無菌マウスにおける歯周疾患の発症機構に関する研究

新 井 聡

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室

(主任：中村治郎教授)

(平成6年9月16日受付)

Study on Pathogenesis of Periodontal Disease in Gnotobiotic Mice

Satoshi ARAI

Department of Periodontics and Endodontics, Tsurumi University

School of Dental Medicine

2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230, Japan

(Director : Prof. Jiro NAKAMURA)

The purpose of this study was to examine the periodontopathic potential of oral bacteria and effects of immunization by *Porphyromonas gingivalis* on experimental periodontitis in gnotobiotic mice.

Seven-week-old BALB/c mice were divided into the following groups: respective groups mono-inoculated with *P. gingivalis*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus* and *Propionibacterium acnes*, and each group di-inoculated with a bacterial combination of *P. gingivalis* and *S. sanguis*, *A. viscosus* or *P. acnes*. Animals mono-inoculated with *P. gingivalis* and inoculated with a bacterial combination were immunized parenterally with whole cells of *P. gingivalis* suspended with incomplete Freund's adjuvant (IFA), and physiological saline with IFA (sham-immunized) before bacterial inoculation,

respectively. A microbiological analysis, IgG antibody activity against *P. gingivalis*, gingival collagenase activity, and alveolar bone resorption were assessed at the termination of the experiment.

The present study demonstrated that the effect of immune stimulation on periodontitis was depended on a repeated oral inoculation *P. gingivalis* after immunization and was higher in animals inoculated with a bacterial combination than in those mono-inoculated with *P. gingivalis*. Alveolar bone resorption and collagenase activity in *P. gingivalis*-inoculated groups were higher than those in other groups, although *P. gingivalis* of all groups disappeared from oral and fecal samples within 3 weeks. This suggests that *P. gingivalis* had a high periodontopathic potential although *P. gingivalis* was present transiently in the oral cavity.

Key words : Gnotobiotic mouse, *Porphyromonas gingivalis*, Alveolar bone resorption, Gingival collagenase activity, Experimental periodontitis

要旨：歯周疾患関連細菌の病原性と歯周疾患進展における *P. gingivalis* (Pg) の免疫の影響を無菌マウスで検討した。7週齢無菌 BALB/c マウスを Pg と *A. viscosus*, *S. sanguis*, *P. acnes* の単独あるいは混合接種群に分け、この内 Pg 接種群はあらかじめ免疫群と対照群を作出した。実験終了時に各群の定着菌数、Pg に対する血清 IgG 抗体価、歯肉コラゲナーゼ活性および歯槽骨吸収度を測定した。

Pg は接種後3週目には検出されなくなったが、Pg 接種群のコラゲナーゼ活性および歯槽骨吸収度は他群より

有意に高値を示し、このことから Pg は一過性の存在でも歯周病原性が高いことがわかった。免疫効果は抗原の量により効果に差があり、混合接種した細菌がこの効果を増強させることがわかった。

索引用語: Gnotobiotic mouse, *Porphyromonas gingivalis*, 歯槽骨吸収, 歯肉コラゲナーゼ活性, 実験的歯周炎

緒 言

口腔内のプラークには 300 種類もの細菌が含まれていて、これらのなかには歯周疾患やう蝕などを引き起こす潜在的病原性を持つものがある^{1,2)}。歯面の獲得被膜上に形成されたプラークは成熟するにつれ、その構成細菌が置き変わり、複雑化してくる^{3~5)}。この過程で細菌どうしの共生や拮抗等の様々な生物学的な関係があることが知られている。一方 *in vitro* で菌体間凝集反応 (interbacterial aggregation あるいは coaggregation) と呼ばれる現象があり、これは異なった菌種間で特異的な親和性があるために起こると考えられている^{6~8)}。この coaggregation がプラークの形成と成熟化に関係があることを示唆する報告はあるが^{9,10)}、実際の歯周局所で *in vitro* と同様の現象を起こすかどうかを確認した研究はない。多くの研究者が歯周疾患の発症を *in vivo* で検索するために、通常飼育のラットやハムスターを用いた様々な動物モデルを用いている^{11~14)}。しかし、通常飼育動物では動物固有の常在細菌を完全に除去することは不可能なため、無菌飼育動物による優れたモデルの確立が望まれている。無菌動物を利用することの利点は口腔内の常在菌による影響のない環境で特定細菌の侵入と病原性を検証できることである。さらに細菌以外の刺激で炎症を惹起させ、通常飼育動物の場合と比較することにより、口腔内常在菌の発症への影響を推測でき、しかも菌叢の単純化によって、接種した歯周疾患関連細菌間の相互作用を解明できることである。現在までに、ある特定の細菌の病原性を検索する目的で無菌動物を使用した研究が報告され、多くの有益な知見が得られている^{15~21)}。これらの研究は無菌ラットを用いており、マウスは歯がはるかに小さく実験操作上難点があるため、使用する研究者は少ない^{22,23)}。しかしマウスは現在 300 種以上の近交系が確立されており、遺伝学的背景のデーターが多数あるので²⁴⁾、歯周疾患に関わる細菌間の相互作用や遺伝的要因を解明するのに非常に有用であると考えられる。

本研究では、近交系 BALB/c 無菌マウスにヒトの

歯周疾患関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* とプラーク内で本菌と相互あるいは拮抗関係を持つと思われる数種の細菌を接種し、ノトバイオート歯周疾患実験モデルを確立した。次に本モデルにおける、1) 接種した細菌の定着性の比較、2) 歯槽骨吸収度と歯周局所のコラゲナーゼ活性との関係、3) 歯周疾患関連細菌 *P. gingivalis* による免疫の影響、ならびに、本モデルの有用性を検討し、歯周疾患の発症機構の解明を目的とした。

材料と方法

1. 動物および飼育方法

実験動物は、理化学研究所動物試験室で飼育維持している BALB/c 無菌飼育マウス 150 匹 (7 週齢: 雄 75 匹, 雌 75 匹) を用いた。動物の群分けは Table 1, 2 に示した。床敷, 実験器具および飲料水はオートクレーブ (130°C, 60 分間) 滅菌を施し, アイソレータの組立て, 機材の搬入, 搬出時のステリルロック, スリーブ内の滅菌は 2% 過酢酸 (三菱瓦斯化学, 東京) を用いて噴霧滅菌を行った。また実験開始 1 週間前に, 日本実験動物研究会の方法²⁵⁾に従い, Thioglycolate medium (BBL, USA), Cooked meat phytone medium (BBL), Potato dextrose broth (DIFCO, USA) を用いて無菌試験を行い, 床敷および動物の新鮮便が無菌であることを確認した。飼料は固形飼料 CE-2 あるいは Keyes らにより考案された高蔗糖含有粉末飼料 Keyes No. 2000²⁶⁾ の sucrose を 30% に減じたものを用い²⁷⁾, それぞれの飼料は 50 kgy の γ 線照射滅菌して使用した (日本クレア, 東京)。

2. 供試菌株の調製

A. 供試菌株および培地

菌株は, 鶴見大学歯学部口腔細菌学教室保存の *Porphyromonas gingivalis* FDC 381 株, *Propionibacterium acnes* ATCC 6169 株, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 株, *Actinomyces viscosus* ATCC 15987 株および神奈川歯科大学口腔細菌学教室から *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株, さらに日本

Table 1 Groups in Experiment 1

Group	Inoculation	n(♂ : ♀)	Immunization	Diet
1	<i>P. gingivalis</i> 381	10(5 : 5)	<i>P. gingivalis</i> 381 + IFA	D # 2000
2	<i>P. gingivalis</i> 381	10(5 : 5)	saline+IFA (sham IMZ)	D # 2000
3	<i>P. gingivalis</i> 381 + <i>A. viscosus</i>	10(5 : 5)	<i>P. gingivalis</i> 381 + IFA	D # 2000
4	<i>P. gingivalis</i> 381 + <i>A. viscosus</i>	10(5 : 5)	saline+IFA (sham IMZ)	D # 2000
5	<i>P. gingivalis</i> 381 + <i>S. sanguis</i>	10(5 : 5)	<i>P. gingivalis</i> 381 + IFA	D # 2000
6	<i>P. gingivalis</i> 381 + <i>S. sanguis</i>	10(5 : 5)	saline+IFA (sham IMZ)	D # 2000
7	<i>A. viscosus</i>	10(5 : 5)	(—)	D # 2000
8	<i>S. sanguis</i>	10(5 : 5)	(—)	D # 2000
9	untreated germ-free	10(5 : 5)	(—)	CE-2

IFA=incomplete Freund's adjuvant

sham IMZ=sham immunized

n=number of animals

Table 2 Groups in Experiment 2

Group	Inoculation	n(♂ : ♀)	Immunization	Diet
1	<i>P. gingivalis</i> 381 + <i>P. acnes</i>	10(5 : 5)	<i>P. gingivalis</i> 381 + IFA	D # 2000
2	<i>P. gingivalis</i> 381 + <i>P. acnes</i>	10(5 : 5)	saline+IFA (sham IMZ)	D # 2000
3	<i>P. gingivalis</i> 33277	10(5 : 5)	<i>P. gingivalis</i> 33277 + IFA	D # 2000
4	<i>P. gingivalis</i> 33277	10(5 : 5)	saline+IFA (sham IMZ)	D # 2000
5	<i>P. acnes</i>	10(5 : 5)	(—)	D # 2000
6	untreated germ-free	10(5 : 5)	(—)	D # 2000

