原 著

Actinomyces viscosus より抽出した菌体表層 抗原免疫による実験的歯周疾患の予防

Prevention of Experimental Periodontal Disease
by Immunization with Cell Surface Antigen
Extracted from *Actinomyces viscosus*

鶴 水 隆* 中 川 昇* 中 村 直 吉*
清 水 晴 美* 二 上 捷 之* 橋 本 喬*
佐 藤 誠**

Takashi TSURUMIZU*, Noboru NAKAGAWA*, Naoyoshi NAKAMURA*,
Harumi SHIMIZU*, Katsuyuki FUTAKAMI*, Takashi HASHIMOTO*
and Makoto SATO**

Received April 15, 1987; accepted May 1, 1987

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effect of immunization with the cell surface antigen extracted from *Actinomyces viscosus* on periodontal disease of hamsters, which was induced by inoculation with *A. viscosus* K-TL*.

Cell surface substances were released from *A. viscosus* K-TL* cells by stirring them in 0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1M NaCl. These were purified by ammonium sulfate precipitations, gel filtration and ion-exchange chromatography, and fibril-rich substance was obtained. This preparation was used as an immunogen.

Golden hamsters were divided into three groups, immunized, shamimmunized and diet-control groups, and they were immunized in their pouches at 4 and 5 weeks of age. At six weeks of age, they were infected with *A. viscosus* K-TL*, and the establishment of the strain was examined during the experiment. At the end of the experiment, 8 weeks after the last immunization, the hamsters were killed after sampling their saliva and sera, and the mandibulars were evaluated for their alveolar bone loss and root surface caries.

In the immunized group, the mean recovery of *A. viscosus* K-TL* was less, and the occurrence of alveolar bone loss and root surface caries considerably decreased comparing with the sham-immunized group. Both saliva and sera obtained from hamsters in the immunized group also showed more elevated levels of antibody against cell surface antigens than in the sham-immunized group.

The results suggested that immunization with the cell surface antigen might be effective in preventing

* 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)

periodontal diseases induced by *A. viscosus*.

索引用語：歯周疾患予防，免疫，菌体表層抗原，*Actinomyces viscosus*

Key words: Prevention of periodontal disease, Immunization, Cell surface antigen, *Actinomyces viscosus*

緒 言

ヒトの歯周疾患には各種の病型があるが，主な原因は歯周ポケットに蓄積する歯垢中の様々な細菌である。

歯垢中の細菌叢は種々の機序によってグラム陽性菌から内毒素を有する嫌気性グラム陰性菌へ，すなわち，*Streptococci* や *Actinomyces* から *Bacteroides* などの菌種に変わり，それにとまって生体側の応答も菌種と複雑にかかわり合いをもちつつ変化をし，歯周炎の成立から重症の歯周炎へと移行していくものと考えられている^{1,2,3)}。

ヒトおよびハムスターやラットの歯垢から分離される *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*) のなかには，齧歯類に実験的歯周疾患ならびに根面ウ蝕を誘発するものがあることが Jordan ら^{4,5)}の研究から明らかにされている。*A. viscosus* は sucrose から，菌体外に強粘着性のレバンを産生すること，さらに菌体表層に線毛様構造物を有することが知られており，これらが本菌の歯面や歯肉への定着の要因として重要視されている⁶⁻⁸⁾。

我々は，*A. viscosus* による感染発症機構の解明を試み，標準株と分離野性株の変異性，菌体表層構造および細胞付着能と感染発症の関連性について検討を行ってきた^{9,10)}が，その結果，菌体外多糖体形成能が強く，菌体表層に線毛様構造物を備える株ほど病原性の強いことを見出した。特に，線毛様構造物は，Cisar ら¹⁰⁾も述べているごとく，*A. viscosus* の凝集や歯牙あるいは上皮細胞への付着に重要な役割を演じているように思われる。そこで今回は，分離野性株の一つで感染能の高い *A. viscosus* K-TL⁺ 株を供試菌とし，その菌体から線毛様構造物を含む菌体表層成分を抽出精製し，それを免疫原としてハムスターに接種し，*A. viscosus* の口腔内定着と根面ウ蝕ならびに歯槽骨吸収発生に及ぼす免疫予防効果を調べたので報告する。

