原 著

大豆中に存在する *Bacteroides gingivalis*
由来のコラゲナーゼ阻害剤の抽出と
ヒト歯肉線維芽細胞の培養系に
及ぼす影響*

Isolation of a Collagenase Inhibitory Substance from
Soybeans Which is Specifically Active on the
Enzyme from *Bacteroides gingivalis* and
Its Effect on the Cell Culture of Human
Gingival Fibroblast*

中 村 亮** 日野出大輔** 寺 井 浩**
森 岡 昌 美** 前 原 玲 子** 佐 藤 誠**
田 中 敏 之*** 松 田 尚 樹*** 中 村 正 一***

Ryo NAKAMURA **, Daisuke HINODE **, Hiroshi TERAJ **,
Masami MORIOKA **, Reiko MAEHARA **, Makoto SATO **,
Toshiyuki TANAKA ***, Naoki MATSUDA *** and Masakazu NAKAMURA ***

Received April 5, 1989; accepted May 8, 1989

Abstract: In a previous paper we showed that *Bacteroides gingivalis* produces SH-dependent collagenolytic enzyme and that the activity is inhibited by the extract of soybean meal. The purpose of this study is to describe the isolation, partial purification, and characterization of this inhibitory substance.

Dried soybeans were pulverized in a coffee mill to pass a 60 mesh sieve and suspended at a 2 % concentration in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.1 M NaCl. The suspension was centrifuged at 10,000×g and the supernatant was used as crude soybean extract. The inhibitory substance in the crude extract was further purified by DEAE-cellulose column chromatography and gel filtration on Sepharose CL-6B, and the active fraction for the inhibition of the collagenolytic enzyme from *B. gingivalis* was collected, concentrated, and named soybean collagenase inhibitor (SCI). The crude

* 本論文の要旨は第64回 IADR 総会 (1986年 6 月, The Hague) ならびに第36回日本口腔衛生学会総会 (1987年10月, 横須賀市) において発表した。

** 徳島大学歯学部予防歯科学教室 (主任: 中村 亮教授)

*** サンスター株式会社基礎研究所 (相本健次所長)

** Department of Preventive Dentistry, The University of Tokushima School of Dentistry (Director: Prof. Ryo NAKAMURA)

*** Biochemical Research Laboratories, Sunstar Inc. (Director: Kenji AIMOTO)

extract contained soybean trypsin inhibitor (STI), and inhibited the trypsin and collagenolytic enzyme of *B. gingivalis*, but no inhibition was observed for *Clostridium histolyticum* enzyme and the protease of *B. gingivalis*. However, the SCI was successfully separated from STI by these purification procedures. The molecular weight of SCI estimated by gel filtration was approximately 700 K dalton. STI was inactivated by heat treatment in an autoclave for 20 min at 15 lbs/in², but SCI was stable for the same treatment. This substance was very effective in protecting human gingival fibroblast cells (HGF) from cytopathogenicity of the collagenolytic enzyme of *B. gingivalis*. These results suggest that this collagenase inhibitor maintains normal turnover of gingival cells and prevents the development of periodontal disease.

索引用語：歯周病，バクテロイデス・ジンジバリス，大豆，コラゲナーゼ阻害剤

Key words: Periodontal disease, *Bacteroides gingivalis*, Soybeans, Collagenase inhibitor

緒 言

Bacteroides gingivalis はグラム陰性の偏性嫌気性菌で，成人型の辺縁性歯周炎患者の歯周ポケット底部から多数分離されることから，本疾患の有力な原因菌と考えられている¹⁻³⁾。本菌は種々の病原因子を産生するだけでなく，菌体構成成分も強い生物活性を示し，歯周組織細胞との相互作用により局所に過敏反応を惹起して病原性を発揮することも示唆されている⁴⁾。また，本菌は糖を分解せず，エネルギー源としてアミノ酸を利用するためにタンパク質を分解する必要がある。このため，菌自体がコラゲナーゼやプロテアーゼ等の種々のタンパク分解酵素を産生し，歯周ポケットの周囲に存在する組織を基質として栄養源としながら生息するものと考えられる。これらの酵素は，コラーゲン線維に富む歯周組織，特に歯肉や歯根膜を直接破壊する病原因子として注目されると同時に，唾液中の免疫グロブリンAやリゾチムにも作用し，間接的に口腔内の感染防御機能を低下させ，歯周疾患のみならず，他の口腔疾患の発症ならびに進行に関与する可能性を示唆する報告も行われている⁵⁻⁹⁾。

