

黄色ブドウ球菌の HeLa 細胞に対する adhesin の分離と性状

松 浦 尚 志

Isolation and characterization of an adhesin to HeLa cells from *Staphylococcus aureus*

Takashi Matsuura

(平成 6 年 1 月 18 日受付)

緒 言

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は表在性および深在性の感染症の原因菌として知られており、種々の化膿性疾患の他、肺炎、腸炎、表皮剥脱性皮膚炎などの原因となる。特に、多剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は院内感染の原因菌として、現在非常に大きな問題となっている¹⁻⁵⁾。

S. aureus はヒトの鼻腔、皮膚、腸管などに常在するが、口腔^{6,7)} および義歯⁸⁻¹¹⁾ からも分離され、特に顎義歯からは高頻度で分離される¹²⁾。口腔内あるいは義歯に付着した *S. aureus* は口腔領域の化膿性疾患¹³⁾ や義歯性口内炎¹⁴⁾ を誘発するだけでなく、義歯をリザーバーとして咽頭に定着し、さらに呼吸器疾患などの全身疾患を誘発する可能性が考えられる¹⁵⁾。

一般に感染の成立には細菌の宿主への定着が必要であり、その第一歩である付着は重要なステップである。細菌の宿主細胞への付着には、細菌細胞側の adhesin (付着素) とそれに対する宿主細胞側の receptor が関与していると考えられており¹⁶⁾、*S. aureus* においても adhesin やそれに対する receptor を解明するために多くの研究がなされてきた。現在までに明らかとなっている adhesin は laminin receptor¹⁷⁾、fibronectin receptor¹⁸⁻²¹⁾ および collagen receptor^{22,23)} であり、これらは既知の宿主の構成物質を用いた検討により明らかとなった adhesin である。一方、既知の細菌細胞表層物質を用いた検討²⁴⁻³²⁾ により adhesin を明らかにする試みも多数行われてきたが、これらはいずれも

adhesin であることを証明するまでには至っていない。このように、現在までに細菌細胞あるいは宿主細胞の既知構成物質を用いた検討が主になされてきたが、細菌の宿主への付着には多種類の adhesin の関与が示唆されており^{33,34)}、未知物質あるいは adhesin と証明されていない既知物質が *S. aureus* の宿主への付着に関与する可能性は十分に考えられる。したがって、*S. aureus* の持つ全ての adhesin およびそれに対する receptor を解明するには、従来からの既知物質のみを用いた検討ではなく、全ての細菌細胞表層成分および宿主細胞そのものを用いた検討を試みる必要がある。

本研究の目的は、*S. aureus* の宿主細胞に対する adhesin を分離し、その性状を明らかにすることとした。なお、可及的に多種類の adhesin を解明するために、粗菌体表層成分を出発材料として宿主細胞に付着する成分を分離した。宿主細胞には *in vitro* での細菌の付着実験によく用いられる HeLa 細胞を用いた。

材料および方法

1. 使用菌株

菌株は三菱油化 BCL 化学療法部門の小林寅詰博士より分与された呼吸器由来の臨床分離 MRSA 10 株と MSSA 9 株、順天堂大学医学部細菌学講座の平松啓一教授より分与された臨床分離 MRSA 2 株と MSSA 2 株および標準株 Cowan I を用いた。

2. HeLa 細胞の調製

10%ウシ胎児血清を添加した Eagle's MEM (日本製薬、東京) を培地とし、 4×10^5 cells/ml に調製した HeLa 細胞の浮遊液を Celldesk[®] (住友ベークライト、東京) あるいは 13 mm × 13 mm に分割した無蛍光ガラス (Takahashi Giken Glass Co., Ltd., 東京) 上に接

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任: 赤川安正教授) 本論文の要旨は平成 5 年 3 月の第 66 回日本細菌学会総会および平成 5 年 7 月の第 7 回 Bacterial Adherence 研究会において発表した。

種した。37°C, 5%炭酸ガス—95%空気中にて約24時間培養することにより confluent になった HeLa 細胞を実験に用いた。

3. 菌付着実験

1) 菌培養条件

菌の培養はトリプチケース・ソイ液体培地 (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) を用いて、37°C にて3時間振盪 (振幅 30 mm, 毎分140回) することにより行った。対数増殖期後期に達した菌を集菌した後、0.14 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (PBS; pH 7.4) で2回洗浄した。

2) 菌付着実験

培養後洗浄した菌を PBS に懸濁後、コールターカウンター (model ZM, Coulter Electronics Ltd, FL, USA) を用いて菌濃度 10^8 cells/ml に調製した。HeLa 細胞を培養した Celldesk[®] 3枚を PBS にて洗浄後、プラスチックシャーレ (35 mm×10 mm) に両面テープを用いて固定し、調製した菌懸濁液 3 ml を加え、60 rpm の速度で振盪しながら 37°C にて30分間接触させた。反応後、Celldesk[®] を PBS にて洗浄、乾燥し、エチルアルコールによる固定およびグラム染色を施した。1枚の Celldesk[®] につき任意の10視野の付着菌数を光学顕微鏡下にて計測、合計し、3枚の平均付着菌数を算出した。なお、付着菌数の統計学的有意差は t 検定により求めた。

3) 菌の trypsin 処理

菌の付着に及ぼす trypsin の影響を調べる実験では、以下のように trypsin 処理を行った。培養後洗浄した菌を trypsin (半井化学薬品, 京都) 1 mg/ml を含む PBS に懸濁後、37°C にて30分間振盪しながら作用させた。一方、PBS に懸濁後、37°C にて30分間振盪した場合を対照とした。作用終了後、PBS にて2回洗浄した菌を3-2)項に示した菌付着実験に用いた。

