Actinomyces viscosus から分離した *Porphyromonas gingivalis* に対する付着関連因子の性状

笠 毛 甲太郎

鹿児島大学歯学部歯科保存学講座 (2)

(指導：末田 武教授)

(平成 8 年 11 月 10 日受付)

Isolation and Characterization of an *Actinomyces viscosus* Aggregation Factor That Mediates Coaggregation with *Porphyromonas gingivalis*

Kohtaro Kasamo

Department of Periodontology, Kagoshima

University Dental School

8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890, Japan

(Director : Prof. Takeshi Sueda)

Intergeneric coaggregation is responsible for the complexity of the microbiota in human dental plaque and is believed to be important in the initial colonization by bacteria of the human oral cavity.

Actinomyces viscosus (*A. viscosus*), an early colonizer of the tooth surface, may enhance subsequent colonization by *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) which is associated with adult periodontitis. The purpose of this study was to isolate and characterize the *A. viscosus* aggregation factor (AvAF) that mediates coaggregation with *P. gingivalis*. AvAF was isolated from *A. viscosus* sonic extract (SE) by gel filtration on Sephacryl S-400 HR, by hydrophobic interaction chromatography on HiTrap Octyl Sepharose 4 FF, and by ion exchange chromatography on HiTrap Q.

The specific activity increased 12-fold with a yield of 2.5%. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis analysis of AvAF revealed a protein band of high molecular weight in excess of 200 kDa. Carbohydrate was detected as the only other material coinciding with the protein band, indicating that the AvAF was a glycoprotein.

Immunoblotting analysis indicated that AvAF bound to *P. gingivalis* cells. AvAF was sensitive to sodium metaperiodate treatment but not to heat or protease treatment. These data suggest that the carbohydrate component of AvAF mediated coaggregation with *P. gingivalis* cells. AvAF also inhibited coaggregation with other periodontal disease-associated bacteria such as *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga ochracea*.

Key words : *Actinomyces viscosus*, Aggregation factor, Coaggregation, *Porphyromonas gingivalis*

要旨：アーリーコロナイザーズ (early colonizers) の1つで多くの歯周病関連細菌の定着の足がかりになっていると考えられている *Actinomyces viscosus* の菌体表層成分から、歯周病関連細菌で成人性歯周炎の有力な原因菌とされている *Porphyromonas gingivalis* に対する付着関連物質の1つと考えられる、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて 200 kDa を超える高分子量物質 (AvAF) を分離した。分離は Sephacryl S-400 HR によるろ過、HiTrap Octyl Sepharose 4 FF による疎水性クロマトグラフィー、HiTrap Q による陰イオン交換クロマトグラフィーにより行った。得られた AvAF の蛋白質あたりの *P. gingivalis* に対する共凝集阻害活性は 12 倍に上昇し、回収率は 2.5% であった。AvAF には糖も検出されたことから糖蛋白であることが示唆された。

その活性は加熱処理、プロテアーゼ処理に耐性であったが、過ヨウ素酸処理に感受性があった。よって、AvAFの活性は糖に存在することが明らかとなった。また AvAF は *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga ochracea* の *A. viscosus* に対する共凝集においても阻害作用を示した。

索引用語: *Actinomyces viscosus*, 付着関連因子, 共凝集, *Porphyromonas gingivalis*

緒 言

感染症の成立においてその原因菌の付着, 定着が最初の重要なステップであることは広く受け入れられている¹⁾。歯周病も歯周病関連細菌といわれる細菌の歯肉溝への定着によって引き起こされると考えられているため, 感染症のひとつである²⁾。

歯周病の病因となっている歯肉縁下プラークは膨大な数のグラム陽性菌とグラム陰性菌が複雑に関係した細菌叢から成っている³⁾。Listgarten⁴⁾は歯面に近い部分は主にグラム陽性球菌, ジフテリア状菌, 放線菌が占めており, その外側に比較的ゆるくグラム陰性の桿菌や線状菌が付着した細菌の序列を観察している。*Streptococcus* 属や *Actinomyces* 属といったグラム陽性菌は獲得皮膜を介して, または直接歯面に付着する能力があり, アーリーコロナイザーズ (early colonizers) と呼ばれている⁵⁾。

一方 *Porphyromonas* 属, *Prevotella* 属, *Bacteroides* 属, *Fusobacterium* 属, *Capnocytophaga* 属といったグラム陰性の歯周病関連細菌といわれるものは, それ自身で歯面に付着することができないものが多く, 主として既に歯面に定着している細菌群に付着することで定着の足がかりを見いだしていると考えられており⁶⁾, セカンダリーコロナイザーズ (secondary colonizers) と呼ばれている⁵⁾。*Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*) はアーリーコロナイザーズの一員で健康者および歯肉炎患者のプラークから高頻度に分離され, 歯肉炎の発症や進行に関わっていると考えられている^{7,8)}。また一方で歯周病関連細菌とされている種々のグラム陰性菌と共凝集することが確認されており⁹⁾, *A. viscosus* の存在がグラム陰性菌の定着を促進するという報告⁹⁾から, 歯周病発症にも深く関与していると考えられる。

