原 著

ヒト歯肉線維芽細胞共培養下における *A. actinomycetemcomitans* と *P. gingivalis* に対するミノサイクリン, テトラサイクリン およびトスフロキサシンの殺菌効果

鈴木 安里 葛城 啓彰 斎藤 和子

日本歯科大学新潟歯学部口腔微生物学教室 (主任: 斎藤和子教授)

[受付: 平成 10 年 5 月 18 日, 受理: 平成 10 年 9 月 26 日]

Bactericidal activity of minocycline, tetracycline and tosufloxacin against
Actinobacillus actinomycetemcomitans and *Porphyromonas gingivalis*
associated with human gingival fibroblast

Anri Suzuki, Hiroaki Katsuragi and Kazuko Saito

Department of Oral Microbiology, Nippon Dental University, School of Dentistry at Niigata
(Chief : Prof. Kazuko Saito)

1-8, Hamaura-cho, Niigata-shi, Niigata 951-8580, Japan

[Received on May 18, 1998 ; Accepted on September 26, 1998]

Key words : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* / *Porphyromonas gingivalis* / gingival fibroblast /
MBC / invasion / adhesion

Abstract : We evaluated the bactericidal activity of 3 antimicrobial agents, minocycline (MINO), tetracycline (TC), and tosufloxacin (TFLX), when periodontopathic bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* adhered to or invaded cultured human gingival fibroblasts (Gin-1). Minimum bactericidal concentration (MBC) for each antimicrobial agent was obtained using microbroth dilution techniques. MBC for MINO, TC and TFLX against *A. actinomycetemcomitans* associated with Gin-1 were 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ and 3.13 $\mu\text{g/ml}$ respectively and those against Gin-1 associated *P. gingivalis* were 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ and 12.5 $\mu\text{g/ml}$ respectively. MBC significantly increased when these bacterial organisms were associated with Gin-1 cells ; 8-16 times resistant in case of *A. actinomycetemcomitans* and 32-64 times in case of *P. gingivalis*. These results suggest that microbial adherence to and/or invasion in Gin-1 cells may result in increased resistance to some antibiotics.

抄録: 歯周疾患関連菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* と *Porphyromonas gingivalis* が, *in vitro* において培養ヒト歯肉線維芽細胞 (Gin-1) 上に付着あるいは Gin-1 内に侵入しているとき, 3 種抗菌薬ミノサイクリン (MINO), テトラサイクリン (TC), トスフロキサシン (TFLX) の殺菌効果を測定した。MBC は微量液体希釈法を用いて測定した。Gin-1 上あるいは Gin-1 内の菌に対する MINO, TC, TFLX の MBC は *A. actinomycetemcomitans* に対してそれぞれ 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ であり, *P. gingivalis* に対して 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ となった。この MBC は Gin-1 非存在下の系と比較して, *A.*

actinomycetemcomitans においては8-16倍, *P. gingivalis* においては32-64倍の値となった。これらの結果より, 両菌はGin-1への付着性及び侵入性などを介して抗菌薬に抵抗性を示すことが示唆された。

緒 言

歯周疾患の発症と進行にはプラーク細菌が深くかかわっていることが知られており¹⁾, 治療には起因菌の機械的, 化学的除去が必要である。機械的な方法で除去の困難な歯肉縁下プラークの除去には, 薬物療法の適応が有効であると考えられている。とくに近年, 薬剤のポケット内局所投与法の改善に進歩がみられる²⁾。除放性の基剤によりポケット内薬剤濃度は維持され, 臨床的に著明な症状の改善, ポケット内細菌の抑制が得られることがわかっている。

しかしながら, 若年性歯周炎の原因菌と目されている *A. actinomycetemcomitans* には細胞侵入性が^{3,4)}, 成人性歯周炎の原因菌と目されている *P. gingivalis* には細胞への付着性⁵⁾および侵入性⁶⁾があることが知られており, これらの菌が歯周ポケット内で抗生物質に抵抗性を示し^{7,8)}, 生き残って歯周炎の再燃を誘発する危険性があることは歯周治療への抗生物質適応に際し残された問題点といえる。

