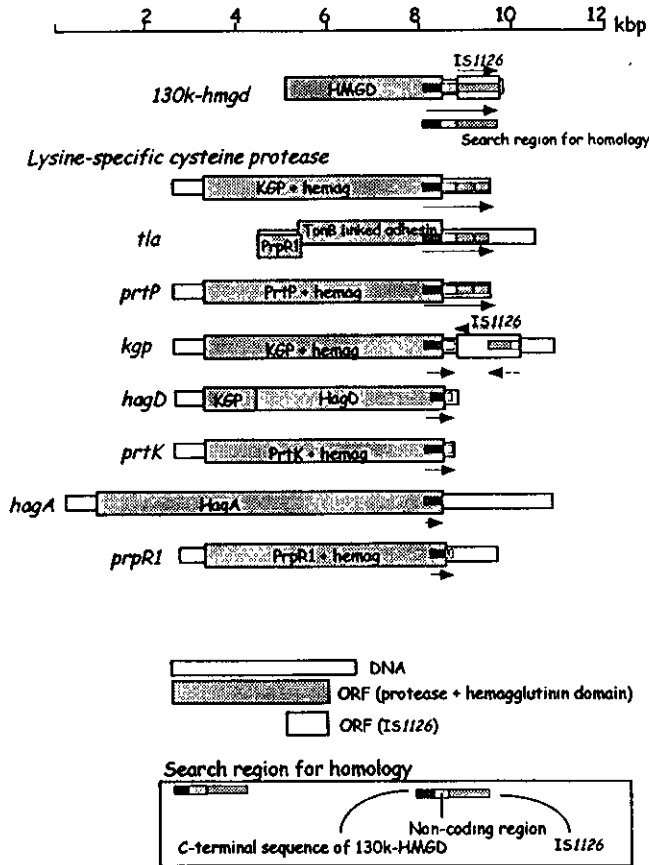


図3. プロテアーゼ類の遺伝子下流の比較

130k-hmgd⁹⁾は、筆者らによりクローニングされたヘマグルチニンドメイン分子

プロテアーゼ	感染菌 (<i>P. gingivalis</i>)	宿主 (ヒト)
トリプシン様プロテアーゼ (システインプロテアーゼ) ヘマグルチニン関連プロテアーゼ ヘマグルチニン非関連プロテアーゼ	口腔内定着 赤血球膜付着 赤血球凝集 溶血 → ヘミン (Fe) 獲得 エネルギー産生 システムに関与?	<ul style="list-style-type: none"> ・感染 ・炎症 ・口腔内組織の損傷 ・マトリックス代謝への影響 ・免疫システムに影響
コラゲナーゼ	コラーゲン分解 フィブロネクチン分解 ↓ ジペプチド、 アミノ酸までの分解 → 増殖材料の獲得	
グリシルプロリルエンドペプチダーゼ	IgGの分解 補体成分の分解 血清タンパク質分解産物の分解 → 宿主の防御機 能からの回避	

