

食塩の過剰摂取による歯周病発症機構の解明

泉福 英信, 中尾 龍馬

国立感染症研究所細菌第一部

概要

歯周病は生活習慣病である一方、*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella denticola* などの口腔内嫌気性菌が歯周組織内に感染し、慢性的な炎症の結果、歯槽骨の吸収を起こす口腔感染症である。歯周病になると、その他の全身疾患(糖尿病, 脳血管疾患, 心臓病など)が起こりやすくなることが危惧されている。よって、歯周病の発症メカニズムを明らかにすることは重要である。日和見菌として口腔でも検出される黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)は、感染性心内膜炎の原因や肺炎の原因として報告されている。塩は、食品の味付けに使用される一方、ヒトの体内細胞の維持に必要な必須ミネラル成分の一つである。しかし近年の研究結果から、塩分の過剰摂取が病原性の 17 型ヘルパーT 細胞(Th17)を誘導することで、腸マイクロバイオーームに影響を与え、乳酸菌 *Lactobacilli* を減少させることが報告された。*Lactobacilli* は口腔常在菌であり、歯周病菌とは相反する菌である。そこで、塩の過剰摂取が口腔の *Lactobacilli* を減少させ、歯周病菌が感染し易い状況をつくるのではないかと考え、高塩食をマウスに摂取させて口腔細菌叢がどのように変化するか検討を行った。4%塩分が含まれた飼料をマウスに毎日食べさせると、摂取後 14 日目ぐらいから 0.5%の食塩食(通常食)に比べ歯表面の *Lactobacillus* の減少、*Staphylococcus* の増加が観察された。高塩食を 14 日間食べさせたマウスの口腔に *P. gingivalis* を感染させると、嫌気性菌数の増加が認められた。また、日和見菌である *Staphylococcus* も増加していた。特に、少子高齢化社会である現在の日本において、*Staphylococcus* のような日和見菌の増加は誤嚥性肺炎の発症に関わり、嫌気性菌の増加は歯周病発症に関わる。高塩食の連日の摂取は 150 日まで続き、*lactobacillus* 菌数の低下に繋がり、口腔フローラの変質、*P. gingivalis* の感染により歯周病菌を含む嫌気性菌の増加により歯周病を誘導する可能性がある。高塩食の連日の摂取は口腔疾患や口腔を介する全身疾患発症に繋がることになるため、塩分を控えるか高塩食の連日摂取をやめるなど、バランスのよい食生活が重要であることが示唆された。

1. 研究目的

歯周病は生活習慣病である一方、*P. gingivalis*, *P. denticola* などの歯周病関連菌が歯周組織内に感染し、慢性的な炎症の結果、歯槽骨の吸収を起こす口腔感染症である⁽¹⁾。その慢性的な炎症は、糖尿病、心疾患や動脈硬化などの全身疾患をも引き起こすことが明らかとなっている⁽²⁾。近年、少子高齢化が起こり、高齢者比率が増加することにより、増々歯周病疾患患者が増え、早急な歯周病予防対策が必要とされている。マウスにおける塩分の過剰摂取が病原性の 17 型ヘルパーT 細胞(Th17)を誘導する

ことで、腸マイクロバイオーームに影響を与え、乳酸菌 *Lactobacilli* を減少させることが近年報告された⁽³⁾。これが自己免疫疾患である脳脊髄炎や高血圧を発症させることがマウスにおいて明らかになった。また他のグループでは、歯周病の発症メカニズムに Th17 細胞が関与していることが明らかになった⁽⁴⁾。よって、塩分の過剰摂取が Th17 細胞を誘導し、口腔内の *Lactobacillus* sp. を減少させ、*P. gingivalis* などの感染を促し、歯周病を発症させる可能性が考えられる。また *Lactobacillus* は、プロバイオティクスとして口腔に接種することで歯周病を予防するという報告

もなされており⁽⁵⁾, 状況証拠としてこれらの報告は, 塩分の過剰摂取と歯周病発症との関係性があることを示している。以前の補助研究で, 高濃度の塩分が *Staphylococcus* spp. のバイオフィルム形成を誘導することを明らかにした。これらの結果から, 塩分の過剰摂取が歯周病の発症, 口腔内日和見菌の増加に繋がっている可能性が考えられた。そこで, 本研究では, これらの状況証拠を研究により科学的に証明していくことを目的とし計画した。

2. 研究方法

2. 1. 使用菌株

P. gingivalis ATCC332377

2. 2. マウスへの飼料

通常量(0.5% NaCl)か高塩量(4% NaCl)の飼料をマウスに食べさせて飼育する。

2. 3. マウス口腔内フローラ解析

2週間, 通常量(0.5% NaCl)か高塩量(4% NaCl)の飼料を食べさせたマウスから唾液試料を採取する。唾液中微生物から DNA を採取し, 16S シークエンスを用いた細菌叢解析を行い, どのような微生物グループが存在しているか解析する。

2. 4. マウス口腔内への *P. gingivalis* の接種

高塩量(4% NaCl)の飼料を食べさせたマウスから *Lactobacillus* group の菌量が減少していることを確認する。*Lactobacillus* group の菌量が減少していることを確認後, そのマウスに *P. gingivalis* を口腔内に1日2回接種する。

2. 5. マウス口腔内 *P. gingivalis* および *S. aureus* の感染の確認

唾液および口腔内スワブ試料を用いて, それぞれの菌の選択培地にそれらの飼料を接種し, 培養後菌のコロニー数を計測する。

2. 6. Treg 細胞の検討

通常量(0.5% NaCl)か高塩量(4% NaCl)の飼料を食べさせたマウスから頸部リンパ節, 脾臓からリンパ球を採取する。それらのリンパ球に抗 CD3-FITC, 抗 CD4-APC-Vio770, 抗 CD25-VioBlue, 抗 FoxP3-PerCP-Cy5.5 などを用いて反応させ, Treg 細胞の存在を FACS にて解析する。

