The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト末梢血単球の化学走性を誘導する Porphyromonas gingivalis 線毛蛋白の機能領域
Author(s)	小郷, 秀司
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38882
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【4】

氏　　名	小郷秀司（おごうひでじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　11326　号
学位授与年月日	平成6年3月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	ヒト末梢血単球の化学走性を誘導する *Porphyromonas gingivalis* 線毛蛋白の機能領域
論文審査委員	（主査） 教　授　岡田　宏 （副査） 教　授　浜田　茂幸　　助教授　鳥居　光男　　助教授　森崎市治郎

論文内容の要旨

【研究目的】

グラム陰性嫌気性の黒色色素産生性細菌である *Porphyromonas gingivalis* は，歯周病，なかでも成人性歯周炎の発症や進行に深く関わっていると考えられる。同歯周炎の感染の第一段階として，*P. gingivalis* 菌体表層に存在する繊維状構造体である線毛が重要な働きをしていることが示唆される。*P.gingivalis* 線毛蛋白の化学的性状ならびに免疫生物学的活性について，多くの研究グループにより報告されており，同線毛が歯周組織中の種々の細胞との付着に関係し，また，宿主細胞を活性化し歯周組織における炎症を惹起することが考えられる。*P.gingivalis* を含む歯周病原性細胞は歯周局所への炎症性細胞（多形白血球やマクロファージ等）を誘導し，炎症や組織破壊を招くことが示唆される。しかしながら，これら歯周病の感染や発症について歯周病原性細菌の線毛と宿主細胞との分子レベルでの相互作用に関する研究は緒についたばかりである。そこで，本研究は組織マクロファージの前駆細胞と考えられるヒト末梢血単球／マクロファージに対する *P.gingivalis* 線毛の遊走刺激作用について検討し，さらに，同線毛のサブユニット蛋白であるフィンブリリンのアミノ酸配列を模して合成した部分ペプチドを用いて，その機能領域を明らかにしようとするものである。

【研究方法】

1. 線毛蛋白およびリポ多糖体（LPS）の調製：*P.gingivalis* 381株を嫌気的条件下で培養後，同菌体表層より機械的に線毛を剥離し，硫安塩析ついで陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。また，同菌体より温フェノール・水法により LPS を抽出した。2. 合成ペプチドの作出：Dickinson ら（1988）により明らかにされたフィンブリリンの推定アミノ酸配列にもとづいて，その対応する部分ペプチドを自動ペプチド合成装置を用いて合成し，逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製した。3. ヒト末梢血単核球の調製：健常者から静脈血を採取し比重遠心法により単核球を分離した。4. 遊走刺激作用の検討：Boyden の多穴走化チェンバーを用いて，ヒト末梢血単球に対する遊走刺激作用について検討した。陽性対照として *N*－ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン（fMLP）を用いた。なお，単球の遊走性が供試した試料の濃度勾配に依存する化学走性によるものか否かを Zigmond と Hirsch（1973）のチェッカーボード法により調べた。

【研究結果】

1. *P.gingivalis* 線毛は，ヒト末梢血単球に対して0.001～100 μg／ml の用量で明確な遊走刺激作用を示した。また，

チェッカーボード分析による結果から同遊走刺激作用は濃度勾配に依存した化学走性であることが明らかとなった。一方，同菌体から抽出したLPSはヒト末梢血単球に対して遊走刺激作用を示したが，化学走性は，化学走性であると同時にランダムな遊走の亢進であるケモキネシスであった。2. ウサギ赤血球に対して凝集活性を示すことがOgawaら（1991）により明らかにされている領域に相当する部分合成ペプチドであるFP 381（61-80;N末端側からのアミノ酸残基の番号）ならびにFP381（171－185）は10^{-13}～10^{-5} Mの用量で明確な単球の遊走刺激作用を示し，10^{-11} Mの用量で最も強い活性を示した。その活性の程度は陽性対照として用いたfMLPに匹敵するものであり，その最大活性を示す用量はfMLPの1／1000であった。3. FP38（61－80）と同程度の単球遊走刺激作用が，その短鎖部分ペプチドであるFP381（69－80）に認められたが，FP381（69－80）のアミノ酸残基番号69のアラニンをグリシンに置換した構造異性体であるFP381（69［Gly］-80）には，同活性は認められなかった。さらに，FP381（69－80）のN末端側やC末端側のアミノ酸残基を除いたより短鎖な部分合成ペプチドの単球に対する遊走刺激作用の程度は，FP 381（69－80）のそれより低いかあるいは全くみられなかった。なお，FP381（69－80）のヒト単球の遊走刺激作用は天然線毛の場合と同様に化学走性によるものであった。

【考察】

*P.gingivalis*が，成人性歯周炎患者の歯周ポケットから高頻度で検出され，また，歯周炎の炎症組織中にマクロファージが浸潤していることが組織学的所見から明らかとなっている。本研究により，*P.gingivalis*線毛蛋白がヒト末梢血単球に対して化学走性活性を示すことが明らかになったが，これらの所見は，歯周病巣部にみられるマクロファージの浸潤に同菌体表層の線毛が深く関わっていることが示唆される。また，部分合成ペプチドを用いた解析の結果，*P.gingivalis*線毛蛋白分子中に化学走性活性の機能領域が存在し，その機能領域のアミノ酸配列としてXLTXXLTXXNXXが重要であることを明らかにした。歯周病巣部において，*P.gingivalis*線毛のみならず同線毛蛋白が内因性のプロテアーゼなどの働きにより部分分解され，その分解産物が炎症性細胞の浸潤をさらに増長させていることを考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は，ヒト末梢血単球の化学走性を誘導する*Porphyromoas gingivalis*線毛蛋白分子中の機能領域について検討したものである。

その結果，*P.gingivalis*線毛ならびにその部分合成ペプチドは，ヒト末梢血単球に対して明確な化学走性活性を示し，その機能領域としてアミノ酸配列XLTXXLTXXNXXが重要であることを明らかにした。これらの知見は，歯周炎の病原因子の一つである*P.gingivalis*による炎症性細胞の浸潤の機構を知る手がかりを与えるものであり，本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められる。