このため, 歯周組織細胞の存在によって抗生物質の薬効が変化するかどうかを明らかにするために, 培養ヒト歯肉線維芽細胞 (Gin-1) の存在下で *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* に対する MINO, TC, TFLX の薬剤感受性試験を行い, 反応系上清の菌に対する MBC と, 細胞上および細胞内の菌に対する MBC を比較検討した。

材料および方法

1. 供試菌

供試菌として *A. actinomycetemcomitans* Y 4, *P. gingivalis* 381, また Gin-1 共培養下での実験において細胞非侵入性菌の対照として *Actinomyces viscosus* NIAH 1010 (*A. viscosus*) を用いた。*A. actinomycetemcomitans* と *A. viscosus* は, ブレインハートインフュージョンブロス (BHI ブロス; Difco, Detroit, Michigan, USA), *P. gingivalis* は, BHI ブロスに 0.5% 酵母エキス (BBL, Cockeysville, USA), 0.0005% ヘミン (Sigma, St. Louis, USA) を加えて補強したものを用いた。*A. actinomycetemcomitans* は炭酸ガス培養器 (5% CO₂, 95% air) 中で, *A. viscosus* と *P. gingivalis* は嫌氣的条

件下 (N₂: 70%, H₂: 20%, CO₂: 10%) で, それぞれ 37°C で継代培養をした。実験に供する際には 1,600 g, 15 分の遠心操作によって集菌し, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した。

2. 歯肉線維芽細胞

供試細胞として正常ヒト歯肉線維芽細胞 (Gin-1, ATCC CRL 1292) を用いた。Gin-1 は通法に従い, 10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) を含有するダルベッコ MEM 培地 (D-MEM; ICN Biomedicals) に 500 IU/ml ペニシリン, 500 µg/ml ストレプトマイシン, 25 µg/ml アムホテリシン B を添加したものを増殖培地として, 炭酸ガス培養器中で培養した。実験に供する 48 時間前に, 抗生物質を含まない 5% FBS を含む D-MEM 培地 (5% FBS-D-MEM) で 2.0×10^5 個/ml の細胞浮遊液に調節し, 24 ウェルマイクロタイタープレートに分注培養して, 2×10^5 個/ウェルで用いた。

3. 抗菌薬

抗菌薬は MINO, TC (和光純薬, 大阪), TFLX (富山化学工業, 東京) を用いた。実験に際して, MINO, TC は滅菌蒸留水, TFLX はトシル酸トスフロキサシン 9.19 mg (TFLX として 6.25 mg) を 0.1 N NaOH 10 ml で溶解し, 625 µg/ml の溶液を調整して使用した。

4. 薬効の測定

最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) は原則として日本化学療法学会の感受性試験標準法⁹⁾および同学会の嫌気性菌の感受性試験標準法¹⁰⁾に準じ, 微量液体希釈法にて測定した。また, Gin-1 共培養下で MBC を測定するとき, *A. actinomycetemcomitans* の細胞侵入性測定実験¹¹⁾, *P. gingivalis* の細胞侵入性測定実験¹²⁾の条件に一部変更して感受性測定を行った。

1) Gin-1 非存在下での薬効の測定

(1) 標準法: 感受性測定培地は 3 菌ともに GAM ブロスをを用い, 96 ウェルマイクロタイタープレートに, MINO, TC においては 25 µg/ml, TFLX は結晶が析出するため, 12.5 µg/ml からの 2 倍段階希釈で試験した。菌濃度は 3 菌ともに 1×10^6 CUF/ml とし, 各菌の増殖の条件下で 24 時間培養ののちプレートの濁りのみられないウェルの最小濃度を MIC とした。MIC の測定の終

わったプレート軽くタッピングしたのち、MIC 以上の濃度の薬剤を含むウェルから、プロス $10\ \mu\text{l}$ を薬剤無添加の増殖用平板に接種した。増殖用平板として *A. actinomycetemcomitans* は BHI 寒天、*P. gingivalis* はトリプチケースソイペプトン寒天に 5% (v/v) 綿羊脱線維血液、0.5% 酵母エキス、0.0005% ヘミンを加えて補強したものを用い、各菌の増殖の条件下で 48–72 時間培養したのち生育菌の有無を判定し、菌の発育の認められない最小濃度を MBC とした。また反応液中の抗菌薬は塗布した菌の発育に影響を及ぼさないことを確認した。

