

研究者：宮井由記子（所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児歯科学分野）

**研究題目：原因不明の乳歯の早期脱落を引き起こした患児から得られた
Actinomyces naeslundii のバイオフィルム形成能とその構造**

目的：

一般的に乳歯の早期脱落は、全身疾患関連歯周炎および染色体異常や遺伝性疾患に随伴する歯周炎の場合が多い。しかしながら、全身的に健康であるが急速な歯周組織の破壊を伴い、歯根吸収がみられない乳歯の早期脱落を起こした症例に遭遇した。我々は、これまで患児の歯肉溝浸出液から得られた細菌を解析したところ、*Actinomyces naeslundii* の検出率が有意に高かったことから、これまで歯周病の発症に関連がないと考えられていた菌が小児の歯周病の発症に関与している可能性が示唆された。本研究では *A. naeslundii* のバイオフィルム形成能とその構造について比較検討することで、病原性との関連を評価した。

対象および方法：

1. 供試菌株

本研究は岡山大学倫理審査委員会の承認（研 1810-028）を得て行った。患児は5歳2か月時に乳歯の早期脱落を主訴に岡山大学病院小児歯科を受診した。問診および血液検査により、歯周疾患に関連する全身疾患、染色体異常や遺伝性疾患がないことを確認した。患児のパノラマエックス線画像検査および歯周組織検査をもとに、局所的な垂直性骨吸収あるいはアタッチメントロスがある部位から歯肉溝浸出液を採取し、滅菌生理食塩水で懸濁した後に、CDC 血液寒天培地に播種し、37℃、5%CO₂ 条件下で嫌気培養した。培養後、独立したコロニーを顕微鏡下で鈎菌し、染色体 DNA を抽出し、塩基配列解析により同定した *A. naeslundii* AY1 株を使用した。また、標準株として *A. naeslundii* JCM8350 株を使用した。

2. 供試菌の最小発育阻止濃度

抗菌薬を添加したドライプレート（栄研化学）を用いた微量液体希釈法にて供試菌の最小発育阻止濃度を調べた。48 時間後に細菌の発育を目視で確認し、菌の増殖がみられなかった濃度を最小発育阻止濃度とした。

3. *A. naeslundii* の増殖速度の測定

Tryptic soy (TS) 液体培地 6 mL にあらかじめ培養した供試菌液を 60μL 播種した後、37℃ で嫌気培養した。菌液を Handy Sonic model UR-21P で 20 秒間、レベル 7 で超音波処理した後、波長 550 nm で経時的に濁度を測定した。

4. バイオフィルム形成能の測定

(1) バイオフィルム形成量測定

TS 液体培地に 1/100 量になるように供試菌を播種し、96 穴平底マイクロタイタープレートに 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 24 および 48 時間、嫌気培養した。底面に形成されたバイオフィルムを 1% クリスタルバイオレット溶液で染色し、洗浄後、エタノールにより溶解し固定し、波長 570 nm における吸光度を測定した。

(2) バイオフィルム構造の観察

供試菌を TS 液体培地で嫌気培養後、遠心分離により菌体を回収した。ヨウ化ヘキシジウムで菌体を染色し、TS 液体培地にて、波長 600nm における濁度が 0.1 となるように調整した。この菌液をポリスチレン製 8 穴チャンバースライドシステムに 200 μ L ずつ播種し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間嫌気培養した。形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察した。バイオフィルムの画像を ImageJ[®] (Version 1.54) により数値化し、評価した。

結果：

1. 最小発育阻止濃度

表 1 薬物感受性検査の結果

抗菌薬		<i>A. naeslundii</i> JCM8350 株 (μ g/mL)	<i>A. naeslundii</i> AY1 株 (μ g/mL)
ペニシリン系	ベンジルペニシリンカリウム	0.12	0.25
	アンピシリンナトリウム	–	0.5
セフェム系	セフトジシム	2	8
	塩酸セフェピム	–	4
カルバペネム系	イミペネム	>8	–
リンコマイシン系	クリンダマイシン	–	0.25
キノロン系	モキシフロキサシン	0.25	1

–：陰性

A. naeslundii AY1 株では *A. naeslundii* JCM8350 株と比較して耐性を示す抗菌薬が多く、最小発育阻止濃度も高い傾向にあった (表 1)。

2. 供試菌の増殖速度

A. naeslundii AY1 株は増殖速度が *A. naeslundii* JCM8350 株と比較して有意に遅延し、そのため、*A. naeslundii* AY1 株は、*A. naeslundii* JCM8350 株と比較して対数増殖期に達するまでの時間が延長していた (図 1)。

3. バイオフィルム形成量

バイオフィルム形成量は 24 時間後、48 時間後ともに *A. naeslundii* AY1 株は *A. naeslundii* JCM8350 株と比較して有意に低かった (図 2)。

