

総 説

—日本歯周病学会学術賞受賞—

歯周病原嫌気性菌の産生する酪酸による T細胞アポトーシス誘導機序の解明

落合 智子

日本大学松戸歯学部 感染免疫学

Role of T-cell apoptosis by butyric acid, metabolic by-product of
periodontopathic bacteria

Tomoko Ochiai

Department of Microbiology and Immunology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

はじめに

口腔の代表的感染症「齲蝕と歯周病」は、デンタルプラーク中に棲息する細菌によって引き起こされる。近年、米国における大規模調査から、歯周病原細菌に起因する炎症や炎症物質が心臓病や動脈硬化などの循環器障害、糖尿病、呼吸器疾患や早産など多くの全身性疾患に関わっていることが判明した¹⁾。また、培養や検索技術の進歩により歯周病原細菌およびその遺伝子が、呼吸器系および循環器系感染症から分離されたという報告が多数見られる²⁻⁴⁾。歯周病原細菌の産生する病原因子として内・外毒素、莢膜、付着線毛、そして多くの組織破壊酵素が知られている。我々は、歯周局所における免疫応答の異常、免疫抑制物質の研究を通して口腔感染症の発生および全身転移機序の解明を行ってきた。更に、一連の研究から、代表的歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* や *Fusobacterium nucleatum* などの嫌気性グラム陰性菌が産生する代謝産物・短鎖脂肪酸

(Short-chain fatty acids: SCFA)、特に高濃度の酪酸が、歯周組織内の免疫担当細胞にさまざまな為害作用を与えていることを報告してきた。本稿では、これらの研究経過を軸に歯周病原細菌と全身疾患の関係を考えてみたい。

1. 歯周病原菌は大量の SCFA を産生する

歯周病発症には、微生物、宿主応答、環境などのリスク因子が複雑に作用しているが、これらは局所および全身的因子に分類され、その重要を決定すべく多くの疫学調査や研究がなされている。しかし、細菌は「必要因子であるが十分条件ではない」との考えもあるが、病原因子と防御因子などの n の階乗に及ぶ条件が解明されない限り、この果てしない論議は繰り返されるだろう。これは、他の慢性感染症や慢性疾患においても同様である。しかし、細菌感染症において赤痢や腸管出血性大腸菌のように 10 ~ 100 個単位で発症する感染症はきわめて希で、コレラも 10⁸ 個以下ではほとんど発症しない。このように病原細菌とされる外来細菌感染症においても、感染と発症の間に大きな違いがあり、本邦に見られるような衛生的な環境下で、かつ

連絡先：落合智子

〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1

日本大学松戸歯学部感染免疫学講座

Tomoko Ochiai

Department of Microbiology and Immunology, Nihon

University School of Dentistry at Matsudo

2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, 271-8587, Japan

E-mail ochiai.tomoko@nihon-u.ac.jp

正常な生体防御機構を持つ宿主の場合、感染後急激に発症することは少ない。感染症である歯周病に多くの宿主側の因子が関与するのは当然で、結果として混合感染による慢性疾患としての経過をとる。従って、強固なリンパ系組織が発達した口腔の感染症を外因感染機序と同じ視点で考えることは困難である。菌の関与なしに歯周病は発症しえないことから、歯周病を単なる生活習慣病として考えるのは問題であろう。

遺伝的背景や免疫学的研究など様々な方面から精力的な研究が行われている潰瘍性大腸炎やクローン病などの難治性腸疾患においても、その発症機序がいまだ解明されていない。しかし、無菌動物ではこれらの疾患が発症しないことから、腸内細菌叢やその遷移が重要とされている研究結果があり、歯周病を比較するとおもしろい^{5, 6)}。

歯周病原菌の中で特殊な菌として、症状が急性に進行する若年性歯周炎の原因菌 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* がある⁷⁾。この菌は、Fc 結合タンパクやロイコトキシンといわれる外毒素を産生し、ヒト末梢血中の多形核白血球や単球に為害作用を及ぼし死滅させる。さらに、近年新たな毒素(Cytolethal distending toxin, CDT)の存在も確認されている。しかし、感染者が最も多い成人性歯周炎の原因菌(第1表)の多くは、内毒素(lipopolysaccharide, LPS)、莢膜、付着線毛など多くの病原因子を産生するが、いずれも一般病原細菌に比較してその病原性は弱い。酵素としては、*P. gingivalis* が産生する gingipain が代表的で、コラゲナーゼ、トリプシン様酵素、ヒアルロニダーゼなどがあり歯根膜やその周囲の線維芽細胞、そして骨芽細胞などを直接破壊する。一群の歯周病原菌によってのみで発症するのではなく、病因論的に他の細菌に比べて高いと考えるべきであろう。現在、既知の病型と原因菌の因果関係に若干疑問が生じているものもあるが、歯周組織内に侵入し増殖した細菌全てに炎症誘発、組織破壊能力があり、その代表的な菌として *P. gingivalis* があげられると考えて良い。それら組織内増殖細菌は、毒素や毒性物質、組織破壊酵素を産生し病態を徐々に進行させるが、強力な病原因子を産生しないことが慢性化の一因となる。しかし、「地球上で最も繁栄している病原細菌は常在菌である」という考えもあり、歯周病原細菌のような弱毒細菌にとって、慢性感染という感染様式は有効な生き残り手段ともいえる。

穿刺により採取した歯肉組織を用いた炎症関連因子の遺伝子発現プロファイルからも、歯周病の発症と病態の進展には多くの液性因子が深く関わり合っている事が報告されている。我々は歯周組織局所における

第1表 歯周病の病型と歯周病原細菌

病 型	歯周病原菌(菌種)
慢性歯周炎	* <i>Porphyromonas gingivalis</i> * <i>Prevotella intermedia</i> * <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> * <i>Tannerella forsythia</i> <i>Campylobacter rectus</i> * <i>Treponema species</i>
侵襲性歯周炎	* <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
思春期関連性歯肉炎	* <i>Prevotella intermedia</i>
妊娠期間関連性歯肉炎	* <i>Prevotella intermedia</i>
壊死性潰瘍性歯周炎 (壊死性潰瘍性歯肉炎)	* <i>Prevotella intermedia</i> * <i>Treponema species</i>