つぎに、Gin-1 共培養下における薬効の測定に先立ち、標準法から以下のように各条件を順次変化させて感受性を測定した。これは、Gin-1 存在下では細胞侵入性測定実験に即して接種菌量を増加させ、また、感受性測定培地を置換するため、細胞以外の条件の変化が薬効に影響を与えないか確認が必要となるためである。

(2) 接種菌量の増加：接種菌量を *A. actinomycetemcomitans* は 1×10^8 CFU/ml、*P. gingivalis* は 2×10^7 CFU/ml となるように添加し、標準法と MIC、MBC を比較した。

(3) 感受性測定培地の変化：細胞の存在する系の MBC との比較のため、これ以降、菌の濃度は (2) のとおりとし、薬効は MBC のみ測定した。まず感受性測定培地を GAM プロスに 5% FBS を添加したものとし、同じもので MBC を比較した。さらに試験培地を 5% FBS-D-MEM 培地に置き換えて MBC を測定した。

2) Gin-1 共培養下での薬効の測定

(1) Gin-1 共培養上清の供試菌に対する MBC の測定：Gin-1 単層を形成させた 24 ウェルマイクロタイタープレートのウェル上清を除去し、 $0.2\ \text{ml}$ D-MEM で軽く洗浄した。5% FBS-D-MEM 培地に調整した菌の懸濁液を *A. actinomycetemcomitans* と *P. gingivalis* は 1) の (2) の濃度で、*A. viscosus* は 2×10^7 CFU/ml で

各 $1\ \text{ml}$ ずつ添加し、プレートごと $900\ \text{g}$ 、10 分の遠心操作にかけ、2 時間培養した。接種菌量を大きくして、遠心にかけるのは菌と Gin-1 の接触頻度を高くし、細胞侵入率を増加させるためである。こののち各ウェルを PBS で 2 回洗浄し、細胞上に付着あるいは細胞内に侵入した菌以外は除去した。この操作により、ウェルに残る菌数を測定したところ、*A. actinomycetemcomitans* は 1/10 に減少したが *P. gingivalis* は 1/2 程度にしか減少せず、この結果、両菌の量はほぼ同じになることがわかった。この残った菌のウェルに、5% FBS-D-MEM で薬剤を希釈したものを添加し、24 時間培養ののち MBC を測定した。

(2) Gin-1 に付着あるいは侵入した (Gin-1 関連) 菌に対する各薬剤の MBC の測定：上記の Gin-1 との共培養上清中の供試菌に対する MBC を測定したのち、同じプレートのウェル上清を除去し、 $1\ \text{ml}$ PBS で 2 回洗浄ののちさらに $1\ \text{ml}$ PBS を添加して 3 秒間超音波処理した。超音波処理は細胞が破壊され、菌には影響のない程度とし (位相差顕微鏡観察、平板塗布で確認)、十分に冷却された状態で無菌的に行った。この破砕反応液を $10\ \mu\text{l}$ ずつ各菌の増殖用平板に接種して MBC を測定し、Gin-1 関連の菌に対する各薬剤の MBC とした。

結 果

1. 接種菌量の抗菌効果に及ぼす影響

標準法と菌濃度を上昇させた系における MIC と MBC を Table 1 に示した。標準法での両菌に対する MIC は各薬剤ともに $0.05\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、MBC はその 2 倍程度と低い値を示し、良好な抗菌活性を有した。菌濃度を増加させた系において、まず MIC をみると *A. actinomycetemcomitans* で各薬剤の MIC が標準法と比較し 2–8 倍上昇したのに対し、*P. gingivalis* ではほとん

Table 1 Effect of inoculum size on the bactericidal activity of MINO, TC, and TFLX against *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*

Microorganisms	Inoculum size (CFU/ml)	MINO		TC		TFLX	
		MIC*	MBC*	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1×10^6	0.05	0.10	0.05	0.05	<0.025	<0.025
	1×10^8	0.39	1.56	0.39	3.13	0.05	0.20
<i>P. gingivalis</i>	1×10^6	<0.025	0.025	<0.025	0.05	<0.025	0.10
	2×10^7	<0.025	0.78	<0.025	1.56	<0.025	1.39

