

<原著>Porphyromonas gingivalisと
Propionibacterium acnesおよびP. avidumとの共凝
集について

著者名(日)	鎌口 有秀, 中村 麗子, 渡部 俊弘, 大山 徹, 馬場 久衛
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	21
号	2
ページ	237-245
発行年	2002-12-31
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008755/

〔原 著〕

Porphyromonas gingivalis と *Propionibacterium acnes*
および *P. avidum* との共凝集について

鎌口 有秀*, 中村 麗子*,
渡部 俊弘**, 大山 徹**, 馬場 久衛*

*北海道医療大学歯学部口腔細菌学教室
**東京農業大学生物産業学部食品科学科生物化学研究室

*(主任: 馬場 久衛教授)
**(主任: 大山 徹教授)

Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and
Propionibacterium acnes and *P. avidum*

Arihide KAMAGUCHI*, Reiko NAKAMURA*,
Toshihiro WATANABE**, Tohru OHYAMA** and Hisae BABA*

*Department of Oral Microbiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido
**Department of Food Science and Technology, Faculty of Bioindustry,
Tokyo University of Agriculture

*(Chief : Prof. Hisae BABA)
**(Chief : Prof. Tohru OHYAMA)

Abstract

Porphyromonas gingivalis coaggregation with *Propionibacterium acnes* and *P. avidum* was observed. These coaggregations were inhibited with L-arginine, L-lysine, L-cysteine and L-histidine. Heat- and proteinase K-treatment experiments indicated that cell surface heat labile-protein factors of *P. gingivalis* may adhere to the cell surface of heat-stable protein factors of *P. acnes* and *P. avidum*. Both *P. gingivalis* cells and vesicles promoted the coaggregation of *P. acnes* to the partner cell with which native *P. acnes* cells do not ordinarily coaggregate. It was confirmed that supernatants containing menadione like substances of *P. acnes* and *P. avidum* stimulated the growth of *P. gingivalis* *in vitro*, suggesting that these coaggregations play an important role in the growth of *P. gingivalis* in subgingival biofilms and in the progress of periodontal disease.

Key words : *Porphyromonas gingivalis*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium avidum*, coaggregation, vesicle.

受付: 平成14年9月25日

緒 言

*Porphyromonas gingivalis*は歯周病の主原因細菌の1つであり, 病原因子として種々の候補が報告されている^{1,2)}. 歯周病は菌側の病原因子のみで規定されるものではなく, その病原因子に対する宿主側の応答も重要な要因である. 成人性歯周炎の場合, 疾患の進行に伴い歯肉溝に*P. gingivalis*が増加することが報告されている³⁻⁵⁾. *P. gingivalis*が歯肉溝において増殖するには, まず,*P. gingivalis*がその局所に付着することが必要である.*P. gingivalis*が局所に付着する方法として, 線毛による局所細胞への直接的な付着, また, すでに局所に定着している細菌に結合する(共凝集)ことが想定されている.*P. gingivalis*が局所に付着後, 増殖するには, 嫌気状態に加え, 増殖因子として, ヘミンおよびビタミンKが必要である⁶⁻⁸⁾. *P. gingivalis*は糖を利用できず, エネルギーをペプチドより得る必要がある. ペプチドは*P. gingivalis*が産生するarginine-specific cysteine proteinase (Rgp) やlysine-specific proteinase (Kgp) によりタンパク質から得ることと, 赤血球からhemolysin等により放出されたヘミンを獲得する機序についてはShiら, Nakayamaらにより明らかにされた^{9,10)}. さらにビタミンKは歯肉溝滲出液等から得るものと考えられる. 一方, 口腔内にも存在する*Propionibacterium acnes*^{11,12)}がビタミンK様の物質を産生すること, さらに*P. acnes*の培養上清により*P. gingivalis*の増殖が増加することが報告され細菌が共生関係にある可能性が示された¹³⁻¹⁵⁾. 我々は*P. gingivalis*のバイオフィームへの参入および形成における役割を検討するために*P. gingivalis*と種々の口腔細菌との共凝集を検索した結果, *P. gingivalis*と*P. acnes*および*P. avidum*とも共凝集することを観察した.*P. gingivalis*のgrowth factorを産生する*P. acnes*あるいは

*P. avidum*と共凝集することは*P. gingivalis*の発育において有利に働くものと考えられる. 本研究では, *P. gingivalis*と*P. acnes*および*P. avidum*の共凝集の性状について種々の検討を加えた.

