

〔原著〕 松本歯学 14 : 58~65, 1988

key words: *B. oralis* — ヒアルロニダーゼ — 精製

Bacteroides oralis のヒアルロニダーゼの精製とその性状

柴田幸永, 志村隆二, 藤村節夫, 中村 武

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

Purification and Characterization of Hyaluronidase from *Bacteroides oralis*

YUKINAGA SHIBATA, RYUJI SHIMURA,

SETSUO FUJIMURA and TAKESHI NAKAMURA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College

(Chief : Prof. T. Nakamura)

Summary

From a culture supernatant of *B. oralis* ATCC 33269, hyaluronidase was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose column chromatography, gel filtration on Sephacryl S-300, and hydroxylapatite column chromatography. Specific activity increased 12,000 fold and recovery was 5.8 %

The molecular weight was determined to be 75,000 by gel filtration, and the isoelectric point was 7.6. The optimum pH for the activity was 5.5. The purified hyaluronidase degraded hyaluronic acid, but it had no activity against chondroitin, chondroitin sulfate A, B, C, heparin and heparan sulfate. From degradation products of hyaluronic acid, unsaturated tetrasaccharides and disaccharides were detected by paper chromatography.

結 言

歯周疾患の病型によって病巣からの検出菌種が異なり、各歯周病に対するそれぞれ主要病原菌種が指摘されている。最も罹患率の高い成人歯周炎患者の病巣局所からは嫌気性グラム陰性桿菌群が圧倒的に多く検出され、これら嫌気性菌群は本症の主要病原菌種とみなされている^{1,2)}。とくに、*Bacteroides gingivalis* をはじめとする黒色色素産生 *Bacteroides* の病原性に多くの注目が寄せら

れ、その定着因子や歯周組織破壊に関連する各産生酵素、内毒素活性などについて検討が加えられ^{3,4)}、本菌群の病原的屬性が極めて多様であることが明らかにされている⁵⁾。しかし、病巣局所から黒色色素産生 *Bacteroides* とともにしばしば高率に検出される菌種に非黒色 *Bacteroides* がある^{6,7)}。これまで、口腔内非黒色 *Bacteroides* の分類学的不明確さから、しばしば病巣より検出される非黒色 *Bacteroides* 群の多くは、同定不能として扱われていた。近年、歯周病原菌として嫌気性グラム陰性桿菌種が注目されるようになり、非黒色

Bacteroides の分類学的検討とともに新しい菌種が提示されつつある⁸⁾。しかし、これら非黒色 *Bacteroides* の病原的屬性については不明な点が多い。われわれは、口腔の非黒色 *Bacteroides* 種の酸性ムコ多糖体分解活性について検討を加え、近年、新しい菌種として採録された *B. heparinolyticus*⁹⁾ とともに *B. oralis* に強いヒアルロニダーゼ活性を認めた。本研究は、*B. oralis* のヒアルロニダーゼを精製して、その性状について検討したものである。

材料と方法

1. 供試菌株と培養

B. oralis ATCC33269を供試して、メナジオン (0.5 mg/ℓ) およびヘミン (5 mg/ℓ) 加 GAM broth (日本製薬) で Anaerobic glove box (N₂: 85, H₂: 10, CO₂: 15) にて嫌気培養した。これを遠心 (15,000G, 4°C 15分間) して、菌体と培養上清を得た。

2. 培養試料の調整

培養菌体は50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) で2回洗浄後、同緩衝液に懸濁して超音波処理 (9 KHz, 15分間) した。この試料を超遠心 (100,000 G, 4°C 30分間) して上清を分離しこれを菌体からの抽出試料とした。この菌体からの抽出試料および培養上清試料について、それぞれヒアルロニダーゼ活性を測定した。

3. 酵素活性の測定法

ヒアルロニダーゼ活性の測定は、Linkerの方法¹⁰⁾に準じて基質ヒアルロン酸 (Sigma) 分解によって生ずる不飽和糖を232 nm 吸光度の増加を測定することによって行った。すなわち、ヒアルロン酸 (2 mg/ml) 0.2 ml, 1.0 M 酢酸緩衝液 (pH5.5) 0.1 ml, 酵素試料および精製水各0.1 ml を加え、全量0.5 ml の反応系で行った。反応混液を37°C 30分間インキュベート後、3%過塩素酸液2.5 ml 加え反応を停止させ、10分間静置した。これを遠心してその上清について、232 nm 吸光度を測定した。なお、活性単位は、上記の反応系で試料1 ml 当り吸光度0.1上昇させる活性を1単位 (U) とした。