* $\mu\text{g}/\text{ml}$

ど変化しなかった。つぎに各薬剤の MBC をみると, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ともかなりの上昇を示し, 菌量を増加させるだけでも薬効の低下が発現した。薬剤間で薬効を比較すると, TFLX が *A. actinomycetemcomitans* に対して著明な効果を示し, TC では菌濃度の上昇によって, とくに *A. actinomycetemcomitans* に対する薬効の低下が著しかった。

2. 感受性測定培地の変化, 血清の添加が薬効に及ぼす影響

感受性測定培地が GAM ブロスであるとき, 5%濃度での血清の存在は各薬剤の両菌に対する MBC に影響を与えなかったが, 試験培地が 5% FBS-D-MEM に置き換わると, 各菌とも GAM ブロスのときの約 1/2 MBC

となり, 発育が抑えられた (Table 2)。また, 結果には示していないが, このとき薬剤非添加の系で各菌の増殖を測定すると, GAM ブロス中の菌が 24 時間まで対数増殖を示すのに比較して, 5%FBS-D-MEM 中の菌はベースラインにとどまって増殖を示さなかった。

3. Gin-1 共培養下における, 上清と Gin-1 関連の菌に対する MBC

上清中の菌に対する MBC は Gin-1 非存在下の系で感受性測定培地が 5% FBS-D-MEM のときの MBC よりも上昇し, *A. actinomycetemcomitans* では各薬剤とも, 約 2 倍, *P. gingivalis* では MINO, TC に対しては約 4 倍, TFLX においては 16 倍の上昇を示し, 薬効の低下は *P. gingivalis* において著しかった (Table 3)。Gin-

Table 2 Effect of a change of testing medium and addition of serum on the bactericidal activity of MINO, TC, and TFLX against *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*

Condition	MBC ($\mu\text{g/ml}$)					
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> *			<i>P. gingivalis</i> **		
	MINO	TC	TFLX	MINO	TC	TFLX
GAM-broth	1.56	3.13	0.20	0.78	1.56	0.39
GAM-broth + Serum + (5%)	1.56	3.13	0.20	0.78	1.56	0.39
D-MEM + Serum + (5%)	0.39	1.56	0.10	0.39	0.78	0.20

Inoculum size : * 1×10^8 , ** 2×10^7 CFU/ml.

Table 3 MBC for MINO, TC, and TFLX against nonadhering and Gin-1-associated microorganisms

Microorganisms	Drugs	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	
		nonadhering microorganisms	Gin-1-associated microorganisms
<i>A. actinomycetemcomitans</i> *	MINO	1.56	6.25
	T C	3.13	12.5
	TFLX	0.20	3.13
<i>P. gingivalis</i> **	MINO	1.56	12.5
	T C	3.13	25
	TFLX	3.13	12.5
<i>A. viscosus</i> †	MINO	1.56	3.13
	T C	6.25	6.25
	TFLX	3.13	3.13

Inoculum size : * 1×10^8 , **† 2×10^7 CFU/ml. Gin-1 monolayers (2×10^5 cells) were infected for 2 h. Infected monolayers were washed two times with PBS prior to incubation with medium containing antibiotics for 24 h.

1 関連の菌に対する MBC は上清中の菌に対する MBC と比較してさらに上昇し、MINO, TC, TFLX において *A. actinomycetemcomitans* ではそれぞれ 4, 4, 16 倍となり、*P. gingivalis* ではそれぞれ 8, 8, 4 倍となった (Table 3)。結果には示していないが、この系において薬剤非添加で菌の増殖状態をみると 5% FBS-D-MEM 単独での培養のときとほとんど変わらず、各菌の増殖量は 24 時間まで変化しなかった。

また、同様の系において、細胞非侵入性の菌として *A. viscosus* に対する上清中の菌と Gin-1 関連の菌に対する MBC を比較すると、MINO においては約 2 倍の上昇がみられたが、残りの薬剤では差違はみられなかった (Table 3)。

