

研究者：沖田 楓（所属：九州歯科大学 歯学研究科 口腔健康学専攻）

研究題目：マクロファージに貪食された歯周病原細菌 Persister の生理的動態解明

目的：

歯周病の原因となる細菌には、Persister 菌と呼ばれる抗生物質に対する高い抵抗性と高い生存力を持つ菌が存在する。細菌が Persister 化している場合、マクロファージの食作用を回避し継続的な炎症性サイトカイン産生を促し、これが歯周病の慢性化や再発の原因であると考えられる。歯周病原細菌の Persister 化の生理的動態の解明する事により、近年増加している慢性歯周炎の関連とともに治療や予防への貢献を目的とする。

対象および方法：

本研究では限局性侵襲性歯周炎の起炎菌とされている *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 をターゲットとして実験を行う。ヒト単球性白血病由来細胞である THP-1 に PMA（ホルボール 12- ミリスタート 13- アセタート）を一晩刺激して、PBS で洗浄したのちに、5% FBS 添加 RPMI1640 培養液で 2 日間培養する。マクロファージに分化させた *A. actinomycetemcomitans* Y4 を THP-1 細胞に感染させる菌数や時間の適切な条件を調べる。通常のアクティブな状態である *A. actinomycetemcomitans* Y4 と、薬剤処理を生存した Persister それぞれを免疫細胞であるマクロファージに侵入させることで、マクロファージ内での生存率の違いを調べる。

結果および考察：

1. マクロファージに貪食させる *A. actinomycetemcomitans* Y4 の Multiplicity of Infection (MOI) と侵入時間の決定

マクロファージ細胞に貪食させる適切な *A. actinomycetemcomitans* Y4 の菌数と時間を決定するため、マクロファージ細胞に対して、*A. actinomycetemcomitans* Y4 を MOI : 0, 10, 100, 1000, 10000 の条件でそれぞれ感染させ、その後マクロファージ細胞を回収し、マクロファージを 1% TritonX-100 溶液で細胞溶解してマクロファージ細胞内の細菌を取り出し、それらを寒天培地に播種して細菌数をカウントした。また、同様の方法でマクロファージ細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4 を 30 分、1 時間、3 時間のそれぞれの時間で侵入させたのち、細胞内の細菌を取り出して、寒天培地に播種してカウントした。その結果、MOI が 1000 で最も多くの細菌数が取り込まれており（図 1A）、侵入時間 30 分の条件で十分な細菌数が細胞内で確認された（図 1B）。今回の実験でマクロファージに感染させる *A. actinomycetemcomitans* Y4 の条件は MOI 1000、30 分が適切であることが分かったため、今後のマクロファージの侵入実験に適用することとなった。