表1. *P. gingivalis*のもつプロテアーゼ類の機能と宿主に及ぼす影響

これらのプロテアーゼは*P. gingivalis*が口腔内で生育していくために重要な働きをしている

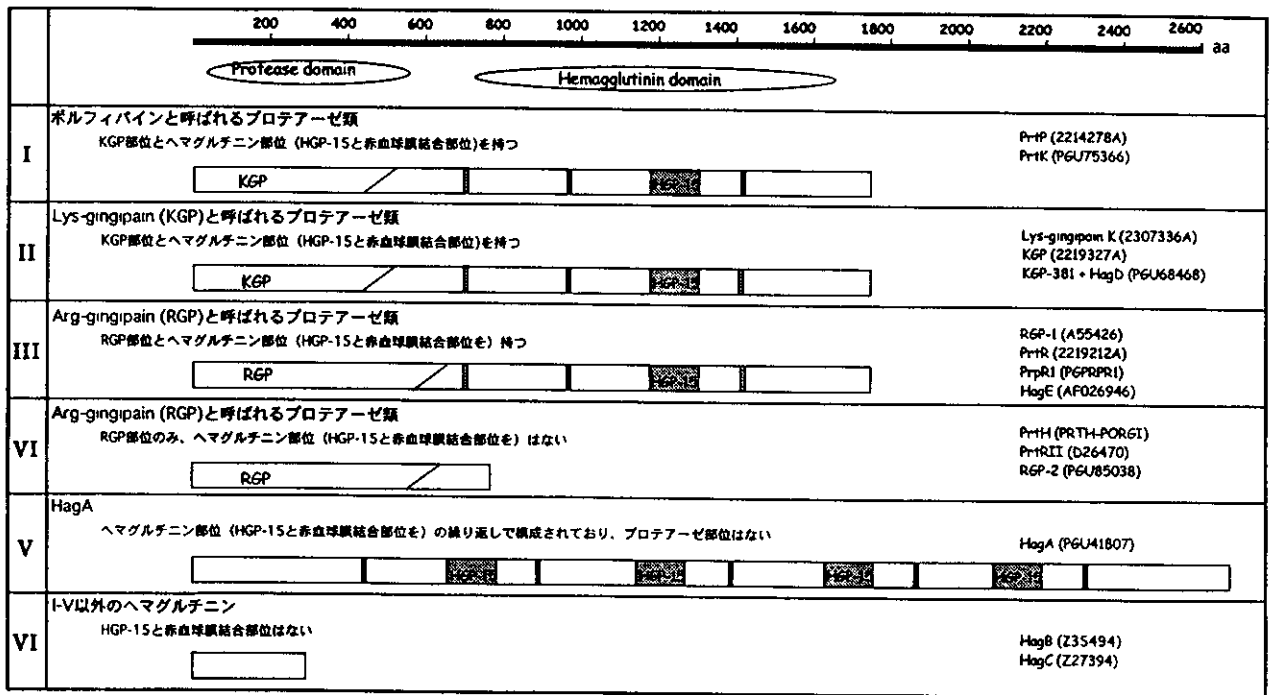


図1. *P. gingivalis*ヘマグルチニンに関連した分子群

- ▬ : 赤血球膜結合アミノ酸配列部位
- ▬ : 赤血球膜結合配列と似たアミノ酸配列の部位
- : ヘモグロビン結合部位 (HGP-15)

2) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Actinobacillus actinomycetemcomitans の分類

Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aa)は非運動性のグラム陰性通性嫌気性小型球桿菌 ($0.5 \times 1 \mu\text{m}$) であり、最新のBergey's manual of determinative bacteriology (第9版) では文字通り*Actinobacillus*属に分類されている。この属名は、菌体の形状が桿菌 (bacillus) であり、選択培地上のコロニーの内部に放射状 (actin) に広がる星形がしばしば認められることに由来している。また、この長たらしい種の名前は、同細菌が放線菌症 (actinomycosis) に付随して (comitans) 頻繁に分離されたことに因んで付けられた。しかし、*Actinobacillus*属を始めとして*Pasteurella*属や*Haemophilus*属などが分類されている*Pasteurellacea*科の古典的な分類は、現在大きく混乱している。Aaについても、同細菌が二酸化炭素によって発育の促進が認められるなど、他の*Actinobacillus*属の菌種よりもむしろ*Haemophilus aphrophilus*や*Haemophilus paraphrophilus*などに類似することから、Pottsらによって*Haemophilus*属に分類することが提案された。このため、Aaを*Haemophilus actinomycetemcomitans* として記載した論文が多数報告された時期があった。ところが、*Haemophilus*属の代表菌株である*Haemophilus influenzae*がヘミンとNADを生育に必要とするのに対して、Aaにはこのような*Haemophilus*属に典型的とされる栄養要求性が認められないことを理由に、この提案は結局受け入れられなかった。現在では、Aaは再び*Actinobacillus*属に分類されているが、最近では、DNA-DNA ハイブリダイゼーションや16S rRNAの塩基配列などの比較結果から、本細菌を*Actinobacillus*属や*Haemophilus*属とは異なる新たな属として捉えるべきとの考え方が主流になりつつある。

また、Aaは菌体表層多糖の抗原性の違いにより、さらにa-e型の5つの血清型に分類される。ある種の脱水素酵素活性の電気泳動パターンの解析結果から、これらの血清型はa、d、e型とb、c型の2つの系統に大別されることが示されており、将来Aaがこれらの系統に分割され、それぞれが新たな種として分類される可能性もある。

Aa と歯周病との関連性

Aaは、1912年にKlingerによって、*Bacterium actinomycetemcomitans* の名で放線菌症の病巣から初めて分離されたが、分離当初は主たる病原性細菌としては捉えられていなかった。しかし、1951年にペニシリン投与によって*A. actinomyces israelii*が排除された放線菌症の病巣からAaが純粋培養されたことから、単独でも病原性を示すと考えられるようになった。その後、心内膜炎、軟組織膿瘍、骨髄炎などの病巣から続々と本細菌が分離されて、全身の様々な組織に感染症を引き起こす可能性が示唆されたが、Aaと歯周病

との関連性が取り沙汰されるようになるのは1970年代後半からである。

Aaと歯周病の関連性を最初に示したのは、1975年のIrvingらによるラットを用いた動物実験の結果である。この実験では、限局型若年性歯周炎(LJP)の患者から分離されたグラム陰性桿菌をgnotobioticラットに感染させたところ、グラム陽性菌による歯周組織の炎症とは異なり、炎症反応が低いにもかかわらず、歯槽骨の吸収を始めとした広範囲の歯周組織の破壊が生じた。後に、このグラム陰性桿菌がAaであることが明らかにされているが、このIrvingらの報告後、LJPの患者の病巣から極めて高頻度でAaを検出した臨床研究が次々と報告されている。LJPは家族性に伝播することが知られており、Aaの感染やAaに対する血清の反応性も、この家族性の伝播と辻褃のあう結果が得られている。治療によってAaの感染数が減少したLJPの症例では臨床的に良好な結果が得られるが、Aaの感染数を減少できない場合には治癒に至らないとの報告もあり、LJPの治療に際しAaの感染レベルの変化を把握することは、治療の予後を知るうえで有用な指標の1つと考えられている。

