

Porphyromonas endodontalis の病原因子の解析

昆 麻子

岩手医科大学歯学部歯科保存学第一講座

(主任 : 久保田 稔 教授)

(受付 : 2002年10月24日)

(受理 : 2002年11月15日)

Abstract : *Porphyromonas endodontalis*, a gram-negative anaerobic rod, is an important pathogenic organism in periapical lesions with acute symptoms, such as pain, swelling, and suppuration in endodontic patient. Like *P. gingivalis*, a major pathogen of adult periodontitis, *P. endodontalis* is asaccharolytic and forms black-pigmented colonies on enriched blood agar plates. However, pathogenic factors and pathological potential of this microbe have been poorly characterized. In this study, we assessed the adhesive abilities of *P. endodontalis* to gingival epithelial cell, and investigated whether *P. endodontalis* has a major fimbrial component of fimbriin similar to that of *P. gingivalis*. Furthermore, the proteolytic activities of *P. endodontalis* were examined. The results indicated that *P. endodontalis* significantly adhered to a mouse gingival epithelial cell line, GE1, although the adhesive ability was lower than that of *P. gingivalis*. The electron microscopic investigations showed scarcely any fimbriae in *P. endodontalis*. Furthermore, PCR and the DNA-DNA hybridization analysis for the gene encoding fimbriin (*fimA*) of *P. gingivalis* revealed that *P. endodontalis* did not have *fimA* or *fimA*-related genes, which could account for the lesser adhesive ability of *P. endodontalis* to gingival epithelial cells. The hydrolyzing profile toward various synthetic peptides showed that the spectrum of proteolytic activities of *P. endodontalis* was markedly different from that of *P. gingivalis*. Thus, the present findings indicate that *P. endodontalis* has a different adhesion mechanism from *P. gingivalis* fimbriae, and has a different spectrum of proteolytic activities from that of *P. gingivalis*, which may lead to the specific pathological potential of the organisms in periapical lesions in humans.

Key words : *Porphyromonas endodontalis*, pathogenic factors, *fimA*, adhesion, protease.

緒 言

炎症歯髓組織内に細菌が存在することを示した W. D. Miller の報告¹⁾以来, 病理組織学的研究, 細菌学的研究さらに無菌動物を用いた動物実験など, 根管内の細菌の病原性に関する多くの研究がなされてきている^{2~9)}。感染根管や根

尖性歯周炎からはこれまでに数多くの細菌種が分離されているが, 特に細菌の嫌気培養法が確立¹⁰⁾されてからは, 嫌気性細菌が根管内で優勢であることが明らかにされている¹¹⁾。嫌気培養法を用いた感染根管内の細菌叢に関する平井らの研究¹²⁾では, *Actinomyces* 属, *Eubacterium* 属, *Lactbacillus* 属, *Prevotella/*

Pathogenic factors of *Porphyromonas endodontalis*

Asako KON

Department of Operative Dentistry and Endodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University, 1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

Porphyromonas 属 (旧分類では *Bacteroides* 属) が優勢で、特に臨床症状を有する感染根管からは、*Eubacterium* 属、*Peptostreptococcus* 属、*Prevotella/ Porphyromonas* 属の細菌の分離頻度が高いことが示されている。しかし、1根管 (もしくは1歯) からの分離細菌種数は少ないことから、感染根管/根尖性歯周炎における細菌叢が、その細菌種のみならず細菌叢の複雑性においても、歯周疾患の病巣部歯周ポケット内のそれとは大きく異なっていることが示唆される。

感染根管/根尖性歯周炎から分離される *Prevotella/ Porphyromonas* 属の細菌のうち、成人性 (慢性) 歯周炎の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* の分離頻度は低い^{11, 13)}。しかし感染根管/根尖性歯周炎からは、*P. gingivalis* と細菌学的性状が類似した *Porphyromonas endodontalis* が分離されている¹⁴⁾。本菌は、特に、強い臨床症状をとともう根管にあるいは歯根膿瘍病巣部から分離されることから、根尖性歯周炎の病巣部での急性症状との関連性が示唆されている¹⁵⁾。細菌学的には、*P. endodontalis* はグラム陰性桿菌で、黒色素産生性、糖非発酵性という点では *P. gingivalis* と一致するが、トリプシン様活性とヒツジ赤血球凝集能を欠き、また最終産物としてフェニル酢酸を産生しない点で異なると報告されている^{16, 17)}。しかし、*P. endodontalis* の病原特異性に関わる病原因子についての解析はほとんど進んでおらず¹⁸⁾、したがって、臨床的に明確な病原性の違いがある *P. gingivalis* の病原因子との異同、関連性についても明らかではない。*P. gingivalis* の病原因子としては、これまでに、定着因子としての線毛、赤血球凝集能、outer membrane vesicles, capsules, butyric acid 等の代謝産物、および種々の酵素 (トリプシン様タンパク分解酵素、コラゲナーゼ、ゲラチナーゼ、ヒアルロニダーゼ) などが挙げられている^{19~25)}。特に、*P. gingivalis* の線毛には6種類のタイプ (タイプ I-V およびタイプ Ib) のあることが遺伝子レベルで明らかにされてお

