日本人の成人性歯周炎患者から分離培養した血清型 “a” の *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

小 延 裕 之

日本歯科大学歯学部歯周病学教室

(指導：鴨井久一教授)

(平成 6 年 12 月 20 日受付)

Actinobacillus actinomycetemcomitans Serotype “a” Isolated from Adult Periodontitis in Japan

Hiroyuki KONOBU

Department of Periodontology, The Nippon Dental University

2-3-16, Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

(Chief : Prof. Kyuichi KAMOI)

A. actinomycetemcomitans is a possible pathogen in several types of periodontal disease, such as localized juvenile periodontitis, adult periodontitis, rapidly progressive periodontitis and “refractory” periodontal disease. According to some reports *A. actinomycetemcomitans* could be clonal in any one patient. The information on *A. actinomycetemcomitans* isolates from Japanese patients is rather scant. In this investigation we determined whether a similar clonal distribution pattern could be found in Japanese subjects. The objective of this investigation was to compare the SDS-PAGE fingerprinting and G+C contents(%) of the whole genomic DNAs of Japanese *A. actinomycetemcomitans* strains to those of ATCC 29523, Y 4 and NCTC 9710 which were used as standard strains. The 41 strains isolated from Japanese adult periodontitis patients formed small, rough and translucent colony on TSBV agar under an anaerobic condition, they

were catalase positive, and fermented several carbohydrates, such as glucose, fructose, xylose and maltose. The wild strains indicated that they were serotype a by an immuno diffusion method using rabbit serum against autoclave extracted antigens from standard strains. All fingerprinting of the protein profile on SDS-PAGE showed a clonal pattern that is similar to those of ATCC 29523 and Y 4. All genomic DNAs were extracted from whole cells by modified method of Saitoh and Miura. G+C contents(%) were about “42” (mol%) calculated from “Tm”. From all of results, (1) almost all of Japanese isolates would belong to *A. actinomycetemcomitans* serotype “a” in this investigation. (2) clonal infection in Japanese adult periodontitis could be proved. (3) It is obvious that *A. actinomycetemcomitans* is associated with a certain type of exogenous bacterial transmission on periodontium.

Key words : *A. actinomycetemcomitans*, DNA, SDS-PAGE, Infection

要旨：日本人の成人性歯周炎患者の歯周ポケットより、TSBV 培地にて分離培養した 41 菌株の血清型 “a” の *A. actinomycetemcomitans* について、生化学的および分子生物学的な分析を加えた。その内容は、既知の血清型 a, b および c の菌株との各種生化学的代謝、各種の酵素活性、菌体タンパクの SDS-PAGE による泳動像の比較および、菌体より抽出した全 DNA の相同性の比較と各菌株 G/C mol% の解析である。その結果、日本人の成人性歯周炎患者に感染していた血清型 “a” の *A. actinomycetemcomitans* について遺伝的に相同性が高い株が多数を占めていた。これは *A. actinomycetemcomitans* のいわゆる “clonal infection” を示すものであると考えられる。

索引用語：*A. actinomycetemcomitans*, DNA, SDS-PAGE, 感染

緒 言

現在の歯周病学の知識によると、歯周炎の罹患の起源は健全な歯肉溝周辺に堆積、付着する歯肉縁上プラークを病原因子として、歯肉炎が発症する。これが最初の段階であると考えられている。

次の段階として、アタッチメントロスを伴い歯周炎に発展し、形成された歯周ポケットに歯肉縁下プラークはその結果として生じると考えられている。

近年、歯肉縁下プラーク中の多数の微生物の内、ある特定の微生物群が歯周組織上に感染したもののみがアタッチメントロスを伴う歯周炎に発展するのではないかと考え始められるようになった¹⁾。

それらの歯周病原性微生物と考えられているものの中で *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (以下、*A. actinomycetemcomitans* と略す) が注目を浴びた理由として、局所型若年性歯周炎 (localized juvenile periodontitis) の臨床症状の特徴である、歯肉縁上、縁下ともにプラーク、歯石の付着および沈着がほとんど観察されないにも拘らず、歯周組織の破壊は重篤であることが知られている²⁾。

さらに、成人性の歯周炎においても急速進行性歯周炎や、局所に垂直性の骨欠損を伴った歯周炎³⁾、あるいは積極的な歯周治療が終了したにも拘らず、その後のメンテナンス時において口腔衛生管理は良好な状態を継続してはいるがアタッチメントロスが進行してゆく型などの症例において、*A. actinomycetemcomitans* の感染が密接に関与していると考えられている⁴⁾。

Slots ら⁵⁾によって *A. actinomycetemcomitans* 感染の血清型の違いによる分布調査が行われており、また、標準的な歯周病原性微生物としての *A. actinomycetemcomitans* の菌株として知られている“Y4” (血清型“b”) は Ebersole ら⁶⁾によって黒人少女の局所型若年性歯周炎の病巣部より分離・同定された菌株である。

しかし、その他の血清型の既知の標準菌株は、いずれも歯周疾患とは異なる疾患の病巣、例えば、心内膜炎、brain abscess などより分離・同定されている。その様な経緯により、歯周病原性微生物としての *A. actinomycetemcomitans* の研究においては“Y4”が代表的な菌株として扱われている。

局所型若年性歯周炎 (LJP) の罹患率は人種により異なるといった報告⁷⁾もあり、日本人の成人性歯周炎においては、血清型“b”の *A. actinomycetemcomitans* は検出されないといった報告⁸⁾もある。

一方、歯周疾患の感染症としての観点より、家族内における *A. actinomycetemcomitans* の感染を示唆した研究⁹⁾や、歯ブラシによる感染を示唆した研究¹⁰⁾などもある。

これらの報告より欧米人における感染の分布状況と、日本人におけるそれとは、異なることが十分に推測される。

また、現在注目を集めている、同一患者の口腔内より、単一の血清型および単一の遺伝型の、*A. actinomycetemcomitans* のみが探知される現象である“clonal infection”¹¹⁾ が日本人の歯周炎患者でも観察されるかは現段階では未確認の状態であり、これらの究明は非常に意義深いものである。

特に、局所型若年性歯周炎ではなく、成人性歯周炎の病原性微生物として *A. actinomycetemcomitans* を研究していく上で、その標準 (対照) 菌株として、“Labo Strain”とも呼ばれる“Y4”に偏重した研究では十分に病因論を究明できないと思われる。さらに、日本人の成人性歯周炎患者より分離される *A. actinomycetemcomitans* についての情報も現時点においては非常に少ない。

近年、各種のヒトの歯周炎と微生物との関係で若年性歯周炎と *A. actinomycetemcomitans* が同疾患の発症および進行に深く関与することが報告され、成人性歯周炎の発症、あるいは進行にも *A. actinomycetemcomitans* の関与が推測されている。感染症の診断においては、病原微生物の検出・同定が重要であるのは周知の事実である。

本研究では、日本人の成人性歯周炎に罹患した患者の病巣部である歯周ポケット内より歯肉縁下プラークを採取し、*A. actinomycetemcomitans* の感染の有無を調べたところ、同菌種と思われる微生物が分離されたので純培養を行った。*Actinobacillus* 属と近縁関係にある微生物としては、*Haemophilus*、*Pasteurella* および *Yersinia* の3種があげられる。

Actinobacillus を含めた上記3種の分類は、Manual of Systematic Microbiology, Vol. 1 (1984)¹²⁾によれば、colonies sticky (+), catalase (D), Voges-Proskauer test (37°C) (D), Xylose (+), DNAのG+Cが40-43 (Mol%)で大別している。

さらに現在、*Actinobacillus* 属は、*Actinobacillus lignieresii*, *Actinobacillus equuli*, *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus capsulatus* および *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の5種に分けられており、sheep blood agarの溶血反応、馬尿酸塩の分解、エスクリンの代謝、糖の発酵 (cellobiose, lactose, mannitol, melibiose, salicin, trehalose) により分

けられている。

さらに、詳細に同定・分類する方法として、SDS-PAGE によるタンパク質の分子量の検討、API-ZYM による酵素活性の測定などが広く行われている。

微生物を分類学的に特徴づける性質として、その形態、生理・生化学的性状、菌体成分、代謝産物などがあり、これらはいずれもその表現形式として重要であるが、その重要度は属や種といった分類群レベルで異なっている。これに対し、遺伝子レベルで微生物の類縁性や系統を論ずることが、現在では主流であると言える。中でも、DNA の塩基組成の算定と、塩基配列の相同性の比較が挙げられる。

