

〔原著〕 松本歯学 2 : 140~145, 1976

## 口腔内 *Propionibacterium acnes* の Chondroitin Sulfatase に関する研究

中村 武, 杉中芳幸

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

高添一郎, 奥田克爾

東京歯科大学 微生物学教室 (主任 高添一郎 教授)

### The Study on the Chondroitin Sulfatase Activity of Oral *Propionibacterium acnes*

TAKESHI NAKAMURA and YOSHIYUKI SUGINAKA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. T. Nakamura)

ICHIRO TAKAZOE and KATSUJI OKUDA

Department of Microbiology, Tokyo Dental College

(Chief: Prof. I. Takazoe)

### Summary

Chondroitin sulfate splitting activity was demonstrated by 10 strains of *Propionibacterium acnes* isolated from gingival pocket's samples exhibiting periodontal disease and by one strain isolated from the pus sample of experimental mixed infection in guinea pig induced by human dental plaque. The activity was observed in both cells and culture supernatant. From the daily change in the activity of these samples the factor was found to liberate from the cell quite easily. The factor was non-dialyzable. Heating at 70°C for 10 minutes was found to inactivate completely the factor. Reducing group of chondroitin sulfate increased following the decreasing of the substrate. The highest activity was observed at pH between 5.5 and 6.0. Based on the fact that *Propionibacterium acnes* was an essential member of the trio for the mixed infection in the animal, a possible role of the chondroitin sulfatase of the species in the etiology of the periodontal disease was discussed.

### 緒 言

これまで嫌気性 *Corynebacterium* として知ら

れた菌群の中で, glucose からの major product がプロピオン酸であるものは, Bergey's manual of Determinative Bacteriology<sup>3)</sup> 8 版 (1974) で新たな菌種 *Propionibacterium acnes* とされた. 本菌種は, 口腔内, 特に歯垢ないし歯齦囊に  $10^{8-9}$  程

(1967 年 10 月 25 日受理)

度に常在し<sup>17)</sup>、歯周疾患患者病巣で *Bacteroides* 種と共に増加する<sup>2) 6) 12)</sup>。また、歯垢接種による実験感染症病巣でも *Bacteroides* 種<sup>11)</sup>と共に顕著な増量を示し、本菌の純培養菌をこれら病巣局所で優勢となる2種の *Bacteroides* と組合せて種々の動物に接種すると、歯垢接種と同様の感染症を成立せしめうることも明らかとなっている<sup>22)</sup>。従って、内因感染である歯周疾患の病因に本菌が重要な役割を有するものと考えられ、本菌の病原的属性について検討が加えられている。これまでに本菌の硬蛋白および脂質分解酵素が明らかにされている<sup>4) 8) 13) 14) 24)</sup>。しかし、多糖体を対象とした研究は未だ十分とは言えない。

本研究は、主に歯槽膿漏症患者の歯齦囊材料より分離した *Propionibacterium acnes* の酸性ムコ多糖体に対する作用、特に本菌の chondroitin sulfatase の kinetics について検討したものである。

### 実験方法

供試菌株は、歯槽膿漏症患者(40~56才)の歯齦囊材料より分離し、*Propionibacterium acnes* と同定<sup>3) 18)</sup>された10株および歯垢接種による実験混合感染症膿汁より分離した<sup>22)</sup>1株(Exc-1)の計11株である。

各菌株の chondroitin sulfate 分解活性は、基質加液体培地(0.2% Yeast Extract 加 Brain Heart Infusion broth (Difco) に 1 mg/ml の chondroitin sulfate, Sodium Salt (東京化成)を添加)に基質無添加同平板の3日前培養菌を1白金耳接種し、嫌氣的(黄磷法)に2日、4日および7日間培養後、培地中の基質定量による分解率から検索した。なお、定量法は、0.02% toluidine blue 溶液による titration method<sup>13)</sup> によって行った。

