

Porphyromonas gingivalis 열충격 단백질으로 면역한 백신에서의 치조골 파괴의 감소

이하나 · 이주연 · 최점일

부산대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

동물 실험들은 다수 박테리아에 의해 유도된 치주염의 심각성이 전체 박테리아 세포 혹은 동종 세균으로부터 얻은 항원으로 면역함으로써 최소화될 수 있음을 강력히 제안한다(Taubman *et al.*¹⁾, Klausen *et al.*^{2,3)}, Genco *et al.*⁴⁾, Choi *et al.*⁵⁾, Kats *et al.*⁶⁾, Rajapakse *et al.*⁷⁾, DeCarlo *et al.*⁸⁾). 그러나 인간 치주염에서의 정교한 백신 개발과 관련되어 여러 논쟁이 발표되었다(Klausen²⁾, Page⁹⁾). 첫째, 인간의 치주 질환은 단일 병인에 의해 유발되지 않는다. 최근 일곱에서 열 종류의 박테리아가 치주 병인으로 추정, 주장되고 있다(Dzink *et al.*¹⁰⁾). 병원균의 다양성은 치주염에 대한 효과적인 백신 계획이 매우 복잡한 작업을 요구한다는 것을 나타낸다(Podmore *et al.*¹¹⁾). 둘째, 백신으로 박테리아의 전체 세포나 crude extract preparation을 사용하는 것은 바람직하지 않는데 박테리아의 전체 세포나 항원 결정 부위가 인간에서의 대응요소와 교차반응을 보일 높은 위험성을 잠재적으로 갖기 때문이다.

열충격 단백질(HSP)은 치주병원성 박테리아들 간에 높은 배열 상동성을 공유하며(Hinode *et al.*¹²⁾), 여

러 병원균에 대해 교차방어하는 백신으로 사용될 수 있다. 교차방어성 백신을 개발하기 위한 이전 연구에서 우리는 *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) HSP이 여섯 종류의 치주병원성 박테리아의 열유도성 단백질과 교차반응을 보이고 여섯 종류의 표적 박테리아에 대해 높은 흡소닌식작용을 보임을 보고하였다(Choi *et al.*¹³⁾). 이에 연속하여 본 연구에서는 박테리아 유도성 치조골 파괴에 대한 *P.gingivalis* HSP의 백신 효과를 백신 모델에서 평가하기로 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 박테리아 균주의 성장과 관리

P.gingivalis 381, *Prevotella intermedia* (*P.intermedia*) 25611과 *Fusobacterium nucleatum* (*F.nucleatum*) ATCC 10953을 hemin(5 μ g/ml)과 menadione(0.5 μ g/ml)을 보충한 tryptic soy broth(Difco, Detroit, MI)에서 배양하였다. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*) 33384를 hemin(5 μ g/ml)과 menadione(0.5 μ g/ml)을 보충한 brain heart infusion broth에서 배양하였다.

교신 저자: 최점일, 부산광역시 서구 아미 1가 10 부산대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 602-739, 전화번호: 051-240-7463, Fax: 051-243-7606

Bacteroides forsythus (*B. forsythus*) 43037은 horse serum과 함께 peptone-yeast extract 배지에서 배양하였다. 모든 박테리아 균주는 혐기성 배양기(Coy, Detroit, MI)를 사용하여 혐기성 환경에서 성장시켜 관리하였다. *Treponema denticola* (*T. denticola*) 33520의 냉동건조 배양은 Ishihara 박사(동경치과대학, Chiba, 일본)로부터 양도받았다. 박테리아 배양을 채집하여 phosphate-buffered saline으로 세척하여 혐기성 균이 살아있도록 마지막으로 미리 환원된 링거액에서 재 부유시켰다. *P. gingivalis* 단독의 5×10^8 개 세포 또는 각 박테리아 1×10^8 개 세포의 혼합물을 각 백서의 감염을 위해 사용하였다.