本研究では、日本人の成人性歯周炎患者より分離培養した *A. actinomycetemcomitans* について、上記の根拠および手法に基づき、その純培養菌株の検討を試みた。

材料および方法

1. 標準 (対照) 菌株

A. actinomycetemcomitans, ATCC 29523, 血清型 “a”, (以後、ATCC 29523 と略す)

A. actinomycetemcomitans, FDC Y4, 血清型 “b”, (以後、FDC Y4 と略す)

A. actinomycetemcomitans, NCTC 9710, 血清型 “c”, (以後、NCTC 9710 と略す)

以上、3 菌株を標準 (対照) 菌株として用いた。

2. 分離培養

1) 資料の採取部位

被験者は日本歯科大学歯学部附属病院歯周病科に来院した中等度から重度の成人性歯周炎であると診断された患者で、23 歳から 56 歳までの 17 人 (平均年齢 42 ± 6.3 歳, 男性 10 人, 女性 7 人) における口腔内を診査し、日歯大式 N2 プローブを用いプロービングによる出血 (bleeding on probing) が認められ、プロービングデプスが 4 mm から 8 mm, X 線写真像の所見では局所的に垂直性の骨吸収が見られる歯周ポケットをサンプリングの対象部位とした。

2) 歯肉縁下プラークの採取

試料の採取は、あらかじめ簡易防湿を施したサンプリング対象部位に、滅菌綿球で歯肉縁上プラークを軽く清拭した後、歯科用ピンセットで乾熱滅菌済みのペーパーポイント (Medium size, Johnson & Johnson, U.S.A.) を歯周ポケット内に軽く抵抗を感じるまで挿入した。30 秒間静置した後、歯周ポケット内より除去し、迅速に移送用培地 ANA ポート微研 (ク

リニカルサプライ, 岐阜) 4.5 ml 中に投入し密封後、速やかに実験室に移送した。

3) 分離用培地および培養法

診療室で採取した試料を Mixer® (IWAKI, 東京) を最大値に設定して 60 秒, 分散させた後, 0.5 ml 毎に連続希釈を行い, 1,000 倍希釈までの試料を調製した。これを, それぞれ 0.1 ml ずつ, Slots の処方¹³⁾ による *A. actinomycetemcomitans* の選択培地である TSBV 培地を塗抹し, 嫌氣的条件下 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) で, 37°C, 72 時間, 培養を行った。

4) 純培養

TSBV 培地上に形成したコロニーを白金耳で採取して TB 培地 (Tryptic soy broth (Difco, U.S.A.) 12.0 g, Yeast extract (Difco, U.S.A.) 2.0 g, Agar (和光純薬, 大阪) 7.0 g, d.w. 360 ml, 脱繊維素ウマ血液 (日本バイオテスト, 東京) 20 ml, Hemin-Menadione 4.0 ml) に接種し, 嫌氣的条件下 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) で, 37°C, 72 時間培養を行った。これらの菌株は以後, 72 時間間隔で継代培養を行い実験に供した。

3. 予備同定試験

1) 液体培地での培養

BHI broth (Difco, U.S.A.) に 0.5%, Yeast extract (Difco, U.S.A.), 10 ml の試験管に純培養菌株を接種し, 37°C, 72 時間, 嫌氣的条件下 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) で培養を行ない, 増殖所見を観察した。

2) コロニーの形態による識別

コロニーの形態学的特徴として, 直径約 0.5 mm から 1 mm で透明または半透明, あるいは白色または乳白色で, 辺縁がスムーズ型またはラフ型を示すもので, コロニー上に 3% 過酸化水素水を滴下すると強度のカタラーゼ反応を示す菌株を対象とした。そのコロニーの一部を採り Gram 染色を行い染色状態がグラム陰性の短桿菌であることを確認した。

3) Rap ID NH system による判定

微生物の各種実験を行う予備同定のひとつとして, Rap ID NH system (アムコ, 東京) を用いた。患者の病巣部より分離, 純培養した菌株を ATCC 29523, FDC Y4 および NCTC 9710 と同様なコードである “2102” を対照とした菌株を同定した。

4) 血清反応

抗特異血清, すなわち, ATCC 29523 (血清型 “a”), FDC Y4 (血清型 “b”), NCTC 9710 (血清型 “c”) を抗原として作成された各抗血清は, -80°C に凍結保存してあったものを実験に供した。各抗血清は, それぞれの血清型間における血清型特異性

および交叉反応は事前に検定済みであり、さらにオートクレーブ処理による抗原に対する抗体価の検定も調整済みである⁸⁾。

オートクレーブ処理による抗原は BHI broth 50 ml に接種, 37°C, 48 時間, 嫌氣的条件下 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) で培養した。

得られた菌体に PBS (0.1 M, pH 7.3) を加え 100 mg (wet weight)/ml の濃度に調製し, 121°C, 20 分間, 高圧滅菌処理し, 4°C, 4,000×G, 20 分間, 遠心分離を行い上清を回収して, -20°C にて実験に供するまで保存した。血清型の判定は寒天ゲル内沈降反応 (Ouchterlony 法) を用いた。

4. 本同定試験

A. *actinomycetemcomitans* の同定基準となる各種の生化学的性状は, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (1989) および Manual of Clinical Microbiology, 5th edition (1991)¹⁴⁾ の記載に準じて検査を行った。その検査方法および判定基準は, 以下のごとくである。

1) 各種糖の発酵能

Arabinose (E-Merck), Xylose (和光純薬, 大阪), Glucose (和光純薬, 大阪), Mannose (和光純薬, 大阪), Fructose (和光純薬, 大阪), Galactose (和光純薬, 大阪), Rhamnose (E-Merck), Maltose (和光純薬, 大阪), Sucrose (和光純薬, 大阪), Lactose (和光純薬, 大阪), Cellobiose (ICN bio.), Trehalose (三光純薬, 東京), Raffinose (Difco, U.S.A.), Sorbitol (三光純薬, 東京), Mannitol (小宗化学), Inositol (三光純薬, 東京), Salicin (三光純薬, 東京), Starch (国産化学), Inulin (三光純薬, 東京), Adonitol (Difco, U.S.A.), Dulcitol (Difco, U.S.A.), Glycerol (和光純薬, 大阪) 以上の糖を対象とした。

2) 各種物質の代謝活性

- (1) 硝酸塩の還元
- (2) McConkey 培地での増殖
- (3) オキシダーゼの産生
- (4) メチルレッド試験
- (5) Voges-Proskauer 反応
- (6) スターチの合成能-1
- (7) スターチの合成能-2
- (8) 馬尿酸塩の分解
- (9) ゼラチンの液化
- (10) 硫化水素の産生
- (11) ヒツジ赤血球の溶血
- (12) インドールの産生能
- (13) ウレアーゼの産生

5. API-ZYM による酵素活性の測定

供試菌株を API-ZYM system により 19 種類の酵素活性を調べた。

6. タンパク質の分子量の測定

1) 可溶性タンパクの抽出

BHI broth (Difco, U.S.A.) に 0.5% Yeast extract (Difco, U.S.A.) を添加し, 121°C, 20 分間, 高圧滅菌した培地 100 ml に供試菌株を接種し, 37°C, 48 時間, 嫌氣的条件下 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) で培養した菌体を 4°C, 10,000×G, 20 分間, 遠心集菌した。

沈殿した菌体を 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) で 2 回洗浄し, 5.0 ml, 0.5 M ショ糖 (和光純薬, 大阪) を添加した 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に懸濁した後, 氷温下で 5 分間, 超音波処理機 US 150 (NISSEI) を用い最大出力で超音波粉碎を行った。

次いで, 鏡検により菌体細胞が破碎されていることを確認した後, この粗膜画分を 20,000×G, 2 時間遠心分離し, 得られた上清を可溶性タンパク質画分として電気泳動の試料として実験に供するまで -20°C で保存した。

可溶性タンパク質の濃度は Lowry 法により定量した。

2) SDS-PAGE

調製した可溶性タンパク質画分を 0.0625 M Tris-HCL (pH 6.8), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol を含むタンパク溶液でタンパク質濃度が 1 mg/ml になるように調製し, この試料を 100°C で 3 分間熱処理した。