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) は黒色素産生性のグラム陰性嫌気性桿菌の一種で, 歯周炎患者の歯周ポケットから高頻度で分離され, その多彩な生物活性から歯周病関連細菌の一つとして注目されている^{10,11)}。またその定着が *A. viscosus* の存在により促進されることが明らかにされている¹²⁾。

A. viscosus と *P. gingivalis* における共凝集については, これまでその特異的なメカニズムの解明を目指

して研究が行われてきた。しかし, この共凝集が多くのプラーク細菌の特異的な結合を担っているとされている蛋白性 adhesin と糖 receptor の検索で通常行われるような加熱処理, 各種酵素処理等の菌体処理試験や各種糖による阻害試験に対して明確な反応を示さないことから¹³⁾ adhesin-receptor の存在を証明できないままになっている。また, これまでの報告は *P. gingivalis* が歯周病関連細菌である為か, その線毛¹⁴⁾, LPS¹⁵⁾, vesicle^{15,16)}, トリプシン様酵素¹⁷⁾といった成分について付着関連因子としての可能性を検索したものが多く, *A. viscosus* 側についての言及は少ない。本研究では *A. viscosus* の付着関連因子について分離を試み, その性状を分析することにした。それによって解明困難であったこの共凝集の一端が明らかになる可能性があると考えた。また歯周病は混合感染であり, そのことが歯周病の予防や治療を困難にしている最大の要因となっている。*A. viscosus* はアーリーコロナイザーとして多くの歯周病関連細菌の定着の足がかりになっていると考えられていることから⁹⁾, その分析は *P. gingivalis* 以外の歯周病関連細菌の定着機構にも何か知見を与えてくれる可能性も有していると考えた。

材料と方法

1. 供試菌株および培養条件

A. viscosus として成人性歯周炎患者より分離, 同定した臨床分離株 *A. viscosus* KWS 81 を使用した。本菌の分離, 同定については, 以下のようにして行った。鹿児島大学歯学部附属病院歯周病治療科を受診し, 成人性歯周炎と診断された患者よりペーパーポイント (ジョンソン・アンド・ジョンソンメディカル, 東京) にて歯肉縁下プラークを採取し, 5% 脱線維素ヒツジ血液加 Trypticase soy agar (BBL Microbiological Systems, Cockeysville, MD, USA) に播種し, 嫌気ボックス (Forma Scientific, OH, USA) にて 80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ の条件下, 37°C で 10 日間培養した。その後 macrocolony 性状¹⁸⁾, グラム染色をもとに釣菌し, 3 回画線培養し, 純培養を確認後, カタラーゼ試験¹⁸⁾, 酸素要求性試験¹⁸⁾, インドール試験¹⁹⁾, PYG ブロース及び GAM ブイヨン (日水製薬, 東京) を用いたグルコースの最

終代謝産物のガスクロマトグラフィー分析^{20,21)}を行い、それらの結果により同定を行った。また *P. gingivalis* として本教室所有の臨床分離株である *P. gingivalis* KC 409 を使用した。

両菌種とも GAM ブイヨンに接種し、*P. gingivalis* についてはヘミン (5 µg/ml) (ナカライテスク、京都)、メナジオン (1 µg/ml) (ナカライテスク) を加えた。培養は嫌気条件下、37°C、48 時間行った。

2. *A. viscosus* 菌体表層成分の調整

Kolenbrander らの方法²²⁾に準じて行った。即ち *A. viscosus* KWS 81 ブロースカルチャーを 8,000×g にて遠心、集菌し、蒸留水にて 3 回洗浄した後、菌体 600 mg (湿重量) を蒸留水にて 3 ml に調整し、氷冷下にて SONICATOR (和研薬、京都) による超音波処理を 1 分間行った。その後、20,000×g にて遠心し、上清を採取し、sonic extract (SE) とした。

3. *A. viscosus* 付着関連因子の分離

20 ml の SE (蛋白量 18 mg) を 20 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl pH 8.0 で透析し、CentriCell® 20 (10,000 cut off) (Polysciences, Inc. UK) にて 500 µl に濃縮した後、0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) (ナカライテスク) を添加した同緩衝液で平衡化した Sephacryl S-400 HR (1.5 by 50 cm) (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) に添加した。すべての操作は室温で行い、流速は 1 ml/min とした。溶出液を 1 ml ずつ分取し、各画分の 280 nm における吸光度を測定した。また各画分に含有する SDS を Ampure™ DT (Amersham Int., Amersham, Buckinghamshire, UK) にて除去し、適度の間隔において選んだ画分ごとに共凝集阻害活性試験ならびに SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。共凝集阻害活性測定にて 3 つの活性を有するピークを認め、そのうち SDS-PAGE にて 200 kDa を超えるブロードを示す高分子量バンドを含む画分をプールした。得られた画分を 2.0 mol/l 硫酸アンモニウム溶液とし、HiTrap Octyl Sepharose 4 FF (bed volume 1 ml) (Pharmacia) による疎水性クロマトグラフィーを行った。溶出は 50 mmol/l リン酸緩衝液 pH 7.0 ベースで硫酸アンモニウム濃度 1.5 mol/l, 1.0 mol/l, 0.5 mol/l, 0 mol/l のステップワイズで行った。溶出は室温にて流速 1 ml/min で行い、280 nm における吸光度を測定した。各ステップの画分について共凝集阻害活性を測定した。得られた画分を 20 mmol/l bis-Tris propane pH 7.0 にて透析した後、HiTrap Q (bed volume 1 ml) (Pharmacia) による陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。溶出は同緩衝液に