材料および方法

1. 供試菌株と培養

P. gingivalis ATCC33277と381はイーストエキストラクト, ヘミンおよびメナジオン添加 tryptic soy brothにて, *P. acnes* JCM6425, JCM6473および*P. avidum* ATCC25577は tryptic soy brothにて嫌気培養した. 各培養液から得た菌体を共凝集緩衝液にて洗浄し, 共凝集緩衝液にて菌液を作製した.*P. gingivalis* ATCC33277, 381はOD660nmを約0.6に調整し, *P. acnes* JCM6425, JCM6473はOD660nmを約1.8に調整した.

2. 共凝集の測定

共凝集の測定方法はCisarらの方法¹⁶⁾に準じた. すなわち, 2種の細菌の菌液を13×100mmの試験管に200 μ lずつ添加し, さらに共凝集緩衝液を100 μ l添加し, 室温で1時間振とう後, 肉眼で観察し, -から4+の5段階で評価した. また, アミノ酸, 糖およびEDTA存在下における共凝集を測定しそれぞれの影響をみた. また, 各菌体を85°C, 10分間加熱した時の共凝集を測定し, 菌体加熱による影響をみた.

3. *P. gingivalis*からのベシクルの調整

Grenierらの方法¹⁷⁾に従って行った. すなわち, 1Lのヘミン, メナジオンおよびイーストエキストラクト添加 tryptic soy brothにて*P. gingivalis* ATCC33277を5日間嫌気培養後, 8,000xgにて遠心し, 菌体を除いた. 得られた上清を40%硫酸塩析後, 10,000xgにて遠心し, 沈殿を得た. 得られた沈殿を50mM Tris-HCl緩衝液(pH9.5)に対して透析し, 27,000xgで60分間遠心した. 得られた沈殿物をベシクルとした.

4. ベシクルによる凝集活性の測定

ベシクル液(100 μ l)を共凝集緩衝液にて2倍希釈系列を作製し、ここに菌液(100 μ l)と共凝集緩衝液50 μ lを添加し、振とう器にて(100 rpm, 室温)1時間反応させた。凝集活性のみられた最高希釈数の逆数を凝集活性とした。

5. 菌体のproteaseK処理による影響

P. gingivalis または *P. acnes* に proteaseK (final conc. 2 mg/ml) を加え37°Cで2時間反応後、共凝集緩衝液にて洗浄後、菌液を作製し、共凝集を測定した。

6. *P. gingivalis* 菌体およびベシクルの共凝集誘導の観察

P. gingivalis 菌体のbridge作用の観察は *Candida albicans* の菌糸形細胞を用いて行った。すなわち、*P. gingivalis* ATCC33277および *C. albicans* E31とを混合し、室温で1時間反応後、84xgで遠心し上清を除く操作を3回行い、これに *P. acnes* を加え室温で1時間反応後、84xgで遠心し上清を除く操作を3回行った。ついで、グラム染色し、検鏡した。

P. gingivalis ベシクルによる共凝集の誘導の測定は、以下のように行った。すなわち、*P. acnes* にベシクル液を加え、室温で1時間反応させた。反応後、84xgにて遠心し、上清を除く操作を3回行い、*S. aureus* 209P菌液を加え室温で1時間反応させた。ついで84xgにて遠心し上清を除く操作を3回行った後、グラム染色し検鏡した。*C. albicans* E31と *P. acnes* についても同様の操作を行った。

7. *P. acnes* 培養上清の *P. gingivalis* 発育に対する影響

ヘミンおよびイーストエキストラクト添加 tryptic soy broth に *P. acnes* JCM6425 または JCM6473 の培養上清を0, 10%, 20%, 30%, 40% および50% になるように添加後、それぞれに *P. gingivalis* ATCC33277 を接種し嫌気培養後の OD660nm の吸光度を測定し、比較した。

結 果

1. *P. gingivalis* と *P. acnes* および *P. avidum* との共凝集および種々の物質による阻害効果

Table 1. Coaggregation of *P. gingivalis* and *P. acnes* or *P. avidum*

Bacteria	Coaggregation		
	<i>P. acnes</i> JCM 6425	<i>P. acnes</i> JCM 6473	<i>P. avidum</i> ATCC 25577
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	3+ ^{a)}	3+	4+
<i>P. gingivalis</i> 381	3+	3+	4+

a) Coaggregation was measured as described in Materials and Methods.

