短 報

Actinobacillus actinomycetemcomitans の血清型とヒト歯肉縁下歯垢中の血清型分布

Serotype of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and Its Distribution in Human Subgingival Plaque

萬好都美恵*, 佐藤 誠*, 中村 亮*
渋谷 辰巳**, 小此木博**, 鶴水 隆**

Tomie MAN-YOSHI*, Makoto SATO*,
Ryo NAKAMURA*, Tatsumi SHIBUSAWA**,
Hiroshi OKONOGI** and Takashi TSURUMIZU**

結 言

Actinobacillus actinomycetemcomitans (A.a.) はヒトの歯肉縁下歯垢から分離され、若年型歯周炎の病原菌として注目されている¹⁾。同菌の血清学的性状については、Zambon ら²⁾ が三つの血清型 (a, b, c) の存在を指摘し、最近 Koga ら³⁾ は、同菌の血清型特異性を示す抗原が莢膜に存在する糖抗原であることを報告するとともに、その化学構造についても明らかにした。

しかし、Zambon ら²⁾ の報告では、ヒトの口腔より分離される A.a. は、a 型あるいは b 型が主で、c 型は少ないとされているのに対し、日本人における A.a. の血清型を調べた研究では、c 型が主に検出され、b 型は全く認められず、しかも分離株の半数近くは、いずれの血清型にも属さなかったことが報告されている⁴⁾。また、同時に、血清型を決定するために用いる抗原の反応性が、抗原作製法により異なることも示唆されている⁴⁾。

そこで今回、あらためて、A.a. の血清学的性状について検討を行うとともに、ヒトの歯肉縁下歯垢中より採取した同菌の血清型分布状況について調査を行ったので報告する。

* 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)

** 北里研究所

** Kitasato Institute

1991年5月31日受付

材料ならびに方法

用いた菌株は、A.a. の標準菌株として ATCC 29523, ATCC 43718 (Y 4), ATCC 43719 の3株と今回新たに分離した48菌株である。

本学附属病院予防歯科外来を訪れた歯周炎患者 (29歳~62歳) 12名より滅菌ペーパーポイントを用いて、深さ4mm以上(平均6.3mm)の歯周ポケット内歯肉縁下歯垢を採取し、A.a. の分離を試みた。採取した歯垢は、TSBV 寒天培地⁵⁾にて37°C、48~72時間嫌気培養を行い、発育した菌株の中から、A.a. の標準株と相似の colony 形態とグラム陰性を示す菌株を選び、さらに、カタラーゼ陽性で、免疫拡散法にて後述のオートクレープ抽出抗原が抗 A.a. 抗体 (抗29523, 抗43718, 抗43719抗体) と反応を示したものを A.a. と同定し、実験期間中 BHI 寒天培地に継代保存した。

A.a. ATCC 29523 (a 型²⁾), ATCC 43718 (Y 4, b 型²⁾), ATCC 43719 (c 型²⁾) の全菌体に対する家兎免疫血清は、先に *Streptococcus salivarius* に対する抗血清作製時に用いた方法⁶⁾ に準じて作製した。即ち、菌体を60°C、30分間加熱処理し、生理食塩水に浮遊させたもの (O.D. 550nm=1.0) を免疫用抗原として家兎の耳静脈に接種し、抗血清を作製した。A.a. の標準株及び分離株の免疫拡散法用抗原は、それぞれの菌株ごとに、全菌体を120°C、15分間オートクレープ処理を行う Rantz and Randall 法⁷⁾ (オートクレープ抽出抗原) と亜硝酸ナトリウムを用いる Kholy らの方法⁸⁾ (Kholy 法抽出抗原) の二つの方法で抽出した。免疫拡散法は1.2% (W/V) Noble agar の寒天平板を用いて実施した。