り²⁶⁾、それぞれのタイプにより歯肉上皮細胞への定着性、侵入性に違いのあることが示唆されている²⁷⁾。一方、*P. endodontalis* については本菌の皮下接種後、膿瘍形成能を示すという動物実験での結果が示されている²⁸⁾ものの、その病原因子、病原性の機序についての報告はなされていないというのが現状である。

そこで本研究では、*P. endodontalis* の病原因子を明らかにする目的で、歯肉上皮細胞への定着性について *P. gingivalis* と比較検討するとともに、本菌が *P. gingivalis* の線毛様構造物を有するか否かについて、これまでに報告のある主要5種類の *fimA* 遺伝子配列をもとにした分子生物学的検索法を用いて検討した。さらに、種々の合成基質ペプチドを用いて *P. endodontalis* のプロテアーゼ活性スペクトラムを検索し、*P. endodontalis* の病原特異性についての検討を行った。

材料および方法

1. 供試菌株と培養条件

P. endodontalis ATCC 35406株、*P. gingivalis* ATCC 33277株 (タイプ I *fimA*)、HW24D1株 (タイプ II *fimA*)、ATCC 49417株 (タイプ III *fimA*)、および ATCC 53978株 (タイプ IV *fimA*) を American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入し実験に供した。菌株は、Suzuki らの方法²⁹⁾を一部改変し、メナジオン (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を添加した嫌気性菌用培地 (栄研化学, 東京) (ABCM 培地) で、嫌気培養システム (日本ベクトン・ディッキンソン, 東京) を用いて嫌气的条件下 (90% N_2 , 5% H_2 , 5% CO_2) で、37°C, 48時間培養した。プロテアーゼ活性測定実験では、供試菌株を Ohara-Nemoto ら³⁰⁾にしたがい透析膜上培養法により培養した。すなわち、オートクレーブ滅菌した透析膜 (カットオフ6000; 三光純薬, 東京) を ABCM 寒天培地に密着するように敷き、前培養した菌株を播種し、37°C, 嫌気条件下で72時間培養した。

Table 1. PCR primer sets used in this study

Target gene	Primer sets (5'-3')	Size (bp)
<i>P. gingivalis</i> 16S rRNA	TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC ACGTCATCCCCACCTTCCTC	197
<i>P. endodontalis</i> 16S rRNA	TTTCTCCGCATGGAGGAGGA CTTCGGTCTCCTCTAGCATA	477
type I <i>fimA</i>	CTGTGTGTTTATGGCAAACCTC AACCCCGCTCCCTGTATTCCGA	392
type II <i>fimA</i>	ACAACAATACTTATGACAATGG AACCCCGCTCCCTGTATTCCGA	257
type III <i>fimA</i>	ATTACACCTACACAGGTGAGGC AACCCCGCTCCCTGTATTCCGA	247
type IV <i>fimA</i>	CTATTCAGGTGCTATTACCCAA AACCCCGCTCCCTGTATTCCGA	251
type V <i>fimA</i>	AACAACAGTCTCCTTGACAGTG TATTGGGGGTCGAACGTTACTGTC	462

2. 歯肉上皮細胞への付着能の検討

P. endodontalis および *P. gingivalis* ATCC 33277 菌体を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) で洗浄後、1% ウシ胎児血清 (ICN Biomedicals, 大阪) を含む SFM 101 培地 (Nissui, 東京) に懸濁 (1×10^9 個/ml) した。その懸濁液 (100 μ l) を、6 cm シャーレ内で、カバーガラス (18 \times 22mm) 上に別途調製したマウス歯肉上皮細胞株である GE 1 細胞³¹⁾ に添加し、5% CO₂-95% 大気、湿度 95% の条件下で 33°C、2 時間培養を行った。GE 1 細胞は畠山節子博士 (岩手医科大学口腔病理学講座) より恵受を受けた。培養終了後、非付着細菌を PBS で洗浄、除去後、通法にしたがいギムザ染色を行い、光学顕微鏡下で観察を行った。

歯肉上皮細胞への付着能の定量的測定は [³H] で標識した菌株を用いて行った。すなわち、 [³H] チミジン (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) を添加して培養した菌体の懸濁液を調製し、懸濁液 (100 μ l) を GE 1 細胞に添加し培養 (33°C, 2 時間) した。培養終了後、PBS で洗浄した後、10% TCA (trichloroacetic acid) (200 μ l) を加え氷上で 20 分間静置した。静置後、0.1 M NaOH (200 μ l) を加えて細胞を溶解し、その放射活性から付着

率を算出した。

3. 電子顕微鏡観察

液体培養した細菌を PBS で洗浄後、2.5% グルタルアルデヒド (ナカライテスク, 京都) で 2 時間固定した。ニッケルグリッドに塗布後、2% 酢酸ウランでネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡 (H600A, HITACHI, 東京) で観察した。走査型電子顕微鏡観察は、スライドガラスに塗布した菌体を 1% オスミウムで固定し、脱水、凍結真空乾燥後、オスミウムコーティングを行い、走査型電子顕微鏡 (S-4700, HITACHI) で観察した。