著者ら^{6,10)}は，*B. gingivalis* の産生するコラゲナーゼを部分精製し，その性質を調べたところ，酵素活性はSH-基に対する依存性が高く，その活性の発現にシステインやジチオスレイトール等のSH化合物を必要とすることを報告した。この性質は従来から報告されているコラゲナーゼの性質とは正反対のものであり，非常に特異的である⁹⁾。しかしながら，この特異的な性質はこの菌の示す強い偏性嫌気性ととも，歯周疾患患者の歯周ポケットの深部で本酵素活性を賦活して，組織の破壊を進行せしめるという点では合目的であり，本菌の有力な

病原因子と考えられる。したがって，本酵素活性を特異的に阻害することが可能になれば，本菌の病原性を減弱化し，成人型の辺縁性歯周炎の予防や治療に効果が期待されるものと思われる。

以上のような目的で著者等は，*B. gingivalis* の産生するコラゲナーゼの活性阻害剤を土壌菌などの産生物中で検索するうちに，土壌菌の培養成分として用いる大豆粉末中に強い活性阻害を示す物質が含まれていることを見出した¹¹⁾。

本研究では市販の大豆を用いて *B. gingivalis* 由来のコラゲナーゼ阻害物質の分離精製を試み，その性質を明らかにするとともに，本酵素による組織破壊に対しどのような影響を与えるかをヒト歯肉線維芽細胞を用いて調べた。

材料及び方法

菌株

コラゲナーゼの抽出に用いた菌株は，フォーサイス歯科研究所の Dr. Socransky によって歯周病患者の歯周ポケットから分離された *B. gingivalis* 381株で，ニューヨーク州立大学バッファロー分校の Drs. R. J. Genco ならびに J. Slots から分与され，著者らの教室で継代保存しているものである。本菌の培養は，嫌気性 BHI (Brain heart infusion) にヘミンとビタミン K₁ を添加した液体培地中で 5% CO₂，10% H₂ 及び 85% N₂ 下の嫌気ボックス中で 37°C で行った¹²⁾。

菌株は VPI (Virginia Polytechnic Institute) の Anaerobic Laboratory Manual¹²⁾に記載の方法に従って，定期的に糖の要求性，フェニール酢酸やアルコール等の産生物をガスクロマトグラフィーによって同定を行うとともに，FITC 標識の抗-*B. gingivalis* 家兔免疫血清

との反応性によっても同定した。

Bacteroides gingivalis 381 より SH 依存性コラゲナーゼの調製

Bacteroides gingivalis 381をイースト抽出液、ヘミン及びビタミン K₁ を添加した嫌気性 BHI 培地で37°C で2昼夜培養した。培養上清は培養液を10,000×g 15分間遠心して集めた。コラゲナーゼは友辺ら¹⁰⁾の方法に従って抽出、部分精製したものを用いた。すなわち *B. gingivalis* の培養上清に1.5倍量のアセトンを加えて得られた沈渣画分を、1mM ジチオスレイトール (DTT) を含む10mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.4に溶解し、同緩衝液で1夜透析を行なった。この透析内液標品をセファロース CL-6B によりゲル濾過し、その活性画分を100,000×g, 2時間, 4°C にて超遠心した。沈渣を0.8% N-オクチル-β-D-グルコピラノシドを加えた上記緩衝液に溶解し、再度超遠心した後、得られた上清を酵素液とした。部分精製酵素は1mg 酵素タンパク当り37°C で1分間に130μg のコラーゲンを分解する活性をもっていた。

