

〔原 著〕

## *Porphyromonas gingivalis*線毛はヒト冠動脈血管内皮細胞に付着する

広瀬 公治, 磯貝恵美子, 水谷 博幸, 小林美智代

北海道医療大学歯学部口腔衛生学講座

### Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to human coronary artery endothelial cells

Kimiharu HIROSE, Emiko ISOGAI, Hiroyuki MIZUGAI and Michiyo KOBAYASHI

Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido

#### Abstract

Infection of periodontopathic bacteria have been suggested to have biological consequences in increased risks of cardiovascular disease. The present study examined whether *Porphyromonas gingivalis* fimbriae could adhere to human heart endothelium, because the fimbriae could be involved in attachment of the organism to host tissue. The study shows that the fimbriae bind specifically to human coronary artery endothelial cells. These results provide experimental evidence to support the correlation between periodontal and heart disease.

**Key words :** Fimbriae, Endothelium, Adhesion.

#### 緒 言

*Helicobacter pylori*が心疾患の高いリスクファクターになることが報告されている<sup>1)</sup>。すなわち細菌の持続感染は心疾患, とりわけ虚血性心疾患の発病要因のひとつになると考えられる。成人性歯周疾患は, 日本国民の多くが罹患している生活習慣病のひとつであるが, 本疾患は*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の慢性持続感染により惹起される疾患である。近

年, 成人型歯周疾患有病者のうち, その重症度が高いほど虚血性心疾患に罹患する割合が高いという疫学報告がなされた<sup>2)</sup>。このことは*P. gingivalis*が心臓血管系, とりわけ冠動静脈に対して特異的に感染を成立させている可能性が示唆される。しかし, これを裏付ける査証はいまだ少ない。

*P. gingivalis*は, いくつかの組織付着因子を持っていることが知られている。このうち菌体最表層に存在する線毛は歯周組織構成細胞, 免

受付: 平成13年3月31日

疫担当細胞に特異的付着することが明かとなっている<sup>3,4)</sup>。このような付着活性を持つ線毛は、歯周局所における感染成立のためのイニシャルイベントに重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、本菌線毛がヒト心臓血管系細胞に感染する能力、すなわち特異的に付着することができるかはいまだ明らかとなっていない。そこで今回我々は、*P. gingivalis* が心臓血管系細胞において感染を成立させる能力があるかを検討するために、本菌精製線毛がヒト冠動脈血管内皮細胞に付着するかについて検索を行った。

## 材料および方法

### 1. *P. gingivalis* 線毛の精製

*P. gingivalis* 線毛の精製は、*P. gingivalis* 381株を48時間GAM液体培地中（日水製薬，東京）で嫌気条件下で培養を行ったものを出発材料とした。線毛の精製は、Yoshimuraら<sup>5)</sup>の方法に従い物理的処理，イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製された線毛は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて分子量43,000の単一バンドを示すこと，および透過型電子顕微鏡を用いた観察により線毛以外の混入物がないことを確認した。線毛蛋白質濃度はBradfordの方法<sup>6)</sup>に従い実施した。

### 2. *P. gingivalis* 線毛の放射性同位元素による標識

精製した *P. gingivalis* 線毛の標識は Hana-zawaら<sup>7)</sup>の方法に従い行った。すなわち精製線毛200 $\mu$ gをEnzymobead(Bio Rad Japan, 東京)と37MBq (1mCi) のキャリアフリーの<sup>125</sup>I (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA) 共存下において標識を行った。標識線毛と非結合の<sup>125</sup>Iの分離は、Sephadex G75 (Pharmacia Japan, 東京) によるカラムクロマトグラフィー法で行った。

### 3. *P. gingivalis* 381株の放射性同位元素による標識

*P. gingivalis* 381株菌体の標識は、GAM培地100ml中に菌体を接種した後、370KBq (100 mCi) のトリチウム-チミジン (<sup>3</sup>H) -TdR: Moravec Biochemicals, Brea, CA, USA) を添加し48時間嫌気条件下で培養することにより行った。培養終了後、遠心にて標識菌体を回収し、MCDB-107培地中において $1 \times 10^7$ 個/mlの菌体濃度になるように調整した。

### 4. ヒト冠動脈血管内皮細胞の培養

ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) は Clonetics社 (Walkersville, MD, USA) より入手したものをを用いた。HCAECは、1%ゼラチンにてコーティングしたプラスチックシャーレ上で、プレートキットEGM-2培地 (Clonetics) 中で5%CO<sub>2</sub>, 37°Cにて継代維持培養を行った。なお実験には、継代数3-6代のものをを用いた。

