

論文の内容の要旨

氏名：大 屋 学

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Influence of varying hemin concentrations on growth and physiological activity of

Porphyromonas gingivalis strains with different *fimA* genotypes

(*fimA* 遺伝子型の異なる *Porphyromonas gingivalis* の発育と生理活性に及ぼす hemin 濃度の影響)

歯周病は歯肉の炎症と歯槽骨の破壊を特徴とする炎症性疾患で、30 歳以上の約 8 割が罹患している。歯を失う最も大きな要因であるが、近年では、糖尿病、低体重児出産および呼吸器疾患など様々な全身疾患の誘因としても注目されている。歯周病の発症と進展には、バイオフィームに生息する口腔細菌が複合的に関与しているが、*Porphyromonas gingivalis* は最も重要な歯周病原菌であり、病原因子や生理学的特性に関する解析が進んでいる。

グラム陰性嫌気性桿菌である *P. gingivalis* は、病原因子として線毛、LPS および莢膜を有するとともに、ジンジパインなどのタンパク分解酵素を産生する。ジンジパインはこの菌種に特有の酵素で、基質の違いから arginine-gingipain (Rgp) と lysine-gingipain (Kgp) とに分類される。特に Rgp は、菌の増殖のみならず、膜タンパクの成熟など様々な生理活性に関与しているため、Rgp 活性は *P. gingivalis* の生理状態を表す良い指標となる。一方、線毛は、本菌の歯周ポケット内への定着、バイオフィームの形成および heme の取り込みなどに関与する。主要な線毛である FimA 線毛には、*fimA* 遺伝子の塩基配列の違いにより I～V 型および I 型の亜型としての Ib 型が存在する。疫学的解析から、*fimA* 遺伝子型と歯周病の病態とは相関することが示されており、健常者からは I 型が、重度の歯周病患者からは II および IV 型が多く検出される。

P. gingivalis の発育と病原性の発揮には栄養素としての鉄が必須であり、赤血球由来の heme が主な供給源となる。一方で、過剰量の heme は、数株の *P. gingivalis* の増殖を抑制することが示唆されている。歯周病の進展にともない、歯周ポケット滲出液中の出血量が増えるため、heme 濃度と検出される *P. gingivalis* の *fimA* 遺伝子型との間に関連性があることが考えられるが、このような観点から検討した研究はこれまでにない。また、heme 濃度が、菌体内の活性酸素種のバランスに変化を生じさせ菌の発育に影響を及ぼしていることも考えられる。実際に、菌体内の Rgp 活性が H_2O_2 の影響を受けること、本菌の生存にスーパーオキシドの存在が深く関わっていることが知られている。従って、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 量は本菌の発育と生理活性に大きな影響を及ぼしていることが考えられるが、heme 濃度と SOD 量との関連性は検討されていない。そこで本研究では、*fimA* 遺伝子型が異なる *P. gingivalis* の菌株を用い、heme の代用安定物質である hemin の濃度が各々の菌株の発育に及ぼす影響を調べた。また、種々の hemin 濃度を用いて培養を行った時の菌体の Rgp 活性、 H_2O_2 および SOD 量を定量し、hemin 濃度と菌体内の生理活性との関連性を検討した。

実験には、供試菌株として FDC381 株 (I 型)、MPW1b-01 株 (Ib 型)、TDC60 株 (II 型)、ATCC49417 株 (III 型)、W83 株 (IV 型) および HNA99 株 (V 型) を用いた。培地中に添加した hemin の濃度は、標準的に用いられる 5 ppm を基準の 1× 濃度とし、その他 25 ppm (5×)、2.5 ppm (0.5×) および 0.5 ppm (0.1×) の濃度を用いた。各菌株を接種後、37°C 嫌気環境下にて培養を行い、濁度 (OD600 nm) が 1.0 に達した時点を中心とした十分な発育時間とした。発育した菌株を集菌しビーズにて破碎、遠心上清を回収した後タンパク量を一定量にしてから実験に用いた。Rgp 活性、 H_2O_2 量および SOD 量は、既報の方法に準じ、各々 BAPNA 分解能試験、グルコースオキシダーゼ活性を用いた比色定量法および xanthine oxidase と tetrazolium salt を用いた比色定量法にて測定した。

