

<原著>Neisseria sicca, N. mucosaおよびN. subflavaと口腔細菌とのcoaggregationについて

著者名(日)	鎌口 有秀, 中村 麗子, 渡部 俊弘, 大山 徹, 馬場 久衛
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	21
号	2
ページ	227-235
発行年	2002-12-31
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008754/

〔原 著〕

Neisseria sicca, *N. mucosa*および*N. subflava*と
口腔細菌とのcoaggregationについて

鎌口 有秀*, 中村 麗子*,
渡部 俊弘**, 大山 徹**, 馬場 久衛*

*北海道医療大学歯学部口腔細菌学教室
**東京農業大学生物産業学部食品科学科生物化学研究室

*(主任：馬場 久衛教授)
**(主任：大山 徹教授)

Coaggregation of *Neisseria sicca*, *N. mucosa*,
N. subflava, and oral bacteria

Arihide KAMAGUCHI*, Reiko NAKAMURA*,
Toshihiro WATANABE**, Tohru OHYAMA** and Hisae BABA*

*Department of Oral Microbiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido
**Department of Food Science and Technology,
Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture

*(Chief : Prof. Hisae BABA)
**(Chief : Prof. Tohru OHYAMA)

Abstract

Neisseria sicca, *N. mucosa* and *N. subflava* were coaggregated with *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii*, or *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*. These coaggregations were not inhibited by amino acids, sugars, or EDTA, and suggesting that heat stable cell surface factors from the heat treatment of each kind of cell are involved in the coaggregation. Culture supernatant of *N. sicca*, *N. mucosa*, and *N. subflava* aggregated with *S. sanguis*, *A. viscosus* and *A. naeslundii*. These culture supernatants promoted coaggregation among the microorganisms which do not occur each other in the native cells. These results suggest that *N. sicca*, *N. mucosa* and *N. subflava*, early colonizers, are associated with dental plaque formation, followed by participation of secondary colonizers and the initial steps of cariogenic bacteria adherence.

Key words : Coaggregation, *Neisseria sicca*, *N. mucosa*, *N. subflava*, vesicle.

受付：平成14年9月25日

緒 言

口腔内には37属からなる350菌種またはそれ以上の菌が存在するとされており,それぞれが,歯面,歯肉溝,口腔粘膜,舌,唾液等に生育している^{1,2)}.歯面に口腔細菌が初期付着するには歯面に形成されたペリクルの成分に結合するか,または既に付着している細菌に結合することが考えられる.前者の結合の例としては *Streptococcus sanguis*, *S. oralis*, *S. gordonii* および *S. mutans* 等が知られている³⁾.中でも *S. mutans* は微線毛によるペリクルへの初期付着を行う.この微線毛を構成している成分はPACであり⁴⁾,PACが結合するペリクル成分は α -アミラーゼ,リゾチーム,プロリンを含む塩基性タンパク質,40kDaの凝集素等と報告されている^{5,6)}.微線毛による初期付着は弱い結合であり,この後,不溶性グルカンによる強固な結合が生じ,う蝕の原因となる.後者の結合の例は *in vitro* では coaggregation として肉眼でも観察され各口腔細菌間における coaggregation については多くの細菌において報告されている.これらの coaggregation に関与する口腔細菌の adhesin とレセプターについて明らかにされているものもある⁷⁾.歯面に付着する口腔細菌の中で *N. sicca*, *N. mucosa*, *N. subflava* は初期に歯面に結合する細菌の一員であり⁸⁾,口腔内ではこの *N. sicca*, *N. mucosa* および *N. subflava* に結合することにより初期付着をする細菌もあるものと想定される.既に,Willcoxらにより⁹⁾ *Neisseria pharyngis* と口腔細菌との結合について報告されているが,*N. pharyngis* は Bergy's Manual of Systematic Bacteriology にも掲載されておらず,また,どのような様式で結合するかについても明確ではない.本研究は,口腔内に生存する *N. sicca*, *N. mucosa*, *N. subflava* と口腔細菌との coaggregation について検討し,これらの菌間の coaggregation による初期

プラーク形成への関与の可能性について検討を加えた.