3. 研究結果

3. 1. 4%食塩食と通常食のマウス体重への影響

6週齢 BALB/c マウスメスに4%食塩含む飼料と通常食(0.5%食塩含む)を与え, 観察し, 口腔内細菌叢を調べ, 高塩食の口腔細菌叢への影響を検討した。唾液や歯表面スワブサンプルを使用した。さらに, *P. gingivalis* の口腔接種の影響も検討した。検討スケジュールを, **Fig. 1** に示した。

体重は, 4%食塩食を摂取しているマウスと普通食を摂取しているマウスとで大きな差は認められなかった(**Fig. 2**)。この結果, 4%食塩の影響は体重に関して認められなかった。

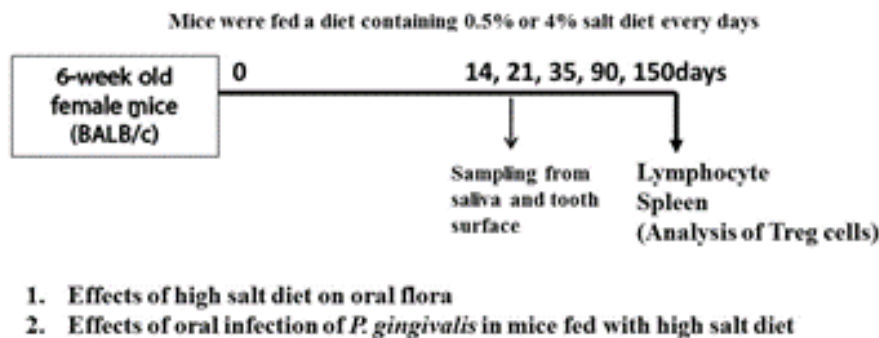


Fig. 1 Time schedule of intake of salt diet and sampling

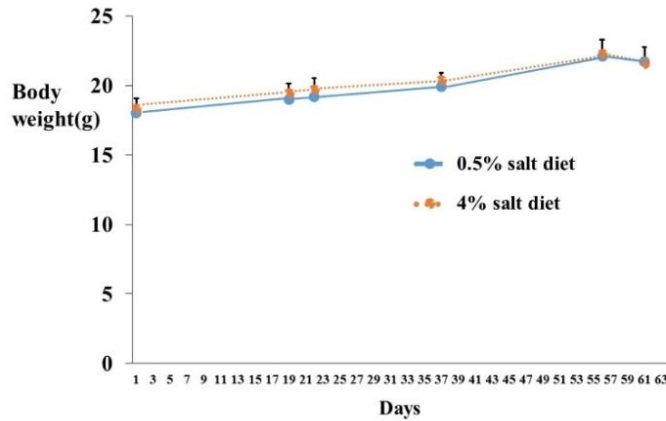


Fig. 2 Effects of 0.5% or 4% salt intake on body weight

3. 2. 4%食塩食と通常食のマウス口腔細菌への影響 (接種後21日目)

唾液と歯表面スワブサンプルにおける *Lactobacillus*, 総菌, 総連鎖球菌への 4% 食塩食による影響を通常食と比較しながら行った。その結果, すべての菌において有意差は認められなかった (Fig. 3)。しかし, 唾液と歯表面サンプルで比較すると, 歯表面の方はばらつきが少なかった。ばらつきの影響がより小さくするために, 総菌で *Lactobacillus* の菌量を割り算した。その結果を比較すると, 4% 食塩食の効果は認められなかったが, 歯表面の方は唾液よりもばらつきがより小さくなった (Fig. 4)。

今後のサンプル採取は歯表面で行うことにした。

3. 3. 4%食塩食と通常食のマウス口腔細菌への影響 (摂取後 35 日目)

4% 食塩食の影響を普通食と比較しながら口腔微生物への影響において, 摂取してから 35 日目の検討を行った。

その結果, 4% 食塩食は, *Lactobacillus* において有意差はなかったが, 総菌数が有意に通常食よりも増加していた (Fig. 5)。

Lactobacillus 菌数を総菌数で割り算した結果, 4% 食塩食の方が有意に通常食よりも減少していた (Fig. 6)。このことから, 高塩食は, 全体の菌数に対して *Lactobacillus* 菌の比率を下げていることが考えられた。

Lactobacillus の菌量は, *Lactobacilli* MRS 寒天培地を用いて行った。培地上のコロニーに 2 種類が存在していた (Fig. 7)。そこで, その 2 種類の菌を培養し, グラム染色後菌の形態を観察した。その結果, 連鎖球菌の A と桿菌の B が認められた (Fig. 7)。 *Lactobacillus* は桿菌の形態を有しており, B が *Lactobacillus* であることが推測された。よって, *Lactobacilli* MRS 寒天培地で計測された菌数は *Lactobacillus* の菌数に依存していると考えられた。

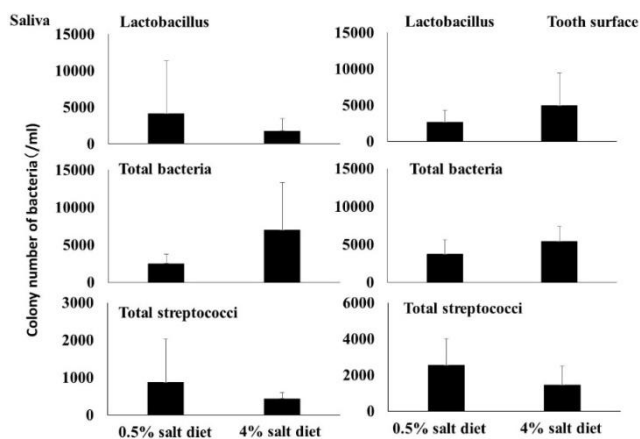


Fig.3 Effects of 0.5% or 4% salt intake on oral bacteria (21 days)