材料および方法

1. 使用菌株

A. viscosus K-TL⁺ 株

2. 使用培地

TTY 培地

トリプトケースペプトン (BBL) 680g

トリプトース (Difco) 120g

イーストエキストラクト (Difco) 120g

以上を精製水3,000ml で加温溶解し，17,000ml の精製水中でセロハンチューブにより2日間透析した。この透析外液に，塩化ナトリウム1,000g リン酸ニカリウム500g を加え，溶解後精製水を加え全量を20,000ml とし，115°C 20分間滅菌し，別滅菌したぶどう糖500g を加えた。

3. 菌体表層成分の抽出および精製法

A. viscosus K-TL⁺ 株を TTY 培地 20,000ml に 37°C 24時間培養し，この培養液を8,000r.p.m. 20分間遠心して得られた沈殿部分を 1M-NaCl 加0.05M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.6 に浮遊させ，20Kc 3分間超音波処理して菌塊をほぐしたのち，同緩衝液で2,000ml に希釈し，4°C 72時間撪拌を行ない，これを8,000r.p.m. 15分間遠心して得られた上清に結晶硫酸アンモニウムを60%飽和になるように加えた。撪拌溶解後8,000r.p.m. 15分間遠心して得た沈殿をセロハンチューブに入れ同緩衝液中で透析を行なった。

透析内液を8,000r.p.m. 20分間遠心し，その上清を Sephacryl S-300 を充填した Bio Process カラム (Pharmacia) 11.29×79cm にかけて，ゲル濾過を行なった。溶出液は同上緩衝液，流速13ml/分，分画サイズは200ml とした。得られた各画分は，同方法で抽出精製した菌体表層抗原に対する家兔免疫血清を用いてゲル内沈降反応を行ない，反応を示した画分をプールした。この画分の凍結乾燥を行ない，適量の同緩衝液で溶解後，同緩衝液で透析を行なった。

透析内液80ml を Sephacryl S-300 で再分画を行なった。即ちカラムは，K50/100 (Pharmacia) 5×79cm を用い，溶出液は同緩衝液で，流速2ml/分，分画サイズ30ml で分画した。各画分を同様にゲル内沈降反応によって調べた。反応が陽性の画分を混合した約800ml を凍結乾燥したのち0.05M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.6 80ml に溶解し，冷水および Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) で透析を行なった。

透析内液を10ml ずつ Q-Sepharose カラム K50/30

(Pharmacia) 5×10cm につけ、溶出液0.05M Tris-HCl-0.05M Tris-HCl 1M NaCl, 流速2ml/分, 分画サイズ10ml の直線型塩濃度勾配によって溶出した。溶出画分をやはりゲル内沈降反応によって調べ、陽性画分を混合した約600ml を凍結乾燥し、これを50ml の0.9%塩化ナトリウム溶液で溶解し、同液で透析を行なったものを菌体表層成分とした。

4. ハムスター感染抑制試験

菌体表層成分をタンパク濃度20μg/ml になるように0.01M PBS pH 7.2に希釈し、これと水酸化アルミニウムゲルを100μg/ml になるように加えた沈降型抗原を免疫原とした。

ゴールデンハムスター（以後ハムスター）は北里研究所実験動物飼育室で自家繁殖させたもので、*A. viscosus* は否定されているクローズドコロニーを用いた。

ハムスターは、生後4週目に I. Diet 対照群10匹, II. 非免疫群10匹, III. 免疫群10匹の3群に分け、III. 免疫群は右頬嚢部皮下にそれぞれ上記免疫原を0.1ml/匹ずつ注射した。さらに1週間後に左頬嚢部皮下に0.1ml/匹に追加免疫を行なった。なおII. 非対照群には、同量の100μg/ml 水酸化アルミゲル加0.01M PBSを同様に注射した。

生後6週目にIIおよびIII群のハムスターには、次に述べるような方法で *A. viscosus* 菌液を接種した。すなわち、0.5%イーストエキストラクト加トリプトケースソイブローズで37°C 24時間培養した *A. viscosus* K-TL⁺ 株を10⁸ CFU/ml になるように0.01M PBS pH 7.0に浮遊させ、Root Canal Syringe で下顎第一臼歯頰側近心歯肉溝内にネプタール麻酔下で0.05ml ずつ注入した。さらに1週後に同濃度の菌体を再度同様に注入した。

