

Actinomyces naeslundii 線毛による 口腔バイオフィーム形成機構の解明

佐藤 武 則

神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座口腔分子細胞制御学分野・助教

Takenori SATO

Division of Oral Molecular and Cellular Biochemistry, Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry,
 Kanagawa Dental University
 82, Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa, 238-8580 Japan

Abstract

The purpose of this study was analyzed the influence of temperature and bacterial nutrition with *A. naeslundii* biofilm formation. *A. naeslundii* T14V was grown in brain heart infusion (BHI) broth supplemented with yeast extract (YE) with various concentrations, divided into the following six groups under anaerobic condition. Group A was cultured with 3.7% BHI and 0.5% YE at 37°C, Group B was cultured with 1.85% BHI and 0.5% YE at 37°C, Group C was cultured with 1.85% BHI and 0.25% YE at 37°C, Group D was cultured with 3.7% BHI and 0.5% YE at 39°C, Group E was cultured with 1.85% BHI and 0.5% YE at 39°C and Group F was cultured with 1.85% BHI and 0.25% YE at 39°C. The bacterial growths were monitored by using a spectrophotometer at 550 nm for 0 to 48 hours. To evaluate bacterial biofilm formation, the biofilm was performed on the 24-well polystyrene plates with the sterilized coverslips. After incubation, the biofilm was removed by sodium hydroxide solution. Biofilm assay was evaluated the absorbance of the inoculation containing removed biofilm. Visual coaggregation assay was scored by mixed with *S. gordonii* bacterial suspension or *P. gingivalis* bacterial suspension against *A. naeslundii* bacterial suspension. To determine the influence of temperature and medium composition, *A. naeslundii* bacterial protein were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The growth of *A. naeslundii* at 37°C and 39°C were no difference, whereas bacterial cells were decreased by the low concentrations of medium composition. Coaggregation activity of *A. naeslundii* was decreased cultured at 39°C as compared with cultured at 37°C. Moreover, the whole cell proteins of cultured at 39°C were also decreased in a dose-dependent manner. These results suggested that the pathogenesis of *A. naeslundii* may deal with the changes of culture conditions and alter the structures of oral biofilm.

緒 言

歯周炎は多種類の口腔内細菌が混在するデンタルプラーク（口腔バイオフィーム）による感染症である。口腔バイオフィームは *Streptococcus* 属や *Actinomyces* 属などのグラム陽性菌が唾液糖タンパク質由来のペリクルを介して歯面や歯肉溝に初期定着し、後

期定着細菌として歯周病原性をもつ *Porphyromonas gingivalis* や *Treponema denticola* などのグラム陰性菌と共凝集することで成熟することが知られている¹⁾。このような特徴をもつ口腔バイオフィームにおいて、グラム陽性菌 *Actinomyces naeslundii* は口腔バイオフィームの中核的存在を担い、歯周病原細菌が定着可能な環境を整備する役割があると言われて

いる²⁾。*A. naeslundii* はこれまで健康な人に多い口腔常在菌であり、う蝕³⁾や歯肉炎⁴⁾の発症に関与するものの、慢性歯周炎患者では *A. naeslundii* の細菌数が減少することから⁵⁾、本菌の歯周病原性に関しては注目されてこなかった。2012年、われわれはラット実験的歯周炎モデルにおいて *A. naeslundii* が *P. gingivalis* と同程度の歯槽骨吸収を惹起することを明らかにし、歯槽骨吸収に関与する重要な菌種であることを報告している⁶⁾。

炎症の進行により歯周組織では、歯周病原細菌数の増加や細菌が産生する酵素活性が亢進し、歯肉の炎症や歯槽骨吸収、歯周ポケット形成などが認められる。炎症時の歯肉縁下ポケットでは歯肉溝滲出液中の細菌数や歯周病原細菌の産生する酵素、サイトカイン量が有意に増加し⁷⁾、ポケット内部の温度も健康歯肉溝と比較して約 2°C 上昇することが報告されている^{7,8)}。また *P. gingivalis* の歯槽骨吸収誘導因子である内毒素の活性中心であるリポド A が 2°C の温度上昇により Toll 様受容体の活性化を促進することも明らかにされ⁹⁾、炎症による温度上昇などの口腔環境の変化がバイオフィルムの構成細菌や病原因子の活性化に影響し、歯周炎進行の制御に関与していると考えられている。そこで本研究はバイオフィルム形成において重要な働きが認められ、歯周炎の進行に関与すると考えられている *A. naeslundii* の培養温度や栄養源となる培地組成の違いによる増殖速度やバイオフィルム形成について評価し、さらに *A. naeslundii* の口腔内定着因子とされている菌体表層の構造物である線毛タンパク質発現への影響について検討した。