電気泳動は Lugtenberg ら¹⁵⁾の方法に従って, 分離ゲル 10% アクリルアミドゲル, 濃縮ゲル 3% を用いて行った。泳動試料は各菌株ともタンパク質量 50 μg/slot とし, tracking dye として 0.008% BPB を含む 70% ショ糖, 0.0625 M Tris-HCL (pH 6.8) 溶液を添加し, 室温下でゲルプレートあたり 20 mA の定電流で電気泳動を行った。

泳動終了後, comassie brilliant blue R 250 (CBB) で染色し, 電気泳動パターンを観察した。

7. DNA 分析

1) DNA の抽出

菌体より全ゲノムの抽出方法は, フェノール法¹⁶⁾に準じて行った。すなわち, 400 ml の BHI broth (Difco, U.S.A.) に 2.0 g の Yeast extract (Difco, U.S.A.) を加えた培地に各供試菌株を接種し, 37°C, 48 時間, 嫌氣的条件下 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂)

で培養した。これを4°C, 7,000×G, 15分間遠心分離して得られた全菌体をSTEバッファー〔0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA〕を用い1回洗浄し, 50 mM EDTAを添加した50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液4 ml中に懸濁した。Lysozyme (SIGMA)の終濃度が500 µg/mlになるように加え0°Cにて30分活性化させ, 溶菌した試料にSTEPバッファー〔0.5% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.4 mM EDTA, 1 mg/ml Proteinase K (SIGMA)〕を0.8 ml加え, 溶液を静かに混和し, 65°C, 1時間インキュベートした。

インキュベート終了後, 溶液に3倍量のフェノール混合物〔Tris-HCl (pH 7.8)に飽和させたフェノール (和光純薬, 大阪), クロロホルム (和光純薬, 大阪), イソアミル (和光純薬, 大阪) (25:24:1)の混合物〕を加え激しく振騰し, 次いで10,000×G, 15分間遠心分離を行い, 上清を集めた。

この操作を3回繰り返し, さらに等量のクロロホルム, イソアミル (24:1)の混合物を加え遠心処理によって上清を集めた。これに酢酸アンモニウムを終濃度が2.5 Mとなるように加え, さらに等量のエタノールを加えて, 析出したDNAをガラス棒にゆっくりと巻きながら採って, 70%のエタノールに晒し, 再び3 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTAに溶解した。次いでRNAse A (SIGMA)を終濃度50 µg/mlとなるように加え, 4°Cにて24時間処理した。

さらに, SDS (半井化学)が0.5%, proteinase K (SIGMA)が50 µg/mlになるように各々, 加えた。これを65°C, 1時間インキュベートした後, 上記のフェノール混合物を加え激しく振騰し, 10,000×G, 15分間遠心分離を行い, 上清を集めた。

この操作を3回繰り返し, さらに等量のクロロホルム, イソアミル (24:1)の混合物を加え激しく振騰, 遠心処理によって上清を回収した。

ついで, 得られた上清に3 M酢酸アンモニウム, 1 mM EDTAを0.5 ml加え, -20°Cのイソプロパノール (和光純薬, 大阪)を静かに2倍量加えてガラス棒を用いて, 析出したDNAを注意深く巻き取り, 70%, 80%, 95%のエタノールに順次, 晒して脱水処理を行った。

最後にガラス棒に巻き採られたものを500 µlの10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTAに溶解し, DNAを解析する標品として4°Cで保存した。

2) DNA-DNA 相同性の測定

DNA-DNAハイブリダイゼーションの方法は, ニトロセルロースフィルターを利用したメンブランフィ

ルター法で行った。標準 (対照) 菌株より抽出したDNAにより3種のプローブを調製した。

(1) DNA プローブの調製

DNA プローブは, ランダムなヘキサヌクレオチドプライマーとKlenowフラグメントを利用するDNA Labelling Kit (ニッポンジーン)を用いた。

まず, ラベルするDNA溶液を100°C, 2分間沸騰水中で加温後, 氷冷しDNA鎖を解離した。〔H₃〕-dCTP (3,000 ci/mmol)を50 µl (50 µci)マイクロチューブに採取し, 風乾して溶媒のエタノールを揮発させ除去し, その容器中に, 熱処理したDNA 1 µg, DNA labelling buffer 10 µl, BSA solution 2 µl およびd.w.を加えて総量を50 µlにした。

次いでDNA labelling enzyme solutionを2 µl加えて37°Cにて24時間インキュベートした。反応が終了した溶液に等量のTris-phenol (1:4) バッファーを加えて10,000 rpm, 10分間遠心操作を行いその上清を回収し, 得られた上清にcarrier DNAを50 µl加え, 等量のエタノールを約200 µl添加して-20°C, 10分間冷却し, 10,000 rpm, 10分間遠心操作を行い, その沈渣を回収した。この沈渣に0.1×SSCを50 µlから100 µl加え, 溶解し (標識DNA 2本鎖), その溶液を沸騰水中にて2分間加熱後, 氷冷により標識DNAを1本鎖に解離した。ハイブリダイゼーションに用いるメンブランフィルター1枚あたりに対して5,000から10,000 cpmになるように標識DNAを採取し, 0.1×SSCをnmI (n=DNA-DNA交雑実験に供試するメンブランフィルターの枚数)加えて希釈した。

超音波処理機 (Ohtake Works)を用いて出力100 Wで超音波処理を1分間行い, 沸騰水中にて, 10分間, 100°Cで熱処理を行い, 溶液中のSSCの濃度が2×SSCとなるよう4分の1量の10×SSCを添加し, SDSが0.1%の終濃度となるように25% SDS溶液を加え, フィルターハイブリダイゼーション用のDNAプローブ標品とした。

(2) 放射性ヌクレオチド取り込み率の検定調製した標識DNAを2 µl採り, 氷温の10%トリクロロ酢酸2 mlを加え, -40°Cで1時間静置後, フィルターをアスピレーターで吸引しながら溶液を濾過し, 10%トリクロロ酢酸2 mlで2回, 吸引洗浄した。フィルター風乾後, 液体シンチレーションカウンターLSC-3500 (Aloka)で標識DNAのdCTP (−³H) 取り込み率を測定した。

(3) フィルターへの固定

DNA溶液をO.D.=2 (λ=260 nm)に調製し, 100°C, 1分間沸騰水中加温後, 急冷し, 溶解した

DNA鎖を一本鎖に解離した。次いで熱処理後、最終濃度 $2\times\text{SSC}$ 溶液とし、DNA濃度を $\text{O.D.}=0.95$ から 1.05 ($\lambda=260\text{ nm}$) に希釈した。マルチチャンネルフィルター吸引洗浄装置 (サンプラテック) に固定したメンブランフィルター pore size $0.45\text{ }\mu\text{m}$, HAWPO 25 XX (Millipore) (以下フィルターとする) をあらかじめ $2\times\text{SSC}$ 1 ml で吸引洗浄 (水道用アスピレーターで吸引して2分間程度でフィルターを通過するようにあらかじめ吸引圧を設定した) し、等速度の流量でDNA溶液 1 ml を吸引した。その後、等速度の流量で $2\times\text{SSC}$ 1 ml 吸引洗浄を2度行った。

調製したフィルターを12時間、風乾し、さらに 80°C , 3時間、真空乾燥器中 AE-3701 (Atto) でDNAフラグメントの焼付け固定を行い、ハイブリダイゼーション用の被検DNA標品とした。

一方、DNAを吸着させずに同様に処理したフィルターをブランクとして同様に実験系に加えた。

(4) DNA-DNA ハイブリダイゼーション

液体シンチレーション測定用バイアル瓶にDNAを固定したフィルターと共に、調製したDNAプローブを 1 ml 入れて密栓し、乾熱用オープン中で 60°C , 48時間反応させた。その後、室温まで徐冷し、マルチチャンネルフィルター吸引洗浄装置にフィルターを装着して $2\times\text{SSC}$, 2 ml を2回、吸引洗浄を行い、 5 mM Tris-HCl (pH 無調製) で2回吸引洗浄し、さらに風乾した。