* 短鎖脂肪酸産生菌

免疫応答の異常、特にサイトカイン産生のアンバランスが病態進行に深く関わっていると考え、歯周病原菌の免疫担当細胞に及ぼす影響について一連の検討を行ってきた。特に、*A. actinomycetemcomitans* や *C. ochracea* は、全身転移過程での食細胞に対する抵抗性や免疫抑制物質の産生が深く関わっていると推測した。そこで、これらの菌体からタンパクを主成分とする免疫抑制物質の精製を行い、その性状を明らかにした^{8, 9)}。しかし、最も罹患率の高い成人性歯周炎の主要原因菌 *P. gingivalis* からは、このような強い免疫抑制活性物質を検出することができなかった。そこで、歯周病原菌培養上清を用い免疫担当細胞に影響を及ぼす物質の検討を行った結果、*P. gingivalis*, *P. loe-scheii*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* など嫌気性グラム陰性菌の培養上清が極めて強力に T 細胞および B 細胞の増殖を抑制することを見いだした¹⁰⁾。各種解析の結果、この物質は低分子で、グラム陰性菌の代表的な病原因子 LPS とは明らかに異なっていた。詳細に検討を行ったところこの抑制作用は、歯周病原嫌気性菌の主要な代謝産物・SCFA により誘導されることが判明した。特に高濃度酪酸(butyric acid)はその作用が強く、プロピオン酸(propionic acid)やイソ吉草酸(isovaleric acid)にもその作用が認められた。菌種別には、*P. gingivalis* では酪酸とイソ吉草酸、*P. loe-scheii* では酪酸、プロピオン酸とイソ吉草酸、*F. nucleatum* においては酪酸がそれぞれ主な産生物であった。定量分析の結果、これらの細菌の培養上清中には、13.3 から 26.8 mM の酪酸が検出された。さらに、酪酸を用いた *in vitro* 実験の結果では 5 mM で T 細胞、B 細胞の増殖が完全に阻害された。一方、口腔では、正常歯肉溝内で約 8 mM、歯周病炎症部位においては約 14.4 mM と高濃度の酪酸が存在している^{11, 12)}。

また、これらの嫌気性菌が産生する硫化水素やメチルメルカプタンなども組織為害作用を有するが、いずれもこの細胞障害作用には関与していない。Li らは、6ヶ月間に渡り歯肉溝内の SCFA と歯周病との関係を解析した結果、治療により酪酸とイソ吉草酸濃度が低下し病態が改善した¹³⁾。さらに、この2つの脂肪酸は歯周病診断と経過観察に極めて有効であると報告している。

単一細菌による急性感染症においては、特定病原因子の研究により感染機序の解明や予防法に関して有効な結論を引き出すことができる。しかし、混合感染による慢性感染症の発症機序解析においては限界がある。細菌を中心とする歯周病研究の戦略として、LPS や酵素などと共に、歯周病原菌が共通に産生し細胞にさまざまな影響を与える病原因子・SCFA を検討することも重要と考える。また、このアプローチは、近年問題となっているさまざまな内因感染研究においても多くの示唆を与えるものと考えている。

2. SCFA は局所の免疫応答に影響を及ぼす

マウス脾臓 T 細胞を用いサイトカイン産生に及ぼす SCFA の影響を検討した結果、1.25 mM の酪酸添加で IL-4, IL-5, IL-6 の産生がほぼ完全に阻害された。IL-2 の産生も 2.5 mM 添加でその産生量が 80% 阻害された。いずれのサイトカインも 5 mM 添加で完全に産生が阻害された。これらの結果から、極めて低濃度の SCFA が直接免疫担当細胞に作用した場合、Th2 タイプのサイトカイン産生が著しく阻害され、局所の免疫応答に影響を及ぼす可能性が示唆された¹⁰⁾。T 細胞は、ナイーブ CD4T 細胞が IL-4 の存在下で Th2 タイプに分化し、IL-6 および IL-10 を分泌し B 細胞を活性化することが知られている。その結果、抗体産生が促進され、体液性免疫応答が誘導される。SCFA によるサイトカイン産生阻害が、正常な抗原特異的体液性免疫応答に影響を及ぼしている可能性が考えられる。一方、細胞性免疫応答に関与するとされる Th1 タイプ T 細胞分化では、IL-4 が抑制的に働くことが知られている。しかし、局所の SCFA 増加が著しい IL-4 産生阻害を惹起すると、細胞性免疫応答の制御が困難となり、種々の細胞障害作用が起きる可能性がある。歯周病の進行に伴う局所の IL-4 濃度変化に関する報告は、必ずしも統一されていないものの、SCFA によるサイトカイン産生への影響は大変興味のある現象と思われる。

歯周炎症局所の組織像では著しい B 細胞の増加が見られるが、必ずしも特異抗体産生量が増加しているわけではない。従って、歯周病変部において増加したグラム陰性菌の菌体成分や LPS などにより B 細胞増

殖がおこり、非特異的抗体産生が亢進されているものと考えられる。しかし、非特異的抗体産生過多は、感染を進行させるばかりでなく、補体の活性化などにより組織破壊が進む可能性があげられることから、SCFA が局所の免疫担当細胞に影響を及ぼし特異的防御作用が低下する可能性が考えられる。

SCFA 添加により供試した T, B 細胞およびマクロファージに典型的なアポトーシス像が見いだされ、細胞死が確認された。

3. 内毒素 LPS は SCFA によるアポトーシスを促進する

グラム陰性菌感染症において最も重要な病原因子 LPS は、発熱作用、補体や B 細胞の活性化、マクロファージや破骨細胞の活性化、そしてエンドトキシンショックなど様々な生物活性を持つ。しかし、LPS に対するそれぞれの細胞の反応性は大きく異なる。多形核白血球は、歯肉構内や歯周組織感染部位に多数遊走し第一線で侵入細菌に対応する最も微生物に接触する機会の多い細胞で、早期感染防御において重要な細胞である。多形核白血球に対する SCFA や LPS の作用を検討することは、歯肉構内での生体と侵入細菌のせめぎ合いを再現しているものといえる。多形核白血球に酪酸を作用させると、0.6 mM から 5 mM の濃度でアポトーシス像が見られる。そこに微量の LPS を共存させると、アポトーシス誘導性は著しく増加する¹⁴⁾。これは、感染部での防御作用の低下を引き起こすばかりでなく、過剰な多形核白血球の遊走により組織破壊が促進されることが考えられる。