2. Recombinant *P. gingivalis* HSP60으로의 면역

P. gingivalis GroEL 유전자(Maeda et al.¹⁴), 일본 Okayama 치과대학의 Yoji murayama 교수로부터 기증받음)로부터 recombinant *P. gingivalis* HSP60이 제조, 정제되었다. Specific pathogen-free 배양시설에서 사육한 12마리의 Sprague-Dawley 백서를 complete Freund's adjuvant의 *P. gingivalis* HSP60(5 μ g)으로 1차 피하면역하고 2주 간격으로 두 번 incomplete Freund's adjuvant의 *P. gingivalis* HSP60으로 면역하였다. 백서 혈청 표본을 첫 면역 전, 그리고 마지막 면역 1주 후에 꼬리 출혈로부터 수집하여 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 12마리의 대조군 쥐는 complete Freund's adjuvant 및 incomplete Freund's adjuvant 각각으로 모사면역하였다.

3. 박테리아 감염에 의한 치조골 파괴의 유도

면역 4일 후에, 내인성 박테리아를 억제하기 위한 목적으로 각 백서를 하루 ampicillin과 kanamycin 20mg의 분량으로 연속 3일간 근육내 주사하였다. 항생제 처치한 3일 뒤 박테리아 감염에 의해 실험적인 치조골 파괴를 유도하였다; 면역된 12마리를 두 군으로 나누었다; 6마리(실험군 1)을 2% 점도의 carboxymethyl cellulose 상에 부유된 *P. gingivalis*($5 \times$

10^8 개) 단독을 구강내 접종하는 방법으로 연속 3일간 감염시켰고, 다른 6마리(실험군 2)는 혼합된 치주병원성 박테리아(1×10^8 개/각 박테리아)로 같은 방식으로 감염하였다. 12마리의 대조군(유사면역) 역시 두 군으로 나누었다; 각 군은 *P. gingivalis* 또는 혼합 박테리아로 감염하였다. 세균 감염을 연속 3일간 반복하였다. 마지막 세균 감염 6주 후에 pentothal sodium을 과량 주사하여 백서들을 희생시켰다.

4. 치은연하치태에서의 치주병원성 박테리아동정

박테리아 감염 이틀 뒤 백서의 배설물 표본을 수집하여 구강내 접종이 성공하였는지를 평가하기 위해 rDNA의 PCR 증폭을 실시하였다. 이전에 발표한 primer 쌍이 미생물의 16S rDNA의 PCR 증폭을 위해 선택되었다(Goncharoff et al., 1993, Fouad et al., 2002). 통상적인 방법에 따라, thermal cycler(PE2400; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif.)에서 PCR를 실시하였다. PCR 산물은 agarose gel 전기영동을 통해 시각적으로 확인되었다.

5. Anti-*P. gingivalis* HSP60 IgG 항체 역가 측정

Microtiter plate를 phosphate buffer로 희석한 *P. gingivalis* HSP60 (10 μ g/ml)으로 3번 coating하였다. Plate를 세척하고 PBS/Tween에서 단계별로 희석된 백서 혈청표본을 각 well에 첨가하여 배양하였다. Plate를 세척 후, peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)를 첨가하여 배양하였다. Plate를 세척하고 tetramethylbenzidine (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)을 각 well에 첨가하여 배양한 뒤, H₂SO₄를 첨가하여 반응을 종결하였다. 450nm의 파장에서 검사한 광흡광도를 혈청희석인자의 기능으로 설정하여 회귀분석을 실시하였다. 전면역된 대조군 혈청 중의 하나를 ELISA unit 100으로 설정하고 다른 대조군과 실험군 혈청의 혈청 IgG 역가를 분석하였다. Student *t*-test를 실시하여 통계분석하였다.

6. 박테리아유도성 치조골 파괴의 측정

백서를 과량의 pentothal sodium으로 희생하였다. 상악골을 두개골로부터 분리하고 5분간 끓인 후, 기계적으로 연조직을 제거하였다. 전자입체현미경(Olympus, 일본) 하에서 상악 우측 제1,2 대구치의 다섯 부위에서 백악법랑경계로부터 협측, 구개측 치조골정까지의 거리를 측정하였다. Student *t*-test를 실시하여 그룹 간 차이의 유의성 여부를 검사하였다.