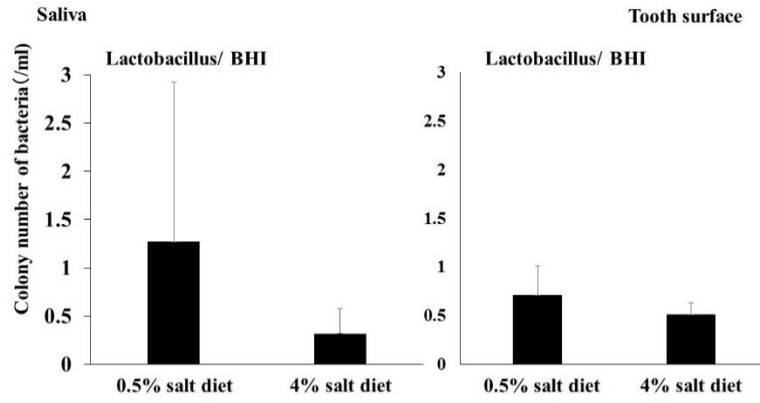


Fig. 4 Effects of 0.5% or 4% salt intake on *Lactobacillus* (21 days)

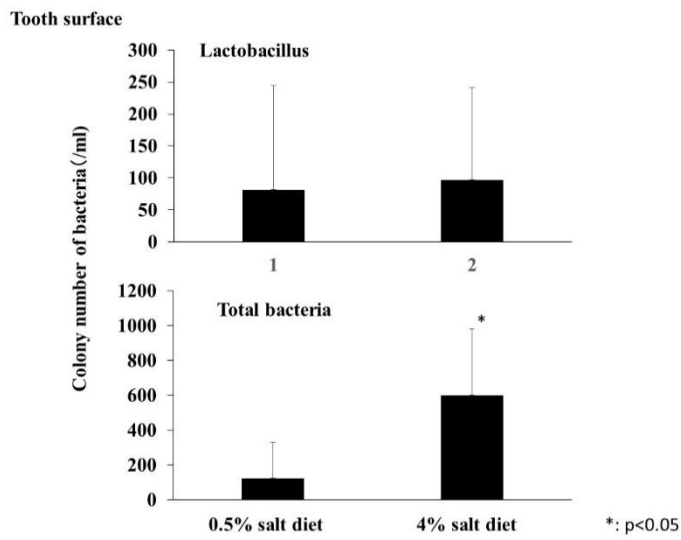


Fig. 5 Effects of 0.5% or 4% salts intake on *Lactobacillus* and total bacteria (35 days)

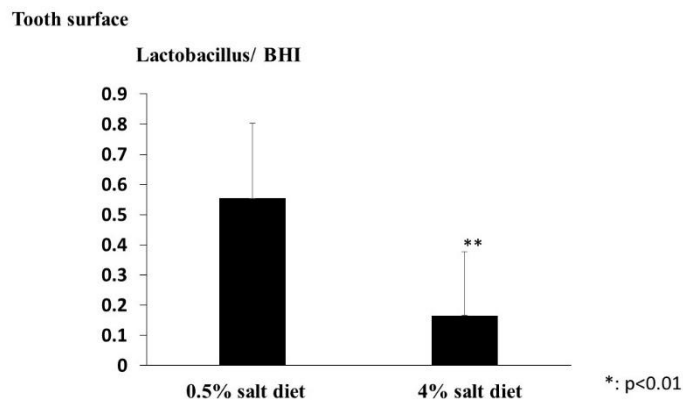


Fig. 6 Effects of 0.5% or 4% salt intake on rates of *Lactobacillus* and total bacteria (35 days)

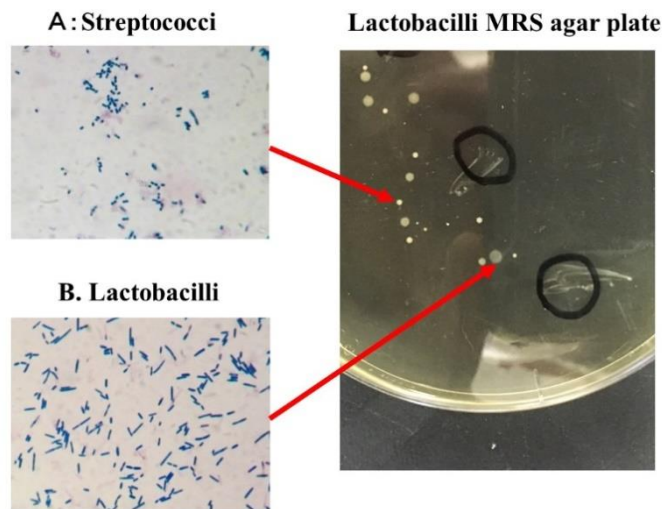


Fig. 7 Observation of colony on the Lactobacilli MRS agar plate (35 days)

3. 4. 4%食塩食と普通食のマウス口腔細菌への影響 (接種後14日目と35日目の比較)

新しいマウスグループを用いて、4%食塩食摂取後14日目と35日目の口腔細菌への影響を通常食と比較しながら検討を行った。歯表面スワブサンプルを用いて、口腔細菌量を検討した。摂取後14日目と35日目の総菌数に大きな差が無く、4%食塩食が普通食より多い傾向が見られるが有意差はなかった(Fig. 8)。総連鎖球菌について検討を行った。こちらにおいても、摂取後14日目と35日

目における差や通常食(0.5%食塩を含む)と4%食塩食に有意差はなかった(Fig. 9)。Lactobacillusについて検討を行った。その結果、摂取後35日目において、4%食塩食が通常食よりもLactobacillusの量が有意に減少していることが明らかとなった(Fig. 10)。摂取後14日目では、そのような減少は認められなかった。総菌に対するLactobacillusの比率を計算すると、摂取後14日目も35日目も通常食よりも4%食塩食の方が、その比率は減少したが、摂取後35日目で有意差が認められた(Fig. 11)。