第一回目の菌接種後より、飼料は Diet 2000¹¹⁾ に換え、飲料水と共に自由に摂取させた。温度22~24°C, 湿度50~60%の条件下で飼育し、実験期間は第一回の免疫後9週間とした。

接種菌株の定着様態を調べるため、第二回目の菌接種後1週および3週目に、綿棒で下顎左右側臼歯頸部をよく擦過し、それぞれの希釈液を TYC 寒天平板培地¹²⁾ と Propionic acid agar¹³⁾ に培養後、菌数を算定した。

5. 抗体価測定

実験終了時に、体重100g 当たり0.75%硫酸ピロカロピン0.1ml を腹腔に注射し、各個体別に唾液を採取したのち、全採血して血清を分離した。

唾液および血清中の保有抗体価は次のごとく調製した

感作赤血球凝集反応によって判定した。

5%グルタルアルデヒド固定羊赤血球に1/20,000タニン酸溶液を加え、37°C 10分間反応させたのち遠心し、生理食塩水で遠心洗浄して5%生理食塩水浮遊液とした。これに *A. viscosus* K-TL⁺ 抽出菌体表層抗原を加え37°C 30分間攪拌して吸着せしめ、遠心後3回生理食塩水で洗浄したのち0.5%菌体表層抗原吸着羊血球とした。反応は常法に従って希釈唾液および血清に等量の感作血球を加え室温60分後に判定した。

6. 歯槽骨吸収度ならびに根面ウ蝕の測定

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、軟組織を除去後ブラシでよく水洗し、これを20%硝酸銀で5分間染色し水洗して乾燥し、骨標本とした。

測定は、両下顎第一臼歯を実体顕微鏡下(×20)で築山ら¹⁴⁾の方法によって、オリンパスマイクロメーターを用い、エナメル、セメント境より歯槽骨縁までの長さを測定し、歯槽骨の吸収度とした。根面ウ蝕は、その面積を方眼マイクロメータ(1方眼0.5×0.5mm)で測定した。

実験結果

1. 菌体表層成分(線毛成分)の抽出と精製

A. viscosus K-TL⁺ 株より抽出した菌体表層成分を Sephacryl S-300 によるゲル濾過および Q-Sepharose イオン交換クロマトグラフィーによって精製を行なった。

Sephacryl S-300 分画によって、Fig. 1 に示した如く、線毛様構造物に富む成分が回収され、更に Sephacryl S-300 で再分画したのち Q-Sepharose による直線型塩濃度勾配分画で Fig. 2 に示した如く、Fraction 48~55 に線毛様構造物が分画回収された。この分画の Phast System (Pharmacia Fine Chemicals) 電気泳動による泳動像は、Fig. 3 に示した如くで、今回得られた線毛様構造物の分子量は、およそ150,000前後と推定された。

菌体表層抗原家兔免疫血清によるゲル内沈降反応像は Fig. 4 に示した如くで、Q-Sepharose 分画像には1本の沈降線が認められる。

2. ハムスター感染抑制試験

(1) 菌の定着様態

接種した *A. viscosus* の口腔定着様態を調べた結果、Table 1 に示したごとく、接種1週間後では、III. 免疫群にも、かなりの菌の定着が確認されたが、3週間後にはIII. 免疫群では、検出率が低下していた。

(2) 歯槽骨吸収度および根面ウ蝕

Fig. 1 Electron micrograph of cell surface substance of *A. viscosus* K-TL⁺ purified by gel-filtration chromatography on Sephacryl S-300. Numerous fibrils can be seen. (×86,000)

Fig. 2 Elution profile of the fibril-rich gel filtration fraction by Q-Sepharose column chromatography

Table 1 Recovery of *A. viscosus* K-TL⁺ inoculated into hamsters

Group	1 week	3 week
I. Diet control	0	0
II. Sham-immunized	20.8±24.8*	23.2±19.2
III. Immunized	11.2± 9.3	1.8± 1.6

*: Recovery was shown as mean % (No. of *A. viscosus* colonies/No. of total colonies)±S.D.