Table 2. Effect of various compounds on coaggregation of *P. gingivaris* and *P. acnes* or *P. avidum*

Tested compound		Coaggregation					
		<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277			<i>P. gingivalis</i> 381		
		<i>P. acnes</i> JCM 6425	<i>P. acnes</i> JCM 6473	<i>P. avidum</i> ATCC 25577	<i>P. acnes</i> JCM 6425	<i>P. acnes</i> JCM 6473	<i>P. avidum</i> ATCC 25577
None	50mM ^{b)}	3+ ^{a)}	3+	4+	3+	3+	4+
L-arginine	50mM	-	-	-	-	-	-
L-lysine	50mM	2+	+	-	+	2+	-
L-histidine	50mM	2+	2+	3+	3+	2+	+
L-cysteine	50mM	-	-	+	+	-	2+
Other amino acid ^{c)}	50mM	3+	3+	4+	3+	3+	4+
Sugars ^{d)}	100mM	3+	3+	4+	3+	3+	4+
EDTA	0.6mM	3+	3+	4+	3+	3+	4+

a) Coaggregation was measured as described in Materials and Methods.

b) Final concentration of tested compound.

c) L-alanine, L-asparagine, L-proline, L-serine, L-glycine.

d) D-fucose, D-galactose, D-glucose, D-mannitol, D-rhamnose, D-mannose, D-sorbitol, lactose, N-acetyl-D-glucose.

Table 1 に示したように, *P. gingivalis* ATCC33277, 381と *P. acnes* JCM6425, JCM6473および *P. avidum* ATCC25577は共凝集することが観察された。この共凝集はTable 2 に示したようにL-arginine, L-lysine, L-cysteineおよびL-histidineのアミノ酸により阻害されたが, 糖およびEDTAによる阻害はみられなかった。さらに各アミノ酸の添加濃度による阻害はTable 3 のようであった。すなわち, L-arginine, L-cysteineについては添加濃度が

25mMあるいは12.5mMでも完全に阻害されたが, L-lysine, L-histidineは50mMでも完全な阻害はみられず, L-arginineの阻害効果が最も強くみられた。また, *P. gingivalis*381と *P. acnes*, *P. avidum*との間においても同様の阻害がみられた。

2. 加熱およびproteinaseK処理の共凝集への影響

Table 4 に示したように, *P. gingivalis*を加熱することにより共凝集は消失した。一方, *P.*

Table 3. Effect of concentration of amino acids on coaggregation of *P. gingivalis* and *P. acnes* or *P. avidum*

Tested compound	Coaggregation					
	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277			<i>P. gingivalis</i> 381		
	<i>P. acnes</i> JCM 6245	<i>P. acnes</i> JCM 6473	<i>P. avidum</i> ATCC 25577	<i>P. acnes</i> JCM 6245	<i>P. acnes</i> JCM 6473	<i>P. avidum</i> ATCC 2557
None	3+ ^a	3+	4+	3+	3+	4+
L-Arginine	50mM ^b	-	-	-	-	-
	25mM	-	-	-	-	-
	12.5mM	+	-	-	2+	2+
	5mM	2+	+	2+	2+	3+
L-Lysine	50mM	2+	+	-	+	2+
	25mM	2+	+	3+	2+	2+
	12.5mM	3+	3+	4+	2+	3+
	5mM	3+	3+	4+	3+	3+
L-Histidine	50mM	2+	2+	3+	3+	2+
	25mM	3+	2+	3+	3+	2+
	12.5mM	3+	3+	3+	3+	3+
	5mM	3+	3+	3+	3+	3+
L-Cysteine	50mM	-	-	+	+	-
	25mM	-	-	+	2+	+
	12.5mM	+	-	+	2+	2+
	5mM	2+	2+	+	2+	3+

a) Coaggregation was measured as described in Materials and Methods.

b) Final concentration of tested compound.