材料および方法

1. 供試菌株と培養

N. sicca ATCC29256はTryptic soy brothに isobitalex を添加し好気培養した. *N. mucosa* ATCC19696, *N. subflava* IID856およびIID857はBrain Heart Infusion (BHI) brothで好気培養した. *S. mutans* 67-1, OMZ70, *S. sobrinus* 6715, *S. sanguis* ATCC10556, *S. oralis* ATCC10557, *S. gordonii* ATCC10558, *Actinomyces viscosus* ATCC19246, *Actinomyces naeslundii* ATCC12104, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* 6328および8532はBHIbrothを用いて嫌気培養した.各菌株を培養後,それぞれ菌体を回収し,coaggregation buffer (1 mM) (Tris-HCl (pH7.5), 0.1mM CaCl₂, 0.1mM MgCl₂, 0.15M NaCl および 0.02% NaN₃)¹⁰⁾にて3回洗浄し,OD660nmを約1.6に調整した.

2. Coaggregationの測定

Coaggregationの測定方法はCisarらの方法¹⁰⁾に準じた.すなわち,2種の細菌の菌液を13×100mmの試験管にそれぞれ200 μ lずつ添加しさらにcoaggregation bufferを100 μ l添加し,室温で1時間振とう後,凝集の程度を肉眼で観察し,-から4+の5段階で判定した.また,アミノ酸,糖およびEDTA存在下におけるcoaggregationを測定しそれぞれの影響を観察した.さらに,各菌体を85°C,10分間加熱したときのcoaggregationを測定し,菌体加熱による影響を観察した.

3. *N. sicca*, *N. mucosa* および *N. subflava* の培養上清の調整と凝集活性の測定

N. sicca ATCC29256, *N. mucosa* ATCC19696, *N. subflava* IID856およびIID857を培養後,10,000xg,30分間遠心し,各培養上清を得た.各培養上清の凝集活性は30×100mmの試験管

に各菌液200 μ l, 上清200 μ lおよびcoaggregation buffer100 μ lを加え室温で1時間反応後, 肉眼で-から4+で判定した。

4. *N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*培養上清処理菌体と口腔細菌とのcoaggregationの測定

N. sicca, *N. mucosa*および*N. subflava*の各培養上清を菌液に加え室温で1時間反応後, 3回coaggregation bufferにて洗浄した。ついで, coaggregation bufferにて菌液を作製した。この菌液1 mlにpartner cellの菌液1 mlを加え, 室温で1時間反応後, KinderとHoltの方法¹¹⁾に従い, 84xgにて1分間遠心し, 上清の菌数を細菌計算盤にて測定した。Coaggregationは凝集し, 沈殿した菌数を下記の計算式にて百分率で表わした。

$$\text{Coaggregation (\%)} = (1 - (\text{上清処理菌との反応上清の菌数} / \text{coaggregation buffer添加菌液との反応上清の菌数})) \times 100$$

5. Cell surface hydrophobicityの測定

Rosenbergらの方法¹²⁾に準じて行った。すなわち, 各菌株を培養後, それぞれの菌体を回収し, PBSにて3回洗浄した。得られた菌体は, PBSに懸濁し菌液とした(OD600nm: 約1.8)。この菌液2 mlに100 μ lのn-hexadecane (nHD)を添加し, 1分間vortexした。これを室温に15分間放置後, 水層のOD600nmを測定した(これをSとする)。また, 菌液にnHDの代わりにPBS 100 μ l加え同様に処理後の水層のOD600nmを

測定し(これをCとした), 下記の式よりhydrophobicityを百分率で算出した。

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = ((C - S) / C) \times 100$$

結 果

1. *N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*と他の口腔細菌とのcoaggregation