て NaCl 濃度 0 から 1.0 mol/l の濃度勾配をかけて、室温にて流速 1 ml/min で行った。溶出液を 1 ml ずつ分画し、各画分の 280 nm における吸光度を測定した。280 nm において、3 つのピークを得、各々プールした。各々の画分について共凝集阻害活性を測定し、活性を有する画分を最終標品 (*A. viscosus* aggregation factor: AvAF) とした。

4. ウサギ抗血清の調整

A. viscosus に対するウサギ抗血清を調整した。滅菌生理食塩水にて OD₆₅₀=0.1 に調整した *A. viscosus* 菌液 1 ml を体重 3 kg の雄のウサギ (日本白色) (九動、熊本) の後背部皮下に 0.2 ml ずつ 5 カ所に接種した。接種は 1 週間毎に 3 回行った。最終免疫終了後 1 週間後に採血し、血清を分離した。得られた抗血清を PBS にて OD₆₅₀=1.0 に調整した *P. gingivalis* 菌液により吸収した。即ち抗血清と *P. gingivalis* 菌液を 1:100 (v/v) となるように混合し²³⁾、4°C において振盪しながら一晩インキュベートした。その後、遠心を行い、上清を採取した。この操作を 3 回行い、得られた上清を *A. viscosus* に対する抗血清とし、イムノブロットに供試した。

5. SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli の方法²⁴⁾に準じて行った。ゲルは厚さ 1 mm の 2-15% グラジエントゲル (第一化学、東京) を用いた。Sephacryl S-400 HR で得た画分および AvAF を sample buffer (0.0625 mol/l Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (w/v) glycerol, 5% (w/v) mercaptoethanol, 0.001% (w/v) bromophenol blue (BPB); pH 6.8) に溶解し、100°C で 2 分間処理した。蛋白染色は泳動後のゲルを銀染色 (銀染色 II キットワコー; 和光純薬、大阪) した。

6. イムノブロット

AvAF の *P. gingivalis* に対する付着能を検索するためにイムノブロットを行った。

(1) 試料の調整

Goulbourne ら¹⁴⁾の方法に準じて行った。AvAF 100 µl (蛋白量 7.5 µg) を PBS にて OD₆₅₀=2.0 に調整した *P. gingivalis* 菌液 250 µl と混合し、室温下で振盪しながら 30 分インキュベートした。その後、遠心し、*P. gingivalis* 菌体を PBS にて 2 回洗浄した。洗浄後の *P. gingivalis* 菌体に 50 mmol/l glycine-HCl pH 2.5 を加え、懸濁後、室温下で振盪しながら 10 分間インキュベートした。その後、遠心し、上清を採取した。尚コントロールとして AvAF のかわりに PBS を用い、同様に処理し、*P. gingivalis* との交差反応の有無を調べた。

(2) SDS-PAGE およびイムノブロット

上記試料について SDS-PAGE を行い、泳動後のゲルをニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) に転写した。転写はトランスブロット SD (Bio-Rad) を用い、15 V で 30 分を行った。転写した膜を 3% gelatin-20 mmol/l Tris, 500 mmol/l NaCl, pH 7.5 (TBS) でブロッキング後、0.05% Tween 20 を含む TBS (TTBS) で洗浄し、あらかじめ *P. gingivalis* にて吸収操作を行った *A. viscosus* に対するウサギ抗血清を 1% gelatin-TTBS で 1,000 倍に希釈し、室温で 1 時間反応させた。次に TTBS で洗浄後、1% gelatin-TTBS で 3,000 倍に希釈したホースラディッシュペーパーオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Bio-Rad) を室温で 1 時間反応させた。TTBS, TBS の順で洗浄後、4-クロロ-1-ナフトールにて発色させる HRP 発色キット (Bio-Rad) を用い発色を行った。

7. 糖検出

AvAF が糖を含有するか否かを検索した。

AvAF について SDS-PAGE 及びニトロセルロース膜への転写を行い、Glyco Track™ Carbohydrate Detection Kit (Oxford GlycoSciences, PLC, UK) により行った。

8. AvAF の物理化学的処理に対する感受性

AvAF 50 μ l (1 力価) について、以下の処理を行い、その共凝集阻害活性の感受性を判定した。

1) 加熱処理

100°C, 10 分間行った。

2) プロテアーゼ処理

Ebisu ら²⁵⁾の方法に準じ、AvAF のプロテアーゼ処理を行った。trypsin (type IX; Sigma, St. Louis, MO, USA), pronase E (protease type XXV; Sigma) を用いた。AvAF 50 μ l を trypsin (5 μ g/ml in PBS pH 7.6), pronase E (2 μ g/ml in PBS pH 7.5) にて 37°C, 1 時間処理した。インキュベート後、100°C で 10 分間加熱処理し、酵素を不活化した。その後、共凝集阻害活性試験に供試した。尚、酵素のみを含有するバッファーを加熱処理したものを各々コントロールとし、加熱処理した酵素自体が共凝集反応を阻害しないことを確かめた。