4. PCR (polymerase chain reaction)

それぞれの菌株から Wizard ゲノム DNA 精製キット (Promega, Madison, WI, USA) を用いて DNA を精製した。精製した DNA をテンプレートとし、*fimA* 遺伝子特異的プライマー (Table 1) を用いて既報³⁰⁾ の反応条件で、PCR 反応 (94°C, 30 秒間, 58°C, 30 秒間, 72°C, 30 秒間を 1 サイクルとして 30 サイクル) を行った。PCR 産物はアガロースゲル (1.8% アガロース, 1 μ g/ml エチジウムブロマイド, 0.66 mM Tris-borate, 5 mM EDTA, pH 8.3) 電気泳動を行い検出した。

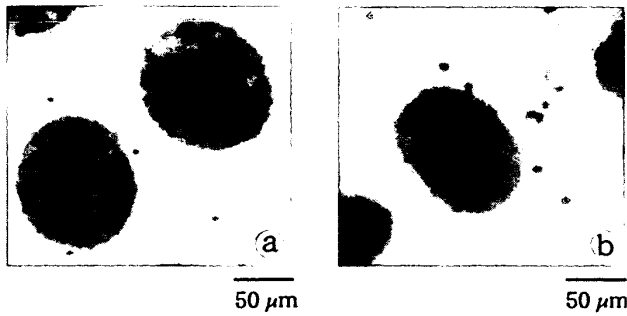


Fig. 1. A representative result of Giemsa staining obtained in the adhesion assay. *P. endodontalis* (a) and *P. gingivalis* ATCC 33277 (b) were incubated with gingival epithelial cells (GE1), and adhered bacteria were stained.

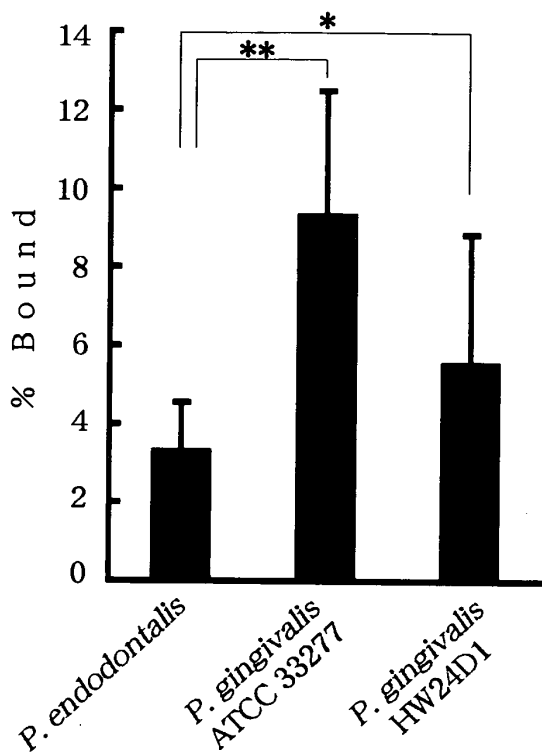


Fig. 2. Adhesion assay with [^3H] labeled-*P. endodontalis* with GE1 cells. *P. endodontalis* and *P. gingivalis* ATCC 33277 and HW24D1 were labeled with [^3H] thymidine, and then [^3H] labeled-bacteria (1×10^8) were incubated with GE1 cells (1×10^6) at 33°C for 2 h. After washing, the radio activity was measured. The results are expressed as a percentage of [^3H] bound of the added [^3H] count (means \pm SD, $n = 7$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

5. DNA-DNA ハイブリダイゼーション

P. gingivalis ATCC 33277株の DNA をテン

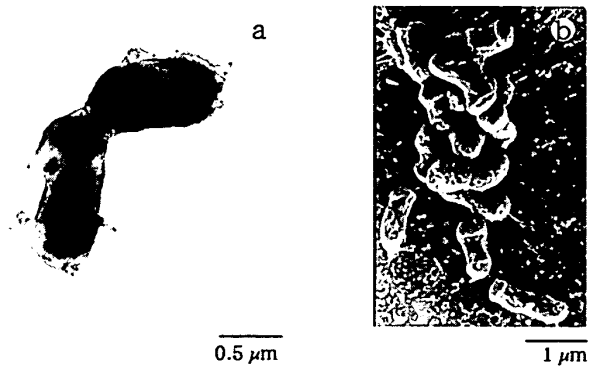


Fig. 3. An electron micrograph of negatively stained *P. endodontalis* (a), and the SEM micrograph (b).

プレートとして、プライマー (5'-GAGCACAACATAATCTGAACGA-3', 5'-AACGGGTTCTGCCTCGTTG-3') を用いてタイプI-V *fimA* の共通配列部分192 bpをPCRで増幅した。増幅 DNA 断片を1.8%アガロースゲル電気泳動で分離後, Qiaex II Gel Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) で精製した。精製 DNA を Gene image labeling system (Amarsham) を用いてフルオレセイン標識し, Ohara-Nemoto ら³⁰⁾ にしたがひ, *P. endodontalis* ゲノム DNA との DNA-DNA ハイブリダイゼーション解析を行った。