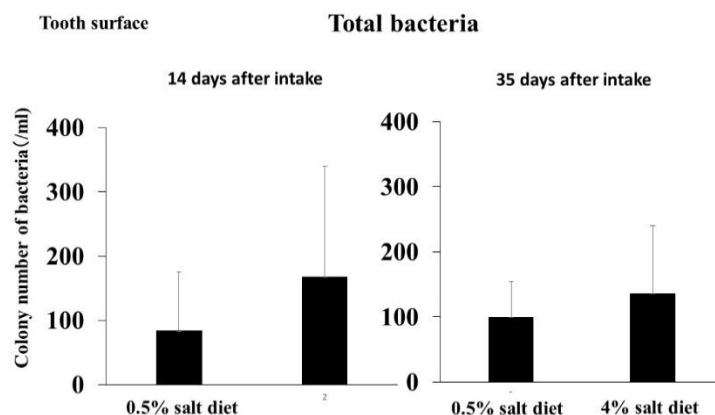


Fig. 8 Effects of 0.5% or 4% salt intake on total bacteria (14 and 35 days)

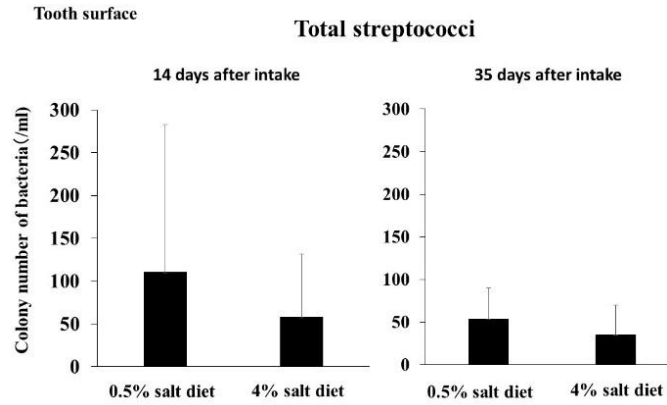


Fig. 9 Effects of 0.5% or 4% salt intake on total streptococci (14 and 35 days)

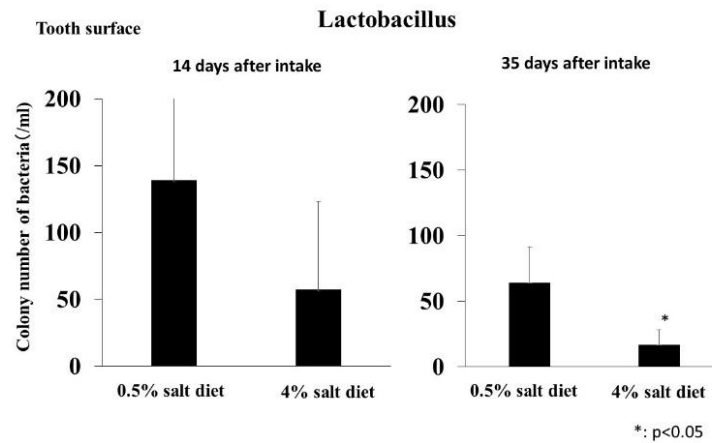


Fig. 10 Effects of 0.5% or 4% salt intake on *Lactobacillus* (14 and 35 days)

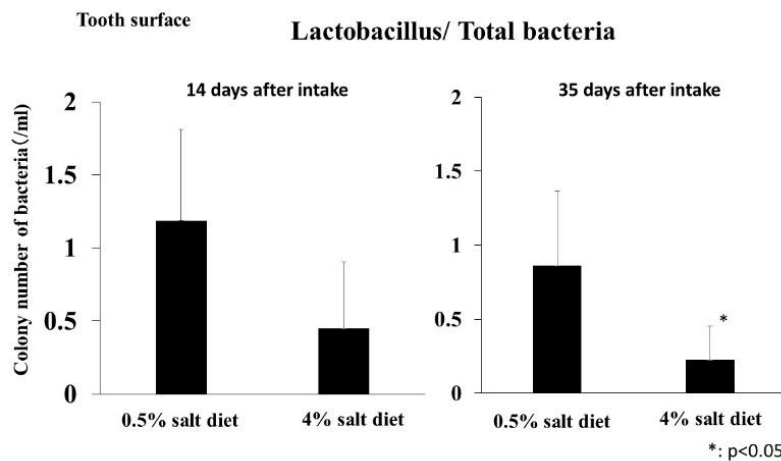


Fig. 11 Effects of 0.5% or 4% salt intake on rates of *Lactobacillus* and total bacteria (14 and 35 days)

ここまでの結果、4%食塩食を毎日摂取することで、14日目から *Lactobacillus* が他の口腔細菌と比較して減少してきていることが明らかとなった。この *Lactobacillus* の減少

が他の菌の感染を助長するか検討すると、4%食塩食は通常食よりも *Staphylococcus* の菌量が多くなることが明らかとなった (Fig. 12)。しかし、この菌量増加に有意差はなかつ

た。さらに、総菌に対する *Staphylococcus* の比率を計測すると、4%食塩食で通常食よりも有意に上昇することが明らかとなった (Fig. 13)。よって、高塩食の影響が *Lactobacillus* の減少に繋がり、それと伴い *Staphylococcus* の感染増加を導いている可能性が考えられた。

歯周病細菌である *P. gingivalis* を摂取後 14 日目のマウスに接種した。その結果、血液寒天培地で培養した嫌気性菌数と *Staphylococcus* の菌量が通常食よりも 4% 食塩食

で増量することが明らかになった (Fig. 14)。これらのように、*P. gingivalis* の口腔内接種により、高塩食を摂取している方が通常食よりも、口腔内の嫌気性菌や *Staphylococcus* を増加させることが示唆された。*P. gingivalis* は嫌気性菌である。よって、高塩食は *Lactobacillus* を減少させて、*P. gingivalis* を含む嫌気性菌の感染や *Staphylococcus* の感染を導く可能性がある。

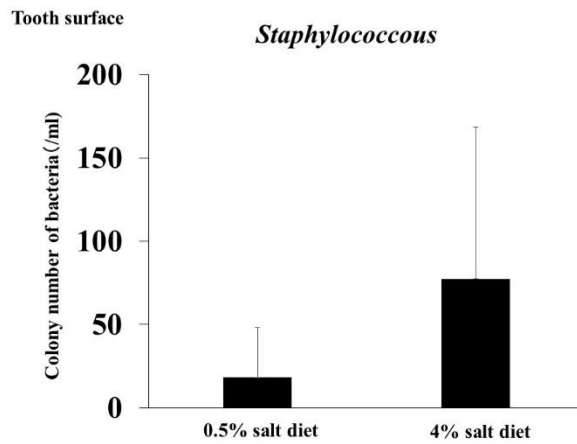


Fig. 12 Effects of 0.5% or 4% salt intake on *Staphylococcus* (14 days)