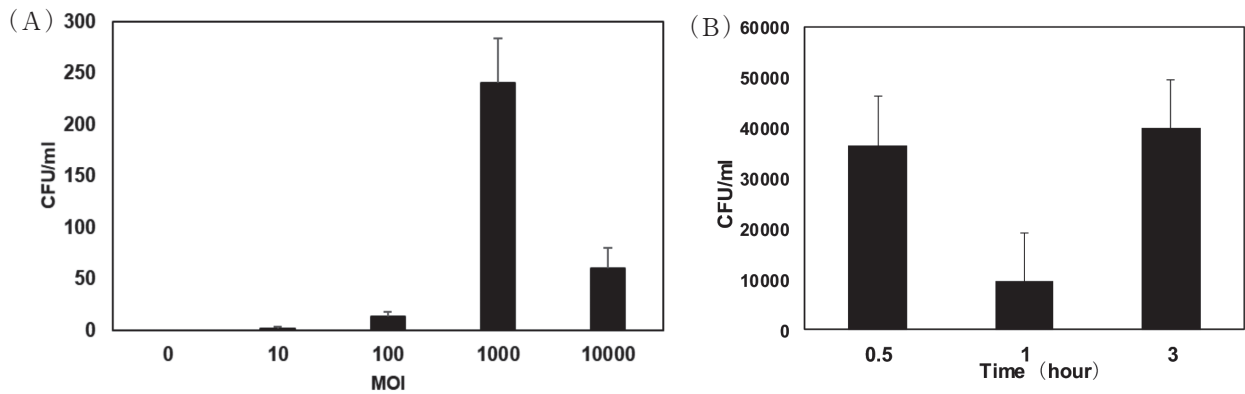


図1 マクロファージに侵入させる *A. actinomycetemcomitans* Y4 の細菌数および侵入時間の検討

2. 通常活性状態の *A. actinomycetemcomitans* Y4 のマクロファージ細胞内での生存率

次に、通常活性状態の *A. actinomycetemcomitans* Y4 のマクロファージ細胞内での生存率について調べるため、MOI 1000 の細菌を 30 分間マクロファージ細胞に感染させた。その後マクロファージ細胞外の細菌を gentamycin 添加した培養液 (RPMI1640) で除去したのちに、再度 30 分、1 時間、3 時間培養し、細胞溶解して細胞内の細菌を取り出して、各時間でどの程度細菌が生存

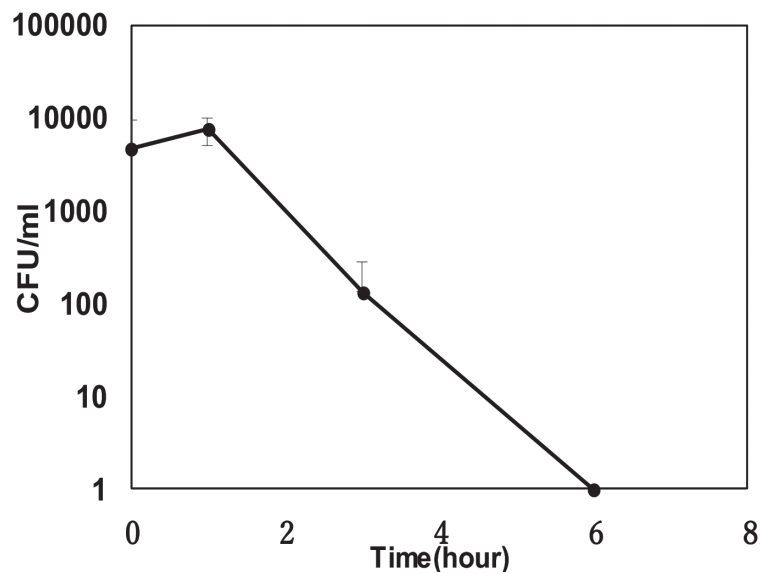


図2 マクロファージ細胞内での通常活性状態の *A. actinomycetemcomitans* Y4 の生存率

しているか、寒天培地に播種してカウントした。その結果、6 時間の時点でマクロファージ細胞内の細菌の存在がみられなかった (図2)。そのため、通常活性状態の *A. actinomycetemcomitans* Y4 のマクロファージ細胞内での生存時間は 6 時間で完全に死滅していることが分かった。

3. Persister 化した *A. actinomycetemcomitans* Y4 のマクロファージ細胞内での生存率

通常活性状態の *A. actinomycetemcomitans* Y4 のマクロファージ細胞内の生存時間は 6 時間以内であることが分かった。この結果に対して、Persister 化させた *A. actinomycetemcomitans* Y4 のマクロファージ細胞内での生存率を調べて、通常活性状態との生存率の差を調べる。*A. actinomycetemcomitans* Y4 の Persister 化は、0.06% 過酸化水素を *A. actinomycetemcomitans* Y4 に 3 時間処理したのち、PBS で洗浄して行った。Persister 化した細菌は、通常活性状態の細菌と同様の方法で実験を行い、マクロファージ細胞内での生存率を調べた。その結果、どの時間においても、播種した寒天培地でコロニーの形成は確認できなかった (図3)。そのため、Persister 化した *A. actinomycetemcomitans* Y4 はマクロファージ細胞への侵入ができないことが示唆された。

今回の研究から、通常活性状態の *A. actinomycetemcomitans* Y4 のマクロファージ細胞内での生存時間は6時間以下であることに対し、Persister 化した *A. actinomycetemcomitans* Y4 はマクロファージ細胞内での存在が認められなかった。