また、LJPの患者の血清、唾液、歯肉溝液中には、健常者や成人性歯周疾患の患者と比較して、Aaの全菌体や菌体成分に対する抗体価が有意に高いことが明らかにされており、このこともAaをLJPの原因菌とする重要な根拠となっている。培養検査で本細菌が検出されなかったLJPの患者でも、Aaに対する特異的な抗体価が上昇している症例も報告されている。また、Aaの感染レベルと歯周組織の臨床症状を経時的に観察した研究では、臨床的に歯周組織の顕著な破壊が認められる半年以上も前に、Aaの感染レベルが培養可能な全細菌数の30-70%を占めるまでに増加したLJPの症例が報告されている。これらの症例では、その後LJPの臨床症状を呈する頃には、Aaの感染レベルが1%以下に自然に低下していた。このように、Aaの感染レベルは必ずしも臨床症状と合致するわけではない。Aaの感染とLJPの関係を正確に把握するためには、細菌の検出だけに頼るのではなく、血清学的な診断も併せて行うことが大切である。我々の研究室ではBIAcoreのセンサーチップにAaの血清型特異多糖を固定化して、100 µl程度の微量の血清を用いるだけで、Aaの各血清型特異抗原に対する抗体価を迅速に測定できるシステムを開発しており、LJPの診断に威力を発揮することが期待される。

しかしその一方で、LJPの患者に限らず、健常者や成人性歯周炎の患者にもAaが検出されるとの報告も少なからず見られる。これらの報告においてAaが検出される頻度は、LJPの場合に比べるとかなり低いですが、ベトナムの小児を調べた研究では、健常者の実に78%にAaが検出されている。AaをLJPの原因菌とする説に一見矛盾する事実であるが、Aaの各種の病原因子の発現レベルは各菌株でその程度が大きく異なることが知られている。また、血清型ではb型のAaがLJPの患者に高い頻度で検出されるのに対し、成人の歯周炎患者にはa型のAaが検出されることが多く、またc型のAaは健常者に検出されることが多いと言われている。Aaを歯周病原性細菌として正確に評価するためには、単にAaの存在を調べるだけでなく、検出されたAaの病原性を含めて歯周病との関連性を考える必要があ

る。

Aaの病原性因子

Aaの感染の第一段階は口腔内への定着である。この定着にはAaの口腔組織への付着能が重要であり、菌体表層のタンパク質成分、微小胞、線毛が上皮細胞や歯面とAaの付着に関与することが明らかにされている。また、Aaがフィブロネクチン、ラミニン、タイプIVコラーゲンに付着能を持つことも明らかにされているが、どのような菌体成分がこの付着能に関与しているのかは不明である。

AaがLJPの患者の歯周組織に侵入していることが、臨床研究によって明らかにされている。in vitroでの研究でも、Aaが上皮細胞に侵入することが確認されているが、このような能力を発揮するAaはごく限られた菌株である。Aaが組織や上皮へ侵入する機構は不明であるが、このような侵入能が歯周ポケット内の機械的な清掃だけではLJPが完治しがたい理由の一つなのかもしれない。

歯肉溝内には、組織液と共に多形核白血球（PMNs）や単球などの食細胞が滲出しており、Aaが病原性を発揮するためには、このような食細胞の攻撃をかいくぐる必要がある。さらにAaが歯周組織に侵入した際には、この攻撃はより強くなることは想像に難くない。PMNsは細菌への走化性を示すが、Aaの培養上清にはこの走化性を抑制する低分子成分が存在することが明らかとなっている。また、トランスポゾンによる形質転換によってb型の莢膜様多糖抗原を欠いたAaの変異株がPMNsによって貪食され易くなることから、本多糖抗原が宿主の防御機構に対する抵抗因子として働いていると考えられる。分子量116 kDaの塩基性タンパク質であるロイコトキシンは、Aaの病原因子の中でも最も注目されている。ロイコトキシンは、好中球、単球およびある種のリンパ球の細胞膜に穴をあけ、浸透圧によってこれらの白血球細胞に傷害を及ぼす。Aaの菌株によっては、ロイコトキシンを高産生する株と、ほとんど産生しない株が見られる。このようなロイコトキシン産生能の差は、*ltxA*遺伝子のプロモータ構造の違いによるmRNAの転写レベルの差に由来しているが、このプロモータ構造の違いは、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法によって増幅される遺伝子のサイズを比較することで、簡単に識別できることが知られている。

これらの病原性因子以外にも、Fc-結合タンパク質、免疫抑制因子、コラーゲナーゼ、フォスファターゼなど様々な因子がAaの病原性遺伝子として挙げられている。最近では、cytolethal distending toxinと呼ばれる細胞毒性因子の遺伝子がクローニングされAaの新たな病原性の側面が解明されようとしている。しかし、これらの病原性因子が歯周病の発症にどのように関わっているのかについては不明な点も多く、今後の研究課題である。

③ *Campylobacter rectus*

細菌学的特徴

The Forsyth Institute (旧 Forsyth Dental Center)の Tanner らは、進行した破壊性歯周病病巣から牛の前胃に生息する嫌気性細菌 *Vibrio succinogenes* に細菌学的性状が類似するグラム陰性糖非発酵性の運動性桿菌を分離・同定した。この運動性桿菌は、通常の同定試験では他の細菌群と区別するのが難しいとされていたが、*V. succinogenes* の発見者である Wolin の名前にちなんで新しい *Wolinella* 属が提唱され、*Wolinella recta* と命名された¹⁾。その後 *W. recta* は微好気条件でも発育すること等の生化学的性状や細菌リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)塩基配列に基づく系統分類により *Campylobacter* 属への移行が提案され *Campylobacter rectus* として再分類された。