Fig. 3 Electrophoresis of cell surface substance extracted from *A. viscosus* K-TL⁺. (a) The unfractionated substance, (b) The gel filtration fraction of (a) by Sephacryl S-300, (c) The gel filtration fraction of (b) by Sephacryl S-300, (d) The fraction from Q-Sepharose ion-exchange chromatography of (c)

Fig. 4 Immunodiffusion analysis of the cell surface substance extracted from *A. viscosus* K-TL⁺. The center well contained antiserum against the cell surface substance extracted from *A. viscosus* K-TL⁺. The outer wells contained antigens in (1) unfractionated cell surface substance, (2) fraction from Sephacryl S-300 chromatography, and (3) fraction from Q-Sepharose chromatography

Table 2 Effect of immunization with cell surface substance extracted from *A. viscosus* K-TL⁺ against alveolar bone resorption and root surface caries in hamsters

Group	No. of hamsters	Alveolar bone resorption (mm)	Root surface caries (mm)
I. Diet control	10	15.10±2.49*	0.113±0.206*
II. Sham-immunized	10	27.20±9.74	1.925±1.744
III. Immunized	10	14.35±2.85	0.075±0.164

*: Mean ± S.D.

(A)

(B)

Fig. 5 Mandibular molars of hamsters infected with *A. viscosus* K-TL⁺
(A) Sham-immunized, (B) Immunized with the cell surface substance extracted from *A. viscosus* K-TL⁺

Table 3 Antibody levels in saliva and serum against cell surface substance extracted from *A. viscosus* K-TL⁺

Group	No. of hamsters	Saliva	Serum
I. Diet control	10	4*	4
II. Sham-immunized	10	4	4
III. Immunized	10	4-16	8-32

*: Highest dilution showing agglutination.

実験終了時に摘出して処理した骨標本を、実体顕微鏡下(×20)で観察した。歯槽骨吸収度および根面ウ蝕の様態は、Table 2, Fig. 5 に示すごとく、免疫群では、いずれも発生が顕著に抑制された。

(3) 唾液および血清中抗体価

実験終了時に採取した唾液および血清中の保有抗体について、感作赤血球反応によって測定した。結果はTable 3 に示すごとく、免疫群は唾液4~16×、血清中8~32×の保有抗体価を示したが、対照群およびDiet対照群ではいずれも4×以下であった。

考 察

A. viscosus は、ヒトの歯頸部歯垢より高率に分離され¹⁵⁾、ハムスターやラットなどの実験動物に歯周疾患を誘発することなどから、歯周疾患の病原菌の一種と考えられている。

A. viscosus の歯周疾患発症機作としては、菌の産生する骨吸収促進物質なども報告されている¹⁶⁾が、一般的には、歯周組織に対する直接的な障害作用よりも、むしろ菌体成分に対する生体の免疫応答の結果であると考えられている^{17,18)}。

ところで、*A. viscosus* の歯牙表面への付着能は、本菌の局所定着とそれに引き続く病原性の発揮に関連して注目されるところであり、特に、菌体表層に存在する線毛様構造物(*Fibrils* あるいは *Fimbriae*)が本菌の歯牙表面への付着や、ストレプトコッカス属との菌種間凝集に関与していることが明らかにされ¹⁹⁻²¹⁾、病原性を欠いた変異株では、線毛様構造物が量的に減少していることが報告されている²²⁾。さらに *A. viscosus* は、ショ糖から菌体外に粘稠な多糖体を形成し、この事は、本菌の

歯牙表面への強固な付着に関与していると考えられる²⁰⁾。著者らが⁹⁾、先に報告した強い病原性を示す *A. viscosus* P₁ 株も、ほとんど病原性を示さない *A. viscosus* P₃ 株に比べて、長い線毛様構造物と、多糖体と思われる菌体外物質の強い産生能を有していた。

今回、著者らは *A. viscosus* K-TL⁺ 株より、菌体表層成分の抽出、精製を試みたが、本成分は高張食塩を加えた緩衝液でよく菌体から遊離され、ゲル濾過法とイオン交換クロマトグラフィーで線毛様構造物に富む菌体表層成分を分画することができた。この画分を抗原として、ハムスターに免疫を行なったところ、*A. viscosus* K-TL⁺ 株を口腔内に接種しても、非免疫群に比べて、菌の口腔内定着が阻害され、歯槽骨の吸収や歯根ウ蝕の発生が著しく抑制された。免疫群では、本菌に対する唾液中抗体価や血清中抗体価が上昇を示していたことから、免疫により生じたこれらの抗体が、菌の付着因子である線毛様構造物をマスクすることにより菌の定着阻害が生じた結果と思われた。

