

原 著

Prevotella nigrescens 由来 exopolysaccharide の生物学的作用

山根一芳*¹ 長澤成明*² 池尾 隆*² 小幡 登*¹
中村利央*¹ 森 直樹*¹ 山中武志*¹ 福島久典*¹

*¹大阪歯科大学細菌学講座

*²大阪歯科大学学生化学講座

(2004年4月17日受理)

Biological Activities of Exopolysaccharides Derived from *Prevotella nigrescens*

Kazuyoshi Yamane*¹, Shigeaki Nagasawa*², Takashi Ikee*², Noboru Obata*¹,
Toshio Nakamura*¹, Naoki Mori*¹, Takeshi Yamanaka*¹, Hisanori Fukushima*¹

Department of Bacteriology*¹, Department of Biochemistry*², Osaka Dental University

Accepted for publication 17 April 2004

Prevotella nigrescens is a gram-negative anaerobic rod that is frequently isolated from patients with periodontitis and other oral infectious diseases. We previously isolated exopolysaccharide (EPS)-producing *P. nigrescens* strains 22 and 23 from a chronic periodontitis patient and purified the EPS of each strain. In this study, we investigated the biological effects of EPS on human periodontal ligament fibroblasts (PDL cells) and human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in order to understand how these organisms establish their biofilm scaffold in periodontal tissue. PDL cells and PBMCs were exposed to purified EPS (1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to determine the effect of EPS on proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, and cytokine production by PDL cells and PBMCs. These cells were also cultured with purified EPS and *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) to determine whether EPS increases or inhibits the effects of LPS. Both the EPS from strain 22 and the EPS from strain 23 displayed a slightly inhibitory effect on proliferation by PDL cells and modestly increased the ALP activity of PDL cells. EPS did not induce IL-6, IL-8, or GM-CSF production by PDL cells, nor did EPS induce IL-1 β , IL-6, IL-8, or TNF- α production by PBMCs. Pre-incubation of PBMCs with EPS for 24 hours diminished the effect of LPS stimulation on IL-6 and IL-8 production by PBMCs. EPS did not increase inflammatory cytokine production by PDL cells or PBMCs, and EPS pretreatment reduced LPS-induced cytokine production by PBMCs. These results suggest that the role of EPS may be to enable *P. nigrescens* to escape from host immune responses when the organism invades periodontal tissues and allow it to cause persistent oral infection. J Jpn Soc Periodontol, 46 : 143 ~151, 2004.

Key words : *Prevotella nigrescens*, exopolysaccharide, fibroblast

連絡先：山根一芳

〒573-1121 大阪府枚方市楠葉花園町8-1 大阪歯科大学細菌学講座

Kazuyoshi Yamane

Department of Bacteriology, Osaka Dental University

8-1, Kuzuhahanazono-cho, Hirakata-city, Osaka 573-1121, Japan

E-mail yamane@cc.osaka-dent.ac.jp

要旨: *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) は、歯周病患者の歯周ポケットから高頻度、高比率に分離される歯周病原細菌である。*P. nigrescens* には exopolysaccharide (EPS) を産生する株があり、EPS 産生株を SEM で観察すると、菌体間に網目状の構造物がみられ、biofilm を形成している。本研究では、EPS が歯周組織にどのような影響を与えているかを明らかにすることを目的に、以下の実験を行った。(1) 歯根膜由来線維芽細胞 (PDL 細胞) に歯周ポケット由来の EPS 産生 *P. nigrescens* strain 22, 23 からそれぞれ分離精製した EPS を添加し、細胞数、アルカリホスファターゼ活性 (ALP 活性)、cytokine 産生誘導能を測定した。(2) ヒト末梢血単核細胞画分 (PBMCs) に $1 \mu\text{g/ml}$ の両 EPS を添加し、培養上清中の cytokine 産生量を測定した。(3) PBMCs を両 EPS とともに前培養後、LPS で刺激し、cytokine 産生量の変化を検討した。結果、(1) 両 EPS は、 $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で PDL 細胞の増殖を抑制し、ALP 活性を軽度上昇させた。しかし 1 ないし $100 \mu\text{g/ml}$ の EPS は PDL 細胞に IL-6, IL-8, GM-CSF 産生を誘導しなかった。(2) 両 EPS は PBMCs の IL-1 β , IL-6, IL-8 および TNF- α 産生を誘導しなかった。(3) 両 EPS は PBMCs に対する LPS の IL-6, IL-8 産生誘導を軽度に抑制した。

今回検討を行った範囲では、EPS にはほとんど生物学的活性が見られなかったことから、EPS の *P. nigrescens* の組織侵襲性に及ぼす影響は、主に EPS が物理的バリアを形成し、宿主の局所免疫応答による細菌の排除を回避することによって生じる可能性が示唆された。