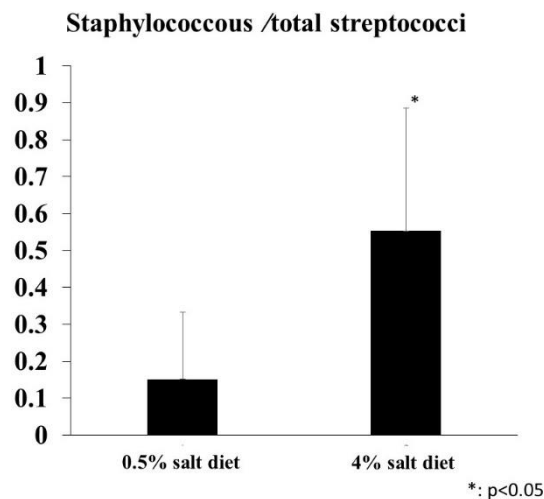


Fig. 13 Effects of 0.5% or 4% salt intake on rates of *Staphylococcus* and total streptococci (14 days)

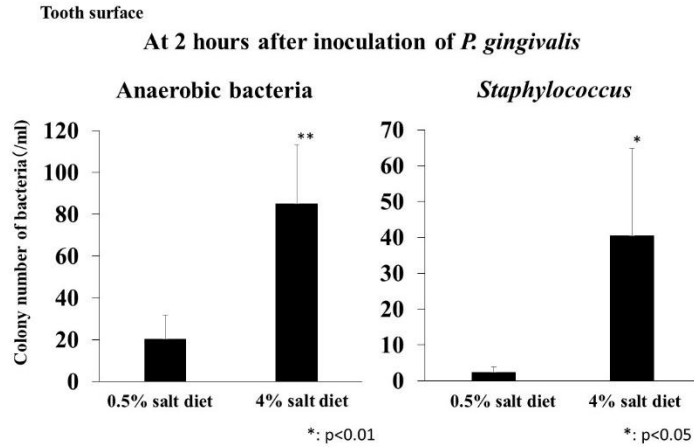


Fig. 14 Effects of 0.5% or 4% salt intake on anaerobic bacteria and *Staphylococcus* (14 days)

3. 5. 4%食塩食と通常食のマウス口腔細菌への影響 (接種後 90 日目)

4%食塩食の影響を通常食と比較しながら口腔微生物への影響において、摂取してから90日目の検討を行った。その結果、4%食塩食は、有意差はないが通常食よりも *Lactobacillus* が減少していた (Fig. 15)。総菌に対する *Lactobacillus* の比率を計算すると、通常食よりも4%食塩食の方が、その比率は有意に減少した (Fig. 16)。4%食塩食は、総連鎖球菌において有意差はないが、通常食と比

較して菌量を減少させていた (Fig. 17)。*Staphylococcus* 菌量に対する影響も、摂取してから14日目と同様に、通常食よりも4%食塩食の方が有意に *Staphylococcus* の上昇が認められた (Fig. 18)。*P. gingivalis* の口腔への接種実験においても、接種前と後で口腔内嫌気性菌数を比較すると、接種前は通常食と比較して4%食塩食を摂取すると、嫌気性菌が有意に減少するが、接種後は通常食よりも4%食塩食摂取の方が有意に嫌気性菌数が上昇するのが認められた (Fig. 19)。

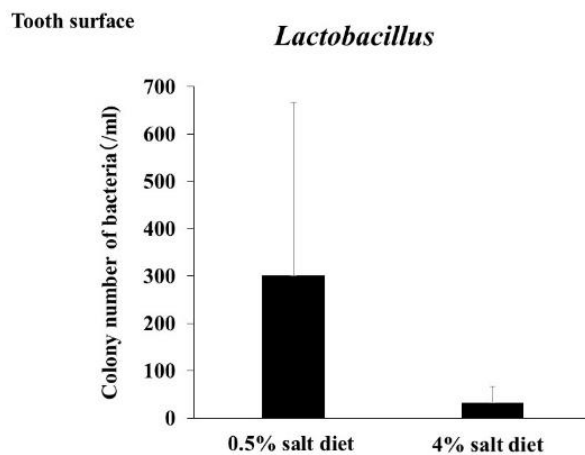


Fig. 15 Effects of 0.5% or 4% salt intake on *Lactobacillus* (90 days)

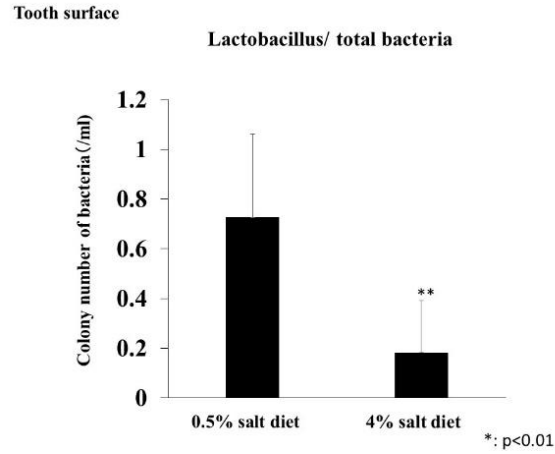


Fig. 16 Effects of 0.5% or 4% salt intake on rates of *Lactobacillus* to total bacteria (90 days)