分解因子の消長ならびに局在は、Exc-1株を供試して、培養日数別菌体と培養上清について検討した。すなわち、各培養日数別の遠沈(12,000 r.p.m. 20 min. 4°C)上清を pH 6.0 に調製し、菌体は 100°C、10分処理した当該上清に再び suspend (5 mg/ml w.w.) し、それぞれ chondroitin sulfate (1 mg/ml) と 37°C、4時間作用させ、培養菌の活性同様に検索した。

分解因子の作用至適 pH ならびに熱抵抗性は、

Exc-1 株の5日培養上清を用いて検討した。すなわち、培養上清に HCl および NaOH の各 10% 溶液で pH 4.0~8.0 とし、それぞれの pH における基質分解率から判定した。熱抵抗性は、pH 6.0 の培養上清を 40~80°C、10分処理した後の活性から判定した。

分解因子の濃縮は Fig. 1 に示す如く、5日培養

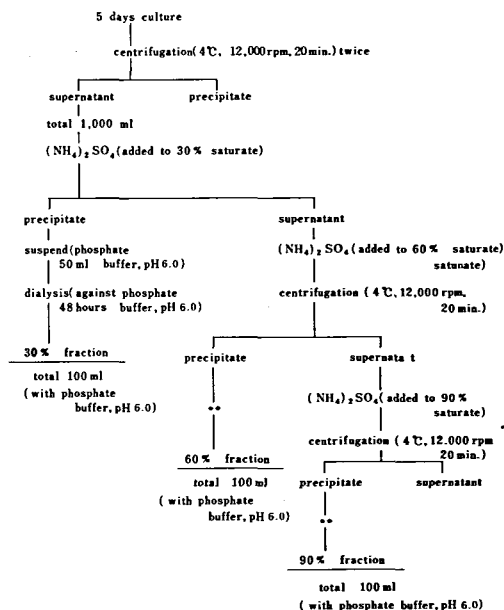


Fig. 1. Condensation procedure of the chondroitin sulfatase

上清に硫酸アンモニウムを添加し、0~30% (30%), 30~60% (60%) および 60~90% (90%) 硫酸画分を得て、各画分を pH 6.0 の phosphate buffer に対して透析した後、5 mg/ml の基質と作用させ、各画分の活性を検した。なお、強い活性を認めた 60% 画分の chondroitin sulfate 分解を reducing group の定量<sup>10)</sup>からも確認した。

### 実験成績

供試11株には、いずれも chondroitin sulfate の分解活性が認められた (Table 1)。供試菌株中、特に D-7、P-3、B-1 および Exc-1 の4株の分解活性は、強く、培養2日ですでに 100% の分解を示した。次いで N-4、O-8、F-6 および T-1 の4株は、4~7日培養で分解率 100% であった。

**Table 1.** Chondroitin sulfate splitting by *Propionibacterium acnes* isolated from gingival crevice with periodontal diseases

days	strains	D-7	P-3	B-1	EXC-1	N-4	O-8	F-6	T-1	K-2	C-3	Y-11
initial	1 (ml)	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4
2		0 (100)	0 (100)	0 (100)	0 (100)	1.6 (84.6)	1.2 (88.5)	1.2 (88.5)	7.8 (25.0)	10.4 ( 0 )	8.4 (19.2)	9.0 (13.5)
4		.	.	.	.	0 (100)	0 (100)	0 (100)	3.2 (69.2)	5.0 (61.5)	7.2 (30.8)	7.0 (32.7)
7		.	.	.	.	.	.	.	0 (100)	2.4 (76.9)	4.3 (58.7)	6.4 (38.4)

The activity was determined with culture fluid supplemented  
by chondroitin sulfate, ( ): splitting %

これに対して、K-2、C-3およびY-11の3株は、経日的に分解が認められたが他の菌株と比較して、その分解率は低かった。この経日的基質分解率に差異が認められることは菌株により分解活性に強弱のあることを示すものと考えられた。