C. rectus は $0.5 \times 2 \sim 4 \mu\text{m}$ の大きさで端が丸まったまっすぐなグラム陰性小桿菌である。菌体の一端に 1 本の極鞭毛を有し、活発な運動性を示す (図 1. 電顕写真)。
血液寒天平板上では、直径 1mm から、培地表面に食い込んだり周囲に広がった 5mm 程度の中高で灰白色の透明な集落 (コロニー) を形成して発育する。嫌気性であるが、なかには 5%酸素の存在下でも生育できる株もある。10%二酸化炭素を満たした空気中では全く生育できない。グルコース等の糖は発酵しない。ギ酸塩やフマル酸塩により増殖は促進され、アミノ酸あるいは TCA サイクルの中間代謝産物からエネルギーを獲得している。この菌の形態上の大きな特徴は、外膜の外層に約 17nm の六角形の規則的配列を示す特殊な表層構造(S-layer)が存在することである (図 2. 電顕写真)。

歯周病原性

口腔内 *Campylobacter* 属菌種の中で、*C. rectus* は歯周病患者の病巣歯肉縁下プラークから、特に活動期の病巣部プラークから高頻度 (文献によると 80%との報告) に分離されること、また歯周病患者は健常人に比べて *C. rectus* に対して高い血清抗体価を有していること、さらに本菌が歯周病原因子を有していること等から、歯周病の発症と進行に関わる有力な歯周病細菌 (歯周病原性細菌) のひとつと目されている。*C. rectus* は、成人性歯周炎病巣の他にもインシュリン非依存型糖尿病患者やエイズ患者における歯肉炎や歯周炎、インプラント周囲歯周炎、壊死性歯髓病巣、方線菌症(病因菌: *Actinomyces viscosus*)の胸壁病巣などからも分離されている。

歯周病細菌の歯周病の発症と進行への関わりは、歯周局所に十分な細菌が存在し

そしてその構成成分あるいは代謝産物が宿主の恒常性保持や防御機能を崩壊することによるが未だ明確ではない。 *C. rectus* のこれまでに明らかにされた歯周病原因子を表1. にまとめた。さらに、 *C. rectus* の歯肉縁下プラークのエコシステム（生態系）における栄養相互的な共生関係は歯周ポケットにおける持続的な歯周病細菌の生息に重要な役割をはたしている（図3. プラークにおける口腔細菌の共生関係図）。

分子生物学的性状

独特な生化学的性状や形態学的特徴を有する歯周病細菌である *C. rectus* の分子生物学的性状の解析は主に1) 16S rDNA, 2) リポ多糖体 (LPS), 3) S-layer 構成蛋白について進められてきた。

1) 16S rDNA

約 1500 塩基対から構成される細菌 16S rDNA は現在、細菌の分子遺伝学的系統分類においての有力な指標となっている。 *C. rectus* の細菌 16S rDNA については 1,459 塩基対が解析され、これを基に *Wolinella* 属から *Campylobacter* 属へと再分類された。この遺伝子にはどの細菌種にも共通な塩基配列の領域と細菌種それぞれに特異的な塩基配列の領域とが交互に存在する。すなわち、16S rDNA の *C. rectus* に特異的な塩基配列から設計・合成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて Polymerase Chain Reaction(PCR)を行えば、歯周病患者歯肉縁下プラークサンプルの *C. rectus* を高感度かつ簡便に検出・同定できる。

2) LPS

LPS は [O 抗原特異多糖体] - [コア多糖体] - [リピド A] の3つの部分から構成される。化学分析の結果、 *C. rectus* LPS は、大腸菌やサルモネラ菌等の腸内細菌や他の歯周病細菌とは異なる以下のような特徴を有する²⁾。

1) *C. rectus* LPS の菌種や菌株の抗原特異性あるいは血清型を担う O 抗原特異多糖体の構成糖が主にラムノースとグルコースである。 *C. rectus* LPS をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動で調べると、竹の節のような独特な泳動パターンを示す。2) コア多糖体には2種類の7単糖、すなわち、L-グリセロ-D-マンノヘプトースに加えてその光学異性体 D-グリセロ-D-マンノヘプトースを含む。3) リピド A には、腸内細菌 LPS の特徴的な構成脂肪酸である3ヒドロキシミリスチン酸(3-OH-C_{14:0})に加え、より長鎖の3ヒドロキシパルミチン酸(3-OH-C_{16:0})を含む。

C. rectus LPS にも、LPS の主な免疫・生物学的作用である Shwartzman 反応、Limulus テスト陽性（カプトガニアメーバー様細胞の凝固）、マウス脾臓細胞に対するマイトジェン作用、腹腔マクロファージからのインターロイキン-1 (Interleukin-1: IL-1) 産生作用などが認められる。また、培養ヒト歯肉線維芽細胞に対して、炎症反応を惹起させる働きのある IL-1 β や IL-6 やプロスタグランジン E2 等の産生を亢進させる。さらに、プラスミノゲン活性化因子-プラスミン系の活性化による細胞外基質の分解促進作用も認められる。 *C. rectus* LPS が様々な内毒素活性（免疫・生物学的作用）を有することが歯周病原因子とされるゆえんでもある。

