

氏名	森 田 学
学 位(専攻分野の名称)	博 士 (歯 学)
学 位 授 与 番 号	博 乙 第 2331 号
学位授与の日付	平成 3 年 9 月 30 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第 4 条第 2 項該当)
学 位 論 文 題 目	歯肉縁上歯石に関連するペプチダーゼ産出菌の同定について
論 文 審 査 委 員	教授 渡邊達夫 教授 加藤慶二郎 教授 村山洋二

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒 言】

唾液中の蛋白分解酵素と歯石指数との間に正の相関が認められることが報告されて以来、歯垢の石灰化過程において唾液中の蛋白分解酵素が関与している可能性が示唆されている。唾液中的のある種の蛋白あるいはペプチド（プロリン含有蛋白，スタセリン等）は、過飽和の状態にある唾液中のカルシウムを安定化しており、それらの蛋白が唾液中の蛋白分解酵素により破壊されると、カルシウムの析出が生じることが考えられる。しかし、歯石は歯垢の石灰化により生じることから、唾液中よりもむしろ歯垢中の蛋白分解酵素が歯石形成と関係していると考えるのが妥当である。歯石形成の関与する蛋白分解酵素は口腔細菌由来である可能性が示唆されており、また申請者らは歯石保有者群の歯垢中の蛋白分解酵素の比活性は、非保有者群の歯垢中の比活性よりも有意に高いことを明らかにしている。

本研究では、歯石の存在に関係し、かつ蛋白分解能を有する細菌を歯肉縁上歯垢より分離、同定することを目的とした。

【材料および方法】

1. 歯垢の採取

岡山大学歯学部附属病院外来初診患者を対象に、下顎中切歯舌側に歯肉縁上歯石を認める者と認めない者との分類し、それぞれ歯石保有者群、非保有者群とした。同部位の歯肉縁上歯垢を採取し、0.05%チオグリコレート含有滅菌生理食塩水中に浮遊させた。なお、非保有者は過去3ヶ月間歯石除去を受けていないことを確認した。

2. 培 地

試料をホモジナイズし希釈した後、非選択培地（ヘミン、ビタミンK添加血液寒天培地）と各種選択培地（MS培地、MSB培地、SL培地、VM培地、FM培地及びバクテロイデス

の選択培地)に播種した。37℃, 7日間嫌氣的に培養し, 総生菌数に対する各種選択培地のコロニーの比率を算出した。

3. 菌の同定

同定は, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, VPI Anaerobic Manual, DNA 相同性によって行った。

4. 酵素活性の測定

基質として benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide を用い, 0.15mole/l のバルビタール緩衝液 (pH 8.5) 中で試料とともに37℃でインキュベートした。1時間後, 50%酢酸を加え反応を停止させ, 遊離した p-nitroaniline の吸光度 (410nm) を測定した。

5. 蛋白量の測定

蛍光法により求め, 標準蛋白として牛血清アルブミンを用いた。

【結 果】

1. 歯垢中のペプチダーゼの活性

性, 年齢の分布に差のない歯石保有者群 (60名) 及び非保有者群 (60名) の歯垢中に含まれるペプチダーゼの比活性は, 保有者群と非保有者群よりも有意に高く, 今回使用した基質を分解する酵素が歯石の存在と関係していることが示された。

2. ペプチダーゼ産生菌の同定

1) 性差, 年齢差のない保有者群 (32名), 非保有者群 (32名) それぞれについて各種選択培地に生育したコロニー数の百分率を調べた。その結果, バクテロイデスの選択培地に生育したコロニーの総生菌数に対する割合は, 歯石保有者群では11.1%で, 非保有者群の4.5%に比べて有意に高く, その他の選択培地において有意差は認められなかった。この結果より, 以下の実験ではバクテロイデスの選択培地を用いた。

2) バクテロイデスの選択培地上で, 保有者群, 非保有者群それぞれ60名についてコロニーを形態的に分類した。その結果, wet spreading colony, black pigmented colony の出現率が歯石保有者群においてそれぞれ78%, 72%で, 非保有者群における43%, 23%と比べて有意に高い値を示した。また, 総生菌数に占めるコロニーの比率はいずれも保有者群のほうが非保有者と比較して有意に高かった。Wet spreading colony は black pigmented colony に比べて数十倍強いペプチダーゼ活性を示し, 各種生化学的性状の結果より Capnocytophaga と同定された。保有者群10名, 非保有者群10名から一人あたり10株ずつを分離し, DNA-DNA ハイブリダイゼーション法により Capnocytophaga を同定した結果, C. gingivalis の出現率は保有者群で30%, 非保有者群で7%と両群間に有意な差が認められた。また, C. gingivalis は C. ochracea, C. sputigena よりも強いペプチダーゼ活性を有していた。

【考察および結論】

今回の結果より, 歯垢中のペプチダーゼが歯肉縁上歯石の存在と関係していることが確認された。Capnocytophaga は歯石保有者群の歯垢中に有意に高い出現率で現れ, 特に C.

gingivalis の出現率は保有者群のほうが有意に高く、かつ C. ochracea, C. sputigena よりも強いペプチダーゼ活性を有することが明らかになった。現在、C. gingivalis が in vitro においてリン酸カルシウムの結晶化を促進することを確認しており、C. gingivalis のペプチダーゼが歯石形成に関連している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯肉縁上歯垢の石灰化促進の要因の一つと考えられている歯垢のペプチダーゼに注目し、症例—対照研究として、歯肉縁上歯石保有者群と非保有者群の2群に分けてペプチダーゼ産生菌の頻度と分布を調査した。その結果、歯石保有者群の歯肉縁上歯垢に含まれるペプチダーゼの比活性が非保有者群に比べて有意に高いことを確認した。また、歯石保有者群の縁上歯垢における Capnocytophaga の出現率と総生菌数に占める割合は、非保有者群に比べて有意に高いことを明らかにした。さらに C. gingivalis の出現率は、歯石保有者群の歯垢のほうが非保有者群に比べて有意に高く、また C. gingivalis は、C. ochracea, C. sputigena よりも強いペプチダーゼ活性を有することを明らかにした。

これらの知見は、C. gingivalis のペプチダーゼが歯肉縁上歯垢の石灰化促進に関与するという、分析疫学的手法による仮説を示唆するものであり、価値ある業績であると認める。