酵素活性ならびにその阻害活性の測定

コラゲナーゼ活性は Toda ら⁹⁾の方法に準じて測定した。基質には仔牛アキレス腱から抽出し、¹⁴C で標識したアセチルコラーゲンを用い、0.2M NaCl, 1mM DTT, 5mM 酢酸カルシウム, 50mM Tris-HCl を含む緩衝液 pH7.6に0.1%になるよう調製し、適量の酵素を加えた合計400μl を標準反応液とした。コラーゲンの Specific activity は20,000dpm/mg となるよう調整した。反応液は30°C で1時間反応させた。反応は20mMのo-phenanthroline 20μl と dioxane 400μl を加えて停止させ、10,000×g, 10分, 4°C で遠心した上清中の放射能活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、コラーゲン分解活性は反応系に当初から o-phenanthroline を添加した場合との差 (dpm) を求めて表した。なお, *Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼ活性の測定には反応液に DTT を含まないものを用いた。

トリプシンの活性測定は市販の牛豚トリプシン (Sigma, Type III) を酵素とし、牛乳カゼインを基質として Otsuka ら⁹⁾の方法に準じて行った。標準反応液は0.1M リン酸ソーダ緩衝液, pH 7.7に基質が、1.5%になるように調整した。これに適量の酵素を加えて全量を 1ml とし、37°C で30分間反応させた。その濾過液0.1ml に0.05M リン酸ソーダ緩衝液2.4ml, 0.03%フルオレスカミン0.5ml を加えよく攪拌後、10分以内に蛍光分光光度計により励起波長390nm, 蛍光波長480nm にてその蛍光

量を測定した。なお, *B. gingivalis* より抽出したプロテアーゼ (カゼイン分解酵素) の測定には、トリプシンの活性測定に用いた反応液に 2mM DTT を添加し、緩衝液の pH を6.5としたものを使用した以外はトリプシンの活性測定と同様の方法によった⁹⁾。

盲検には100°C で10分間加熱により失活させた酵素を用い、阻害率はそれぞれの反応系にインヒビターを加えて測定した時に生じた活性の阻害率で示した。

ヒト歯肉線維芽細胞の培養

抜歯時に得られた20歳女性の健康歯肉片を約3mm四方に裁断し、シャーレ上に静置し、Fetal calf serum (FCS)10%を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DME; NISSUI) を少量添加して、CO₂ インキュベーター内で培養した。組織片のシャーレ上への付着を確認した後、充分量の培地をさらに加えて培養を行って Outgrowth した細胞が Confluent に至ったところで継代し、この時点での細胞を初代のヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) とした。本実験には7代目の HGF を用い、継代培養された細胞を、0.02% EDTA-0.25%トリプシン (DIFCO; 1:250) にて回収後、4×10⁴ cells/ml の濃度で10% FCS-DME に浮遊させ、60mm の培養皿 (CORNING) に5ml ずつ加え、37°C, 5% CO₂ で培養を行った。4日後、培養液を取り除き、FCS を含まない DME にて細胞表面を洗浄後、*B. gingivalis* 由来のコラゲナーゼ及び大豆より抽出した同酵素阻害物質等を含む FCS 無添加 DME 5ml を各培養皿に加え、再び所定の時間培養を行った。観察は経時的に倒立顕微鏡 (NIKON; DIAPHOT-TMD) を用いて行った。

結 果

Bacteroides gingivalis の産生する SH 依存性コラゲナーゼの活性阻害物質の抽出精製と性質

Bacteroides gingivalis の産生する SH 依存性コラゲナーゼの活性阻害物質の抽出精製は下記のように行った (Fig. 1)。

市販の乾燥大豆をコーヒーマルで60mesh に碎粉し、重量比で2%になるように蒸留水に浮遊させ、Potter-Elvehjem type のホモジナイザーでホモジナイズして4°C で1夜放置後、ナイロクロスで濾過した。その濾液を0.1M NaCl を含む10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に対して1夜透析後、10,000×g で15分間遠心した。その遠心上清を粗抽出液とした。粗抽出液による *B. gingivalis* 由来のコラーゲンならびにカゼイン分解