6. プロテアーゼ活性の測定

透析膜上培養した菌体を PBS に懸濁し, 菌懸濁液 ($A_{600} = 1$) を調製した。菌懸濁液 (1 ml) を $8,000 \times g$, 20分間遠心して得られた上清を菌体外産物画分とした。沈渣菌体を 5 ml PBS で 3回洗浄後, 1 ml の PBS に再懸濁し, 菌体浮遊液画分とした。50 μl の菌体外産物画分あるいは菌体浮遊液画分に 1 mM DTT (dithiothreitol), 58 mM Na_2HPO_4 , 17 mM NaH_2PO_4 , 68 mM NaCl を添加して 200 μl の反応液 (pH7.4) とした。反応液を 30°C , 5分間保温した後, 0.1 mM 4-methylcoumaryl-7-amid (MCA) ペプチド (ペプチド研究所, 大阪) を添加し反応を開始した。反応 (30°C , 30分間) 終了後, 蛍光分光光度計 (F-2000, HITACHI) を用いて, 励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm で 7-amino-4-

methylcoumarin の蛍光強度を測定した。

結 果

1. 歯肉上皮細胞への付着能

マウス歯肉上皮細胞株である GE 1 細胞への *P. endodontalis* の付着性について *P. gingivalis* と比較検討した。ギムザ染色後の光顕観察 (Fig. 1) では、GE 1 細胞の 1 細胞に付着する *P. endodontalis* の菌数は、 3.4 ± 0.5 個 (平均 \pm 標準偏差, $n=40$) で、*P. gingivalis* の付着菌数 (5.0 ± 1.4 個, $n=40$) と比較して有意に低いことが明らかとなった ($P < 0.001$)。

この結果は、 $[^3\text{H}]$ 標識した菌体を用いた GE 1 細胞との付着能の測定からも確認された (Fig. 2)。すなわち、*P. endodontalis* は、タイプ I 型線毛を有する *P. gingivalis* ATCC 33277 株、タイプ II 型線毛を有する *P. gingivalis* HW 24D 1 株と比較して、GE 1 細胞への付着能が有意に低いことが明らかとなった (それぞれ $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

また、ネガティブ染色および走査型電子顕微鏡による線毛構造の観察を行った結果、*P. endodontalis* に明確な線毛様構造は認められなかった (Fig. 3)。

2. *fimA* 関連遺伝子の検索

現在のところ、*P. gingivalis* 線毛の主要な構成成分であるフィンブリリンには 6 種類のサブタイプが存在することが報告されている^{26, 32)}。そこで、*P. endodontalis* が、フィンブリリンの構造遺伝子である *fimA*、あるいはそれに類似する *fimA* 関連遺伝子を保有する可能性について PCR 法を用いて検討した (Fig. 4)。その結果、*P. endodontalis* のゲノム DNA をテンプレートとした場合には、タイプ I-V のいずれの *fimA* の増幅も見られなかった。

さらに、*P. endodontalis* ゲノム DNA 上に *fimA* 類似配列が存在するか否かについて、DNA-DNA ハイブリダイゼーション解析を行った (Fig. 5)。結果は、 42°C の高ストリエンジェントな条件から 27°C までの低ストリエン

ジェントな条件までのいずれの条件下においても、タイプ I-V の *fimA* 共通配列部分との結合は認められなかった。

3. プロテアーゼ活性の検討

P. endodontalis の菌体結合性および菌体外産生性のプロテアーゼ活性を種々の MCA ペプチド合成基質 (Table 2) を用いて測定した。対照として *P. gingivalis* ATCC 33277 株の同等画分を用いた。*P. endodontalis* では Lys-Ala-MCA (No. 20) の加水分解活性が菌体結合性プロテアーゼとしては最も高いことが明らかとなった (Fig. 6 a)。ついで Gly-Pro-MCA (No. 21) 加水分解活性も測定され、さらに低いながらも Pro-Phe-Arg-MCA (No. 4), Boc-Val-Pro-Arg-MCA (No. 2), Z-Val-Lys-Met-MCA (No. 16), Z-Leu-Leu-Glu-MCA (No. 14) に対する活性も認められた (Fig. 6 a)。菌体外産生性のプロテアーゼ活性では、菌体結合型のそれと同様に Lys-Ala-MCA に対する高い加水分解活性が認められ、その他の基質に対する活性は低いことが明らかとなった (Fig. 6 b)。一方、*P. gingivalis* では、*P. endodontalis* のプロテアーゼ活性スペクトラムとは大きく異なり、菌体結合性および菌体外産生性のプロテアーゼとして MCA ペプチド No. 1-8 に対する活性がいずれも高かった。

考 察

感染根管/根尖性歯周炎から分離される根管細菌のうち、*P. endodontalis* は強い臨床症状をとともなう根管内あるいは歯根膿瘍病巣部から分離されることから、急性症状との関連性が示唆されている¹⁵⁾。一方、成人性歯周炎の原因菌である *P. gingivalis* は感染根管/根尖性歯周炎からの分離頻度は低く^{11, 13)}、細菌学的には類縁の両菌種間で明確な病原特異性が存在する。