IFA=incomplete Freund's adjuvant

sham IMZ=sham immunized

n=number of animals

大学松戸歯学部細菌学教室から *Streptococcus mitis* biovar 1 株, *Actinomyces viscosus* T 14 V 株をそれぞれ分与されたものを用いた。この内、無菌動物に接種したのは *P. gingivalis* 381 および 33277, *A. viscosus* 15987, *S. sanguis* 10556 および *P. acnes* 6169 で, *S. mitis* biovar 1 と *A. viscosus* T 14 V は菌体間凝集反応試験の陽性対照として用いた^{28,29)}。 *P. gingivalis* は hemin (5 mg/ml) および menadione (1 µg/ml) 含有 Tryptic Soy (TS) Broth (DIFCO) で 37°C, 72 時間嫌気培養した。他の菌株は, TS broth で 37°C, 48 時間好気あるいは嫌気培養した。

B. 共凝集試験のための菌液調製

供試菌株をそれぞれ培養後, 5,000 rpm, 20 分間遠心により集菌し, 0.1 mM の CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 150 mM の NaCl および 0.02% NaN₃ を含む 1 mM Tris-buffer (pH 8.0) にて 2 回洗浄した。同緩衝液で再懸濁した菌体浮遊液は分光光度計 (UV-1200 : 島津製作所, 京都) を用い, 波長 600 nm で吸光度 0.7 に調整した。

C. 接種用の菌液および *P. gingivalis* 抗原液の調製

各接種菌株はそれぞれ培養後集菌し, 各培地に再浮遊させ, 吸光度 (600 nm) が約 1.0 になるように調製し, 経口接種用の菌液とした。

P. gingivalis による免疫のための抗原液の調製は以下のように行った。72 時間嫌気培養後, 集菌して得られた菌体を生理食塩加リン酸緩衝液 (Phosphate buffer saline : PBS) で 3 回洗浄した。吸光度 (600 nm) が約 2.0 になるように調製し, これを Freund's の不完全アジュバント (DIFCO : 以下 IFA と略す) と等量混合しエマルジョン化したものを抗原液とした。また生理食塩液と IFA をエマルジョン化したものを sham 免疫群に用いた。

3. 実験スケジュール

A. 実験 1

Fig. 1 に実験 1 と 2 のスケジュールを示した。*P. gingivalis* 381, *A. viscosus* および *S. sanguis* の単独接種, *P. gingivalis* 381 と *A. viscosus* あるいは *S.*

Fig. 1 Experimental schedule

IMZ : Immunization (3 times/week)

Reinoculation : Reinoculated with *P. gingivalis* to the groups which inoculated with *P. gingivalis*.

Pg : Further inoculations with *P. gingivalis* 381 or 33277 to the groups which inoculated with *P. gingivalis*.

S1~S7 : Sampling from feces and oral cavity

sanguis との混合接種の群を作出し, *P. gingivalis* 381 接種群はさらに *P. gingivalis* 381 免疫群と sham 免疫群に分けた。*P. gingivalis* 381 免疫および sham 免疫群は, 7 および 8 週齢時に 3 回ずつ計 6 回, マウス背部皮下に前述したエマルジョンをそれぞれ 0.2 ml ずつ接種した。また, それぞれの群の菌接種は, 調製した各菌液を 9 週齢時に 1 回経口的に投与することで行った。ただし *P. gingivalis* 381 接種群のみは通常化 (conventionalized) マウス背部皮下で本菌による膿瘍形成させ, そこから回収した本菌を 13 週齢時に再び経口的に接種した。各菌の定着は菌接種後, 1, 3, 5, 7, 9, 11 および 13 週目に口腔内 swab と新鮮便を試料として確認した。実験終了時にすべてのマウスは屠殺し, 各定着菌数の測定, 歯槽骨吸収度, *P. gingivalis* 381 に対する特異的血清 IgG 抗体価および歯肉コラゲナーゼ活性を測定し, 各群間で比較した。

B. 実験 2

P. gingivalis 33277 および *P. acnes* の単独接種, *P. gingivalis* 381 と *P. acnes* の混合接種の群を作出し, *P. gingivalis* を接種した群は実験 1 と同様にそれぞれの *P. gingivalis* の菌株で免疫した群と sham 免疫群にさらに分けた (Table 2)。実験 1 では *P. gingivalis* を 2 回接種したが, 実験 2 では *P. gingivalis* のみ実験期間を通じて 1 週間おきに (計 7 回) 接種した。そ

他の実験スケジュールおよび検査項目は実験 1 に準じて行った (Fig. 1)。

4. 定着菌数の検索

口腔内および腸内への各細菌の定着の確認は, 菌接種 1 週後 (10 週目) から 2 週おきに計 7 回行った。口腔内からはあらかじめ重量を測定しておいた滅菌綿棒で swabbing して試料を採取し, 採取後の綿棒の湿重量からサンプル量を求め, ただちに GAM broth (日水製薬, 東京) で 10^{-3} まで連続希釈し, それぞれの 0.05 ml ずつを 5% 馬脱繊維素血含有 GAM 寒天培地 (日水製薬) に塗抹した。腸内における定着菌数の測定は新鮮便を試料とし, この重量を測定し 50 倍希釈したのち, さらに 10^{-7} まで連続希釈し, 10^{-5} から 10^{-7} までを同培地に塗抹した。

実験終了時にピロカルピン (三晃製薬, 東京) 2 mg/kg ip 投与の刺激でマウスの唾液を 5 分間採取後, 屠殺し, 上顎歯および盲腸便を試料として各部位の定着菌数を測定した。唾液を除く試料は重量を測定後 GAM broth を加え, POLYTRON (KINEMATICA 社, Switzerland) で粉砕後, 連続希釈し, 同培地に塗抹した。これらの培地は嫌気性グローブボックス (MIP-1025, Forma Scientific 社: USA) で 7 日間, 37°C , N_2 80%, H_2 8%, Co_2 12% の条件で嫌気培養し, それぞれの平板に発育したコロニー数を計測し,

Fig. 2 Measurement of bone resorption on lower right first molar: $B/A \times 100$ (%)

M1: First molar

A: Total length of first molar

B: Length of crown and exposed root

各試料のグラム当たりの colony forming unit とした。

5. 歯槽骨吸収度の評価

下顎右側の軟組織を次亜塩素酸溶液で除去後、軟X線撮影を行った。撮影装置には Softex (CSM-2: ソフテックス社, 神奈川) を用い、撮影条件は、二次電圧 30 kVp, 電流 2 mA, 露出時間 25 秒で行った。フィルムには Softex film FG (富士フィルム社, 東京) を用い、撮影後、レンドールにて 20°C, 4 分間現像し、次いでレンフィックスにて 20°C, 10 分間定着し、水洗乾燥した。さらにこの軟X線写真を万能投影機 (Nikon, 東京) で 20 倍に拡大して映写したものをトレースし、Fig. 2 に示す第一臼歯の近心根尖部から咬頭頂までの距離 A に対する近心歯槽骨頂から咬頭頂までの距離 B を計測し、 $B/A \times 100$ (%) を歯槽骨吸収度とした。

6. ELISA 法による血清 IgG 抗体価の解析

屠殺時にマウス腹部を切開し、下大静脈から全採血し、分離採取した血清を測定まで -20°C にて保存した。ELISA 測定に用いた抗原の調製は以下のごとく行った。*P. gingivalis* 381 および 33277 は増菌後、遠心集菌したものを PBS で 3 回洗浄し、オートクレーブ (121°C, 20 min) 処理したものを抗原とした。総蛋白質量の定量はプロテインアッセイキット (バイオラッド, USA) により測定した。この *P. gingivalis* 抗原を 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に総蛋白濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように浮遊させ、96 穴 ELISA 用マルチプレート (住友ベークライト社, 東京) の各ウエ

ルに 100 μl ずつ加え、4°C で一晩放置して抗原を吸着させた。0.05% Tween 20 (和光純薬: 大阪) と 0.2% sodium azide (和光純薬) を含む PBS (PBS-T) で 3 回洗浄後、1% bovine serum albumin (和光純薬) と 10% 仔牛血清含有炭酸緩衝液を 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え 4°C で 18 時間 Blocking 処理した。PBS-T にて 3 回洗浄後、同緩衝液にて 10^{-2} から 10^{-7} まで希釈した被検血清を各 well に 100 μl ずつ加え、37°C 2 時間吸着後、PBS-T で 3 回洗浄した。ついで 2 次抗体として PBS-T で 5,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (BINDING SITE 社, U.K.) を 100 μl 各 well に加え、37°C 2 時間吸着した。PBS-T にて 3 回洗浄後、リン酸クエン酸緩衝液 100 ml 中、o-phenylenediamine dihydrochloride (和光純薬) 40 mg, 30% H_2O_2 (和光純薬) 10 μl 含んだ基質溶液を 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、室温で 30 分反応させた。6 N-硫酸を 50 μl 各 well に加え反応を停止させ、各 well の 492 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (MPR-A4: 東ソー, 東京) により測定した。

