種々の口腔常在菌の培養濾液の示す 好中球に対する走化活性

三宅 洋一郎 福井 一博
橋本 加代子 守山 隆章

広島大学歯学部 口腔細菌学教室*

〔受付：昭和54年9月28日〕

抄録：歯周病の発症において、歯肉溝に存在する白血球、特に好中球の役割は重要であると思われる。口腔内では歯垢、歯肉溝、唾液中に好中球に対する走化活性が認められている。その中には細菌由来の因子があると思われるが、この報告では口腔細菌のうちどのような種類の菌が活性を持っているかを測定した。種々の口腔常在菌の培養濾液について、アガロースプレート法により走化活性を測定した結果、調べた19株のうち、*S. mutans* 5株、*S. sanguis* 2株、*S. salivarius*、*L. casei*、*L. plantarum*、*L. acidophilus*、*C. diphtheroides*、*C. parvum* の培養濾液中に強い活性が認められた。

緒言

歯周組織の炎症の発症には歯垢形成が必要であり、歯垢中の細菌の産生する酵素、走化性因子、抗原が重要な役割をはたしている^{1,2)}。歯肉溝液中には白血球が存在しているが、その数と炎症の程度には正の相関があり、その多くは好中球であるといわれている³⁻⁵⁾。実験的に好中球減少症をおこすと、歯肉溝液量及びその中のリソゾーム酵素活性が減少することが知られており⁶⁾、歯周病発症における好中球の役割が注目されている²⁾。口腔内における好中球に対する走化活性は、歯垢^{7,8)}、歯肉溝液⁹⁾、唾液^{10,11)}に認められている。

好中球走化性因子には、補体、血清、白血球、細菌由来のもの、外来性タンパク質及びその分解産物、合成 *N*-formylpeptide 等多くの種類のものがある¹²⁾。このうち細菌由来の因子は、*Staphylococcus albus*、*Streptococcus faecalis*、*Diplococcus pneumoniae*、及び *Escherichia coli*¹³⁾、*Staphylococcus aureus*¹⁹⁾、*Candida albicans*¹⁴⁾、*Actinomyces viscosus* 及び *Streptococcus salivarius*¹⁰⁾ の

培養上清中に証明されており、*Treponema denticola*、*Actinomyces viscosus*、*Bacteroides melanogenicus*、*Capnocytophage ochraceus* の菌体抽出液にも活性が認められている¹⁵⁾。

この報告は、我々の利用しえた19株の口腔常在菌について、その培養濾液中のヒト好中球に対する走化活性を測定したものである。

材料と方法

A. 供試菌及び培養濾液の調整

用いた菌株は、*Streptococcus mutans* HS-6、AHT、BHT、Ingbritt 及び OMZ-176 ; *S. sanguis* ATCC 10556 及び ATCC 10557 ; *S. salivarius* ATCC 9222 ; *S. mitis* ATCC 903、ATCC 6249 及び ATCC 9811 ; *Actinomyces viscosus* ATCC 15987 ; *Clostridium sporogenes* 213 (大阪大学微生物病研究所より分与) ; *Corynebacterium diphtheroides* 27-64 及び *C. parvum* 3085 (岐阜大学医学部微生物学教室より分与) ; *Lactobacillus casei* ATCC 7469、*L. plantarum* ATCC 8014、*L. acidophilus* YIT 0066 (ヤクルト研究所より分与) ;

Neutrophil chemotactic activity of culture filtrates of various oral bacteria.

Yoichiro MIYAKE, Kazuhiro FUKUI, Kayoko HASHIMOTO and Takafumi MORIYAMA (Department of Microbiology, Hiroshima University School of Dentistry, Hiroshima)

* 広島市霞 1-2-3 (〒734)

Jap. J. oral Biol., 21 : 689-692, 1979.

Veillonella parvula ATCC 17742. また、すでにその上清中に活性の知られている、*Escherichia coli* K-12を対照として用いた。培地は、*Streptococci*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *Corynebacteria* は Berman の培地²⁰⁾, *Lactobacilli* は SL-broth²¹⁾, *Veillonella* は V23A 培地²²⁾, *E. coli* は minimal medium²³⁾を用いた。菌は一夜、前培養したものを、それぞれ13×100mmの試験管中の培養液に接種し、37°Cで静止期に入る直前まで培養した。pore size 0.45 μ m Millipore filter (No. HAWPO 25, Millipore corp., USA) により濾過した培養濾液を標品として用いた。なお濾液は-20°Cに凍結し、活性測定直前に融解した。