3) 過ヨウ素酸処理

10 mmol/l メタ過ヨウ素酸ナトリウム (ナカライテスク) pH 4.0 中にて室温で 10 分間処理した。インキュベート後、Centricon® 10 (10,000 cut off) (Amicon, inc. MA, USA) にて過ヨウ素酸を除去し、PBS にて透析した。

9. 界面活性剤などによる AvAF の共凝集阻害活性の感受性

SDS, Tween 80 (ナカライテスク), Bovine serum albumin (和光純薬) を用いた。

AvAF 50 μ l (1 力価) に PBS にて溶解した SDS, Tween 80, BSA を最終濃度で SDS (0.1 mmol/l), Tween 80 (0.05%), BSA (100 μ g/ml) となるように加え²⁷⁾、共凝集阻害活性試験を行った。

10. 共凝集阻害活性試験および判定法

A. viscosus および *P. gingivalis* のブロースカルチャーを遠心、集菌し 10 mmol/l phosphate buffered saline (PBS) にて 3 回洗浄した後、PBS に OD₆₅₀ = 2.0 となるように分散させ、調整菌液とした。96 穴丸底アッセイプレート (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) に供試する試料を添加した PBS 100 μ l を入れ、*P. gingivalis* 菌液を各ウェルに 5 μ l 加え、10 分間振盪後、*A. viscosus* 菌液を 5 μ l 加え、さらに 10 分間振盪した。1 時間室温にて静置し、ウェル内の凝集塊を観察した。判定は Kolenbrander²⁶⁾の方法に準じて、凝集塊の分布と大きさにより、0~+4 のスコアで表示した (図 1)。

AvAF の分離過程における共凝集阻害活性試験は各画分を PBS にて透析後行うこととし、判定は各画分を PBS にて段階希釈し、スコア 0 を示す最高希釈度を基準とし、力価を求めた。また物理化学的処理および疎水性インヒビターによる感受性の判定は、未処理の AvAF (1 力価) にて完全阻害されたウェルをコントロール (スコア 0) としスコア判定した。

11. 化学分析

蛋白質の定量は、標準標品として BSA を用い、BCA protein assay kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) で行った。ヘキサースの定量は、標準標品としてグルコース (ナカライテスク) を用い、Dubois²⁸⁾らの方法で行った。アミノ酸分析は AvAF を精製水にて透析後、6 N 塩酸 (ナカライテスク) で 150°C, 1 時間減圧下で加水分解し、Wakosil-PTC カラム (和光純薬) を用い、HPLC (CCPM, トーソー) で行った。スタンダードとしてアミノ酸混合標準液 (H 型) (和光純薬) を用いた。糖組成分析は AvAF を精製水にて透析後、1 N 硫酸 (ナカライテスク) で 150°C, 3 時間減圧下で加水分解し、カラムは ISA-07/S 2504 (島津製作所, 京都) を用い、HPLC (L 6200; 日立製作所, 東京) で行った。

12. A. viscosus と他の歯周病関連細菌との共凝集における AvAF の阻害効果

A. viscosus と共凝集することが報告されているグラム陰性菌のうち *Prevotella intermedia* (*P. inter-*

図1 96穴アッセイプレートを用いた共凝集反応の5段階スコア〈文献27〉より引用
 スコア0: 菌体はすべてウェルの最深部に沈殿し、辺縁が明瞭でボタン状の外観を呈する。
 スコア1: 微細な凝集塊がウェルの最深部を中心として辺縁不明瞭な雲状に沈殿している。
 スコア2: 凝集塊がやや大きさを増しているがウェルの底部に均一に分布している。
 スコア3: 凝集塊がさらに大きさを増して一部はウェルの最深部に集合し、ウェルの底部は不均一になっている。
 スコア4: 大きな凝集塊がウェルの底部にほぼ一塊となって沈殿している。

media) KC 504, KC 505 (以上臨床分離株), ATCC 15032, ATCC 15033, ATCC 25611. *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) ATCC 10953, ATCC 25586. *Capnocytophaga sputigena* (*C. sputigena*) ATCC 33612. *Capnocytophaga ochracea* (*C. ochracea*) ATCC 33595 について *A. viscosus* KWS 81 との共凝集における AvAF の阻害効果を検索した。すべての供試菌株は PBS にて $OD_{650}=2.0$ となるように調整し, AvAF $50 \mu l$ (1 力価) を用いて *A. viscosus* KWS 81 との共凝集阻害活性試験に供試した。AvAF を含有しないウェルをコントロールし, スコア判定した。

結 果

1. AvAF の分離

A. viscosus の SE の Sephacryl S-400 HR によるゲルろ過パターンを図2に示す。*P. gingivalis* に対する

表1 Sephacryl S-400 HR 画分の共凝集阻害活性

画分番号	活性 (力価)
25	0
32	4
37	2
45	8
53	8
61	0
65	0
70	0

活性 (力価) は各画分を段階希釈し, 完全に共凝集を阻害する最高希釈度を基準として求めた。

共凝集阻害活性を測定した結果, 溶出パターンと一致するように3つのピークを検出した (表1)。SDS-PAGE により検索を行ったところ, 最初の活性ピークを有する画分 (S1) には, 分子量 200 kDa を超え