考 察

標準法で行った感受性試験の結果は、歯周疾患関連菌に対する各種抗生物質の効果を調べた Miyake ら¹³⁾の報告とほぼ一致するもので、3 剤ともに *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* に対して有効であり、歯周疾患治療のすぐれた選択薬剤であることが確認された。試験菌濃度の上昇によって *P. gingivalis* の MBC の上昇が著しく、この菌では、菌濃度が高くても低濃度の薬剤で静菌は可能だが、殺菌にはかなりの高濃度が必要であることがわかった。このことは *in vivo* においても、活動期の *P. gingivalis* の抑制が薬剤投与によって比較的容易に達成されるが、完全な排除には至らないことのひとつの理由と考えられる。

今回の実験では Gin-1 の存在が薬剤の感受性に与える影響について観察することが目的であったため、Gin-1 共培養下の系における Gin-1 以外の因子の薬効への影響を考慮しなくてはならないと考えられた。このため、標準法から順次条件を変化させて MBC を比較した。5% 濃度での血清の存在は薬効に影響を与えなかったが、感受性測定培地が GAM プロスから、5%FBS-D-MEM に置換されたことにより、両菌ともに MBC は約 1/2 になり菌の感受性は高くなった。これは各菌の栄養要求性に対し、5% FBS-D-MEM が GAM プロスほど十分ではないことが原因と思われた。このため、Gin-1 の存在する系においては、薬剤感受性の低下にかかわっているのは Gin-1 そのものだけと考えてよいことになる。

Gin-1 共培養下の系においてまず上清の MBC についてみたが、両菌において MBC は上昇し、*P. gingivalis* の方が上昇率は高かった。各菌の添加濃度は *A. actinomycetemcomitans* の方が *P. gingivalis* より 5 倍

多いが、薬剤培地を添加する前に遠心、洗浄操作をほどこしているため両方で菌量はほぼ同じになり、菌量の違いとは別のものが MBC の上昇率の違いにかかわっていると考えられた。また洗浄操作にかけてあるため、この系の MBC は細胞に付着している菌で、Gin-1 内には侵入していない菌に対する MBC と考えられる。Wright ら¹⁴⁾は、*P. gingivalis* がハイドロキシアパタイト表面に 72 時間でバイオフィルムを形成し、バイオフィルム内の菌に対するメトロニダゾールの MIC は、浮遊状態の菌の 160 倍に上昇することを観察している。このようなバイオフィルムの形成は、上皮細胞上でも発現することが知られており、今回の実験においても細胞付着性の強い *P. gingivalis* が、Gin-1 表面でバイオフィルム様物質を形成することにより薬効に抵抗を示している可能性は十分考えられる。今後、細胞上での *P. gingivalis* のバイオフィルム形成について検討する必要があると思われる。

Gin-1 関連の *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* に対する薬効の低下は、上記の上清の薬効の低下をさらに上回るものであった。*A. viscosus* のような細胞侵入性の報告のない菌においては、このような反応上清と Gin-1 関連の菌の MBC の違いはみられず、残り 2 菌の薬効の低下に関しては、菌の付着性のみならず細胞侵入性がかかわっていることが示唆された。

しかしながら、*in vitro* での細胞侵入性測定の実験系には不備な点が残っているように思われ、今回の実験でも各菌の侵入率の正確な測定はできなかった。問題点のひとつは、細胞内の菌量を測定する際に、細胞浸透性の少ない抗生物質を使って反応上清の菌を除去しているが、細胞内に侵入せず、細胞上に付着したまま生き残っている菌を除去できない点である。このため、この実験系の MBC は Gin-1 に侵入している菌の MBC ということとはできず、Gin-1 上あるいは Gin-1 内の菌の MBC、または、Gin-1 関連の菌の MBC としなくてはならなかった。この時、上清の菌が殺菌された系において Gin-1 上あるいは Gin-1 内の菌量は各菌で添加菌量の 1/100—1/1,000 程度に減少していた。Sandros ら¹⁵⁾によると *P. gingivalis* については、細胞外の菌を除去するにはメトロニダゾール 0.1 mg/ml とゲンタマイシン 0.5 mg/ml という高濃度の混合薬剤での 10 時間の反応が必要であり、今回われわれの使用した薬剤でも短時間で反応上清の *P. gingivalis* を殺菌できる薬剤はなかった。また、薬剤との反応を炭酸ガス培養器中で行ったため、嫌気性菌である *P. gingivalis* への影響を考え、反応時間を 24 時間としたが、48 時間までの薬剤の作用時間の延長によっても MBC には変化はみられなかった。