7. 歯肉コラゲナーゼ活性の測定法

実験 1, 2 の *P. gingivalis* 単独接種群, 混合接種群および実験 2 の *P. acnes* 単独接種群は FITC 標識コラーゲンを用いた「コラゲノキット CNL-100」(コラーゲン技術研修会) を使用して、屠殺時に採取した各群のマウスの上顎歯肉を試料としてコラゲナーゼ活性を測定した³⁰⁾。すなわちそれぞれの試料に基質コラーゲン溶液 200 μl を加え、水溶液中で 35°C, 2 時間反応させた。さらに 10 μl の反応停止液 (80 mM O-フェナントロリン/50% エタノール) を加え、35°C, 1 時間反応させ、室温まで冷却後 400 μl の分解物抽出溶液 (70% エタノール, 含 Tris-HCl buffer, NaCl) を加え激しく攪拌し、10,000 rpm, 10 分間、4°C で遠心した上清を分光蛍光光度計 (RF-500: 島津製作所) を用いて Ex 495 nm, Em 520 nm で蛍光強度 (F.I.) を測定した。コラゲナーゼ活性はコラーゲン 1 μg を 35°C, 1 分間で分解するのに要する酵素量を 1 unit として表した。

8. 菌体間共凝集反応の顕微鏡による判定法

菌体間共凝集試験は各菌体浮遊液 0.5 ml ずつを高さ約 50 mm, 底面の直径約 15 mm の円筒形の透明プラスチック容器に分注後、ボルテックスミキサーにて 5 秒間混和し、判定を実体顕微鏡下で行った。共凝集の判定は Cisar らの方法³¹⁾に従って行った。すなわち

- IMZ Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in immunization group
- SI Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in sham-immunization group
- ▨ IMZ Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*A. viscosus* in immunization group
- ▩ SI Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*A. viscosus* in sham-immunization group
- ▤ IMZ Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*S. sanguis* in immunization group
- ▥ SI Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*S. sanguis* in sham-immunization group

n.d. : not detected

Fig. 3 Recovery of inoculated *P. gingivalis* 381 from the oral cavity

- IMZ Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in immunization group
- SI Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in sham-immunization group
- ▨ IMZ Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*A. viscosus* in immunization group
- ▩ SI Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*A. viscosus* in sham-immunization group
- ▤ IMZ Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*S. sanguis* in immunization group
- ▥ SI Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*S. sanguis* in sham-immunization group

n.d. : not detected

Fig. 4 Recovery of inoculated *P. gingivalis* 381 from the feces

浮遊液中に共凝集体が全く認められないものを0, 浮遊液が混濁し多数の小さな共凝集体を形成するものを1, 浮遊液に混濁が認められるものの中程度の共凝集体を形成するものを2, 浮遊液はやや混濁するもののほぼ透明で5~10個の大きな共凝集体を形成するものを3, 浮遊液は透明で極めて大きな1~3個の共凝集体を形成するものを4とした。なお対照 (positive control) として *A. viscosus* T 14 V 株と *Streptococcus mitis* biovar 1 (*S. sanguis* H 1 株) を用い, 生じた共凝集を4とした。

9. 統計的解析

得られたデータは各群毎に集計し, 定着菌数, 血清中のIgG抗体価および歯槽骨吸収度について各群間の差を一元配置分散分析法によって解析し, さらに多重比較により2群ずつの比較を行った^{32,33)}。統計計算はStatView 4.0.2 J (ヒューリンクス社: 東京) を用いた。

結 果

1. (実験1)

(1) 定着菌数

P. gingivalis 381 の口腔内における経時的変化をFig. 3に示した。*P. gingivalis* 381 は接種1週後ではどの群も約6 log/g のオーダーで分離されたが, 接種3週目からは分離されなくなった。そこで通常化BALB/cマウスの皮下に*P. gingivalis* 381 を接種し膿瘍形成させ3代継代し, そこから回収した同菌株を*P. gingivalis* 381 接種群のみ実験開始時から6週後に再び接種した。しかし1回目の接種と同様に再接種後3週目には検出されなくなった。口腔内から*P. gingivalis* 381 が分離された実験開始後1週目と7週目の結果を比較すると, 各群間での*P. gingivalis* 381 菌数はほとんど差がみられなかった。

新鮮便中の*P. gingivalis* 381 は接種1週後のサンプルリングで約9~11 log/g であったが, 口腔と同様に2

- IMZ Pg 381+Av: Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in immunization group (*A. viscosus*)
- SI Pg 381+Av: Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in sham-immunization group (*A. viscosus*)
- IMZ Pg 381+Ss: Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in immunization group (*S. sanguis*)
- SI Pg 381+Ss: Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in sham-immunization group (*S. sanguis*)
- S. *sanguis*: Inoculation with *S. sanguis* group
- A. *viscosus*: Inoculation with *A. viscosus* group

Fig. 5 Recovery of inoculated *A. viscosus* or *S. sanguis* from the oral cavity

- IMZ Pg 381+Av: Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in immunization group (*A. viscosus*)
- SI Pg 381+Av: Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in sham-immunization group (*A. viscosus*)
- IMZ Pg 381+Ss: Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in immunization group (*S. sanguis*)
- SI Pg 381+Ss: Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in immunization group (*S. sanguis*)
- S. *sanguis*: Inoculation with *S. sanguis* group
- A. *viscosus*: Inoculation with *A. viscosus* group

Fig. 6 Recovery of inoculated *A. viscosus* or *S. sanguis* from the feces

回目のサンプリング以降検出されず、再接種後も同様の結果であった (Fig. 4)。 *P. gingivalis* 381 が分離された 1 週目と 7 週目の比較では、その菌数は 7 週目 (再接種 1 週後) の方が、1 週目よりもやや少ない傾向がみられた。

A. viscosus あるいは *S. sanguis* 単独接種群とそれぞれの *P. gingivalis* 381 との混合接種群における *A. viscosus* および *S. sanguis* は経時的に一定した菌数が検出され、各群の菌数変動パターンに大きな差は認められなかった。口腔内ではどの群も 6~7 log/g 程度を示し (Fig. 5)、新鮮便中には 9~12 log/g 程度認められた (Fig. 6)。

実験終了時の定着菌数は、*P. gingivalis* 381 が消失したため *S. sanguis* と *A. viscosus* について行った。唾液中の菌数は *S. sanguis*, *A. viscosus* とともに 4~5 log/ml, また歯に付着した菌数は 7~8 log/g で、盲腸中の菌数は 10~11 log/g であった (Fig. 7)。

(2) 血清 IgG 抗体価の解析

P. gingivalis 381 免疫群と sham 免疫群で血清中の IgG 抗体価を比較したが、全ての免疫群で著しい抗体

価の上昇が認められ、sham 免疫群との間に明らかな有意差 ($P < 0.0001$) が認められた (Fig. 8)。最も抗体価の上昇したのは *P. gingivalis* 381 と *S. sanguis* 混合接種群で 0.50 (10^{-3} 希釈血清における O.D. 492 nm 値) であり、次いで *P. gingivalis* 381 と *A. viscosus* 混合接種群の 0.33 で、免疫群で最も低値を示したのは *P. gingivalis* 381 単独接種群の 0.15 であった。これら 3 免疫群、すなわち *P. gingivalis* 381 単独接種免疫群、*P. gingivalis* 381 と *A. viscosus* 混合接種群、および *P. gingivalis* 381 と *S. sanguis* 混合接種群の間にも有意差 ($P < 0.0001$) が認められた。

(3) 歯肉コラゲナーゼ活性測定

各群の歯肉コラゲナーゼ活性を比較すると *P. gingivalis* 381 単独接種 sham 免疫群で最も大きく、ついで *P. gingivalis* 381 と *S. sanguis* 混合接種 sham 免疫群の値が大きかった (Fig. 9)。しかし抽出した各群歯肉をプールして測定したため統計学的検討はできなかった。一方、*P. gingivalis* 381 と *A. viscosus* 混合接種は免疫、sham 免疫群とも他の群に比べ低い値を示した。免疫群と sham 免疫群を比較すると、すべて

- IMZ Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in immunization group (*A. viscosus*)
- SI Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in sham-immunization group (*A. viscosus*)
- ▨ IMZ Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in immunization group (*S. sanguis*)
- SI Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in immunization group (*S. sanguis*)
- ▨ S. *sanguis* : Inoculation with *S. sanguis* group
- A. *viscosus* : Inoculation with *A. viscosus* group

Fig. 7 Recovery of inoculated *A. viscosus* or *S. sanguis* at the termination of experiment

- IMZ Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in immunization group
- SI Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in sham-immunization group
- ▨ IMZ Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in immunization group
- SI Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in sham-immunization group
- ▨ IMZ Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in immunization group
- SI Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in sham-immunization group

Fig. 9 Collagenase activity in gingiva

- IMZ Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in immunization group
- SI Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in sham-immunization group
- ▨ IMZ Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in immunization group
- SI Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+A. *viscosus* in sham-immunization group
- ▨ IMZ Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in immunization group
- SI Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+S. *sanguis* in sham-immunization group

* Significant different from each sham-immunized group : $P < 0.0001$

a : Significant different between IMZ Pg 381 and IMZ Pg 381+Ss : $P < 0.0001$

b : Significant different between IMZ Pg 381+Av and IMZ Pg 381+Ss or IMZ Pg 381 : $P < 0.0001$