4. 培養日数と酵素活性

供試菌株を上記 GAM broth で1~4日間、嫌

気培養して経日的に培養上清についてヒアルロニダーゼ活性を測定した。

5. 酵素の精製

前記 GAM broth (2ℓ) で3日間嫌気培養して得た、培養上清を酵素精製の出発試料とした。この上清試料に70%飽和になるように硫酸を加え、4°C にて2時間静置後、遠心して沈渣を得た。この沈渣を50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) に溶解し、同緩衝液に24時間透析した。透析試料を同緩衝液で平衡化した DE-32 (Whatman) カラム (2.6×20 cm) に添加し、この非吸着画分を集めた。これを濃縮後、0.15 M NaCl を含む上記緩衝液に対して透析し、同緩衝液で平衡化した Sephacryl S-300 (Pharmacia) カラム (2.4×90 cm) によるゲル濾過を行った。活性画分を集め、この試料を10 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で透析後、同緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイト (Clarkson Chemical Company) カラム (1.6×15 cm) に添加した。このカラムを約70 ml の同緩衝液で洗浄後、20 mM および60 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) にてステップワイズで溶出した。

6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

ヒドロキシアパタイトカラムで溶出した活性画分の濃縮試料に、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) およびメルカプトエタノールをそれぞれ1%になるように加え100°C 1分間処理した。この試料を Laemmli の方法¹¹⁾ に準じて、10%のアクリルアミドゲルを用いて、SDS・PAGE を行った。また分子量マーカー (Pharmacia) を用いて同様に泳動した。なお、泳動ゲルはコマシーブルーによって染色した。

7. 酵素の性状

1) 分子量

精製試料および標準標品として、キモトリプシノーゲン A, オブアルブミン, ウシ血清アルブミン, アルドラーゼ, フェリチン (Pharmacia) を用いて、Sephacryl S-300カラムによるゲル濾過法および SDS・PAGE によって算定した。

2) 等電点

等電点は Vesterberg の方法¹²⁾ に準じてカラム (LKB 110 ml) 等電点電気泳動法によって測定した。すなわち、精製試料を1%グリシン液に透析後、1%アンホライト pH3.5~10 (LKB) を用い定電圧 (400 V) で30時間泳動した。各画分 (3

ml /tube)について、それぞれ280 nm 吸光度, pH および酵素活性を測定した。

3) 至適 pH

1.0 M 緩衝液 (pH4.0~5.5は酢酸緩衝液, pH5.5~7.5はトリスマレイト緩衝液, pH7.5~9.0はトリス塩酸緩衝液)各0.1 ml, ヒアルロン酸 (2 mg/ml) 0.2 ml, 精製試料および精製水を加え全量0.5 ml とした反応系で酵素活性を測定して判定した。

4) 金属イオンの影響

CaCl₂, MgCl₂, FeSO₄, CoCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, HgCl₂を供試し, 反応系にそれぞれ1.0 mM になるように添加して, 酵素活性を測定した。

5) 基質特異性

酸性ムコ多糖体基質としてヒアルロン酸, コンドロイチン, コンドロイチン硫酸 A, B, C, ヘパリン, ヘパラン硫酸 (各 Sigma) を用い, 精製試料と作用させそれぞれ232 nm 吸光度の増加を経時的に測定して判定した。

8. 酵素によるヒアルロン酸分解物の検索

本菌酵素のヒアルロン酸分解物はペーパークロマトグラフィーによって調べた。ヒアルロン酸 (2 mg/ml) 1.2 ml, 1.0 M 酢酸緩衝液 (pH5.5) 0.3 ml, 精製酵素試料0.5 ml, 精製水1.0 ml の全量 3 ml の反応混液とし, 37°C 24時間作用さ

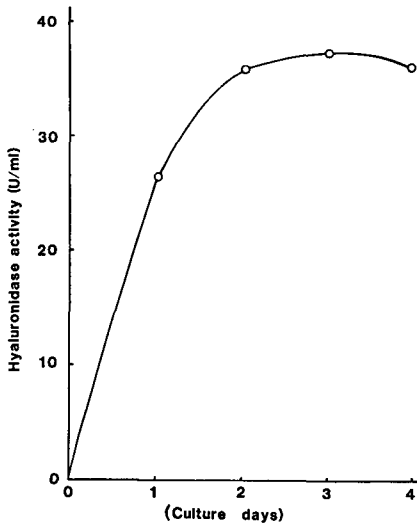


Fig. 1: Time course of production of extracellular hyaluronidase by *B. oralis*

せた後, これを減圧下で濃縮した。濃縮試料は10 mM 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 (Pharmacia) カラム (1.6×90 cm) を用いゲル濾過法によって脱塩した。また, このゲル濾過画分 (3 ml /tube) の232 nm 吸光度を測定した。この吸光度ピーク画分の濃縮試料を東洋口紙 No. 50A にスポットして, n-ブタノール:酢酸:水 (10:3:7 v/v) を溶媒とした下降法により展開した。糖の検出は, アルカリ性硝酸銀試薬¹³⁾による呈色によって行った。なお標準オリゴ糖として, ヒアルロン酸由来の不飽和二糖 (生化学工業) および分解産物が明確となっている市販の *Streptomyces hyalurolyticus* 由来のヒアルロニダーゼ (生化学工業) を用いて上記の精製酵素の分解産物に準じて得た不飽和二糖および四糖をも供試した。