今回の実験においては Gin-1 関連の菌に対する薬剤間の MBC に明らかな違いはみられなかったが、佐藤ら¹⁶⁾によれば TC 系では TC より MINO のヒト歯肉由来ケラチノサイトへの浸透性がすぐれているという報告がある。TFLX においても細胞浸透性がすぐれていることが知られており、細胞内へ薬剤は浸透しているが、なんらかの理由で効果が減弱している可能性も考えられる。

また、小嶋ら¹⁷⁾によればヒト歯肉由来ケラチノサイトに対する細胞毒性が発現しはじめるのは、48 時間の培養で TC, MINO では 30 $\mu\text{g/ml}$, TFLX においては 18 $\mu\text{g/ml}$ である。今回の実験時間内での細胞傷害性は観察されなかったが、Gin-1 関連の菌に対する MBC は、このような細胞毒性の発現する濃度に近いものであった。

以上のように菌濃度の上昇、細胞の存在により MBC が上昇を示したことから、歯周炎の治療に抗生物質を適応するには有効濃度への考慮が必要である。里見ら¹⁸⁾によれば、局所投与法 LS-007 によるポケット内の TC 濃度は *P. gingivalis* に対しては 100 時間、*A. actinomycetemcomitans* においては 24 時間、MIC₉₀ のレベルに維持され、臨床症状の改善ならびに菌の制圧が達成されると報告されている。また全身投与では MINO 100 mg 1 日 2 回の投与で歯肉溝液中濃度が 8—15.5 $\mu\text{g/ml}$ 168—192 時間、TC では 250 mg 1 日 1 回投与で 5—12 $\mu\text{g/ml}$ 3—7 時間維持されることが報告されている¹⁹⁾。しかしながら、細胞上、細胞内に殺菌されない菌が残存する可能性は高く、炎症の再燃をまねく危険性を避けるには、今後も薬効を妨げる因子について検討が必要と思われる。

結 論

歯周病原菌である *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* に対する 3 種抗生物質 MINO, TC, TFLX の薬剤感受性が、歯肉線維芽細胞 (Gin-1) の存在によって影響を受けることを薬剤感受性試験により MBC を測定して検討した。

1. Gin-1 非存在下で、標準法における各薬剤の両菌に対する MIC は 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 以下、MBC はその 2 倍程度と良好な抗菌活性を示した。菌濃度を標準法での $1 \times 10^6/\text{ml}$ から、*A. actinomycetemcomitans* は $1 \times 10^8/\text{ml}$, *P. gingivalis* は $2 \times 10^7/\text{ml}$ に増加させると、*P. gingivalis* の MBC の上昇が著しく、殺菌に高濃度の薬剤が必要であることがわかった。また、TFLX は *A. actinomycetemcomitans* にとくに著明な殺菌力を示し、

TC では菌濃度の増加によってこの菌に対する薬効の低下が著しかった。

2. Gin-1 共培養上清における MBC は、Gin-1 の存在しない系の MBC と比較して両菌とも上昇したが、*P. gingivalis* の上昇率の方が高かった。この菌種間における上昇率の差は、*P. gingivalis* の細胞付着性によると考えられた。