分解因子の消長についてみると、菌体では培養4日まで約37～60%の分解率を示すが、それ以後、その活性は低下した。これに対し、培養上清の活性は、培養日数と共に分解率が上昇し、4日以上培養上清では完全にすべての基質を分解した (Table 2)。

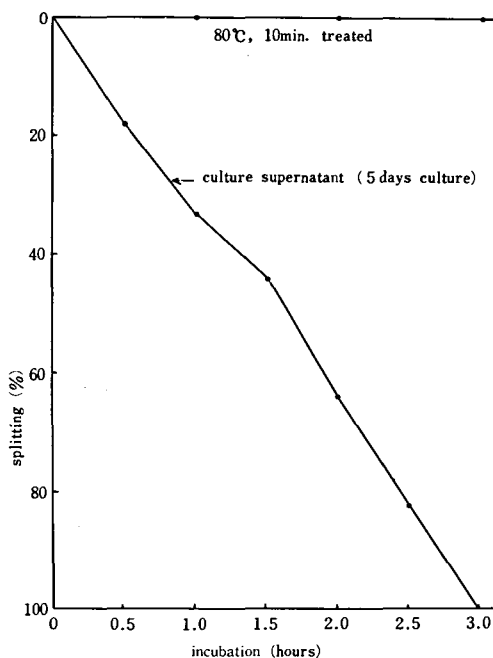
**Table 2.** Distribution of chondroitin sulfate splitting activity of *Propionibacterium acnes* at various culture ages

origin	c e l l		culture supernatant	
	titration	splitting	titration	splitting
initial	8.4 ml	0 %	8.4 ml	0 %
1 day	5.3 ml	36.9 %	8.3 ml	1.2 %
2 days	4.1 ml	51.0 %	6.0 ml	28.6 %
3 days	5.3 ml	36.9 %	5.2 ml	38.1 %
4 days	3.4 ml	59.5 %	0 ml	100 %
5 days	7.5 ml	10.7 %	0 ml	100 %
6 days	7.2 ml	14.2 %	0 ml	100 %

Determination was performed by the titration method with each sample after 4 hours incubation at 37 °C with the substrate

5日培養上清を用いて反応経過を追究したところ、Fig. 2の如く、分解活性は incubation 時間にはほぼ比例して認められ、3時間で100%の分解率を示した。これに対して、80°C、10分処理した培養上清には全く分解活性が認められなかった。

分解因子の各 pH における活性は、Fig. 3に示

**Fig. 2.** Time sequence of chondroitin sulfate splitting by culture supernatant of *Propionibacterium acnes*

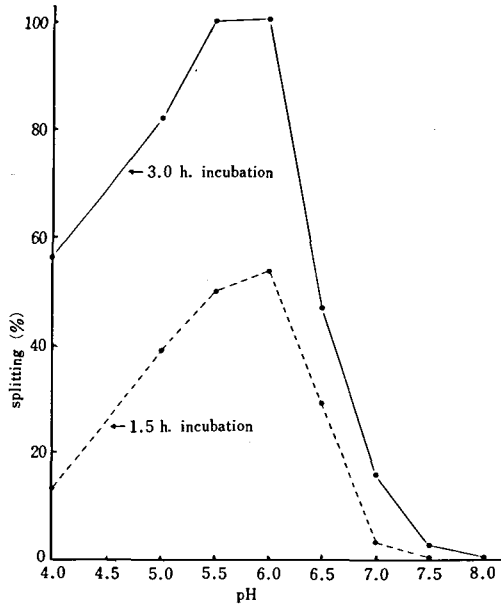


Fig. 3. Exploration of the optimal pH of the chondroitin sulfate splitting activity in culture supernatant of *Propionibacterium acnes*

pH adjustment was performed by a certain quantity of HCl or NaOH to minimize the volume change of enzyme preparation