P. gingivalis の病原因子についてはこれまでに多方面から研究が進められている³³⁻³⁶⁾が、*P. endodontalis* についての報告はほとんどなされていない。そこで本研究では、まず、定着特

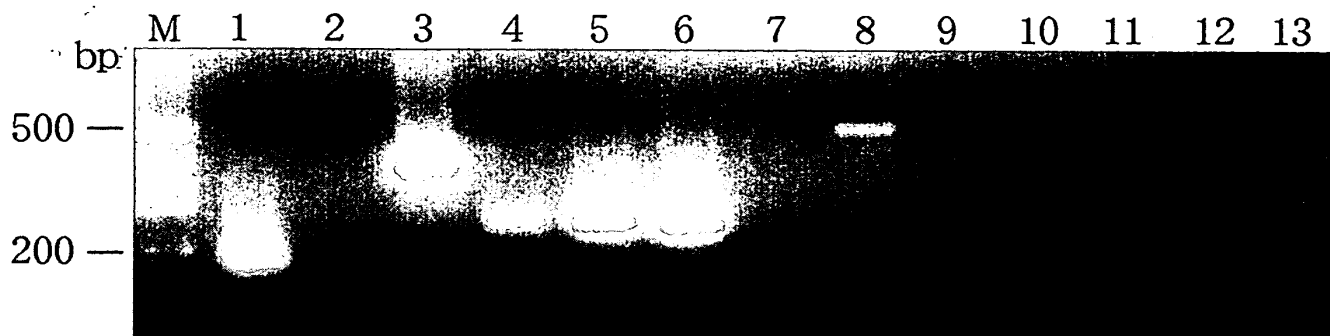


Fig. 4. PCR analysis of *fimA* genes in *P. endodontalis*. Chromosomal DNA from *P. gingivalis* ATCC 33277 (lanes 1-3), HW24D1 (lane 4), ATCC 49417 (lane 5), ATCC 53978 (lane 6), and *P. endodontalis* (lanes 7-13) were used as a template of PCR for 16S rRNA gene of *P. gingivalis* (lanes 1 and 7), 16S rRNA gene of *P. endodontalis* (lanes 2 and 8), type I (lanes 3 and 9), type II (lanes 4 and 10), type III (lanes 5 and 11), type IV (lanes 6 and 12), type V (lane 13) of *fimA*. M indicates 1 kb DNA ladder.

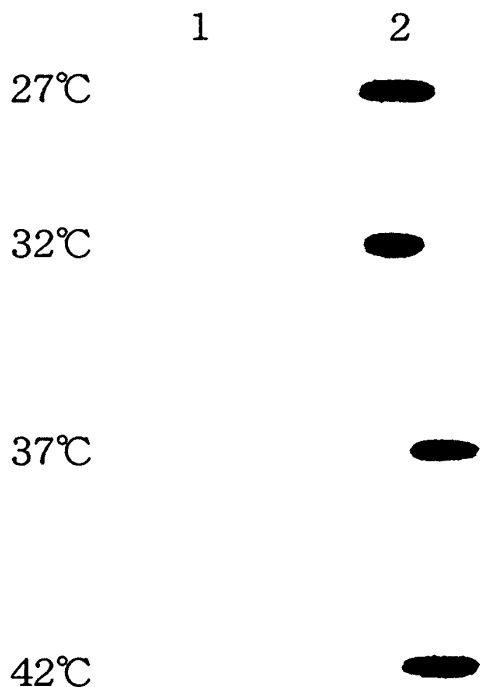


Fig. 5. DNA-DNA hybridization of *P. endodontalis* and *P. gingivalis* DNA with the *fimA* probe. Chromosomal DNA (2 μ g) from *P. endodontalis* (lane 1) and *P. gingivalis* ATCC 33277 (lane 2) were blotted on a HybondN⁺ membrane. Blots were probed with the fluorescein-labeled DNA fragment of *fimA*. Temperatures of hybridization are shown on the left of the panel.

異性を検討する目的で、歯肉上皮細胞への *P. endodontalis* の付着能を *P. gingivalis* と比較検討した。その結果、*P. endodontalis* の GE1 細胞への付着数が *P. gingivalis* ATCC 33277株

と比較して有意に少ないことが明らかとなった (Fig. 1)。この成績は [³H] 標識した菌体の付着実験からも確認された (Fig. 2)。*P. gingivalis* の培養歯肉上皮細胞への定着性および侵入性については、最近の報告で *fimA* タイプにより大きな違いのあることが示されている³⁷⁾。さらに、ヒトの歯周炎では、これまでに多くの研究が進められてきたタイプ I *fimA* を有する *P. gingivalis* ではなく、タイプ II *fimA* を有する *P. gingivalis* が優勢であることが明らかにされている³⁴⁾。そこで、タイプ II *fimA* を有する *P. gingivalis* HW24D1 株の GE1 細胞への付着能についても *P. endodontalis* と比較検討したが、タイプ I *fimA* を有する *P. gingivalis* ATCC 33277株の場合と同様、*P. endodontalis* の付着能が有意に低いことが明らかとなった (Fig. 2)。この成績は、感染根管を主たる定着部位とする *P. endodontalis* と歯肉溝/歯周ポケットを主たる定着部位とする *P. gingivalis* の定着機構の違いを示唆するものと考えられる。

次に、定着機構を規定する定着因子としての線毛様構造物について検討した。その結果、ネガティブ染色像および走査型電子顕微鏡のいずれの観察においても、*P. endodontalis* 表層に線毛様構造物は認められなかった (Fig. 3)。*fimA* 特異的プライマーを用いた PCR でも、*P. endodontalis* のゲノム DNA をテンプレートと