結 果

1. 培養試料のヒアルロニダーゼ活性

培養遠心上清, 超音波処理によって菌体からの抽出試料のいずれにもヒアルロニダーゼ活性が認められた。しかし, 培養遠心上清試料は菌体からの抽出試料に対して約150倍の活性を示した。

2. 培養日数による酵素活性

培養 2 日目まで上清中に直線的に酵素活性が増加し, 3 日間培養で最大活性が認められた (Fig. 1)。

3. 酵素の精製

培養上清の70%硫酸飽和画分にヒアルロニダーゼ活性の殆んどが回収された。この試料を DE-32 カラムに添加したが, 活性は本カラムに吸着せず非吸着画分に活性が認められた。非吸着画分の Sephacryl S-300 によるゲル濾過の溶出パターン

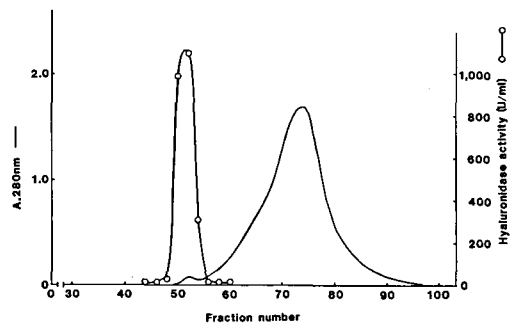


Fig. 2: Gel filtration on Sephacryl S-300 of hyaluronidase

は Fig. 2 に示した、活性は溶出画分 No. 76 を中心とした大きな蛋白質ピークの前に溶出するわずかな 280 nm 吸収と一致して認められた。この活性画分をハイドロキシアパタイトに添加すると、ヒアルロニダーゼ活性は非吸着画分および 20 mM リン酸緩衝液の溶出画分には全く認められず、60 mM リン酸緩衝液で溶出した (Fig. 3)。

ハイドロキシアパタイトカラムで溶出した活性画分の濃縮試料の SDS・PAGE 所見は Fig. 4 に示した。単一バンドが認められ、また、このバンドは分子量マーカー 70,000~80,000 の間の位置であった。この成績から *B. oralis* ヒアルロニダーゼは高純度に精製できたものとみられる。

各精製段階における成績は Table 1 に要約した。培養上清に対して最終精製のハイドロキシアパタイトカラムによって、比活性は約 12,000 倍に上昇し、回収率が 5.8% であった。