索引用語: プレボテラ・ニグレッセンス, 菌体外多糖, 線維芽細胞

緒 言

Prevotella nigrescens (*P. nigrescens*) は *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) とともに、慢性歯周炎¹⁻⁴⁾、急性壊死性潰瘍性歯肉炎⁵⁾、妊娠時における歯肉炎および⁶⁾、根尖性歯周炎^{7,8)}など口腔領域の感染症から高頻度かつ高比率に分離される黒色色素産生性偏性嫌気性グラム陰性桿菌である。*P. intermedia/nigrescens* は線毛性、非線毛性の付着性⁹⁾、他の細菌との共凝集による宿主への付着性¹⁰⁾、Ig protease 産生による組織侵襲性¹¹⁾、赤血球凝集性¹²⁾、溶血性、そして elastolytic serine protease¹³⁾、hyaluronidase、chondroitin sulfatase、collagenase¹⁴⁾、lecithinase¹⁵⁾、acid phosphatase¹⁶⁾ 産生性などの病原性をもつことが報告されている。また、病巣の増悪に伴って産生酵素数が増加し、分離される部位によって病原性が大きく異なることが知られている¹⁴⁾。

さらに *P. nigrescens* の中には exopolysaccharide (EPS) を産生する株 (strain 22, 23) がある¹⁵⁾。山本ら¹⁷⁾はこれらの株から EPS を精製し、EPS が mannose を主要糖とする中性糖からなり、glucose、galactose、arabinose、xylose、rhamnose、ribose を含んでいることを明らかにしている。また、山本ら¹⁷⁾は EPS 産生株と非産生株に突然変異誘発剤を作用させて作製した EPS 非産生変異株の性状を比較している。その結果、両株は酵素産生性や plasmid 保有性に違いはないが、形態学的特徴、赤血球凝集活性、SDS-PAGE の泳動パターンに違いがあることを明らかにしている。最近、我々は strain 22 から分離精製

した EPS の構造が (1,2-, 1,6-), (1,2-), (1,6-), (1,3-) 結合のマンノースを主体とすること、EPS 産生株は非産生株に比べマウスに対する強い膿瘍形成誘導能があること、EPS がヒト好中球に対して貪食抵抗因子として働くことを明らかにしている¹⁸⁾。

歯周疾患の病態には細菌の持つ直接的な病原性のほかに、歯周組織や免疫担当細胞の応答性が関与している。PDL 細胞は歯周組織を構成する細胞であり、その増殖、分化は正常な歯周組織の機能維持に重要な役割を果たしている¹⁹⁾。また同時に線維芽細胞は種々の cytokine を産生し、免疫系細胞とともに cytokine network を構成している²⁰⁾。この cytokine network は炎症の成立、骨吸収促進作用など、歯周組織の破壊や歯周疾患の病状の悪化に深く関与していることが知られている²⁰⁻²³⁾。

本研究では EPS 産生菌がもつ強い膿瘍形成誘導能や貪食抵抗性が EPS の如何なる生物学的作用によるものかを検討するために、以下の実験を行った。まず、strain 22 と strain 23 が産生する EPS を培養歯根膜由来線維芽細胞 (PDL 細胞) に作用させ、その細胞増殖能や分化の指標となるアルカリホスファターゼ活性 (ALP 活性)²⁴⁾、cytokine 産生量に及ぼす影響を検討した。

また、EPS が免疫担当細胞の cytokine 産生に与える影響を明らかにするため、末梢血単核細胞 (PBMCs) に EPS を作用させ、誘導される cytokine 量を検討した。さらに EPS 添加条件で前培養した PBMCs に lipopolysaccharide (LPS) を添加し、EPS が LPS による細胞刺激を遮断するか否かを cytokine 産生能を指標に検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

本実験には歯周ポケットから分離した EPS 産生株 strain 22 と strain 23 を供試した。供試菌は 5% の割合で羊脱線維血を加えた, 5 mg/l hemin, 400 mg/l L-cystine, 10 mg/l vitamin K₁ および 0.5% yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を含む trypticase soy agar (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) に接種し, anaerobic chamber (ANX-3, ヒラサワ, 東京) 内で嫌気培養 (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) した。

2. EPS の分離精製

EPS は Campbell と Pappenheimer²⁵⁾ の方法を用いて, 培養上清から精製した。供試菌を 5 mg/l hemin, 400 mg/l L-cystine, 10 mg/l vitamin K₁ および 0.5% yeast extract (Difco) を含む trypticase soy broth (BBL) で 24 時間嫌気培養したのち, 8,000 rpm, 30 分間の遠心で細胞画分を除去, 培養上清を回収した。得られた上清に最終濃度が 5% になるように sodium acetate を加え攪拌後, 等量の ethanol を添加した。生じた沈殿を 8,000 rpm, 30 分間の遠心で回収し, 5% sodium acetate に溶解した。ついで 1/5 容積の chloroform : 1-butanol (5 : 1) を加え激しく攪拌後, 12,000 rpm, 15 分間の遠心で chloroform-1-butanol 相と水相に分けた。水相を回収し, 同量の ethanol を添加して沈殿物を遠心回収した。この操作を数回繰り返したのち, 凍結乾燥した。1% (w/v) になるように蒸留水に溶解後, 35,000 rpm, 2 時間の遠心で LPS を可及的に除去し, 上清を凍結乾燥後, EPS 標品を得た。