図2 Sephacryl S-400 HR

A. SE 20 ml (蛋白量 18 mg) を 20 mmol/l Tris-HCl 150 mmol/l NaCl pH 8.0 にて透析、濃縮後、カラム (1.5 by 50 cm) に添加した。溶出は 0.1% SDS 含有の同緩衝液で行った。(flow rate: 1 ml/min)。

B. 画分の SDS-PAGE により 200 kDa を超えるブロードを示す高分子量バンドを含む S1 画分 (画分番号 28-36) を回収し、プールした。

るブロードに広がる高分子量バンドが見られ、また同バンドは 2 および 3 番目の活性ピークを有する画分 (S2) には認められなかった (図 2)。

S1 画分から HiTrap Octyl Sepharose 4 FF による疎水性クロマトグラフィーおよび HiTrap Q による陰イオン交換クロマトグラフィーによりさらに分離を進めた。HiTrap Octyl Sepharose 4 FF での共凝集阻害活性画分は硫酸アンモニウム濃度 1.0 mol/l, 0.5 mol/l, 0 mol/l に認められた (図 3)。各画分 (A~D) についてイムノプロットを行った結果、硫酸アン

図3 HiTrap Octyl Sepharose 4 FF クロマトグラフィー

A. Sephacryl S-400 HR により得た回収画分を 2 mol/l 硫酸アンモニウム溶液とし、カラムに添加した。溶出は 50 mmol/l phosphate pH 7.0 ベースで硫酸アンモニウム濃度 1.5 mol/l, 1.0 mol/l, 0.5 mol/l, 0 mol/l のステップワイズで行った。(flow rate: 1 ml/min)。

B. 硫酸アンモニウム濃度 1.0 mol/l, 0.5 mol/l 溶出画分 (画分 B, C) を回収し、プールした。

モニウム濃度 1.0 mol/l (画分 B) および 0.5 mol/l (画分 C) に目的の高分子量物質と考えられる強い染色像が認められたため (データ省略), 両画分を合わせて次の陰イオン交換クロマトグラフィーに供試した。HiTrap Q では NaCl 濃度 0.2 mol/l から 0.37 mol/l に溶出されたものに共凝集阻害活性が認められた (図 4)。

HiTrap Q により得られた活性画分について SDS

図4 HiTrap Q クロマトグラフィー

A. HiTrap Octyl Sepharose 4 FF により得た画分 B, C のプール画分を 20 mmol/l bis-Tris propane pH 7.0 にて透析した後、カラムに添加した。同緩衝液にて NaCl 濃度 0 から 1 mol/l の濃度勾配をかけて溶出した。(flow rate: 1 ml/min)。

B. NaCl 濃度 0.2-0.37 mol/l 溶出画分 (画分 E) を回収した。

図5 AvAF の SDS-PAGE, イムノプロット, 糖検出

表2 AvAF の分離

	総蛋白量 (μ g)	総活性 (力価)	比活性 (力価/総蛋白量(μ g))	純度 (倍)	回収率 (%)
SE	18,240	400	0.022	1	100.0
Sephacryl S-400 HR	335	53	0.158	7	13.3
HiTrap Octyl Sepharose 4 FF	203	40	0.197	9	10.0
HiTrap Q	37.5	10	0.267	12	2.5

-PAGE を行った結果、ゲルろ過にて検出した高分子量バンドを分離できたことを確認し (図5), AvAF とした。蛋白質あたりの活性は、12 倍に上昇し、回収率は 2.5% であった (表2)。また同部位に糖の存在も認められた (図5)。さらにイムノプロットにより、AvAF は *P. gingivalis* に付着することを認めた (図5)。尚、同相当部位に *P. gingivalis* との交差反応は認められなかった (データ省略)。

2. AvAF の物理化学的性状

AvAF において 100 μ g の蛋白質当たり 0.7 μ g のヘキソースを含有していた。

アミノ酸組成分析により Acidic 7.5%, Basic 23.7%, Polar uncharged 12.3%, Nonpolar 56.4% であった (表3)。糖組成分析により rhamnose 1.2%, galactose 92.6%, glucose 6.2% を含有していたことが明らかとなった (表4)。

AvAF は加熱処理およびプロテアーゼ処理 (trypsin, pronase E) に対して耐性であったが、過ヨウ素酸処理に対しては感受性が認められた (スコア 0 → 3) (表5)。

3. AvAF の界面活性剤などによる影響

SDS, Tween 80, BSA の存在でわずかな感受性が

表 3 AvAF のアミノ酸組成

組成	mol(比)
Asp(n)	2.7
Glu(n)	4.8
Ser	2.1
Gly	4.2
His	11.6
Arg	1.4
Thr	2.0
Ala	50.7
Pro	2.3
Tyr	2.9
Val	0.8
Met	0.9
Cys	1.1
Ile	0.3
Leu	0.5
Phe	0.9
Lys	10.7