4. 酵素の性状

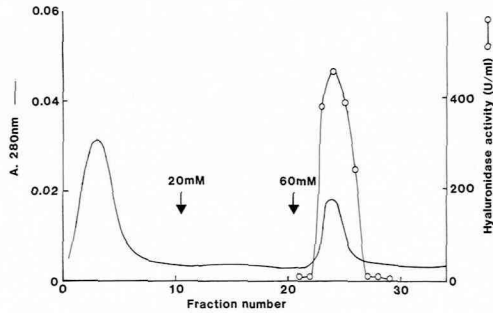


Fig. 3: Hydroxylapatite chromatography of hyaluronidase

1) 分子量

Sephacryl S-300によるゲル濾過法および SDS・PAGEによって、ヒアルロニダーゼの分子量は約75,000と算定された (Fig. 5)。

2) 等電点

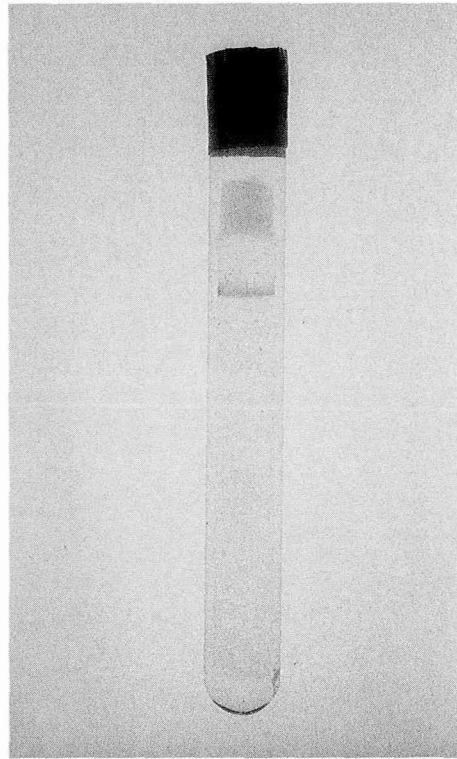


Fig. 4: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified hyaluronidase

Table 1: Purification of *B. oralis* hyaluronidase

Steps	Protein (mg)	Activity (U)	Sp.act (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	37120	74400	2	1	100
Ammonium sulfate (0-70% saturation)	1377	47719	35	17.5	64
DE-32	211	40314	191	95.5	54
Sephacryl S-300	1.16	25430	21922	10961	34
Hydroxylapatite	0.18	4280	23778	11889	5.8

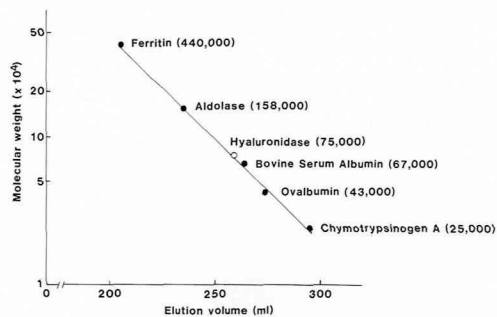


Fig. 5: Estimation of molecular weight of hyaluronidase: Hyaluronidase and 2mg of each standard protein were chromatographed on Sephacryl S-300. The elution volume was determined by absorbance at 280 nm.

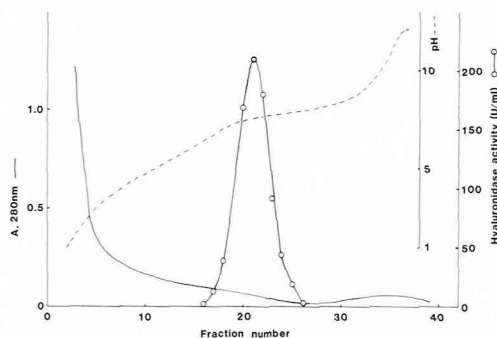


Fig. 6: Isoelectric focusing of hyaluronidase

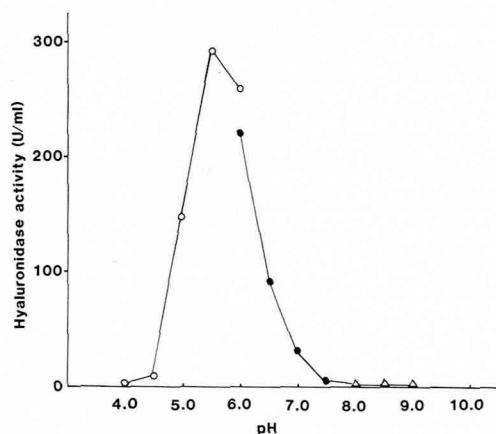


Fig. 7: Effect of pH on hyaluronidase activity
 ○—○ Acetate buffer
 ●—● Phosphate buffer
 △—△ Tris-HCl buffer

等電点電気泳動法の成績は Fig. 6 に示した。ヒアルロニダーゼ活性は、pH7.6で最大活性を示し、本酵素の等電点は7.6と推定された。

3) 至適 pH

pH5.5で最大活性を示し、pH7.0以上のアルカリ側においては殆んど活性を示さなかった。(Fig. 7). この成績から酵素の作用至適 pH は5.5付近であるとみられる。

4) 金属イオンの影響

ヒアルロニダーゼ活性は Hg^{2+} Cu^{2+} イオンで強く阻害された。しかし、 Ca^{2+} Fe^{2+} Mn^{2+} Zn^{2+} イオンによって殆んど活性に影響はみとめられなかった (Table 2)。

5) 基質特異性

精製酵素は基質ヒアルロン酸に対してのみ、232 nm 吸光度の増加を示し、その他の供試酸性ムコ多糖体からは全く232 nm 吸光度の増加がみられなかった (Fig. 8)。

5. 分解産物の同定

1) Sephadex G-25カラムクロマトグラフィー

市販の *Streptomyces hyalurolyticus* 由来の酵素反応液(A)および *B. oralis* からの精製酵素との反応液(B)のそれぞれの Sephadex G-25カラムクロマトグラフィーによる溶出パターンは Fig. 9 に示した。市販ヒアルロニダーゼの反応液より2つのピーク (I, II) が認められた。本酵素の分解産物が明示されている事実にもとづいて、この232 nm 溶出画分をそれぞれ、不飽和六糖、四糖と同定

