原 著

Actinomyces viscosus の変異性に関する研究

A Study on the Phase Variation of *Actinomyces viscosus*

鶴 水 隆* 中 川 昇* 中 村 直 吉*
橋 本 喬* 佐 藤 誠**

Takashi TSURUMIZU*, Noboru NAKAGAWA*, Naoyoshi NAKAMURA*,
Takashi HASHIMOTO* and Makoto SATO**

Received April 8, 1987; accepted May 1, 1987

Abstract: We studied the colonial morphology and some characteristics of phase variants of *Actinomyces viscosus*, in order to clarify factors of its virulence.

All of *A. viscosus* examined spontaneously presented three types ($P_1 \sim P_3$) of colonies on TYC agar, which contained 5% sucrose. These morphological differences of colonies seemed to be due to the difference of their ability to produce extracellular polysaccharide. The strain which produced the largest amount of extracellular polysaccharide was designated P_1 , the strain which was designated P_3 lacked or had little ability to produce it, and P_2 possessed an intermediate.

Although both P_1 and P_3 strains showed similar characteristics in many biochemical tests, P_1 adhered well to the glass wall when cultivated in sucrose-containing medium, whereas adherence of P_3 was negligible. Electron microscopic examination of cell walls revealed longer fibrils on P_1 cell walls than on P_3 cell walls. P_1 was virulent for infected golden hamsters, causing periodontal disease, bone loss and root surface caries, but P_3 was avirulent.

These data suggest that the ability to produce extracellular polysaccharide and the presence of fibrils on cell surfaces are important factors in making *A. viscosus* successful members of plaque community and oral pathogens. The phase variation which occurred spontaneously during sub-culturing of *A. viscosus* should be given attention because it might influence the pathogenicity of the organism.

索引用語: *Actinomyces viscosus*, 変異性, 歯周疾患, 線毛様構造物

Key Words: *Actinomyces viscosus*, Phase variation, Periodontal disease, Fibrils

結 言

Actinomyces viscosus (*A. viscosus*) は Sucrose から粘稠な多糖体を合成し、集塊となって歯牙表面に付着

すること、また、人の歯頸部付近の歯垢より高率に分離され、その分離株を投与すると、ハムスターやラットに、実験的に根面ウ蝕や歯周疾患を誘発することが知られている¹⁻⁴⁾。また、本菌は菌体表層に線毛様構造物を

* 北里研究所

* Kitasato Institute

** 徳島大学歯学部予防歯科学教室 (主任: 中村 亮教授)

** Department of Preventive Dentistry, The University of Tokushima School of Dentistry (Director: Prof. Ryo NAKAMURA)

有することが明らかにされ⁵⁾、この構造物を介して、本菌の同種あるいは異種菌体間凝集や上皮細胞への付着が生じるものと思われ、本菌の口腔内局所定着に線毛様構造物が関与しているものと考えられている。

著者等は、*A. viscosus* による歯周疾患の感染発病機構の解明を試みてきたが、その間、本菌はその諸性状が変異を示しやすいことが認められた。そこで、今回は本菌の変異性について検討を行ない、変異した諸性状と本菌の実験的歯周疾患誘発能の関連性について、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 使用菌株

Table 1 に示した菌株を用いた。各菌株は後述のごとく TYC⁶⁾ 寒天平板培地上で3種類の colony 形態を示した。そのうち特に P₁ 株および P₃ 株と名付けて区別した colony を分離、継代し純培養株としたものを用いた。

2. 培養条件

各菌株の継代用培地として TYC 寒天平板培地を用い、増殖用培地としては TYC broth および0.5% Yeast extract (Difco) を加えた Trypticase soy broth を用いた。歯周疾患患者の歯垢からの *A. viscosus* の分離には大西ら⁷⁾の0.5%プロピオン酸加普通寒天平板培地 (pH 7.0) および TYC 寒天平板培地を用いた。TYC 寒天平板培地 および プロピオン酸加普通寒天平板培地は Gas Pak System (BBL) により37°C 72時間培養を、Trypticase soy broth および TYC broth は37°C 24～48時間培養を行なった。

各菌株は3% Trypticase peptone 10% Glycerin solution に浮遊させ、-80°C に凍結保存し、各実験にはこの凍結保存株の初代または継代したものを用いた。

3. 菌体の管壁付着試験

5% Sucrose 加 Trypticase soy broth に37°C 24時間斜面にして培養し、培養液を除き一度軽く洗浄して試験管壁への付着様態を観察した。