4. SCFA に対する感受性は細胞種により異なる

SCFA の T 細胞に及ぼす影響を検討した結果、極めて顕著なアポトーシス誘導性が観察された。最もアポトーシス誘導能の強い酪酸を用い各種細胞の感受性の違いを検討した結果、マウス胸腺細胞、脾臓 T 細胞、B 細胞およびヒト T 細胞株 Jurkat 細胞においては、ほぼ同程度の DNA 断片化が認められた¹⁵⁾。また、B 細胞株 Raji および WEHI 231、さらにマクロファージ細胞株においても、同様の結果が見られた¹⁶⁾。しかし、ヒト口腔粘膜上皮細胞および歯根膜、歯髄分離各種線維芽細胞は、酪酸に対し非感受性であり、アポトーシスは誘導されなかった。これらの結果は、主にリンパ系細胞が酪酸感受性であり、細菌体や産生物などと接触する可能性の高い上皮細胞および線維芽細胞は抵抗性が強いことを示している。このように正常な歯周組織や歯肉溝では、上皮および線維芽細胞が SCFA に抵抗性を示し組織の恒常性を維持しているものと思われる。

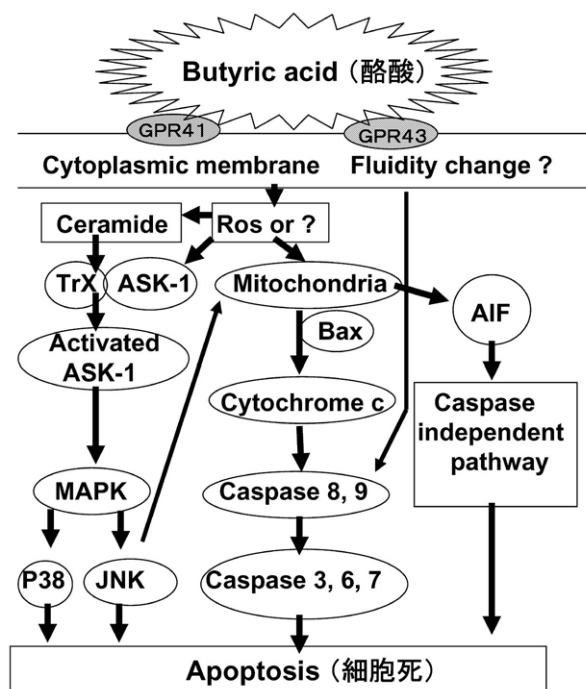
5. 酪酸のアポトーシス誘導機序

細胞が放射線や薬剤などによる DNA の傷害をはじめとする種々のストレスを受けると、ATM や DNA-dependent protein kinase などを経た系により p53 の活性化、安定化が起こり、細胞周期 G1 での停止やアポトーシスが誘導される。特に、大腸癌、肝癌、食道癌など多くのガン細胞で p53 の異常が見つかり、前ガン細胞にアポトーシスを誘導するため癌制御遺伝子として注目を集め、p53 ファミリーの研究が精力的に行われてきた。歯周病においても、加齢に伴うアポトーシス関連の形態学的変化が、歯周病の感受性を促進するという報告がある¹⁷⁾。しかし、一方では、p53 や Bcl-2 などのアポトーシス関連遺伝子の発現が、細菌により誘導されるヒト歯肉慢性炎症を阻害するとの報告がある¹⁸⁾。これらの視点から、酪酸誘導アポトーシスの機序を解明するため、p53 および Bcl-2, Bax の発現について p53 ノックアウトマウスを用い検討を行った¹⁹⁾。正常および同系 p53 ノックアウトマウスより胸腺細胞、脾臓 T および B 細胞を分離し、種々の濃度で酪酸を作用し DNA の断片化を測定した。いずれのマウスから分離した細胞においても、酪酸処理により同程度の DNA 断片化が見られた。それぞれのマウスから精製した CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞でも酪酸に対する感受性の差は認められなかった。また、Bcl-2, Bcl-XL の発現低下についても差は認められなかった。これらの結果から、酪酸誘導アポトーシスには p53 の関与はないものと考えられる。

Fas 抗原 (Fas/CD95) は、腫瘍壊死因子 (TNF)/ 神経増殖因子 (NGF) 受容体ファミリーに属する膜タンパクであり、その細胞内領域にはデスドメイン (death domain) と呼ばれる細胞死のシグナルを細胞内に伝達する領域がある。アゴニストとして働く抗 Fas 抗体や Fas-L が Fas に結合すると、アポトーシスシグナルが細胞内に伝達され細胞死が誘導される。この Fas の生理的機能としては、自己反応性免疫担当細胞の末梢での除去、細胞障害性 T 細胞によるガン細胞やウイルス感染細胞の除去など重要な役割を担っていると考えられる。酪酸誘導アポトーシスにおいても、リンパ系細胞で典型的アポトーシス像が高頻度に見られることから、Fas/Fas-L 系の関与の有無を検討した。Jurkat 細胞株および、ヒト PBMC より生成した T 細胞を 5 mM 酪酸存在下で培養し、Fas 発現の変化をフローサイトメーターで解析した結果、特に変化は認められなかった²⁰⁾。さらに、抗 Fas 抗体、細胞障害性抗 Fas 抗体および抗 Fas-L 抗体などさまざまな抗体を用いアポトーシス誘導性の変化を検討したが、酪酸処理と Fas/Fas-L 系の関連性は認められなかった。

酸化ストレスは種々の細胞でアポトーシスの誘導あるいは抑制を引き起こすことが知られており、アポトーシスの実行に深く関与する。酸化ストレスが細胞に対して引き起こす作用としては、チオレドキシン (TRX) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) などのレドックス酵素の酸化、脂質膜や膜蛋白質の酸化変性を主因とする生体膜構造の障害がある。更に、酸化ストレスは主として DNA を構成するグアニン塩基を酸化することで DNA 障害を引き起こす。これらの作用により、アポトーシスの機構を担う多様な因子が酸化ストレスによる調節を受けることでアポトーシスの実行が制御されている。そこで、酪酸誘導アポトーシスの誘導因子としての活性酸素 (ROS) 産生の有無を調べたところ、酪酸により細胞内 ROS 産生が増加し、この増加は抗酸化剤処理により完全に抑制された²¹⁾。更に種々の抗酸化剤により、酪酸で誘導されるアポトーシス及び caspase ファミリーの活性化が抑制されたことから、酪酸誘導アポトーシスには ROS が深く関与することが明らかとなった。ROS による酸化ストレスは癌や虚血性臓器障害を始めとして、糖尿病、動脈硬化など様々な疾患の原因に関与している。老化に関しても ROS の発生とその傷害の蓄積が細胞および生体の寿命を規定する重要な因子となっている。