Table 2: Effect of divalent ions on hyaluronidase activity

Ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
Ca^{2+}	1.0	116
Mg^{2+}	1.0	52
Fe^{2+}	1.0	97
Co^{2+}	1.0	112
Mn^{2+}	1.0	113
Zn^{2+}	1.0	106
Hg^{2+}	1.0	14
Cu^{2+}	1.0	3
EDTA	1.0	159

した。一方、精製酵素の反応液(B)より市販酵素によるピーク(II)と同じ溶出位置、これより遅れてより大きな232 nm 吸収ピーク(III)が認められた。

2) ペーパークロマトグラフィー

ヒアルロン酸由来不飽和二糖、市販酵素を作用させて(反応液(A))得た不飽和六糖および四糖、および精製酵素を作用させて(反応液(B))得たピーク(II)(III)のそれぞれ試料について口紙クロマトグラフィーの所見はFig.10に示した。*B. oralis*の精製酵素による先のピーク(II)(III)は、それぞれ、各不飽和二糖および不飽和四糖のRf値と

一致した。これらの成績から *B. oralis* のヒアルロニダーゼによる基質分解産物は不飽和四糖および不飽和二糖と同定した。

考 察

歯周病原菌として注目される嫌気性グラム陰性桿菌群中非黒色 *Bacteroides* の病原的屬性など不明な点も多い。われわれは、歯周病巣からしばしば高率に分離される非黒色 *Bacteroides* 中、*B. heparinolyticus*^{14,15)}が種々の酸性ムコ多糖体分解

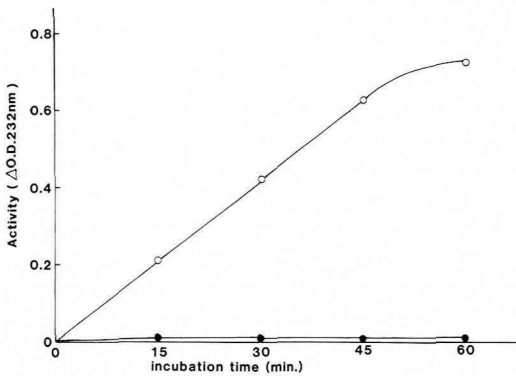


Fig. 8: Time course of degradation of various mucopolysaccharides by hyaluronidase :
 ○—○ hyaluronic acid
 ●—● heparin, heparan sulfate, chondroitin, chondroitin sulfate A, B, C

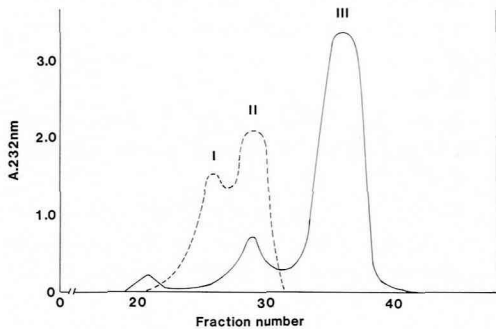


Fig. 9: Gel filtration of digestive products of hyaluronic acid on Sephadex G-25 :
 — *B. oralis* hyaluronidase
 *Streptomyces hyalurolyticus* hyaluronidase

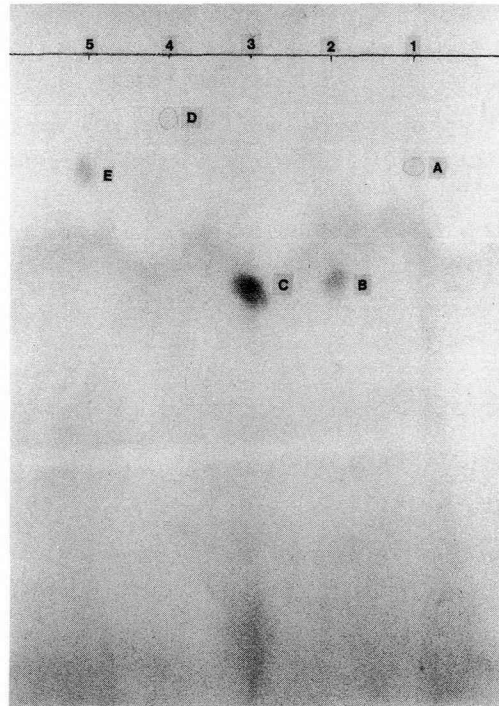


Fig. 10: Paper chromatograms of degradation products in hyaluronic acid by *B. oralis* hyaluronidase and *Streptomyces hyalurolyticus* hyaluronidase :
 1. A. *B. oralis* hyaluronidase : peak II of Sephadex G-25
 2. B. *B. oralis* hyaluronidase : peak III of Sephadex G-25
 3. C. unsaturated disaccharide
 4. D. unsaturated hexasaccharide, *Streptomyces hyalurolyticus* hyaluronidase : peak I of Sephadex G-25
 5. E. unsaturated tetrasaccharide, *Streptomyces hyalurolyticus* hyaluronidase : peak II of Sephadex G-25