Fig. 8 Serum IgG antibody responses against *P. gingivalis* 381

の群において sham 免疫群の方がわずかに高い値を示す傾向にあった。

(4) 歯槽骨吸収の評価

下顎右側第一臼歯近心側における歯槽骨吸収量を Fig. 10 に示した。最も吸収量が著しかったのは *P. gingivalis* 381 単独接種免疫群の 48.7% で、ついで *P. gingivalis* 381 および *S. sanguis* 混合接種免疫群の 47.7% であった。これらの群と無菌対照群 (37.1%) および *S. sanguis* 単独接種群 (40.3%) との間に有意差 ($P < 0.0001$) があった。また sham 免疫 *P. gingivalis* 381 単独接種群 (47.2%) と無処置無菌対照群にも有意差 ($P < 0.001$) が認められた。免疫群と sham 免疫群の比較ではどの群も免疫群の方が吸収度は大きい傾向にあったが、統計的有意差は認められなかった。

- IMZ Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in immunization group
 ■ SI Pg 381 : Inoculation with *P. gingivalis* 381 in sham-immunization group
 ▨ IMZ Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*A. viscosus* in immunization group
 ■ SI Pg 381+Av : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*A. viscosus* in sham-immunization group
 ▨ IMZ Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*S. sanguis* in immunization group
 ■ SI Pg 381+Ss : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*S. sanguis* in sham-immunization group
 ■ *S. sanguis* : Inoculation with *S. sanguis* group
 ■ *A. viscosus* : Inoculation with *A. viscosus* group
 □ GF : untreated germ-free group
 a : Significant different from GF : $P < 0.0001$
 b : Significant different from GF : $P < 0.001$

Fig. 10 Percent of alveolar bone resorption in lower right first molar

2. (実験2)

(1) 定着菌数

P. gingivalis 381 および 33277 はそれぞれの菌株で実験1と同様に免疫後、2週間に1度経口接種した。各群の接種後1週目の定着菌数の確認で、検出されない週もあったが、どちらの *P. gingivalis* も口腔内で約5~6 log/g、新鮮便中で約6~8 log/g 分離され、ほぼ一定した菌数を示した (Fig. 11, 12)。 *P. gingivalis* 381 と 33277 の定着菌数に有意差は認められなかった。 *P. gingivalis* 免疫群と sham 免疫群を比較するとわずかではあるが sham 免疫群の方が菌数が多い傾向が認められた。

一方、 *P. acnes* は実験期間を通じてほぼ一定した菌数を示し、変動のパターンに大きな違いは認められなかったが、 *P. acnes* 単独接種群の方が *P. gingivalis* との混合接種群より定着菌数が多い傾向にあった (Fig. 13, 14)。

実験終了、屠殺時においてどの部位からも *P. gin-*

- IMZ Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in immunization group
 ■ SI Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in sham-immunization group
 ▨ IMZ Pg 33277 : Inoculation with *P. gingivalis* 33277 in immunization group
 ■ SI Pg 33277 : Inoculation with *P. gingivalis* 33277 in sham-immunization group
 n.d. : not detected

Fig. 11 Recovery of inoculated *P. gingivalis* 381 or 33277 from the oral cavity

- IMZ Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in immunization group
 ■ SI Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in sham-immunization group
 ▨ IMZ Pg 33277 : Inoculation with *P. gingivalis* 33277 in immunization group
 ■ SI Pg 33277 : Inoculation with *P. gingivalis* 33277 in sham-immunization group

Fig. 12 Recovery of inoculated *P. gingivalis* 381 or 33277 from the feces

- IMZ Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in immunization group (*P. acnes*)
- SI Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in sham-immunization group (*P. acnes*)
- *P. acnes* : Inoculation with *P. acnes* group

Fig. 13 Recovery of inoculated *P. acnes* from the oral cavity

- IMZ Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in immunization group (*P. acnes*)
- SI Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in sham-immunization group (*P. acnes*)
- *P. acnes* : Inoculation with *P. acnes* group

Fig. 15 Recovery of inoculated *P. acnes* at the termination of experiment

gingivalis 381 株と 33277 株は検出されなかった。*P. acnes* の各部位における菌数を Fig. 15 に示した。各定着菌数はほぼ一定し、唾液中で 4~5 log/ml、歯に付着した菌数は 7~8 log/g、盲腸内容物中で 8~9 log/g のオーダーで検出された。

(2) 血清 IgG 抗体価の解析

Fig. 16 は *P. gingivalis* 381 あるいは *P. gingivalis* 33277 免疫群と sham 免疫群の屠殺時におけるそれぞ

- IMZ Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in immunization group (*P. acnes*)
- SI Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in sham-immunization group (*P. acnes*)
- *P. acnes* : Inoculation with *P. acnes* group

Fig. 14 Recovery of inoculated *P. acnes* from the feces

- IMZ Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in immunization group (*P. gingivalis* 381 antigen)
- SI Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in sham-immunization group (*P. gingivalis* 381 antigen)
- IMZ Pg 33277 : Inoculation with *P. gingivalis* 33277 in immunization group (*P. gingivalis* 33277 antigen)
- SI Pg 33277 : Inoculation with *P. gingivalis* 33277 in sham-immunization group (*P. gingivalis* 33277 antigen)
- GF 33277 : untreated germ-free group (*P. gingivalis* 33277 antigen)
- GF 381 : untreated germ-free group (*P. gingivalis* 381 antigen)

a : Significant different between IMZ Pg 381+Pa and other groups : $P < 0.0001$

b : Significant different between IMZ Pg 33277 and GF or SI Pg 33277 : $P < 0.0001$

Fig. 16 Serum IgG antibody responses against *P. gingivalis*

れの *P. gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価を比較したものである。免疫群では sham 免疫群より高い抗体価を示し統計的有意差 ($P < 0.0001$) が認められ、*P. gingivalis* 381 と *P. acnes* の混合接種免疫群は、最も高い抗体価を示し 1.33 (10^{-3} 希釈血清における O.D. 492 nm 値) であり、*P. gingivalis* 33277 免疫群は 0.38 で、これらの間にも有意差 ($P < 0.0001$) が認められた。また *P. gingivalis* 33277 単独接種 sham 免疫群の抗体価は 0.08 で、無菌対照群 (0.038) よりやや高いものの有意差は認められなかった。

(3) 歯肉コラゲナーゼ活性

各群の上顎歯肉培養液中のコラゲナーゼ活性は、*P. gingivalis* 381 と *P. acnes* の混合接種 sham 免疫群が最も高い値を示した (Fig. 17)。免疫群と sham 免疫群を比較すると *P. gingivalis* 381 あるいは *P. gin-*

- IMZ Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in immunization group
- SI Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in sham-immunization group
- ▤ IMZ Pg 33277 : Inoculation and immunization with *P. gingivalis* 33277
- ▨ SI Pg 33277 : Inoculation with *P. gingivalis* 33277 in sham-immunization group
- *P. acnes* : Inoculation with *P. acnes* group
- ▩ GF : untreated germ-free group

Fig. 17 Collagenase activity in gingiva

givalis 33277 接種群とも sham 免疫群の方が高い活性を示した。また *P. acnes* 単独接種群は、*P. gingivalis* 接種群よりも活性は低値を示した。

(4) 歯槽骨吸収度

下顎右側第一臼歯近心における歯槽骨吸収度を比較すると *P. gingivalis* 381 と *P. acnes* の混合接種 sham 免疫群が最も高く 55.8% を示し (Fig. 18)、ついで同菌株混合接種免疫群の 53.2% であった。*P. gingivalis* 33277 単独接種群は免疫群, sham 免疫群ともほぼ同程度の歯槽骨吸収度でそれぞれ 51.6%, 52.2% となり *P. gingivalis* 381 と *P. acnes* 混合接種群より低い値を示した。また *P. acnes* 単独接種群

- IMZ Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in immunization group
 - SI Pg 381+Pa : Inoculation with *P. gingivalis* 381+*P. acnes* in sham-immunization group
 - ▤ IMZ Pg 33277 : Inoculation with *P. gingivalis* 33277 in immunization group
 - ▨ SI Pg 33277 : Inoculation with *P. gingivalis* 33277 in sham-immunization group
 - *P. acnes* : Inoculation with *P. acnes* group
 - ▩ GF : untreated germ-free group
- *Significantly different from GF and *P. acnes* : $P < 0.0001$

Fig. 18 Percent of alveolar bone resorption in lower right first molar

Table 3 Coaggregation of tested strains

	Pg 33277	Ss 10556	Av 15987	Pa 6169	Av T14V	Sm
<i>P. gingivalis</i> 381	2	3	3	0	2	3
<i>P. gingivalis</i> 33277		3	1	0	1	3
<i>S. sanguis</i> 10556			2	0	0	0
<i>A. viscosus</i> 15987				0	0	1
<i>P. acnes</i> 6169					0	0
<i>A. viscosus</i> T14V						4

Results were scored as 0 for non-coaggregation to 4 for maximum coaggregation.