N. sicca, *N. mucosa*および*N. subflava*と供試した他の口腔細菌とのcoaggregationはTable 1に示すように, Neisseriaの菌種と菌株において若干の違いがみられた。すなわち, *N. sicca* ATCC29256は*S. sanguis* ATCC10556および*A. naeslundii* ATCC12014に対し4+, *S. mutans*67-1および*S. gordonii* ATCC10558に対し2+のcoaggregationを示し, *N. mucosa* ATCC19696は*S. sanguis* ATCC10556に対し4+, *A. naeslundii* ATCC12104に対し3+, *S. mutans* 67-1およびOMZ70に対し2+のcoaggregationを示した。また, *N. subflava* IID857は*A. naeslundii* ATCC12104に対し4+, *S. sanguis* ATCC10556に対し2+のcoaggregationを示した。これらの結果より, う蝕の主原因細菌とされている*S. mutans*および*S. sobrinus*も*N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*とcoaggregationすることがわかった。つまり, *S. mutans*および*S. sobrinus*はペリクルに直接付着することに加え, 初期プラーク形成細菌である*N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*に結合することによっても初期付着を達成できるものと考えられ

Table 1. Coaggregation of *N. sicca*, *N. mucosa*, and *N. subflava* and oral bacteria

Organism	Coaggregation			
	<i>N. sicca</i> ATCC 29256	<i>N. mucosa</i> ATCC 19696	<i>N. subflava</i> IID 856	<i>N. subflava</i> IID 857
<i>S. mutans</i> 67-1	2+ ^{a)}	2+	-	-
<i>S. mutans</i> OMZ 70	+	2+	-	-
<i>S. sobrinus</i> 6715	+	-	-	-
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	4+	4+	+	2+
<i>S. orals</i> ATCC 10557	-	+	-	-
<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	2+	-	-	-
<i>A. viscosus</i> ATCC 19246	+	+	+	+
<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	4+	3+	+	4+
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> 6328	+	+	+	+
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> 8532	+	+	+	+

a) Coaggregation was measured as described in materials and Methods.

Table 2. Effect of various compounds on coaggregation of *N. sicca*, *N. mucosa*, and *N. subflava*

Tested compound	Coaggregation								
	<i>N. sicca</i> ATCC29256			<i>N. mucosa</i> ATCC19696			<i>N. subflava</i> IID857		
	<i>S. mutans</i> 67-1	<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	<i>S. mutans</i> 67-1	<i>S. sanguis</i> ATCC10556	<i>A. naeslundii</i> ATCC12104	<i>S. sanguis</i> ATCC10556	<i>A. naeslundii</i> ATCC12104	
None	2+ ^{a)}	4+	4+	2+	4+	3+	2+	4+	
Amino acid ^{b)}	100mM ^{b)}	2+	4+	4+	2+	4+	3+	2+	4+
Sugars ^{c)}	100mM	2+	4+	4+	2+	4+	3+	2+	4+
EDTA	0.6 mM	2+	4+	4+	2+	4+	3+	2+	4+

a) Coaggregation was measured as described in Materials and Methods.

b) Final concentration of tested compound.

c) L- α -alanine, L-asparagine, L-cysteine, L-histidine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-arginine, L-lysine.

d) D-galactose, D-glucose, D-mannitol, L-rhamnose, D-sorbitol, D-mannose, lactose, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine.

た。また、+の弱いcoaggregationは多くの組合せで観察された。このことより *N. sicca*, *N. mucosa* および *N. subflava* を介して多くの口腔細菌が歯面に間接的に結合する可能性が示唆された。

2. 種々の物質添加および菌体加熱による coaggregation の阻害効果

coaggregation がどのような結合様式により生じているか検討するため、2+以上のcoaggregationがみられた組合せに対しアミノ酸、糖およびEDTAを添加しcoaggregationを検討した。その結果、Table 2に示したように、いずれの物質の添加においても阻害はみられなかった。これらのことより *N. sicca*, *N. mucosa* および *N. subflava* と他の口腔細菌とのcoaggregationは一般的な口腔細菌間でのcoaggregationにみられる結合様式とは異なることが推察され

た。一方、各菌体を加熱し、coaggregationに対する影響を観察した。その結果Table 3に示したように、*N. sicca*の易熱性因子が *S. mutans* 67-1との結合に、また、*S. sanguis* ATCC10556の易熱性因子が *N. sicca*との結合に関与する傾向がみられたが、その他の組合せにおいてはいずれも耐熱性の因子が関与するものと思われた。

3. Cell surface hydrophobicity と coaggregation について

N. sicca, *N. mucosa* および *N. subflava* と口腔細菌のcoaggregationがアミノ酸、糖およびEDTA等により阻害されないことより、これらの結合は疎水結合による結合様式の可能性が考えられた。そこで、それぞれのcell surface hydrophobicity と coaggregation の関係を検討した (Table 4)。 *N. sicca* ATCC29256と *N.*