反応の終了したフィルターを液体シンチレーションカウンター LSC-3500 (Aloka) で測定した。測定条件は2分間、ESCR (外部標準チャンネル比法) に設定した。得られた相同値はブランクを差引いて、基準とする (プローブにした) 供試 (対照) 菌株を100として、その相対値で求めた。

さらにエラー補正のためにフィルターを再び取り出して乾燥し、 $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 溶液を 1 ml 液体シンチレーション測定用バイアル瓶に、フィルターと共に密栓し、乾熱用オープン中で 70°C , 30分間、加熱処理を施した後、同様の測定条件で測定した。この手順により、相同でないDNA同士がつくる不安定な雑種DNAが加熱処理によって解離し、相同値の低下を示したものをそのデータから排除した。

以上の手順で1回の実験に際し1菌株あたり3枚のフィルターを同時に測定し、それを少なくとも5回測定を繰り返し、平均値を求めることによって相同性を決定した。

3) DNAのG+C含量 (mol, %) の測定

標品は、以下の方法で調製した。すなわち、精製したDNA溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ を 100°C , 10分間沸騰水中で加

温後、氷冷し、DNA鎖を解離した。

ヌクレアーゼ P1 (ヤマサ) の 0.1 mg/ml 溶液 [溶媒: 2 mM $\text{ZnSO}_4 + 40\text{ mM}$ 酢酸ナトリウム (pH 5.3)] を $10\text{ }\mu\text{l}$ 加えて 50°C , 1時間反応させたものを試料とした。HPLCはLC-9A (島津) と、検出器のSPD-6A (島津) を使用した。カラムは逆相分配のODS (C18) 系のYMC-PACK AQ-312 (6.0 mm I.D. $\times 150\text{ mm}$ L) を用い、デオキシシチジル酸 (dCMP), デオキシアデニル酸 (dAMP), デオキシチミジル酸 (dTMP), デオキシグアニル酸 (dGMP) の4種類のヌクレオチドを分析した。

その分析条件は、展開溶媒として 10 mM リン酸緩衝液 [10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 + 10\text{ mM}$ H_3PO_4 (pH 3.5)] を用い、溶媒の流速を 1.5 ml/min とし、試料の注入量は $5\text{ }\mu\text{l}$ とした。

検出条件の設定はUVで、波長 270 nm , AUFSは0.04に設定した。G+C含量 (mol %) の判定は、4塩基ヌクレオチド等モル混合物を評価基準として、コンピュータ C-R 6A (島津) の、修正百分率法で自動的に各ヌクレオチドのモル%が計算されるプログラムを使用した。

結 果

1. 分離培養

TSBV培地表面に形成したコロニーは、培地上に非常に強固な付着能を示した。

一方、標準 (対照) 菌株である ATCC 29523, FDC Y4 および NCTC 9710 の3菌株のコロニーの肉眼所見はTSBV培地上への付着能は認められなかった。

2. 純培養

純培養のために継代したTB培地上においても、コロニーは、その性状として非常に強固な付着能を継続して保持していた。

一方、対照 (標準) 菌株である ATCC 29523, FDC Y4 および NCTC 9710 の3菌株のコロニーの肉眼所見はTB培地上への付着能も認められなかった。

3. 予備同定試験

1) 液体培地での培養

液体培地中で増殖後の特筆すべき所見として、純培養菌株は試験管の管壁に強固な付着、および強い疎水性を有していた。一方、対照 (標準) 菌株である ATCC 29523, FDC Y4 および NCTC 9710 の3菌株について増殖状態の肉眼所見は液体培地中において、均一な懸濁液となり疎水性も観察されなかった。

2) コロニーの形態による識別

形態学的特徴として、コロニーの直径は、約0.5 mm から1 mm の透明または半透明、あるいは白色または乳白色で、辺縁がスムーズ型またはラフ型であった。カタラーゼ反応は陽性であった。グラム染色による光学顕微鏡所見は、グラム陰性の短桿菌であった。

3) Rap ID NH system による判定

RAP ID NH system (アムコ, 東京) 患者の病巣部より分離、純培養した菌株群は、ATCC 29523, FDC Y 4 および NCTC 9710 と同様なコードである“2102”であった。

4) 血清反応

寒天ゲル内沈降反応 (Ouchterlony 法) により、オートクレーブ処理をした抗原と、血清型“a”である特異抗血清との間にのみ、コントロールである標準(対照) 菌株 ATCC 29523 より抽出した抗原 (sam-

ple 1-5) との間に形成した沈降線と分離・純培養した菌株より抽出した抗原とは連続した沈降線が観察された (図1)。

しかし、血清型“b”，である FDC Y 4 および血清型“c”，の菌株である NCTC 9710 より抽出された抗原と、それぞれの血清型“b”および血清型“c”の抗血清の間に形成した沈降線とは、分離培養した抗原による連続した沈降線を形成しなかった。

以上の結果より、分離・純培養した菌株のうち 41 菌株は、血清型“a”であることが確認され、以降の実験に供された。さらに血清型“b”の菌株は一菌株も同定されなかったが、血清型“c”の菌株および、いずれの血清型にも分類されない菌株が認められた。

4. 本同定試験

1) 各種糖の発酵能

結果を表1に示す。Fructose, Glucose, Maltose, Mannose, Xylose の5種の糖類に関して

1, 2, 3, 4, 5 ; antigens from clinical isolates

図1 Serotyping results

表 1 Sugar fermentation

strains	1	2	3	4	5	6	7
ATCC 29523	+	±	-	-	+	-	+
FDC Y4	+	±	±	±	-	-	±
NCTC 9710	+	±	±	+	+	-	+
K0101	+	±	-	-	+	-	+
K0104	+	±	-	-	+	-	+
K0208	+	±	-	-	+	-	+
K0310	+	±	-	-	+	-	+
K0313	+	±	-	-	+	-	+
K0414	+	±	-	+	+	-	+
K0515	+	±	-	-	+	-	+
K0516	+	±	-	-	+	-	+
K0518	+	±	-	-	+	-	+
K0519	+	±	-	-	+	-	+
K0520	+	±	-	-	+	-	+
K0621	+	±	-	-	+	-	+
K0622	+	±	-	-	+	-	+
K0732	+	±	-	-	+	-	+
K0733	+	±	-	-	+	-	+
K0834	+	±	-	-	+	-	+
K0937	+	±	-	±	+	-	+
K0942	+	±	-	-	+	-	+
K1043	+	±	-	-	+	-	+
K1045	+	±	-	+	+	-	+
K1146	+	±	-	-	+	-	+
K1250	+	±	-	-	+	-	+
K1261	+	±	-	+	-	+	-
K1362	+	±	-	-	+	-	+
K1363	+	±	-	-	+	-	+
K1364	+	±	-	-	+	-	+
K1465	+	±	-	-	+	-	+
K1467	+	±	-	-	+	-	+
K1468	+	±	-	-	+	-	+
K1570	+	±	-	-	+	-	+
K1571	+	±	-	-	+	-	+
K1673	+	±	-	-	+	-	+
K1775	+	±	-	-	+	-	+
K1778	+	±	-	-	+	-	+
K1779	+	±	-	-	+	-	+
K1780	+	±	-	-	+	-	+
K1801	+	±	-	±	+	-	±
K1901	+	±	-	-	+	-	+
S0624	+	±	-	-	+	-	+
S1401	-	±	±	+	+	-	+
S1701	+	-	-	-	-	-	-

1=Galactose, 2=Trehalose, 3=Raffinose,
4=Sorbitol, 5=Mannitol, 6=Salicin, 7=Starch
[+: positive, ±: D, -: negative]

fermentation 100% positive(+) of all strains:

Xylose, Glucose, Mannose, Fructose, Maltose,
Glycerol

fermentation 100% negative(-) of all strains:

Arabinose, Rhamnose, Sucrose, Lactose,
Cellobiose, Inositol, Inulin, Adonitol, Dulcitol

は、総ての菌株において明確な発酵能が認められた。

Galactose については S 1401 株を除いて総ての菌株について陽性であった。Mannitole は FDC Y4 と S 1701 は、陰性で残る 39 の菌株は陽性であった。Starch は、37 株が陽性であり、FDC Y4 と K 1801 株が疑陽性で、K 1261 および S 1701 株が陰性であった。

Trehalose は、40 菌株について疑陽性で、S 1701 株のみが陰性であった。

Raffinose は、発酵能が陽性である菌株は認められず、FDC Y4, NCTC 9710 および S 1401 株のみが疑陽性で、残る 38 菌株は陰性であった。