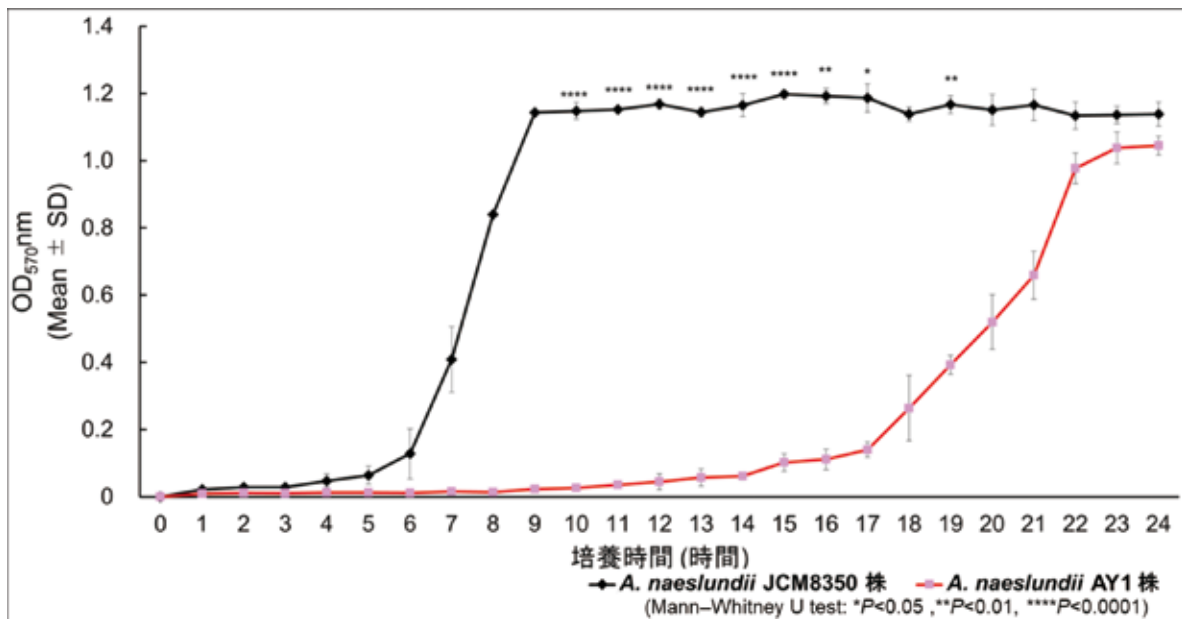


図1 *A. naeslundii* の増殖局線

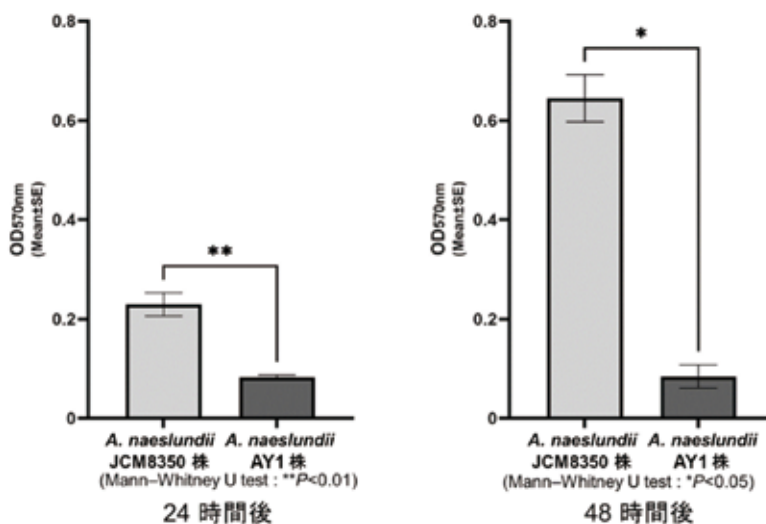


図2 バイオフィーム形成量

4. バイオフィームの構造

共焦点走査型レーザー顕微鏡で得られたバイオフィームの像において、バイオフィームを形成している株はいずれも棒状の桿菌特有の像を示した(図3)。*A. naeslundii* AY1株によって形成されたバイオフィームは患児では不均一な広がり、凝集塊が認められた。一方、*A. naeslundii* JCM8350株によって形成されたバイオフィームは均一であった。