3. Gin-1 に付着あるいは侵入した菌に対する薬効は、両菌ともこの系の上清の MBC と比較して各薬剤で 4—16 倍上昇し、細胞の存在しない系と比較すると *A. actinomycetemcomitans* では 8—16 倍、*P. gingivalis* では 32—64 倍もの上昇を示した。薬剤感受性の上昇の割合は、各薬剤間で大きな差はなく、この薬効の低下には、菌の細胞への侵入性が関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Listgarten, M.A. : Nature of periodontal disease : Pathogenic mechanisms. J. Periodont. Res. **22** : 172—178, 1987.
- 2) Yeom, H.R., Park, Y.J., Lee, S.J., Rhyu, I.C., Chung, C.P. and Nisengard, R.J. : Clinical and microbiological effects of minocycline-loaded microcapsules in adult periodontitis. J. Periodontol. **68** : 1102—1109, 1997.
- 3) Carranza, F.A. Jr., Saglie, R., Newman, M.G. and Valentin, P.L. : Scanning and transmission electron microscopic study of tissue-invading microorganisms in localized juvenile periodontitis. J. Periodont. **54** : 598—617, 1983.
- 4) Meyer, D.H., Lippmann, J.E. and Fives-Taylor, P. M. : Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* : a dynamic, multistep process. Infect. Immun. **64** : 2988—2997, 1996.
- 5) Hirose, K., Mizugai, H. and Ueda, I. : Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to human gingival cell line Ca 9-22. Oral Microbiol. Immunol. **11** : 402—406, 1996.
- 6) Madianos, P.N., Papapanou, P.N., Nannmark, U., Dahlen, G. and Sandros, J. : *Porphyromonas gingivalis* FDC 381 multiplies and persists within human oral epithelial cells *in vitro*. Infect. Immun. **64** : 660—664, 1996.
- 7) Müller, H.P., Lange, D.E., Müller, R.F. : Failure of adjunctive minocycline-HCl to eliminate oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Clin. Periodont. **20** : 498—504, 1993.
- 8) Goodson, J.M., Tanner, A., McArdle, S., Dix, K.,

- Watanabe, S.M. : Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy. III. Microbiological response. J. Periodont. Res. **26** : 440—451, 1991.
- 9) 微量液体希釈によるMIC測定法（微量液体希釈法）—日本化学療法学会標準法—。Chemotherapy **38** : 103—105, 1990.
- 10) 小酒井望, 上野一恵, 五島瑳智子, 三橋 進, 中山一誠, 島田 馨, 玉井健三, 小栗豊子：嫌気性菌の最小発育阻止濃度（MIC）の測定法。Chemotherapy **27** : 559—560, 1979.
- 11) Meyer, D.H., Sreenivasan, P.K. and Fives-Taylor, P.M. : Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect. Immun. **59** : 2719—2726, 1991.
- 12) Duncan, M.J., Nakao, S., Skobe, Z. and Xie, H. : Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. Infect. Immun. **61** : 2260—2265, 1993.
- 13) Miyake, Y., Tsuruda, K., Okuda, K., Widowati, Iwamoto, Y., Suginaka, H. : *In vitro* activity of tetracyclines, macrolides, quinolones, clindamycin and metronidazole against periodontopathic bacteria. J. Periodont. Res. **30** : 290—293, 1995.
- 14) Wright, T.L., Ellen, R.P., Lacroix, J.-M., Sinnadurai, S., Mittelman, M.W. : Effects of metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. J. Periodont. Res. **32** : 473—477, 1997.
- 15) Sandros, J., Papapanou, P.N., Nannmark, U., Dahlen, G. : *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium *in vitro*. J. Periodont. Res. **29** : 62—69, 1994.
- 16) 佐藤英継, 筒井健機：ヒト歯肉由来培養ケラチノサイトにおけるテトラサイクリン系抗生物質の細胞生存率と細胞内濃度に及ぼす効果。日歯周誌 **40** : 1—8, 1998.
- 17) 小嶋 憲, 田中ゆり子, 松戸裕子, 筒井健機：ヒト歯肉由来培養ケラチノサイトへのテトラサイクリン系抗生物質およびピリドンカルボン酸系合成抗菌剤の影響。日歯周誌 **38** : 465—476, 1996.
- 18) 里見綾子, 浦口良治, 野口俊英, 石川 烈, 田丸博秋, 北村正孝：LS-700 投与後の歯周ポケット内ミノサイクリン濃度。日歯周誌 **29** : 937—943, 1987.
- 19) Slots, J. and Rams, T.E. : Antibiotics in periodontal therapy : advantages and disadvantages. J. Clin. Periodontol. **17** : 479—493, 1990.