結 果

歯周炎患者12名 (男3名, 女9名) 中 A.a. が検出されたのは7名 (男2名, 女5名, 58.3%) であった。この7名の歯周炎患者の歯周ポケット12部位より各々1菌株から9菌株分離した計48菌株と上記 A.a. 標準3菌株を被験株とした。

初めに、A.a. 標準株3株よりオートクレープ抽出抗原及び Kholy 法抽出抗原をそれぞれ作製し、対応する3種類の抗血清とゲル内沈降反応を行い、抗原作製法の違いに基づく反応性の異同を検討した。

血清型 a の未吸収抗血清との反応において、Kholy 法抽出抗原では血清型 b 及び c は沈降反応を示さず、血清型 a とのみ複数の沈降線を生じた。一方、オートクレープ抽出抗原では、血清型 a の特異抗原抗体反応と見られ

Fig. 1 Immunodiffusion reaction of extracts from whole cells of *A. actinomycetemcomitans* with anti-*A. actinomycetemcomitans* sera. Well 1, Kholy extract of ATCC 29523, Well 2, autoclave extract of ATCC 29523, Well 3, Kholy extract of ATCC 43718, Well 4, autoclave extract of ATCC 43718, Well 5, Kholy extract of ATCC 43719, Well 6, autoclave extract of ATCC 43719, Well a, anti-ATCC 29523 serum (serotype a), Well b, anti-ATCC 43718 serum (serotype b), Well c, anti-ATCC 43719 serum (serotype c).

る沈降線は認められるものの、血清型bの抗原との間にも共通な沈降線が形成された (Fig. 1A)。

血清型bの未吸収抗血清に対しては、いずれの抗原作製法においても血清型a及びc抗原は反応を示さず、血清型bの抽出抗原のみ沈降線を生じた (Fig. 1B)。

血清型cの未吸収抗血清は、血清型a, b, cの各々2種類の抽出抗原の全てと沈降線を形成した (Fig. 1C)。そこで血清型cの特異血清を得るため、ATCC 29523, ATCC 43718の凍結乾燥菌体で吸収操作を行い、Kholy法抽出抗原において血清型a及びbと沈降反応を示さなくなるまで吸収操作を繰り返した。得られた血清型c特異抗血清は、Kholy法抽出抗原では血清型cとのみ反応を示したが、オートクレーブ抽出抗原では血清型c抗原に特異抗原抗体反応とみられる明瞭な沈降線が認められるものの、血清型a, b抗原とも沈降線を生じた。

被験者7名より分離された48菌株について血清型に分類した結果を Table 1 に示す。Kholy法抽出抗原による分類では、血清型aは21菌株、血清型bは認められず、血清型cは19菌株、血清型a及びcの両方に反応したもの1菌株、血清型a, b, cのいずれとも反応しなかったもの7菌株であった。一方、オートクレーブ抽出抗原によれば血清型a, 血清型bは認められず、血清型cが23菌株、血清型a及びcの両方に反応したもの25菌株であった。

また、同一被験者より分離された菌株は、部位が異なっても同一の血清型に分類される傾向がみられた。

Table 1 *A. actinomycetemcomitans* serotyping using Kholy extracts or autoclave extracts as antigens

Serotype	Number of strains (%)	
	Kholy extract	autoclave extract
a	21 (43.7)	0 (0.0)
b	0 (0.0)	0 (0.0)
c	19 (39.6)	23 (47.9)
a + c	1 (2.1)	25 (52.1)
no-reaction	7 (14.6)	0 (0.0)
total	48	48

考 察

A.a. の血清型特異抗原は糖より構成されることが報告されており⁹⁾、超音波抽出抗原やオートクレーブ抽出抗原を用いた血清型分類が示されてきた。今回、我々は、多糖体抗原の抽出法である Kholy 法に基づいて *A.a.* の抗原抽出を行い、オートクレーブ抽出抗原と比較検討を行った。