III. 결과

1. Anti-*P.gingivalis* HSP60 IgG 항체역가

대조군의 평균 anti-*P.gingivalis* HSP60 IgG 역가는 baseline과 면역 후에 각각 110.5 ± 24.5 , 115.6 ± 33.4 이었다. 실험군 1(*P.gingivalis* 단독 감염)에서 그 값은 각각 115.1 ± 14.1 , 385.1 ± 15.8 이었다. 실험군 2(혼합 박테리아 감염)에서 그 값은 각각 $121.4 \pm$

Table 1. 각 실험 기간의 실험 및 대조군의 anti-*P.gingivalis* HSP60 IgG 항체역가

(평균±표준편차)

그룹	면역 전	면역 후	P-value
대조군 (12마리)	110.5 ± 24.5	115.6 ± 33.41	NS
실험군 1(<i>P.gingivalis</i> 단독)	115.1 ± 14.1	385.1 ± 15.8	<0,05
실험군 2(Mixed bacteria)	121.4 ± 30.6	873.3 ± 61.7	<0,005

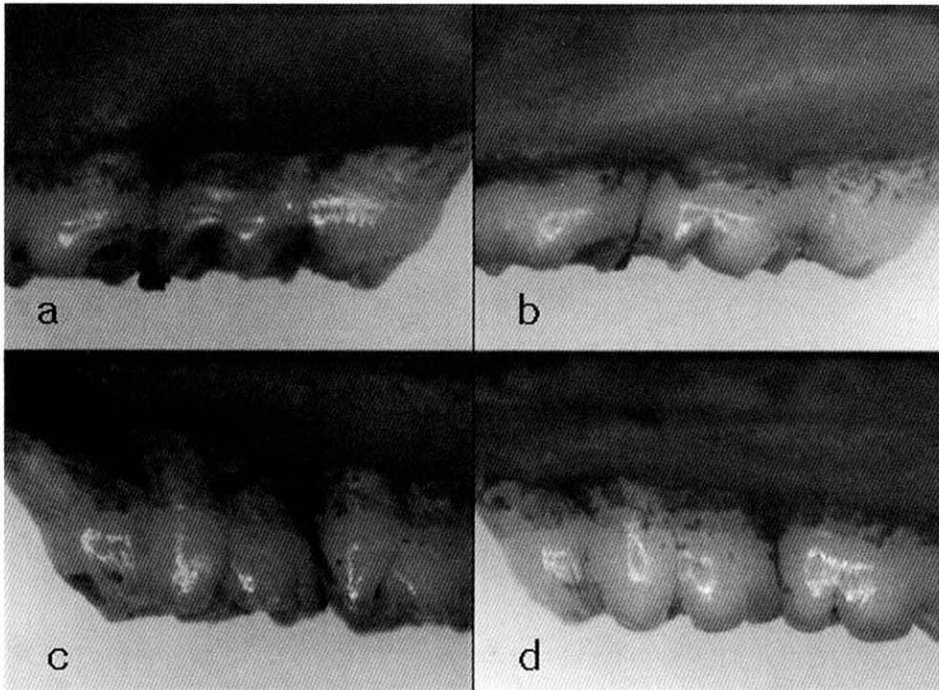


Figure 1. 전자입체현미경으로 관찰한 실험군과 대조군에서의 소실된 치조골 사진

(a : 대조군의 buccal surface, b: 실험군의 buccal surface, c : 대조군의 palatal surface, d : 실험군의 palatal surface). *P.gingivalis* HSP60으로 면역하지 않은 대조군에서 더 뚜렷한 치조골 파괴가 보인다.)