酵素や *Cl. histolyticum* 由来のコラゲナーゼ、トリプシン等に対する活性阻害の特異性について調べたのを Table 1 に示した。

大豆の粗抽出液は *B. gingivalis* 由来のコラーゲン分解酵素（コラゲナーゼ）ならびにトリプシンの活性を強く阻害するが、*B. gingivalis* 由来のカゼイン分解酵素と *Cl. histolyticum* 由来のコラゲナーゼは何ら阻害を受けなかった。

次いで、前記緩衝液で十分に平衡化した DEAE-cel-

Fig. 1 Purification procedures of collagenase inhibitory substance from soybeans, Buffer A; 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, Buffer B; buffer A containing 0.1M NaCl.

lulose column に吸着させ、同緩衝液でよく洗浄後、0.2 M 及び0.3M NaCl を含む10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で段階的に溶出した。その結果は Fig. 2 に示すとおりである。コラゲナーゼ阻害活性は0.3M NaCl を含む同緩衝液による画分に集中して溶出されることがわかった。この阻害活性画分を集め、固形硫酸を加えて80%飽和とし、遠心によりその沈渣を0.1M NaCl を含む10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に回収した。同緩衝液に対して1夜透析後、同緩衝液で十分に平衡化した Sepharose CL-6B (15×600mm) カラムによりゲル濾過を行った。その溶出パターンを Fig. 3 に示した。ゲル濾過により大きく三つのピークに分れたが、コラゲナーゼ阻害活性画分は最も大きなピーク II に認め、その他の画分には認めなかった。同じカラムを用いて同じ条件で標準タンパクをゲル濾過し、その溶出パターンを半対数紙にプロットしたのが Fig. 4 である。これによると、ゲル濾過により得られたピーク II 画分はチログロブリン (669K dalton) とほぼ同じ容量で溶出され、その分子量は約700K dalton と推定された。

Table 2 はそれぞれの精製の過程での標品による *B. gingivalis* の産生する SH 依存性コラゲナーゼ活性を50%阻害する濃度 (IC 50) を求めたものである。タンパク当りの比活性でみると、コラゲナーゼ阻害活性は、DEAE-cellulose による吸着クロマトグラフィにより約2倍に、Sepharose CL-6B によるゲル濾過で約3倍に上昇した。

Table 3 はコラゲナーゼ阻害物質が大豆中に大量に含まれる Bowman-Birk¹³⁾ や Kunitz¹⁴⁾ のソイビーン・トリプシン・インヒビターと異なる物質かどうか調べるために、各精製のステップでの両活性を並行して測定したものである。また、コラゲナーゼ阻害物質はオートクレーブや煮沸などによる加熱処理に強く、逆に、ソイビ

Table 1 Specificity of the inhibition of some proteolytic enzymes by soybean extract

Enzyme	Enzyme amount* used	% Inhibition
Collagenolytic enzyme from <i>B. gingivalis</i>	1.0 unit	69%
Caseinolytic enzyme from <i>B. gingivalis</i>	0.03unit	—10% **
Collagenase from <i>Cl. histolyticum</i>	1.0 unit	0
Trypsin from bovine pancreas	0.03unit	79%

Crude preparation was used as soybean extract (20μl).

* One unit of collagenolytic enzyme or collagenase was defined as that ammount which hydrolysed 1 μg of collagen per min at 35°C, and caseinol ytic enzyme or trypsin was that ammount which produced fluorescence equivalent to 1 μmole tyrosine per hr at 37°C,

** The enzyme activity was enhanced.

Fig. 2 Column chromatography on DEAE-cellulose of the extract from dried soybeans. 115 ml of the sample (702 mg protein) was applied to a column (50×250mm) and the stepwise elutions with NaCl in 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, were achieved. The flow rate was adjusted to 30ml/h and 15ml fractions were collected.