### 5. HCAECに対する*P. gingivalis*線毛および菌体の付着実験

付着実験には、継代維持したHCAECを、1%ゼラチンコートした96-wellマイクロカルチャープレート (Becton Dickinson, NJ, USA) に1-wellあたり $2 \times 10^3$ 個移植しEGM-2培地中で72時間培養を行い、confluent monolayerの形成を顕微鏡下にて確認したものをを用いた。Confluent monolayerを形成したHCAECは血清ならびに成長因子非添加のMCDB-107培地（極東製薬，東京）にて2回洗浄後、1-wellあたり0.2mlの同培地に置換し付着実験に供した。そこに<sup>125</sup>Iにて標識された線毛を所定の濃度添加し、4°Cにて4時間培養を継続した。培養終了後、非付着線毛を除去するためにMCDB-107培地にて2回洗浄した。その後、線毛-HCAEC複合体をラバーポリスマンにてwellより剥離回収し、ガンマカウンター

(ARC 300, Aloka, 東京)にて放射活性を測定し線毛結合量の指標とした。一方, HCAECへの*P. gingivalis* 381株菌体の付着実験は同様に準備したHCAEC 1-wellあたり0.1ml ( $1 \times 10^6$ 個)の*P. gingivalis*菌液を添加し, 線毛付着実験と同様に4℃, 4時間培養を行った。培養終了後非付着菌体を除去するためにMCDB-107培地にて2回洗浄した後, 菌体-HCAEC複合体を1%SDS溶液にて溶解回収した。回収した複合体は液体シンチレーションカウンター(LSC-900, Aloka, 東京)にてその放射活性を測定し, 付着菌数の指標とした。

## 6. 抗体

線毛の付着阻止活性を持つ抗*P. gingivalis* 381株線毛モノクローナル抗体(EF-3-11)はIsogaiら<sup>9)</sup>の作成したEF-3-11産生ハイブリドーマをBALB/cマウス腹腔内に接種することで得られた腹水を森ら<sup>9)</sup>の方法に従い精製したIgG<sub>1</sub>画分を用いた。ネガティブコントロールとして用いた正常マウスIgG<sub>1</sub>はR&D社(MacK-inley Place, USA)より入手した。

## 7. 統計解析

2群の平均の差の検定はStudent'sのt検定を用いて実施した。

# 結 果

## 1. HCAECへの*P. gingivalis*線毛の付着

*P. gingivalis*線毛がHCAECに付着するか否かを知るために, *P. gingivalis* 381株より精製した線毛を<sup>125</sup>Iにて放射標識したものを検討を行った。その結果, 精製線毛は, その添加濃度依存的にHCAECに付着することが認められ, 線毛添加量400ng/wellでプラトーに達した。(Fig. 1)。またその付着動態は時間依存的であり, HCAECへの付着量は線毛添加2時間後から著明に上昇し, 4時間後にはプラトーに

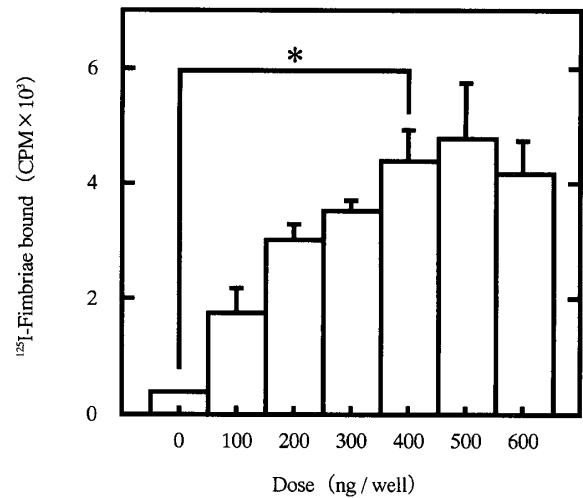


Fig. 1

Adhesion of *P. gingivalis* fimbriae to HCAEC. The cells were incubated for 4-h with various doses of <sup>125</sup>I-labeled fimbriae in supplement-free MCDB-107 media at 4 °C. The results are expressed as mean ± SD of triplicate cultures. \*p < 0.01

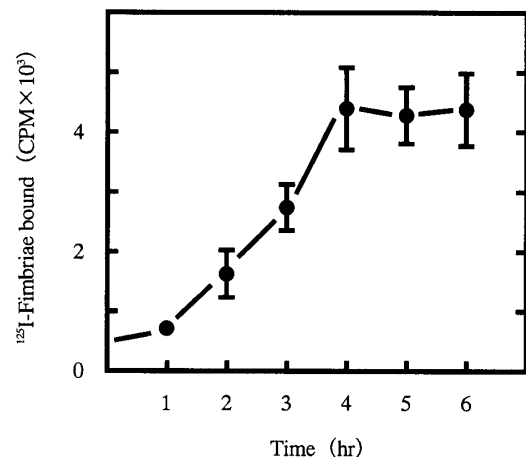


Fig. 2

Time courses of *P. gingivalis* fimbriae adhesion to HCAEC. The cells were incubated for various periods of time with <sup>125</sup>I-labeled fimbriae (400ng/well) in supplement-free MCDB-107 media at 4 °C for 4h. Each point and bar represent the mean ± SD of triplicate cultures.