Table 2. 전자입체현미경으로 측정된 실험군과 대조군에서의 평균 치조골 높이

(mm±표준편차)

감염 그룹	<i>P.gingivalis</i> 단독			mixed bacteria		
	대조군	실험군	P-value	대조군	실험군	P-value
buccal	0.53±0.13	0.45±0.14	< .0001	0.52±0.14	0.42±0.11	< .0001
palatal	0.73±0.09	0.64±0.13	< .001	0.77±0.17	0.63±0.13	< .0001

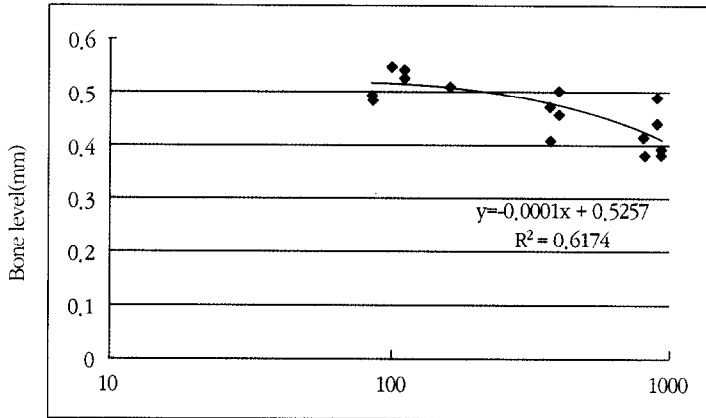


Figure 2. 치조골 높이와 anti-*P.gingivalis* HSP IgG 항체역가. 두 변수 사이에 강한 역 상관관계가 나타난다.

30.6, 873.3±61.7이었다(Table 1). 면역 전의 값과 비교하였을 때 면역 후 anti-*P.gingivalis* HSP60 IgG 역가는 유의하게 증가하였다.

2. 치조골의 높이

*P.gingivalis*로 감염시킨 대조군에서의 평균 협측, 구개측 치조골 높이는 각각 0.53±0.13mm, 0.73±0.09mm이었고, 실험군 1에서는 각각 0.45±0.14mm, 0.64±0.13mm이었다(Table 2). 두 그룹 간의 차이는 통계적으로 유의하였다(각각 p<0.0001, 그리고 p<0.001). 혼합박테리아로 감염시킨 대조군에서의 평균 협측, 구개측 치조골 높이는 각각 0.52±0.14mm, 0.77±0.17mm이었고 실험군 2에서는 각각 0.42±0.11mm, 0.63±0.13mm이었다. 두 그룹간의 차이는 통계적으로 유의하였다(각각 p<0.0001, 그리고 p<0.0001)(Figure 1)(Table 2).

3. 면역 후 anti-*P.gingivalis* IgG 역가와 치조골 높이 사이의 상관관계

면역 후 anti-*P.gingivalis* HSP60 역가와 백악법랑 경계로부터의 치조골 높이 사이의 상관관계를 평가하기 위해 선형회귀분석이 실시되었다. 상관계수는 매우 높았다($r^2=0.62$, Figure 2). Spearman rank test에서 매우 유의성 있는 역의 상관관계가 보였다(p=0.0001).

4. PCR 방법을 이용한 치은연하 지태표본으로부터 박테리아의 동정

감염 이틀 뒤, *P.gingivalis* 단독 혹은 혼합 박테리아로 감염시킨 백서의 배설물 표본을 PCR 검사하여 박테리아 균주를 동정할 수 있었다(Figure 3). 실험

