

Title	Parvimonas micra と歯周病原菌の共培養時におけるバイオフィルム形成能
Author(s)	堀内, 章; 浅井, 知宏; 額賀, 智之; 石原, 和幸; 石井, 拓男
Journal	歯科学報, 112(4): 537-537
URL	http://hdl.handle.net/10130/2908
Right	

口 演

No.1 : *Porphyromonas gingivalis* に対する *Treponema denticola* の共凝集因子の解明

三枝弘樹, 稲垣 覚, 石原和幸 (東歯大・微生物)

目的: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* の3菌種は慢性歯周炎から高頻度に検出され, その臨床症状との関連から red complex と呼ばれている。このうち *P. gingivalis* と *T. denticola* の間では共凝集が認められる。共凝集はこれらの菌種の歯肉溝内への定着, 歯周病原性バイオフィルムの形成に重要な役割を果たすと考えられている。今回, 我々は *P. gingivalis* との共凝集に関与する *T. denticola* 表層のタンパクの解析を行った。**方法:** *P. gingivalis* ATCC 33277株の Hgp44組換え抗原をウサギに免疫し, 得られた抗 Hgp44抗体を用いて免疫沈降法を行った。*T. denticola* ATCC 35405株から freeze-thawing によって得た画分と *P. gingivalis* ATCC 33277株の超音波破碎上清および抗 Hgp44抗体を混ぜ, 2時間室温にて共培養した。反応後, ProteinA が coat された磁気 beads を加え, 抗 Hgp44抗体およびその結合したタンパクを分画した。得られた画分を SDS-PAGE 電気泳動後,

PVDF 膜に転写し, ウサギ抗 *T. denticola* 抗体を用いた Western blot により *T. denticola* のタンパクを検出した。

成績および考察: 免疫沈降により得られた sample を SDS-PAGE により解析すると, 抗 Hgp44抗体を添加した試料には, 約52kDa のタンパクバンドが認められたが, 対照では認められなかった。抗 *T. denticola* 抗体を使用した Western blot によってもこのタンパクが認められた。このタンパクの大きさは *T. denticola* の表層タンパクである major outer sheath protein (Msp) の大きさに類似していたため, 抗 Msp 抗体を用いて Western blot を行ったところ抗 Msp 抗体はこのタンパクに結合しなかった。この結果より共凝集に関与する *T. denticola* の表層タンパクは Msp とは異なる約52kDa のタンパクであることが明らかとなった。今後, このタンパクを二次元電気泳動, 質量分析法により同定していく予定である。

No.2 : *Parvimonas micra* と歯周病原菌の共培養時におけるバイオフィルム形成能

堀内 章¹⁾, 浅井知宏¹⁾, 額賀智之¹⁾, 石原和幸²⁾, 石井拓男¹⁾³⁾ (東歯大・保存)¹⁾ (東歯大・微生物)²⁾
(東歯大・社会歯)³⁾

研究目的: 根尖性歯周炎の病巣には, 根尖周囲に細菌によるバイオフィルム形成が認められている。根尖病巣からは多様な菌が分離される。このうち検出頻度の高い菌種としては *Parvimonas*, *Prevotella*, *Streptococcus* 等があげられる。慢性歯周炎病巣でのバイオフィルム形成については現在すでに多数の報告があるが, 根尖部におけるバイオフィルム形成についての解析はまだ少ない。さらに, *Parvimonas micra* については, 検出頻度は高いものの, そのバイオフィルム形成メカニズム, 他の菌種との相互作用によるに関してはまだ明らかにされていない。本研究では, *Parvimonas micra* JCM12970の他の歯周病原性菌との共培養時における, バイオフィルム形成能のメカニズムを解析した。

方法: 菌種として *Fusobacterium nucleatum* TDC100, *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277, *Streptococcus mutans* ingbritt, *Prevotella intermedia* 19B, *Capnocytophaga ochracea* ATCC33596, *Staphyrococcus epidermidis* TDC78, TDC86を用いた。また, これらの菌種をヘミン(5µg/ml), メナジオン(0.5µg/ml), 25%システイン及び0.1%グルタミン酸ナトリウムを添加した BHI broth に接種し, 37℃にて2日間嫌気下にて予備培養した。それぞれの菌と *P. micra* を混合し, 共凝集を Cisar らの方法に沿って測定し

た。また, *P. micra* とそれぞれの菌との共培養時の増殖能を OD₆₀₀での吸光度により, バイオフィルム形成能をクリスタルバイオレットの染色により測定した。さらに, 可溶性の分子による菌種間相互作用については Two compartment system を用い, 0.4 µm のフィルターを介して培養し, それぞれの組み合わせにて, planktonic cell の増殖と, バイオフィルムでの増殖をそれぞれ比較した。

結果および考察: *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *C. ochracea* に *P. micra* との共凝集が認められた。その作用は, *F. nucleatum* が最も強く Score 4, *P. gingivalis* で Score 3, *C. ochracea* で Score 2 であった。また, *P. micra* とそれぞれの菌の共培養では, planktonic cell の増加については優位な差は認められなかったが, バイオフィルム形成量では *P. micra* と *F. nucleatum* との組み合わせが, *P. micra* 単体と比べ有意に増加が認められた。

Two compartment system による共培養においても, *P. micra* 単独と比較し, *F. nucleatum* または *P. gingivalis* との共培養によってバイオフィルム形成量の有意な増加が見られた。これら結果により, *P. micra* のバイオフィルム形性が *P. gingivalis*, *F. nucleatum* から遊離される可溶性物質により亢進されることが明らかにされた。