Table 2 . List of peptidyl-MCA substrates used in this study

No.	Compound	No.	Compound
1	Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	15	Z-Leu-Leu-Leu-MCA
2	Boc-Val-Pro-Arg-MCA	16	Z-Val-Lys-Met-MCA
3	Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	17	Suc-Ala-Pro-Ala-MCA
4	Pro-Phe-Arg-MCA	18	Suc-Gly-Pro-MCA
5	Z-Phe-Arg-MCA	19	Suc-Ala-Glu-MCA
6	Bz-Arg-MCA	20	Lys-Ala-MCA
7	Arg-MCA	21	Gly-Pro-MCA
8	Boc-Val-Leu-Lys-MCA	22	Ala-MCA
9	Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA	23	Leu-MCA
10	Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-MCA	24	Lys-MCA
11	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA	25	Met-MCA
12	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	26	Phe-MCA
13	Suc-Ala-Ala-Ala-MCA	27	Pro-MCA
14	Z-Leu-Leu-Glu-MCA		

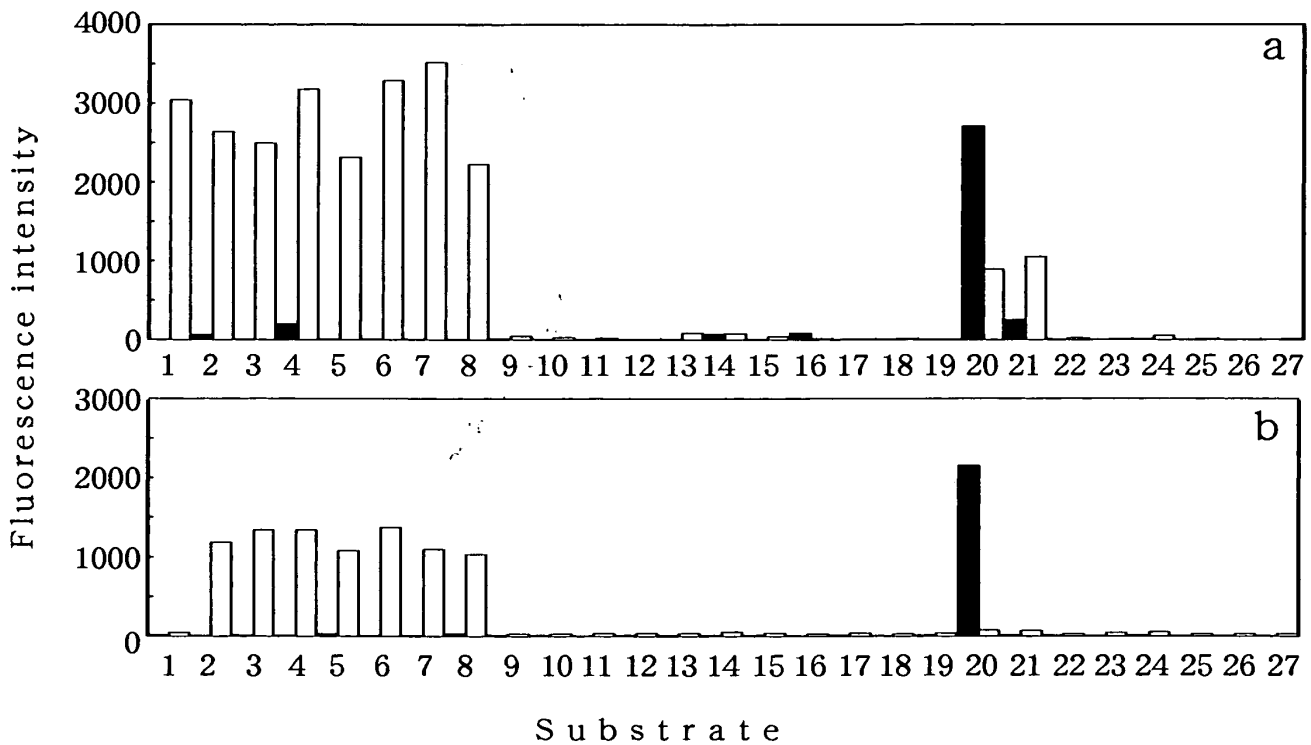


Fig. 6. Proteolytic activity of *P. endodontalis* toward peptidyl MCA substrates. The proteolytic activities of the cell-associated (a) and extracellular specimens (b) of *P. endodontalis* (closed bars) and *P. gingivalis* ATCC 33277 (open bars) were measured as described in the "Materials and Methods." Substrates are shown in Table 2.

した場合にはタイプ I-V のいずれの *fimA* の増幅も見られなかった (Fig. 4)。さらに、DNA-DNA ハイブリダイゼーション解析においても、42°C の高ストリエンジェントな条件から 27°C までの低ストリエンジェントな条件まで検討したが、いずれの条件下においてもタイプ I-V の *fimA* 共通配列部分との結合は認められ

ず、*fimA* 類似の配列が *P. endodontalis* に存在しないことが明らかとなった (Fig. 5)。これらの成績より、*P. endodontalis* は線毛様構造物を保有せず、*P. gingivalis* とは異なる定着機構によって、特異的に感染根管に定着し根尖性歯周炎の病原因子となることが強く示唆された。