Sorbitole は、NCTC 9710, K 0414 株, K 1045 株 および S 1401 株が陽性を示し、FDC Y4, K 0937 株 および K 1801 株が疑陽性、残る 34 の菌株は陰性であった。

残りの Adonitole, Arabinose, Cellobiose, Dulcitol, Glycerole, Inositol, Inulin, Lactose, Rhamnose, Salicine および Sucrose これらの糖類に関しては総ての供試菌株が発酵能を示さなかった。この結果より、患者から分離・純培養した 33 菌株は ATCC 29523 (血清型 “a”) と類似していた。

つまり、標準 (対照) 菌株とした ATCC 29523 (血清型 “a”) は Xylose, Glucose, Mannose, Fructose, Galactose, Maltose, Mannitole および Starch を発酵させたが、Trehalose は疑陽性であり、その他の糖類については発酵能を示さなかった。患者より分離した純培養菌株のうちで、これと類似した発酵パターンを示したものは K 0101 以下、S 0624 までの 34 菌株であった。

残りの 7 菌株、すなわち、K 0414, K 0937, K 1045, K 1261, K 1801, S 1401 および S 1701 は FDC Y4 (血清型 “b”), NCTC 9710 (血清型 “c”) と異なっていた。

2) 各種の物質の代謝活性

結果を表 2 に示す。いずれの項目においても同定基準となる各種の生化学的性状は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (1989) および Manual of Clinical Microbiology, 5th edition (1991) の記載を満たしており他の *Actinobacillus* 属の菌種のものとも明白に同定・分類された。

5. API-ZYM による酵素活性

結果を表 3 に示す。強い酵素活性を示したものは、Phosphatase alkaline, Phosphatase acid, Leucine arylamidase の 3 種であり、次いで、Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Valine arylamidase, Phosphoamidase の 4 種の酵素活性が

微弱に発現したのが全菌株の傾向として観察された。標準（対照）菌株も血清型の差異にかかわらず、患者からの分離・純培養菌株群とほぼ同一の酵素活性の発現であった。

A. actinomycetemcomitans と誤同定し易い性状を有する *Heamophilus aphrophilus* との同定の鑑別点は、 β -galactosidase および α -glucosidase の活性の発現が陰性であるので、明確に分類された。詳細に検討を加えたところ ATCC 29523（血清型 “a”）は、Phosphatase alkaline が 3, Leucine arylamidase が 3, Phosphatase acid, が 5, すなわち, “3-3-5” となっている。

これに類似した患者からの純培養菌株としては、K 0515, K 0518, K 0520, K 1043, K 1045, K 1250, K 1261, K 1362, K 1363, K 1364, K 1467, K 1468, K 1570, S 1401 の 14 株があげられる。加えて、これに非常に近似する菌株としては、3-2-5 を示す K 0101, K 0104, K 0208, K 0310, K 0834 の 5 株があり、K 1775 (4-3-5), K 1801 (3-4-5), K 1901 (3-4-5) の 3 株があった。FDC Y 4（血清型 “b”）および NCTC 9710（血清型 “c”）は、Phosphatase alkaline が 5, Leucine arylamidase が 3, Phosphatase acid, が 5, すなわち “5-3-5” となっている。

これに類似した患者からの分離・純培養された菌株としては、K 0414, K 0519, K 0622, K 0732, K 0733, K 1146, K 1465, K 1467, K 1571, K 1673, K 1776, K 1778 の 12 株があげられ、これに近似するとみられる K 1775 (4-3-5), K 0621 (5-1-5), K 1780 (5-2-5), K 1801 (3-4-5), K 1901 (3-4-5), S 0624 (5-3-3) の 6 株があった。

上記の 2 種類に含まれない菌株としては、S 1701 (1-1-1) があった。

以上、API-ZYM による酵素活性の試験結果からすると、全ての患者より分離・純培養された菌株は、ほぼ等しい酵素活性を有し、その活性の発現の強度によって、3 型に大別された。

6. SDS-PAGE

標準（対照）菌株および純培養菌株に共通した、メジャーなバンドは、約 20 kD, 40 kD および 60 kD の 3 カ所において濃染されたバンドが認められた（図 2）。

マイナーなバンドについては、3 種の標準（対照）菌株はそれぞれ幾分異なっていた。S 1701, S 1401 および S 0624 においては若干、異なったパターンが認められた。K 0518, K 0621, K 0834 および K 0313

表 2 biological characters

strains	1	2	3	4	5	6
ATCC 29523	—	+	±	+	—	±
FDC Y4	—	+	±	+	±	±
NCTC 9710	—	+	+	+	—	—
K0101	±	—	+	±	—	—
K0104	—	—	±	±	—	—
K0208	—	—	+	±	—	—
K0310	—	—	±	±	—	—
K0313	—	±	+	+	—	—
K0414	—	—	±	±	—	±
K0515	—	—	—	+	—	—
K0516	—	—	+	+	—	—
K0518	—	—	+	+	—	—
K0519	—	—	±	±	—	—
K0520	—	—	—	+	±	+
K0621	—	—	±	±	—	—
K0622	—	±	+	+	—	—
K0732	—	—	±	±	+	—
K0733	—	—	±	±	—	—
K0834	—	—	—	±	—	±
K0937	—	—	—	±	±	—
K0942	—	—	—	±	—	—
K1043	—	—	+	+	—	—
K1045	—	±	±	±	—	—
K1146	—	±	±	±	—	—
K1250	—	—	±	+	—	—
K1261	—	—	—	±	—	—
K1362	—	—	+	+	+	—
K1363	—	—	±	±	+	—
K1364	—	±	±	±	—	—
K1465	—	—	—	±	—	—
K1467	—	±	—	+	—	—
K1468	±	—	—	+	±	—
K1570	—	—	+	+	—	—
K1571	—	—	—	±	—	—
K1673	—	±	±	±	—	±
K1775	±	±	+	—	—	—
K1778	—	—	+	+	—	—
K1779	—	±	—	±	—	—
K1780	—	±	±	±	—	—
K1801	—	+	±	±	—	—
K1901	±	±	±	±	+	—
S 0624	±	+	—	±	—	±
S 1401	—	+	±	+	±	—
S 1701	+	—	±	±	±	—

1. Oxidase ; 2. MetylRed test ; 3. Stahch synthesized from maltose ; 4. Starch synthesized from glucose ; 5. Hydrolysis of Sodium hippurate ; 6. Hemolysis on sheep blood agar [+ : positive, ±, D, — : negative]
100% positive (+) reaction : Nitrate reduction
100% negative (—) reaction : growth on McConkey agar ;
Voges-Proskauer test ; Gelatinase ;
Hydrogen sulfide produced ; Indole ; Urease

表 3 API-ZYM

strains	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
ATCC 29523	3	1	1	0	3	2	5	1
FDC Y4	5	1	1	1	3	1	5	1
NCTC 9710	5	1	1	0	3	1	5	1
K0101	3	1	1	0	2	1	5	1
K0104	3	1	1	0	2	1	5	1
K0208	3	1	1	0	2	1	5	1
K0310	3	1	1	0	1	1	5	1
K0313	3	1	1	0	2	1	5	1
K0414	5	2	2	0	3	1	5	1
K0515	3	2	2	0	3	1	5	1
K0516	3	1	1	0	3	1	5	1
K0518	3	1	2	0	3	2	5	1
K0519	5	2	2	0	3	1	5	1
K0520	3	1	1	0	3	1	5	1
K0621	5	1	1	0	1	1	5	1
K0622	5	2	2	0	3	1	5	1
K0732	5	2	2	0	3	1	5	2
K0733	5	2	2	0	3	1	5	1
K0834	3	2	2	0	2	1	5	1
K0937	3	1	1	0	2	1	5	1
K0942	3	1	1	0	2	1	5	1
K1043	3	1	2	0	3	1	5	1
K1045	3	2	2	0	3	1	5	1
K1146	5	3	3	0	3	1	5	1
K1250	3	2	2	0	3	1	5	1
K1261	3	1	1	0	3	1	5	1
K1362	3	2	1	0	3	1	5	1
K1363	3	1	1	0	3	1	5	1
K1364	3	2	2	0	3	1	5	1
K1465	5	1	2	0	3	1	5	1
K1467	3	2	1	0	3	1	5	1
K1468	3	1	1	0	3	1	5	1
K1570	3	2	2	0	3	1	5	1
K1571	5	2	2	0	3	1	5	1
K1673	5	2	2	0	3	1	5	1
K1775	4	3	3	0	3	1	5	1
K1778	5	2	2	0	3	1	5	1
K1779	5	2	2	0	3	1	5	1
K1780	5	1	1	0	2	1	5	1
K1801	3	1	1	0	4	2	5	1
K1901	3	3	3	0	4	1	5	1
S0624	5	2	1	0	3	1	3	1
S1401	3	0	1	0	3	1	5	1
S1701	1	1	1	0	1	1	1	1