表 4 AvAF の糖組成

組成	mol(比)
Ino	0
Rham	1.2
Man	0
Ara	0
Gal	92.6
Xyl	0
Glu	6.2

表 5 AvAF の物理化学的処理に対する感受性

処理	感受性
None(control)	0
Heat(100°C, 10 min)	0
Protease	
pronase E(2 µg/ml)	0
trypsin(5 µg/ml)	0
Sodium- <i>m</i> -periodate(10 mmol/l)	3

表 6 界面活性剤などによる AvAF の共凝集阻害活性への感受性

インヒビター	感受性
None(control)	0
SDS(0.1 mmol/l)	1
Tween 80(0.05%)	1
BSA(100 µg/ml)	1

表 7 AvAF の他の歯周病関連細菌への阻害効果

菌株	AvAF(-)	AvAF(+)
<i>P. intermedia</i> KC 504	3	0
KC 505	3	0
ATCC 15032	0	—
ATCC 15033	0	—
ATCC 25611	0	—
<i>F. nucleatum</i> ATCC 10953	3	0
ATCC 25586	3	0
<i>C. sputigena</i> ATCC 33612	0	—
<i>C. ochracea</i> ATCC 33595	1	0

認められた〈スコア 0 → 1〉(表 6)。

4. *A. viscosus* と他の歯周病関連細菌との共凝集における AvAF の阻害効果

AvAF は *A. viscosus* KWS 81 と *P. intermedia* KC 504, KC 505, *F. nucleatum* ATCC 10953, ATCC 25586, *C. ochracea* ATCC 33595 との共凝集を完全に阻害した。ただし, *C. ochracea* ATCC 33595 に関してはもともと共凝集能が弱かった。他の菌に関しては全く共凝集が起らなかった(表 7)。

考 察

本研究では, 供試菌株として *A. viscosus*, *P. gingivalis* と臨床分離株を用いた。予備実験において *A. viscosus* T 14 V, ATCC 15987, *P. gingivalis* 381, ATCC 33277 を用いた標準株における共凝集反応を調べたところ, 共凝集能の低下, 自己凝集(特に

P. gingivalis) の問題が認められた。そこで標準株のみではなく, 臨床分離株も交えて比較, 検討することにした。その結果, 両菌種において臨床分離株は標準株に比べ共凝集能が高いことを確認した(データ省略)。したがって本研究では, 臨床分離株を実験に供試することにし, そのなかで自己凝集がなく, 明瞭な共凝集反応を示す組み合わせである *A. viscosus* KWS 81 と *P. gingivalis* KC 409 を実験に供することにした。

A. viscosus 菌体表層成分から *P. gingivalis* に対する付着関連因子の 1 つと考えられる SDS-PAGE にて 200 kDa を超える高分子量物質をゲルろ過, 疎水性クロマトグラフィー, イオン交換クロマトグラフィーにより分離した。ゲルろ過において AvAF 以外の活性

も認めた。最初、予備実験として *A. viscosus* の *P. gingivalis* に対する付着関連因子を推定する目的で *A. viscosus* SE を用い、材料と方法 6. の手順にてイムノブロットを行った。その結果 200 kDa を超える高分子量域にブロードなバンドを検出し、同相当部位に *P. gingivalis* との交差反応を認めなかったことから、今回はこの物質を *A. viscosus* 付着関連因子として分離を試みることにした。AvAF はその protein band の相当部位に糖を検出したことから、糖蛋白であることが示唆された。Morris ら²⁹⁾ は同じグラム陽性菌である *Streptococcus sanguis* 菌体表層成分から唾液でコートした hydroxyapatite への付着を阻害する約 300 kDa の、SDS-PAGE にてブロードなバンドを示す高分子量糖蛋白を分離している。彼らはその物質を電顕による分析から fimbriae 由来のものだと述べている。筆者の分離した AvAF が fimbriae 由来のものか、または cell wall 由来のものかは現時点では不明である。

プラークは多くのグラム陽性菌と陰性菌で構成され、複雑な細菌叢を形成している³⁾。プラーク形成は細菌間の高い特異的作用の結果として起こり、そこには規則性が存在する⁵⁾。プラーク形成における細菌間の付着はランダムに行われることはない³⁰⁾。特異的分子間相互作用として多くのプラーク細菌について蛋白性 adhesin と糖性 receptor の機構が報告されている³¹⁾。

A. viscosus と *P. gingivalis* の共凝集は他の多くの共凝集、例えば *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集³²⁾ において見られるような明確な adhesin と receptor の関係を呈しない。Ellen ら¹³⁾ はこの共凝集は糖による阻害を受けず、両菌種ともプロテアーゼ処理に耐性の反応を呈したことから、この共凝集において adhesin-receptor の根拠を得られなかった。その後、*P. gingivalis* のトリプシン様酵素が付着関連因子として関与し、それがアルギニンによって阻害を受けることから、*A. viscosus* 側の付着関連因子がアルギニン含有の蛋白カペプチドであることを示唆し、adhesin-receptor の存在を否定している¹⁷⁾。しかし *A. viscosus* が加熱処理、プロテアーゼ処理に耐性であることから積極的な証明に至っていない。

