重度歯周疾患患者から分離した歯周ポケットにおける 病原酵素産生細菌の分布

井上 純一 福島 久典 尾上 孝利 江 龍 多美子
上 田 雅 俊* 山 岡 昭* 佐 川 寛 典

大阪歯科大学細菌学教室

(主任：佐川寛典教授)

*大阪歯科大学歯周病学講座

(主任：山岡 昭教授)

(平成元年12月21日受付)

Distribution of Enzymatically Pathogenic Bacteria from Periodontal Pocket in Advancing Periodontitis

Jun-ichi INOUE, Hisanori FUKUSHIMA, Takatoshi ONOE, Tamiko ERYU,
Masatoshi UEDA*, Akira YAMAOKA* and Hirosuke SAGAWA

Department of Bacteriology, Osaka Dental University

5-31, Otemae 1-Chome, Chuo-ku, Osaka 540, Japan

(Chief: Prof. Hirosuke SAGAWA)

*Department of Periodontology, Osaka Dental University

(Chief: Prof. Akira YAMAOKA)

Production of 9 enzymatic activities of 527 strains freshly isolated from periodontal pockets in advancing periodontitis were investigated. Of these isolates, two strains showed lecithinase activity on egg yolk agar plate. Collagenase, plasmin and lipase were produced by 28 strains, 26 strains and 22 strains, respectively.

Two lecithinase-producing strains were identified as *Bacteroides intermedius*. Nineteen strains of *B.*

intermedius and 1 strain of *Fusobacterium* species produced lipase on egg yolk agar plate. All of the 28 collagenase-producing strains were *B. gingivalis*. *B. gingivalis* (20 strains) and non black-pigmented *Bacteroides* (6 strains) showed plasmin activity. These results indicate that *Bacteroides* species, mainly *B. gingivalis* and *B. intermedius* may exert an important influence on the exacerbation of the disease.

Key words: Periodontal pocket, Bacteria, Enzymatic activities

要旨: 6名の重度歯周疾患患者の歯周ポケットから分離した527株の細菌を用いて、lecithinase, collagenase, plasmin, lipase, coagulase, β -lactamase, hyaluronidase, chondroitin sulfatase および DNase 活性について検索した結果、以下の成績を得た。

1. Lecithinase 産生株は2株検出され、2株とも、*Bacteroides intermedius* であった。本菌が分離されたポケット内での分布比率は2%であった。

本論文の一部は、第29回秋季歯周病学会総会(1986年11月20日)および第60回日本細菌学会総会(1987年3月28日)において発表した。

2. Collagenase 産生株は、28 株であり、いずれも、*Bacteroides gingivalis* と同定された。本菌は 4 名の患者から分離され、その分布比率は 1.2~14.9% であった。また、plasmin 産生株は 26 株であり、4 名の患者から分離された。そのうち、20 株は *B. gingivalis* で、分布比率は 1.2~13.9% であった。

3. Lipase 産生株は 22 株検出され、19 株が *B. intermedius* であった。

4. 他の酵素を産生する菌株は検出されなかった。

以上の結果から、直接的な病原因子と考えられる lecithinase, collagenase, plasmin, lipase などの酵素産生株の主体は *Bacteroides* であると考えられる。

索引用語：歯周ポケット，細菌，酵素活性

緒 言

歯周ポケット内細菌叢の検索では、*Bacteroides gingivalis* を初めとする black-pigmented *Bacteroides* (BPB) が優勢であり^{1,2)}、それらの細菌が歯周炎の病原菌として注目されている^{3~13)}。

我々は重度および中等度歯周疾患患者の歯周ポケット内細菌叢の検索において偏性嫌気性グラム陰性桿菌ばかりでなく、グラム陽性桿菌もかなり高い比率で分離されることを明らかにしている^{14~16)}。さらに、歯周ポケット内から分離した主要細菌に対し API ZYM を用いて 19 種類の酵素活性の認められる株を検索したところ、歯周病原性に関連深い trypsin, chymotrypsin, N-acetyl- β -glucosaminidase, acid phosphatase および alkaline phosphatase 産生株は主として *Bacteroides* であった。同時に、*Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* などのグラム陽性菌が優勢であった¹⁷⁾。