Persister 菌は、遺伝子の変化を伴わずに活動を停止する休眠状態になって生き残り、抗生物質などの薬剤に対して耐性を示すことがこれまでの研究により明らかとなっている。そのため今回の実験においても、*A. actinomycetemcomitans* Y4 を Persister 化することにより、休眠状態のためにマクロファージ細胞からの貪食を回避している可能性が考えられる。しかしこれらの可能性については、さらに *A. actinomycetemcomitans* Y4 の Persister 菌の貪食実験や、通常活性状態の細菌と Persister 菌の炎症性サイトカインの産生についての違いについて実験を行い、これらの特性について検討が必要であると考ええる。

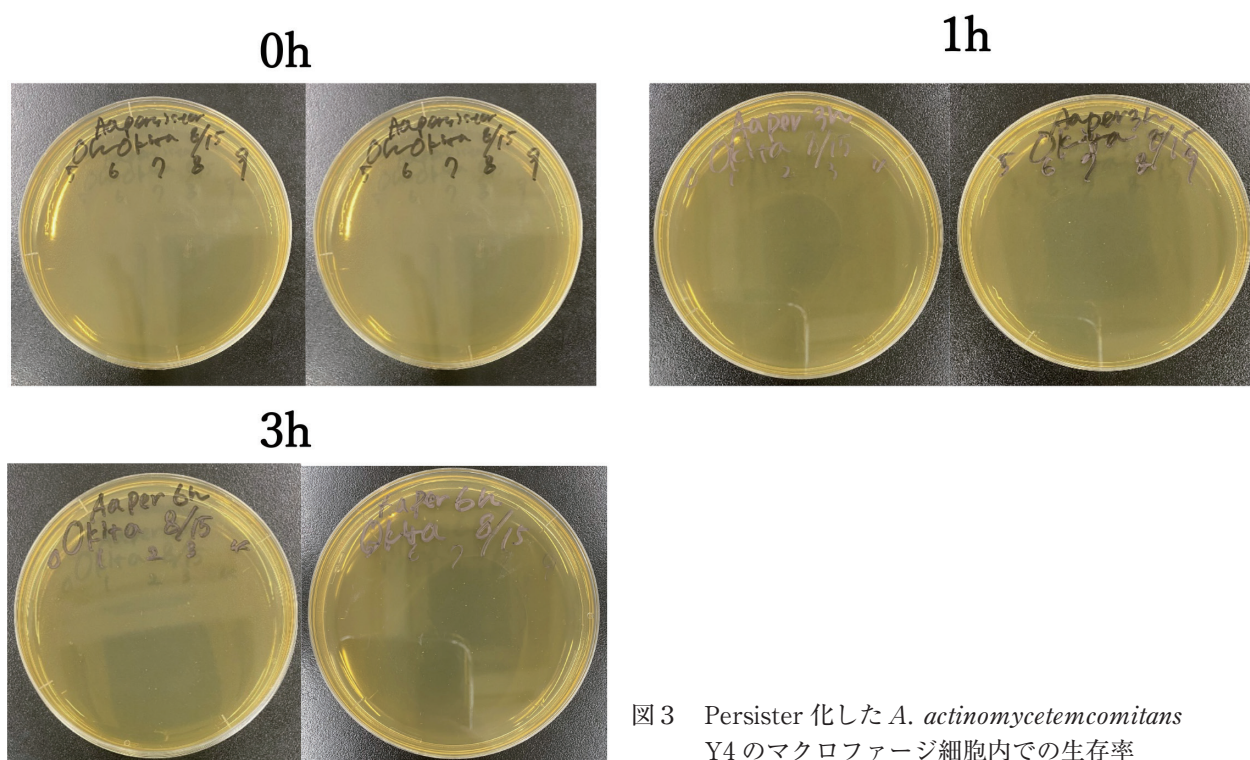


図3 Persister 化した *A. actinomycetemcomitans* Y4 のマクロファージ細胞内での生存率

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

1. Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2022

Physiological dynamics of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Persister phagocytosed by macrophages, Kaede Okita, Ryota Yamasaki, Yohei Nakamura, Yoshie Yoshioka, Wataru Ariyoshi

2. 九州微生物研究フォーラム 2022

細菌“Persister”と歯周病持続化の関連、山崎亮太、中村鷹平、沖田 楓、吉岡香絵、有吉 渉

3. 第65回歯科基礎医学会学術大会 2023年9月

ポスター発表予定