

〔学会記録〕

東日本歯学会第14回学術大会

(平成8年度総会)

—一般講演抄録—

日時：平成8年2月17日(土)

会場：かでの2・7 410ホール 札幌市中央区北2条西7丁目

1. *Porphyromonas gingivalis*線毛のCa9-22細胞への付着に関する検索○広瀬 公治, 三浦 宏子, 水谷 博幸
上田 五男

(口腔衛生学講座)

【目的】*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)線毛は様々な生物活性を持つことが知られている。我々もすでに線毛の宿主細胞に対する線毛の作用を検討し報告している¹⁾。これらの作用は、線毛が宿主細胞に付着することによって発現するものと考えられているが、その付着機構に対する詳細な検討はいまだ不十分である。そこで今回我々は、ヒト歯肉癌由来のCa9-22細胞を用い、線毛の付着を促進あるいは阻止する要因について検討し、その機構解析のための一端とした。

【材料・方法】線毛は、*P. gingivalis* 381株より精製したものをを用いた。精製した線毛は [¹²⁵I] にて標識を行った。Ca9-22細胞は96ウエルマイクロカルチャープレート上でコンフルエントモノレイヤーになるまで培養した。この細胞に標識線毛を添加し所定の時間培養を行った。培養終了後、細胞を剝離し、ガンマーカウンターにてその放射活性を測定し、線毛付着量の指標とした。

【結果・考察】*P. gingivalis*線毛はCa9-22細胞に対して特

異的に付着することが非標識線毛を用いた競合実験により明かとなった。このことはCa9-22細胞表面に線毛に対するレセプターの存在を示唆する。また培養環境pHの上昇とともに、線毛付着量が増加した。歯周局所における炎症の程度と歯周ポケット内pHが正の相関を示すことが知られている。よって局所における炎症の存在が、新たな線毛の付着を誘導するのではないかと考えられる。またCa9-22細胞をトリプシンで処理することによっても線毛付着を促進した。本菌の持つトリプシン様活性酵素と線毛付着との関連が示唆され、今後詳細に検討したい。今回発表した結果の一部は2)により公表される。

文 献

- 1) Hirose K. et al. Oral Microbiol. Immunol. 11 ; 62-64.1996.
- 2) Hirose K. et al. Oral Microbiol. Immunol. 11 ; in press. 1996.

2. *Porphyromonas gingivalis* vesicleによる口腔細菌の凝集に対する唾液の影響○鎌口 有秀¹⁾, 今村 光孝¹⁾, 宮川 博史¹⁾,
寺山 千恵¹⁾, 猪股孝四郎²⁾, 馬場 久衛¹⁾
(口腔細菌学教室¹⁾, 口腔生理学教室²⁾)

演者らは*P. gingivalis*が産生するvesicleが唾液コート ハイドロキシアパタイトへの口腔細菌の付着を促進する

こと、また、共凝集をしない菌間の共凝集を誘導することを報告してきた。これらのことはvesicleがbridgeとして働く結果と推測された。しかし、口腔内でこのような反応が起こる場合は唾液、歯肉溝滲出液等の影響を受けるものと考えられる。そこで今回は唾液、血清等のvesicleによる菌凝集に対する影響について検討した。

供試した*S. mutans* 67-1, OMZ 70, *S. oralis* ATCC 10557, *S. gordonii* ATCC 10558, *A. viscosus* ATCC 19246, *S. aureus* 209Pの各菌の凝集は全唾液、耳下腺唾液、顎下腺唾液、血清により阻害傾向がみられた。全唾液的加熱、アルブミンによる阻害はみられなかった。これらのことより、耐熱性の耳下腺、顎下腺に共通に存在する物質により阻害されることがわかった。また、血清中のalbumin以外の成分が阻害に関与することがわかった。ついで、vesicleの菌凝集に関与する成分を検索する

ためvesicleをdetergentにて可溶化後、ゲル濾過、およびaffinity chromatographyを行い凝集因子を部分精製した。部分精製凝集因子の凝集活性は培養上清の活性に対し約242倍の活性の増加がみられた。この画分のSDS-PAGEによるタンパク染色パターンにおいて44K, 41K, 18.5Kのメジャーなバンドがみられた。このパターンから凝集因子は1種類かそれ以上存在するか、さらにどの成分が凝集活性を示す成分であるか明確にはできなかった。しかし、44K, と41Kのバンドが精製するにしたがいタンパク染色度合いが強くなったことより、これらの成分が菌凝集に関与している可能性が示唆された。

以上のことより、口腔内におけるvesicleによる付着の促進、共凝集の促進作用はin vitroでの活性より弱いものと推察された。

3. *Porphyromonas gingivalis*由来LPSとプロテアーゼに対するヒト歯肉線維芽細胞の応答性

森 修二, 大井戸真理, 加藤 幸紀,
沓澤 政幸, 藤井 健男, 小鷲 悠典,
王 宝禮
(歯科保存学, 北大予防歯科)

歯周疾患はプラーク中の細菌の様々な因子と生体の反応様式が複雑に入り込んで発症すると考えられている。そこで我々は、歯周疾患の発症や進行のメカニズムを解明するために、成人性歯周炎の原因菌として注目される*Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*)由来のLPSとプロテアーゼを抽出、精製し、それらがヒト歯肉由来線維芽細胞に対し、どのような影響を与えるか検討した。実験は無刺激群(コントロール)、LPS単独群、プロテアーゼ単独群、LPSとプロテアーゼ同時添加群の4系列で、形態学的観察は位相差顕微鏡にて行い生化学分析は、DAPIによる蛍光法で付着細胞のDNA量の計測とMTT発色試薬で致死活性の測定で行った。また実験に際し、LPSとプロテアーゼが互いの活性を抑制しないことを確認した。

その結果、形態学的変化はコントロール、およびLPS刺激群では顕著な変化は認められなかった。プロテアーゼ単独群とLPSとプロテアーゼ同時添加群では、細胞は

経時的に剥離した。しかし、LPSとプロテアーゼ同時添加群ではプロテアーゼ単独群よりも細胞の球状化、剥離傾向が弱かった。DNA量およびMTT値は、LPS単独群はコントロールに比較して増加したが、プロテアーゼ単独群とLPSとプロテアーゼ同時添加群では減少した。しかし、LPSとプロテアーゼ同時添加群はプロテアーゼ単独群に比較して、減少傾向は弱かった。

LPSとプロテアーゼ同時添加により得られた*P. g.*プロテアーゼ作用の抑制結果は、LPSには細胞を活性化する作用があり、プロテアーゼが直接細胞に障害を与えているにもかかわらず、LPSが細胞を活性化させているためではないかと考察した。

本研究結果から、ヒト歯肉線維芽細胞の培養系に*P. g.*由来LPSおよび*P. g.*が産生したプロテアーゼを同時添加することにより組織破壊が細菌の因子と生体の反応様式が複雑にからみあって進行していくというひとつの知見が得られた。