3. 歯根膜由来線維芽細胞の調整

PDL 細胞は矯正治療のため便宜抜去した小白歯および抜去埋伏智歯の歯根膜組織から患者の同意を得て採取し, out growth 法²⁶⁾により初代培養して調製した。すなわち, 抜去した歯を直ちに penicillin (10,000 unit/ml)-streptomycin (10,000 mg/ml) 合剤 (Life Technologies Inc, Rockville, USA) を加えた, カルシウムイオン, マグネシウムイオンを含まない pH 7.2 リン酸緩衝液 (PBS) (日水製薬株式会社, 東京) で 3 回洗浄し, メスを用いて歯根中央 1/3 部から歯根膜組織を剝離した。得られた組織片を penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 μg/ml), 10% の割合のウシ胎児血清 (FCS, Flow Laboratories, North Ryde, Australia) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Lang-

ley, OK, USA) 中で培養し, ここから out growth した細胞を採取して PDL 細胞とした。PDL 細胞は, 組織培養用 75 cm² プラスチックフラスコ (Becton Dickinson, Franklin, NJ, USA) に 1×10⁴ cells/ml の割合で 10 ml ずつ分注し, 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。継代は位相差顕微鏡下で, コンフルエントに達したものを trypsin 溶液で剝離し, 細胞が遊離状態にあることを確認したのち, 遠心回収 (1,700 rpm, 10 分) し, ペレットに penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 μg/ml), 10% FCS を添加した RPMI-1640 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) 培地 10 ml を加え, 細胞数を調整後, 再び 1×10⁴ cell/ml の割合で 10 ml ずつ 75 cm² フラスコに播きこみ継代した。また実験には血清中の各種細胞増殖因子, 分化抑制因子などの影響を少なくするために, 2% FCS 添加 RPMI-1640 培地を用いた。

4. EPS の PDL 細胞増殖能に及ぼす影響

PDL 細胞浮遊液を 3×10⁴ cells/ml になるように 2% FCS 含有培地で調整し, 100 μl/well ずつ 96 ウェル組織培養用プラスチックプレート (Becton Dickinson) に分注後, 37°C で 24 時間予備培養した。EPS が PDL 細胞の増殖に及ぼす影響を検討するため, 精製 EPS を RPMI-1640 培地に溶解し, 最終濃度 0 から 50 μg/ml の範囲で各 well に加えた。これを 7 日間培養し, Cell Counting Kit (同仁化学研究所, 熊本) を用いて, 細胞数を上清の細胞代謝物量の呈色反応により測定した。結果は測定した値から算出した細胞数で表した。結果は, Mann-Whitney's U test で統計学的に検定した。

5. EPS が PDL 細胞の ALP 活性に及ぼす影響

上記のごとく PDL 細胞浮遊液 100 μl を 96 ウェル組織培養用プラスチックプレートに分注し, 37°C で 5 日間予備培養したのち, 培養液を抜き取り, PBS で洗浄後, 最終濃度 0, 3, 6, 12.5, 25, 50, 100 μg/ml になるように EPS を各 well に加えた。これを 3 日間培養し, ALP 活性をアルカリ性ホスファ K-テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いてフェニルリン酸法²⁷⁾で測定した。この際, 細胞数も同時にカウントし, ALP 活性は細胞 10⁴ 個あたりの比活性で表した。結果は, Mann-Whitney's U test で統計学的に検定した。

6. EPS が PDL 細胞の cytokine 産生に及ぼす影響

PDL 細胞浮遊液を最終濃度 3×10⁴ cells/ml になるように調整し, 3 ml ずつ組織培養用プラスチックフラスコに分注した。37°C で 24 時間予備培養したのち, 培養液を抜き取り, EPS の最終濃度を 1 μg/ml

と 100 $\mu\text{g/ml}$ に調整した EPS 加 RPMI-1640 培地, LPS (LPS from *Escherichia coli* serotype O55:B5, シグマ アルドリッチ ジャパン, 東京) の最終濃度を 1 $\mu\text{g/ml}$ に調整した LPS 加 RPMI-1640 培地を各フラスコに加えた。3 日間培養後, 培養上清を回収し, 培養上清中の IL-6, IL-8, GM-CSF 量を Immunoassay Kit Human IL-6, Human IL-8, Human GM-CSF (BioSource International Inc., Camarillo, CA, USA) を用いて ELISA 法で測定した。実験は各検体 3 フラスコずつ行い, その 3 フラスコそれぞれから同量の培養上清を回収し, 混合して測定に供した。

7. 末梢血単核細胞分画の調整

健康成人男性ボランティアの末梢血をヘパリン加採取し, Ficoll-Paque PLUS (アマシャム バイオサイエンス株式会社, 東京) を用いた比重遠心法で PBMCs を分離した。分離した PBMCs は RPMI-1640 培地 (2% FCS 含) で 4×10^6 cells/ml になるよう調整し, 各実験に供した。

8. EPS の cytokine 産生誘導の検討

PBMCs 浮遊液を 1 ml ずつ 24 ウェル組織培養用プラスチックプレートに分注し, 最終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ に調整した EPS 22, 23, LPS の RPMI 溶液を各ウェルに加えて 24 時間培養したのち, 培養上清を回収し, 培養上清中の IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α 量を Immunoassay Kit (BioSource) を用いて ELISA 法で測定した。実験は各検体 3 ウェルずつ行い, その 3 ウェルそれぞれから同量の培養上清を回収し, 混合して測定に供した。