実験材料および方法

1. 供試菌株と培養条件

供試菌株には *Actinomyces naeslundii* T14V 株、*Streptococcus gordonii* DL-1 株および *P. gingivalis* ATCC 33277 株を用いた。*A. naeslundii* の培養は通常の培地濃度である 3.7% とその 1/2 濃度の 1.85% のブレインハートインフュージョン (BHI: Becton Dickinson, Sparks, MD) を用いて、イーストエキストラクト (YE: Becton Dickinson, Sparks, MD) を 0.5% と 1/2 濃度の 0.25% で添加した BHI・YE 液体培地を以下に示す培地濃度に調整した。すなわち、実験群は A 群 (3.7% BHI+0.5% YE 培地)、B 群 (1.85% BHI+0.5% YE 培地)、C 群 (1.85% BHI+0.25% YE 培地)、D 群 (3.7% BHI+0.5% YE 培地)、E 群 (1.85% BHI+0.5% YE 培地)、F 群 (1.85% BHI+0.25% YE 培地) を用い、A 群、B 群、C 群は 37°C で、D 群、E 群、F 群は 39°C で嫌気培養した。また G 群 (3.7%

BHI+0.5% YE 培地) を細菌無添加コントロールとして用いた。一方、*S. gordonii* の培養は通常濃度の BHI・YE 液体培地を用い、*P. gingivalis* の培養は 1.0% ヘミン、1.0% ビタミン K₁ を添加した通常濃度の BHI・YE 液体培地を用いて 37°C 嫌気条件下 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) で培養した細菌を実験に供試した。

2. *A. naeslundii* の増殖活性

濃度調整した各 BHI・Y 液体培地 5 ml に一昼夜培養の *A. naeslundii* 菌液 100 μl を添加後、嫌気培養を行ない、37°C と 39°C の培養温度で培養した。培養開始から 48 時間まで経時的に菌液を採取して濁度測定を行ない、異なる温度と栄養価による細菌の発育変化を評価した。

3. バイオフィルム形成能

24 穴プラスチックプレート内にカバーガラス (直径 12 mm, 厚さ 0.15 mm, 松浪硝子, 東京) を静置して濃度調整した各 BHI・Y 液体培地 1.0 ml に *A. naeslundii* 菌液 100 μl を添加後、48 時間嫌気培養してバイオフィルム形成を行なった。その後浮遊細菌を除去し、カバーガラスに付着したバイオフィルムを 1N 水酸化ナトリウム水溶液 500 μl で 30 秒間処理後、剥離バイオフィルムを含む菌液の濁度を測定した。

4. 線毛タンパク質の発現性

48 時間嫌気培養した *A. naeslundii* 菌液 200 ml を 4°C, 8000 rpm で 15 分間遠心集菌後、30% ポリアクリルアミド (SDS-PAGE) サンプルバッファーに懸濁し、100°C, 10 分間加熱処理した。その後 SDS-PAGE ゲル電気泳動を行ない、クマシーブリリアントブルー染色を行なった。

5. 共凝集活性

A. naeslundii と *S. gordonii*, *A. naeslundii* と *P. gingivalis* の共凝集活性の評価は Cisar らの方法¹⁰⁾ に準じた visual coaggregation assay により行った。すなわち通常濃度に調整した BHI・YE 液体培地で 18 時間培養した供試菌液を 12000 rpm, 1 分間遠心分離させた後、共凝集緩衝液 (0.15 M 塩化ナトリウム, 0.1 mM 塩化カルシウム二水和物, 塩化マグネシウム六水和物を含み, pH7.5 に調整した 10 mM トリス塩酸緩衝液) で 2 回洗浄し、菌液の濁度が OD₅₅₀=1.0 になるように調整後 24 穴プレート中で各菌液 200 μl を混和後静置し、30 分後にプレート内に形成された凝集塊を目視により評価した。共凝集活性の判定は以下のスコア 0~3 の 4 段階で行なった (0: 凝集が認められない, 1: 透明な混合液中に小さい凝集塊を認める, 2: 透明な混合液中に中程度の大きさの凝集塊を認める, 3: 透明な混合液中に大きな凝集塊を認める)。

