

Title	Effect of eel galectin AJL-1 on periodontopathic bacterial biofilm formation and their lipopolysaccharide-mediated inflammatory cytokine induction
Author(s)	高山, 沙織
Journal	歯科学報, 110(4): 530-531
URL	http://hdl.handle.net/10130/2007
Right	

氏名(本籍)	たかやまさおり 高山沙織 (千葉県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1802号(甲第1073号)
学位授与の日付	平成21年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Effect of eel galectin AJL-1 on periodontopathic bacterial biofilm formation and their lipopolysaccharide-mediated inflammatory cytokine induction
掲載雑誌名	International Journal of Antimicrobial Agents 第34巻 355~359頁 2009年
論文審査委員	(主査) 山田 了教授 (副査) 佐野 司教授 松久保 隆教授 石原 和幸教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

歯周疾患を引き起こす細菌は口腔内でバイオフィルムを形成し、病原性を発揮する。形成されたバイオフィルムの薬物による除去は難しく、歯周疾患治療において未だ課題である。近年バイオフィルムの予防を目的として、口腔内細菌に抗菌活性を示す天然物質が注目されており、魚類の体表上皮成分もその候補のひとつである。日本産ウナギ(*Anguilla japonica*)体表上皮に存在するガレクチン AJL-1 は、体表において感染防御に作用することが報告されている。そこで我々は、AJL-1 がもつ歯周病原細菌バイオフィルム形成阻害ならびに内毒素(LPS)活性に対する効果を検討した。

2. 研究方法

A. japonica 体表上皮から分離・精製した AJL-1 を実験に用いた。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* をそれぞれ2~3株ずつ用い、96-well プレート上で、単一菌からなるバイオフィルム形成への AJL-1 の影響を検討した。AJL-1 (25, 50, 100 μ g/ml) を含む培地に、前培養菌を植菌し、嫌気培養後、クリスタル紫染色法によってバイオフィルム形成量を測定した。また浮遊菌の ATP 量(ATP 量測定法)および菌量(OD 値)を測定し抗菌活性を検討した。

さらに AJL-1 が、*A. actinomycetemcomitans* Y4 株, ATCC29523株から分離精製した LPS によるヒト正常臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)からの炎症性サイトカイン産生誘導を抑制するか否かについて検討した。培養液に LPS (8 ng/ml) 単独, あるいは LPS および AJL-1 (20 μ g/ml) を加え HUVECs を培養し, 17時間後の細胞上清中 IL-6 および IL-8 量を市販 ELISA キットにて測定した。

3. 研究成績および考察

A. actinomycetemcomitans 全供試菌株において AJL-1 は、濃度依存的にバイオフィルム形成を抑制した($p < 0.02$)。しかし、*P. gingivalis* および *P. intermedia* に対しては有意な抑制を示さなかった。*A. actinomycetemcomitans* のバイオフィルム形成抑制は、AJL-1 の抗菌活性によるものなのか否かを検討するため、浮遊 *A. actinomycetemcomitans* ATP 量と菌量を測定した。その結果、どちらも AJL-1 の濃度依存的に増加し、AJL-1 は強い抗菌活性をもたないことが示唆された。

LPSは菌体の付着に関与する外膜の構成成分であり、その構造は*A. actinomycetemcomitans*と供試した他菌株では異なっている。そこで、*A. actinomycetemcomitans*のみにみられたバイオフィーム形成抑制はAJL-1がそのLPSに作用することによるものではないかと推察し、LPS活性に対するAJL-1の影響を検討した。その結果、AJL-1は*A. actinomycetemcomitans* Y4株のLPSが誘導するIL-6およびIL-8の産生を30~40%程度、ATCC29523株のLPSに対しては40~50%程度の有意な抑制効果を示した。このことから、AJL-1はLPSに作用することによってバイオフィームの形成を抑制することができると考えられた。

4. 結 論

AJL-1は*A. actinomycetemcomitans*バイオフィーム形成および本菌内毒素の炎症性サイトカイン誘導活性を抑制することができ、本菌が関与する歯周疾患を予防するための天然物質として有力な候補であることが示唆された。

論 文 審 査 の 要 旨

近年バイオフィームの予防を目的として、口腔内細菌に抗菌活性を示す天然物質が注目されており、日本産ウナギ(*Anguilla japonica*)体表上皮に存在するガレクチンAJL-1は、体表において感染防御に作用することが報告されている。そこで我々は、AJL-1がもつ歯周病原細菌バイオフィーム形成阻害ならびに内毒素(LPS)活性に対する効果を検討した。

A. japonica 体表上皮から分離・精製したAJL-1を実験に用いた。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* を用い、AJL-1を含む培地に、前培養菌を植菌し、嫌気培養後、クリスタル紫染色法によってバイオフィーム形成量を測定した。また浮遊菌のATP量および菌量により抗菌活性を検討した。さらにAJL-1が、*A. actinomycetemcomitans* LPSによるヒト正常臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)からの炎症性サイトカイン産生誘導を抑制するかについて、培養液にLPS単独、あるいはLPSおよびAJL-1を加えHUVECsを培養し、細胞上清中のIL-6およびIL-8量を測定した。

その結果、*A. actinomycetemcomitans* においてAJL-1は、濃度依存的にバイオフィーム形成を抑制した($p < 0.02$)。しかし、*P. gingivalis* および *P. intermedia* に対しては有意な抑制を示さなかった。つぎに、浮遊 *A. actinomycetemcomitans* ATP量と菌量を測定した結果、どちらもAJL-1の濃度依存的に増加し、AJL-1は強い抗菌活性をもたないことが示唆された。そこで、LPS活性に対するAJL-1の影響を検討した。その結果、AJL-1は*A. actinomycetemcomitans* Y4株のLPSが誘導するIL-6およびIL-8の産生を30~40%程度、ATCC29523株のLPSに対しては40~50%程度の有意な抑制効果を示した。このことから、AJL-1はLPSに作用することによってバイオフィームの形成を抑制することができると考えられた。以上の結果よりAJL-1は*A. actinomycetemcomitans*バイオフィーム形成および本菌内毒素の炎症性サイトカイン誘導活性を抑制することができ、本菌が関与する歯周疾患を予防するための天然物質として有力な候補であることが示唆された。

本審査委員会では、1) この抑制作用の口腔感染症予防における意義、2) バイオフィーム形成抑制と付着作用との相異、3) 臨床応用への展望、4) 統計分析方法についての討議ならびに質疑がなされ、概ね妥当な回答が得られた。また、論文の構成や図の表現など、改善の指摘があり修正がなされた。

本研究で得られた知見は、歯科医学の進歩発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定された。