アポトーシスによる細胞死がおこるには、誘導、決定、実行の 3 つの過程が存在するが、中でもアポトーシスの決定過程には、2 つの経路が主要な役割を果たしていると考えられる。その一つは、caspase による自己および下位 caspase の限定分解経路であり、細胞内のタンパク分解により実行過程において重要な役割を果たしている。もう一つの経路はミトコンドリアを介する経路で、Bcl-2 ファミリーがこの経路を制御している。さらに、誘導過程においては caspase ファミリー、Bcl-2 ファミリーに加えて MAP キナーゼファミリーもそのシグナル伝達に重要な役割を果たしている。酪酸処理によって起こるアポトーシスには p53 や Fas/Fas-L 系の関与が見られなかった。細胞内においてアポトーシスがどのように決定、実行されているかを検討するためマウス脾臓 T 細胞を用い実験を行った。それに先立ち、これら一連の動きを推測するため、Jurkat T 細胞を用い DNA マイクロアレイによる分析を行った。更に、マイクロアレイの結果を参考に、実際に細胞内でどのような情報伝達が行われているか種々の実験を行った結果を第 1 図にまとめた。すなわち酪酸誘導アポトーシスは、ROS および Ceramide の産生を介して、分化・増殖に関与するとされる ERK 活性を抑制し、その一方でストレス伝達系として機能する ASK1-JNK 経路を活性化する。活



第 1 図 酪酸による T 細胞アポトーシスの誘導機序

性化した JNK はミトコンドリア上流にて Bcl-2 の不活化や Bax および Bak の活性化を誘導することにより、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出、一連の caspase ファミリーの活性化を誘導し、その結果 DNA の断片化を引き起こす。更に JNK は AP1 の核移行に伴う種々の転写因子活性化にも関与し、アポトーシスを促進する。一方 AIF の作用も認められることから、caspase 依存系の他にミトコンドリアを介する caspase 非依存系も機能していることが示唆された。これら一連の結果は、ほぼマイクロアレイの結果と同様であり、酪酸処理により細胞内においては幾つものアポトーシスの実行経路が連動して作用し、細胞死を誘導することが判明した²¹⁾。

6. 酪酸の口腔由来細胞およびサイトカイン産生に及ぼす影響

大腸では大量の細菌が宿主と共生関係を維持し、腸内細菌は食物繊維を発酵し大量の SCFA を産生するが、これらの SCFA は、細菌により更に分解され、大腸上皮(結腸上皮)に速やかに吸収、代謝され、結腸上皮の発育を増進するなど腸内環境に様々な影響を与える^{22, 23)}。我々も低濃度の酪酸が、T 細胞、B 細胞さらに線維芽細胞などの細胞増殖を顕著に促進する結果を得ている²⁴⁾。また、潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis, UC)の患者では、結腸の酪酸産生量が減少している可能性も示唆されているなど、極めて重要かつ有益な物

質である。しかし、我々の研究を中心に、酪酸は口腔では為害性の強い物質として認識されている。この差は、おそらく腸管と口腔の粘液層、粘膜組織の構造や相互の環境の違いに由来しているものと考えられる。SCFA や腸内細菌叢と難治性腸疾患については多くの興味ある結果が報告されているが^{5, 6)}、腸管においても酪酸は極めて有効な物質であると共に、過剰な濃度上昇が組織にさまざまな影響を与えている可能性がある。

口腔由来の線維芽細胞に 5 mM 濃度の酪酸を処理すると、5 ~ 15% 程度の発育増殖抑制が見られた。それらの発育抑制は添加酪酸の濃度依存性であったが、T 細胞や B 細胞の発育抑制に比べると発育抑制作用は低かった。アポトーシス誘導性も同様で、使用酪酸濃度依存的にアポトーシス細胞数が増加するものの、T 細胞や B 細胞における 60 ~ 80% といった高率に比べその影響は少なかった。口腔上皮ガン由来細胞を用いた同様の実験においても、線維芽細胞同様、酪酸による発育抑制とアポトーシス誘導性は低い結果が得られている。

歯周病細菌の LPS、線毛や酵素が歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生に影響を及ぼすことは知られているが^{25, 26)}、酪酸がどのような作用を及ぼしているかを検討した報告はない。そこで、酪酸添加 24 時間後の歯髓および歯肉線維芽細胞の IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-11、TNF- α および TGF- β 産生性の変化について検討を行った。その結果、0.62 mM 以下の酪酸添加では、いずれのサイトカイン産生にも影響は認められなかったが、1.25 ~ 5 mM では、酪酸濃度依存的に IL-6、IL-8、IL-11 の産生量が著しく増加した。特に、5 mM の酪酸添加では、IL-6、IL-8、IL-11 が顕著に増加し、それぞれ 4 倍、50 倍、15 倍であった。これらの結果から、酪酸が直接線維芽細胞に作用し、炎症性サイトカインの産生量を著しく増加させることが判明した。従って、LPS などの菌体成分と酪酸は相乗的に歯周局所で炎症性サイトカインの産生を促進しているものと考えられる。

7. 歯肉線維芽細胞による酪酸誘導 T 細胞アポトーシスの解除

酪酸刺激による線維芽細胞のサイトカイン産生量増加の意義を検討するため、*in vitro* における *in vivo* 再構成実験を行った。酪酸によりアポトーシスを起こしやすい T 細胞と抵抗性の線維芽細胞間相互作用について、液性因子の関与を検討するため、ヒト T 細胞株 Jurkat 細胞と歯肉線維芽細胞を culture insert を用いて co-culture した。その培養系に 5 mM 酪酸を添加し、Jurkat 細胞のアポトーシス誘導性に及ぼす線維芽