そこで、本実験では重度歯周疾患患者の歯周ポケットから分離した細菌 (527 株) が、歯周病原性に関連が深いと考えられる lecithinase, collagenase, plasmin, lipase, coagulase, β -lactamase, hyaluronidase, chondroitin sulfatase および DNase などの酵素活性を有するかどうかを検討し、それらの酵素産生株を同定した。

実験材料および方法

1. 被験者および供試菌株

大阪歯科大学附属病院歯周病科に来院した 6 名の重度歯周疾患患者から分離した 527 株を実験に使用した。被験者 A~F の臨床診査結果は既に報告している¹⁷⁾。また、分離細菌の同定方法は、既報告どおりに行った^{14~17)}。

2. 酵素活性の測定法

酵素活性は lecithinase, collagenase, plasmin, lipase, coagulase, β -lactamase, hyaluronidase, chondroitin

sulfatase および DNase の 9 種類について、以下の方法で検討した。

1) Lecithinase 活性

LD-egg yolk agar¹⁸⁾ に供試菌を接種し、7 日間嫌気培養後、周囲に淡黄乳白色の不透明帯 (乳光反応) を生じた集落を lecithinase 産生株とした (Fig. 1-a)。

2) Collagenase 活性

Hemin 5 mg/ml, L-cystine 400 mg/ml および vitamin K₁ 50 μ g/ml 加 trypticase soy broth (TSB, BBL, USA) に供試菌を接種後、嫌気的に 7 日間培養し、コラゲノキット LN-100[®] (コラーゲン技術研修会, 東京) を用いて活性を検討した。

3) Plasmin 活性

供試菌を TSB に接種後、嫌気的に 7 日間培養した。培養菌液をフィブリン・プレート (北里研究所東京) に滴下し、その周囲に透明帯が認められたものを陽性とした。

4) Lipase 活性

LD-egg yolk agar¹⁸⁾ に供試菌を接種後、嫌気的に 7 日間培養後、集落の表面や周辺に真珠様光沢をもつ菌株を lipase 産生株とした (Fig. 1-b)。

5) Coagulase 活性

細菌学実習提要¹⁹⁾に記載されている試験管法で行った。

6) β -Lactamase 活性

供試菌を TSB に接種後、嫌気的に 7 日間培養した菌液に Nitrocefin (BBL, USA) を一滴添加する broth 法で判定した。

7) Hyaluronidase および chondroitin sulfatase 活性

Smith and Willett の方法²⁰⁾によった。

8) DNase 活性

Jefferies の方法²¹⁾を用いた。

Fig. 1

Table 1 Proportional distribution of lecithinase producing bacteria

Enzyme	Patient	Proportional distribution (%)	Bacteria	Number of isolates
Lecithinase	F	2.0	<i>Bacteroides intermedius</i>	2
	A	0		
	B	0		
	C	0		
	D	0		
	E	0		

実験成績

1. Lecithinase 活性

Lecithinase 産生株は F 症例で検出され、その分布比率は 2.0% であり、2 株の産生株はいずれも *B. intermedius* と同定された (Table 1)。

2. Collagenase 活性および plasmin 活性

Collagenase 活性および plasmin 活性の分布比率は、Table 2 に示した。Collagenase 活性を有する菌株は 4 症例から 28 株分離され、すべて *B. gingivalis* であった。分布比率の範囲は 0~14.9% であり、C 症例では全分離菌の 14.9% (20 株) に collagenase 活性が認められた。

Plasmin 産生株は、4 症例から検出され、分布比率の範囲は 0~13.9% で、合計 26 株分離された。そのうち、20 株は *B. gingivalis*、6 株が非黒色色素産生性 *Bacteroides* であった。C 症例では全分離菌の 13.9% (19 株) に

plasmin 産生株が認められ、そのうち、16 株が *B. gingivalis* であった。

Table 3 は、collagenase および plasmin 産生株数と同定結果を比較したものである。*B. gingivalis* のうち両酵素活性を示した菌株は 20 株、collagenase 活性陽性で plasmin 活性陰性の菌株は 8 株であった。また、collagenase 活性陰性で plasmin 活性陽性の菌株は 6 株みられ、いずれも非黒色色素産生性の *Bacteroides* であった。