4. 生化学的性状検査

(1) 糖類の分解能

GAM 糖分解用半流動培地「ニッスイ」(日水製薬) にブロムクレゾールパープル0.06%, 各糖を1%に加えた培地を用い、各菌株の P₁ および P₃ を穿刺し37°C 48時間培養して判定した。

(2) ゼラチン液化

ゼラチン培地「ニッスイ」(日水製薬) に各菌株の P₁

Table 1 *Actinomyces viscosus* strains examined

ATCC 15988
NY-1
T-6
W IV
*K-TS
*K-TL+

* Strains isolated in Kitasato Institute

および P₃ を穿刺し、37°C 48時間培養後液化性を判定した。

(3) インドールおよび硫化水素産生

SIM 確認培地「ニッスイ」(日水製薬) に各菌株の P₁ および P₃ を穿刺し、37°C 48時間培養後、インドールおよび硫化水素産生能を判定した。

(4) その他の性状検査

硝酸塩還元能は BC テスト「ニッスイ」(日水製薬) により、またカタラーゼ試験はスライドに3% H₂O₂ を1滴載せ、菌を白金耳で拾ってよく混ぜ判定を行なった。

5. 電子顕微鏡用試料

各菌株の P₁ および P₃ の TYC 寒天平板培地上の colony を寒天ごと切り取り、4°C 以下に冷却し、同様に冷却した2% Glutaraldehyde を含む0.1M PBS (pH 7.4) 中に浮遊させて固定した後、同 PBS でよく洗浄した。これを4°C 以下に冷却した2% Osmic acid を含む同 PBS 中に浮遊させ、120分間固定した。この二重固定後、colony を寒天面より剝離させたのち、さらに同 PBS でよく洗浄して試料とした。

菌体の表層構造物を観察するために Trypticase soy broth 培養菌体を、前述の colony と同様に2% Glutaraldehyde と2% Osmic acid による二重固定を行なった。

走査電子顕微鏡で観察するために、colony 試料は固定後 alcohol 系列を通して脱水し、3-Methylbutyl Acetate に入れ、臨界点乾燥装置(日立 HCP 型)で乾燥したのち、試料を実体顕微鏡下で寒天平板上の colony 発育状態の位置になるようにアルミニウム台座に銀ペーストで固定し、イオンコーター IBIII 型(エイコーエンジニアリング社製)により金をコーティングして作製した。

透過電子顕微鏡で観察するために、菌体試料は二重固定したものを alcohol 系列を通して脱水した試料を通常

のごとく処理し、一部は Epon 樹脂に包埋したのち100～900Åの厚さの超薄切片を作製し、菌体表層の線毛様構造物を観察し、さらに Periodic Acid Mechenamine Silver Stain (PAM 染色) により莢膜様態を観察した。

6. ゴールデンハムスター感染実験

A. viscosus ATCC 15988および K-TL+ 株を供試株とし、それぞれの菌株から分離継代した P₁ および P₃ 株を用いて感染性を比較した。

ゴールデンハムスターは北里研究所実験動物飼育室で自家繁殖された *A. viscosus* の否定されているものを用いた。ゴールデンハムスターは、生後38日目に10匹ずつ実験群4群、飼料対照群1群の5群に分けた。実験群1～4群には硫酸カナマイシン200μg/ml を含んだ脱イオン水を下記に述べる感染試験前2日間摂取させて口腔フローラを抑制した。

感染には、各供試株の P₁ および P₃ 株の Trypticase soy broth 37°C 24時間培養液を遠心し、菌体を0.75M PBS (pH 7.5) に10⁸ CFU/ml に浮遊した菌液を用いた。すなわち実験群1は、K-TL+ P₁ 株、実験群2は ATCC 15988 P₁ 株、実験群3は K-TL+ P₃ 株、および実験群4には ATCC 15988 P₃ 株の菌液を生後40日より1日おきに3回、ネブプター麻酔下で両方の下顎第一臼歯頰側の近心側歯肉溝内に Root Canal Syringe で1匹当たり0.05～0.1ml を注入した。実験群5は飼料対照群とした。

各実験群には、実験開始と同時に Diet 2000[®] に飼料を切り換え、殺菌脱イオン水と共に自由に摂取させた。飼育条件は温度22～24°C、湿度60%の環境下で、全自動飼育ケージにより、実験期間は40日間とした。