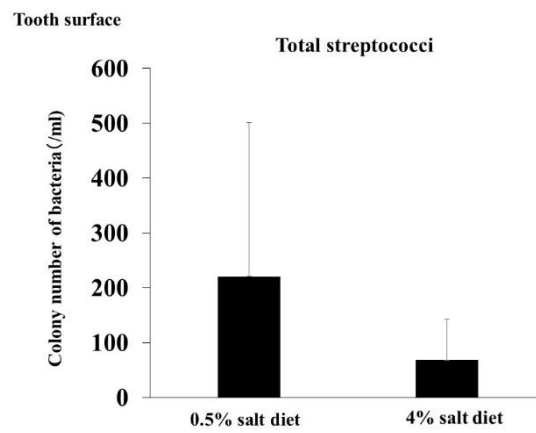


Fig. 17 Effects of 0.5% or 4% salt intake on rates of total streptococci (90 days)

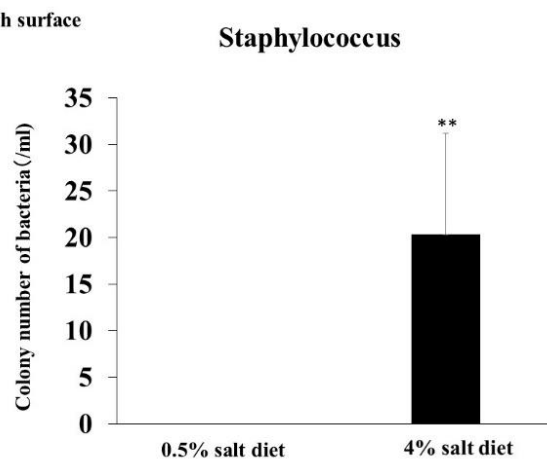


Fig. 18 Effects of 0.5% or 4% salt intake on rates of *Staphylococcus* (90 days)

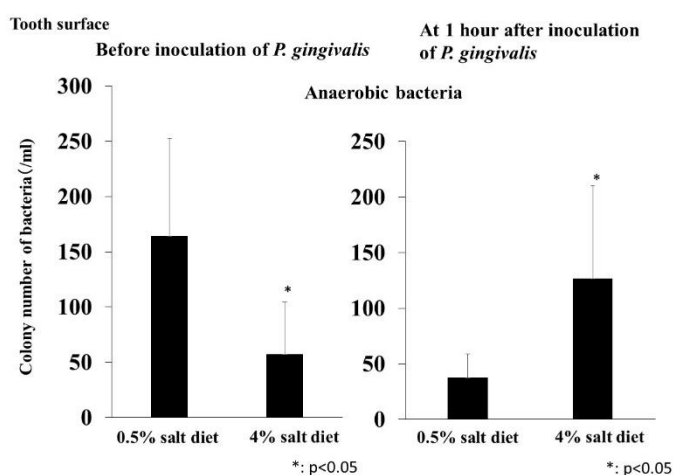


Fig. 19 Effects of 0.5% or 4% salt intake on rates of anaerobic bacteria (90 days)

3. 6. 4%食塩食と通常食のマウス口腔細菌叢への影響 (接種後 90 日目)

4%食塩食と通常食 90 日目のマウス口腔細菌叢を次世代シーケンサーを用いて検討を行った。通常食と 4%食塩食を摂取したマウスの口腔細菌叢は大きく異なることが明らかとなった (Fig. 20)。通常食よりも 4%食塩食で、*Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Clostridiaceae*, *Turicibacter*, *Lactobacillus* の比率が低下することが明らかとなった。一

方, *Aerococcaceae*, *Staphylococcus sciuri*, *Jeotgalicoccus psychrophilus*, *Corynebacterium stationis* の比率は上昇することが明らかとなった。培養法で明らかになった結果と同様に, *Lactobacillus* の比率が低下し, *Staphylococcus* の比率が上昇していた。この結果からも, 高塩分食は, 口腔細菌叢に変化を与え, *Lactobacillus* を減少させ *Staphylococcus* を増加させることが明らかとなった。

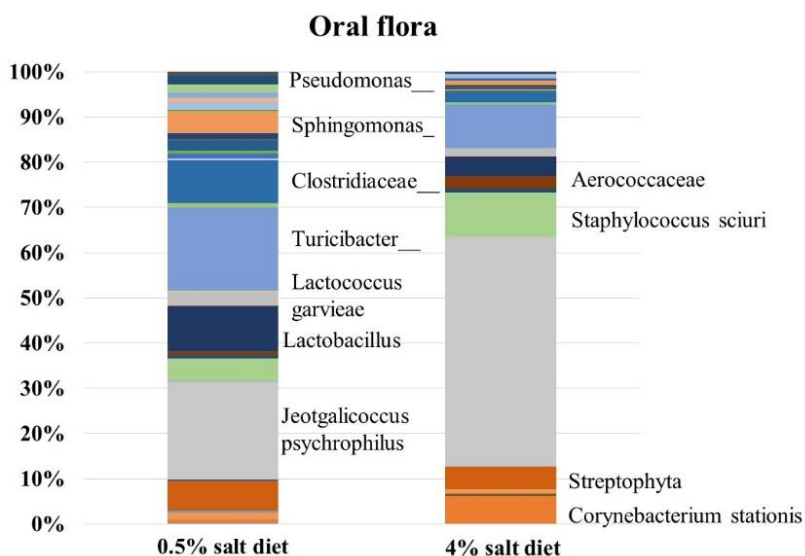


Fig. 20 Effects of 0.5% or 4% salt intake on oral flora (90 days)

3. 7. 4%食塩食と通常食のマウス Treg 細胞の比率(接種後 150 日目)

マウスにおける塩分の過剰摂取が病原性の 17 型ヘルパーT 細胞(Th17)を誘導することで、腸マイクロバイオータに影響を与え、乳酸菌 *Lactobacilli* を減少させることが近年報告されている⁽³⁾。この Th17 は Treg 細胞に制御を受けていることが明らかとなっている。また、Treg 細胞の免疫抑制能を担うのは転写因子である Foxp3 であることが明らかになっている。この Foxp3 陽性 T 細胞が免疫抑制能を持ち、Th17 の制御に関わっていることが考えられる。そこ