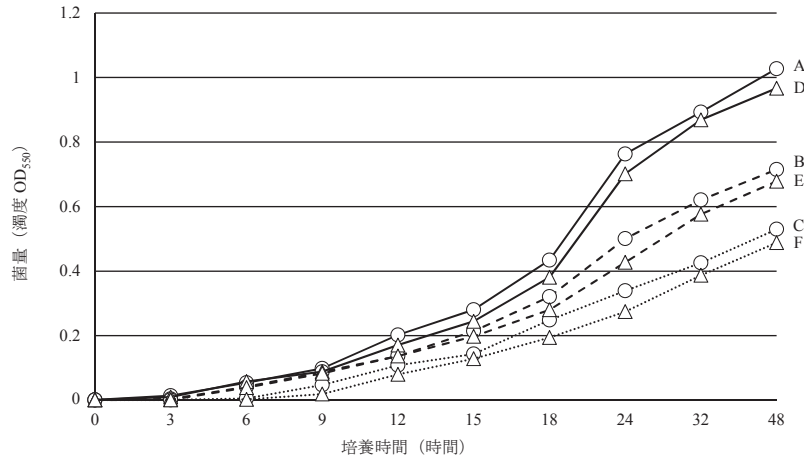


図1 *A. naeslundii* の増殖活性。A群 (3.7% BHI+0.5% YE 培地), B群 (1.85% BHI+0.5% YE 培地), C群 (1.85% BHI+0.25% YE 培地), D群 (3.7% BHI+0.5% YE 培地), E群 (1.85% BHI+0.5% YE 培地), F群 (1.85% BHI+0.25% YE 培地) を用い, A群, B群, C群は 37°C, D群, E群, F群は 39°C で嫌気培養した。各群の実験値は波長 550 nm での培地の濁度を示す。

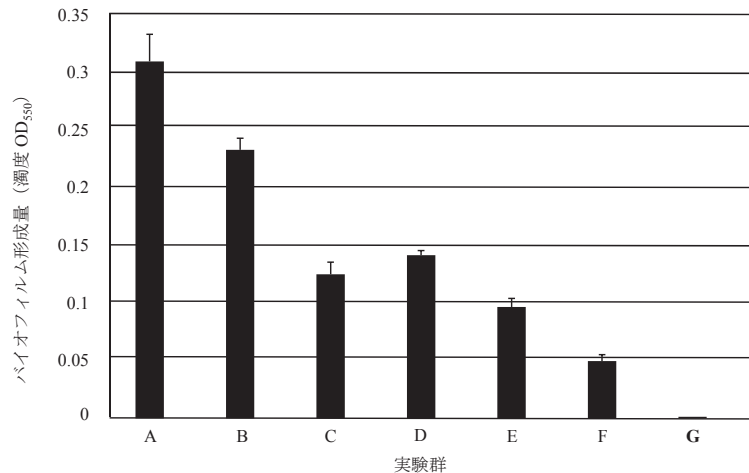


図2 *A. naeslundii* バイオフィーム形成量。A群 (3.7% BHI+0.5% YE 培地), B群 (1.85% BHI+0.5% YE 培地), C群 (1.85% BHI+0.25% YE 培地), D群 (3.7% BHI+0.5% YE 培地), E群 (1.85% BHI+0.5% YE 培地), F群 (1.85% BHI+0.25% YE 培地), G群 (3.7% BHI+0.5% YE 培地) を用い, A群, B群, C群, G群は 37°C, D群, E群, F群は 39°C で嫌気培養した。実験値は波長 550 nm での剥離バイオフィームを含む菌液濃度を平均値±標準偏差で示す。

6. 統計処理

A. naeslundii が形成したバイオフィーム形成細菌数の平均値と標準偏差を算出後, 一元配置分散分析と Tukey 検定による多重比較解析を有意水準 5% で行った。

結 果

1. 温度変化による *A. naeslundii* の増殖への影響

図1に各濃度に調整した *A. naeslundii* 菌液の経時的な濁度測定結果を示す。37°C と 39°C で比較した結果, *A. naeslundii* 菌体の発育に大きな変化は認めら