Fig. 3 Gel filtration on Sepharose CL-6B of the active fraction of collagenase inhibitory substance from DEAE-cellulose column chromatography. A column packed with Sepharose CL-6B (15×600mm) was equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.1M NaCl and 0.5ml of the concentrated active fraction (31.8mg protein) was applied. The flow rate was adjusted to 1ml per hour and 1.3ml fractions were collected.

ーン・トリプシン・インヒビターは弱いことを著者らは確認しているため、オートクレーブによる影響を同時に調べた。

大豆粉末からの粗抽出液は *B. gingivalis* 由来のコラゲナーゼならびにトリプシンに対して共に強い活性阻害を示したが、DEAE-cellulose によるクロマトグラフィーを行うと、トリプシン・インヒビターは0.2M NaClを含む緩衝液でほとんど溶出され、コラゲナーゼ阻害物質が最も多く溶出する0.3M NaCl 画分にはわずかに認

Fig. 4 Estimation of molecular weight of the soybean collagenase inhibitor by gel filtration on Sepharose CL-6B. Plots of elution volume for authentic proteins are shown as a function of molecular weight on a logarithmic scale.

められるのみであった。さらに Sepharose CL-6B によるゲル濾過を行うと、コラゲナーゼ阻害物質を含むPeak IIにはトリプシン・インヒビターの活性は全く認めなかった。このことは各精製段階の画分をオートクレーブして活性を測定すると一層顕著であった。すなわち、各精製段階の画分中のコラゲナーゼ阻害物質はオートクレーブによりその活性はほとんど影響を受けないのに対し、トリプシン・インヒビターの活性は粗抽出液中にわずかの活性を残すのみであった。

***Bacteroides gingivalis* 由来の粗コラゲナーゼ標品のヒト歯肉線維芽細胞に対する障害性におよぼす大豆より抽出したコラゲナーゼ阻害物質の影響**

Bacteroides gingivalis 由来の赤血球凝集因子 (HA) や粗コラゲナーゼ並びにプロテアーゼ抽出液は、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) の凝集作用や細胞のコラーゲン接着能を阻害することを著者らは見出している (未発表)。このことはこれらの物質が歯肉の正常な細胞間接着能や、細胞の細胞外基質への付着に対し何らかの毒性因子として作用し、歯周組織の破壊や正常細胞のターンオーバーの阻害に関与していることを示唆している。このような酵素並びに毒性因子のなかで *B. gingivalis* 由来の粗コラゲナーゼ標品に対して、今回抽出精製したコラゲナーゼ阻害物質がどのような影響を及ぼすかについて検討した。

Fig. 5 は FCS 無添加 DME で HGF を3日間培養したときに *B. gingivalis* の粗コラゲナーゼ標品の HGF に与える影響と、それに対する大豆より抽出した非加熱処理コラゲナーゼ阻害物質の影響を調べたものである。

Table 2 Fifty percent inhibition concentration of the sample from soybeans on collagenolytic activity from *Bacteroides gingivalis*

Sample	50% Inhibition concentration*
Curde extract	120 μ g
DEAE-cellulose column chromatography	69 μ g
Gel filtration on Sepharose CL-6B	42.5 μ g

* Figures show the final concentration of the sample protein which inhibited 50% activity of SH-dependent collagenolytic enzyme.

コラゲナーゼ阻害物質のみでは3日間の HGF の培養に対し何ら影響を与えず、50 μ g、100 μ g の添加 (a-50, a-100) では添加しない時 (a) と同様に HGF は正常な単層細胞層を形成し、細胞は一定方向の配列傾向を示していた。しかしながら、*B. gingivalis* 由来の粗コラゲナーゼのみを添加すると (b, c, d)、濃度に従って細胞が球状になり、細胞凝集塊を形成することなく浮遊しているのが多く見られるようになった。これに対し、*B. gingivalis* の粗コラゲナーゼ標品とともに大豆より抽出した非加熱処理コラゲナーゼ阻害物質を加えてみたが、HGF 障害の抑制は殆ど見られなかった (b-50, b-100, c-50, c-100, d-50, d-100)。