9. LPS 刺激下での EPS による cytokine 産生阻害

PBMCs 浮遊液を 1 ml ずつ 24 ウェル組織培養用プラスチックプレートに分注し, 最終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ に調整した EPS 22, 23 の RPMI 溶液を各ウェルに加えて 24 時間前培養後, 最終濃度 0.05 $\mu\text{g/ml}$ の LPS を添加して 24 時間培養した。なお, EPS 無添加の RPMI-1640 培地を加え, 同様の LPS 刺激を行ったものを陽性対照とし, LPS 刺激を行わないものを陰性対照とした。それぞれの培養上清を回収し, IL-6, IL-8 の量を Immunoassay Kit (BioSource) を用いて ELISA 法で測定した。実験は各検体 3 ウェルずつ行い, その 3 ウェルそれぞれから同量の培養上清を回収して混合後, 測定した。

結 果

1. EPS の PDL 細胞に及ぼす影響

1) 細胞増殖能への影響

PDL 細胞に 0~50 $\mu\text{g/ml}$ の EPS を加え 7 日間培養すると, 細胞数は対照群に比べて, strain 22 由来の EPS を 0.37 $\mu\text{g/ml}$ 添加で, strain 23 由来の EPS では 0.75 $\mu\text{g/ml}$ 添加で細胞数が有意 ($p < 0.05$) に減少した。また, PDL 細胞に 50 $\mu\text{g/ml}$ の EPS を加えて細胞数を経時的に観察すると, 7 日目で細胞数は, strain 22 由来の EPS 添加で $8.2 \pm 0.7 \times 10^3$ cells/ml, strain 23 では $7.0 \pm 0.5 \times 10^3$ cells/ml となり, EPS 無添加の対照群の細胞数 $11.1 \pm 0.4 \times 10^3$ cells/ml に比べ, 有意 ($p < 0.05$) に減少した (図 1 A, B)。

2) ALP 活性への影響

あらかじめ 5 日間培養した PDL 細胞に濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ の strain 23 由来の EPS を加えて 3 日間培養すると, PDL 細胞の ALP 活性は 5.5 ± 1.3 IU/ 10^4 cells となり, EPS 無添加の対照群の 4.0 ± 0.2 IU/ 10^4 cells に比べ有意 ($p < 0.05$) に上昇した (図 2)。しかし濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度では有意な差はみられなかった。

3) Cytokine 産生への影響

PDL に 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の EPS を加えて培養すると, 培養上清中の IL-6 量は, strain 22 由来 EPS 添加では 0.82 ng/ml, strain 23 由来の EPS では 0.88 ng/ml となり, 無添加の対照群 (0.86 ng/ml) と差が認められなかった。陽性対照としての LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 添加では 7.44 ng/ml に上昇した。(図 3-a)。IL-8 量も LPS 刺激では 1.02 ng/ml に上昇したが, EPS 添加ではこの産生は誘導されず, 無添加の対照群と差が認められなかった (図 3-b)。GM-CSF 量も LPS 刺激では上昇したが, EPS による産生誘導は認められなかった (図 3-c)。また, 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の EPS を加えても, 培養上清中に IL-6, IL-8, GM-CSF の産生は誘導されなかった (図に示さず)。

2. EPS の PBMCs による cytokine 産生誘導の検討

PBMCs に 1 $\mu\text{g/ml}$ の EPS または 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS を加えて培養した時の培養上清中の IL-1 β 量は, LPS を加えると 3.49 ng/ml に上昇したが, strain 22 由来 EPS 添加では 0.030 ng/ml, strain 23 由来 EPS 添加では 0.036 ng/ml となり, EPS 無添加の対照群の培養上清中の IL-1 β 量 0.043 ng/ml と差が認められなかった (図 4-a)。IL-6 量 (図 4-b), IL-8 量