能を有し、これら分解酵素を精製して、本菌のヘパリナーゼおよびヒアルロニダーゼの性状を明らかにしている^{16,17)}。本研究で *B. heparinolyticus* を除くその他の非黒色 *Bacteroides* のヒアルロニダーゼ活性を調べ、*B. oralis* の培養上清中に強い活性を認めたので、*B. oralis* のヒアルロニダーゼを精製して、その性状について明らかにした。

B. oralis のヒアルロニダーゼ活性は菌体から超音波処理して得た抽出試料に比較して培養上清中に強く認められることから、本菌のヒアルロニダーゼは、*B. heparinolyticus* ヒアルロニダーゼ¹⁷⁾とは異なり、菌体外産生性であることを示す。

本酵素の分子量は、ゲル濾過法および SDS・PAGE 所見のいずれによっても 75,000 と算定され、*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equir-milis*, *Propionibacterium acnes*, *B. heparinolyticus* など多くの細菌ヒアルロニダーゼの分子量が 84,000~90,000 程度であるとされている¹⁷⁻²⁰⁾ に比較すると、やや小さく、また SDS・PAGE 所見などから考え、この酵素は単純ポリペプチド鎖と推定される。等電点電気泳動法によって本酵素の等電点 (pI) は 7.6 で、*P. acnes*²¹⁾ や *B. heparinolyticus*¹⁶⁾ のそれに比較し、やや高い値を示したが近似するものであった。

B. heparinolyticus や *P. acnes* など、多くのヒアルロニダーゼは複数の酸性ムコ多糖体分解能を有する。これら細菌酵素と異なり、*B. oralis* ヒアルロニダーゼは酸性ムコ多糖体中、ヒアルロン酸のみ分解するに過ぎず、硫酸基を持つコンドロイチン硫酸 A, B, C, ヘパリン, ヘパラン硫酸のみならず、硫酸基を欠除するコンドロイチンに対して全く分解作用がみられず、極めて基質特異性の高い酵素とみられる。

多くの細菌ヒアルロニダーゼ (*Streptomyces hyalurolyticus* を除く) が二糖を最終分解産物とすることが示されている²²⁾。 *B. oralis* ヒアルロニダーゼによる分解産物のペーパークロマトグラフィによる検討から、不飽和四糖および不飽和二糖が検出、確認された。しかし、二糖に比較して四糖の検出が極めてわずかであることから、この四糖の検出は、本反応系で酵素量に対する基質濃度の過剰が考えられ、最終的には多くの細菌酵素と同様その分解産物が不飽和二糖であると考えられる。

歯周組織破壊に直接関与する因子の一つに、種々の細菌酵素があげられる^{3,4)}。竹内らは²³⁾、蛍光抗体法によってヒトの炎症歯肉における細菌性ヒアルロニダーゼやコンドロイチナーゼの局在を調べ、両酵素が歯周組織破壊に直接関与する病原因子と述べている。事実、ヒアルロニダーゼを動物の歯周に滴下しても、炎症変化がみられることが示されている^{24,25)}。これらの知見から *B. oralis* のヒアルロニダーゼが菌体外産生性であり、歯肉内縁上皮の破壊や炎症の初発に直接作用する可能性を示唆する。本菌の精製ヒアルロニダーゼを用いて、今後、歯周組織破壊や感染における役割を明らかにしたい。

文 献

- 1) Takazoe, I. and Nakamura, T. (1971) Experimental mixed infection by human gingival crevice material. Bull. Tokyo Dent. Coll. 12: 85-93
- 2) Slots, J. (1981) Importance of black-pigmented bacteroides in human periodontal disease. Host-parasite interactions in Periodontal diseases. 27-45. American Society for Microbiology, Washington.
- 3) Fujimura, S. and Nakamura, T. (1987) Isolation and characterization of a protease from *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun. 55: 716-720
- 4) Toda, K., Otsuka, M., Ishikawa, Y., Sato, M., Yamamoto, Y. and Nakamura, R. (1984) Thiol-dependent collagenolytic activity in culture media of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodontal Res. 19: 373-381
- 5) 奥田克爾 (1982) *Bacteroides gingivalis* の性状と歯周疾患誘発能。浜田茂幸編、う蝕と歯周病一研究の進歩 第1巻 151-183。日本歯科評論社、東京。
- 6) 矢ヶ崎 崇, 千野武広, 中村 武 (1985) 口腔内 *Bacteroides* sp. の β -lactamase 活性, 嫌気性菌感染症研究, 15: 74-80.
- 7) Nakamura, T., Suginaka, Y. and Takazoe, I. (1976) Heparinase activity in lesions of periodontal disease. Bull. Tokyo Dent. Coll. 17: 147-155.
- 8) Krieg, N. R. and Holt, J. G. (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology. 1: 604-631 Williams and Wilkins, Baltimore/London.
- 9) Okuda, K., Kato, T., Shiozu, J., Takazoe, I. and Nakamura, T. (1985) *Bacteroides heparinolyticus* sp. nov. isolated from humans with