Fig. 6 は HGF を3日間培養したときに、*B. gingivalis* の粗コラゲナーゼ標品が HGF に与える細胞障害性に対する、加熱処理コラゲナーゼ阻害物質の影響を調べたものである。左側 (a, b, c, d) の図は前図と同じものである。*B. gingivalis* 由来の粗コラゲナーゼ添加によって見られた HGF の細胞障害は、同濃度 (50 μ g、

100 μ g) でもコラゲナーゼ阻害物質の加熱処理により、ほぼ完全に抑制された (b-50B, b-100B, c-50B, c-100B, d-50B, d-100B)。

考 察

大豆粉末は微生物の培養に広く利用され、主として2%の濃度で用いられる。著者らは大豆粉末を含む培地で土壤菌を培養し、*B. gingivalis* 由来のコラゲナーゼ阻害物質を検索していたところ、培地成分の中の大豆粉末によってコラゲナーゼ活性が阻害されることを見出した¹¹⁾。まず、予備実験でこの阻害物質は透析内液成分に存在し、100,000 $\times$ g の超遠心を行っても活性が遠心上清に出現することから、可溶性の画分に存在することが分った。また、このコラゲナーゼ阻害物質は培地の滅菌消毒に用いるオートクレーブや煮沸などによる加熱処理によっても失活せず、むしろ阻害活性が増強されることも確認した。このことは今回の研究の結果からも明らかである。

大豆中にはトリプシンを阻害するトリプシンインヒビター (STI) が存在することが早くから知られ、1944年にすでに Bowman-Birk ら¹³⁾ によって分子量8,000の STI が発見されている。その後、相次いで分子量21,000~22,000の Kunitz¹⁴⁾ のソイビーン・トリプシンインヒビター (STI) が報告されている。そこで、先ずこのコラゲナーゼ阻害物質がこれらの STI と異なる物質かどうかを調べるためにコラゲナーゼ阻害物質と STI との分離を試みた。Birk¹⁵⁾ は大豆抽出液を DEAE-cellulose によるカラムクロマトグラフィを行うと、STI は0.2M NaCl を含む緩衝液によって溶出されることを報告している。今回行った実験でも STI は0.2M NaCl を含む緩衝液によってその殆どが溶出され、コラゲナー

Table 3 Effect of autoclaveing on the inhibition of collagenolytic enzyme from *Bacteroides gingivalis* and trypsin from bovine pancreas by soybean extract

Sample (Protein concentration)	% Inhibition					
	Collagenolytic enzyme			trypsin		
	Applied vol.	untreated	Autoclaved	Applied vol.	untreated	Autoclaved
Crude extract (5.7mg/ml)	20 μ l	69%	72%	$\times$ 3,50 μ l	79%	43%
Peak of 0.3M NaCl eluate of DEAE-cellulose column chromatography (3.8mg/ml)	50 μ l	77%	85%	$\times$ 4,30 μ l	22%	0
Peak II of gel filtration on Sepharose CL-6B (1.7 mg/ml)	50 μ l	64%	55%	50 μ l	0	0

Fig. 5 Cytopathogenicity of SH-dependent collagenolytic enzyme preparation from *Bacteroides gingivalis* 381 (CE) on the cell culture of human gingival fibroblasts (HGF) and the inhibitory effect of unheated-collagenase inhibitor extracted from soybeans (unheated SCI). Confluent cultures of HGF were incubated for 3 days in DME medium without FCS in the presence of the given concentrations of CE and unheated SCI. The concentrations of CE and unheated SCI in the cultures were as follows: a, control culture; b, CE (6 µg/ml); c, CE (15 µg/ml); d, CE (20 µg/ml); a-50, b-50, c-50, d-50, 50 µg/ml of unheated-SCI were added to the cultures of a, b, c, and d, respectively; a-100, b-100, c-100, d-100, 100 µg/ml of unheated-SCI were added to the cultures of a, b, c, and d, respectively.