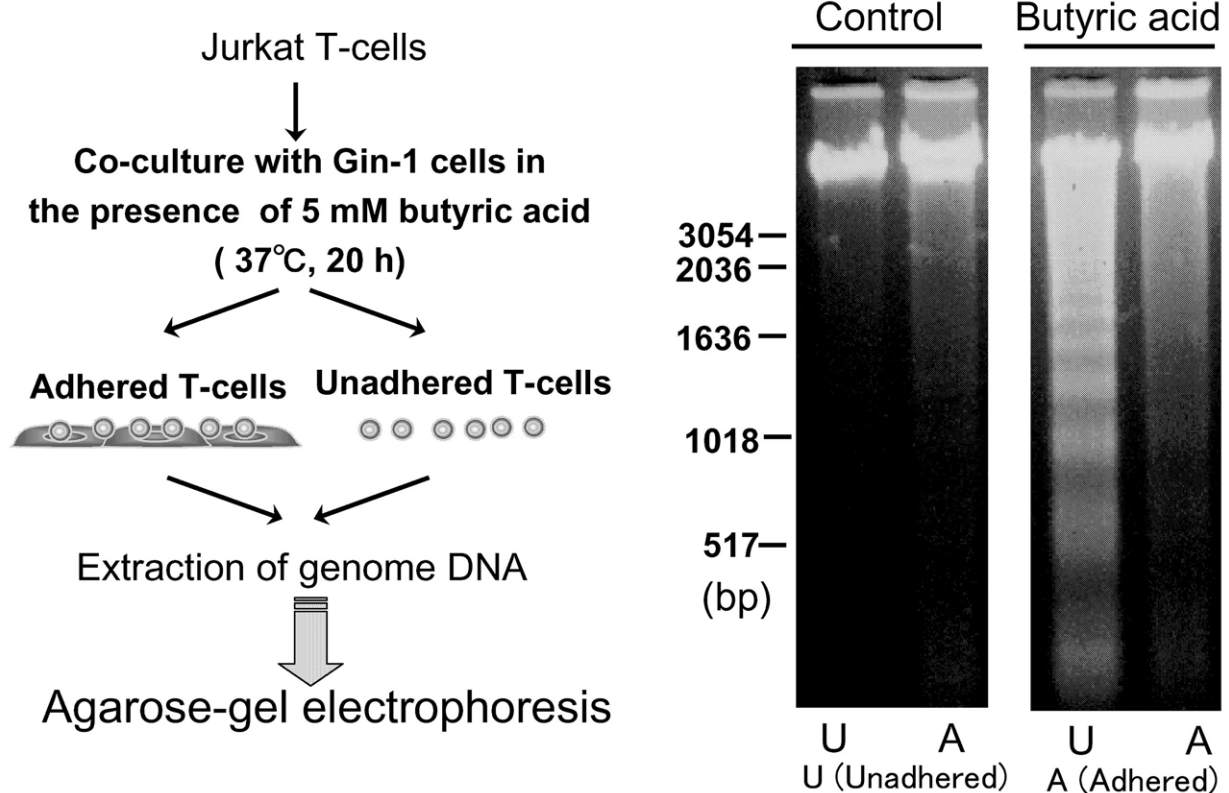
細胞の影響を検討した結果、線維芽細胞との共存により酪酸誘導 Jurkat T 細胞のアポトーシスは、約 30 % 減少した²⁷⁾。ヒト末梢 T 細胞を用いた場合においても同様の結果が得られたことから、T 細胞は線維芽細胞との共存により、酪酸誘導アポトーシスを部分的に回避することが判明した。

この回避を誘導する因子を解明するため、線維芽細胞培養上清中に産生される液性因子、サイトカインの影響について検討を行った。酪酸刺激により線維芽細胞の IL-6, IL-8, IL-11 の産生が増加することから、それぞれのサイトカインを酪酸共存 Jurkat T 細胞の培養系に種々の濃度で添加した。その結果、IL-6 または、IL-11 を 10 μ g/ml 濃度で添加した場合、それぞれ、最高 31.2%, 36.4% のアポトーシス誘導阻害が認められた。しかし、IL-8 ではそのような現象は認められなかった。また、酪酸添加で産生量に変化の認められなかった IL-1 などの影響も検討したが、アポトーシスの誘導阻害は認められなかった。IL-6 と IL-11 に対する特異モノクローナル抗体をこの実験系に加えると、それぞれのアポトーシス誘導阻害が低下し、再びアポトーシスが誘導された。これらのことから T 細胞は、線維芽細胞の産生する IL-6 と IL-11 により