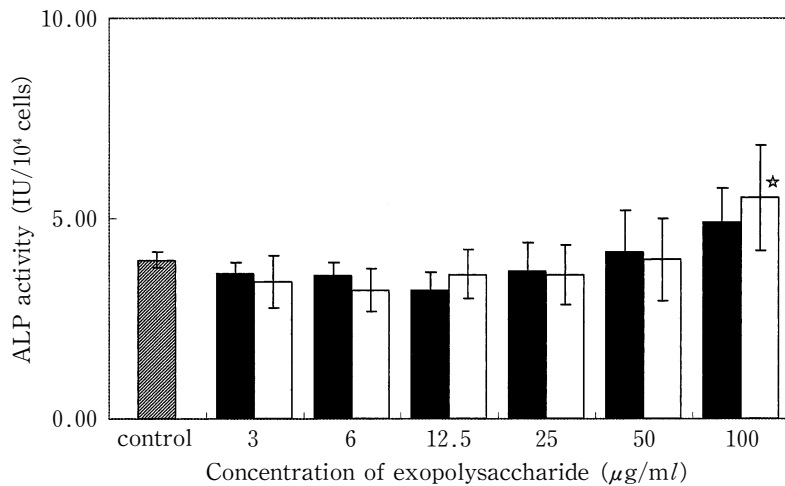
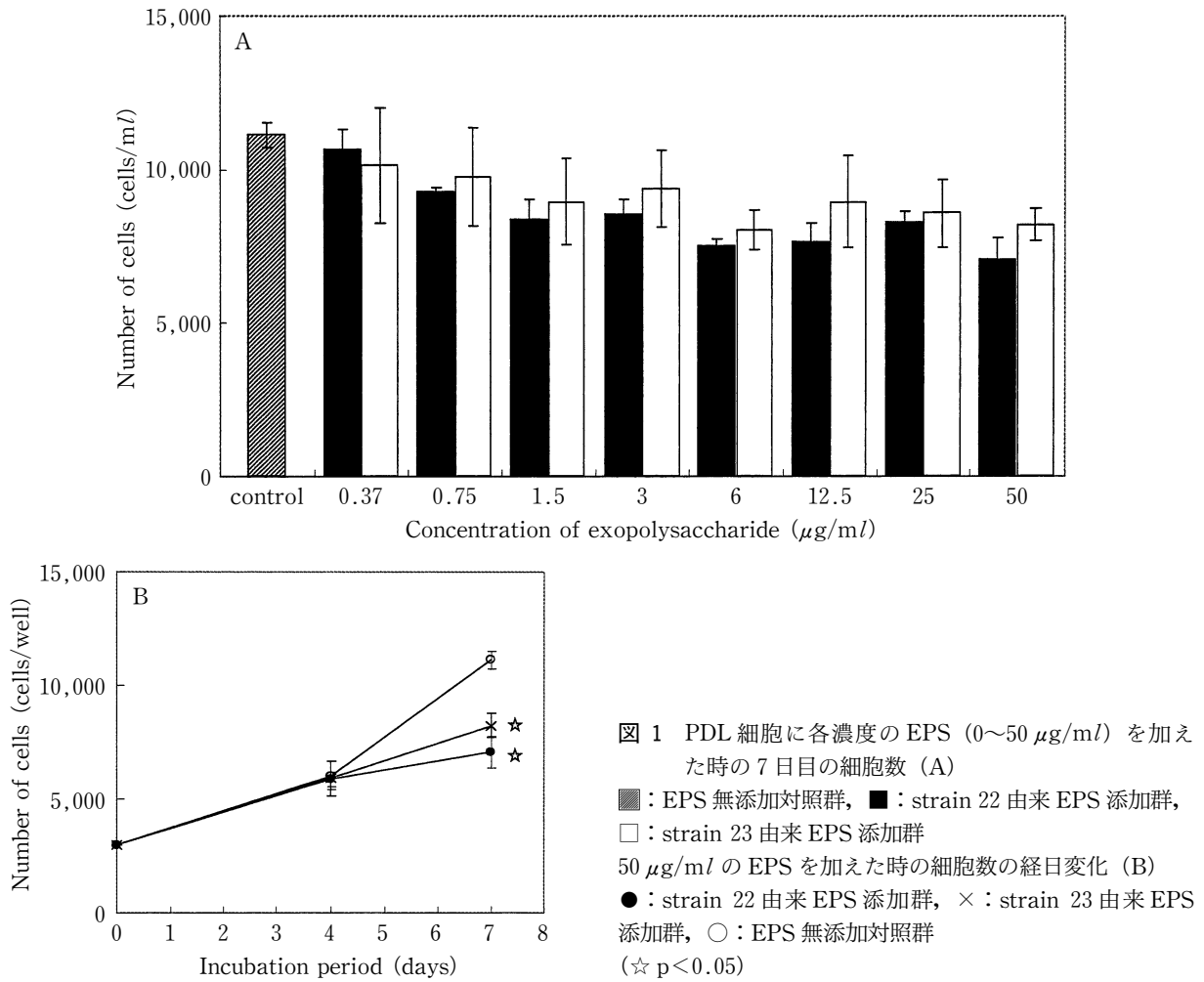


図 1 PDL 細胞に各濃度の EPS (0~50 $\mu\text{g/ml}$) を加えた時の 7 日目の細胞数 (A)
 ■ : EPS 無添加対照群, ■ : strain 22 由来 EPS 添加群, □ : strain 23 由来 EPS 添加群
 50 $\mu\text{g/ml}$ の EPS を加えた時の細胞数の経日変化 (B)
 ● : strain 22 由来 EPS 添加群, × : strain 23 由来 EPS 添加群, ○ : EPS 無添加対照群
 (☆ $p < 0.05$)

図 2 EPS の PDL 細胞の ALP 活性への影響
 ■ : EPS 無添加対照群, ■ : strain 22 由来 EPS 添加群, □ : strain 23 由来 EPS 添加群
 (☆ $p < 0.05$)