P. gingivalis の病原因子としては、線毛とな

らんで、種々のプロテアーゼが挙げられている^{21, 36)}。糖非発酵性の *P. endodontalis* や *P. gingivalis* にとってのプロテアーゼは、血漿や歯周組織由来のタンパク質をペプチドやアミノ酸に分解し、これらを菌体内に取り込んで栄養源として利用するための重要な因子ではあるが、同時に、宿主組織/細胞を傷害する病原因子となる。*P. gingivalis* の産生するプロテアーゼ中では、gingipain と呼ばれる一群のプロテアーゼが知られており、歯周組織の破壊との関連性が示唆されている^{21, 38, 39)}。さらに *P. gingivalis* は、gingipain とは異なる dipeptidylpeptidase⁴⁰⁾ や tripeptidylpeptidase⁴¹⁾ といったプロテアーゼをも産生することが示されており、gingipain を含むこれらのプロテアーゼ活性が *P. gingivalis* の病原特異性の一面を規定していることが示唆される。そこで本研究では、*P. endodontalis* の病原特異性を、プロテアーゼ活性スペクトラムという面から *P. gingivalis* と比較検討した。その結果、菌体外産生性および菌体結合型のいずれのプロテアーゼ活性についても、*P. endodontalis* では *P. gingivalis* とは大きく異なることが明らかとなった (Fig. 6)。特に、*P. endodontalis* では Lys-Ala-MCA の加水分解活性が高く、*P. gingivalis* に存在するものとは異なる dipeptidylpeptidase 様の高い活性が認められたことから、プロテアーゼ活性スペクトラムという面からも *P. endodontalis* は、*P. gingivalis* とは異なる病原特異性を有することが強く示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科保存学第一講座久保田稔教授、口腔微生物学講座木村重信教授に深く感謝致します。本研究に際し、終始ひとかたならぬご指導ならびにご助言をいただき、ご懇篤な校閲賜りました口腔微生物学講座根本優子博士に心から感謝の意を表します。また、数々のご助言、ご協力をいただいた歯科

保存学第一講座、口腔微生物学講座の皆様には感謝致します。

文 献

- 1) Miller, W. D. : An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dental Cosmos* 36 : 505-528, 1894.
- 2) Moller, A. J. R. : Microbiological examination of root canal and periapical tissues of human teeth ; *Methological Studies* ; 1st ed. Elanders Boktryckeri Aktiebolag, Göteborg, pp 1-174, 1966.
- 3) Winkler, K. C., and van Amerongen, J. : Bacteriologic results from 4,000 root canal cultures. *Oral Surg. Oral Med. & Oral Pathol.* 12 : 857-875, 1959.
- 4) Kantz, W. E., and Henry, C. A. : Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. *Archs. Oral Biol.* 19 : 91-96, 1974.
- 5) Wittgow, W. C. Jr., and Sabiston, C. B. Jr. : Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J. Endodont.* 1 : 168-171, 1975.
- 6) Sandqvist, G. : Bacteriological studies of necrotic dental pulps. *Umea Univ. Odontol. Dissertation* 7 : 1-94, 1974.
- 7) Keudell, K., Conte, M., Fujimoto, L., Ernest, M., and Berry, H. G. : Microorganisms isolated from pulp chambers. *J. Endodont.* 2 : 146-148, 1976.
- 8) Anthony, D., and Goodman, A. D. : Isolation of anaerobic bacteria from the root canal systems of necrotic teeth by the use of a transport solution. *Oral Surg. Oral Med. & Oral Path.* 43 : 766-770, 1977.
- 9) Zavistoski, J., Dzing, J., Onderdonk, A., and Bartlett, J. : Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surg. Oral Med. & Oral Path.* 49 : 171-174, 1980.
- 10) Berg, J. O., and Nord, C. E. : A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand. J. Dent. Res.* 81 : 163-166, 1973.
- 11) 浜田茂幸：口腔微生物学・免疫学，第1版，医歯薬出版，東京，pp324-326，2000。
- 12) 平井久行，小島寿雄，見田美千代，錦和彦，星川ますみ，松本開，東堤稔，坂本雅子，小野裕美，恵比須繁之，木村重信，岡田宏：根管内細菌の病原的意義—感染象牙質の細菌学的検索，日歯保誌，31：616-625，1988。
- 13) Sunde, P. T., Tronstad, L., Eribe, E. R., Lind, P. O., and Olasen, I. : Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod. Dent. Traumatol.* 16 : 191-196, 2000.
- 14) van Steenberg, T. J. M., van Winkelhoff, A. J., Mayrand, D., Grenier, D., and Graaff, J. : *Bacte-*