I : Phosphatase alkaline, II : Esterase (C4),
 III : Estetase Lipase (C8), IV : Lipase (C14),
 V : Leucine arylamidase, VI : Valine arylamidase,
 VII : Phosphatase acid, VIII : Phosphoamidase
 Quantity of hydrolysed substrate :

5. <40 nanomoles ; 4. 30 nanomoles ;
 3. 20 nanomoles ; 2. 10 nanomoles ; 1. 0 nanomoles
 [negative enzymatic activities of all strains] :
 Cystine arylamidase, Trypsin, Chymotrypsin,
 α galactosidase, β glucuronidase, β glucuronidase,
 α glucosidase, β glucosidase 1,
 N-acetyl- β glucosaminidase, α mannosidase,
 α -fucosidase and negative control

は、非常に ATCC 29523 に近似しているパターンが観察された。

残りの 34 菌株については、ほぼ共通した約 40 kD, 60 kD のメジャーなバンド、約 43 kD, 20 kD 付近のマイナーなバンドのパターンが観察され、それは標準 (対照) 菌株として用いた ATCC 29523 に近似したパターンであり、NCTC 9710, FDC Y4 の両菌株とは、さらに、若干の相違が観察された。以上の 34 菌株のうちで、K 1146, K 1250 および K 0310 の 3 菌株については、20 kD 付近のマイナーなバンドが欠損しているのが認められた。全菌株において電気泳動パターンの相似性は、分離・純培養された菌株において高かった。

7. DNA の分析

結果を表 4 に示す。

1) DNA-DNA の相同性

まず、ATCC 29523 (血清型 “a”) をプローブとした場合は、標準 (対照) 菌株のうち FDC Y4 (血清型 “b”) に対して 82.22% で相同性が認められたが、標準 (対照) 菌株である NCTC 9710 (血清型 “c”) においては、64.13% であり、相同性が低かった。

患者より分離・純培養した菌株においては、36 株に対して相同性が認められ、特に K 0310, K 0313, K 0519, K 0732, K 0834, K 1043, K 1045, K 1261, K 1362, K 1363, K 1571 および K 1673 の 12 株に対して、90% 以上の非常に高い相同性を示し、K 0208, K 1467, K 1779, K 1780 および K 1801 の 5 株では相同性が低かった。

次いで、FDC Y4 (血清型 “b”) をプローブとした場合は標準 (対照) 菌株のひとつとした ATCC 29523 (血清型 “a”) および NCTC 9710 (血清型 “c”) との間には、90.00% と 98.43% で相同性が認められた。

患者より分離・純培養した 41 菌株においては K 0104, K 1045, K 1250, K 1261, K 1362, K 1363, K 1570, K 1571, K 1673, K 1778, K 1780, K 1801, K 1901, S 0624 および S 1401 の 15 株に対して相同性が認められたが、残る 26 株に対しては相同性は低かった。

さらに、NCTC 9710 (血清型 “c”) をプローブとした場合は標準 (対照) 菌株のひとつとした FDC Y4 (血清型の “b”) との間では、98.67% で相同性が認められたが、ATCC 29523 (血清型 “a”) との間では、67.88% であり相同性が低かった。

患者より分離・純培養した菌株においては、37 株においては相同性が認められ、特に、K 0101,

1 ; K 1901, 2 ; K 1801, 3 ; 1775, 4 ; K 1362, 5 ; K 1250, 6 ; K 1146, 7 ; K 1043, 8 ; K 0937, 9 ;
K 0834, 10 ; K 0733, 11 ; K 0621, 12 ; K 0520, 13 ; K 0518, 14 ; K 0515, 15 ; K 0414, 16 ;
K 0310, 17 ; K 0208, 18 ; K 0101, 19 ; S 1701, 20 ; S 1401, 21 ; S 0624, 22 ; NCTC 9710, 23 ;
FDC Y 4, 23 ; ATCC 29523

図 2 SDS-PAGE

表 4 DNA analysis

strains	DNA-DNA homology(%)			G+C(mol%)
	ATCC 29523	FDC Y4	NCTC 9710	
ATCC 29523	100.00	90.00	67.88	46.70
FDC Y4	82.22	100.00	98.67	47.80
NCTC 9710	64.10	98.43	100.00	46.60
K0101	88.28	55.60	99.80	47.70
K0104	76.93	78.90	96.23	44.10
K0208	67.17	49.13	55.05	n/a
K0310	99.67	58.50	97.00	44.80
K0313	95.00	58.80	93.44	44.30
K0414	84.34	58.67	72.22	43.30
K0515	88.05	69.90	98.98	44.30
K0516	75.67	38.99	80.50	44.70
K0518	74.33	52.77	92.25	45.00
K0519	94.46	55.11	96.67	43.90
K0520	82.63	62.20	96.66	47.80
K0621	76.95	50.02	81.40	n/a
K0622	84.45	48.09	77.10	44.00
K0732	90.00	52.09	94.67	n/a
K0733	80.85	42.03	88.51	44.50
K0834	93.39	47.40	97.87	44.60
K0937	72.25	67.78	74.03	n/a
K0942	84.56	58.46	75.05	43.90
K1043	98.60	55.00	99.08	44.20
K1045	96.61	70.02	97.05	n/a
K1146	72.97	56.67	78.00	44.50
K1250	81.40	82.04	98.61	43.20
K1261	98.60	79.05	99.78	43.60
K1362	92.60	79.00	96.00	44.60
K1363	92.40	84.03	97.64	44.20
K1364	85.36	41.00	87.05	44.50
K1465	76.06	49.10	59.20	n/a
K1467	55.23	54.90	58.90	n/a
K1468	79.25	55.80	49.20	47.70
K1570	70.22	83.70	99.55	n/a
K1571	92.23	75.56	84.00	44.40
K1673	98.63	72.40	79.01	44.50
K1775	70.43	64.30	98.60	n/a
K1778	84.23	75.55	98.99	43.50
K1779	68.55	56.22	96.45	n/a
K1780	69.00	72.80	87.04	n/a
K1801	67.12	74.60	98.39	45.40
K1901	88.33	92.10	92.00	44.60
S0624	83.46	98.80	96.33	47.10
S1401	72.12	81.06	98.60	n/a
S1701	78.00	56.00	98.40	n/a
E. coli	3.12	2.00	1.70	

'n/a': not available.

K 0104, K 0310, K 0313, K 0515, K 0518,
K 0519, K 0520, K 0732, K 0834, K 1043,
K 1045, K 1250, K 1261, K 1362, K 1363,
K 1570, K 1775, K 1778, K 1779, K 1801,

K 1901, S 0624, S 1401 および KS 1701 の 25 株においては, 90% 以上の相同性を示したが, K 0208, K 1465, K 1467 および K 1468 の 4 株との間には相同性が低かった。

以上の成績を標準 (対照) 菌株を基準にしてみると, 患者より分離・純培養を行った 41 菌株の多くは, 分離培養された菌株の一部である K 0208, K 1467, K 1779, K 1780 および K 1801 を除いて NCTC 9710 (血清型 “c”) に対して非常に相同性が高く, 次いで ATCC 29523 (血清型 “a”) に対しても相同性を示す菌株が多かった。

2) DNA の G+C 含量 (mol%)

標準 (対照) 菌株である ATCC 29523, FDC Y 4, NCTC 9710 の DNA の G+C 含量 (mol%) は 46.60% から 47.80% の間にあったので, 比較的近似していた。