Table 4. Effect of heat treatment on coaggregation of *P. gingivalis* and *P. acnes* or *P. avidum*

Combination of organism	Coaggregation
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+
<i>P. acnes</i> JCM 6425	3+ ^a
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277(H) ^b	+
<i>P. acnes</i> JCM 6425	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+
<i>P. acnes</i> JCM 6425(H)	4+
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+
<i>P. acnes</i> JCM 6473	3+
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277(H)	+
<i>P. acnes</i> JCM 6473	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+
<i>P. acnes</i> JCM 6473(H)	4+
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+
<i>P. avidum</i> ATCC 25577	4+
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277(H)	+
<i>P. avidum</i> ATCC 25577	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+
<i>P. avidum</i> ATCC 25577(H)	4+
<i>P. gingivalis</i> 381	+
<i>P. acnes</i> JCM 6425	3+
<i>P. gingivalis</i> 381(H)	+
<i>P. acnes</i> JCM 6425	-
<i>P. gingivalis</i> 381	+
<i>P. acnes</i> JCM 6425(H)	4+
<i>P. gingivalis</i> 381	+
<i>P. acnes</i> JCM 6473	3+
<i>P. gingivalis</i> 381(H)	+
<i>P. acnes</i> JCM 6473	-
<i>P. gingivalis</i> 381	+
<i>P. acnes</i> JCM 6473(H)	4+
<i>P. gingivalis</i> 381	+
<i>P. avidum</i> ATCC 25577	4+
<i>P. gingivalis</i> 381(H)	+
<i>P. avidum</i> ATCC 25577	-
<i>P. gingivalis</i> 381	+
<i>P. avidum</i> ATCC 25577(H)	4+

a) Coaggregation was measured as described in Materials and Methods.

b) Cells were heated at 85 °C for 10 min.

acnes および *P. avidum* を加熱すると共凝集が増加する傾向がみられた。また, proteinaseK 処理の影響に関しては Table 5 に示した。すなわち, *P. gingivalis* と *P. acnes*, *P. avidum* の proteinaseK 処理により, 共凝集は消失した。これらのことより, *P. gingivalis* と *P. acnes* および *P. avidum* の共凝集には *P. gingivalis* の易熱性タンパク質成分と *P. acnes* あるいは *P. avidum* の耐熱性タンパク質成分が関与している可能性が示唆された。

3. *P. gingivalis* ベシクルによる *P. acnes* および *P. avidum* の凝集および種々の物質による阻害について

Table 6 に示すように, *P. gingivalis* ATCC 33277 および 381 から得たベシクルは *P. acnes* お

よび *P. avidum* を凝集した。この凝集は *P. gingivalis* ATCC 33277 より得たベシクルの方が若干強い傾向が見られた。また, この凝集は L-arginine, L-lysine, L-cysteine および L-histidine により阻害され, 菌体による共凝集の阻害と同様であった (Table 7)。このことより, *P. gingivalis* と *P. acnes* の共凝集は *P. gingivalis* の外膜成分が関与していることが示唆された。

4. *P. acnes* と *P. avidum* 培養上清による *P. gingivalis* の生育活性化について

P. acnes JCM6425, JCM6473, *P. avidum* JCM25577 の培養上清を加えたメナジオン不含培地中での *P. gingivalis* の生育を観察した。その結果, Fig. 1 に示すように, それぞれ, 30% または 40% の培養上清添加により著しい生育の上

Table 5. Effect of Proteinase K treatment on coaggregation of *P. gingivalis* and *P. acnes* or *P. avidum*

Combination of organism		Coaggregation	
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+	<i>P. acnes</i> JCM 6425	3+ ^a
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277(P)	+	<i>P. acnes</i> JCM 6425	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+	<i>P. acnes</i> JCM 6425(P)	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+	<i>P. acnes</i> JCM 6473	3+
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277(P)	+	<i>P. acnes</i> JCM 6473	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+	<i>P. acnes</i> JCM 6473(P)	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+	<i>P. avidum</i> ATCC 25577	4+
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277(P)	+	<i>P. avidum</i> ATCC 25577	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	+	<i>P. avidum</i> ATCC 25577(P)	-
<i>P. gingivalis</i> 381	+	<i>P. acnes</i> JCM 6425	3+
<i>P. gingivalis</i> 381(P)	+	<i>P. acnes</i> JCM 6425	-
<i>P. gingivalis</i> 381	+	<i>P. acnes</i> JCM 6425(P)	-
<i>P. gingivalis</i> 381	+	<i>P. acnes</i> JCM 6473	3+
<i>P. gingivalis</i> 381(P)	+	<i>P. acnes</i> JCM 6473	-
<i>P. gingivalis</i> 381	+	<i>P. acnes</i> JCM 6473(P)	-
<i>P. gingivalis</i> 381	+	<i>P. avidum</i> ATCC 25577	4+
<i>P. gingivalis</i> 381(P)	+	<i>P. avidum</i> ATCC 25577	-
<i>P. gingivalis</i> 381	+	<i>P. avidum</i> ATCC 25577(P)	-

a) Coaggregation was measured as described in Materials and Methods.
 b) Cells were treated with Proteinase K (final conc. 2mg/ml) at 37 °C for 2hr.