Coaggregation tested were performed by method of Cisar, J.O., et al.³¹⁾

Sm=*Streptococcus mitis* biovar 1

(40.9%) はどちらの *P. gingivalis* 接種群よりも低い値を示し、この群と無処置無菌対照群 (36.9%) は *P. gingivalis* 381 と *P. acnes* 混合接種群および *P. gingivalis* 33277 単独接種群と比較して有意に低値を示した ($P < 0.0001$)。

3. 菌体間共凝集反応

供試した 8 菌株の共凝集試験の結果を Table 3 に示した。陽性対照に用いた *S. mitis* と *A. viscosus* T 14 V は非常に強い共凝集性を示し、実体顕微鏡による観察では極めて大きな凝集塊を形成した。*P. gingivalis* 381 は *S. sanguis* 10556, *A. viscosus* 15987 および *S. mitis* と強い反応性を示し、比較的大きな凝集塊が認められたが、*P. acnes* 6169 とは全く共凝集性が認められなかった。一方、*P. gingivalis* 33277 は *S. sanguis* 10556 と *S. mitis* に対し *P. gingivalis* 381 と同様に強い凝集性を示したが、*A. viscosus* 15987 と *A. viscosus* T 14 V には弱い反応しか認められず、*P. acnes* 6169 とは全く共凝集性を示さなかった。

考 察

歯周疾患の細菌学的あるいは免疫学的研究のために実験動物を用いた多くの研究が行われている。これらは通常飼育あるいは SPF 動物を使用しているものが多く^{34~36)}、無菌動物を用いたものは比較的少ない。無菌動物は免疫応答能が通常飼育動物と異なるという指摘もあるが¹⁴⁾、ある特定の細菌の病原性や接種した複数の細菌間の相互関係を検索するためには非常に優れたモデルであると考えられる。

本研究ではヒトの成人性歯周疾患の原因と考えられている細菌やプラークの成熟過程に関係の深い細菌を無菌の近交系マウスに接種し歯周疾患実験系を確立した。このモデルにおける各細菌の定着性を比較し、歯周局所コラゲナーゼ活性と歯槽骨吸収度を測定し、さらに *P. gingivalis* による免疫が歯周疾患の進展に与える影響を検索し、これらの結果から歯周疾患の発症過程ならびに本モデルの有用性を考察した。

1. 接種細菌の定着性について

実験 1 では経口接種用の供試菌株として *P. gingivalis* 381, *A. viscosus* および *S. sanguis* を次に述べる理由から選んだ。*P. gingivalis* は成人性歯周炎病巣局所から高頻度に分離され³⁷⁾、本菌に対する血清抗体価が歯周疾患患者で有意に上昇しているという報告が多いこと^{38,39)}、さらに本菌はコラゲナーゼなどの種々

の蛋白分解酵素や内毒素などを保有し、歯周組織破壊に関与することから成人性歯周炎の最も有力な病原細菌であると考えられている⁴⁰⁾。一方、*A. viscosus* は成熟プラークの優勢細菌で歯肉炎や根面う蝕の原因となることがあり^{41,42)}、*S. sanguis* はプラーク中で常に優勢な細菌で両者は共凝集することが知られている^{43,44)}。この性質からこれらの細菌がプラーク成熟化の過程に深く関与していると思われる⁴⁵⁾。そこで、これらの細菌単独接種群と *P. gingivalis* と *A. viscosus* あるいは *S. sanguis* との混合接種の実験群を作出し、それぞれの細菌の定着性、歯周組織に及ぼす影響および細菌どうしの相互関係を検討した。菌接種後 1 週間の口腔内および新鮮便からは全ての細菌が検出されたが、3 週目のサンプリングでは *P. gingivalis* は分離されなくなり、本菌が定着しにくいことが示唆された。Brook⁴⁶⁾ はいったん生体を通じた *P. gingivalis* が荚膜や纖毛などの病原因子を高い割合で持つことを報告している。そこで通常化マウスの背部皮下で *P. gingivalis* による膿瘍を形成させ、その部から分離した *P. gingivalis* を実験開始後 6 週目に再接種した。その結果、1 回目の接種と同様に接種後 1 週目の試料からは検出されたが 2 回目からは検出されなくなった。一方、*A. viscosus* あるいは *S. sanguis* は実験期間を通じて、それぞれの単独接種、*P. gingivalis* との混合接種群ともほぼ一定した菌数で分離され、実験終了時における口腔内 (唾液および上顎歯面) あるいは盲腸便中の菌数も両細菌間および各群間で差は見られなかった。

実験 2 では *P. gingivalis* 381 と 33277 および *P. acnes* を用いて、*P. acnes* あるいは *P. gingivalis* 33277 単独、*P. acnes* と *P. gingivalis* 381 の混合接種群を作出し、細菌相互の定着性を検索した。*P. acnes* は歯周疾患患者の口腔内で菌数が増加しているという報告⁴⁷⁾や本菌の産生する hyaluronidase, phospholipase C などの酵素産生、あるいは他の歯周病原性細菌の相補的役割をして歯周疾患増悪を示唆する研究がある⁴⁸⁾。さらに本菌は *P. gingivalis* の発育促進因子を分泌することが知られている⁴⁹⁾。これらのことから、本研究では *P. acnes* 単独の歯周病原性を検索するとともに本菌が *P. gingivalis* の定着性を促進するかどうかを検討した。また、多くの研究者が *P. gingivalis* の菌株間での病原性を比較し、*P. gingivalis* 381 と 33277 の間には細胞附着能と表面構造の違い⁵⁰⁾やマウスモデルにおける膿瘍形成能⁵¹⁾などに差

があることを報告している。さらに Grenier³²⁾ は 12 菌株の *P. gingivalis* について trypsin 様活性, ヒト赤血球凝集活性および上皮細胞への付着能 (epithelial cell-binding activity) を測定し, *P. gingivalis* 381 の方が 33277 よりも高値を示したと報告している。そこで本モデルにおける *P. gingivalis* 381 と 33277 の菌株間の定着性の差を検索した。実験 1 の結果から *P. gingivalis* が極めて定着しにくいことが明らかになったので, 実験 2 では *P. gingivalis* のみは隔週毎に接種した。さらに実験 1 と同様に *P. gingivalis* 381 あるいは 33277 接種群はそれぞれの菌株による免疫群と sham 免疫群に分けた。その結果, 隔週接種後 1 週目のサンプリングで *P. gingivalis* 381 および 33277 株とも口腔内で約 5~6 log/g, 新鮮便中で約 6~8 log/g とほぼ一定した菌数を示し, 分離細菌数の菌株間での有意差は見られなかった。

一方, *P. acnes* は実験 1 の *A. viscosus* および *S. sanguis* と同様に, 1 回だけの経口接種で定着し, 口腔内および新鮮便ともに実験期間を通じて一定した菌数が分離された。また実験終了時に採取した各部位の試料から, *P. acnes* は *A. viscosus* および *S. sanguis* と同様に分離されたが, *P. gingivalis* はどちらの菌株も全く検出されなかった。*P. gingivalis* がこのように定着しにくい原因は host であるマウスと parasite である *P. gingivalis* の両者にあると考えられる。Trudel ら⁵³⁾ および加藤ら²⁷⁾ は通常飼育 BALB/c マウスの口腔内常在細菌叢には嫌気性細菌が非常に少ないことを報告しており, BALB/c マウスの口腔は *P. gingivalis* のような嫌気性菌は定着しにくい環境であるのかもしれない。一方, 無菌ラットに *P. gingivalis* を経口接種した Irving ら⁵⁴⁾ の研究では, *P. gingivalis* の定着を確認し, 歯槽骨吸収が認められたと報告している。しかし, これと同系統のラットにスピロヘータを接種した試みでは定着は認められなかった⁵⁵⁾。彼らはラットの唾液 pH は 7.5~8.4⁵⁶⁾ であるが, スピロヘータの至適 pH は 6.5~7.2 であり⁵⁷⁾, このことが定着を妨げた可能性があるとしている。これと同様のことがマウスと *P. gingivalis* の関係にも当てはまるのかもしれない。すなわち, マウスの唾液の pH が非常に高いため⁵⁸⁾, *P. gingivalis* の定着を困難にしていると考えられる。

ヒトの口腔内におけるプラーク形成の過程において, 初期には嫌気性細菌はきわめて少数であるが, 次第にプラーク内の酸素が消失し, 嫌気性細菌が増加し

てくる。この過程には異種の細菌の coaggregation や細菌どうしの相互関係などの複雑な因子が関係している。これらを検討するために実験 1 では coaggregation に関する *A. viscosus* と *S. sanguis* を混合接種の相手として選び, 実験 2 で *P. gingivalis* と共生関係があるとされる *P. acnes* を用いた。しかし, どの細菌との組み合わせでも *P. gingivalis* は定着しなかった。実験 1 で用いた *A. viscosus* と *S. sanguis* は *in vitro* での共凝集反応で *P. gingivalis* との強い凝集が確認されている。この共凝集性はプラークの成熟化の過程を説明するための *in vitro* での系として非常に興味深い, *in vivo* での定着に関しては共凝集性よりも host 側の因子の方が大きく影響していると思われる。