Table 3. Effect of heat treatment of bacterial cells on coaggregation of *N. sicca*, *N. mucosa*, *N. subflava* and oral bacteria

	Coaggregation		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>A. naeslundii</i>
	67-1	ATCC 10556	ATCC 12104
native <i>N. sicca</i> ATCC 29256	2+ ^{a)}	4+	4+
heated <i>N. sicca</i> ATCC 29256 ^{b)}		4+	3+
native <i>N. mucosa</i> ATCC 19696	2+	4+	3+
heated <i>N. mucosa</i> ATCC 19696	2+	4+	3+
native <i>N. subflava</i> IID 857	N. D. ^{c)}	3+	4+
heated <i>N. subflava</i> IID 857	N. D.	3+	4+

a) Cell was heated at 85 °C for 10min.

b) Coaggregation was measured as described in Materials and Methods.

c) not detected.

Table 4. Coaggregation of *N. sicca*, *N. mucosa*, *N. subflava* and oral bacteria and surface hydrophobicity to cells of various bacterial species and strains

	Coaggregation					
	<i>S. mutans</i> 67-1 6715 (82.0%) ^{a)}	<i>S. sobrinus</i> ATCC 10556 (27.0%)	<i>S. sanguis</i> ATCC 10557 (74.8%)	<i>S. oralis</i> ATCC19246 (92.8%)	<i>A. viscosus</i> ATCC 12104 (47.9%)	<i>A. naeslundii</i> (45.8%)
<i>N. sicca</i> ATCC 29256 (60.7%)	2+ ^{b)}	+	4+	+	+	4+
<i>N. mucosa</i> ATCC 19696 (10.4%)	2+	-	4+	+	+	3+
<i>N. subflava</i> IID 856 (15.8%)	+	-	+	-	+	+
<i>N. subflava</i> IID 857 (12.4%)	-	-	2+	-	+	4+

a) cell surface hydrophobicity.
b) Coaggregation was measured as described in Materials and Methods.

mucosa ATCC19696と *S. mutans* 67-1との coaggregationにおいて、*N. sicca* ATCC29256は *N. mucosa* より約 6 倍 hydrophobicity が強いが coaggregation に違いはみられない。また、*N. sicca* ATCC29246と *S. sanguis* ATCC10556および *S. oralis* ATCC10557との関係を見ると *S. oralis* ATCC10557の hydrophobicity の方が強いが、coaggregation は *S. sanguis* の方が弱かった。さらに、*A. viscosus* と *A. naeslundii* の hydrophobicity は殆ど同値であるが、*A. naeslundii* の方が遙かに coaggregation は強いという結果が得られた。このことより、これらの結合は単に菌体表層の疎水性の強弱によるものではなく、他のレセプターとリガンド結合があるものと推測された。

4. *N. sicca*, *N. mucosa* および *N. subflava* の

培養上清の口腔細菌の凝集活性

N. sicca, *N. mucosa* および *N. subflava* の培養上清の種々の口腔細菌の凝集活性を検討した。その結果、Table 5 に示したように *N. sicca* ATCC 29256, *N. mucosa* ATCC19696 および *N. subflava* IID857 の培養上清は *S. sanguis* ATCC10556, *A. viscosus* ATCC19246 および *A. naeslundii* ATCC12104 を凝集した。この菌体外の凝集因子がプラーク中にて産生された場合 *S. sanguis*, *A. viscosus* および *A. naeslundii* のプラークへの参入に何らかの作用をするものと考えられた。また、各培地のみにおける凝集はみられなかった。

N. sicca の培養上清による *S. sanguis* および *A. naeslundii* の凝集へのアミノ酸、糖、および EDTA の影響を検討したが、Table 6 に示した

Table 5. Aggregation of oral bacteria with supernatant of *N. sicca*, *N. mucosa*, and *N. subflava*

	Aggregation			
	Supernatant of <i>N. sicca</i> ATCC 29256	Supernatant of <i>N. mucosa</i> ATCC 19696	Supernatant of <i>N. subflava</i> IID 856	Supernatant of <i>N. subflava</i> IID 857
<i>S. mutans</i> 67-1	- ^{a)}	-	-	-
<i>S. mutans</i> OMZ 70	-	-	-	-
<i>S. sobrinus</i> 6715	-	-	-	-
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	4+	4+	-	4+
<i>S. oralis</i> ATCC 10557	-	-	-	-
<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	-	-	-	-
<i>A. viscosus</i> ATCC 19246	+	2+	-	+
<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	4+	3+	-	2+
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> 6328	-	-	-	-
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> 8532	-	-	-	-

a) Aggregation was measured as described in Materials and Methods.