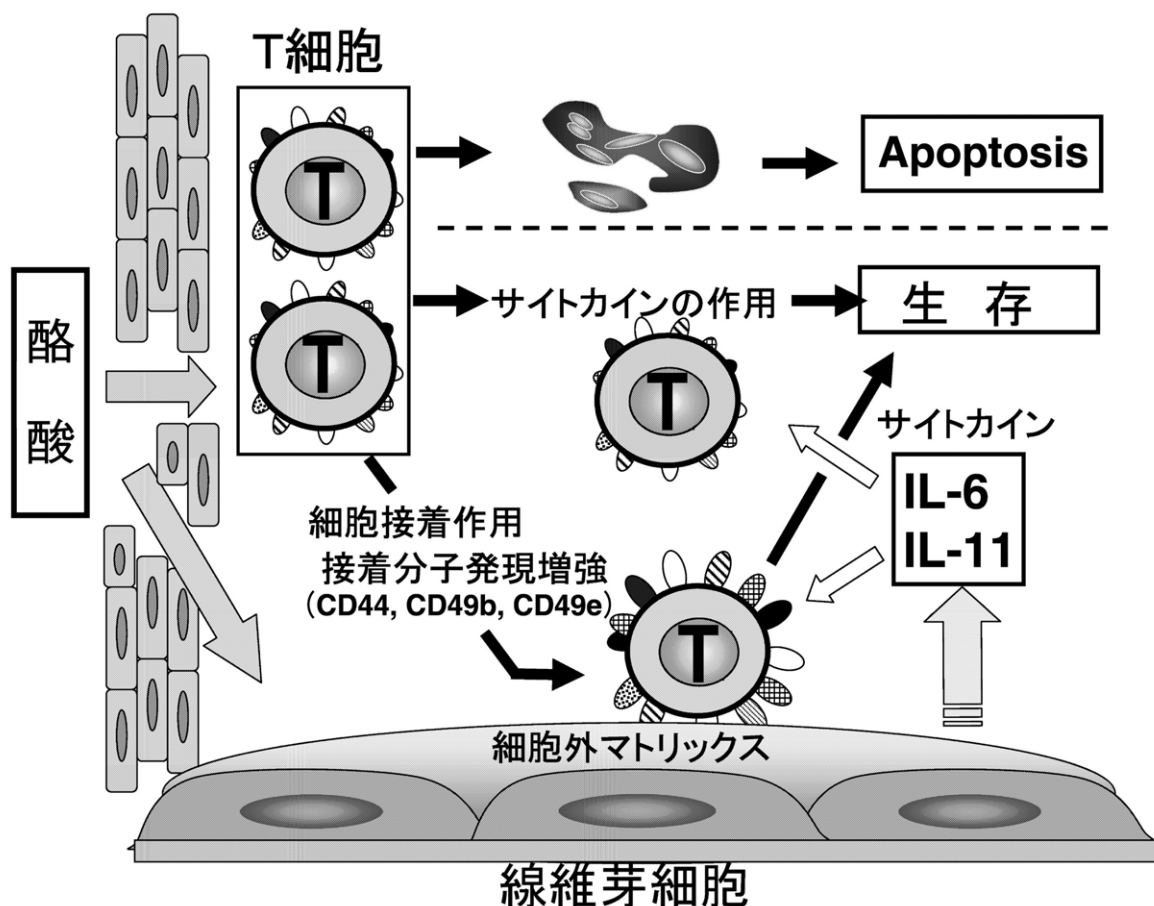
アポトーシスが部分的に回避されることが判明した²⁷⁾。

更に線維芽細胞と T 細胞間の相互作用を更に検討するため以下のような検討を行った。T 細胞が歯周組織や末梢の組織内においても線維芽細胞に付着する事は以前から報告されているが、その意義は解明されていない。線維芽細胞を培養して作成した線維芽細胞シートに接着する T 細胞の数の変化を酪酸添加条件で検討した。実験系に酪酸を添加すると、非添加に比べ接着する T 細胞の数が約 3 倍程度増加した。非接着 T 細胞は全てアポトーシスにより死亡していたにもかかわらず、接着 T 細胞はアポトーシス誘導濃度の酪酸を添加してもほぼ全て生存している結果を得た(第 2 図)。この接着には T 細胞表層の接着分子 CD44, CD49b や CD49e が関与していることが判明した^{28, 29)}。

これら一連の実験から、局所の T 細胞は歯周病原細菌が産生する酪酸刺激により自ら接着分子の産生量を増加させ、線維芽細胞との直接接合を増加させ酪酸の為害作用を回避しているものと思われる。更に、線維芽細胞は IL-6, IL-11 の産生を促進し、接着した T 細胞のみならず、近傍の T 細胞も酪酸の害から守る



第 2 図 細胞接着の酪酸誘導 T 細胞アポトーシスに及ぼす影響

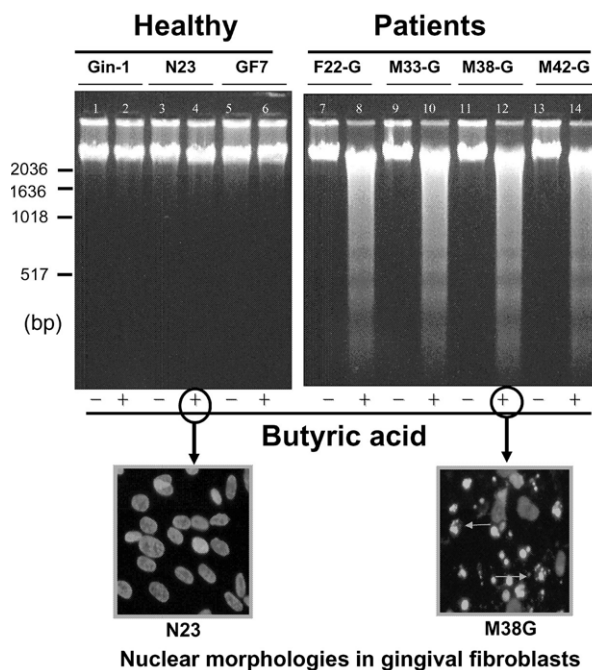


第3図 歯肉線維芽細胞の酪酸感受性の変化

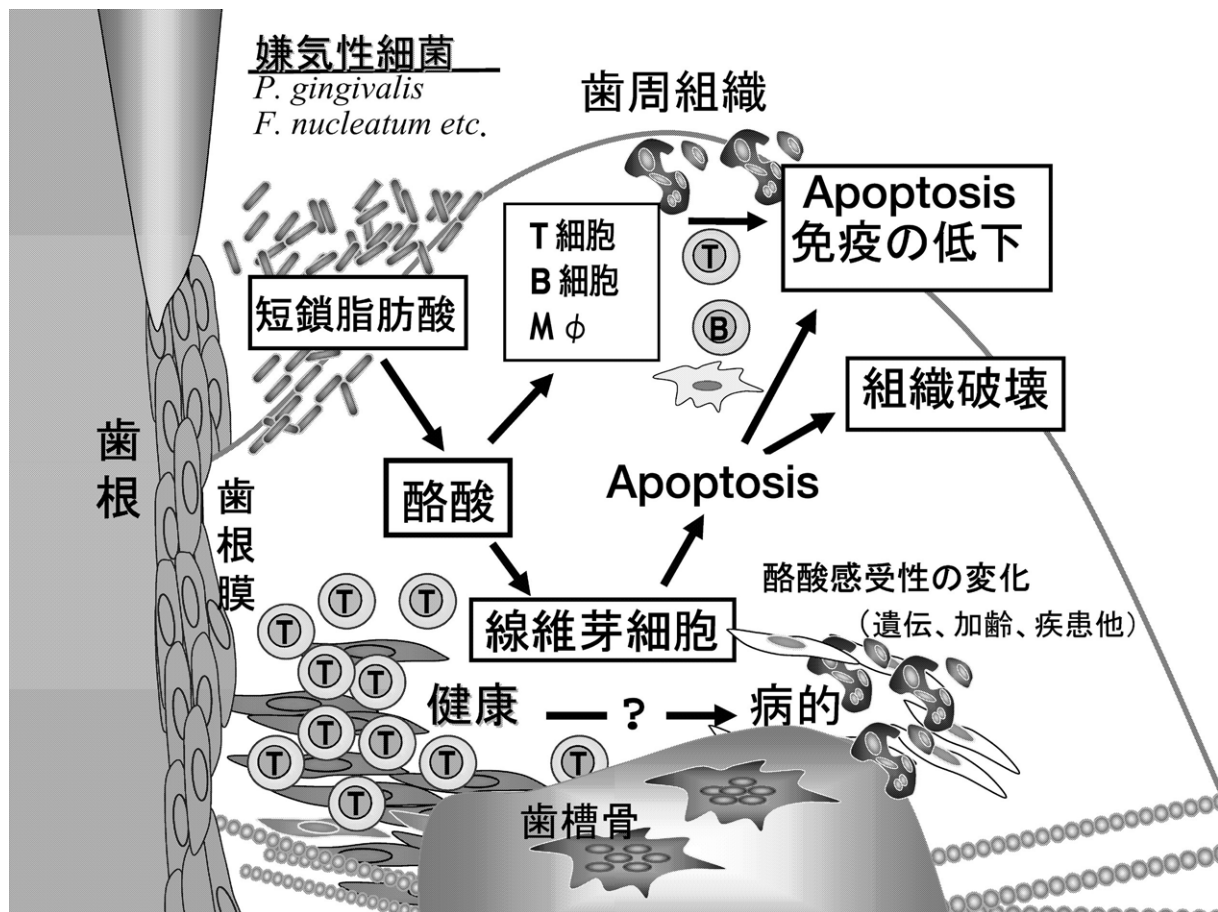
ことにより、歯周組織における正常な免疫応答を維持していると思われる(第3図)。産生増加が見られるこれらの炎症性サイトカインの炎症への影響と T 細胞保護作用については、今後詳細な検討が必要と思われる。