れなかったが, 栄養源となる培地濃度の低下により *A. naeslundii* の増殖が抑制された。特に, 全栄養源を通常濃度の半分に調整した 39°C, 嫌気培養した F 群は, 他の実験群と比較して細菌の増殖抑制が強く認められた。

2. *A. naeslundii* バイオフィーム形成

図2に48時間培養後のバイオフィーム形成細菌数を評価した結果を示す。37°C に比べて 39°C で培養した時ではバイオフィーム形成細菌数が半減し, 培地濃度に依存的なバイオフィームの形成が認められた。

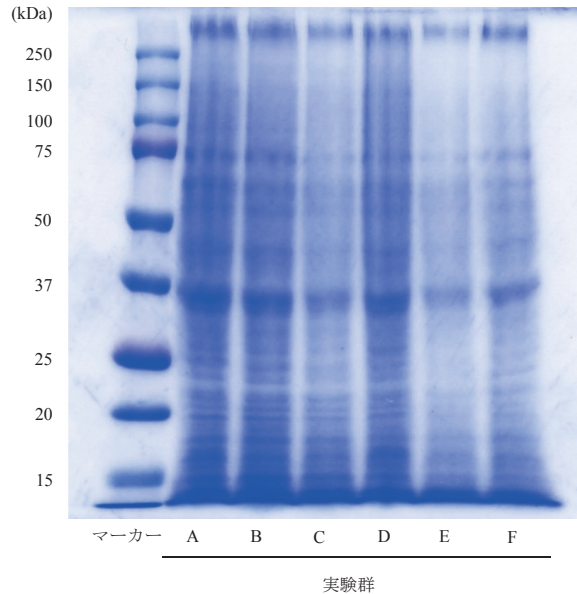


図3 SDS-PAGEによる *A. naeslundii* 菌体タンパク質の発現解析。A群(3.7% BHI+0.5% YE 培地), B群(1.85% BHI+0.5% YE 培地), C群(1.85% BHI+0.25% YE 培地), D群(3.7% BHI+0.5% YE 培地), E群(1.85% BHI+0.5% YE 培地), F群(1.85% BHI+0.25% YE 培地)を用い, A群, B群, C群は37°C, D群, E群, F群は39°Cで嫌気培養した。

表1 *A. naeslundii* と *S. gordonii* および *P. gingivalis* との共凝集活性

供試菌	<i>P. gingivalis</i>	<i>S. gordonii</i>	
<i>A. naeslundii</i>	37 °C	3	3
	39 °C	2	2

スコア0:凝集が認められない, スコア1:透明な混合液中に小さい凝集塊を認める, スコア2:透明な混合液中に中程度の大きさの凝集塊を認める, スコア3:透明な混合液中に大きな凝集塊を認める

3. *A. naeslundii* 菌体タンパク質の発現

図3に48時間培養後の菌体内タンパク質のSDS-PAGEによる解析結果を示す。菌体タンパク質の発現量は37°Cに比べて39°C培養時に減少し, 培地濃度に依存してタンパク質の減少が認められた。

4. 温度変化による *A. naeslundii* の共凝集活性

表1に通常濃度に調整した培地で37°Cと39°Cでそれぞれ培養した *A. naeslundii* と37°Cで培養した *S. gordonii* と *P. gingivalis* の共凝集活性の結果を示す。*A. naeslundii* を39°Cで培養した場合では37°Cで培養した時に比べて *S. gordonii* や *P. gingivalis* との共凝集活性が低下した。

まとめと今後の展望

バイオフィームは, 細菌が外部刺激を防御して生存

するために固体表面に形成される膜状菌塊構造物である。その内部は細菌だけでなく, 菌体が産生する菌体外多糖体により外部を覆われ, 表面には通水チャンネルが数多く存在し細菌が増殖と定着を持続可能な環境が構築されている¹¹⁾。これらの機能によりバイオフィームを構成する細菌は温度, 栄養素, 酸素分圧, 水素イオン濃度(pH), 酸化還元電位が影響して遷移し, 口腔バイオフィーム表層では好気性菌が, 深層では嫌気性菌が優勢である。

細菌の病原因子である線毛は付着・定着機能を示す菌体表層の構造物である。口腔バイオフィーム形成の中核を担う *A. naeslundii* にはI型とII型の2種類の線毛を保有し, I型線毛は歯面や唾液ペリクルおよび歯肉上皮細胞への付着性に関与し, II型線毛は他の口腔細菌との共凝集を行なうことが明らかにされてい