- roides endodontalis* sp. nov., an asaccharolytic black-pigmented bacteroides species from infected dental root canals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34 : 118-120, 1984.
- 15) Mayrand, D., and Holts, S. C. : Biology of asaccharolytic *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.* 52 : 134-152, 1988.
 - 16) van Winkelhoff, A. J., van Steenberg, T. J. M., Kippuw, N., and Graaff, J. : Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented bacteroides species from the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 22 : 75-79, 1985.
 - 17) van Steenberg, T. J. M., and Graaff, J. : Proteolytic activity of black-pigmented Bacteroides strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 33 : 219-222, 1986.
 - 18) Rosen, G., Shoshani, M., Naor, R., and Sela, M. N. : The purification and characterization of an 88-kDa *Porphyromonas endodontalis* 35406 protease. *Oral Microbiol. Immunol.* 16 : 326-331, 2001.
 - 19) Nishikata, M., and Yoshimura F. : Characterization of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* hemagglutinin as a protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 : 336-42, 1991.
 - 20) Grenier, D., and Michaud J. : Evidence for the absence of hyaluronidase activity in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 1913-5, 1993.
 - 21) Kadowaki, T., Yoneda, M., Okamoto, K., Maeda, K., and Yamamoto, K. : Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* 269 : 21371-21378, 1994.
 - 22) Duchesne, P., Grenier, D., and Mayrand, D. : Demonstration of adherence properties of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles using a new microassay. *Oral Microbiol. Immunol.* 10 : 76-80, 1995.
 - 23) Laine, M. L., Appelmek, B. J., and van Winkelhoff, A. J. : Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res.* 31 : 278-84, 1996 .
 - 24) Niederman, R., Buyle-Bodin, Y., Lu, B. Y., Naleway, C., Robinson, P., and Kent, R. : The relationship of gingival crevicular fluid short chain carboxylic acid concentration to gingival inflammation. *J. Clin. Periodontol.* 23 : 743-749, 1996.
 - 25) Nakamura, R., Hinode, D., Terai, H., and Morioka, M. : Extracellular enzymes of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* in relation to periodontal destruction. In : Hamada, S., Holt, C., and McGhee, J. R. : *Periodontal disease : Pathogen & Host Immune Responses* Quintessence Publishing Co., Ltd., Tokyo, pp129-141, 1991.
 - 26) Nakagawa, I., Amano, A., Kimura, R. K., Nakamura, T., Kawabata, S., and Hamada, S. : Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. *J. Clin. Microbiol.* 38 :1909-14, 2000.
 - 27) Nakagawa, I., Amano, A., Kuboniwa, M., Nakamura, T., Kawabata, S., and Hamada, S. : Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effect on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect. Immun.* 70 : 277-285, 2002.
 - 28) Sandqvist, G., Eckerbom, M. I., Larsson A. P., and Sjogren U. T. : Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect. Immun.* 25 : 685-693, 1979.
 - 29) Suzuki, K., Ikeda, T., Nakamura, H., and Yoshimura, F. : Isolation and characterization of a nonpigmented variant of *Porphyromonas endodontalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 12 : 155-161, 1997.
 - 30) Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S., and Kimura, S. : Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb. Pathogenesis* 33 : 33-41, 2002.
 - 31) Hatakeyama, S., Ohara-Namoto, Y., Yanai, N., Obinata, M., Hayashi, S., and Satoh, M. : Establishment of gingival epithelial cell lines from transgenic mice harboring temperature sensitive simian virus 40 large T-antigen. *J. Oral Pathol. Med.* 30 : 296-304, 2001.
 - 32) Fujiwara, T., Morishima, S., Takahashi, I., and Hamada, S. : Molecular cloning and sequencing of the fimbriin gene of *Porphyromonas gingivalis* strains and characterization of recombinant proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197 : 241-247, 1993.
 - 33) Slots, J., and Genco, R. J. : Microbial pathogenicity of black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Dent. Res.* 63 : 412-421, 1984.
 - 34) Holt, S. C., and Ebersole, J. L. : The surface of selected periodontopathic bacteria : possible role in virulence. In : Hamada, s., Holt, C., and McGhee, J. R. : *Periodontal disease : Pathogens and Host Immune Responses* Quintessence Publishing Co., Tokyo, pp 79-98, 1991.
 - 35) Hamada, S., Fujiwara, T., Morishima, S., Takahashi, I., Nakagawa, I., Kimura, S., and Ogawa, T. : Molecular and immunological characterization of the fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol. Immunol.* 38 : 921-30,

- 1994.
- 36) Kontani, M., Ono, H., Shibata, H., Okamura, Y., Tanaka, T., Fujiwara, T., Kimura, S., and Hamada, S. : Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins. *Infect. Immun.* 64 : 756-62, 1996.
- 37) Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, I., and Hamada, S. : Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 1426-30, 1999.
- 38) Kato, T., Takahashi N., and Kuramitsu, H. K. : Sequence analysis and characterization of the *Porphyromonas gingivalis prtC* gene, which expresses a novel collagenase activity. *J. Bacteriol.* 174 : 3889-3895, 1992.
- 39) Kontani, M., Kimura, S., Nakagawa, I., and Hamada, S. : Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to matrix proteins via a fimbrial cryptic receptor exposed by its own arginine-specific protease. *Mol. Microbiol.* 24 : 1179-1187, 1997.
- 40) Banbula, A., Yen, J., Oleksy, A., Mak, P., Bugno, M., Travis, J., and Potempa, J. : *Porphyromonas gingivalis* DPP-7 represents a novel type of dipeptidylpeptidase. *J. Biol.Chem.* 276 : 6299-6305, 2001.
- 41) Banbula, A., Mak, P., Bugno, M., Silberring, J., Dubin, A., Nelson, D., Travis, J., and Potempa, J. : Prolyl tripeptidyl peptidase from *Porphyromonas gingivalis*. A novel enzyme with possible pathological implications for the development of periodontitis. *J. Biol. Chem.* 274 : 9246-9252, 1999.