3) S-layer 構成蛋白

C. rectus の外膜表層には特殊な S-layer が存在する。S-layer は菌体最外部にあり、歯周ポケットにおける *C. rectus* の生息環境に直接接しており、特に抗体、補

体、多形核白血球、マクロファージ等の宿主防御因子等からの障壁となって細菌細胞を保護している。S-layer を保有する *C. rectus* 菌株；S(+)株と S-layer が突然変異で欠落した菌株；S(-)株とを比較すると、S(+)のほうが S(-)株に比べてヒト歯肉線維芽細胞に付着しにくいことから、白血球やマクロファージにも取りこまれにくく、初期の生体防御機構から免れている。またマウス皮下にそれぞれの生菌を接種した際の膿瘍形成能とマウスの病態を比較すると、病原性は S(-)株の方が強く S-layer は *C. rectus* の生体内での生息や病原性に関連する重要な菌体構成成分である。

C. rectus の S-layer は酸性条件で菌体表層から特異的に分離される主として分子量約 150kDa の蛋白(Slp)とそれより少し低分子量の 2 種類の蛋白から構成されている³⁾。Miyamoto ら⁴⁾は *C. rectus* ATCC 33238 株の 150kDa S-layer 蛋白遺伝子(*slp*)の分子生物学的性状を明らかにした。*slp* は 4,086 塩基対 (1,361 アミノ酸残基) から構成されていた。成熟 Slp は最初のメチオニンを欠き、シグナルペプチドは存在しない。*slp* は既報の *C. fetus* の S-layer 遺伝子(*sapA*)とアミノ酸配列において高い相同性をしめした。ちなみに *C. fetus* の S-layer も抗食菌作用として機能し、その病原性に関わることから、SapA はグラム陰性細菌 S-layer 蛋白のなかでも特にその分子生物学的性状が解明されている。

Slp と SapA とのアミノ酸配列の比較とこれまでの SapA に関する報告から Slp について以下のことが推察される。

- 1) SapA と相同性の高い N 末端部分は LPS との結合さらには外膜表層へのアンカーとなる。またこの領域は S-layer 蛋白の抗原性 (血清型) に関係する。
- 2) C 末端部分には(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D-X というグリシンに富む特定の繰り返し配列が存在する。これはカルシウムと結合し、S-layer 蛋白の高次構造保持やお互いの会合に与る。

一方、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* 白血球毒素(LT)に代表される細菌毒素にもこの(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D-X 配列が存在し、RTX (repeats in the structural toxin) 毒素と呼ばれる。*C. rectus* の培養上清にはその LT に類似した分子量 104kDa の細胞毒素が存在し、その N 末端アミノ酸配列は Slp のそれと同一であった。しかしながら、Slp 自体に細胞毒素活性が認められないことや分子量が異なること等から *C. rectus* の細胞毒素は Slp とは異なる。

C. rectus には百日咳菌の RTX 毒素である細胞溶解素遺伝子(adenylate cyclase: *cyaa*)に相同性を示す *csxA* および *csxB* の 2 つの遺伝子が存在する⁵⁾。両遺伝子から推定されるアミノ酸配列は前半部分が S-layer 蛋白また後半部分が RTX 毒素の特徴を示す。この遺伝子産物自体が細胞溶解素であるのか、また実際の発現や細胞(表層)局在などは今のところ不明である。

歯周病細菌 *A. actinomycetemcomitans* と *Porphyromonas gingivalis* についてはそれぞれの細菌染色体 DNA 全塩基配列の解明が進められているが、*C. rectus* については今のところその計画はない。S-layer 蛋白遺伝子以外でこれまでに解明された *C. rectus* の遺伝子塩基配列について表 3 にまとめた。*C. rectus* の DNA-dependent RNA polymerase の部分塩基配列は *H. pylori* の塩基配列を基に直接 PCR により増幅することにより解析された。今後さらに *C. rectus* における病原性に関連するあるいは興味ある遺伝子の解析は、近縁種である *C. jejuni* また *H. pylori* やその他の病原細菌での既報の遺伝子塩基配列を基にして進められるであろう。

引用文献

- 1) Tanner ACR, Badger S, Lai C-H, et al. : *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal diseases. Int. J. Syst. Bacteriol., 31: 432-445, 1981.
- 2) Koikeguchi S, Tsutsui O, Kato K, et al. : Comparative study of lipopolysaccharides from *Wolinella recta*, *W. curva*, *W. succinogenes* and *Campylobacter sputorum* ssp. *sputorum*. FEMS Microbiol. Lett., 81: 291-298, 1991.
- 3) Koikeguchi S, Kato K, Kurihara H, et al. : Cell surface protein antigen from *Wolinella recta* ATCC 33238^T. J. Clin. Microbiol., 27: 1210-1217, 1989.
- 4) Miyamoto M, Maeda H, Kitanaka M, et al. : The S-layer protein from *Campylobacter rectus*: sequence determination and function of the recombinant protein. FEMS Microbiol. Lett., 166: 275-281, 1998.
- 5) Braun M, Kuhnert P, Nicolet J, et al. : Cloning and characterization of two bistructural S-layer-RTX protein from *Campylobacter rectus*. J. Bacteriol., 181: 2501-2506, 1999.