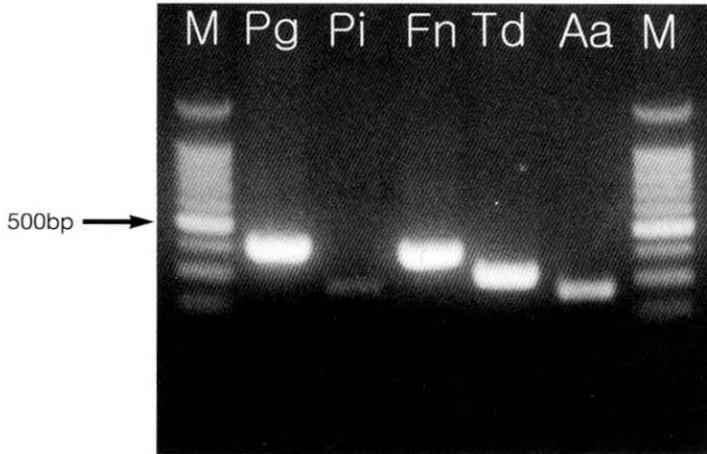


Figure 3. 혼합 박테리아의 구강내 접종 이틀 뒤 실험군과 대조군의 배설물 표본에서 동정된 각 표적 박테리아의 PCR 산물의 사진 (M : molecular weight marker, Pg : *P.gingivalis*, Pi : *P.intermedia*, Fn : *F.nucleatum*, Td : *T.denticola*, Aa : *A.actinomycetemcomitans*).

종료 시 얻은 실험군의 배설물 표본으로부터는 박테리아 균주를 동정할 수 없었다. 또한 *B.forsythus*는 어떤 표본에서도 동정되지 않았다.

IV. 총괄 및 고안

치주병원성 박테리아 간의 높은 배열 상동성을 공유하는 여러 항원 결정 부위가 존재하며 이들은 다양한 병원균에 대해 교차반응하는 백신으로 사용될 수 있을 것이다. 이런 항원에는 phosphorylcholine (PC)(Schenkein *et al.*¹⁷⁾) 뿐 아니라 capsular polysaccharide (CPS) (Laine *et al.*¹⁸⁾) 및 열충격 단백질 (HSP)(Hinode *et al.*¹²⁾)이 포함된다. PC는 *P.gingivalis*에서 동정되지 않으므로 그 사용을 배제하였다. CPS 역시 우리 연구에 포함되지 않았는데, 이것이 백신 제조시 CPS-단백질 결합을 필요로 하며 T-cell 매개성 면역의 유도자가 아니기 때문이다(Choi *et al.*⁴⁾).

*P.gingivalis*로 감염시킨 백서에서 치조골 흡수가 증가하였는데, 이는 다른 연구에서 얻은 결과와 유사하였다(Rajapakse *et al.*⁶⁾, Katz *et al.*⁵⁾, DeCarlo *et al.*⁷⁾). 이들은 치조골 흡수의 감소와 *P.gingivalis*의 균집화를 억제하기 위해 *P.gingivalis*로부터 얻은 RgpA-Kgp proteinase-adhesin 복합체 또는 HA2 백신의 효과를 연구하였다. 그러나 다수의 치주병원균

에 대한 *in vivo* 백신의 효과를 동물 모델에서 평가한 연구는 없었다.

그러므로 여섯 종류의 치주병원성 박테리아의 열유도성 단백질의 교차반응성과 표적 박테리아에 대한 성공적인 흡소닌작용을 보임으로써 *P.gingivalis* HSP을 잠재적인 치주 백신으로 사용할 수 있으리라는 우리의 이전 *in vitro* 연구(Choi *et al.*¹³⁾)를 연속하여 수행하였다. 본 연구에서는 다수 박테리아에 의한 치조골 파괴를 억제하는 *P.gingivalis* HSP의 백신 효과를 *in vivo*에서 평가하기 위해 백서 모델을 사용하였다. Anti-*P.gingivalis* HSP IgG 항체역가는 면역 전 단계와 비교하여 유의하게 증가하였는데 이는 면역 방법이 성공적이었음을 보여준다. 배설물의 박테리아 균주가 PCR 방법으로 동정된 것은 구강내 균집화가 이루어졌음을 나타낸다. *B.forsythus*는 예외였는데 그 배양이 까다롭기 때문으로 보인다. 그러나 이는 접근의 어려움으로 치은연하 치태 표본으로부터 직접 확인할 수 없었다. 실험 종료 시 얻은 실험군의 배설물 표본에서는 어떤 박테리아 균주도 동정할 수 없었다.