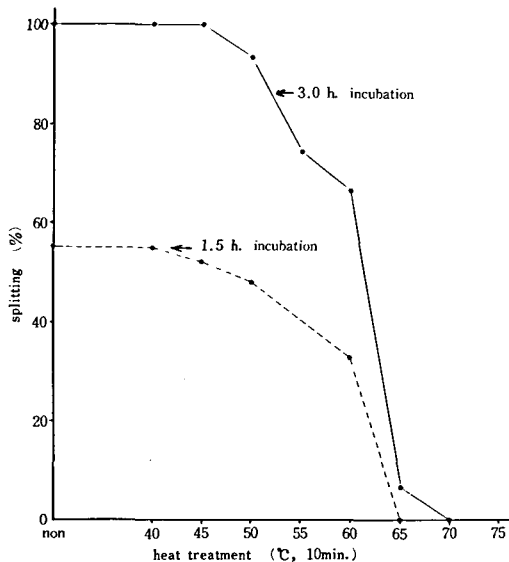


Fig. 4. Heating effects upon the chondroitin sulfate splitting activity of culture supernatant of *Propionibacterium acnes*

Table 3. Chondroitin sulfate splitting activity in various ammonium sulfate-fraction from culture supernatant of *Propionibacterium acnes*

salurate fraction incubation	30 %	60 %	90 %	60 %. heating (80 °C, 10min.)
30 min.	8.6	78.2	10.8	0
60 min.	13.0	100	23.9	0

Number express splitting (%) by the titration

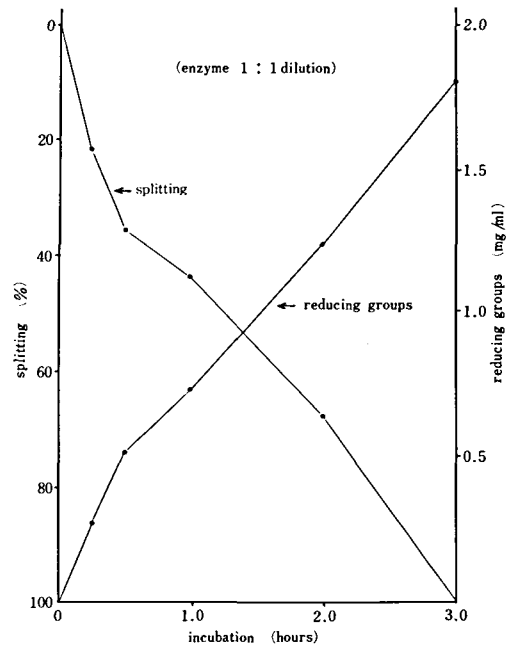


Fig. 5. Release of reducing groups from chondroitin sulfate by the crude enzyme following the substrate splitting

した。pH 5.5~6.0 で最大の分解が認められたが、pH 7.5 以上では殆んど分解が認められなかった。この成績から、本菌の chondroitin sulfate 分解因子の作用最適 pH は、5.5~6.0 の範囲であることがわかった。

本因子の熱抵抗性は、40°C、10 分処理では、その活性に低下が認められなかったが、50°C 以上では処理温度と共に活性が低下し、70°C、10 分で活性が認められなかった。このことから本分解因子

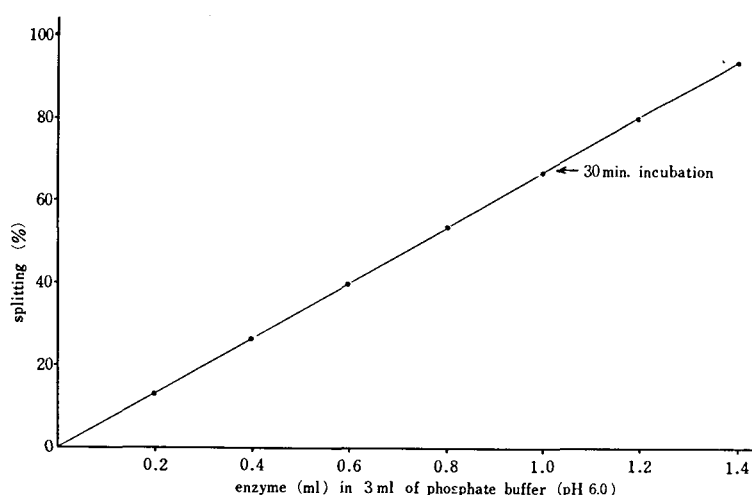


Fig. 6. Effects of the concentration of the sample upon chondroitin sulfate splitting

