

最近のトピックス

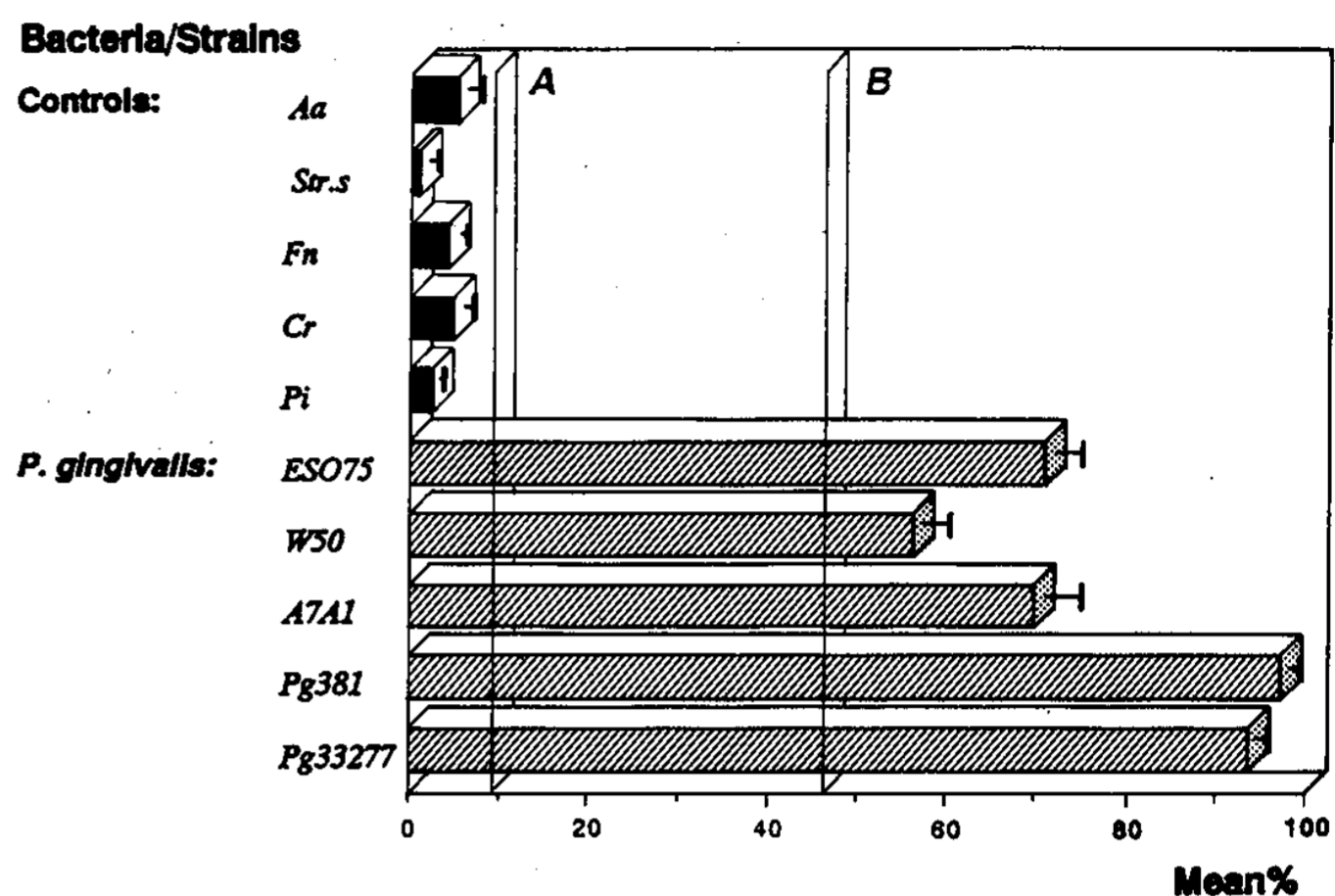
フローサイトメトリーによる *Porphyromonas gingivalis* 迅速同定法の確立

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

奥田 一博 神谷 維知郎

歯周疾患は、歯周ポケット内局所による感染症であることが明らかにされてきた。とりわけ *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* 等のグラム陰性嫌気性細菌群は深い歯周ポケットや急速に破壊が進行していくポケット、さらに治療後に再発したポケットからしばしば高い頻度と比率で検出されていることから歯周病関連細菌として重要視されている。一連の歯周治療の過程で、病型診断、初期治療効果、薬剤選択、メンテナンス間隔の決定等に際しこれらの菌の存在の有無と比率を知ることは、予測性のある治療方針をたてる上で、きわめて必要な情報である。しかしながら、現状の嫌気培養法は、菌の採取から培養、同定に至るまでの取扱いに特別な技術と長期の時間を必要とすることから、チェアサイドでルチーンに細菌学的所見を利用することは困難であった。近年、培養を必要とせず迅速に同定を行える方法として蛍光抗体法、DNAプローブ法、酵素活性法の開発が注目されている。このうち蛍光抗体法は、従来からポリクローナル抗血清や抗体を用いて酵素抗体法(ELISA法)や免疫蛍光顕微鏡を用いた方法が行われていたが感度、精度ともに培養法を上回ることは難しく実用性に乏しかった。この度、筆者らは、*P. gingivalis* のリポ多糖特異的なモノクローナル抗体を用いて *P. gingivalis* のフローサイトメトリーによる同定法の確立を試みたのでその内容を概説する。

供試された *P. gingivalis* 株は ATCC33277, 381, ESO75, W50, A7A1で、対照菌には *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Streptococcus sanguis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* が選ばれた。細菌浮遊液は 10^7 /ml に調整されモノクローナル抗体、蛍光色素で標識された二次抗体と反応後、フローサイトメトリーにより解折された。スキャター



グラム上で凝集した細菌を除外し、ヒストグラム上のモノクローナル反応領域にある細菌区分(%)を5回の解折の平均値で示した。

P. gingivalis 株では ATCC33277で93.5%, 381で97.2%, ESO75で70.6%, W50で56.2%, A7A1で70.0%であった。*F. nucleatum*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *S. sanguis*, *A. actinomycetemcomitans* では、4.0, 2.2, 4.7, 1.0, 5.1%であった(図)。また *P. gingivalis* では 10^2 /ml, 10^4 /ml, 10^6 /ml に調整された浮遊液の値は各々35.7%, 48.1%, 91.4%であった。

一方、*P. gingivalis* と *P. intermedia* との混合浮遊液から *P. gingivalis* の検出の有無を判定できる限界濃度は 10^2 /ml であった。さらに全菌数を 10^6 に調整して *P. gingivalis* が 10^5 以上存在する場合には *P. gingivalis*/*P. intermedia* 比に応じた値が得られた。リポ多糖で前培養されたモノクローナル抗体と反応した *P. gingivalis* の反応性は減少し、モノクローナル抗体のリポ多糖に対する反応特異性が示された。

以上の結果より、本方法は DNA プローブ法や嫌気培養法に匹敵または上回る精度、感度を有する同定法として確立できる可能性が示された。現在、プラーク中からの *P. gingivalis* 検出のための準備を進めているが、宿主細胞、食片と細菌の付着、細菌間同士による凝集からの分離を行うべく種々の界面活性剤使用等の検討を行っている。