はじめに、種々の hemin 濃度が各菌株の発育に及ぼす影響を検討した結果、FDC381 株、TDC60 株、ATCC49417 株および W83 株 では、いずれの濃度においても培養 24 時間後には十分な発育が認めら

れた。一方、MPW1b-01株とHNA99株の発育には、各々96時間、72時間を要した。また、MPW1b-01株では5×と1×の濃度、HNA99株は5×、1×および0.5×の濃度を用いた場合に発育が認められたが、それ以外の濃度では発育しなかった。

次に、培養24時間後に発育が認められたFDC381株、TDC60株、ATCC49417株およびW83株において、菌体内Rgp活性を指標として各菌株における至適hemin濃度を求めるとともに、hemin濃度と菌体内H₂O₂量およびSOD量との関連性を調べた。その結果、Rgp活性とSOD量はhemin濃度によって菌株ごとに変化が認められたが、H₂O₂量はすべての菌株において、標準的なhemin濃度とその他の濃度との間に有意差は認められなかった。

FDC381株(I型)は、1×のhemin濃度を用いた場合、最も高いRgp活性が認められたことから本菌株においては、標準濃度のheminが発育至適濃度であると考えられた。SOD量は、このhemin濃度を用いた培養時に比べ、他のhemin濃度使用時には同等もしくは増加したことから、至適hemin濃度以外の環境下でも、ストレスはかかるものの発育可能であることが考えられた。

TDC60株(II型)は、5×のhemin濃度を用いた場合、最も高いRgp活性が認められたことから、本菌株の発育には標準的な濃度よりも高濃度のheminが適しているものと考えられた。SOD量は、この濃度のheminを用いた場合を最高値に、hemin濃度依存的に有意に減少したことから、hemin濃度が高いほど菌体に対するストレスも少なく、発育環境も良好であることが考えられた。

ATCC49417株(III型)は、0.5×のhemin濃度を用いた場合、最も高いRgp活性が認められたことから、本菌株の発育には標準的な濃度よりも低濃度のheminが適しているものと考えられた。SOD量は、5×と0.1×のhemin濃度を用いた場合、顕著に減少したことから、至適発育環境のhemin濃度とかけ離れた濃度の環境下では、発育に有害なストレスが生じていることが考えられた。

W83株(IV型)は、高濃度(5×)と低濃度(0.5×)のheminを用いた場合、高いRgp活性が認められた。SOD量は、これら両hemin濃度とそれ以外の濃度間において有意差が認められなかったことから、本菌株はいずれのhemin濃度にも対応して発育できることが考えられた。

以上の結果から、*P. gingivalis*は*fimA*遺伝子型の違いにより至適hemin濃度が異なること、hemin濃度により菌体内のストレス状況が菌株ごとに異なることが分子レベルで明らかとなった。臨床研究から、II型*fimA*遺伝子を有するTDC60株は重度歯周病患者の歯周ポケットから高頻度に検出されること、一方、III型*fimA*遺伝子を有するATCC49417株は、歯周病患者からの検出率が低いことが報告されている。今回の研究から、TDC60株の発育には高濃度のheminが、ATCC49417株は低濃度のheminが発育に適していることが示され、これまでの臨床研究の結果と一致した。歯周病が進展し歯周ポケット内のheme濃度が上昇した状況は、TDC60株のような高病原性かつ高濃度hemin要求菌にとってより増殖しやすい環境であることが推察される。

歯周局所の環境変化により歯周ポケット内面に潰瘍が形成され、毛細血管がバイオフィルムに暴露された時、供給される血液量に応じて*fimA*遺伝子型の異なる*P. gingivalis*が増殖することが考えられる。heme濃度に対応し、歯周ポケット内では*P. gingivalis*の遺伝子型の遷移と歯周病の進展は深く関与していることが推察された。炎症を制御し血液の供給を断つことすなわちhemeの濃度を抑制することが歯周病進展の抑制と治療に重要であることが示唆された。