達した (Fig. 2)。

## 2. <sup>125</sup>I 標識線毛と非標識線毛を用いた付着競合阻害実験

*P. gingivalis*線毛がHCAECに付着することが確かめられたが, これが特異的な付着か, あるいは非特異的な付着かを検討するために放射性同位元素で標識した精製線毛と非標識線毛を

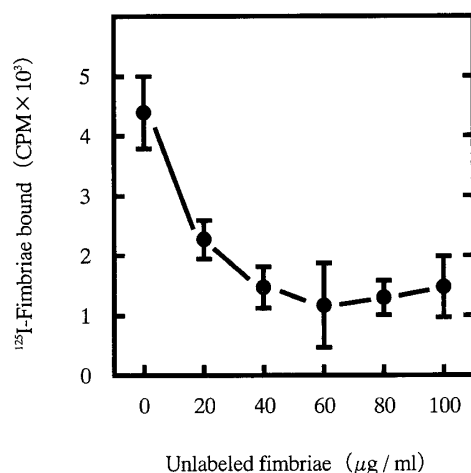


Fig. 3

Competitive adhesion of <sup>125</sup>I-labeled fimbriae with unlabeled fimbriae to HCAEC. The cells were cultured in supplement-free MCDB-107 media at 4 °C for 4 h with <sup>125</sup>I-labeled fimbriae (400 ng/well) and in the presence or absence of various doses of unlabeled fimbriae. The results are expressed as mean ± SD of triplicate cultures.

用いた付着競合阻害実験を行った。標識線毛は、HCAEC各wellあたり400ngの線毛を添加し、非標識線毛は0から100μgの各所定の濃度の量を添加し、4°Cで4時間培養したものにおける標識線毛の付着動態を検索した。その結果、非標識線毛添加量の増加とともに、標識線毛のHCAECへの付着が抑制された (Fig. 3)。

### 3. EF-3-11モノクローナル抗体によるHCAECへの*P. gingivalis* 381株菌

体付着抑制線毛がHCAECに対し特異的に付着することが確かめられたが、菌体それ自体のHCAECへの付着は線毛を介したものであるかを検索するためにHCAECへの*P. gingivalis* 381株の付着におけるEF-3-11抗体の効果について検討した。その結果、抗体 (EF-3-11: 2 μg/ml) 添加群では非添加群に比べHCAECへの*P. gingivalis* 381株菌体の付着は、約60%抑制された (Table 1)。なおネガティブコントロールとして用いた正常マウスIgG<sub>1</sub> (2 μg/ml)

**Table 1** Inhibitory effects of anti-*P. gingivalis* fimbriae monoclonal antibody (EF-3-11) on the fimbriae-mediated adhesion of *P. gingivalis* to HCAEC.

Antibody	<sup>3</sup> H- <i>P. gingivalis</i> bound (CPM) mean ± SD
Control	2,850 ± 231
EF-3-11 (2 μg/ml)	1,072 ± 338
Normal mouse IgG <sub>1</sub> (2 μg/ml)	2,531 ± 446
Blank well : 203 ± 12	*p < 0.01

ml) においては付着抑制効果を認めなかった。

## 考 察

成人型歯周疾患は口腔局所のみならず全身の健康を阻害する要因であることが認識されつつある。このうちBeckら<sup>2)</sup>は、成人型歯周疾患罹患者は、そうでない者に比べ高い相対危険度をもって心疾患に罹患することを疫学的に証明している。これに対する実験的査証を得ようと、近年、成人型歯周疾患原因細菌である*P. gingivalis*が心臓血管系細胞に与える影響についての報告がわずかではあるがなされるようになってきた。Deshpandeら<sup>10)</sup>は、*P. gingivalis*がウシ大動脈および心臓血管内皮細胞へ侵入する能力があることを示している。しかしながら、心疾患のうち最も重要と考える虚血性心疾患の発症に関与する冠動脈内皮細胞に対する本菌の感染成立の可能性を示した報告はない。

今回我々は、*P. gingivalis*の宿主への感染成立、すなわち局所への付着を誘導する線毛がヒト冠動脈内皮細胞に特異的に付着することを明らかにした。このことは歯周局所における本菌が血流を介して心臓血管系細胞にも感染することを示唆すると同時に、心臓血管系内皮細胞において歯周病原性細菌線毛の受容体が存在することも示唆する。