박테리아 유도성 치조골 파괴에 대한 *P.gingivalis* HSP의 억제효과는, 백서가 *P.gingivalis* 단독으로 감염되었는가 아니면 혼합 치주병원균으로 감염되었는가에 상관없이 매우 유의하였다. 이런 결과는 우

리의 이전 *in vitro* 연구에서의 결과(Choi *et al.*¹³⁾)와 더불어 *P.gingivalis*를 다수의 치주병원성 박테리아에 대한 잠재적 치주백신으로 사용할 수 있음을 강력히 제안한다. 또한 이 억제 효과는 anti-*P.gingivalis* HSP 항체 수준과 밀접히 관련 있었다. 그러므로 anti-*P.gingivalis* HSP 항체 수준은 박테리아 유도성 치주염의 방어능에서의 지표가 될지 모른다.

그러나 HSP로의 면역이 숙주 단백질에 대해 자가 면역을 발생시킬지 모른다는 중요한 문제가 제기된다. 박테리아성 HSP에 대한 T-세포 면역반응은 포유류 HSP를 표적으로 하는 자가면역을 유도함으로써 치주 질환의 면역학적 병인기전에 관여할 수 있다 (Ando *et al.*¹⁹), Lopatin *et al.*²⁰), Ueki *et al.*²¹), Yamazaki *et al.*²²). 최근에 *P.gingivalis* HSP의 면역우세 T-세포 항원 결정 부위가 치주염 환자로부터 동정되었는데 이 peptide를 미래의 예방 백신으로 개발할 수 있을 것이다(Choi *et al.*²³).

V. 결론

본 연구는 다수의 박테리아에 의해 발생하는 치조골 파괴를 억제하기 위한 '미래 백신'으로서 *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) 열충격 단백질(HSP)60의 가능성을 평가하기 위해 실시되었다. 백서를 *P.gingivalis* HSP60으로 면역하였고, 다수의 치주병원성 박테리아 감염에 의해 실험적 치조골 파괴를 유도하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 면역 후, 쥐의 anti-*P. gingivalis* HSP IgG 항체역가는 유의하게 증가하였다.
2. Anti-*P.gingivalis* HSP IgG 항체역가는 다수 박테리아에 의해 유도된 치조골 파괴의 양과 매우 유의성 있는 역의 상관관계를 보였다.
3. 치은연하 세균성 치태의 PCR 검사로부터 얻은 결과는 백신이 여러 치주병원성 박테리아를 성공적으로 제거함을 보여주었다.

이상의 결과 *P.gingivalis* HSP60이 여러 치주병원성 박테리아에 의해 유도된 치주 질환을 억제하는

백신으로 개발될 가능성이 있다고 생각된다.

VI. 참고 문헌

1. Taubman MA, Yoshie H, Wetherell JR, Ebersole JL, Smith DJ (1983). Immune response and periodontal bone loss in germfree rats immunized with and infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res* 18:393-401.
2. Klausen B (1991). Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: A review article. *J Periodontol* 62:59-73.
3. Klausen B, Evans RT, Ramamurthy NS, Golub LM, Sfantescu C, Lee JY, Bedi G, Zambon JJ, Genco RJ (1991). Periodontal bone level and gingival proteinase activity in gnotobiotic rats immunized with *Bacteroides gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 6:193-201.
4. Genco CA, Kapczynski DR, Cutler CW, Arko RJ, Arnold RR (1992). Influence of immunization on *Porphyromonas gingivalis* colonization and invasion in the mouse chamber model. *Infect Immun* 60:1447-1454.
5. Choi JI, Schifferle RE, Yoshimura F, Kim BW (1998). Capsular polysaccharide-fimbrial protein conjugate vaccine protects against *Porphyromonas gingivalis* infection in SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. *Infect Immun* 66:391-393.
6. Katz J, Black KP, Michalek SM (1999). Host responses to recombinant hema-gglutinin B of *Porphyromonas gingivalis* in an experimental rat model. *Infect Immun* 67:4352-4359.
7. Rajapakse PS, O'Brien-Simpson NM, Slakeski N, Hoffman B, Reynolds EC (2002). Immunization with the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis* protects against bone loss in the rat periodontitis model. *Infect*