患者から分離・純培養した 41 菌株についてみると, 測定不能であった菌株が 13 株あったが, その他の菌株についてみると, K 0101 (47.70%), K 0520 (47.80%), K 1468 (47.70%) および S 0624 (47.10%) の 4 株については対照 (標準) 菌株と近似した値を示したが, 残る 23 株については 43.90% から 45.40% の間にあり, G+C 含量 (mol%) は少し低い値であった。

考 察

A. actinomycetemcomitans の研究は局所型若年性歯周炎の原因菌であることが認められるようになり, 広く興味をもたれるところとなった。その後に成人性の歯周疾患についての情報が増加するにつれて, その中でも重篤な症例といえる急速進行型の歯周炎, 骨縁下ポケットを形成する局所的な骨吸収などに密接に関連している¹⁷⁾ことが明らかになりつつある。

この問題は, 歯肉縁下プラークに含まれる多数の微生物群の中でいくらかの特定の微生物のみが歯周組織の組織破壊を惹起する特異性を有するのではないかと考えられている¹⁸⁾。そのような微生物のひとつとして *A. actinomycetemcomitans* も, その病因性を疑われるようになってきた。

感染症としての側面より, *A. actinomycetemcomitans* の感染は内因性の日和見感染などではなく, 外因性の感染について調査した報告¹⁹⁾に対して, 局所型若年性歯周炎の感染に関する疫学的な研究²⁰⁾により肯定的な報告がみられる。

一方では, 疾病を惹起した *A. actinomycetemcomitans* の感染は従来の歯周治療では, その感染を除去

することは容易ではないことが疫学的な調査²¹⁾によって知られている。また、そのような症例は“refractory case”として知られており²²⁾、現在その病因について種々の研究がなされている。近年、少数ではあるが日本人の成人性歯周炎患者について *A. actinomycetemcomitans* の感染が報告²³⁾されており、さらに糖尿病に罹患した歯周炎患者にも感染が検出されている²⁴⁾。そのような訳で *A. actinomycetemcomitans* の病原性に関する説明が期待されている。

本研究では日本人の成人性歯周炎より分離した *A. actinomycetemcomitans* について近年、微生物の同定・分類の基準として行われている手法のうち4種類を用いて分析を行った。すなわち、基本的な生化学的性状、API-ZYM system による酵素活性による検討、SDS-PAGE によるタンパク質の分子量およびDNA-DNA の相同性である。これらの手法は、酵素活性および、タンパク質の分子量ならびにDNAを指標とした分子生物学的な手法である。

歯周炎と *A. actinomycetemcomitans* との関連が研究され始めた当初より、この菌株について3種類の血清型の存在が知られており、感染患者より分離される菌株の血清型の分布状況に関する報告²⁵⁾は多い。それらの報告によれば、感染した患者一人あたりの口腔内には一種類のみの血清型からなる *A. actinomycetemcomitans* が分離されることが知られており²⁶⁾、遺伝的に単一の *A. actinomycetemcomitans* が感染し、その他の血清型のもの、あるいは遺伝的に相異なる菌株が混合感染することは現時点では観察されていない。

特に日本においては真性の局所型若年性歯周炎が極少数しか認められないこと、加えて、日本人の成人性歯周炎より探知される *A. actinomycetemcomitans* は血清型の“b”のものはほとんど見当たらないと報告⁸⁾されている。

この研究を開始するに当たって日本人の成人性歯周炎患者の口腔内より分離培養を試みたが、血清型の“b”の菌株を分離することは不可能であった。

日本人の成人性歯周炎患者の歯肉縁下ブランクより分離した、純培養菌株は、TSBV 培地表面に形成したコロニーの内部構造物が明瞭に観察されたものはほとんど無く、従来言われているような透明なコロニー内部の星型構造物は、一切観察されなかった。加えて、数十代の継代培養を重ねていくうちに、コロニーの辺縁形態が、ラフ型よりスムーズ型へと徐々に移行していった。

液体培地中では増殖後の特筆すべき所見として、純培養菌株は試験管の管壁に強固な付着、および強い疎水性を有していた。

一方、対照（標準）菌株である ATCC 29523, FDC Y 4 および NCTC 9710 の3菌株のコロニーの肉眼所見は白色で辺縁はスムーズ型のもので、TSBV 培地、TB 培地上への付着能は認められず、液体培地中においては均一な懸濁液となり疎水性も観察されなかった。この性状は、Kozlovsky ら²⁷⁾の報告と一致している。

血清型の分類と同様に糖発酵能の差異による“biotype”も知られるようになり十数種類の型があると報告²⁸⁾されている。しかし、このような細菌の生化学的な表現形式が直接に病型に関連するという報告は見当たらない。

本研究においてもいくらかの亜型と考えられる生化学的表現型が混在した。病原性を発揮すると考えられる酵素活性としてはアルカリ、酸性の両ホスファターゼ活性が非常に強いことがあげられる。これは著者の分離培養した菌株も等しく保有する性質で恐らく歯周疾患の病因の一因子と考えられる。

遺伝子の本体であるDNAの遺伝情報はその塩基配列に組み込まれているが、その配列を知ることは非常に困難である。タンパク質は各種アミノ酸から構成された高分子化合物であり、その一次構造はDNAの塩基配列によって規定されておりDNAの塩基配列の反映のひとつと考えられ、微生物のタンパクについてもこれを比較することによって類縁性を比較することが出来ると考えられる。タンパクの構造的性質を簡便かつ迅速に研究する手段として電気泳動法が利用されている。タンパクは両性電解質であり、それぞれ異なった荷電を持つため、適当なpH、緩衝液および支持体を選択し電場をかけると、荷電の差に基づき固有の速度で移動するため、支持体の分子ふるい効果とあわせ、分離することが出来る。

本研究では、緩衝液にSDSを添加したポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法（SDS-PAGE）で行った。微生物の種レベルでは、非常に明確なパターンの差異によって有効な方法であると言われている。

今回の研究では、34菌株においてほぼ等しいパターンが観察され、標準（対照）菌株である、ATCC 29523 と非常に近似した傾向を示したことは血清反応による結果と一致する。より明確な分類を行うためには、特定の酵素基質によるスラブゲルに対する染色法の適用が効果的であるのではないかと考えている。

本研究では、*A. actinomycetemcomitans* の病原性、あるいは病変の活動性を論じている訳ではないが、臨床における診査・診断基準の根拠のよりどころとして、分離・純培養された *A. actinomycetemcomitans* の各種の生化学的性状および酵素活性を把握することは、

同菌種の同定において重要であると考えている。

DNA 巨大分子中の莫大な情報量は、細菌ゲノムの塩基配列にゆだねられているが、これを解析することは、実際的ではなく、DNA-DNA の相同性をハイブリダイゼーションによる核酸の塩基配列の比較が、2 つの異なったゲノムの相同性を比較する上での手法である。細菌の形態その他の表現型の差異が、DNA の塩基配列の違いに由来していると考えられることから、表現形質よりさらに本質的な情報を与えてくれるものとして、DNA の諸性質が微生物の分類体系を評価する有効な手段となっている。

一方、DNA の塩基組成が近似していることは、生物間の系統学的な近縁性の十分条件ではないが必要条件であると言われている。

近年、様々な研究者が種々の病原性細菌についてそれらの遺伝子を分析して同定・分類を行う手法により感染の由来を精密に解析しようと試みている²⁹⁾。なかでも DNA を制限酵素によって断裂させたフラグメントを電気泳動により電気泳動パターンとして視覚化により分類の試みがなされて成果があげられて、その手法は“DNA finger printing”と呼ばれる。

それによるとわずかに数種類の遺伝子的な型に分類されるのではないかと考えられており、さらに同一の血清型でも異なる遺伝的な型に属するといった報告がある。また現時点では血清型のように確立された分類がなされている訳ではない。このような報告により歯周炎患者の各々の口腔内に感染した *A. actinomycetemcomitans* は血清学的、遺伝子情報的にも単一のもので、この現象を“clonal infection”と呼称¹¹⁾している。これらの問題に関する研究者は、近い将来において、恐らくその感染源が特定されるであろうと推測している。

本研究において分離した 41 菌株をフィルターを用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行って標準（対照）菌株との相同性を検討した結果、大多数の菌株が純培養菌株群とは異なった血清型である血清型“c”の NCTC 9710 株に対して非常に高値の相同性を示した。次いで、分離菌株の血清型“a”と同一の ATCC 29523 株に対して NCTC 9710 に対するものと比較すればやや低値ではあるが高い相同性を示し、FDC Y 4 株に対しては 3 菌株の中でも最も低い相同性を示すものが多数を占めた。