は、70°C、10分で失活する易熱性であることがわかった (Fig. 4).

培養上清から得た、各硫酸画分の活性は、Table 3 に示す如く、30%および90%画分の分解率は、1時間の incubation でそれぞれ13.0%、23.9%と低いのに対して、60%画分の分解率は、30分の incubation ですでに78.2%を示し、いずれの画分よりも強い活性を示した。この60%画分による chondroitin sulfate 分解を reducing group の定量によって追究すると、Fig. 5 の如く、titration method による基質分解に比例して、reducing group の増量が認められた。また、本60%画分の濃度に正比例して chondroitin sulfate が分解されることもわかった (Fig. 6).

以上の成績から *Propionibacterium acnes* の chondroitin sulfate 分解因子は、非透析性の酵素と考えられた。

## 考 察

本菌は、動物における実験混合感染症の成立に必須であることがわかっている。しかし、それ以後の多くの研究<sup>9) 14) 22) 23)</sup> にもかかわらず、その感染機序は、未だ明らかでない。本研究で示された *Propionibacterium acnes* の chondroitin sulfatase 活性は、この実験混合感染症の成立機序説明の一因子として役立つであろう。元来、本菌は、

歯齦囊局所の主要局在菌<sup>17)</sup>であることから、歯周疾患の発症ならびに経過に何らかの役割を果たしているものと考えられる。おそらく上述の実験混合感染症の成立機序と軌を一にする可能性もあろう。他の多くの生体個所における本菌の役割<sup>4) 5)</sup> からみて、歯周疾患の最初の変化である歯齦炎の成立に本活性が関連しているかも知れない。hyaluronidase の局所滴下によって炎症性変化がみられ<sup>1) 19)</sup>たという動物実験は、本酵素活性が炎症の初発をもたらす可能性を示唆している。何らかの機序によって局所組織の崩壊がわずかでも起きた場合には、本酵素の炎症増悪の役割は容易に推定できる。本酵素活性によって結合組織は、種々の毒性物質の侵入を促進するであろうし、微小循環に障害を与えられとされるからである。Schultz-Haudt<sup>20)</sup>らによって推定された本酵素活性の炎症局所における二次的役割を間接的に指示する所見は、本酵素の至適 pH である。一般に歯齦囊局所の pH は、高いのに対して、本酵素活性が pH 5.5 から 6.0 という、やや低いところにあることは、炎症現場での本酵素活性の役割を示唆すると考えられる。

近年、本菌の保有する生物活性は、極めて広範囲であることが示されている<sup>7) 15) 16) 21)</sup>。これらの生物活性が生体内で作用する際には、本酵素活性もこれらの作用と明らかに関連すると考えられる。本菌の保有する生理的意義や病原的役割につ

いては、さらに検討されるであろうが、本酵素活性の特異性は、これらの解明の一助となろう。

### 結 論

主に歯槽膿漏症患者歯齦囊より分離した, *Propionibacterium acnes* は, chondroitin sulfate を分解することがわかった。その分解因子は、菌体外に産生され、70°C, 10 分で失活し、非透析性である。従って本因子の本態は酵素であることがわかった。本酵素の作用至適 pH は 5.5~6.0 である。本菌は、2 種の *Bacteroides* と協同して実験感染症を成立する事実と考え合せ、本菌の保有する chondroitin sulfatase の歯周疾患における役割を考察した。