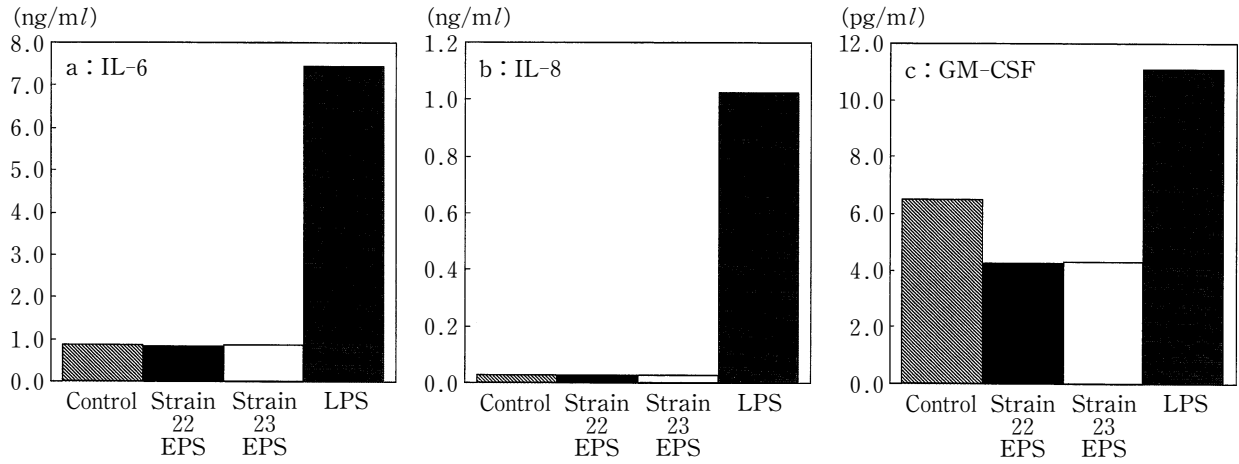


図 3 EPS の PDL 細胞の cytokine 産生性への影響

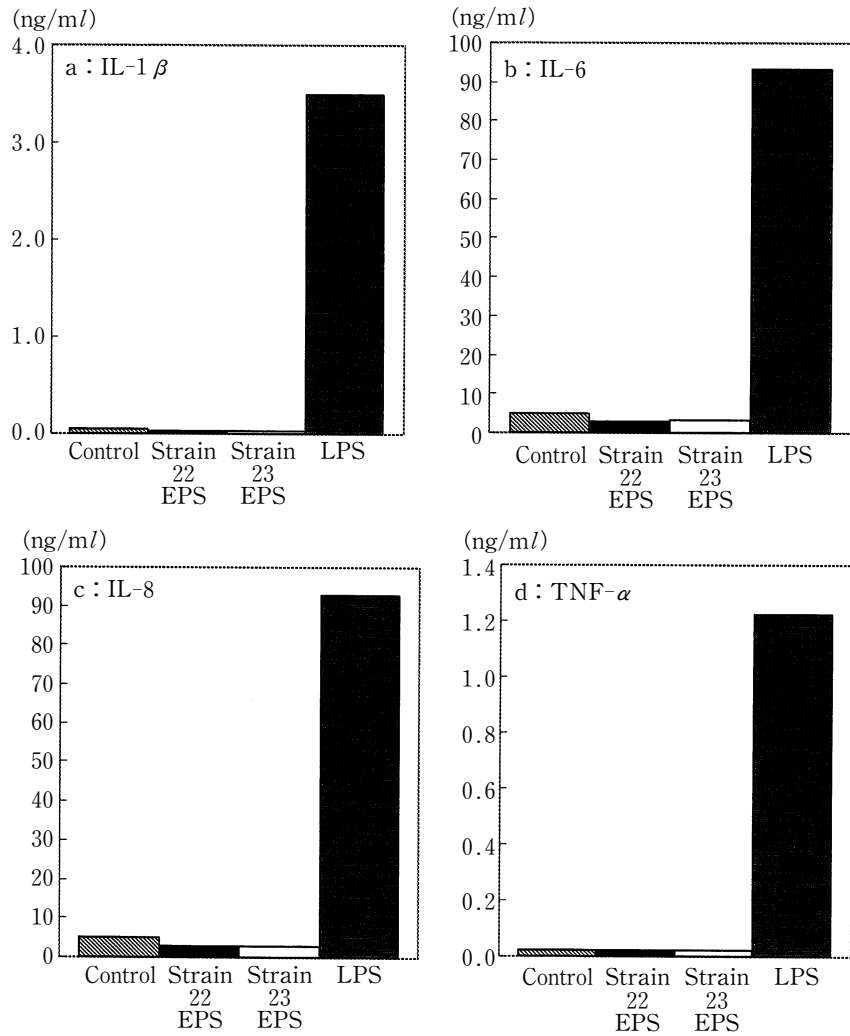


図 4 EPS の PBMCs の cytokine 産生性への影響

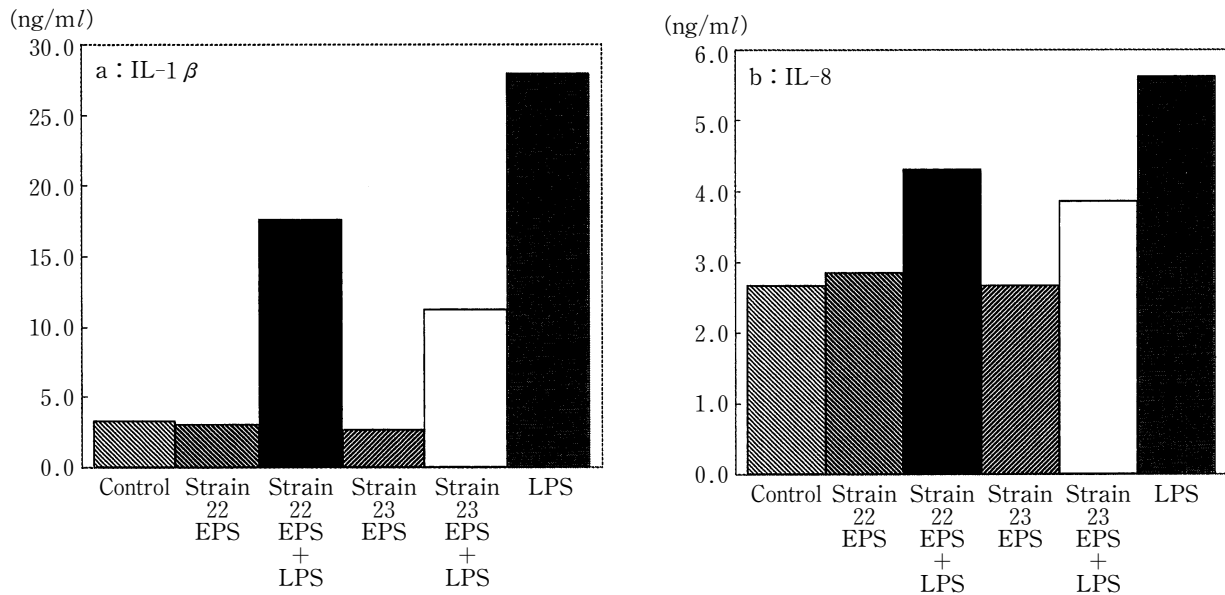


図 5 EPSと共に前培養（24時間）したPBMCsにLPS刺激を加えた時の培養上清中 cytokine 量

(図4-c)についても同様で、LPS刺激下では上昇したが、EPSによる産生誘導は認められなかった。TNF- α 量についても、EPS無添加の対照群と差が認められなかった(図4-d)。図4-a, b, c, dは、同一傾向を示した2回の実験の一例を示したものである。

3. EPSによる cytokine 産生誘導阻害の検討

EPSにはPDL細胞とPBMCsに対する cytokine 産生誘導性が無いことが明らかになったので、次に、EPSがLPS刺激に対する cytokine 産生に影響を及ぼすか検討を行った。最終濃度1 $\mu\text{g/ml}$ のEPSと前培養したPBMCsをLPSで刺激すると、strain 22, strain 23 EPSの両者ともLPSによるIL-6, IL-8産生誘導(図5 a, b)を軽度抑制した。Strain 23由来EPSの方がやや抑制効果は強かった。結果は同一傾向を示した2回の実験の一例を示す(図5 a, b)。

考 察

通常歯肉縁上の dental plaque biofilm は、streptococci を主としたグラム陽性菌の歯面への付着、集落形成を起点に、次第に偏性嫌気性グラム陰性菌の比率が増加すると考えられている²⁸⁾。

我々は既にこのシュクロース依存性のプラーク形成とは別に、歯周病原細菌である *P. intermedia* や *P. nigrescens* が多量のEPSを産生し、独自にバイオフィルムを形成する可能性を報告している^{15,17)}。また、EPS産生 *P. nigrescens* は非産生株と比較して強い膿

瘍形成能や好中球貪食抵抗性をもつことを明らかにしている¹⁸⁾。このようにEPSは産生菌や周囲の細菌に強い組織侵襲性を付与していることが分かっている。