B. 好中球走化活性の測定

活性の測定はアガロースプレート法^{16,17)}を用い、好中球はヒト末梢血より分離した。

1. ヒト好中球浮遊液の調整

ヘパリンを加えた健康成人の静脈血10mlに生理食塩水に溶かした6%デキストラン(分子量264,000 Sigma chem. Co., USA) 3mlを加え、37°Cで30分静置し、赤血球を沈降させた。分離した上清を3~4mlのLymphoprep (Nyegaard and Co., Norway) 上に静かに重層し、20°Cで400×g 30分遠心した。沈渣の好中球中に混入した赤血球を溶血により除き、M-199 (Grand Island Biological Co. USA) で洗浄後、濃縮し、1~2×10⁸/mlの浮遊液とした。

2. アガロースプレートの作製

1%アガロース(A-45, 半井化学薬品, 日本), 10%熱非動化牛胎児血清(Grand Island Biological Co., USA) 及び NaHCO₃ (375 μ g/ml) を含むM-199, 5mlを、組織培養用プラスチックシャーレ(60×15mm, No. 302, Sterilin limited, England) 中で硬化させ、冷却後直径2.3mmのwellを2.3mm間隔で直線上に3個ステンレスカッターにより作製したものを1組とし、都合8組をシャーレの中心より周囲に向かって放射状に作製した。測定前30分間37°Cで5%CO₂気流中にインキュベート後、well内に出て来た水分を吸引し測定に用いた。

3. 好中球遊走試験

3個1組のwellのうち中央のwellに好中球

浮遊液、外側のwellに培養濾液、内側のwellに対照としてそれぞれの細菌培養に用いた培地をそれぞれ5 μ lずつ入れ、5%CO₂気流中で37°C2時間インキュベートした。反応終了後、倒立顕微鏡で好中球の標品へ向っての遊走距離(A)と対照へ向っての遊走距離(B)を計測し、Chemotactic differential (A-B)とChemotactic index (A/B)を算出した。

結 果

まず菌の増殖時期と培養濾液中の活性との関係を調べるために、*S. sanguis* ATCC 10556を用いてOptical densityと活性とを測定したのが図1である。図に示すように菌の増殖と共に活性は増加し、静止期に入る前で最大活性を示すことがわかったので、材料と方法に示したように、静止期直前まで培養し濾過を行った。

表1は、種々の口腔常在菌培養濾液中の走化活性を測定した結果である。用いたすべての菌が強弱の差はあるが、その培養濾液中に活性を示した。*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *C. diphtheroides*, *C. parvum*, *E. coli*はChemotactic index 2以上の強い活性を示し、Chemotactic differentialも500 μ m以上であったが、*V. parvula*, *A. viscosus*,

図1 *S. sanguis* ATCC 10556の増殖と培養濾液中の走化活性

表 1 種々の口腔常在菌培養濾液のヒト好中球に対する走化活性

Bacteria	Chemotactic Index	Chemotactic Differential (μ m)
<i>S. mutans</i> HS-6	2.4	750
AHT	2.4	730
BHT	2.0	550
Ingbritt	2.4	760
OMZ-176	2.5	790
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	2.2	670
ATCC 10557	2.2	580
<i>S. salivarius</i> ATCC 9222	2.2	640
<i>S. mitis</i> ATCC 903	1.7	360
ATCC 6249	1.4	240
ATCC 9811	1.9	450
<i>A. viscosus</i> ATCC 15987	1.2	130
<i>L. casei</i> ATCC 7469	2.4	730
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	2.5	780
<i>L. acidophilus</i> YIT 0066	2.5	810
<i>V. parvula</i> ATCC 17742	1.4	180
<i>C. sporogenes</i> 213	1.3	150
<i>C. diphtheroides</i> 27-64	2.1	660
<i>C. parvum</i> 3085	2.4	720
<i>E. coli</i> K-12	2.4	580

C. sporogenes は Chemotactic index 1.5以下, Chemotactic differential 200 μ m 以下という弱い活性しか示さなかった。

考 察

この実験において用いた口腔常在菌培養濾液中には、強弱はあったがすべてヒト好中球に対する走化活性が認められた。しかし、菌の種類によって培地が異なること、またそれぞれの菌の最大の活性を示す時期が異なることも考えられるので、この結果からすぐ活性の強弱の断定は出来ないと思われる。すでに活性を持つと報告されている、*E. coli*¹⁸⁾、*S. salivarius*¹⁰⁾については、表1に示すように強い活性が認められたが、*A. viscosus*¹⁰⁾については、非常に弱い活性しか認められなかった。原因が、菌株、使用培地の相違によるのか、あるいは Boyden chamber 法と我々のアガロースプレート法という活性測定方法による相違によるのか現在のところ明らかでない。

これら細菌由来の走化性因子の性質について

は、*E. coli*¹⁸⁾、*S. aureus*¹⁹⁾、*C. albicans*¹⁴⁾、等で調べられている。*E. coli* では低分子の酸性ペプチドで耐熱性であり、構成アミノ酸として考えられるものとして、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、アラニン、グリシンが挙げられている。*S. aureus* のものは、耐熱性、非透析性の物質であり、*C. albicans* では耐熱性で凍結融解にも耐える物質と報告されている。またいずれの場合も活性を表わすのに補体系は介さず、直接好中球に作用している。我々は、表1より強い活性を示した *S. sanguis* を用いて、走化性因子の分離精製を行っているが、別の機会に報告したいと考えている。