3. Lipase 活性

Lipase 産生株は、4 症例から 22 株検出され、19 株は *B. intermedius*、1 株は *Fusobacterium* であったが、2 株は今回の同定法では同定できなかった。分布比率の範囲は 0~9.9% で、A の症例で最も多く認められた (Table 4)。

4. Coagulase, β -lactamase, hyaluronidase, chondroitin sulfatase および DNase 活性

Coagulase, β -lactamase, hyaluronidase, chondroitin sulfatase および DNase 産生株は検出されなかった。

Table 2 Proportional distribution of collagenase and plasmin-producing bacteria

Enzyme	Patient	Proportional distribution (%)	Bacteria	Number of isolates
Collagenase	A	<u>3.0</u>	<i>Bacteroides gingivalis</i>	3
	C	<u>14.9</u>	<i>Bacteroides gingivalis</i>	20
	E	<u>1.2</u>	<i>Bacteroides gingivalis</i>	1
	F	<u>4.9</u>	<i>Bacteroides gingivalis</i>	4
	B	<u>0</u>		
	D	<u>0</u>		
Plasmin	A	<u>3.0</u>	<i>Bacteroides gingivalis</i> sp.	1 2
	C	<u>13.9</u>	<i>Bacteroides gingivalis</i> sp.	16 3
	E	<u>1.2</u>	<i>Bacteroides gingivalis</i>	1
	F	<u>3.7</u>	<i>Bacteroides gingivalis</i> sp.	2 1
	B	<u>0</u>		
	D	<u>0</u>		

Table 3 Number of isolates produced collagenase and plasmin

Collagenase	Plasmin	Number of isolates	Bacteria
+	+	20	<i>Bacteroides gingivalis</i>
+	-	8	<i>Bacteroides gingivalis</i>
-	+	6	<i>Bacteroides</i> sp.

考 察

歯周ポケットから分離された主要細菌がどのような酵素活性を有し、その酵素産生株の分布比率を患者間で比較検討することは歯周疾患増悪のメカニズムを解明する上で重要である。

我々は先の実験で歯周ポケット内から分離した 527 株の酵素活性を API ZYM を用いて検索した¹⁷⁾。その結果、歯周組織に為害作用を及ぼすと推定される trypsin 産生株は 28 株、chymotrypsin 産生株は 19 株、N-acetyl-β-

glucosaminidase 産生株は 62 株、acid phosphatase および alkaline phosphatase 産生株はそれぞれ 298 株と 268 株であった。それらの酵素産生株を同定した結果、*B. gingivalis* をはじめとする BPB が優勢であったが、同時に *Actinomyces*, *Peptostreptococcus* および *Streptococcus* などのグラム陽性菌も優勢であり、BPB およびこれらのグラム陽性菌が歯周疾患の増悪に関与している可能性を示唆した。

本実験では歯周ポケット内から分離した菌株 (527 株) を用いて、強い病原性を示すと考えられる lecithinase, collagenase, plasmin, lipase, coagulase, β-lactamase, hyaluronidase, chondroitin sulfatase および DNase 産生性を検討した。

これらの酵素の中で、lecithinase 活性は細胞膜を構成している lecithin を分解し、直接、宿主細胞を破壊する酵素である。歯周ポケット内から、一人の被験者であるが、2% の割合で lecithinase 産生株がみられたことは産生株の認められなかった歯周ポケットと比較した場合、歯周疾患の増悪過程に差がある可能性が考えられる。

Table 4 Proportional distribution of lipase producing bacteria

Enzyme	Patient	Proportional distribution (%)	Bacteria	Number of isolates
Lipase	A	9.9	<i>Bacteroides intermedius</i>	8
		1.0	<i>Fusobacterium</i>	1
		1.0	Not identified	
		2.9	<i>Bacteroides intermedius</i>	4
	E	3.7	<i>Bacteroides intermedius</i>	3
		4.9	<i>Bacteroides intermedius</i>	4
	F	1.2	Not identified	1
	B	0		
	D	0		