表 1. *C. rectus* の主な歯周病原因子

歯周組織への定着

単鞭毛による運動性

宿主抗細菌防御機構回避能

表層特殊構造蛋白 (S-layer protein)

免疫応答抑制物質

細胞 (白血球) 毒素

細胞毒性、傷害性

リポ多糖体

細胞 (白血球) 毒素

ヒト歯肉線維芽細胞傷害活性

GroEL 様蛋白

マウスモデルでの膿瘍形成能

細菌代謝産物

硫化物 H₂S, コハク酸

表 2. 既報の *C. rectus* S-layer 蛋白遺伝子の分子生物学的特徴

GenBank/EMBL 登録番号	遺伝子名	推定	推定	RTX unit 数	アミノ酸配列相同性(%)*	
		アミノ酸数	分子量(kDa)		Slp	SapA2
AB001876	<i>slp</i>	1,361	145	7	-	26.4
AF010143	<i>crs</i>	1,361	144	7	92.5	26.3
AF035192	<i>csxB</i>	1,123	119	22	24.6	23.8
AF035193	<i>csxA</i>	1,238	131	13	24.9	23.1

*遺伝子解析ソフト Genetyx の Maximum Matching を用いて算出した値

表 3. その他既報の *C. rectus* 遺伝子塩基配列

GenBank/EMBL 登録番号	解析された遺伝子
L06973	16S ribosomal RNA sequence
L04317	complete 16S ribosomal RNA
AF035192	tRNA-Arg gene, complete sequence; and putative histidine kinase gene, partial cds
AF136518	DNA-dependent RNA polymerase beta and beta' subunits junction site (rpoB-rpoC) gene, partial sequence

ワンポイント用語解説

Campylobacter rectus

彎曲した(Campylo)桿菌(bacter)のなかで、まっすぐな(rectus; straight)形の細菌という意味で命名された。*Campylobacter* 属には、家畜や家禽の腸管の常在菌でヒトの食中毒の主な病因菌のひとつである *C. jejuni* や *C. coli* また *C. fetus* が含まれる。ちなみに現在、胃炎や胃潰瘍の病因菌としてまた胃ガンの危険因子として注目されている *Helicobacter pylori* は当初 *C. pylori*(発見当時は *C. pyloridis*)として分類されていた。現在ヒト口腔内から分離される *Campylobacter* 属菌種としては、*C. sputorum* subspecies *sputorum* や *C. concisus* が、そして再分類された *C. rectus* や *C. curvus*(旧 *W. curva*)や *C. gracilis*(旧 *Bacteroides gracilis*) が、また最近新種として登録された *C. showae*がある。

S-layer

古細菌やグラム陽性細菌やグラム陰性細菌の細菌表層に存在する四角形あるいは六角形の規則的配列構造を S-layer と呼ぶ。Regular もしくは crystalline surface layer あるいは単に surface layer の意味である。電子顕微鏡による細菌の形態学的研究から、S-layer の存在やその特徴が明らかにされた。多くの場合、1 種類の蛋白もしくは糖蛋白（分子量は約 4 万から 20 万）から構成されている。

16S rDNA に基づく PCR による *C. rectus* の検出

Ashimoto らの方法 (Oral Microbiol. Immunol., 11: 266-273, 1996) によれば、*C. rectus* 16S rDNA に特異的な 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマー (TTTCGGAGCGTAAACTCCTTTTC と TTTCTGCAAGCAGACACTCTT) を用いて PCR (最初 95°C 2 分間の熱変成に続いて、95°C 30 秒、60°C 1 分、72°C 1 分の反応過程を 36 サイクル、そして最後に 72°C 2 分の伸展反応) を行えば、598 塩基対の *C. rectus* 16S rDNA 特異的遺伝子断片が増幅される。

細菌ゲノム解析プロジェクト

1995 年 *Haemophilus influenzae* Rd の染色体 DNA の全塩基配列がアメリカ、メリーランド州 The Institute for Genome Research (TIGR: <http://www.tigr.org/>) により決定されたのを皮切りに、現在世界各地で代表的な病原細菌や真菌また原虫についての細菌ゲノム解析プロジェクトが進められている。これまでにすでに 23 菌種の染色体 DNA 全塩基配列が決定された。口腔細菌のうち *A. actinomycetemcomitans* と *Streptococcus mutans* についてはオクラホマ大学の Advanced Center for Genome Technology (ACGT: <http://www.genome.ou.edu/>) において、また *Porphyromonas gingivalis* については TIGR と The Forsyth Institute (<http://www.forsyth.org/>) との共同でそれぞれの細菌染色体 DNA 全塩基配列の解析が進められている。ちなみに、*H. pylori* については TIGR で、また *C. jejuni* については The Sanger Centre (<http://www.sanger.ac.uk/>) でそれぞれの染色体 DNA 全塩基配列が既に決定されている。