### 文 献

- 1) Aisenberg, M. S. and Aisenberg, A. D. (1951) Hyaluronidase in periodontal disease. *Oral Surg.* 4: 317—320.
- 2) Beveridge, T. J. and Goldner, M. (1973) Statistical relationship between the presence of human subgingival anaerobic diphtheroides and periodontal disease. *J. dent. Res.* 52: 451—453.
- 3) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., 599—681, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 4) Ellison, S. A. (1970) Oral bacteria and periodontal disease. *J. dent. Res.* 49: 199—202.
- 5) Freinkel, R. K. (1969) Pathogenesis of acne vulgaris. *New. Eng. J. Med.* 280: 1161—1163.
- 6) 岩田一夫 (1966) 歯槽膿漏症局所の嫌気性菌について。歯科学報, 66: 234—252.
- 7) 花沢重正, 上之原和子, 加藤英夫, 柳沢龍治, 荻野武克, 荻原喜雄 (1976) 嫌気性コリネ及びプロピオン属諸菌株の生物学的活性に関する比較検討。日細誌, 31: 613—619.
- 8) Linder, L. and Nord, C. E. (1971) Formation of hyaluronidase in batch culture by strains of oral *Corynebacteria*. *J. dent. Res., Suppl.* 5, 5: 1228.
- 9) Macdonald, J. B., Socransky, S. S. and Gibbons, R. J. (1963) Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infection of mucous membranes. *J. dent. Res.* 42: 529—544.
- 10) Meyer, K. H. and Gibbons, G. C. (1951) The present status of starch chemistry. *Advance enzymol.* 12: 341—377.
- 11) 中村 武 (1969) 口腔内嫌気性 Heparinase 産生菌に関する研究。十全会誌, 78: 509—530.
- 12) Nakamura, T., Suginaka, Y. and Takazoe, I. (1976) Heparinase activity in lesion of periodontal diseases. *Bull. Tokyo dent. Coll.* 17: 147—155.
- 13) 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.
- 14) 小幡哲夫 (1966) 口腔内嫌気性 *Corynebacterium* について。歯科学報, 66: 949—968.
- 15) 奥田克爾, 高添一郎 (1975) アレルギーからみた歯周疾患のなりたち。歯界展望, 46: 383—389.
- 16) Okuda, K. and Takazoe, I. (1976) Biological activity of *Propionibacterium acnes* from the human oral cavity — Dermal toxicity and RES — Stimulating activity —. *Bull. Tokyo dent. Coll.* 17: 1—9.
- 17) Sabiston, Jr., C. B. and Grigsby, W. R. (1972) Anaerobic bacteria from the advanced periodontal lesion. *J. Periodont.* 43: 199—201.
- 18) 佐々木脩浩 (1975) 口腔内嫌気性ジフテロイド菌群の分類学的位置付け。歯科学報, 75: 1818—1827.
- 19) Schultz-Haudt, S. D., Dewar, M. and Bibby, B. G. (1953) Effects of hyaluronidase on human gingival epithelium. *Science.* 117: 653—655.
- 20) Schultz-Haudt, S. D. and Scherp, H. W. (1956) The production of chondrosulfatase by microorganisms isolated from human gingival crevice. *J. dent. Res.* 35: 299—307.
- 21) 高添一郎 (1973) 歯周疾患の免疫学的病因論。歯界展望, 41: 765—770.
- 22) Takazoe, I. and Nakamura, T. (1971) Experimental mixed infection by human gingival crevice material. *Bull. Tokyo dent. Coll.* 12: 85—93.
- 23) 高添一郎, 中村 武, 小幡哲夫 (1967) 口腔常在性嫌気性菌群と感染症。日細誌, 22: 346—347.
- 24) Werner, H. (1967) Untersuchungen über die Lipase und Lecithinase-aktivität von aeroden und anaeroden *Corynebacterium* und von *Propionibacterium*-arten. *Zbl. Bact. I. orig.* 204: 127—138.