最近我々は、歯周病患者の歯周組織から分離した線維芽細胞は、健康者の歯周組織から分離したそれより酪酸感受性が強く、容易にアポトーシスが誘導される現象を見いだした(第4図)³⁰⁾。組織内に浸潤した酪酸により線維芽細胞が破壊されると、為害作用を回避するためのパートナーを亡くした T 細胞は生存が困難となり、正常な局所免疫応答が誘導されなくなる可能性が示唆される。歯周病患者由来線維芽細胞の酪酸感受性の変化が、遺伝的背景によるものか、加齢に起因するものか、あるいはそれ以外の因子の影響が現在検討中である。

これらの結果から、組織内の T 細胞が粘膜外に棲息する細菌叢の遷移を病原細菌が産生する酪酸の濃度により察知し、その為害作用を細胞間接着により回避



第4図 線維芽細胞による酪酸誘導 T 細胞アポトーシス回避機構



第5図 歯周病における酪酸の為害作用

している可能性がある。一連の酪酸研究から、線維芽細胞が歯周組織の維持のみならず局所の免疫においても重要な役割を果たしていることが判明した(第5図)。歯周病原菌の増加や腸内細菌叢の遷移により過剰に産生された酪酸により血中濃度が上昇した場合、全身的に様々な為害作用が起こる可能性が考えられる。これらの機序の解明は、慢性感染症や慢性疾患発症機序の解明にもつながるかもしれない。末梢の歯周組織内におけるT細胞と線維芽細胞の相互作用は、T細胞の胸腺内分化を連想させ免疫学的にも興味ある現象と思われる。

おわりに

我々の一連の研究から、歯肉溝内嫌気性菌の産生するSCFAは、低分子で容易に歯肉に浸透し多くの細胞に強い為害作用を持つ。しかし、粘膜上皮や線維芽細胞は、その為害作用に低感受性で歯肉を組織学的、免疫学的に正常に維持することができる。むしろ、これ

らの細胞は低濃度刺激により著しく発育が促進されるため、歯肉溝内にもある程度のSCFA産生菌が存在することは有益と思われる。これは、腸管と腸内細菌叢の関係と同じと考えて良い。しかし、過剰な酪酸産生は、細胞周期を早期に停止させることも知られているため、感染防御に重要な重層扁平上皮の維持が困難になり、酪酸は組織に浸透しやすくなる。更に、何らかの理由で口腔粘膜上皮や線維芽細胞が傷害を受けると、酪酸は容易に組織内に浸透し炎症や免疫担当細胞にアポトーシスを誘導する。その結果、歯肉局所の免疫応答に破綻を来し、より一層の細菌増殖と組織破壊が誘導され、局所の細菌は容易に全身に波及する可能性が考えられる。近年、細菌感染とアポトーシスの誘導性との関連が報告されている^{31, 32)}。アポトーシスは終末化したリンパ球の寿命や慢性炎症を起こしたヒト歯肉組織の調節の鍵を握っている。ヒト歯肉におけるアポトーシスのin situでの検出は、この過程が歯周病における炎症のコントロールに関連していることを意味している^{33, 34)}。更に線維芽細胞アポトーシス

の臨床的重要性が付着性の損失すなわち骨の損失に先立つ歯疾病の初期病変として注目されている³⁵⁾。

免疫系の老化は、若年齢から胸腺に始まり T 細胞系に自己認識能の低下をもたらす。その結果、細胞性および体液性免疫が低下しガンや致命的な感染症が増加する。ガンによる直接の死因は、大部分が常在菌による内因感染であることから考えると、「常在菌と共存出来る期間を寿命」といえる。粘膜および皮膚を覆う微生物環境下で進化した生体防御機能は、常に外界との接触により誘導され、その最前線を粘膜面直下に集中した。したがって、個人の「免疫年齢」を最もよく反映するのは粘膜であり、粘膜の観察(診断)から多くの生体情報が得られる。粘膜直下における免疫応答の破綻は、即座に粘膜上の細菌の侵入を許し全身への転移を可能とする。大量の常在菌が棲息する腸管は、生命維持に関係する消化・吸収が行われるため、感染に敏感に反応し急性の下痢などを起こす。しかし、同様に常在菌が多数棲息する口腔は、直接外界と接触するため強固な組織学的、免疫学的生体防御システムにより容易に感染は成立しない。その強固な防御システムを持つ歯肉溝周辺の感染、つまり歯周炎は、宿主全身の生体防御能の低下を意味し、全身的に既に何らかの変化が生じていると考えられる。我々が示した、従来 SCFA 抵抗性の歯肉繊維芽細胞が歯周病の罹患に伴い SCFA 感受性を示すようになった現象も、防御能の低下が既に起こっていることを示唆している。腸管粘膜の診断は容易ではないことから考えると、口腔粘膜(歯肉)は免疫学的にも臨床的にも診断上極めて重要な部位といえる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、自由な発想で研究を行なう機会を与えて頂きました池田正 日本大学名誉教授並びに福島和雄 日本大学研究所教授に感謝いたします。また、一連の研究にご協力を頂きました日本大学歯学部 落合邦康教授、浜松医科大学 瀬戸真太郎博士をはじめとする多くの共同研究者の先生方に感謝いたします。

文 献

- 1) Teng Y-TA, Taylor GW, Scannapieco F, Kinane DF, Curtis M, Beck JD, Kogan S: Periodontal health and systemic disorders. J Can Dent Assoc 63: 188-192, 2002.
- 2) Scannapieco FA: Role of oral bacteria in respiratory infection. J Periodontol. 70: 793-802, 1999.