Table 6. Effect of various compounds on aggregation of oral bacteria with supernatant of *N. sicca*, and *N. mucosa*, and *N. subflava*

Tested compound	Aggregation							
	Supernatant of <i>N. sicca</i> ATCC29256		Supernatant of <i>N. mucosa</i> ATCC19696			Supernatant of <i>N. subflava</i> IID856		
	<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	<i>S. sanguis</i> ATCC10556	<i>A. viscosus</i> ATCC19246	<i>A. naeslundii</i> ATCC12104	<i>S. sanguis</i> ATCC10556	<i>A. naeslundii</i> ATCC12104	
None	4+ ^{a)}	4+	4+	2+	3+	4+	2+	
Amino acids ^{c)}	100 mM ^{b)}	4+	4+	4+	2+	3+	4+	2+
Sugars ^{d)}	100 mM	4+	4+	4+	2+	3+	4+	2+
EDTA	0.6 mM	4+	4+	4+	2+	3+	4+	2+

a) Coaggregation was measured as described in Materials and Methods.

b) Final concentration of tested compound.

c) L- α -alanine, L-asparagine, L-cysteine, L-histidine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-arginine, L-lysine.

d) D-galactose, D-glucose, D-mannitol, L-rhamnose, D-sorbitol, D-mannose, lactose, D-glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine

ようにいずれの物質による阻害もみられなかった。これはcoaggregationにおける阻害効果と同様であった。また、同様に*N. mucosa*の培養上清と*S. sanguis*, *A. viscosus*および*A. naeslundii*におけるこれらの物質の阻害効果もみられなかった(data not shown)。

N. sicca, *N. mucosa*および*N. subflava*の培養上清を加熱し凝集活性を測定したが、低下がみられなかったことより凝集因子は耐熱性であることがわかった(Table 7)。

5. *N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*培養上清処理菌のcoaggregation誘導

N. sicca, *N. mucosa*および*N. subflava*が菌体外に産生する凝集因子が口腔内でどのような作用をするか推測するためcoaggregationの誘導効果について検討した。*S. sanguis*と*A. naeslundii*はcoaggregationしないが、*N. sicca*, *N. mucosa*または*N. subflava*の培養上清にて*S.*

*sanguis*を処理することより、*A. naeslundii*とcoaggregationすることが観察された(Table 8)。このことより、口腔内でもcoaggregationの誘導効果がみられることが推察された。

考 察

清掃歯面に初期に高率に付着する細菌として*S. sanguis*, *S. oralis*および*S. gordonii*が検出されている。その後、プラークの成熟に従いActinomyces spp.等が増加する傾向が示されている³⁾。*S. sanguis*, *S. oralis*および*S. gordonii*はacquired pellicleのproline-rich protein, alpha amylaseまたはbacterial cell fragment等に結合することが示されており、これらに結合することが最初に高率に検出される要因とされている⁷⁾。*S. sanguis*等が結合した後にプラークに結合する細菌はacquired pellicleに直接結合するより既に結合している*S. sanguis*等に結

Table 7. Effect of heat treatment of supernatants of *N. sicca*, *N. mucosa*, and *N. subflava* on aggregation with oral bacteria

	Aggregation							
	supernatant of <i>N. sicca</i> ATCC 29256		supernatant of <i>N. mucosa</i> ATCC 19696		supernatant of <i>N. subflava</i> IID 856		supernatant of <i>N. subflava</i> IID 857	
	native	heated ^{a)}	native	heated	native	heated	native	heated
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	4+ ^{b)}	4+	4+	4+	-	-	4+	4+
<i>A. viscosus</i> ATCC 19246	+	+	2+	2+	-	-	+	+
<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	3+	3+	3+	3+	-	-	2+	2+

a) Supernatant was heated at 85 °C for 10 min.

b) Aggregation was measured as described in Materials and Methods.