A.a. の血清型を判定する際に、Kholy法抽出抗原を用いた場合、血清型aおよびbの判定には特に血清の吸収操作を必要とせず、血清型cの判定に際しても、オートクレーブ抽出抗原を用いる場合に比べて、吸収操作の容易なことが認められた。

今回作製した血清を用いて分離株の血清型を判定した

ところ, Kholy 法抽出抗原を用いた場合では, 48菌株中40菌株(83.3%)が血清型aあるいはcに分類できたのに比べ, オートクレープ抽出抗原を用いた場合には1つの血清型に特定できたのは血清型cの23菌株(47.9%)のみで, 残り25菌株(52.1%)は血清型a, cの両方に反応し, 一つの血清型に特定することができなかった。Kholy 法抽出抗原のうちいずれの血清型とも反応しなかった7菌株は, オートクレープ抽出抗原では3菌株が血清型cに, 4菌株が血清型a, cの両方に反応していた。

これらより, 2種類の抽出抗原を比較してみると, オートクレープ抽出抗原では血清型c抗血清に対する反応性が, Kholy 法抽出抗原より高く, 血清型a, c両抗原も非特異的反応を示すようである。従って, オートクレープ抽出抗原に基づいて血清型分類を行った場合, Kholy 法によれば血清型aに分類されるべき菌株を血清型cに分類してしまい, 血清型cの検出頻度が実際よりも高く呈示される可能性がある。

また, 今回の研究ではどちらの抽出抗原を用いても血清型b抗血清と反応する分離菌株はみられなかった。欧米では, Juvenile Periodontitis あるいは Adult Periodontitis に罹患している患者の口腔内より分離されるA.a. の血清型の頻度は血清型bが優勢であるという報告⁹⁾がされているが, わが国においてはこれらの関係は必ずしも明らかでないことが認められた。

文 献

- 1) Slots, J. and Schonfeld, S. E.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis, In Periodontal Disease: Pathogens & host immune responses, Edited by Hamada, S., Holt, S. C. & McGhee, J. R., Quintessence Publishing Co., Tokyo, 1991, p.53.
- 2) Zambon, J. J., Slots, J. and Genco, R. J.: Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease, *Infect. Immun.*, **41**; 19-27, 1983.
- 3) Koga, T., Nishihara, T., Amano, K., Takahashi, T., Nakashima, K., Ishihara, Y. and Shibuya, N.: Chemical and biological pro-

perties of cell-surface components of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, In Periodontal disease: Pathogens & host immune responses, Edited by Hamada, S., Holt, S. C. & McGhee, J. R., Quintessence Publishing Co., Tokyo, 1991, p.117.

- 4) 扇 正一, 鴨井久一: ヒト歯肉縁下プラーク中の *Actinobacillus actinomycetemcomitans* とその血清型分布, 日歯周誌, **32**; 450-469, 1990.
- 5) Slots, J.: Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *J. Clin. Microbiol.*, **15**; 606-609, 1982.
- 6) 佐藤 誠, 山崎都美恵, 鶴水 隆, 小此木博, 橋本 喬, 渋谷辰巳: *Streptococcus salivarius* の生化学的及び血清学的性状, 口腔衛生会誌, **40**; 325-330, 1990.
- 7) Rantz, L. A. and Randall, E.: Use of autoclaved extract of hemolytic *Streptococci* for serological grouping, *Stanford Med. Bull.*, **13**; 290-291, 1955.
- 8) Kholy, A. E., Wannamaker, L. W. and Krause, R. M.: Simplified extraction procedure for serological grouping of beta-hemolytic *Streptococci*, *Appl. Microbiol.*, **28**; 836-839, 1974.
- 9) Asikainen, S., Lai, C. H., Alaluusua, S. and Slots, J.: Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease, *Oral Microbiol. Immunol.*, **6**; 115-118, 1991.

索引用語: アクチノバシラス・アクチノミセテムコミタンス, 血清型, 分布

Key words: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Serotype, Distribution