実験終了時に上下顎を摘出し、オートクレーブ処理 (121°C 1～2分間) をして軟組織を除き、更によく水洗した。その後20%硝酸銀に浸し5分間染色し、水洗乾燥したのち、下顎第一臼歯を中心として歯槽骨吸収度⁹⁾および根面ウ蝕様態を調べた。

実験結果

A. viscosus の生化学的諸性状、菌体表層構造物(線毛様物質)の性状などの、本菌の病原性に関与すると思われる諸因子について検討し、次のような結果が得られた。

1. 各菌型の性状

供試菌株のすべてが、TYC 寒天平板上に、Fig. 1 a, b, c に示すような、形態の異なった2～3型の colony を形成した。これらの colony はそれぞれ Fig. に

a. *A. viscosus* K-TL+

b. *A. viscosus* ATCC 15988

c. *A. viscosus* NY-1

Fig. 1 Colonial morphology of *A. viscosus* on TYC agar plate 1. P₁, 2. P₂, 3. P₃

示すように、P₁, P₂ および P₃ 株と呼称して区別し、それぞれの colony 形態の差に基づいて、菌型も P₁, P₂, P₃ 株と名付けた。

P₁ 株: TYC 寒天平板培地上の colony は小さな質的に硬い非水溶性物質に覆われた不規則塊状で固着性の colony を形成した。この性状は各菌株間には差はなく、継代中に P₁→P₂, P₃ 株の自然変異性がみられた。ま

Fig. 2 Scanning electron micrographs of colonies of P_1 and P_3 on TYC agar plates

a, b.: colony of P_3 , extra-cellular substances were not formed

c, d.: colony of P_1 , extra-cellular substances were formed.

た, colony の走査電子顕微鏡による観察では, 菌体外物質の産生とそれが菌体へ付着している様態が明らかに認められた (Fig. 2 c, d)。

P_2 株: TYC 寒天平板培地上で小さな不溶性物質を含んだ菌塊が核のようになり, その周囲の多量のやや粘稠性をもった物質に覆われた種々の多形の colony を形成する。 P_1 と P_3 株との中間的な性状で安定性がとぼしく $P_2 \rightarrow P_1$ の相互間の変異性がみられた。

P_3 株: TYC 寒天平板培地上で, 白色, 正円形, 盛り上がりのある比較的大きな colony を形成する。どの菌株の P_1 株からも自然変異的に出現する。この P_3 株は安定しており, 継代中に自然変異的に P_1 株が出現することはなかった。また走査電子顕微鏡による観察では, Fig. 2 a, b に示すごとく, 菌体外物質の産生はほとんど認められなかった。

P_1 および P_3 株の Trypticase soy broth 培養菌体の超薄切の PAM 染色像では, Fig. 3 に示すごとく両菌型とも菌体周囲に厚い莢膜が認められ両者に差が認められなかった。 P_1 および P_3 株の線毛様構造は, Fig. 4 に示すごとく, P_1 株では菌体より長い線毛様構造が突き出しているが, P_3 株では P_1 株に比べて線毛様構造は少なく, その長さも短かった。

2. Sucrose を加えた培地での付着性

各菌株の P_1 および P_3 株を Sucrose 加 TYC broth に培養し試験管壁への付着性を調べたが, Fig. 5 に示すごとく, P_1 株菌体は試験管壁に強固に付着をしたが, P_3 株菌体はほとんど付着が認められなかった。この現象は全ての供試菌株に共通であった。

3. 生化学的諸性状

各菌株の P_1 および P_3 株の生化学的諸性状は Table

Fig. 3 Electron micrographs of P₁ and P₃ cells of *A. viscosus* stained with PAM.
a. P₁ cells, b. P₃ cells
Both P₁ and P₃ cells had a thick capsule

Fig. 4 Electron micrographs of P₁ and P₃ cells of *A. viscosus*
a. P₁ cells, b. P₃ cells
P₁ cells had longer surface fibrils than P₃ cells

Fig. 5 Adherence of P₁ and P₃ of *A. viscosus* to the glass wall

2に示した。

ATCC 15988 株においては、P₁ と P₃ 株の性状の間に違いは認められなかったが、他の菌株ではメリビオース、ラフィノース、サリシンの分解能に差が認められ、P₃ 株の方が糖分解能のスペクトルの広いことが認められた。