Table 6. Aggregation of *P. acnes* or *P. avidum* with vesicles of *P. gingivalis* ATCC 33277 or 381

Bacteria	Aggregation	
	vesicle of <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	vesicle of <i>P. gingivalis</i> 381
<i>P. acnes</i> JCM 6425	512 ^a	64
<i>P. acnes</i> JCM 6473	512	32
<i>P. avidum</i> ATCC 25577	256	16

a) Aggregation was measured as described in Material and Method.

Table 7. Effect of various compounds on aggregation of *P. acnes* and *P. avidum* with vesicles of *P. gingivalis* ATCC 33277

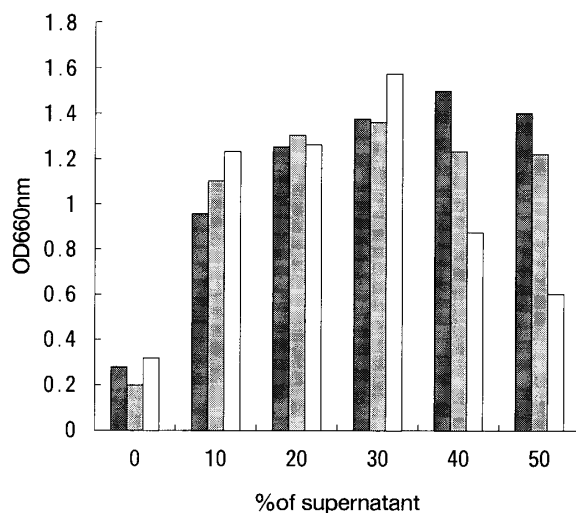
Tested compound		Aggregation		
		Vesicle of <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		
		<i>P. acnes</i> JCM 6425	<i>P. acnes</i> JCM 6473	<i>P. acnes</i> ATCC 25577
None	50mM ^b	512 ^a	512	256
L-arginine	50mM	<1	<1	<1
L-lysine	50mM	<1	<1	<1
L-histidine	50mM	<1	<1	<1
L-cysteine	50mM	<1	<1	<1
Other amino acids ^c	50mM	512	512	256
Sugars ^d	100mM	512	512	256
EDTA	0.6mM	512	512	256

a) Aggregation was measured as described in Material and Methods.

b) Final concentration of tested compound.

c) L-alanine, L-asparagine, L-proline, L-serine, L-glycine.

d) D-fucose, D-galactose, D-glucose, D-mannitole, D-rhamnose, D-mannose, D-sorbitole, lactose, N-acetyl-D-glucose.

Fig.1. Effect of supernatant of *P. acnes* or *P. avidum* on growth of *P. gingivalis* ATCC 33277.■ : Basal medium^{a)}+supernatant of *P. avidum* JCM6425.▒ : Basal medium+supernatant of *P. acnes* JCM 6473.□ : Basal medium+supernatant of *P. avidum* JCM2557.^{a)}Tryptic soy broth supplemented with yeast extract and hemin.

昇が観察された。このことより、供試菌株もメナジオン様の物質を菌体外に産生していることが確認できた。

5. *P. gingivalis*菌体ベシクルの共凝集誘導効果

*P. gingivalis*菌体およびベシクルの共凝集誘導に対する影響を観察した。その結果、通常条件では*P. acnes*と*C. albicans*は結合しないが(Fig. 2 (B)), *P. gingivalis*は*C. albicans*の菌糸形に結合し(Fig. 2 (A)), これに*P. acnes*を添加すると*P. gingivalis*を介して*P. acnes*は*C. albicans*に結合する像が観察された(Fig. 2

(C))。また、*C. albicans*の菌糸形に*P. gingivalis*ベシクルを処理し、これに*P. acnes*を加えると*P. acnes*が*C. albicans*の菌子形に結合する像が観察された(Fig. 2 (D))。さらに*P. acnes*と*S. aureus*は共凝集しないが(Fig. 2 (E)), *P. acnes*を*P. gingivalis*ベシクルにて処理後、*S. aureus*を添加すると共凝集が誘導される像が観察された(Fig. 2 (F))。このことより、*P. acnes*は*P. gingivalis*菌体やベシクルを介して共凝集できない菌体にも結合できることがわかった。