で、末梢である脾臓細胞における Foxp3 陽性 T 細胞 (Foxp3⁺CD3⁺)を解析し、通常食摂取と 4%塩分食摂取マウスで比較することを行った。その結果、通常食の脾臓 Treg 細胞は 0.5%、4%食塩食の脾臓 Treg 細胞は 0.9%と 0.5%であった。大きな差は認められなかった (Fig. 21 ~ Fig. 23)。よって、4%食塩食による Treg 細胞の比率は、*Lactobacillus* の減少や *Staphylococcus* の増加とは関係ないと考えられた。

Experiment-1 (spleen)

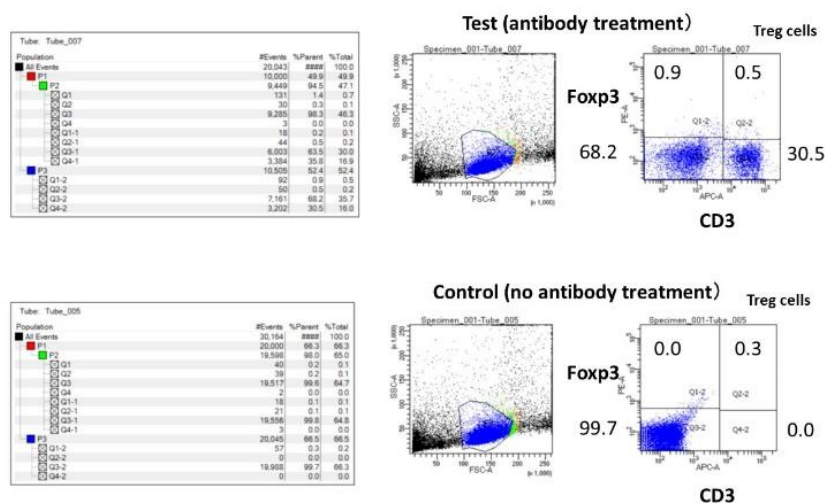


Fig. 21 Effects of 0.5% salt intake on Treg cells in spleen from mice (150 days)

Experiment-1 (spleen)

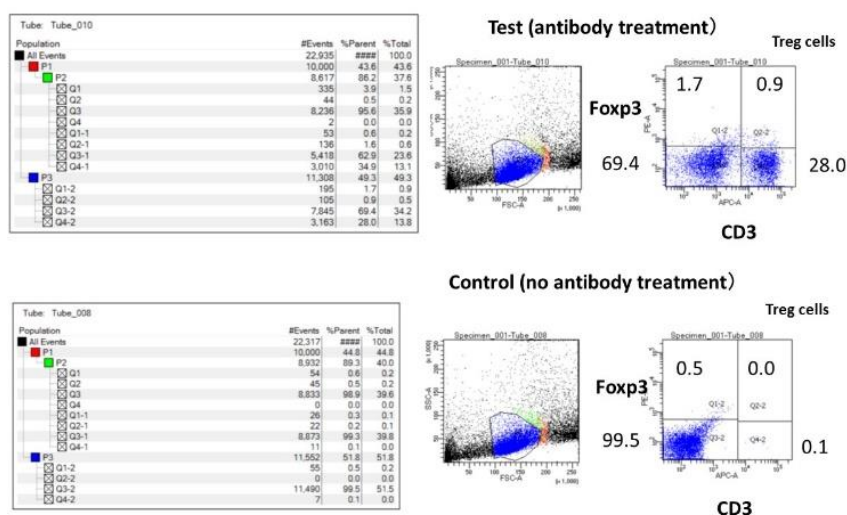


Fig. 22 Effects of 4% salt intake on Treg cells in spleen from mice (150 days)

Experiment-2 (spleen)

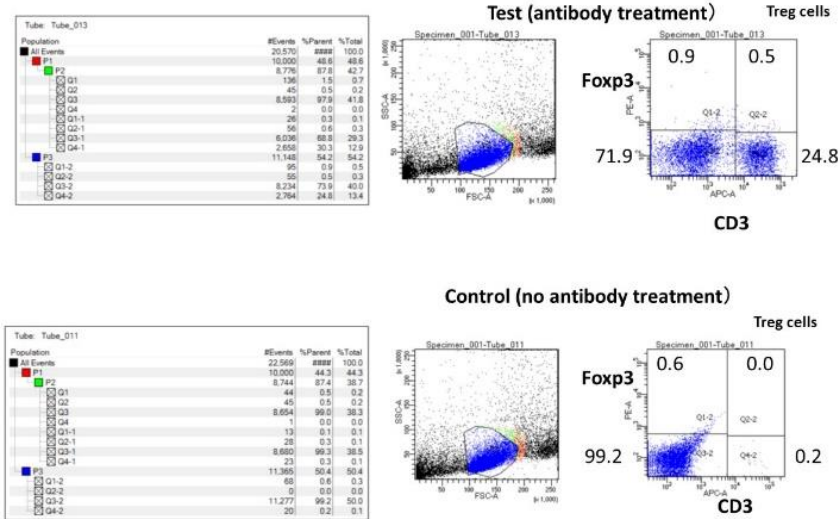


Fig. 23 Effects of 4% salt intake on Treg cells in spleen from mice (150 days)

4. 考 察

4%の塩分が含まれた飼料を毎日食べたマウスは、0.5%の通常量の塩分が含まれた飼料を食べたマウスと体重の変化は特になかった。しかし、4%の塩分が含まれた飼料を毎日食べたマウスは水を良く飲むことが明らかであった。それは、塩分が多すぎたためにそれを洗い流すために飲んでいただけと考えられる。飲む量が多いからと言って、体重が増えることはなかった。高塩の食事を取ったマウスの口腔は、摂取を始めてから35日目で*Lactobacillus*が他の菌と比べて減少する事が明らかとなった。これは、マウスにおける塩分の過剰摂取が、腸マイクロバイオーームに影響を与え、乳酸菌 *Lactobacilli* を減少させること⁽³⁾に近い現象であることが考えられた。さらに、ブドウ球菌である *Staphylococcus* が増加することも明らかとなった。*Staphylococcus* は、高塩に対して抵抗性を持ち、また高塩の状態バイオフィルムを形成することが明らかになっている。よって、長期に高塩分の摂取は、口腔フローラを変質させ、*Lactobacillus* などの乳酸桿菌を減らし、口腔では日和見菌として位置づけられている *Staphylococcus* が増えることが明らかとなった。