4. ゴールデンハムスター感染実験

A. viscosus ATCC 15988 および K-TL+ 株から分離した P₁ および P₃ 株の歯周疾患誘発能をゴールデンハムスターを用いて調べた。

各実験群の骨標本を計測して得られた歯槽骨吸収度および根面ウ蝕誘発能は、Table 3 および Fig. 6 に示したごとくである。両株の P₁ 株の感染群は強い歯槽骨吸収、および広範な根面ウ蝕が観察され、一方両株の P₃ 株感染群では歯槽骨吸収度も弱く、その測定値は Diet 対照群との間に差異はみられなかった。また、根面ウ蝕

Table 2 Biochemical behaviour of P₁ and P₃ of *A. viscosus*

	ATCC 15988		NY-1		T-6		W IV		K-TL+		K-TS	
	P ₁	P ₃	P ₁	P ₃	P ₁	P ₃	P ₁	P ₃	P ₁	P ₃	P ₁	P ₃
Catalase production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	+	+	±	+	-	+	-	+	±	+	-	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	±	+	-	+	±	+
Salicin	+	+	-	±	-	-	±	+	-	+	-	±
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 3 Alveolar bone resorption and root surface caries in golden hamsters inoculated with P₁ or P₃ of *A. viscosus* ATCC 15988 or K-TL+

Group	No. of Hamsters	Alveolar Bone Resorption (mm)	Root Surface Caries (mm ²)
EXP. 1 K-TL+P ₁	10	24.65±8.49	1.280±1.476
EXP. 2 ATCC 15988 P ₁	10	22.50±7.57	0.925±1.130
EXP. 3 K-TL+P ₃	10	16.35±1.46	0.113±0.298
EXP. 4 ATCC 15988 P ₃	10	15.60±0.94	0.038±0.122
EXP. 5 Diet control	10	15.45±1.85	0.013±0.056

の発生も少なかった。供試した ATCC 15988 株および野性分離 K-TL+株からの P₁ と P₃ 株相互間の感染性の差異は認められなかった。

考 察

A. viscosus の病原因子の解明を試み、常用株および分離野性株合わせて6株を用いて検討を行なったところ、これらのいずれの菌株も Sucrose を5% 含んだ TYC 寒天平板培地上の継代によって、3 type の colony を形成した。*A. viscosus* は、Sucrose から菌体外にレバンを中心とした不溶性多糖体を合成することが知

られており^{10,11)} P₁ と名付けた株は Sucrose を含んだ液体培地で培養すると、増殖した菌体は試験管壁に強固に付着をするが、P₃ と名付けた株はほとんど付着性が認められず、さらに走査電顕像で P₁ 株は菌体外に不溶性の物質を大量に産生し、P₃ 株では認められなかった。これらのことから、この colony 形態の違いは、*A. viscosus* の不溶性多糖体形成能の差を反映しているものと推測され、P₁ 株と名付けた菌型のものは不溶性多糖体形成能の強いもの、逆に P₃ 株は不溶性多糖体形成能の欠質あるいは低下したもの、P₂ 株はその中間的な様態を示すものと思われた。

Fig. 6 Mandibular molars of golden hamsters infected with *A. viscosus* K-TL+P₁ (A) or K-TL+P₃ (B)

A. viscosus は菌体表層に存在する線毛様構造物を介して、上皮細胞や唾液で被覆された Hydroxyapatite に付着する¹²⁾ こと、さらにはこの線毛様構造物の質的、量的な差異に基づく付着性の相違が、*A. viscosus* の病原性に関与するという報告がある¹³⁻¹⁵⁾。今回の研究において、P₁ 株は P₃ 株に比べて長い線毛様構造物を有していた。

ゴールデンハムスターによる感染試験では、P₁ 株はよく定着し比較的短期間に歯槽骨吸収や根面ウ蝕を誘発したが、これに反して、P₃ 株は感染試験では歯槽骨吸収や根面ウ蝕の誘発がほとんどみられないか、軽度であった。これらの結果から、*A. viscosus* の病原性に関与する因子として、不溶性多糖体形成能や長い線毛様構造物の存在が重要な要因と考えられ、それらの要因を通して歯肉縁下菌叢¹⁶⁾や歯肉縁上菌垢¹⁷⁾の優性構成菌となり得るものと思われた。

また、歯周疾患患者より、プロピオン酸培地を用いて分離した株を、TYC 寒天平板上に継代をすると、初代ではほとんどが P₁ 様 colony を示し、継代を重ねるにつれて P₃ 株 colony も認められるようになることから、*A. viscosus* によって発症する歯周疾患は P₁ の性状を有する株により誘発されているものと推定された。