能を有し、これら分解酵素を精製して、本菌のヘパリナーゼおよびヒアルロニダーゼの性状を明らかにしている^{16,17)}。本研究で *B. heparinolyticus* を除くその他の非黒色 *Bacteroides* のヒアルロニダーゼ活性を調べ、*B. oralis* の培養上清中に強い活性を認めたので、*B. oralis* のヒアルロニダーゼを精製して、その性状について明らかにした。

B. oralis のヒアルロニダーゼ活性は菌体から超音波処理して得た抽出試料に比較して培養上清中に強く認められることから、本菌のヒアルロニダーゼは、*B. heparinolyticus* ヒアルロニダーゼ¹⁷⁾とは異なり、菌体外産生性であることを示す。

本酵素の分子量は、ゲル濾過法および SDS・PAGE 所見のいずれによっても 75,000 と算定され、*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equir-milis*, *Propionibacterium acnes*, *B. heparinolyticus* など多くの細菌ヒアルロニダーゼの分子量が 84,000~90,000 程度であるとされている¹⁷⁻²⁰⁾のに比較すると、やや小さく、また SDS・PAGE 所見などから考え、この酵素は単純ポリペプチド鎖と推定される。等電点電気泳動法によって本酵素の等電点 (pI) は 7.6 で、*P. acnes*²¹⁾ や *B. heparinolyticus*¹⁶⁾ のそれに比較し、やや高い値を示したが近似するものであった。

B. heparinolyticus や *P. acnes* など、多くのヒアルロニダーゼは複数の酸性ムコ多糖体分解能を有する。これら細菌酵素と異なり、*B. oralis* ヒアルロニダーゼは酸性ムコ多糖体中、ヒアルロン酸のみ分解するに過ぎず、硫酸基を持つコンドロイチン硫酸 A, B, C, ヘパリン、ヘパラン硫酸のみならず、硫酸基を欠除するコンドロイチンに対して全く分解作用がみられず、極めて基質特異性の高い酵素とみられる。

多くの細菌ヒアルロニダーゼ (*Streptomyces hyalurolyticus* を除く) が二糖を最終分解産物とすることが示されている²²⁾。*B. oralis* ヒアルロニダーゼによる分解産物のペーパークロマトグラフィによる検討から、不飽和四糖および不飽和二糖が検出、確認された。しかし、二糖に比較して四糖の検出が極めてわずかであることから、この四糖の検出は、本反応系で酵素量に対する基質濃度の過剰が考えられ、最終的には多くの細菌酵素と同様その分解産物が不飽和二糖であると考えられる。

歯周組織破壊に直接関与する因子の一つに、種々の細菌酵素があげられる^{3,4)}。竹内らは²³⁾、蛍光抗体法によってヒトの炎症歯肉における細菌性ヒアルロニダーゼやコンドロイチナーゼの局在を調べ、両酵素が歯周組織破壊に直接関与する病原因子と述べている。事実、ヒアルロニダーゼを動物の歯周に滴下しても、炎症変化がみられることが示されている^{24,25)}。これらの知見から *B. oralis* のヒアルロニダーゼが菌体外産生性であり、歯肉内縁上皮の破壊や炎症の初発に直接作用する可能性を示唆する。本菌の精製ヒアルロニダーゼを用いて、今後、歯周組織破壊や感染における役割を明らかにしたい。