図1. *C. rectus* 菌体のネガティブ染色による透過型電子顕微鏡像

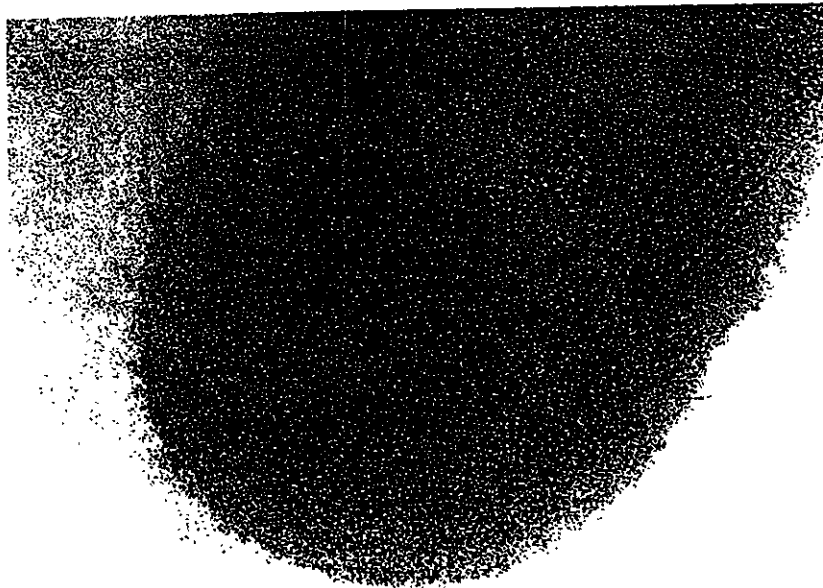


図2. *C. rectus* 菌体表層のネガティブ染色による透過型電子顕微鏡像

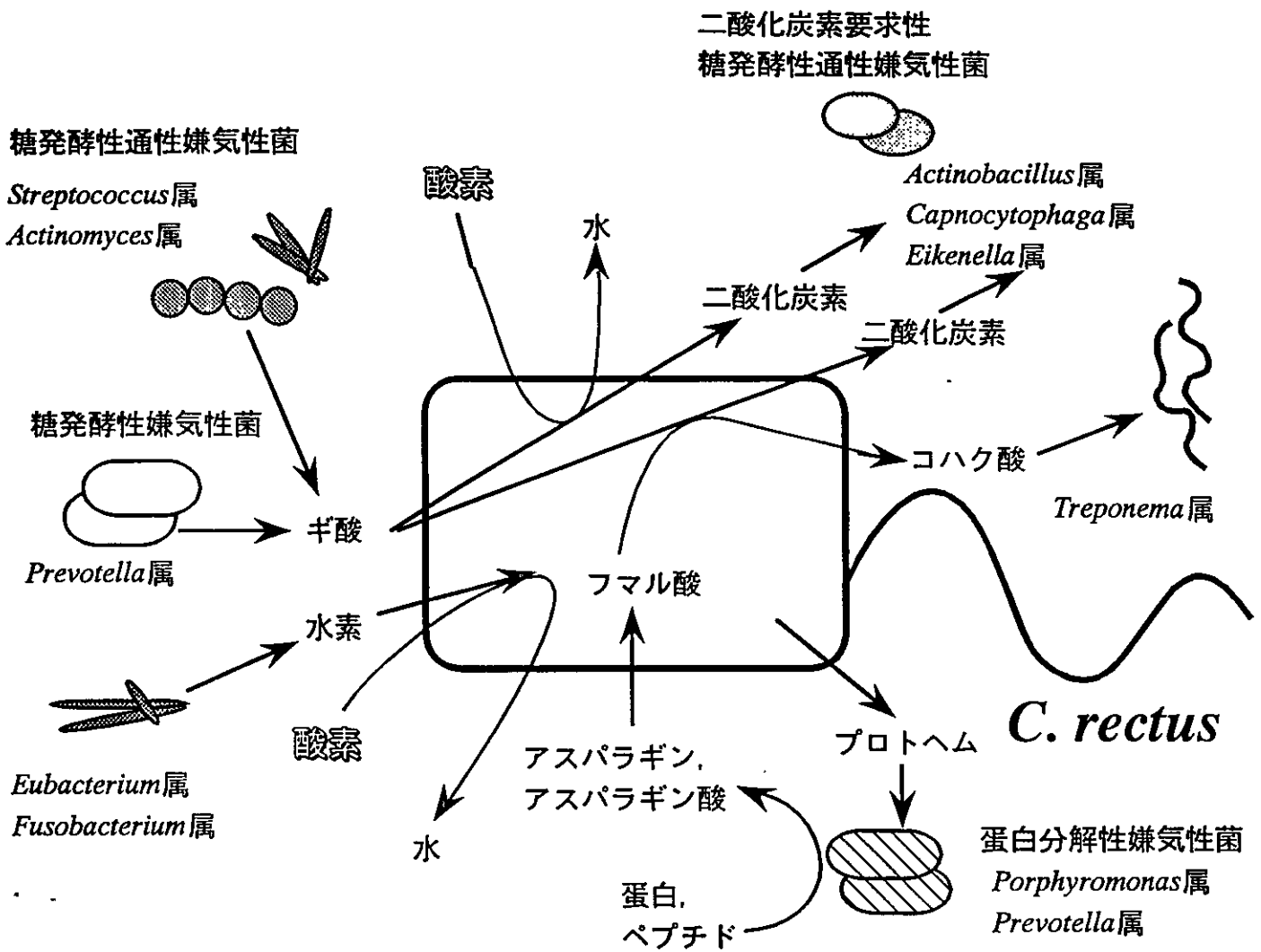


図3. プラークにおける口腔細菌の共生関係

*C. rectus*は主に乳酸や水素を電子供与体とし、またフマル酸（アスパラギンやアスパラギン酸を代謝し産生）や硝酸塩や酸素を電子受容体として呼吸（チトクローム酸化経路）によりエネルギーを獲得している。*C. rectus*が歯周ポケット内の酸素を消費することで嫌気度を高め、嫌気性細菌である歯周病細菌のための生息環境を整える。また*C. rectus*の産生するprotohemeはPrevotellaや Porphyromonas属の増殖に利用される。