ゼ阻害物質が大量に含まれる0.3M NaCl の画分はごくわずかの活性を示すのみであった。さらに、ゲル濾過によりコラゲナーゼ阻害活性を含む画分は STI 画分と完全に分離することができた。このことは、分子量的にみても明らかであり、両物質は全く異なる物質であることがわかった。今回、データは示さなかったが、精製した大豆中のコラゲナーゼ阻害物質を、ポリアクリルアミド

ゲルによるディスク電気泳動を行うと、ゲル濾過により推定した分子量と同じく、SDS 処理をしない場合にはその推定分子量は非常に大きく、数十万であった。しかしながら、SDS により処理後に泳動を行うと、推定分子量が約25K~50K dalton の間に五本と約100K dalton のバンドとして分離したが、いずれも STI より大きな分子量を示した。

Fig. 6 Effect of heated soybean collagenase inhibitor (heated SCI) on the cytopathogenicity of human gingival fibroblasts (HGF) caused by SH-dependent collagenolytic enzyme from *Bacteroides gingivalis* 381 (CE). Confluent cultures of HGF were incubated for 3 days in DME medium without FCS in the presence of given concentrations of CE and heated SCI. The concentrations of CE and heated SCI in cultures were as follows: a, control culture; b, CE (6 μ g/ml); c, CE (15 μ g/ml) d, CE (20 μ g/ml); a-50B, b-50B, c-50B, d-50B, 50 μ g/ml of heated SCI were added to the cultures of a, b, c, and d, respectively; a-100B, b-100B, c-100B, d-100B, 100 μ g/ml of heated SCI were added to the cultures of a, b, c, and d, respectively.

著者ら¹⁶⁾は別に大豆粗抽出液を直接 TSK-G4000W カラムを用いて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離したところ、分子量の大きい順に六個の主なピーク(画分)を得たが、コラゲナーゼ阻害活性は分子量の大きな早く溶出される画分ほど強く、最初から四個目までの画分全てに認めた。しかし、STI 活性は最初の三個の画分には全く認めず、四個目と五個目の画分に非常に強い活性を認めた。以上のことから、コラゲナーゼ活性

を阻害する物質は STI よりも分子量が大きく、分子がいくつか会合してより大きなミセルを作ることによりコラゲナーゼ活性を阻害するのではないかと考えられる。

大豆より抽出精製したコラゲナーゼ阻害物質は、単に酵素活性の阻害のみならず、細胞培養系でコラゲナーゼによってヒト歯肉線維芽細胞が傷害されるのを抑制したことは、歯周疾患患者の *B. gingivalis* によって生じる歯周組織の破壊を予防する可能性が示唆された。

今回の細胞レベルでの検討は、本物質は HGF の傷害に対し強い抵抗性を示し、歯周組織、特に歯肉の正常なターンオーバーを保持することを示したものである。このことは大豆ならびにその加工食品が、歯周病に対する保健食品になりうる可能性を示唆するとともに、将来、本物質を歯周病の予防に応用出来る可能性をも示唆したといえる。

結 論

大豆中に、歯周病の病原因子と考えられる *B. gingivalis* のコラゲナーゼの活性を阻害する物質が含まれることを初めて明らかにし、本物質を抽出精製するとともに、細胞レベルでその影響を調べた。

(1) 大豆粉末より抽出精製した、*B. gingivalis* 由来のコラゲナーゼの活性阻害物質はソイビーン・トリプシン・インヒビターとは全く異なる物質である。

(2) ゲル濾過による本物質の推定分子量は約 700 K dalton と大きい値を示した。

(3) ソイビーン・トリプシン・インヒビターとは異なり、加熱に対して非常に安定で、阻害活性はむしろ増強される。

(4) 本物質は *B. gingivalis* のコラゲナーゼの活性を阻害するが、*Cl. histolyticum* のコラゲナーゼや *B. gingivalis* のプロテアーゼ活性には作用しない。

(5) 本物質を加熱処理すると、*B. gingivalis* 由来のコラゲナーゼがヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に示す強い細胞傷害に対し抑制作用を示す。