LD-egg yolk agar¹⁸⁾ を使用して検索する lecithinase 活性は phospholipase C であり、ガス壊疽の原因菌である *Clostridium perfringens* がこれを産生する²²⁾。口腔内由来細菌では一部の *Propionibacterium acnes* がこの活性を有する²³⁾。*B. gingivalis* や *B. intermedius* では lecithinase の一種である phospholipase A 活性を有する株が報告されている²⁴⁾。本実験では *B. intermedius* 2 菌株に phospholipase C 活性がみられたが、*B. gingivalis* にはこの活性はみられなかった。

Collagenase 産生株は 4 症例から 28 株分離され、全てが *B. gingivalis* であった (Table 3)。Plasmin 産生株は 26 株であり、そのうち 20 株が *B. gingivalis* で、6 株が非黒色素産生性の *Bacteroides* であった (Table 3)。Grenier *et al.*²⁵⁾ は *B. gingivalis* の collagenase 活性は菌株間で強さが異なることを報告しており、本実験での plasmin 活性のように、*B. gingivalis* の病原性の強さは、菌株間でかなりの相違があると考えられる。

Lipase 産生株は 22 株であり、そのうち 20 株が *B. intermedius* であった¹⁷⁾。API ZYM を用いた結果では、lipase 産生株は、*Actinomyces* が優勢であった。本実験では、*B. intermedius* がほとんどであり、これは lipase が作用する基質が異なるためであると考えられる。また、当教室が保存している *B. intermedius* 37 株はすべて LD-egg yolk agar 上における lipase 活性が陽性であったことから、lipase 活性が *B. intermedius* の同定法に利用出来ると考えられる。

本実験の結果から、lecithinase 活性と lipase 活性を有する菌株は *B. intermedius*、collagenase および plasmin 産生株は *B. gingivalis* がそれぞれ優勢であった。

このように歯周病原細菌と考えられている *B. gingivalis* と *B. intermedius* が本実験での酵素活性の面からも主役を演じていることが明らかになったが、前述したように、*B. gingivalis* と *B. intermedius* の酵素活性は菌株間で異なる。また、これらの細菌の分布比率は被験者間で大きく相違している。

このようなことを考え併せると、重度歯周疾患の病因を明らかにするためには、長期に亘って、臨床経過とポケット内細菌の変動について検討する必要がある。

結 論

6 名の重度歯周疾患患者の歯周ポケットから分離した 527 株の細菌を用いて、lecithinase, collagenase, plasmin, lipase, coagulase, β -lactamase, hyaluronidase, chondroitin sulfatase および DNase 活性について検索した結果、以下の成績を得た。

1. Lecithinase 産生株は 2 株検出され、2 株とも、*B. intermedius* であった。本菌が分離されたポケット内での分布比率は 2.0% であった。
2. Collagenase 産生株は、28 株であり、いずれも、*B. gingivalis* であった。本菌は 4 名の患者から分離され、その分布比率は 1.2~14.9% であった。また、plasmin 産生株は 26 株であり、4 名の患者から分離された。そのうち、20 株は *B. gingivalis* であった。分布比率は 1.2~13.9% であった。
3. Lipase 産生株は 22 株検出され、19 株が *B. intermedius* であった。
4. 他の酵素を産生する菌株は検出されなかった。

以上の結果から、直接的な病原因子と考えられる lecithinase, collagenase, plasmin, lipase などの酵素産生株の主体は *Bacteroides* であると考えられる。