考 察

*P. gingivalis*が歯肉縁下プラークに定着する機構が想定されている。*P. gingivalis*はまず歯肉縁上プラークの*Streptococcus sanguis*等に結合し、ついで*Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum*および*Prevotella intermedia*等と結合し歯肉縁下プラークに移動し定着するものと想定される^{18,19}。*P. gingivalis*はこれらの細菌に線毛により結合することが報告されているが、*A. viscosus*や*P. intermedia*へは外膜成分にて結合することが推察されている¹⁹。近年プラークもバイオフィームとしてとらえられており、*P. gingivalis*もこのようにして歯肉溝のバイオフィームに参入するものと考えられる²⁰。一方、*P. acnes*は皮膚から多く分離されるが²¹、口腔内からも分離される。*P. acnes*は*S. sanguis*と

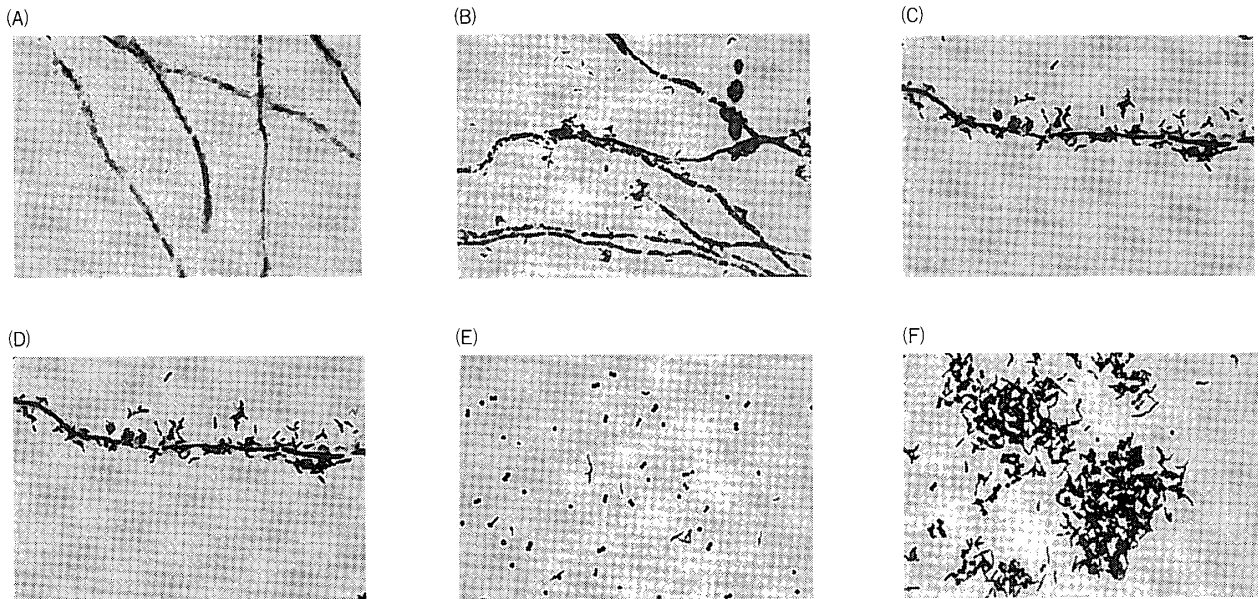


Fig2. Coaggregation promoting effect of *P. gingivalis* cells and vesicles of *P. acnes* and *C. albicans* or *S. aureus*. Micrographs are Gram stained pellet fractions of microorganism after incubation at room temperature for 60 min and centrifuging at 84xg for 1 min. (A) cell mixtures of *P. gingivalis* ATCC 33277 and mycelium type cells of *C. albicans* E3. (B) cell mixture of *P. acnes* JCM6425 and mycelium type cells of *C. albicans* E3. (C) cell mixtures of *P. gingivalis* ATCC 33277 treated mycelium type of *C. albicans* E3 and *P. acnes* JCM6425. (D) cell mixture of *P. gingivalis* ATCC33277 vesicle treated mycelium type cells of *C. albicans* E3 and *P. acnes* JCM6425. (E) cell mixtures of *P. acnes* and *S. aureus* 209P. (F) cell mixtures of *P. gingivalis* ATCC33277 vesicles treated *P. acnes* JCM 6425.