*P. gingivalis*は種々のビルレンス因子を持つことが知られている。そのうち線毛は、組織付

着のみならず、それ単独で歯周組織構成細胞からの炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られている<sup>7)</sup>。すなわち、本菌は菌体構成成分単独でも生物活性を発揮することが示唆され、歯周局所より全身に血行性に供給された線毛が、その受容体を持つ他臓器において病原性を発揮することが考えられる。最近我々は、本菌線毛がヒト臍帯静脈血管内皮細胞へ付着し、さらには同細胞への単球の接合を誘導することを見出し報告している<sup>11)</sup>。血管内皮細胞に単球が接合するのはアテローム形成の初発段階として虚血性心疾患を考察する上できわめて重要な現象である。よって今回示したように、冠動脈血管内皮細胞に対して*P. gingivalis*線毛が付着することは、心臓血管系においても線毛がアテロームを誘導する可能性があることを示唆する。

*P. gingivalis*は様々な生物活性を持つ成分を持っている。このうち、本菌の持つプロテアーゼのひとつにジンジパインがある。そしてこのジンジパインが血液凝固因子の第X因子を活性化し、異常血液凝固を促進する可能性が示唆されている<sup>12)</sup>。今回我々は、*P. gingivalis*菌体が主に線毛を介してHCAECに付着することを示した。このことは、心臓血管系細胞に本菌体が付着すること強く示唆するとともに、*P. gingivalis*由来のジンジパインにより血栓が形成される可能性をも示すものである。血栓は冠動静脈を閉塞し虚血性心疾患の要因ともなるものであり、歯周病原性細菌による虚血性心疾患発症のメカニズムを推察する上で興味ある知見と考える。

今回の研究では、*P. gingivalis*菌体は、主に線毛を介してHCAECに付着することを示したが、抗線毛抗体であるEF-3-11によってその付着を完全に抑制することはできなかった。このことは、本菌とHCAECの付着にはマトリックスベシクルをはじめとする他の接着要因が関与

していることが考えられるが、それが何であるかは今後の検討課題としたい。

## 結 語

1. *P. gingivalis*線毛は、ヒト冠動脈血管内皮細胞に特異的に付着する。
2. *P. gingivalis*菌体は、主に線毛を介してヒト冠動脈血管内皮細胞に付着する。

以上の結果は心疾患のリスクファクターのひとつとして歯周疾患があることを示す疫学的研究報告を支持する実験的証拠のひとつになるものと考ええる。

本研究の一部は日本学術振興会平成12年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)：12672009）により行った。

## 文 献

1. Whincup PH, Mendall MA, Perry IJ, et al. : Prospective relations between *Helicobacter pylori* infection, coronary heart disease, and stroke in middle aged men, *Heart*, **75** : 568-572, 1996.
2. Beck J, Garcia R, Heiss G, et al. : Periodontal disease and cardiovascular disease, *J. Periodontol.*, **67** : 1123-1137, 1996.
3. Hirose K, Isogai E, Mizugai H, et al. : Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to human gingival cell line Ca9-22, *Oral Microbiol. Immunol.*, **11** : 402-406, 1996.
4. Murakami Y, Hanazawa S, Nishida K, et al. : N-acetyl-D-galactosamine inhibits TNF-alpha gene expression in mouse peritoneal macrophages by fimbriae of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*, an oral anaerobe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192** : 826-832, 1993.
5. Yoshimura F, Takahashi K, Nodasaka Y, et al. : Purification and characterization of novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*, *J. Bacteriol.*, **160** : 949-954, 1984.
6. Bradford MM. : A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding,

- Anal. Biochem., **72** : 248-254, 1976.
7. Hanazawa S, Hirose K, Ohmori Y, et al. : *Bacteroides gingivalis* fimbriae stimulate production of thymocyte-activating factor by human gingival fibroblasts, Infect. Immun., **56** : 272-274, 1988.
8. Isogai H, Isogai E, Yoshimura F, et al. : Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae, Arch. Oral Biol., **33** : 479-485, 1988.
9. 森 修二, 広瀬公治, 大井戸真理, 他 : *Porphyromonas gingivalis* のヒト歯肉上皮系細胞 (Ca9-22) への付着および線毛発現の制御に関する培養環境 pH の影響, 日歯周誌, **40** : 58-65, 1998.
10. Deshpande RJ, Khan MB, and Genco CA. : Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*, Infect. Immun., **66** : 5337-5343, 1998.
11. Hirose K, Isogai E, and Ueda I. : *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce adhesion of monocytic cell line U937 to endothelial cells, Microbiol. Immunol., **44** : 17-22, 2000.
12. Imamura T, Potempa J, Tanase S, et al. : Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*, J. Biol. Chem., **272** : 16062-16067, 1997.