Table 8. Coaggregation of supernatants of *N. sicca*, *N. mucosa*, and *N. subflava* treated *S. sanguis* ATCC 10556 and *A. naeslundii* ATCC 12104.

			Coaggregation (%) mean \pm S.D.
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	+	<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	-4.9 \pm 9.3 ^{a)}
Supernatant of <i>N. sicca</i> ATCC 29256 treated <i>S. sanguis</i> ATCC 10556	+	<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	14.8 \pm 9.6
Supernatant of <i>N. mucosa</i> ATCC 19696 treated <i>S. sanguis</i> ATCC 10556	+	<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	30.3 \pm 6.0
Supernatant of <i>N. subflava</i> IID 857 treated <i>S. sanguis</i> ATCC 10556	+	<i>A. naeslundii</i> ATCC 12104	35.2 \pm 8.2

a) Coaggregation (%) was measured as described in Materials and Methods.

合することによりプラークへ参入するものとされている。このことを最初に提唱したのは Bladenら¹³⁾であり、ニクロム線に結合した *Actinomyces viscosus* に *Veillonella* が結合することを観察した。ついで、GibbonsとNygaardは¹⁴⁾異種の細菌を混合することにより結合(凝集)することを観察した。その後これらの結合はcoaggregationとされ、口腔細菌間でも非常に多くの組合せのcoaggregationが生じることが観察された。また阻害剤による実験よりそれぞれ異なった結合様式があることが推察されている¹⁵⁾。このcoaggregationはプラーク形成において重要な機構と考えられている。歯面に初期に結合する細菌はearly colonizerと総称され、口腔内*N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*もearly colonizerの一員とされる。しかし、非常に多くの口腔細菌間のcoaggregationの研究がある中で*N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*と他の口腔細菌とのcoaggregationについては殆ど検討されていない。今回の実験より*N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*はearly colonizerとして初期に検出される*S. sanguis*, *S. oralis*および*S. gordonii*とcoaggregationしたことが、またearly colonizerとして中期に検出される*A. viscosus*および*A. naeslundii*ともcoaggregationすることに加え、secondary colonizerとされている*F. nucleatum* subsp. *nucleatum*ともcoaggregationすることが観察された。さらに、う蝕の原因菌である、*S. mutans*

や*S. sobrinus*ともcoaggregationすることが観察された。このことは*N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*がプラーク形成の初期段階において何らかの役割をすることが推察される。*S. mutans* や *S. sobrinus* とcoaggregationするpartner cellはあまり知られておらず^{16,17)}、*S. mutans*, *S. sobrinus*は微線毛によりaquaiied pellicleに直接結合するとされている。しかし、本研究の結果からこれらの細菌が*N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*を介して初期付着をすることも可能なことが示された。一方、これらの菌のcoaggregationが一般的な阻害剤によって阻害されなかったこと、また、cell surface hydrophobicityとcoaggregationの間において有意な相関関係がみられなかったことから、レクチン結合、Ca²⁺イオンを介した結合および疎水結合によるのではないものと推測された。さらに、加熱菌体を用いた実験の結果からこれらの菌のcoaggregationに関与すると考えられる結合因子は、殆どが耐熱性であると考えられた。結合様式の解明についてはさらに研究が必要である。

N. sicca, *N. mucosa*および*N. subflava*の培養上清もcoaggregationが強くみられたpartner cellを凝集した。この凝集がどのような物質により生じたか不明であるが、*N. sicca*, *N. mucosa*および*N. subflava*はグラム陰性球菌であり、外膜も存在することより、外膜がover produceした可能性が推察された¹⁸⁻²¹⁾。

一般的に *S. sanguis* と *A. naeslundii* は coaggregation するとされているが⁷⁾, coaggregation は同一菌種でも菌株により異なることも知られており, 今回供試した *S. sanguis* ATCC10557 と *A. naeslundii* ATCC12104 は coaggregation が観察されなかった. しかし, *S. sanguis* ATCC10556 を *N. sicca*, *N. mucosa* または *N. subflava* の培養上清で処理することにより *A. naeslundii* ATCC12104 との coaggregation が誘導された. このことより, 菌体外に放出された物質もプラーク形成に関与する可能性も考えられた.