(6) 本物質は HGF そのものに対し何等為害性を示さない。

以上の結果より、大豆中より抽出した *B. gingivalis* のコラゲナーゼの活性を阻害する物質は、*B. gingivalis* による歯肉の細胞傷害を予防することにより、その病原性を減弱させることが判明した。このことは大豆ならびにその加工食品は歯周病に対する保健食品としての可能性が示唆されるとともに、将来、本物質を歯周病の予防に応用出来る可能性をも示唆したといえる。

本研究の一部は文部省科学研究費、一般研究 B (課題番号 61480419) の補助を受けた。

文 献

- 1) Tanner, A. C. R., Haffer, C., Bratthall, G. T., Visconti, R. A. and Socransky, S. S.: A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man, J. Clin. Perio-

- dont., 6; 278, 1979.
- 2) Slots, J.: Subgingival microflora and periodontal disease, J. Clin. Microbiol., 6; 351, 1979.
- 3) Slots, J.: Importance of black-pigmented Bacteroides in human periodontal disease. In: Host-Parasite Interactions on Periodontal Disease, Genco, R. J. and Mergenhagen, S. E., eds., American Society for Microbiology, Washington DC, 1982, p. 27.
- 4) Grenier, D. and Mayrand, D.: Functional characterization of extracellular vesicles produced by Bacteroides gingivalis, Infect. Immun., 55; 111-117, 1987.
- 5) Otsuka, M., Ichimori, M., Sato, M., Yamamoto, Y. and Nakamura, R.: Extracellular protease from oral anaerobes, J. Dent. Hlth., 33; 190, 1983.
- 6) Toda, K., Otsuka, M., Ishikawa, Y., Sato, M., Yamamoto, Y. and Nakamura, R.: Thiol-dependent collagenolytic activity in culture media of B. gingivalis, J. Periodont. Res., 19; 372, 1984.
- 7) Yoshimura, F., Nishikawa, M., Suzuki, T., Hoover, C.I. and Newbrun, E.: Characterization of a trypsin-like protease from the bacterium Bacteroides gingivalis isolated from human dental plaque, Arch. Oral Biol., 29; 559, 1984.
- 8) Sato, M., Otsuka, M., Maehara, R., Endo, J. and Nakamura, R.: Degradation of human secretory immunoglobulin A by protease isolated from the anaerobic periodontopathogenic bacterium, Bacteroides gingivalis, Arch. Oral Biol., 32; 235, 1987.
- 9) Otsuka, M., Endo, J., Hinode, D., Nagata, A., Maehara, R., Sato, M. and Nakamura, R.: Isolation and characterization of protease from culture supernatant of Bacteroides gingivalis, J. Periodont. Res., 22; 491, 1987.
- 10) Tomobe, Y., Endo, J., Hinode, D., Maehara, R., Nagata, A., Shimada, J., Sato, M. and Nakamura, R.: Purification of thiol-dependent collagenolytic enzyme isolated from culture supernatant of Bacteroides gingivalis, J. Dent. Hlth., 35; 630, 1987.
- 11) 友辺芳明, 前原玲子, 佐藤 誠, 田中敏之, 中村昇二, 江口 徹, 中村正一, 中村 亮: Soybean meal による Bacteroides gingivalis 由来の SH 依存性コラゲナーゼの活性阻害について, 口腔衛生会誌, 35; 636-637, 1985.
- 12) Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. E. C.: Anaerobic Laboratory Manual, 4th edition, Anaerobic Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University,

- Blacksburg, 1977.
- 13) Bowman, D. E.: Differentiation of soybean antitryptic factors, *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, **63** ; 547-550, 1946.
 - 14) Kunitz, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties, *J. Gen. Physiol.*, **30** ; 291-310, 1947.
 - 15) Birk, Y.: Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and α -chymotrypsin from soybeans, *Biochim. Biophys. Acta*, **54** ; 378-381, 1961.
 - 16) 日野出大輔, 前原玲子, 佐藤 誠, 田中敏之, 杉原邦夫, 中村 亮: 大豆中に含まれる *Bacteroides gingivalis* 由来の SH 依存性コラゲナーゼ阻害物質の精製について, *口腔衛生会誌*, **37** ; 534-535, 1987.