今回得られた線毛様構造物に富む菌体表層成分と先に述べた Cisar²⁰⁾ や Wheeler²¹⁾ らの抽出した線毛様構造物との差は、抽出法等が異なるため、明らかではないが、*A. viscosus* の口腔内定着のため、菌体の表層成分が密接に関わりあっており、その成分を免疫原として、歯周疾患の予防の可能性が示唆された。

文 献

- 1) 村山洋二：歯肉溝細菌の歯周病原性、歯界展望、57；103, 1981.
- 2) 高添一郎：黒色素産生性 *Bacteroides* の病原性、日細誌、40；459, 1985.
- 3) 奥田克爾：歯周疾患の病原菌とその免疫 (Part I)、歯科ジャーナル、13；476, 1981.
- 4) Jordan, H. V. and Keyes, P. H.: Aerobic, gram positive filamentous bacteria as etiologic agents of experimental disease in hamsters, *Archs Oral Biol.*, 9；401, 1964.
- 5) Jordan, H. V. and Hammond, B. F.: Filamentous bacteria isolated from human root surface caries, *Archs Oral Biol.*, 17；1333, 1972.
- 6) McBride, B. C. and Bourgeau, G.: Dextran induced aggregation of *Actinomyces viscosus*, *Archs Oral Biol.*, 20；837, 1975.
- 7) Girard, A. E. and Jacius, B. H.: Ultrastructure of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*, *Archs Oral Biol.*, 19；71, 1974.
- 8) 鶴水 隆, 橋本 喬, 佐藤 誠, 中村 亮：*Actinomyces viscosus* の病原性因子、口腔衛生会誌、33；166, 1983.
- 9) 鶴水 隆, 中川 昇, 橋本 喬, 佐藤 誠：*Actinomyces viscosus* の変異性に関する研究、口腔衛生会誌 (投稿中).
- 10) Cisar, J. O. and Vatter, A. E.: Surface fibrils (fimbriae) of *Actinomyces viscosus* T14V, *Infect. Immun.*, 24；523, 1979.
- 11) Keyes, P. H. and Jordan, H. V.: Periodontal lesions in the hamster. III. Findings related to an infectious and transmissible component, *Arch. Oral Biol.*, 9；377, 1964.
- 12) 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.
- 13) Onisi, M. and Okano, M.: Two filamentous organisms recovered from bacterial plaque material by propionate medium, *J. Dent. Health*, 20；163, 1970.
- 14) 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、口腔衛生会誌、29；217, 1979.
- 15) 米満正美, 佐藤 誠, 岡田昭五郎, 大西正男：*Streptococcus mutans* の年齢別歯面分布と二、三の口腔内常在菌の口腔内分布に関する研究、口腔衛生会誌、32；370, 1982.
- 16) Hausman, 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.
- 17) 山上弘志：ヒト歯垢ならびに *Actinomyces viscosus* および *Actinomyces naeslundii* 細胞壁の生物学的諸活性、阪大歯学誌、23；78, 1978.
- 18) Charon, J. C., Toto, P. D. and Gargiulo, A. W.: Activated macrophages in human periodontitis, *J. Perio.*, 52；328, 1981.
- 19) Cisar, J. O., Sandberg, A. L. and Mergenhagen, S. E.: The function and distribution of different fimbriae on strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*, *J. Dent. Res.*, 63；393, 1984.
- 20) Cisar, J. O.: Coaggregation reactions between oral bacteria: Studies of specific cell-to-cell adherence mediated by microbial lectins, *Host-Parasite Interactions in Periodontal Diseases*, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1982, p. 121.
- 21) Wheeler, T. T. and Clark, W. B.: Fibril-mediated adherence of *Actinomyces viscosus* to saliva-treated hydroxyapatite, *Infect.*

- Immun., 28 ; 577, 1980.
- 22) Cisar, J. O., Vatter, A. E. and McIntire, F. C. : Identification of the virulence-associated antigen on the surface fibrils of *Actinomyces viscosus* T14V, Infect. Immun., 19 ; 312, 1978.
- 23) 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.