細菌の定着に関する parasite 側の因子として種々の機序が考えられるが, 定着のためにはまず局所に付着することが必要である。*P. gingivalis* は菌体表層に繊毛構造があり, これが本菌の付着に関与するという報告は多い⁵⁹⁾。実験 1 では初回接種で *P. gingivalis* 381 が定着しなかったため, 付着性の増強を期待して本菌をいったん通常化マウスに通過させたものを再接種した。しかし, 再接種後も初回と同様に 3 週目からは検出されなくなった。また, 実験 2 では繊毛構造と付着性が異なる 2 種類の *P. gingivalis*⁵²⁾ を使用したが, どちらの菌株も最終的には定着しなかった。これらの結果から, BALB/c マウスには繊毛を介しても付着が困難な何らかの host 側の因子があることが示唆された。内藤と奥田⁵⁹⁾ は上皮細胞の基底膜中の糖蛋白は細菌の付着防御因子として働くが, *P. gingivalis* のプロテアーゼはこれを破壊する力があるため容易に細胞内へ侵入すると述べている。また, Gibbons ら⁶⁰⁾ はある種の細菌の酵素が上皮細胞表層を変化させ, 付着しやすくさせるという付着メカニズムを提唱している。以上のことから, BALB/c マウスの上皮細胞は *P. gingivalis* の酵素によって容易には破壊しにくい成分を含んでいる可能性が示唆された。今後, BALB/c マウスの上皮細胞の成分を検索し, ヒトのそれと比較することは付着に関する host 側の局所因子を明らかにする一助となると思われる。

2. 各群の歯槽骨吸収度, コラゲナーゼ活性について

コラゲナーゼは結合組織の主要構成成分を破壊するだけではなく, 破骨細胞を誘導させ歯槽骨吸収を惹起させる働きがあることが知られており⁶¹⁾, 歯周疾患患

者の歯肉 homogenate 中のコラゲナーゼ活性と病態とは正の相関関係があるという報告がある⁶¹⁾。また、Chang ら⁶²⁾は *P. gingivalis* を感染させた無菌ラットで歯肉組織精製物のコラゲナーゼ活性の増加を認めている。このように歯周局所にコラゲナーゼ活性が増加する1つの理由として、ヒトにおける歯周病原菌である *P. gingivalis* が本酵素を産生することなどがあげられる^{63,64)}。また、*P. gingivalis* などのグラム陰性細菌がもつ LPS や繊維毛は monocyte や macrophage を刺激し、IL-1 や IL-4 などの炎症性サイトカインを分泌させ、その結果、繊維芽細胞および破骨細胞のコラゲナーゼ産生がもたらされるという報告もある^{65,66)}。さらに本酵素が多形核白血球由来とする報告^{67,68)}もあり、現在までに本酵素の由来に関して十分解明されていない部分もあるが、いずれにしても本酵素活性は歯周疾患の指標の1つとして捕えることができる⁶⁹⁾。そこで本研究ではマウスの上顎歯肉組織をプールし、その培養液中のコラゲナーゼ活性を測定し、歯槽骨吸収度と比較検討した。

実験1では *P. gingivalis* 381 接種群のみのコラゲナーゼ活性を測定した結果、sham 免疫群の方が免疫群より高いコラゲナーゼ活性値を示したが、歯槽骨吸収度は sham 免疫群の方が免疫群よりわずかに低値を示した。この結果は Klausen ら¹⁶⁾の無菌ラットを用いた実験の結果とほぼ一致し、彼らはコラゲナーゼ活性の上昇は感染初期に起こり、屠殺時には減少する可能性を示唆している。今回の実験でも同様の現象が起こっていることが考えられ、これに関してはコラゲナーゼ活性の経時的な変化を検索する必要があるように思われる。

実験2において *P. gingivalis* 381 と *P. acnes* 混合接種 sham 免疫群が最も高いコラゲナーゼ活性を示したが、歯槽骨吸収度はこの群がやや高いものの *P. gingivalis* 381 と *P. acnes* 混合接種免疫群、*P. gingivalis* 33277 単独接種の sham 免疫および免疫群とほぼ同程度に高値であった。免疫群と sham 免疫群でコラゲナーゼ活性を比較すると、実験1と同様に免疫群より sham 免疫群の方が高値を示したが、歯槽骨吸収度はどちらもほぼ同じ値であった。本実験モデルに *P. gingivalis* 381 あるいは 33277 のどちらも定着させることは難しく、実験終了時には全く検出されなかった。それに関わらず *P. gingivalis* によるコラゲナーゼ活性の上昇や歯槽骨吸収度は使用した他の細菌にくらべて非常に高いことが分かった。このことから

P. gingivalis は生体から最終的に消失しても、一過性に大量存在するだけで強い歯周病原性を発揮することが示唆された。また、*P. gingivalis* 381 (実験1) と *P. gingivalis* 33277 (実験2) の単独接種群のコラゲナーゼ活性および歯槽骨吸収度を比較すると、どちらの群でもほぼ同様の値を示した。実験1と実験2における *P. gingivalis* 両菌株の接種回数が異なるので直接の比較は難しいが、*P. gingivalis* 381 は少ない投与回数でも 33277 と同程度の歯槽骨吸収を示すことから *P. gingivalis* 381 の方が歯周病原性が高いように思われた。

一方、*P. gingivalis* 以外の細菌 (*A. viscosus*, *S. sanguis*, *P. acnes*) と単独接種群間での比較では *A. viscosus*, *P. acnes* および *S. sanguis* の順で歯槽骨吸収量が多くなったが、いずれの群も *P. gingivalis* 単独接種群より有意に歯槽骨吸収量が少なく、歯周病原性が *P. gingivalis* に比べて弱いことが分かった。また *P. gingivalis* と他の細菌の混合接種群では *P. acnes* との組み合わせで、歯槽骨吸収量、コラゲナーゼ活性ともに最も高くなり、これらの菌体間の相互関係によって病原性が増したと考えられる。

通常飼育動物では高蔗糖飼料を与えるだけで、特に歯周病原菌を接種しなくても歯周疾患が発症する可能性があることが報告されている^{11,13)}。この理由として、高濃度蔗糖によって常在細菌叢に変化が起こることを示唆する研究¹¹⁾と栄養学的に欠陥のある高蔗糖飼料⁷⁰⁾による歯周組織への影響が考えられる。そこで、今回の実験では実験1と実験2の無菌対照群にそれぞれ通常固形飼料、高蔗糖飼料を与え、飼料の違いが無菌マウスの歯周組織に与える影響を検索した。その結果、実験1と実験2の無菌飼育群の歯槽骨吸収量に全く差はなく、高蔗糖による歯槽骨への影響はないことが示唆された。

3. 免疫効果について

実験1の *P. gingivalis* 381 単独および混合接種群の抗体価を比較すると、*P. gingivalis* 381 と *S. sanguis* 混合接種群が最も高く、ついで *P. gingivalis* 381 と *A. viscosus* 混合接種群で *P. gingivalis* 381 単独接種群は最も低い値であった。また、実験2の *P. gingivalis* 381 と *P. acnes* 混合接種群は実験1の *P. gingivalis* 381 単独接種群の10倍以上、*P. gingivalis* 381 と *S. sanguis* 混合接種群の約3倍の抗体価の上昇が見られた。*P. acnes* 近縁の細菌が免疫反応を増強する働きがあることが知られており⁷¹⁾、このことから本実

験でマウスに定着し続けた各細菌が *P. gingivalis* 381 に対する免疫反応を増強することが示唆された。また今回の結果で、*P. acnes* との混合接種群が最も高い抗体価を示したのは *P. acnes* 自体の免疫増強能が高かった可能性に加えて、実験 2 では 1 週おきに *P. gingivalis* 381 を経口接種したためであると思われる。さらにこの各混合接種群の抗体価の上昇と歯槽骨吸収度の結果は、ほぼ一致していることが分かった。すなわち実験 1 と 2 の *P. gingivalis* 381 で免疫した混合接種群の歯槽骨吸収量を比較すると *P. gingivalis* 381 と *P. acnes* の混合接種免疫群が 53.2% と最も高く、ついで *P. gingivalis* 381 と *S. sanguis* の混合接種免疫群の 47.7%, *P. gingivalis* 381 と *A. viscosus* の混合接種免疫群が 43.7% と最も少なかった。歯周疾患の進展には歯周病原菌による免疫反応が関係することは良く知られているが^{73,74)}、歯周病原菌だけではなくブランク内に共存する細菌がこの免疫反応を増強し、細菌によってその効果に強弱があることが確認された。

実験 1 では *P. gingivalis* 381 免疫群の方が sham 免疫群より歯槽骨吸収量の値が高く、免疫により歯槽骨吸収がやや増強される傾向が見られた。しかし、実験 2 では逆に *P. gingivalis* 381 あるいは 33277 免疫群の方が低い値を示し、免疫による弱い歯槽骨吸収の抑制効果が見られた。Klausen ら¹⁶⁾の研究では、*P. gingivalis* による免疫の効果は抗原量によって差があり、 10^8 cells および 10^9 cells で免疫した gnotobiot 系ラットには免疫の positive な効果は発現されなかったが、 10^{10} cells 免疫したラットの歯槽骨吸収は、非免疫の無菌対照群と同レベルの低い値を示し、コラゲナーゼ活性の上昇も認められなかったと報告している。今回、どちらの実験でも使用した抗原量および接種方法が同じであるのに関わらず、歯槽骨吸収量の結果が実験 1 と 2 で逆転したのは実験 2 の *P. gingivalis* の接種回数が多かったためと思われる。すなわち、実験 2 で頻繁に経口接種された *P. gingivalis* が経口的な免疫を成立させるための抗原となった可能性が示唆された。実際に血清中の *P. gingivalis* 381 に対する抗体価も実験 2 の方が高く、こちらの免疫群で強い免疫反応が起こっていることが示唆された。