4) *Treponema denticola*

*Treponema denticola*は成人性歯周炎局所から高頻度に分離され、他のグラム陰性桿菌群とともに歯周炎の発症と進行に重要な役割を果たしていると考えられている¹⁾。さらに最近では本菌は歯周炎への関与のみならず、最近では低体重時の出産にも関与しているというような全身的な影響を示唆する疫学データも出ている。本菌はらせん形を呈し、菌体表層をouter sheath (OS) とよばれる層が覆っている(図1)。軸糸はouter sheath 内に菌体に巻き付くように存在し、この軸糸による回転運動が運動性をつかさどっている。OS中に最も多いタンパクはMajor outer sheath protein (Msp)とよばれている²⁾。Mspは、*Treponema*に共通して認められ、梅毒の病原体の*Treponema pallidum*でも*T. denticola*のMspに非常に類似したタンパクが認められ、その病原性との関連が注目されている³⁾。Outer sheathにはMspと同様病原性に関わるprolyl phenylalanine specific protease (dentilisin)も存在している。本酵素はNative formでは100kDa 前後の分子量であるが、72, 43, 38 kDaのproteinの3つのタンパクの複合体であり、proline-phenylalanine またはleucine-phenylalanineの配列のところで基質を分解する特異性をもっている⁴⁾。本酵素のアミノ酸配列は活性中心が*Bacillus subtilis*のsubtilisinと類似している。*T. denticola*の考えられている病原因子にはtable 1のようなものがあるが、dentilisinとMspの病原性が最もよく解析されている。

付着作用

細菌が宿主に対して病原性を発揮するためには口腔内に定着する必要がある。*T. denticola*の定着のメカニズムとしては歯面と歯肉線維芽細胞への付着性と共凝集が報告されている。本菌の線維芽細胞への付着は、細胞外マトリクスであるフィブロネクチン、ラミニンに対する付着によって起こることが示されている。これらの細胞外マトリクスに対する付着は主にMspがつかさどっている。Msp以外には dentilisinも本菌の細胞への付着に関与していることも確認されている。

口腔には共生、拮抗作用を示しながら非常に多数の菌が生息している。すでに細菌が生息しているところに定着するためには、細菌同士に付着作用である共凝集が重要な役割を果たしている。*T. denticola*は、*Fusobacterium nucleatum*と*P. gingivalis*と共凝集する。*F. nucleatum*は歯面に最初に定着する菌種と共凝集をおこす。*P. gingivalis*は歯周炎の主要な原因菌である。本菌とこれらの菌との共凝集性は本菌の歯肉縁下への定着に重要な役割をはたしていると考えられる。

さらに本菌と他菌種との間の共生作用も本菌の定着に遊離に働くと考えられる。

歯周ポケット内では*T. denticola*と*P. gingivalis*は近接して存在していることが報告されている。この結果は*in vivo*での共生作用がある可能性を示唆している。*In vitro*では*T. denticola*と*P. gingivalis*の混合培養はそれぞれの増殖を促進することが報告されている。さらに*T. denticola*のproteaseは、*P. gingivalis*の発育を抑制するcystatinをはじめとする宿主由来のprotease inhibitorを分解することも報告され、本菌の存在が阻害物質に対する抵抗性を上昇させている可能性がある。

免疫系に対する影響

*T. denticola*は、リンパ球の活性化を阻害する免疫抑制を引き起こし、dentilisinによって免疫グロブリンを分解し免疫による排除作用からの回避していると考えられる。本菌は表層のプロテアーゼ活性は、IL-1 β を活性型に変換させる。また本菌のlipoproteinがIL-1, TNF α NO産生を導くことも示されている。サルを用いた実験的歯周炎ではIL-1とTNF α に対する抗体が歯周炎の発症を抑制するということが報告されている。そのため*T. denticola*はIL-1の活性化を等を介してimmunoresponseに影響を与え、歯周組織での炎症の発現に関与している可能性が考えられる。さらに本菌によって補体成分であるC3が分解されるという報告もなされている。このIL-1による作用と免疫抑制作用という相反する作用は、炎症を引き起こすとともに、防御反応を混乱させ宿主応答から逃れる役割を果たしていると考えられる。

これらは単に*T. denticola*が細胞への付着性と共凝集によって定着するのみならず、共生作用により積極的に他の歯周病原菌のすみやすい環境を生み出し、歯周炎をさらに憎悪させるようにしていると考えられる。

細胞傷害性

Mspは付着因子だけでなく細胞障害因子として働く可能性も示唆されている。本菌のMspは人工膜のモデルの膜電位を変化させたり、HeLa細胞の膜の透過性を変化させることは細胞傷害性があることを示している。Mspのアミノ酸配列の一部から予想される立体構造がporinと類似している。これはMspが細胞膜に入り込み、porin様の構造を形成し細胞に穴を開けるのではないかと考えられる。

さらにDentilisinが宿主細胞に対して傷害性を示すことも明らかにされている。マウスの膿瘍モデルでは、*T. denticola*が周辺の組織に侵入していることが報告されている。そのためDentilisin activityは、collagen IV, fibronectin, lamininの様な細胞間マトリクスを分解し本菌が宿主に侵入に密接に関与することが考えられる。われわれは本酵素の作用を菌体レベルで明らかにするためにdentilisinをknockoutした欠損株を