文 献

- 1) Takazoe, I. and Nakamura, T. (1971) Experimental mixed infection by human gingival crevice material. Bull. Tokyo Dent. Coll. 12: 85-93
- 2) Slots, J. (1981) Importance of black-pigmented bacteroides in human periodontal disease. Host-parasite interactions in Periodontal diseases. 27-45. American Society for Microbiology, Washington.
- 3) Fujimura, S. and Nakamura, T. (1987) Isolation and characterization of a protease from *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun. 55: 716-720
- 4) Toda, K., Otsuka, M., Ishikawa, Y., Sato, M., Yamamoto, Y. and Nakamura, R. (1984) Thiol-dependent collagenolytic activity in culture media of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodontal Res. 19: 373-381
- 5) 奥田克爾 (1982) *Bacteroides gingivalis* の性状と歯周疾患誘発能。浜田茂幸編、う蝕と歯周病一研究の進歩 第1巻 151-183。日本歯科評論社、東京。
- 6) 矢ヶ崎 崇、千野武広、中村 武 (1985) 口腔内 *Bacteroides* sp. の β -lactamase 活性、嫌気性菌感染症研究、15: 74-80。
- 7) Nakamura, T., Suginaka, Y. and Takazoe, I. (1976) Heparinase activity in lesions of periodontal disease. Bull. Tokyo Dent. Coll. 17: 147-155.
- 8) Krieg, N. R. and Holt, J. G. (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology. 1: 604-631 Williams and Wilkins, Baltimore/London.
- 9) Okuda, K., Kato, T., Shiozu, J., Takazoe, I. and Nakamura, T. (1985) *Bacteroides heparinolyticus* sp. nov. isolated from humans with

- periodontitis. Int. J. Syst. Bacteriol. **35**: 438-442
- 10) Linker, A. (1966) Bacterial mucopolysaccharidases. (Mucopolysaccharide lyases.) Methods in Enzymol. **8**: 650-654.
 - 11) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) **227**: 680-685.
 - 12) Vesterberg, O., Wadstrom, T., Vesterberg, P., Svensson, H. and Malmgten, B. (1967) Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*. I. Separation and characterization of enzymes and toxins by isoelectric focusing. Biochem. Biophys. Acta. **133**: 435-445.
 - 13) 柴田村治 (1957) ペーパークロマトグラフ法の実際, 94-99, 共立出版, 東京.
 - 14) 中村 武, 杉中芳幸, 小幡直樹, 青木宣夫 (1975) 混合感染能を有する口腔内嫌気性菌の酸性ムコ多糖体と脂質分解酵素に関する研究. 松本歯学, **1**: 11-21.
 - 15) 谷口裕明, 藤村節夫, 中村 武. (1982) 口腔内 *Bacteroides* sp. の産生するムコ多糖体分解酵素, 特にヘパリナーゼについて, 松本歯学, **8**: 15-22.
 - 16) Nakamura, T., Shibata, Y. and Fujimura, S. (1988) Purification and properties of *Bacteroides heparinolyticus* heparinase (heparin lyase, EC 4,2,2,7) J. Clin. Microbiol. **26**: (in press)
 - 17) Taniguchi, S., Fujimura, S., Takeuchi, K. and Nakamura, T. (1983) Purification and characterization of mucopolysaccharidase from an oral strain of *Bacteroides* sp. Appl. Environ. Microbiol. **46**: 1252-1257.
 - 18) Rautela, G. S. and Abramson, C. (1973) Crystallization and partial characterization of *Staphylococcus aureus* hyaluronate lyase. Arch. Biochem. Biophys. **158**: 687-694.
 - 19) Ogegowski, J. H., Gerlach, D. and Kohler, W. (1981) Purification and characterization of streptococcal hyaluronate lyase. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.Reihe A **249**: 310-322.
 - 20) Ingham, E., Holland, K. T., Gowland, G. and Cunliffe, W. J. (1979) Purification and partial characterization of hyaluronate lyase (EC 4,2,2,1) from *Propionibacterium acnes*. J. Gen. Microbiol. **115**: 411-418.
 - 21) Nakamura, T., Taniguchi, H., Takeuchi, K., Kiuchi, N. and Fujimura, S. (1982) Purification and properties of hyaluronidase (EC 4,2,2,1) from an oral strain of *Propionibacterium acnes*. Matsumoto Shigaku, **8**: 221-230.
 - 22) 瀬野信子 (1968) ムコ多糖体の構造と機能 135-152. 南江堂, 東京.
 - 23) 竹内 宏, 堀 泰典, 金久純也, 上田雅俊, 谷 明, 佐川寛典, (1983) 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究, 第7報 歯周炎と細菌酵素(その2) 炎症歯肉における bacterial chondroitinase ABC と hyaluronidase について. 歯基礎誌, **25**: 437-442.
 - 24) Schultg-Haundt, S. D., Dewar, M. and Bibby, B. G. (1953) Effects of hyaluronidase on human gingival epithelium. Science. **117**: 653-655.
 - 25) Aisenberg, M. S. and Aisenberg, A. A. (1951) Hyaluronidase in periodontal disease. Oral Surg. **4**: 317-320.