文 献

- 1) Slots, J. : Subgingival microflora and periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 6 : 351-382, 1965.
- 2) Spiegel, C.A., Hayduk, S.E., Minah, G.E. and Krywolap, G.N. : Black-pigmented *Bacteroides* from clinically characterized periodontal sites. J. Periodont. Res., 14 : 376-382, 1979.
- 3) Crawford, A., Socransky, S.S. and Bratthall, G. : Predominant cultivable microbiota of advanced periodontitis. J. Dent. Res., 54 : Special issue A, 97, 1975.
- 4) Slots, J. : The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. Scand. J. Dent. Res., 85 : 114-121, 1977.
- 5) 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. Periodontol., 6 : 278-307, 1979.
- 6) Slots, J. : Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM system. J. Clin. Microbiol., 14 : 288-294, 1981.
- 7) 山本綾子 : 口腔内 *Bacteroides melaninogenicus* の collagenase 活性に関する研究. 歯科学報, 73 : 1166-1171, 1973.
- 8) Nitzan, D., Sperry, J.F. and Wilkins, T.D. : Fibrinolytic activity of oral anaerobic bacteria. Arch. Oral Biol., 23 : 465-470, 1978.
- 9) Fujimura, S. and Nakamura, T. : Isolation and characterization of a protease from *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun., 55 : 716-720, 1987.
- 10) 内田武志, 岡本 莫 : 歯周病における細菌内毒素の役割. 広大歯誌, 9 : 1-11, 1977.
- 11) Ingham, H.R., Sisson, P.R., Tharaggonnet, D., Selkon, J.B. and Codd, A.A. : Inhibition of phagocytosis *in vitro* by obligate anaerobes. Lancet II (8051) : 1252-1254, 1977.
- 12) Okuda, K., Slots, J. and Genco, R.J. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides asaccharolyticus* and *Bacteroides melaninogenicus* subspecies : Cell surface morphology and adherence to erythrocytes and human buccal epithelial cells. Curr. Microbiol., 6 : 7-12, 1981.
- 13) 井下英二, 天野敦雄, 玉川裕夫, 埴岡 隆, 零石 聡, 常光 旭 : *Bacteroides gingivalis* 381 株の菌体外赤血球凝集素の部分精製とその性状. 日歯周誌, 27 : 807-815, 1985.
- 14) 本城範典 : 歯周初期治療における Advancing periodontitis 患者の歯周ポケット内細菌叢の変化. 歯科医学, 47 : 603-620, 1984.
- 15) 井上純一, 本城範典, 山岡 昭, 前田陽規, 岩本吉則, 福島久典, 佐川寛典 : Advancing periodontitis 患者の外科処置後における歯周ポケット内細菌の検索. 日歯周誌, 27 : 400-406, 1985.
- 16) 井上純一 : 歯周初期治療による Moderate periodontitis 患者の歯周ポケット内細菌叢の変動. 日歯周誌, 28 : 484-499, 1986.
- 17) 井上純一, 福島久典, 豊嶋ゆかり, 笹木 充, 山本宏治, 上田雅俊, 山岡 昭, 佐川寛典 : 重度の歯周疾患患者から分離した歯周ポケット内細菌の酵素活性について. 日歯周誌, 30 : 515-525, 1988.
- 18) Dowell, V.D. and George L.L. : Pathogenic members of the Genus *Bacteroides*, Starr, M.P. ed., The Prokaryotes Volume II, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981, 1438.
- 19) 医科学研究所学友会編 : 細菌学実習提要, 第5版, 丸善株式会社, 東京, 1977, 157.
- 20) Smith, R.S. and Willett, N.P. : Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. Appl. Microbiol., 16 : 1434-1436, 1968.
- 21) Jefferies, C.D., Holtman, D.F. and Guse, D.G. : Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid. J. Bacteriol., 73 : 590, 1957.
- 22) 村田良介, 鈴木友二, 逢坂 昭, 田宮信雄, 大橋 誠, 船津 勝 : タンパク毒素 (上), 256-325, 講談社, 東京, 1972.
- 23) 中村 武, 藤村節夫 : *Propionibacterium acnes* の歯周組織破壊酵素. 日本歯科評論, 503 : 137-145, 1984.
- 24) Slots, J. and Genco, R.J. : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. J. Dent. Res., 63 : 412-421, 1984.
- 25) Grenier, D. and Mayrand, D. : Selected characteristics of pathogenic and non-pathogenic

strains of *Bacteroides gingivalis*. J. Clin. Micro-
biol., 25 : 738-740, 1987.

連絡先 :

大阪歯科大学細菌学教室

〒 540 大阪市中央区大手前 1-5-31