歯周疾患予防ワクチンを最終目標として、様々な歯周疾患関連細菌の免疫の効果を検索した報告がある。しかし、これらの中には免疫により歯槽骨吸収を抑制したという報告^{74,75)}、逆に歯槽骨吸収が増加した¹⁵⁾という相反するものがある。このように免疫が歯周疾患

に及ぼす効果に関する報告に相違があるのは、歯周疾患が体液性および細胞性免疫の両者が関係する複雑な病態を示すことによる⁷⁶⁾。また、免疫に用いた抗原によってどちらの免疫応答が優勢に起こるかが決定されるが、研究者によって抗原の調製方法（組成、濃度、量）あるいは接種経路を含めた投与方法などに差があることが原因であると思われる。

4. 実験系について

本実験で、無菌 BALB/c マウスに数種類の口腔内細菌を接種して歯周疾患モデル動物を作出し、有用性について検討した。今回の実験結果から、*P. gingivalis* は無菌 Sprague-Dawley ラットには定着するが^{15~17)}、マウスには定着しにくいことが明らかになった。*P. gingivalis* の無菌マウスへの定着性については、細菌側の因子および host 側の因子ともにさらに検討する必要があるように思われる。しかし、本実験モデルにおいて *P. gingivalis* は一過性の存在だけで歯槽骨吸収を引き起こすことや混合接種した細菌の種類によって、*P. gingivalis* による免疫効果に影響を与え、結果的に歯周疾患の進展にも関わることを明らかにすることができた。

無菌動物は複雑な因子を除外した単純な実験系で細菌相互の関係や細菌と host との関わりを解析できる優れたモデル動物である。今後、このモデルにおける *P. gingivalis* の定着を阻止する因子についてさらに解析し、歯周疾患の進展における細菌学的、免疫学的研究を進めていきたい。

結 論

無菌 BALB/c マウスに *P. gingivalis* などの歯周疾患関連菌を接種したモデル動物を作出し、細菌学的および免疫学的検討を加え以下の結論を得た。

1. *P. gingivalis* 381 および 33277 は無菌 BALB/c マウスに定着しにくく、本マウスには *P. gingivalis* の定着を阻止する何らかの host 側の因子があることが示唆された。
2. *A. viscosus*, *S. sanguis* および *P. acnes* は容易に無菌 BALB/c マウスに定着し、実験期間を通じて一定しほぼ同菌数であった。
3. 実験終了時の歯槽骨吸収度とコラゲナーゼ活性に相関関係は認められなかった。
4. *P. gingivalis* 381 および 33277 は定着せず最終的に消失しても、一過性に存在するだけで歯肉のコラ

ゲナーゼ活性の上昇と歯槽骨吸収量の増加を引きおこし、歯周病原性が極めて高いことが分かった。

5. 歯周疾患の進展は接種した *P. gingivalis* の量によって影響を受け、またブラーク中の細菌が *P. gingivalis* による免疫応答を増強させ、これは細菌によって強弱があることが示唆された。

6. 本研究では高蔗糖による歯槽骨への影響はないことが分かった。

謝 辞

稿を終えるにあたり終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました本教室中村治郎教授に心から感謝申し上げます。また本研究に際して御校閲いただきました本学口腔細菌学教室藤田 浩教授、ならびに本学第一歯科保存学教室河野篤教授に深謝申し上げます。さらに本研究の立案当初より熱心なる御指導と御協力を賜りました理化学研究所動物試験室水谷武夫室長をはじめとする試験室各位に厚く御礼申し上げます。また実験に際し直接の御指導と終始懇切なる御協力いただきました本学口腔細菌学教室前田伸子助教授をはじめとする教室員各位、最後に適切な御助言と御支援をいただきました本教室新井 高助教授をはじめとする本教室諸兄に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Moore, W.E.C.: Microbiology of periodontal disease. J. Periodont. Res., 22: 335-341, 1987.
- 2) 岡田 宏: 歯周疾患の病因論 (Pathogenesis) —とくに歯垢の病原性を中心にして— 歯科ジャーナル, 11: 137-144, 1980.
- 3) Hamada, S. and Slade, H.D.: Mechanisms of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surface in vitro. Beachey, E.H. et., Bacterial adherence, Chapman and Hall, London, 1980, 107-135.
- 4) Hamada, S. and Slade, H.D.: Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 44: 331-384, 1980.
- 5) Socransky, S.S. and Manganelli, S.D.: The oral microbiota of man from birth to senility. J. Periodont., 42: 485-496, 1971.
- 6) Ritz, H.L.: Microbial population shifts in developing human dental plaque. Arch. Oral Biol., 12: 1561-1568, 1967.
- 7) Socransky, S.S., Manganelli, A.D., Propas, D., Oram, V. and van Houte, J.: Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. J Periodont Res., 12: 90-106, 1977.
- 8) Ellen, R.P.: Oral colonization by gram-positive bacteria significant to periodontal disease., Genco, R.J. and Mergenhausen, S.E. ed., Host-parasite interactions in periodontal diseases. American Society for Microbiology, Washington D.C, 1982, 86-97.
- 9) Grenier, D.: Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun., 60: 5298-5301, 1992.
- 10) Kolenbrander, P.E. and Anderson, R.N.: Cell to cell interaction of Capnocytophaga and Bacteroides species with other oral bacteria and their potential role in development of plaque. J. Periodont. Res., 19: 564-569, 1984.
- 11) 野村典生: ゴールデンハムスターの実験的歯肉炎誘発における塩酸テトラサイクリン経口投与による影響について. 日歯周誌, 31: 979-996, 1986.
- 12) 浜田 康: ゴールデンハムスターの実験的歯周炎モデルにおける塩酸テトラサイクリン長期投与終了後の細菌学および歯周病学的検索. 鶴見歯学, 18: 203-216, 1992.
- 13) Okuda, K., Kato, T., Naito, Y., Takazoe, I., Kikuchi, Y., Nakamura, T., Kiyoshige, T. and Sasaki, S.: Protective effect of active and passive immunization against experimental infection with *Bacteroides gingivalis* in ligated hamsters. J. Dent. Res., 67: 807-811, 1988.
- 14) 清重達夫: *Bacteroides gingivalis* の Plaque-Susceptible ラット口腔内への定着性と抗体による定着抑制作用. 歯科学報, 88: 1105-1115, 1988.
- 15) Burckhardt, J.J., Gaeguf-Zollinger, R., Schmid, R. and Guggenheim, B.: Alveolar bone loss in rats after immunization with *Actinomyces viscosus*. Infect. Immun., 31: 971-977, 1981.
- 16) Klausen, B., Evans, R.T., Ramamurthy, N.S., Golub, L.M., Sfintescu, C., Lee, J.-Y., Bedi, G., Zambon, J.J. and Genco, R.J.: Periodontal bone level and gingival proteinase activity in gnotobiotic rats immunized with *Bacteroides gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol., 6: 193-201, 1991.
- 17) Evans, R.T., Klausen, B., Ramamurthy, N.S., Golub, L.M., Sfintescu, C. and Genco, R.J.: Periodontopathic potential of two strains of *Porphyromonas gingivalis* in gnotobiotic rats. Arch oral Biol., 37: 813-819, 1992.
- 18) Evans, R.T., Klausen, B., Sojar, H.T., Bedi, G.S., Sfintescu, C., Ramamurthy, N. S., Golub, L.M. and Genco, R.J.: Immunization with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction. Infect. immun., 60: 2926-2935, 1992.
- 19) Klausen, B.: Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats. J. Periodontol., 62: 59-73, 1991.
- 20) Irving, J.T., Socransky, S.S. and Heeley, J.D.:

- Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. J. Periodontol., 9 : 73-80, 1974.
- 21) Heijl, L., Wennstrom, J. and Socransky, S.S. : Periodontal disease in gnotobiotic rats. J. Periodont. Res., 15 : 405-419, 1980.
 - 22) Gibbons, R.J. and Socransky, S.S. : Enhancement of alveolar bone loss gnotobiotic mice harbouring human gingival bacteria. Archs oral Biol. 11 : 847-848, 1966.
 - 23) 梁川誠郎：無菌マウスを応用した菌垢形成に関する基礎的研究, 日歯周誌, 21 : 261-271, 1979.
 - 24) Bailey, D.W. : 森脇和郎：マウスの免疫遺伝学一技法と展開一. ソフトサイエンス社, 東京, 1988, 249-300.
 - 25) 日本実験動物研究会, 無菌試験の基準に関する委員会：無菌動物の無菌試験法について. 実験動物, 21 : 35-38, 1972.
 - 26) Keyes, P.H. and Jordan, H.V. : Periodontal lesions in the syrian hamster-III, Findings related to an infectious and transmissible component. Archs Oral Biol., 9 : 377-400, 1964.
 - 27) 加藤綾子, 前田伸子, 中野雅子, 田中 倫, 藤田浩 : 近交系マウスを用いたう蝕モデル. 歯基礎誌, 33 : 46-60, 1991.
 - 28) 神野良一 : *Actinomyces viscosus* の菌体凝集とその病原性への影響. 日大口腔科学, 17 : 223~234, 1991.
 - 29) Mizuno, J., Cisar, J.O., Vatter, A.E., Fennessey, P. V. and McIntire, F.C. : A factor from *Actinomyces viscosus* T 14 V that specifically aggregates *Streptococcus sanguis* H 1. Infect. Immun., 40 : 1204-1213, 1983.
 - 30) 永井 裕, 堀 久枝, 服部俊治, 砂田奉伸, 寺田国昭, 橋田亮一, 宮本和代 : コラゲナーゼ活性の簡易微量測定法の開発とその応用 part I FITC-標識コラゲンを用いたコラゲナーゼ活性微量測定法・炎症, 4 : 123-130, 1984.
 - 31) Cisar, J.O., Kolenbrander, P.E. and McIntire, F. C. : Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. Infect. Immun., 24 : 742-752, 1979.
 - 32) 榎日出夫 : Stat View による統計解析, 金原出版, 東京, 1994, 87-100.
 - 33) 長田 理 : Macintosh—医学—統計マニュアル, 真興貿易医書出版部, 東京, 1994, 132-185.
 - 34) Fiehn, N.E., Klausen, B. and Evans, R.T. : Periodontal bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous *Streptococcus sanguis*. J. Periodontal Res., 27 : 609-614, 1992.
 - 35) Lamont, R.J., Hersey, S.G. and Rosan, B. : Characterization of the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. Oral Microbiol. Immunol., 7 : 193-197, 1992.
 - 36) Baumgartner, J.C., Falkler, W.A.Jr. and Beckerman, T. : Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. Oral Microbiol. Immunol., 7 : 253-256, 1992.
 - 37) Slots, J. : Bacterial specificity in adult periodontitis a summary of recent work. J. clin. Periodontol., 13 : 912-917, 1986.
 - 38) Wilton, J.M.A., Hurst, T.J. and Austin, A.K. : IgG subclass antibodies to *Porphyromonas gingivalis* in patients with destructive periodontal disease. J. clin. Periodontol., 19 : 646-651, 1992.
 - 39) Baranowska, H.I., Palmer, R.M. and Wilson R. F. : A comparison of antibody levels to *Bacteroides gingivalis* in serum and crevicular fluid from patients with untreated periodontitis. Oral Microbiol. Immunol., 4 : 173-175, 1989.
 - 40) 高添一郎 : 黒色素産生性 *Bacteroides* の病原性. 日本細菌学雑誌, 40, 459-470, 1985.
 - 41) Bowden, G.H. and Hardie, J.M. : Commensal and pathogenic *Actinomyces* species in man. Sykes, G. and Skinner, F. A. ed, Actinomycetales : Characteristics and practical importance. Society for Applied Bacteriology Symposium Series No. 2 Academic Press Inc., London, 1973, 227-299.
 - 42) Slack, J.M. and Gerencser, M.A. ed., : *Actinomyces*, filamentous bacteria : Biology and pathogenicity. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1975, 101-109.
 - 43) McIntire, F.C., Vatter, A., Baros, J. and Arnold, J. : Mechanism of coaggregation between *Actinomyces viscosus* T 14 V and *Streptococcus sanguis* 34. Infect. Immun., 21 : 978-988, 1978.
 - 44) McIntire, F.C., Crosby, L.K. and Vatter, A. : Inhibitors of coaggregation between *Actinomyces viscosus* T 14 V and *Streptococcus sanguis* 34 : β -galactosides, related sugar, and anionic amphipathic compounds. Infect. Immun., 36, 371-378, 1982.
 - 45) Gibbons, R.J., Nygaard, M. : Interbacterial aggregation of plaque bacteria. Archs oral Biol., 15 : 1397-1400, 1970.
 - 46) Brook, I. : Encapsulated anaerobic bacteria in clinical infections. Zbl. Bakt. 279 : 443-446, 1993.
 - 47) Beveridge, J.J. and Goldner, M. : Statistical relationship between the presence of human subgingival anaerobic diphtheroids and periodontal disease. J. Dent. Res. 52 : 451-453, 1973.
 - 48) 中村 武, 藤村節夫 : *Propionibacterium acnes* の歯周組織破壊酵素. 日本歯科評論, 503 : 137-145, 1984.
 - 49) Takazoe, I. and Nakamura, T. : Experimental mixed infection by human gingival crevice material. Bull. Tokyo dent. Coll., 12 : 85-93, 1971.
 - 50) Watanabe, K., Yamaji, Y. and Umemoto, T. : Correlation between cell-adherent activity and surface structure in *Porphyromonas gingivalis*.

- Oral Microbiol. Immunol., 7 : 357-363, 1992.
- 51) Neiders, M.E., Chen, P.B., Suido, H., Reynolds, H. S., Zambon, J.J., Shlossman, M. and Genco, R.J. : Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodont. Res., 24 : 192-198, 1989.
- 52) Grenier, D. : Further evidence for a possible role of trypsin-like activity in the adherence of *Porphyromonas gingivalis*. Can. J. Microbiol., 38 : 1189-1192, 1992.
- 53) Trudel, L., St-Amand, L., Bareil, M., Cardinal, P. and Lavoie, C. : Bacteriology of the oral cavity of BALB/c mice. Can. J. Microbiol., 32 : 673-678, 1986.
- 54) Irving, J.T., Socransky, S.S. and Tanner, A.C. R. : Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with Gram-negative organisms. J. Periodont. Res., 13 : 326-332, 1978.
- 55) Klausen, B., Hougen, H.P., Fiehn, N-E. : Periodontal reactions in athymic and euthymic rats after inoculation with *Streptococcus mutans* and oral spirochetes. Wu. B-q., Zheng, J. ed., Immune-Deficient Animals in Experimental Medicine., Basel, Karger, 1989, 78-83.
- 56) Allmon, H.B. : Man is not agiant rat. J. Publ. Health Dent., 31 : 218-224, 1971.
- 57) Fiehn, N-E. : Small-sized oral spirochetes and periodontal disease. APMIS, 97 : 1-31, 1989.
- 58) 石塚由香 : 近交系マウスにおける宿主-常在細菌-内因感染の相互作用に関する研究. 鶴見歯学, 20 : 281-300, 1994.
- 59) 内藤祐子, 奥田克爾 : *Porphyromonas gingivalis* の生態と付着メカニズム, 加藤延夫 : 医学微生物学の新しい展開, 菜根出版, 東京, 1993, 399-421.
- 60) Gibbons, R.J., Hay, D.I., Childs, W.C.I. and Davis, G. : Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. Archs oral Biol., 35 : 107-114, 1990.
- 61) Cox, S.W. and Eley, B.M. : Preliminary studies on cysteine serine proteinase activities in inflamed human gingiva using different 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin substrates and protease inhibitors. Archs oral Biol., 32 : 599-605, 1987.
- 62) Chang, K.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T. F., Genco, R.J. and Golub, L.M. : Infection with a gram-negative organism stimulates gingival collagenase production in non-diabetic and diabetic germ-free rats. J. Periodont. Res., 23 : 239-244, 1988.
- 63) Van Steenberg, T.M.J. and De Graaff, J. : Proteolytic activity of black-pigmented *Bacteroides* strains. FEMS Microbiology Letters, 33 : 219-222, 1986.
- 64) Uitto, V.-J., Larjava, H., Heino, J. and Sorsa, T. : A protease of *Bacteroides gingivalis* degrades cell surface and matrix glycoproteins of culture gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator. Infect. Immun., 57 : 213-218, 1989.
- 65) Galloway, A., McCullagh, K. and Vaes, G. : A new synthetic inhibitor of mammalian tissue collagenase inhibits bone resorption in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun., 133 : 483-490, 1985.
- 66) Eeckhout, Y. and Delaisse, J.M. : The role of collagenase in bone resorption-an overview. Path Biol., 36 : 1139-1146, 1988.
- 67) Gangbar, S., Overall, C.M., McCulloch, C.A.G. and Sodek, J. : Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples : Correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis. J. Periodontal Res., 25 : 257-267, 1990.
- 68) Nicoll, G.A., Gollapudi, G.M., Ramamurthy, N.S. and Golub, L.M. : Suppressed collagenolytic in polymorphonuclear leucocytes from diabetic humans. Experimentia, 37 : 315-317, 1981.
- 69) Fullmer, H.M. : Collagenase and Periodontal disease. J. Dent. Res., 50 : 288-291, 1971.
- 70) 尾崎文子, 中村千賀子 : 食餌中の砂糖濃度のラット血中抗体価及びう蝕に対する影響, 口腔衛生会誌, 35 : 178-179, 1985.
- 71) 藤田 浩 : 抗癌剤の薬理動態. メディカルレビュー社, 大阪, 255-259, 1986.
- 72) 小川知彦, 浜田茂幸 : 歯周病巣における局所免疫応答. 歯科ジャーナル, 31 : 880-888, 1990.
- 73) 木村重信, 岡田 宏 : 歯槽骨吸収における免疫機構の関与. 歯科ジャーナル, 22 : 717-726, 1985.
- 74) Crawford, J.M., Taubman, M.A. and Smith, D. : The effect of local immunization with periodontopathic microorganisms on periodontal bone loss in gnotobiotic rats. J. Periodontal Res., 13 : 445-459, 1978.
- 75) Behling U.H., Sanavi, F., Pham, P.H. and Nowothny, A. : Humoral immunity reduced periodontal bone loss in *Eikenella corrodens*-monoassociated rats. Infect. Immun., 33 : 801-805, 1981.
- 76) Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E. : 浜田茂幸 : 歯周病の科学, 医歯薬出版, 1984, 267-273.

連絡先 :

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室 〒230 横浜市鶴見区鶴見2-1-3