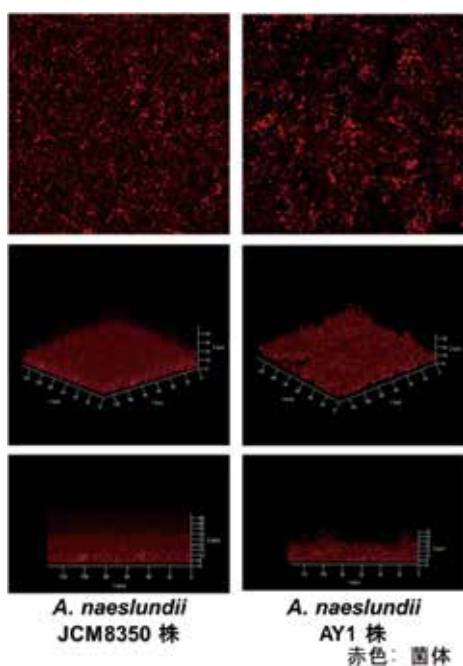


図3 バイオフィルムの構造

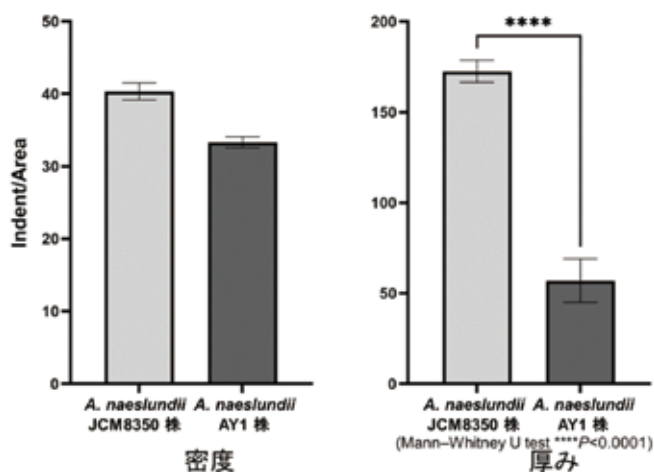


図4 バイオフィルムの密度および厚み

さらにバイオフィルムの密度は *A. naeslundii* JCM8350 株と *A. naeslundii* AY1 株を比較して有意な差は認められなかったものの、厚みは *A. naeslundii* JCM8350 株では *A. naeslundii* AY1 株と比較して有意に高かった (図4)。

さらに図3のバイオフィルムの側面の構造を評価するために、Image[®]により、グレースケール画像に変換し、グレイの濃淡によりトレースした (図5)。その結果、*A. naeslundii* JCM8350 株では3層からバイオフィルムが構成されていたが、*A. naeslundii* AY1 株のバイオフィルムでは2層しか認められなかった (図5)。

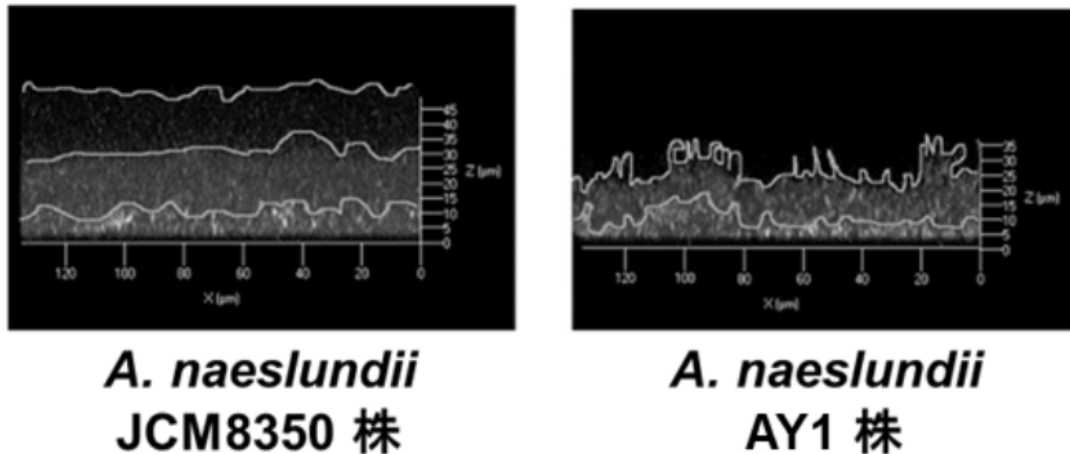


図5 バイオフィルムの側面構造

考 察：

急激な骨吸収がみられた患児から分離した *A. naeslundii* AY1 株では標準株 *A. naeslundii* JCM8350 株と比較して、抗菌薬の感受性が変化し、増殖速度が遅延し、バイオフィルム形成量も有意に低かった。一方で、*A. naeslundii* AY1 株によって形成されたバイオフィルムの構造は凝集塊がみられ、*A. naeslundii* JCM8350 株にみられるような緩やかな3層構造ではなく、不均一で鋸歯状の構造を呈していた。このことから *A. naeslundii* AY1 株は緩やかに増殖しながら、病原性の高いバイオフィルムを形成していることが示唆された。しかしながら、これらの *A. naeslundii* JCM8350 株との違いが病原性にどのように関連しているかは明らかとなっていない。今後は *A. naeslundii* AY1 株のタンパクの発現状況などを調べることによって検討していきたいと考えている。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・宮井由記子、仲 周平、仲野道代. 侵襲性歯周炎を疑う小児から得た *Actinomyces naeslundii* のバイオフィルム形成能の検討. 第42回 日本小児歯科学会 中四国地方会、鳥取、2023年11月.
- ・Miyai Y, Naka S, Matsumoto-Nakano M. Biofilm forming ability of *Actinomyces naeslundii* strains obtained from children with aggressive periodontitis. Korean Academy of Pediatric Dentistry Annual Congress, Seoul, Korea, April 2024.