本実験では、まずEPSのPDL細胞への直接的な影響と、免疫系細胞であるPBMCsの cytokine network への影響を検討した。その結果、EPSは高濃度でPDL細胞の増殖を軽度に抑制し、アルカリホスファターゼ活性を軽度に上昇させたが、低濃度ではPDL細胞の増殖、ALP活性にほとんど影響を与えなかった。またEPSを添加して培養したPDL細胞の培養上清中のIL-6, IL-8, GM-CSF量は対照群と比較して変化がなく、EPSはPDL細胞に刺激因子として直接的に働かないことが明らかになった。また、EPSは免疫担当細胞であるPBMCsのIL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α などの炎症性 cytokine 産生を誘導しなかった。

Streptococcus pneumoniae や *Klebsiella pneumoniae* では多糖体である莢膜が疎水性を低下させ、本来の菌体表層の物理化学的性状を修飾することにより自己表層の異物性を覆い隠していると考えられている²⁹⁾。*P. nigrescens* のEPSにはPDL細胞ならびにPBMCsに対する直接的な生物学的活性を認めなかったため、EPSが生物学的なLPS刺激に対してどのような影響を及ぼすかを検討する目的で、EPSとともに前培養したPBMCsにLPS刺激を加え、 cytokine 産生に及ぼすEPSの影響を検討した。その結果、1 $\mu\text{g/ml}$ のEPSはPBMCsに対するLPSのIL-6、およびIL-8産生誘導を軽度に抑制することが明らかに

なった。今後、EPSの抑制効果が口腔内の細菌由来のLPSやペプチドグリカンなどの成分に対しても抑制効果があるかなどを更に検討していく必要がある。

一般的に、歯周疾患ではLPSが線維芽細胞や免疫担当細胞に作用し、cytokineの産生を誘導することで、疾患の増悪化が起こると考えられている^{30,31)}。EPSは好中球の貪食に抵抗因子として働くが¹⁸⁾自身には全くcytokine産生誘導性が見られないことは興味深い。おそらく*P. nigrescens*のEPSは、他の細菌が産生する菌体外多糖と同様にbiofilmを形成し、菌体を貪食細胞などから保護することに加え、細菌による強い局所免疫応答を抑えることで、持続的な感染症である歯周疾患の成立に関与していると推測される。

謝 辞

本研究は、大阪歯科大学中央歯学研究所（形態系研究施設、画像処理施設、低温実験施設）を利用して行った。また本研究の一部は、大阪歯科大学学術研究奨励助成金(A 03-03)によるものである。