本研究は一部昭和51年度文部省科学研究費（一般研究 B-148289）及び昭和53年度文部省科学研究費（一般研究 C-357551）によった。

文 献

- 1) SOCRANSKY, S. S.: Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 49 : 203-222, 1970.
- 2) HORTON, J. E., OPPENHEIM, J. J. and MERGENHAGEN, S. E.: A role for cell-mediated immunity in the pathogenesis of periodontal disease. *J. periodontol.*, 45 : 351-360, 1974.
- 3) ATTSTRÖM, R.: Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. *J. periodontal Res.*, 5 : 42-47, 1970.
- 4) ATTSTRÖM, R. and EGELBERG, J.: Presence of leukocytes within the gingival crevice during developing gingivitis in dogs. *J. Periodontal. Res.*, 6 : 110-114, 1971.
- 5) RAESTE, A.-M. and AURA, A.: Rate of migration of oral leukocytes in patients with periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 86 : 43-51, 1978.
- 6) ATTSTRÖM, R. TYNELIUS-BRATTHALL, G. and EGELBERG, J.: Effect of experimental leukopenia on chronic gingival inflammation in dogs. *J. Periodontal. Res.*, 6 : 200-210, 1971.
- 7) LINDHE, J. and HELLDÉN, L.: Neutrophil chemotactic activity elaborated by human dental plaque. *J. Periodontal. Res.*, 7 : 297-303, 1972.
- 8) KAHNBERG, K.-E., LINDHE, J. and HELLDÉN, L.: Initial gingivitis induced by topical application of plaque extract. *J. Periodontal Res.*, 11 : 218-225, 1976.

- 9) HELLDÉN, L., LINDHE, J., ATTSTRÖM, R. and SUNDIN, Y.: Neutrophil chemotactic factor in gingival crevice material. *Helv. Odont. Acta*, 17 : 1-5, 1973.
- 10) TEMPEL, T. R., SNYDERMAN, R., JORDAN, H. V. and MERGENHAGEN, S. E.: Factors from saliva and oral bacteria, chemotactic for polymorphonuclear leukocytes: Their possible role in gingival inflammation. *J. Periodontol.*, 41 : 71-80, 1970.
- 11) WRIGHT, W. E. and TEMPEL, T. R.: Effect of oral hygiene on clearance of soluble chemotactic bacterial products from human saliva. *J. Periodontol.*, 45 : 134-138, 1974.
- 12) O'FLAHERTY, J. T. and WARD, P. A.: Chemotactic factors and the neutrophil. *Seminars in Hematology*, 16 : 163-174, 1979.
- 13) WARD, P. A., LEPOW, I. H. and NEWMAN, L. J.: Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Pathol.*, 52 : 725-736, 1968.
- 14) CUTLER, J. E.: Chemotactic factor produced by *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 18 : 568-573, 1977.
- 15) LINDHE, J. and SOCRANSKY, S. S.: Chemotaxis and vascular permeability produced by human periodontopathic bacteria. *J. Periodontal Res.*, 14 : 138-146, 1979.
- 16) CUTLER, J. E.: A simple *in vitro* method for studies on chemotaxis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147 : 471-474, 1974.
- 17) NELSON, R. D., QUIE, P. G. and SIMMONS, R. L.: Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.*, 115 : 1650-1656, 1975.
- 18) SCHIFFMAN, E., SHOWELL, H. V., CORCORAN, B. A., WARD, P. A., SMITH, E. and BECKER, E. L.: The isolaton and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*. *J. Immunol.*, 114 : 1831-1837, 1975.
- 19) WALKER, W. S., BARLET, R. L. and KURTZ, H. M.: Isolation and partial characterization of a Staphylococcal leukocyte cytotoxin. *J. Bacteriol.*, 97 : 1005-1008, 1969.
- 20) BERMAN, K. S., GIBBONS, R. J. and NALBANDIAN, J.: Localization of intercellular polysaccharide granules in *Streptococcus mitis*. *Arch. Oral. Biol.*, 12 : 1133-1138, 1967.
- 21) ROGOSA, M., MITCHEL, J. A. and WISEMAN, R. F.: A selective medium for the isolation and enumeration of oral *Lactobacilli*. *J. Dent. Res.*, 30 : 682-689, 1951.
- 22) ROGOSA, M. and BISHOP, F. S.: The genus *Veillonella*. II. Nutritional studies. *J. Bacteriol.*, 87 : 574-580, 1964.
- 23) DAVIS, B. D. and MINGIOLI, E. S.: Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or Vitamin B₁₂. *J. Bacteriol.*, 60 : 17-28, 1950.