乳酸桿菌が減少すると、歯周病菌が感染しやすくなる可能性がある。そこで、摂取後14日目に *P. gingivalis*

の口腔内接種実験を行った。その結果、*P. gingivalis* を口腔内接種すると、4%の食塩食を摂取しているマウスは通常食に比べ、口腔内嫌気性菌と *Staphylococcus* が増加することが明らかとなった。*P. gingivalis* を含む歯周病関連菌は嫌気性菌であり、*P. gingivalis* を口腔内接種すると、高塩食を摂取しているマウスにおいて、口腔環境を歯周病を発症させやすい環境や日和見菌が多い環境に変えているのかもしれない。

摂取後90日目でも、35日目で起こった現象は維持されており、*Lactobacillus* の減少と *Staphylococcus* の増加が認められた。*P. gingivalis* の接種実験では、接種前は普通食よりも4%食塩食を食べている方が有意に嫌気性菌が少なかったが、接種後は4%食塩食を食べている方が有意に嫌気性菌数が増加していた。高塩食摂取において、*P. gingivalis* 感染と嫌気性菌の増加と *Lactobacillus* の減少に何らかの関連性がある可能性が考えられた。このマウスを利用して、通常食と4%食塩食との口腔内細菌叢の差の検討を行った。その結果、通常食と比べて4%食塩食は、*Lactobacillus* の比率は低くなり、*Staphylococcus* の比率が上昇する結果となった。培養法で観察した結果と同様であった。

このように高塩分食を続けることで、口腔内細菌叢の変化が起こる事が明らかとなった。この変化がどのような理由によるものか検討するために、以前に明らかになっている塩分の過剰摂取が Th17 細胞を誘導するという事に着目した。そこで、T17 細胞よりも T17 細胞を制御する Treg 細胞を観察することにした。近年では、Treg 細胞の Foxp3 の発現が低下した T 細胞が、T17 細胞そのものであるという報告もあることから、T 細胞における Foxp3 の発現を FACS により解析した。その結果、通常食と 4% 食塩食とで大きな差が認められなかった。よって、Th17 に対する Treg 細胞による制御は、高塩食による口腔細菌叢の影響に関与しないことが示唆された。

よって、高塩食の口腔細菌叢への影響のメカニズムは明らかにならなかったが、*Lactobacillus* の減少、*Staphylococcus* の増加、*P. gingivalis* による嫌気性菌の増加は、口腔の病原性に大きく関わる現象である。特に、少子高齢化社会である現在の日本において、*Staphylococcus* のような日和見菌の増加は誤嚥性肺炎の発症に関わり、嫌気性菌の増加は歯周病発症に関わる。高塩食の連日の摂取は、*Lactobacillus* 菌数の低下に繋がわり、口腔フローラの変質、*P. gingivalis* の感染の増加により、歯周病を誘導する可能性がある。高塩食の連日の摂取は、口腔疾患や口腔を介する全身疾患発症に繋がることにな

るため、塩分を控えるか高塩食の連日摂取をやめるなど、バランスのよい食生活が重要であることが示唆された。

5. 文献

- 1) Socransky SS, Haffajee AD. 1997. The nature of periodontal diseases. *Ann Periodontol.* 2(1):3-10.
- 2) Dana T. Graves, Yanling Jiang, Caroline Genco. 2000. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr. Opin. Infect. Disease.* 13(3):227-232.
- 3) Wilck N., et. al., 2017. Salt-responsive Gut Commensal Modulates T H 17 Axis and Disease. *Nature* 551: 585-589.
- 4) Mitani A., 2014. Increased Expression of Interleukin (IL)-35 and IL-17, but Not IL-27, in Gingival Tissues With Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 86: 301-309.
- 5) Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. 2013. Clinical and Microbiological Effects of *Lactobacillus Reuteri* Probiotics in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized Placebo-Controlled Study *Lancet. J Clinical Periodontol.* 40(11):1025-1035.

Elucidation of Developmental Mechanism of Periodontal Diseases by Excessive Intake of Salt

Hidenobu Senpuku, Ryoma Nakao

Department of Bacteriology I
National Institute of Infectious Diseases

Summary

Periodontal diseases are infected by an anaerobic oral bacteria such as *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella denticola* in the periodontal tissue, and are the infectious diseases which causes absorption of an alveolar bone as a result of the chronic inflammation. It is feared that other systemic diseases (diabetes, cerebrovascular disease, heart disease, etc.) are more likely to be caused in periodontal diseases. It is important to clarify the onset mechanism of periodontal diseases. While salt is used for seasoning foods, it is one of the essential mineral components required for the maintenance of human cells. However, a recent research has reported that excessive salt intake induces pathogenic type 17 helper T cells (Th17), which affects the intestinal microbiome and reduces *Lactobacillus*. Lactobacilli are commensal bacteria in the oral cavity and contradict the periodontal diseases pathogens. Therefore, we suppose that excessive intake of salt may decrease lactobacilli in the oral cavity and create a condition in which periodontal diseases bacteria are easily infected. We investigated how oral bacteria flora changes by ingesting a high salt diet to mice. When mice were fed a diet containing 4% salt diet every days, a decrease in *Lactobacillus* on the tooth surface and an increase *Staphylococcus* were observed at 14 days after ingestion compared with 0.5% salt food (regular diet). An increase in the number of anaerobic bacteria was observed when *P. gingivalis* was inoculated in the oral cavity from mice fed a high salt diet for 14 days. In addition, the opportunistic pathogen, *Staphylococcus* was also increased. Daily intake of high salt diet continues for 150 days, lead to a decrease in the number of lactobacillus, alteration of oral flora, and infection of *P. gingivalis* may induces periodontal diseases environment due to an increase in anaerobic bacteria. Daily intake of high-salt diet may lead to the development of periodontal diseases and systemic diseases such as aspiration pneumoniae through the oral cavity. This suggested that a controlled salt in diet was important, such as refraining from high-salt daily intake.