以上のことより, プラークに初期から存在するとされている *N. sicca*, *N. mucosa* および *N. subflava* は共凝集により, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* および *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* 等のプラークへの参入および, *S. mutans* や *S. sobrinus* の初期付着に関与する可能性が強く示唆された.

文 献

- Moore WE, Holdeman LV, Cato EP et al.: Comparative bacteriology of juvenile periodontitis., *Infect Immun*, **48** : 507-519, 1985.
- Moore WE, Holdema LV, and Cato EP: You and your flora. U.S.Fed.Culture Collections News. **18** : 7-22, 1988.
- Hardie JM, and Bowden GH: The microbial flora of dental plaque: bacterial succession and isolation considerations. P63-87. Stiles, M., Loesch, W., and O'Brien, (ed), Microbial aspects of dental caries, vol 1. Conformation Retrieval, Inc., 1976.
- Koga T, Okahashi N, Takahashi I et al.: Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c., *Infect Immun*, **58** : 289-296, 1990.
- Hajishengallis G, Koga T and Russell MW: Affinity and specificity of the interactions between *Streptococcus mutans* antigen I/II and salivary components., *J Dent Res*, **73** : 1493-1502, 1994.
- Russell MW and Mansson-Rahemtulla B: Interaction between surface protein antigens of *Streptococcus mutans* and human salivary components., *Oral Microbiol Immunol*, **4** : 106-111, 1989.
- Kolenbrander PE and London J: Adhere Today, here tomorrow: Oral bacterial adherence., *J Bacteriol*, **175** : 3247-3252, 1993.
- Ritz HL: Microbial population shifts in developing human dental plaque., *Arch Oral Biol*, **12** : 1561-1568, 1967.
- Willcox MD, Drucker DB and Hillier VF: Cohesion between oral streptococci and *Neisseria pharyngis* on saliva-coated glass, in the presence and absence of sucrose., *Microbios*, **61** : 197-205, 1990.
- Cisar JO, Kolenbrander PE and McIntire FC: Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*., *Infect Immun*, **24** : 742-752, 1979.
- Kinder SA and Holt SC: Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18., *Infect Immun*, **57** : 3425-3433, 1989.
- Rosenberg M, Judes H and Weiss E: Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ., *Infect Immun*, **42** : 831-834, 1983.
- Bladen H, Hageage G, Pollock F et al.: Plaque formation *in vitro* on wires by gram-negative oral microorganisms (*Veillonella*)., *Arch Oral Biol*, **15** : 127-133, 1970.
- Gibbons RJ and Nygaard M: Interbacterial aggregation of plaque bacteria., *Arch Oral Biol*, **15** : 1397-1400, 1970.
- Kolenbrander PE: Surface recognition among oral bacteria: Multigeneric coaggregations and their mediators., *Crit Rev Microbiol*, **17** : 137-159, 1989.
- Crowley PJ, Fischlschweiger W, Coleman SE et al.: Intergeneric bacterial coaggregation involving mutans streptococci and oral actinomyces., *Infect Immun*, **55** : 2695-2700, 1987.
- McBride BC and Van der Hoeven JS: Role of interbacterial adherence in colonization of the oral cavities of gnotobiotic rats infected with

- Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens*,
Infect Immun, **33** : 467-472, 1981.
18. Mayrand D and Grenier D: Biological activities of outer membrane vesicles., *Can J Microbiol*, **35** : 607-613, 1989.
19. Singh U, Grenier D and McBride BC: *Bacteroides gingivalis* vesicles mediate attachment of streptococci to serum-coated hydroxyapatite., *Oral Microbiol Immunol*, **4** : 199-203, 1989.
20. Ellen R P, and Grove DA: *Bacteroides gingivalis* blebs bind to and aggregate *Actinomyces viscosus*. *J. Dent. Res.* 67. 268. 1988.
21. Grenier D and Mayrand D: Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*., *Infect Immun*, **55** : 111-117, 1987.