A. viscosus と *P. gingivalis* の共凝集における特異的分子間相互作用を検索するために、分離した AvAF について各種性状を分析した。AvAF の *A. viscosus* と *P. gingivalis* との共凝集に対する共凝集阻害活性の加熱処理、プロテアーゼ処理、過ヨウ素酸処理に対する影響を調べた。その結果、過ヨウ素酸処理に対してのみ、感受性が認められた。このことから活

性は糖に存在し、*P. gingivalis* の whole cell の加熱処理により共凝集が完全に阻害されることから（データ省略）、*A. viscosus* と *P. gingivalis* 間の共凝集にも adhesin-receptor の関係が存在する可能性が示唆された。

細菌の付着、菌体間の凝集に関わる機構には特異的分子間相互作用の他に非特異的な作用である静電気作用、疎水性作用があると言われている³³⁾。Rosenburg ら³⁴⁾ は *A. viscosus* と *P. gingivalis* の共凝集には adhesin-receptor の関係よりもむしろ疎水性作用が重要であるとした。本研究においてもそのインヒビターと考えられている SDS, Tween 80, BSA の AvAF に対する影響を調べた。その結果、これらのインヒビターの存在によって AvAF の共凝集阻害活性の低下が観察されたが、その程度は弱いものであった。疎水性作用は、凝集する細菌どうしを近接させるのに重要な役割を果たし、その後、特異的分子間相互作用が付着を強固にすると考えられている¹⁾。

歯周病は混合感染であり *P. gingivalis* 以外にも *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Capnocytophaga* sp., *Eikenella corrodens* といったグラム陰性菌の関与が報告されている³⁵⁾。*A. viscosus* はこれらのグラム陰性菌と共凝集し、その足がかりとなっていると考えられている⁹⁾。本研究の結果、AvAF は *A. viscosus* KWS 81 と *P. intermedia* KC 504, KC 505, *F. nucleatum* ATCC 19053, ATCC 25586, *C. ochracea* ATCC 33595 との共凝集を明らかに阻害した。このことから *P. gingivalis* だけではなく複数の歯周病関連細菌の *A. viscosus* への付着に AvAF が関わっていることが示唆された。ただし供試した菌株が少なかったため、さらに検討する必要があると考える。

今回、*A. viscosus* の菌体表層成分から *P. gingivalis* に対する付着関連因子と考えられる物質を分離することで whole cell の状態ではわかりにくかったこの共凝集の性状の一端を明らかにできた。しかし、ゲルろ過により複数の活性を認めたことから *A. viscosus* 側の付着機構はもっと複雑なように思える。AvAF の細胞表層における局在や構造、機能の詳細な分析、および他に存在する活性の検索と AvAF との関連性を調べるのが今後の課題であると考ええる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤な御指導と御校閲を賜りました鹿児島大学歯学部歯科保存学講座 (2) 末田武教授に謹んで感謝いたします。また、常に適切な御指示と御指導を賜りました鹿児島大学歯学部予防歯科学講座井上昌

一教授に感謝いたします。研究の実施にあたり、直接の指導と御助言を戴きました鹿児島大学歯学部歯科保存学講座(2) 中馬雅彦助手および鹿児島大学歯学部予防歯科学講座山口泰平助手に厚くお礼を申し上げます。最後に種々の面にわたって貴重な御助言と御協力を戴きました鹿児島大学歯学部歯科保存学講座(2) の皆様方に感謝いたします。