この事実は、不特定の母集団より無作為に抽出した分離・純培養菌株が、ある特定の遺伝的な系統に属するものではないが、また、それが標準菌株群のいずれにも属さないものである可能性が考えられる。しかし、菌株それぞれに対する固有の絶対的な評価である

“DNA finger printing”の手法に対して DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる分析の欠点は、標準（対照）菌株に対する相対的な評価のみであり、その結果も DNA プローブとして供試する菌株の DNA の状態によっても左右される可能性がある。それに対して“DNA finger printing”の欠点は、その電気泳動パターンは非常に不安定で、その泳動像を読み取りにくいといった問題点を有する。

いずれの方法も分析の対象となる DNA の全フラグメントは、その抽出の段階より不特定の位置での断裂によるエラーが生じていると考えられるし、全ての菌株において同一の条件で抽出されたかどうかの検定手段が存在しない。将来、本研究で分離純培養した菌株に対し“DNA finger printing”を行い、今回の成績と比較検討する価値があるのではないかと考えている。

以上の結果を考察すれば、標準（対照）菌株である ATCC 29523, NCTC 9710 のいずれとも異なる型の *A. actinomycetemcomitans* である可能性がある。

日本人の成人性歯周炎において *A. actinomycetemcomitans* が歯肉縁下プラークより探知され、その、41 菌株にほぼ共通した遺伝的な分類傾向が観察されたという現象は、現在のところ比較検討する報告が少ないが、“clonal infection”を示唆しているのではないかと考えている。日本人では若年性歯周炎の症例報告が非常に少なく、それが、今回の研究によって調査された成人性歯周炎において多数を占めた血清型“a”の *A. actinomycetemcomitans* との相関を見いだすことは現時点において不可能であるが、日本人の若年性歯周炎患者の臨床分離菌株と比較検討することは、興味深いテーマであろう。

今後、分類における精度と特異性を向上させる手段として、菌体（細胞）をゲル中に固定した状態で DNA を抽出し、ゲノムを壊さないままに電気泳動を行うパルスフィールド電気泳動法、DNA ゲノムの一部分の既知のシーケンスをプローブとして用いたプロット法などの応用によって検討を重ねれば、さらに詳細な分類が可能になるであろう。

結 論

日本人の成人性歯周炎患者の病巣部から歯肉縁下プラークを採取し、41 の血清型“a”の *A. actinomycetemcomitans* 純培養菌株を得た。ATCC 29523（血清型“a”）、FDC Y 4（血清型“b”）、NCTC 9710（血清型“c”）を標準菌株として、生化学的性状、API-ZYM による酵素活性、SDS-PAGE

によるタンパクの分析, DNA-DNA の相同性, DNA の G+C 含量を調べ, 同定・分類を行った。

その結果, *A. actinomycetemcomitans*, NCTC 9710 (血清型“c”)と遺伝的な距離が非常に近い株が大多数であり, *A. actinomycetemcomitans* のいわゆる“clonal infection”を示唆していると考えられた。

文 献

- 1) Christersson L.A., Zambon J.J. and Genco R.J. : Dental bacterial plaques. Nature and role in periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 18 : 441-446, 1991.
- 2) Zambon J.J., Christersson L.A. and Genco R.J. : Diagnosis and treatment of localized juvenile periodontitis. J. Am. Dent. Assoc., 113 : 295-299, 1986.
- 3) Dzink J.L., Tanner A.C., Haffajee A.D. and Socransky S.S. : Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. J. Clin. Periodontol., 12 : 648-659, 1985.
- 4) Haffajee A.D., Socransky S.S., Dzink J.L., Taubman M.A. and Ebersole J.L. : Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 15 : 390-398, 1988.
- 5) Eisenmann A.C., Eisenmann R., Sousa O. and Slots J. : Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. J. Periodontol., 54 : 712-713, 1983.
- 6) Ebersole J.L., Taubman M.A., Smith D.J., Genco R.J. and Frey D.E. : Human immune responses to oral micro-organisms. I Association of localized juvenile periodontitis (LJP) with serum antibody responses to *A. actinomycetemcomitans*. Clin. exp. Immunol., 43 : 43-52, 1982.
- 7) Tsai C.C., Chen C.C. and Hou G.L. : Clinical, microbiological and immunological study on a Korean localized juvenile periodontitis. The 3rd. Meeting of International Academy of Periodontology, 1988.
- 8) 扇 正一, 鴨井久一 : ヒト歯肉縁下プラーク中の *A. actinomycetemcomitans* とその血清分布. 歯周誌, 32 : 450-469, 1990.
- 9) Zambon J.J., Christersson L.A. and Slots J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease ; Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J. Periodontol., 54 : 707-711, 1983.
- 10) Müller H-P., Lnage D.E. and Muller R.F. : *A. actinomycetemcomitans* contamination of toothbrushes from patients harbouring the organism. J. Clin. Periodontol., 16 : 388-390, 1989.
- 11) Zambon J.J., Sunday G.J. and Smutko J.S. : Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. J. Periodontol. 61 : 75-80, 1990.
- 12) Phillips J.E. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., vol. 1, Williams & Wilkins., Baltimore/London, 1989, 570-575.
- 13) Slots J. : Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Clin. Microbiol., 15 : 606-609, 1982.
- 14) Kilian M. : Manual of Clinical Microbiology., 5th ed., American society for microbiology., Washington, D.C., 1991, chapter 45.
- 15) Silhavy T.J., Berman M.L. and Enquist L.W. : Experiments with Gene Fusions., Cold Spring Harbor Laboratory., Cold Spring Harbor ; N.Y., 1984, 137-139.
- 16) Lugtenberg B., Meijers J., Peters R., van der Hoek P. and Alphen L. : Electrophoretic resolution of the “major outer membrane protein” of *Escherichia coli* K 12 into four bands. FEBES. Lett., 58 : 154-, 1975.
- 17) 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.
- 18) Slots J. : Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. J. Clin. Periodontol., 13 : 912-917, 1986.
- 19) Christersson L.A., Slots J., Zambon J.J. and Genco R.J. : Transmission and colonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. J. Periodontol., 56 : 127-131, 1985.
- 20) DiRienzo J.M., Cornell S., Kazoroski L. and Slots J. : Probe-specific DNA fingerprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis. Oral. Microbiol. Immunol., 5 : 49-56, 1990.
- 21) Renvert S., Wikstrom M., Dahlen G., Slots J. and Egelberg J. : On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. J. Clin. Periodontol., 17 : 351-355, 1990.
- 22) Magnusson I., Marks R.G., Clark W.B., Walker C.B., Low S.B. and McArthur W.P. : Clinical, microbiological and immunological characteristics of subjects with “refractory” periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 18 : 291-299, 1991.

- 23) 小高 博, 笹本幸資, 小延裕之, 扇 正一, 鴨井久一: 糖尿病を有する成人型歯周炎患者より分離された *A. actinomycetemcomitans* の諸性状について. 日歯周誌, 33 : 416-426, 1991.
- 24) 扇 正一, 浅木信安, 青木 護, 中島 茂, 松下正博, 長弘謙樹, 鴨井久一: 糖尿病のコントロールされていない歯周疾患. 日歯周誌, 33 : 767-781, 1991.
- 25) 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.
- 26) Sandholm L.T. and Olsen I. : Salivary IgG, a parameter of periodontal disease activity? High response to *A. actinomycetemcomitans* Y 4 in juvenile and adult periodontitis. J. Clin. Microbiol., 14 : 289-294, 1987.
- 27) Kozlovsky A., Metzger Z. and Eli I. : Cell surface hydrophobicity of *A. actinomycetemcomitans* Y 4. J. Clin. Periodontol., 14 : 370-372, 1987.
- 28) Pulverer G. and Ko H.L. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ; Fermentative capabilities of 140 strains. Appl. Microbiol., 20 : 693-, 1970.
- 29) Genco R.J. and Loos B.G. : The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria periodontitis. J. Clin. Periodontol., 18 : 396-405, 1991.

連絡先:

日本歯科大学歯学部歯周病学教室

〒102 千代田区富士見 2-3-16