本論文の要旨は、第43回秋季日本歯周病学会学術大会(2001年10月18日)において発表した。

文 献

- Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ : Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 15 : 240-246, 1988.
- Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlén G : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*, 13 : 570-577, 1986.
- White D, Mayrand D : Association of oral Bacteroides with gingivitis and adult periodontitis. *J Periodontal Res*, 16 : 259-265, 1981.
- Zambon JJ, Reynolds HS, Slots J : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. *Infect Immun*, 32 : 198-203, 1981.
- Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J : The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol*, 53 : 223-230, 1982.
- Kornman KS, Loesche WJ : The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodontal Res*, 15 : 111-122, 1980.
- Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T : Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod*, 25 : 413-415, 1999.
- Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H : Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod*, 13 : 24-28, 1987.
- Leung K-P, Fukushima H, Sagawa H, Walker CB, Clark WB : Surface appendages, hemagglutination, and adherence to human epithelial cells of *Bacteroides intermedius*. *Oral Microbiol Immunol*, 4 : 204-210, 1989.
- Nesbitt WE, Fukushima H, Leung K-P, Clark WB : Coaggregation of *Prevotella intermedia* with oral *Actinomyces* species. *Infect Immun*, 61 : 2011-2014, 1993.
- Jansen HJ, Grenier D, Van der Hoeven JS : Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol*, 10 : 138-145, 1995.
- Leung K-P, Fukushima H, Nesbitt WE, Clark WB : *Prevotella intermedia* fimbriae mediate hemagglutination. *Oral Microbiol Immunol*, 11 : 42-50, 1996.
- Shibata Y, Fujimura S, Nakamura T : Purification and partial characterization of an elastolytic serine protease of *Prevotella intermedia*. *Appl Environ Microbiol*, 59 : 2107-2111, 1993.
- 多々見敏章 : 歯性感染症における偏性嫌気性菌の病原因子とくに酵素活性に関する研究. *日本口腔外科学会雑誌*, 38 : 254-270, 1992.
- Fukushima H, Moroi H, Inoue J, Onoe T, Ezaki T, Yabuuchi E, Leung K-P, Walker CB, Clark WB and Sagawa H : Phenotypic characteristics and DNA relatedness in *Prevotella intermedia* and similar organisms. *Oral Microbiol Immunol*, 7 : 60-64, 1992.
- Chen X, Ansai T, Awano S, Iida T, Barik S, Takehara T : Isolation, cloning, and expression of an acid phosphatase containing phosphotyrosyl phosphatase activity from *Prevotella intermedia*. *J Bacteriol*, 181 : 7107-7114, 1999.
- 山本範子, 福島久典, 佐川寛典 : *Prevotella nigrescens* 由来 exopolysaccharide の性状. *歯科医学*, 61 : 21-33, 1998.
- 山根一芳, 山中武志, 福島久典 : *Prevotella nigrescens* が産生する exopolysaccharide の性状. *歯科医学*, 67 : 1-12, 2004.
- Beertsen W, McCulloch CG, Sodek J : The periodontal ligament : a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000*, 13 : 20-40, 1997.
- 今西二郎, 笹田昌孝編 : 感染症とサイトカイン 防御と病態形成の両面性. 医歯薬ジャーナル社, 大

- 阪, 1998, 11-20.
- 21) Honig J, Rordorf AC, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F : Increased interleukin-1 beta (IL-1 beta) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. J Periodontal Res, 24 : 362-367, 1989.
 - 22) Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, Murayama Y : Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol, 65 : 147-153, 1994.
 - 23) Nishikawa M Yamaguchi Y, Yoshitake K and Saeki Y : Effects of TNF α and prostaglandin E₂ on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res, 37 : 167-176, 2002.
 - 24) 宮里尚幸, 小俣秀人, 真田一男, 勝海一郎 : ヒト歯髄及び歯根膜由来培養線維芽細胞のアルカリホスファターゼ活性とオステオカルシン合成に及ぼすL-アスコルビン酸 2-リン酸の影響. 日本歯科保存学雑誌, 41 : 1101-1113 1998.
 - 25) Campbell JH, Pappenheimer AM Jr : Quantitative studies of the specificity of anti-pneumococcal polysaccharide antibodies, types III and VIII- I . Isolation of oligosaccharides from acid and from enzymatic hydrolysates of S 3 and S 8. Immunochimistry, 3 : 195-212, 1966.
 - 26) 寺田行男 : 種々なる負荷がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響 *in vitro*. 日本歯科保存学雑誌, 43 : 324-340, 2000.
 - 27) Kind PRN, King EJ : Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. J Clin Path, 7 : 322-326, 1954.
 - 28) Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ : Intergeneric communication in dental plaque biofilms. J Bacteriol, 182 : 7067-7069, 2000.
 - 29) Buttery J, Moxon ER : Capsulate bacteria and lung. Br Med Bull, 61 : 63-80, 2002.
 - 30) 鎌形有祐, 戸来 徹, 塚原武典, 岡本 浩 : 歯周病原細菌内毒素のサイトカイン産生誘導作用. 日本歯科保存学会誌, 36 : 652-656, 1993.
 - 31) 大井戸真理 : 歯周疾患関連細菌由来リポ多糖体に対するヒト歯肉線維芽細胞の応答性に関する研究. 日本歯科保存学会誌, 38 : 1280-1289, 1995.
-