文 献

- Ofek, I. and Beachey, E.H. : General concepts and principles of bacterial adherence in animal and man, Beachey, E.H., Bacterial Adherence, Chapman and Hall, London 1980, 3-11.
- Socransky, S.S. : Microbiology of periodontal disease—Present status and future considerations. J. Periodontol., 48 : 497-504, 1977.
- Moore L.V.H., Moore, W.E.C., Cato, E.P., Smibert R.M., Burmeister, J.A. and Best, A.M. : Bacteriology of human gingivitis. J. Dent. Res. 66 : 989-995, 1987.
- Listgarten, M.A. : Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. J. Periodontol., 47 : 1-18, 1976.
- Kolenbrander, P.E. : Surface recognition among oral bacteria : Multigeneric coaggregations and their mediators. Crit. Rev. Microbiol., 17 : 137-159, 1989.
- Gibbons, R.J. and van Houte, J. : Bacterial adherence and the formation of dental plaques, Beachey, E.H., Bacterial Adherence, Chapman and Hall, London, 1980, 63-104.
- Loesche, W.J., Syed, S.A., Schmidt, E. and Morrison, E.C. : Bacterial profiles of subgingival plaque in periodontitis. J. Periodontol., 56 : 447-456, 1985.
- Syed, S.A. and Loesche, W.J. : Bacteriology of human experimental gingivitis : Effect of plaque age. Infect. Immun., 21 : 821-829, 1978.
- Slots, J. and Gibbons, R.J. : Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. asaccharolyticus to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and periodontal pockets. Infect. Immun., 19 : 254-264, 1978.
- van Steenberg, T.J.M., van Winkelhoff, A.J. and de Graaff, J. : Black-pigmented oral anaerobic rods : classification and role in periodontal disease, Hamada, S., Holt, S.C., McGhee, J.R., Periodontal Disease : Pathogens & Host Immune Responses, Quintessence, Tokyo, 1991, 41-52.
- Slots, J. and Listgarten, M.A. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 15 : 85-93, 1988.
- Schwarz, S., Ellen, R.P. and Grove, D.A. : *Bacteroides gingivalis* - *Actinomyces viscosus* cohesive interactions as measured by a quantitative binding assay. Infect. Immun., 55, 2391-2397, 1987.
- Ellen, R.P., Schwarz-Faulkner, S. and Grove, D.A. : Coaggregation among periodontal pathogens, emphasizing *Bacteroides gingivalis* - *Actinomyces viscosus* cohesion on a saliva-coated mineral surface. Can. J. Microbiol., 34 : 299-306, 1988.
- Goulbourne, P.A. and Ellen, R.P. : Evidence that *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. J. Bacteriol., 173 : 5266-5274, 1991.
- Ellen, R.P. and Grove, D.A. : *Bacteroides gingivalis* vesicle bind to and aggregate *Actinomyces viscosus*. Infect. Immun., 57 : 1618-1620, 1989.
- Bourgeau, G. and Mayrand, D. : Aggregation of *Actinomyces* strains by extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. Can. J. Microbiol., 36 : 362-365, 1990.
- Ellen, R.P., Song, M. and Buivids, I.A. : Inhibition of *Actinomyces viscosus* - *Porphyromonas gingivalis* coadhesion by trypsin and other proteins. Oral Microbiol. Immunol., 7 : 198-203, 1992.
- Slack, J.M. and Gerencser, M.A. : *Actinomyces*, filamentous bacteria : Biology and pathogenicity. 1st ed, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1975, 119-134.
- 坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二 : 新細菌培地学講座(下), 第2版, 近代出版, 東京, 1988, 21-25.
- Holdeman, L.V., Cato, E.P. and Moore, W.E.C. : Anaerobe Laboratory Manual. 4th ed. Virginia Polytechnique Institute and State University, Blacksburg, 1977.
- 上野一恵, 光岡知足, 渡辺邦友 : 嫌気性菌の分離と同定法. 細菌学技術叢書, Vol. 3, 第1版, 日本細菌学会教育委員会, 菜根出版, 東京, 1982, 45-62.
- Kolenbrander, P.E. and Andersen, R.N. : Characterization of *Streptococcus gordonii* (S. sanguis) PK 488 adhesin-mediated coaggregation with *Actinomyces naeslundii* PK 606. Infect. Immun., 58 : 3064-3072, 1990.
- Lamont, R.J., Bevan, C.A., Gil, S., Persson, R.E. and Rosan, B. : Involvement of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in adherence to *Streptococcus gordonii*. Oral Microbiol. Immunol., 8 : 272-276, 1993.
- Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature, 227 : 680-685, 1970.

- 25) Ebisu, S., Nakae, H., Fukuhara, H. and Okada, H. : The mechanisms of *Eikenella corrodens* aggregation by salivary glycoprotein and the effect of the glycoprotein on oral bacterial aggregation. J. Periodont. Res., 27 : 615-622, 1992.
- 26) Kolenbrander, P.E. : Isolation and characterization of coaggregation - defective mutants of *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, and *Streptococcus sanguis*. Infect. Immun., 37, 1200-1208, 1982.
- 27) 中馬雅彦 : 歯周ポケット由来 *Actinomyces odontolyticus* の生理学的性状および *Porphyromonas gingivalis* との共凝集反応について. 日歯周誌, 36 : 129-148, 1994.
- 28) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28 : 350-354, 1956.
- 29) Morris, E.J., Ganeshkumar, N., Song, M. and McBride, B.C. : Identification and preliminary characterization of a *Streptococcus sanguis* fibrillar glycoprotein. J. Bacteriol., 169 : 164-171, 1987.
- 30) Kolenbrander, P.E. : Coaggregation : Adherence in the human oral microbial ecosystem, Dworkin, M., Microbial Cell-Cell Interactions, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1991, 303-329.
- 31) Kolenbrander, P.E., Ganeshkumar, N., Cassels, J. and Hughes, C.V. : Coaggregation : specific adherence among human oral plaque bacteria. FASEB J., 7 : 406-413, 1993.
- 32) Kolenbrander, P.E. and Andersen, R.N. : Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by lactose and related sugars. Infect. Immun. 57 : 3204-3209, 1989.
- 33) McIntire, F.C. : Specific surface components and microbial coaggregation, Mergenhagen, S.E. and Rosan, B., Molecular basis of oral microbial adhesion, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1985, 153-158.
- 34) Rosenberg, M., Buivids, I.A. and Ellen, R.P. : Adhesion of *Actinomyces viscosus* to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* - coated hexadecane droplets. J. Bacteriol., 173 : 2581-2589, 1991.
- 35) Tanner, A. : Microbial succession in the development of periodontal disease, Hamada, S., Holt, S. C., McGhee, J.R., Periodontal Disease : Pathogens & Host Immune Responses, Quintessence, Tokyo, 1991, 13-25.

連絡先 :

鹿児島大学歯学部歯科保存学 (2)

〒 890 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1