A. viscosus の継代培養により、自然変異的に、P₁、P₂ および P₃ 株の性状を持つ菌株の出現することは、先に報告¹⁸⁾した *S. mutans* の場合とよく似ており、P₁、P₂ および P₃ 株は *A. viscosus* の mutational phase (変異相) とも考えられる。口腔由来細菌の性状として、興味深いのが、研究を行なう際には、絶えず継代培養に伴う変異相の出現を考慮に入れながら進めることが必要のように思われた。

文 献

- 1) Jordan, H. V., Keyes, P. H. and Bellack, S.: Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with *Actinomyces* of human origin. *J. Perio. Res.*, **7**: 21, 1972.
- 2) Irving, J. T., Socransky, S. S. and Heeley, J. D.: Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. *J. Perio. Res.*, **9**; 73, 1974.
- 3) Trummel, C. L. and Casgrove, P.: Stimulation and bone resorption by a factor from *Actinomyces viscosus*. *J. Dent. Res.*, **58**(Special issue A): abstract #106, 1979.
- 4) Hausmann, E., Nair, B. C., Knox, K. W., Broady, K. W. and Wicken, A. J.: Purification and characterization of bone resorption factor in *Actinomyces viscosus*. *J. Dent. Res.*, **58**(Special issue A): abstract #108, 1979.
- 5) Girard, A. E. and Jacius, B. H.: Ultrashellure of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. *Arch. Oral Biol.*, **19**; 71, 1974.
- 6) De Stoppelaar, J. D., van Houte, J. and de Moor, C. E.: The Presence of dextran forming bacteria, resembling *Streptococcus bovis* and *Streptococcus sanguis* in human dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, **12**; 1199, 1967.
- 7) Onishi, M. and Okano, M.: Two filamentous organisms recovered from bacterial plaque material by propionate medium, 口衛誌, **20**; 163, 1970.
- 8) Keyes, P. H. and Jordan, H. V.: Perio-

- dontal lesions in the hamster. III. Findings related to an infectious and transmissible component, Arch. Oral Biol., **9** ; 377, 1964.
- 9) 築山雄次, 米満正美, 岡田昭五郎 : Golden hamster における歯周病誘発性食餌 6PMV の改良と歯槽骨吸収測定 について, 口衛誌, **29** ; 217, 1979.
 - 10) Howell, A. and Jordan, H. V. : Production of extracellular levan by *Odontomyces viscosus*, Arch. Oral Biol. **12** ; 571, 1967.
 - 11) Rosan, B. and Hammond, B. F. : Extracellular polysaccharides of *Actinomyces viscosus*. Infect. Immun. **10** ; 304, 1974.
 - 12) Wheeler, T. T. and Clark, W. B. : Fibril-mediated adherence of *Actinomyces viscosus* to saliva-treated hydroxyapatite. Infect. Immun. **28** ; 577, 1980.
 - 13) Cisar, J. O., Vatter, A. E. and McIntire, F. C. : Identification of the Virulence-Associated Antigen on the Surface Fibrils of *Actinomyces viscosus* T14. Infect. Immun. **19** ; 312, 1978.
 - 14) Clark, W. B., Webb, E. L., Wheeler, T. T., Fischlschweiger, W., Birdsell, D. C. and Mansheim, B. J. : Role of Surface Fimbriae (Fibrils) in the Adsorption of *Actinomyces* Species to Saline-Treated Hydroxyapatite Surfaces. Infect. Immun. **33** ; 908, 1981.
 - 15) Brecher, S. M., van Houte, J. and Hammond, B. F. : Role of Colonization in the virulence of *Actinomyces viscosus* Strains T14-Vi and T14-Av. Infect. Immun., **22** ; 603, 1978.
 - 16) Williams, B. L., Pantalone, R. M. and Sherris, J. C. : Subgingival microflora and periodontitis, J. Perio. Res., **11** ; 1, 1976.
 - 17) Socransky, S. S., Mangeniello, A. D., Propas, D., Oram, V. and Houte, J. van : Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque, J. Perio. Res., **12** ; 90, 1977.
 - 18) Tsurumizu, T., Fukuda, Y., Sato, M. and Ozaki, F. : A study of mutational phase of *Streptococcus mutans* : Isolation and properties of mutational phase of *Str. mutans*, 口衛誌, **32** ; 378, 1982.