- Immun* 70:2480-2486.
8. DeCarlo AA, Huang Y, Collyer CA, Langley DB, Katz J (2003). Feasibility of an HA2 domain-based periodontitis vaccine. *Infect Immun* 71:562-566.
 9. Page RC (1994). The humoral response in patients with periodontitis: Effects of treatment and prospects for a vaccine. *Compend Contin Educ Dent Suppl*. No. 18: S666-S671.
 10. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD (1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 15:316-323.
 11. Podmore M, Ebersole JL, Kinane DF (2001). Immunodominant antigens in periodontal disease: a real or illusive concept? *Crit Rev Oral Biol Med* 12:179-185.
 12. Hinode D, Nakamura R, Grenier D, Mayrand D (1998). Cross-reactivity of specific antibodies directed to heat shock proteins from periodontopathogenic bacteria and of human origin. *Oral Microbiol Immunol* 13:55-58.
 13. Choi JI, Choi KS, Yi NN, Kim US, Choi JS, Kim SJ (2003b). Vaccine efficacy of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock protein 60 against multiple putative periodonto -pathogenic bacteria. *J Dent Res* (submitted for publication).
 14. Maeda H, Miyamoto M, Hongyo H, Nagai A, Kurihara H, Murayama Y (1994). Heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*: Molecular cloning and sequence analysis of its gene and purification of the recombinant protein. *FEMS Microbiol Lett* 119:129-136.
 15. Goncharoff P, Figurski DH, Stevens RH, Fine DH. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of IktA-specific sequences. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:105-110.
 16. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40(9):3223-3231.
 17. Schenkein HA, Berry CR, Purkall D, Burmeister JA, Brooks CN, Tew JG (2001). Phosphorylcholine-dependent cross-reactivity between dental plaque bacteria and oxidized low-density lipoproteins. *Infect Immun* 69:6612-6617.
 18. Laine ML, Appelmek BJ, van Winkelhoff AJ (1997). Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *J Dent Res* 76:1840-1844.
 19. Ando T, Kato T, Ishihara K, Ogiuchi H, Okuda K (1995). Heat shock proteins in human periodontal disease process. *Microbiol Immunol* 39:321-327.
 20. Lopatin DE, Shelburne CE, Van Poperin N, Kowalski CJ, Bagramian RA (1999). Humoral immunity to stress proteins and periodontal disease. *J Periodontol* 70 :1185-1193.
 21. Ueki K, Tabeta K, Yoshie H, Yamazaki K (2002). Self-heat shock protein 60 induces tumor necrosis factor-alpha in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 127:72-77.
 22. Yamazaki K, Ohsawa Y, Tabeta K, Ito H, Ueki K, Oda T, Yoshie H, Seymour GJ (2002). Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients. *Infect Immun* 70:2492-2501.
 23. Choi JI, Kang HS, Park YM, Kim SJ, Kim US (2003a). Identification of T-cell epitopes of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock-protein 60 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 18 (in press).

Reduced alveolar bone loss in rats immunized with *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein

Ni-Na Yi, Ju-Youn Lee, Jeom-Il Choi

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

The present study has been performed to evaluate *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) heat shock protein(HSP)60 as a candidate vaccine to inhibit multiple bacteria-induced alveolar bone loss. Rats were immunized with *P. gingivalis* HSP60 and experimental alveolar bone loss was induced by infection with multiple periodonto -pathogenic bacteria. Post-immune rat anti-*P. gingivalis* HSP IgG levels were significantly elevated and have demonstrated highly significant inverse relationship with the amount of alveolar bone loss induced by multiple bacteria. Results from PCR detection of subgingival bacterial plaque indicated that the vaccine successfully eradicated the multiple pathogenic species. We concluded that *P. gingivalis* HSP60 could potentially be developed as a vaccine to inhibit periodontal disease induced by multiple pathogenic bacteria.

Key words : Heat shock protein, *Porphyromonas gingivalis*, vaccine