共凝集するとの報告があるが²²⁾その他の報告はなされていない。*P. acnes*は歯肉溝からも検出されているが、その定着機構は不明である。今回*P. gingivalis*と共凝集することが観察されたことにより、*P. acnes*の歯肉溝への定着機構の1つの可能性もある。これと同様のことが*P. avidum*においても観察された。*P. avidum*も*P. acnes*同様に歯肉溝からも検出されている。*P. acnes*と*P. avidum*は共にビタミンK様の物質を産生し*P. gingivalis*の増殖を促進することが観察されている¹³⁻¹⁵⁾。*P. gingivalis*と結合した細菌が増殖因子を産生することは*P. gingivalis*の増殖において非常に有利になるものと考えられる。

*P. gingivalis*と*P. acnes*, *P. avidum*との共凝集はL-arginine, L-lysine, L-cysteineおよびL-histidineにて阻害された。L-arginine, L-lysineによる阻害からRgpやKgpの関与が推測された。*P. acnes*および*P. avidum*は、*P. gin-*

*givalis*の*rgpA*および*rgpB*遺伝子の変異株とは共凝集しない。しかし、*rgpA*および*rgpB*が欠損すると線毛の構成成分であるフィンブリリンのプロセッシングが行われず、*fimA*線毛が形成されないと報告があることより²³⁾、*fimA*遺伝子の変異株でも検討したところ、親株と同様の共凝集が生じた (data not shown)。これらのことよりRgpまたはRgpとadhesin domain タンパク質の複合体の関与が*P. intermedia*との共凝集と同様に推測された。L-histidineによる阻害の例は*F. nucleatum*と*Eubacterium* spp.との共凝集においてみられており²⁴⁾、L-histidineはL-arginine, L-lysineとcommon configurationの共通性が推測されている。*P. gingivalis*と*P. acnes*, *P. avidum*の共凝集においてもL-arginine, L-lysineによる阻害もあるが、common configurationの共通性が直接的に関与しているかどうかは不明である。Cysteineによる阻害は他にも例がなく不明であるが、cysteineによ

りRgpやKgpが活性化されpartner cellをプロセッシングすることで共凝集の阻害がみられる可能性も推測される。*P. acnes*および*P. avidum*のproteinaseK処理によっても共凝集は阻害されることよりもcysteineによるRgpおよびKgpの活性化による阻害の可能性がある。*P. gingivalis*の加熱により共凝集は阻害されるが、*P. acnes*, *P. avidum*の加熱では阻害されないことより、heat labile-heat stable typeの反応^{25,26)}であると考えられる。また、種々の糖による阻害がないことよりレクチン様の結合はなく、さらにEDTAによる阻害もないことより、electron staticまたはionic forcesの関与はないものと思われた。また、*P. gingivalis*のベシクルによる*P. acnes*あるいは*P. avidum*の凝集は共凝集を阻害した物質によって阻害されることから、*P. gingivalis*の外膜成分の関与が強く示唆された。さらに、*P. gingivalis*菌体およびベシクルは*P. acnes*, *P. avidum*と他の細菌や真菌とのbridgeとして働くことも観察できた。このことは*P. acnes*, *P. avidum*がさらに口腔内プラークに参入しやすくなるものと考えられる。*P. gingivalis*は歯周病に関与すると想定される多くの病原因子を産生するが、*P. gingivalis*と*P. acnes*はともに補体の活性をすると報告されている²⁷⁾ことより*P. gingivalis*と*P. acnes*との共凝集は歯周病の進展を増強する可能性も考えられた。

結 論

1. *P. gingivalis*と*P. acnes*, *P. avidum*が共凝集した。この共凝集はL-arginine, L-lysine, L-cysteineおよびL-histidineにより阻害された。
2. この共凝集は加熱とproteinase K処理の実験から、heat labile-heat stable typeの結合であることがわかった。
3. *P. acnes*, *P. avidum*の培養上清は*P. gin-*

*givalis*の発育を増加させることが確認された。

4. *P. acnes*は*P. gingivalis*菌体またはベシクルを介して、共凝集しないpartner cellに結合することがわかった。

以上のことより、*P. gingivalis*と*P. acnes*, *P. avidum*の共凝集は*P. gingivalis*の外膜に存在する*rgpA*遺伝子産物が関与している可能性が示唆され、また、これらの共凝集は*P. gingivalis*の発育に有利であることがわかった。