る¹²⁾。本研究では *A. naeslundii* の培養温度や栄養価を変化させて細菌の増殖活性やバイオフィーム形成、共凝集能、菌体タンパク質の発現を比較検討した。その結果、*A. naeslundii* の増殖速度には温度よりも培地濃度が影響し、全栄養源を通常濃度の半分に調整し 39°C 嫌気培養した F 群において最も細菌の発育抑制が認められた (図 1, 図 2)。また、バイオフィーム形成と SDS-PAGE を用いた *A. naeslundii* 菌体タンパク質の解析でも、F 群において顕著なバイオフィーム形成の抑制が認められた (図 3)。さらに SDS-PAGE 解析においても通常の培養条件である A 群と比較して菌体タンパク質の減少が認められ、I 型線毛タンパク質 (54 kDa) と II 型線毛タンパク質 (59 kDa) の減少も認められた。バイオフィーム形成に関わる他菌種との共凝集について通常濃度の培地で比較した結果では、2°C の温度上昇による共凝集の減少が認められた (表 1)。温度上昇と低栄養状態の条件下で、*A. naeslundii* 線毛が抑制されることはコードしている線毛遺伝子に何らかの影響が生じている可能性があるため詳細に検討する必要があると考えられた。炎症がもたらす発熱が線毛構造物の発現を抑制することで、他の病原因子の変化をもたらしている可能性も示唆される。以上のことから、*A. naeslundii* 線毛は温度や栄養源の外部環境変化に応じて変化し、バイオフィーム形成に影響を及ぼす可能性が示唆された。

線毛は歯槽骨吸収をおこす破骨細胞の分化誘導因子で、炎症を誘導するサイトカイン産生を促進することが知られている。本研究で温度上昇と低栄養素の 2 つの要因が重なることで減少を認めた *A. naeslundii* 線毛タンパク質が破骨細胞分化誘導能や炎症性サイトカイン産生への影響についても検討を進め、歯周病発症に関わる探索パラメーターとしての確立に貢献できるものと考えている。

結 論

口腔グラム陽性桿菌 *A. naeslundii* は、培養温度や栄養素の濃度の変化により線毛タンパク質の生物活性を変化させ、バイオフィーム形成に影響をおよぼすことから歯周炎発症に重要な細菌であると示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、平成 26～27 年度科学研究費補助金若手研究 (B) 26870665、平成 29～30 年度科学研究費補助金若手研究 (B) 17K18193、ならびに神奈川県歯科大学学会平成 29 年度宿題報告の補助により行われた。

文 献

1. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, *et al.* Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* **8**: 471-480, 2010.
2. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, *et al.* Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* **11**: 94-100, 2003.
3. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* **2000** **28**: 12-55, 2002.
4. Brailsford SR, Lynch E, Beighton D. The isolation of *Actinomyces naeslundii* from sound root surfaces and root carious lesions. *Caries Res* **32**: 100-106, 1998.
5. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, *et al.* Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* **25**: 85-98, 1998.
6. Sato T, Watanabe K, Kumada H, *et al.* Peptidoglycan of *Actinomyces naeslundii* induces inflammatory cytokine production and stimulates osteoclastogenesis in alveolar bone resorption. *Arch Oral Biol* **57**: 1522-1528, 2012.
7. Wolff LF, Koller NJ, Smith QT, *et al.* Subgingival temperature: relation to gingival crevicular fluid enzymes, cytokines, and subgingival plaque microorganisms. *J Clin Periodontol* **24**: 900-906, 1997.
8. Baab DA, Oberg A, Lundström A. Gingival blood flow and temperature changes in young humans with a history of periodontitis. *Arch Oral Biol* **35**: 95-101, 1990.
9. Curtis MA, Percival RS, Devine D, *et al.* Temperature-dependent modulation of *Porphyromonas gingivalis* lipid A structure and interaction with the innate host defenses. *Infect Immun* **79**: 1187-1193, 2011.
10. Cisar JO, Kolenbrander PE, McIntire FC. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun* **24**: 742-752, 1979.
11. McDougald D, Rice SA, Barraud N, *et al.* Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* **10**: 39-50, 2011.
12. Yeung MK. Molecular and genetic analyses of *Actinomyces* spp. *Crit Rev Oral Biol Med* **10**: 120-138, 1999.