- 3) Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ: Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. J Periodontol. 71:1554-1560, 2000.
- 4) Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A: Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25:17-18, 2005.
- 5) Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Sato N: Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. Gut, 52: 79-83, 2003.
- 6) Takaishi H, Matsuki T, Nakazawa A, Takada T, Kado S, Asahara T, Kamada N, Sakuraba A, Yajima T, Higuchi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Nomoto K, Tanaka R, Hibi T: Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Int J Med Microbiol, (in press).
- 7) Aimetti M, Romano F, Nessi F: Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. J Periodontol 78: 1718-1723, 2007.
- 8) Kurita-Ochiai T, Ochiai K: Immunosuppressive factor from *Acinobacillus actinomycetemcomitans* down regulates cytokine production. Infect Immun 64: 50-54, 1996.
- 9) Ochiai K, Senpuku H, Kurita-Ochiai T (1998) Purification of immunosuppressive factor from *Capnocytophaga ochracea*. J Med Microbiol, 47: 1087-1095.
- 10) Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K: Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. J Dent Res, 74: 1367-1373, 1995.
- 11) Tonetti M, Eftimiadi C, Damiani G, Buffa P, Buffa D, Botta GA: Short chain fatty acids present in periodontal pockets may play a role in human periodontal diseases. J Periodont Res, 22: 190-191, 1987.
- 12) Niederman R, Buyle-Bodin Y, Lu BY, Robinson P, Naleway C: Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. J Dent Res 76: 575-579, 1997.
- 13) Li QQ, Meng HX, Gao XJ, Wang ZH: Analysis of volatile fatty acids in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue ZaZhi GCF 40: 208-210, 2005.

- 14) Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K : Lipopolysaccharide stimulates butyric acid-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 67: 22-29, 1999.
- 15) Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K : Butyric acid-induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells. *Infect Immun*, 65: 35-41, 1997.
- 16) Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K : Volatile acid, metabolic by-product of periodontopathic bacteria, induces apoptosis in WEHI 231 and Raji B lymphoma cells and splenic cells. *Infect Immun* 66: 2587-2594, 1998.
- 17) Sakai T, Kiyoshima T, Kobayashi I, Moroi R, Ibuki T, Nagadome M, Terada Y, Sakai H: Age-dependent changes in the distribution of BrdU- and TUNEL-positive cells in the murine gingival tissue. *J Periodontol* 70: 973-981, 1999.
- 18) Tonetti MS, Cortellini D, Lang NP : In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infect Immun* 66: 5190-5195, 1998.
- 19) Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K: Butyric acid-induced apoptosis in murine thymocytes and splenic T- and B-cells occurs in the absence of p53. *J Dent Res* 79: 1948-1954, 2000.
- 20) Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K : Butyric-acid-induced T-cell apoptosis is mediated by caspase-8 and -9 activation in a Fas-independent manner. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 325-332, 2001.
- 21) Kurita-Ochiai T, Amano S, Fukushima K, Ochiai K: Cellular events involved in butyric acid-induced T cell apoptosis. *J Immunol* 171: 3576-3584, 2003.
- 22) Kruh J, Defer N, Tichonicy L : Effects of butyrate on cell proliferation and gene expression. Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. (ed) Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T eds, Cambridge University Press, New York, 275-288, 1995.
- 23) Sakata T : Effects of butyrate on cell proliferation of gut epithelial cells *in vivo*. Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. (ed) Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T eds, Cambridge University Press, New York, 289-305, 1995.
- 24) Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Yonezawa H, Ochiai K, Yamamoto M: Characterization of the effects of butyric acid on cell proliferation, cell cycle distribution and apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47: 67-74, 2006.
- 25) Lu HK, Chou HP, Li CL, Wang MY, Wang LF : Stimulation of cells derived from nifedipine-induced gingival overgrowth with *Porphyromonas gingivalis*, lipopolysaccharide, and interleukin-1beta. *J Dent Res* 11: 1100-1104, 2007.
- 26) Minami T, Kuroishi T, Ozawa A, Shimauchi H, Endo Y, Sugawara S : Histamine amplifies immune response of gingival fibroblasts. *J Dent Res* 86: 1083-1088, 2007.
- 27) Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K, Fukushima K: Human gingival fibroblasts rescue butyric acid-induced T-cell apoptosis. *Infect Immun* 70: 2361-2367, 2002.
- 28) Kurita-Ochiai T, Seto S, Fukushima K, Ochiai K : Role of cell-cell communication in abrogating butyric acid-induced T cell apoptosis. *Infect Immun* 72: 5947-5954, 2004.
- 29) Ochiai K, Kurita-Ochiai T : Short-chain fatty acids-induced apoptosis modulates immunoresponse; Role of cell to cell communication in inhibiting butyric acid-induced T-cell apoptosis. *Bioscience and Microflora* 24: 91-95, 2005.
- 30) Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, Yamamoto M, Abe K, Ochiai K: Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* (in press).
- 31) Kronenberger B, Wagner M, Herrmann E, Mihm U, Piiper A, Sarrazin C, Zeuzem S: Apoptotic cytokeratin 18 neoepitopes in serum of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 12: 307-314, 2005.
- 32) Cheng Y, Chaturvedi R, Asim M, Bussiere FI, Scholz A, Xu H, Casero RA Jr, Wilson KT: *Helicobacter pylori*-induced macrophage apoptosis requires activation of ornithine decarboxylase by c-Myc. *J Biol Chem* 280: 22492-22496, 2005.
- 33) Gamonal J, Bascones A, Acevedo A, Blanco E, Silva A: Apoptosis in chronic periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. *J Periodontol* 72: 517-525, 2001.
- 34) Jewett A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, Shi W: Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun* 68: 1893-1898, 2000.
- 35) Ekuni D, Tomofuji T, Yamanaka R, Tachibana K, Yamamoto T, Watanabe T: Initial apical migration of junctional epithelium in rats following application of lipopolysaccharide and proteases. *J Periodontol* 76: 43-48, 2005.