文 献

1. Slots J: Importance of black-pigmented Bacteroides in human periodontal disease, p. 27-45, In Genco, R.J., and Mergenhagen, S. E.(eds), Host-parasite interactions in periodontal diseases, American society for Microbiology, 27-45,1982.
2. Slots J and Genco RJ: Black-pigmented Bacteroides species, Capnocytopahga species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction., *J Dent Res*, **63** : 412-421, 1984.
3. Genco RJ, Evans RT and Ellison SA: Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease., *J Am Dent Assoc*, **78** : 1016-1036, 1969.
4. Socransky S: Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res*, **49** : 203-222, 1970.
5. Slots J: Subgingival microflora and periodontal disease., *J Clin Periodontal*, **6** : 351-382, 1979.
6. Gibbons RJ and McDonald JB: Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol*, **80** : 164-170, 1960.
7. Lev M: Apparent requirement for vitamin K in rumen strains of *Fusiformis nigrescens*. *Nature*, **181** : 203-204, 1958.
8. Lev M: The growth-promoting activity of compounds of the vitamin K group and analogues for a rumen strain of *Fusiformis nigrescens*. *J Gen Microbiol*, 20697-703,1958.

9. Shi Y, Ratnayake DB, Okamoto K et al.: Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, and *hagA*., *J Biol Chem.*, **274** : 17955-17960, 1999.
10. Nakayama K, Ratnayake DB, Tsukuba T et al.: Haemoglobin receptor protein is intragenically encoded by the cysteine proteinase-encoding genes and the haemagglutinin-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*., *Mol Microbiol*, **27** : 51-61, 1998.
11. Sasaki N, Sakai K and Takazoe I: An improved medium for the selective isolation of *Propionibacterium acnes* from the human oral cavity and skin., *J Dent Res*, **59** : 1518-1519, 1980.
12. Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM et al.: Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans., *Infect Immun*, **38** : 1137-1148, 1982.
13. Macdonald JB, Socransky SS, and Gibbons RJ: Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. *J Dental Res*, **42** : 529-544, 1963.
14. Takazoe I, Nakamura T, Homma T et al.: Growth promoting effect of corynebacterium upon bacteroides., *Bull Tokyo Dent Coll*, **12** : 95-97, 1971.
15. Sasaki N, Soder PO, Fronstell G et al.: Increased numbers of black-pigmented Bacteroides in induced periodontitis in monkeys., *Bull Tokyo Dent Coll*, **31** : 1-7, 1990.
16. Cisar JO, Kolenbrander PE and McIntire FC: Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*., *Infect Immun*, **24** : 742-752, 1979.
17. Grenier D and Mayrand D.: Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*., *Infect Immun*, **55** : 111-117, 1987.
18. Slots J and Gibbons RJ: Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets., *Infect Immun*, **19** : 254-264, 1978.
19. Kamaguchi A, Nakayama K, Ohyama T et al.: Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*., *Microbiol Immunol*, **45** : 649-656, 2001.
20. Marsh PD and Bradshaw DJ: Dental plaque as a biofilm., *J Ind Microbiol*, **15** : 169-175, 1995.
21. Cummins CS, and Jhonson LJ : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Willams & Wilkins, 1984, 1346-1353.
22. Ciardi JE, McCray GF, Kolenbrander PE et al.: Cell-to-cell interaction of *Streptococcus sanguis* and *Propionibacterium acnes* on saliva-coated hydroxyapatite., *Infect Immun*, **55** : 1441-1446, 1987.
23. Nakayama K, Yoshimura F, Kadowaki T et al.: Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*., *J Bacteriol*, **178** : 2818-2824, 1996.
24. George KS and Falkler WA Jr: Coaggregation studies of the *Eubacterium* species., *Oral Microbiol Immunol*, **7** : 285-290, 1992.
25. Kelstrup J and Funder-Nielsen TD: Aggregation of oral streptococci with *Fusobacterium* and *Actinomyces*., *J Boil Buccale*, **2** : 347-362, 1974.
26. Mizuno J, Cisar JO, Vatter AE et al.: A factor form *Actinomyces viscosus* T14 that specifically aggregates *Streptococcus sanguis* H1., *Infect Immun*, **40** : 1204-1213, 1983.
27. Okuda K, Yanagi K and Takazoe I: Complement activation by *Propionibacterium acnes* and *Bacteroides melaninogenicus*., *Arch Oral Biol*, **23** : 911-915, 1978.