

氏名(本籍)	やま だ いちろう 山 田 伊知郎
学位の種類	博 士 ( 歯 学 )
学位記番号	歯 博 第 1 7 9 号
学位授与年月日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	東北大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学臨床系
学位論文題目	Prevotella intermedia による口腔内由来タン パク質の利用に関する研究

(主査)

論文審査委員	教授 堀 内 博	教授 山 田 正
		教授 高 田 春比古

# 論文内容要旨

歯周疾患は様々な局所的、あるいは全身的な要因によって起こる。その中でプラークは、歯周炎の主な原因であると考えられており、そのプラークを構成する細菌の出す代謝産物や菌体外酵素によって歯周組織の破壊を招くと考えられている。歯周炎に関連するとされている菌は、主に病巣部歯肉縁下プラークから検出されるが、*Prevotella intermedia* は病巣部歯肉縁下プラークだけでなく、歯肉縁上プラークや健全な部位からも検出されている。このように多様な環境で生息するためには、*P. intermedia* はその環境で得られる栄養源を効率よく利用することが必要である。

そこで、本研究では、歯肉縁下を常に満たしている歯肉溝滲出液に最も多く含まれるタンパク質成分としてアルブミンを、口腔内に常に存在する唾液に最も多く含まれるタンパク質成分としてムチンを、食事などによって多量に供給されると考えられる糖としてグルコースをそれぞれ選び、これらの栄養成分 *P. intermedia* (type strain ATCC 25611) が利用できるか否かについて、また、これらの栄養成分を利用する際に関わると考えられる菌体タンパク質分解酵素やグリコシダーゼ活性が変化するかどうかについて検討した。

実験の結果、*P. intermedia* は、アルブミンやムチン、グルコースを培地に添加することによって、その増殖を有意に増加した。さらにその時に培養液中のアルブミン、ムチンおよびグルコース量が減少したことから、*P. intermedia* がこれらの成分を増殖のためのエネルギー源や、菌体構成物質の材料として利用したと考えられた。また、菌体外酵素活性についてもアルブミン添加培地では、グリシルプロリルジペプチダーゼ活性、エラスターゼ活性およびアルブミン分解活性の有意な上昇が、ムチン添加培地では、キモトリプシン様活性とエラスターゼ活性の有意な上昇が見られた。一方、グルコース添加培地では、キモトリプシン様活性とエラスターゼ活性の有意な減少が見られた。

以上のことから、*P. intermedia* は口腔内に供給されるアルブミンやムチン、グルコースといった多様な栄養源を利用して増殖することが可能であることがわかった。そして、これがこの細菌が口腔内から広く分離される理由の一つであると考えられる。さらに、栄養源の変動に伴ってタンパク質分解酵素活性やグリコシダーゼ活性などの菌体外酵素活性を変動させていることが明らかになった。このことから、*P. intermedia* は歯肉縁下のような環境においてはタンパク質分解酵素活性を高めることで歯周病原性を増強し、歯周炎の発症や進展に大きく寄与すると考えられる。

## 審査結果要旨

辺縁性歯周炎の発症と進行に歯周病関連菌群が関与していることは既に明らかとなっている。本研究は歯周病関連菌の一つである *Prevotella intermedia* (P.i) が歯周炎病巣部縁下プラーク中だけでなく、病巣部および健全部の縁上プラーク中にも存在することに注目し、生育に必要な栄養源を P.i がどのように摂取するかについてタンパク質分解酵素およびグリコシダーゼ活性に注目して実験的に解明したものである。

実験には *P. intermedia* ATCC 25611 を用い、BM 培地および BM 培地に 0.5% アルブミン、BM に 0.1% ムチン、あるいは 0.5% グルコースを添加したもの (BM, BMA, BMM, あるいは BMG と略す) を用いて嫌気培養を行い、各培地における最大増殖量と培地 pH を測定している。アルブミン消費量はタンパク質アッセイキットを用いた色素法で、ムチンはエタノールで沈澱させたものを遠沈し沈澱物を再度溶解したもののタンパク質濃度を Lowry 法で、グルコースは培養上清に過塩素酸を加え脱イオン水で希釈後 Kunst らの方法に従いヘキソキナーゼとグルコース 6 リン酸脱水素酵素を用いた酵素法で測定している。また、酵素存在下の酵素活性は菌懸濁液を嫌気箱から取り出し、大気下で酵素基質を加え、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性、 $\alpha$ -フコシダーゼ活性、グリシルプロリルジペプチダーゼ活性の測定を行っている。

得られた結果は以下の通りである。

- 1) BM と比較し BMA では 1.7 倍、BMM では 1.4 倍、BMG では 2.6 倍に達する有意な最大増殖量の増大を明らかにしている。
- 2) 細菌の増殖に伴いアルブミンは対数増殖期で 27%、定常期で 51%、ムチンは、対数増殖期で 15%、定常期で 17% およびグルコースでは、対数増殖期に 9.3%、定常期で 16% の有意の減少を認めている。
- 3) BM と比較し、BMA ではグリシルプロリルジペプチダーゼ活性、エラスターゼ活性およびアルブミン分解性が有意に増大し、BMM ではキモトリプシン様活性とエラスターゼ活性が有意に増大したけれども、BMG ではキモトリプシン様活性とエラスターゼ活性が有意に減少し、BMM および BMA では  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の有意の上昇をみている。
- 4) 酵素存在下では、グリシルプロリルジペプチダーゼ活性に大きな変化はなく、 $\alpha$ -フコシダーゼ活性とエラスターゼ活性などが低下する傾向をみている。

これらの結果より、本研究では血漿成分に多いアルブミン、唾液に含まれるムチン、食品中に存在するグルコースなどを P.i がエネルギー源あるいは構成材料として利用できたことを証明し、臨床の場で P.i が広く分布している所似を明らかにするとともに、グルコースの供給がない場合や歯肉縁下においてタンパク質分解酵素活性を増大させることにより歯周病病原性を増強していることを推論している。よって本研究は博士 (歯学) の称号授与に値するものと判定する。