4. 粗細胞壁成分の調製

Switalski ら (1989)²³⁾ の方法に準じ、HeLa 細胞に高付着性を示す臨床分離株 MS 11株から細胞壁成分 (CWC) を調製した。トリプチケース・ソイ液体培地にて対数増殖期後期まで培養した菌 10 g (湿重量) を PBS にて2回洗浄し、0.14 M NaCl および 30% raffinose を含む 50 mM トリス—塩酸緩衝液 100 ml に懸濁し、lysostaphin 1 mg, deoxyribonuclease 2 mg, phenylmethylsulfonyl fluoride (以上, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 100 μ mol, *N*-ethylmaleimide (半井化学薬品, 京都) 1 mmol を添加した。37°C にて30分間振盪しながら反応させた後、lysostaphin 1 mg

を再添加し、完全に細胞壁が破壊されプロトプラストが形成されるまで、さらに2.5時間反応させた。8,000 \times g, 10分間遠心し、その上清を PBS に対して透析した試料を粗細胞壁成分 (crude CWC) とした。

5. 抗全菌血清の作製

洗浄した MS 11株を 0.1% chromium (III) potassium sulphate (半井化学薬品, 京都) を含む 1%ホルマリン溶液に懸濁し、4°C にて24時間処理した。菌を洗浄後、約 0.5×10^8 cells/ml に調製した PBS にて懸濁した菌液 0.5 ml を1週間間隔で10回ウサギに静脈注射することによって得られたウサギ抗血清を抗 MS 11全菌血清として用いた。

6. CWC 付着実験

Choi ら (1989)³⁵⁾ の方法に準じた蛍光抗体法による検出法を用い、CWC の HeLa 細胞に対する付着実験を行った。Crude CWC あるいは以下に示すクロマトグラフィーにより得られた画分 50 μ l をそのままの濃度で無蛍光ガラス上に培養した HeLa 細胞上に滴下し、30分間作用させた。PBS にて十分に洗浄後、3.5%のホルマリン溶液にて10分間固定し、100倍希釈した抗 MS 11 全菌血清 50 μ l を30分間作用させた。PBS にて十分に洗浄後、50倍希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (生化学工業, 東京) 50 μ l を30分間作用させた。なお、反応は全て湿潤下で 37°C にて行った。PBS にて十分に洗浄後乾燥し、蛍光顕微鏡および落射蛍光装置 EFD2 (以上, Labophoto 日本光学工業, 東京) を用いて B2 励起にて観察し、蛍光の有無から CWC の付着の有無を判定した。また、抗 MS 11 全菌血清および FITC 結合抗ウサギ IgG 抗体が非特異的に HeLa 細胞に付着しないことを確認するため、CWC の代わりに PBS を作用させた場合を対照とした。

7. HeLa 細胞付着性 CWC の分離

HeLa 細胞に対する付着性を指標として、高速液体クロマトグラフィーによる HeLa 細胞付着性 CWC の分離を行った。高速液体クロマトグラフィーには HLC システム (HLC-803D, GE-4, UV-8 model II, 東ソー, 東京) を使用した。

1) 疎水クロマトグラフィー

2 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した crude CWC を同緩衝液にて平衡化した TSKgel Phenyl Toyopearl 650 M (12 \times 50 mm; 東ソー, 東京) カラムに添加し、同緩衝液で洗浄後、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて溶出し

た。溶出された HeLa 細胞付着性画分は 0.5 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。

2) キレートクロマトグラフィー

0.5 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて平衡化し、リガンドに銅イオンを用いた TSKgel Chelate 5 PW (7.5×75 mm; 東ソー, 東京) カラムに 7-1) 項で溶出、透析した HeLa 細胞付着性画分を添加し、同緩衝液で洗浄後、0.5 M NaCl および 7.5 mM イミダゾールを含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) により溶出した。溶出された HeLa 細胞付着性画分は 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。

3) 陰イオン交換クロマトグラフィー

7-2) 項で溶出、透析した HeLa 細胞付着性画分を 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて平衡化した TSKgel DEAE 5 PW (7.5×75 mm; 東ソー, 東京) カラムに添加し、同緩衝液で洗浄後、0.5 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) により溶出し、溶出された HeLa 細胞付着性画分を最終画分とした。

8. SDS-PAGE および Western blotting

Laemmli (1970)³⁶⁾ の方法に準じ、7 項に示した分離過程で得られた各 HeLa 細胞付着性画分を 12% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。タンパクはクーマシーブルー染色にて検出した。また、タンパク以外の菌体表層成分も検出するため、Kyhse-Anderson (1984)³⁷⁾ の方法に準じ、Western blotting を行った。ゲルからニトロセルロース膜への blotting はセミドライ型装置 (SARTOBLLOT II, Sartorius, Göttingen, Germany) を用いて行った。菌体表層成分の検出には酵素抗体法を用いた。ブロッキング処理は 2% ウシ血清アルブミンを含む PBS を用いた。一次抗血清による処理には PBS にて 500 倍希釈した抗 MS 11 全菌血清を、二次抗体による処理には PBS にて 1000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Organon Teknika Corp., Treyburn, Durham, USA) を用いた。各処理後は Tween 20 を含む PBS にて十分に洗浄を行った。発色には、4-chloro-1-naphthol (半井化学薬品, 京都) を溶解したエタノールを濾過し、過酸化水素を添加したペルオキシダーゼ反応溶液を用いた。

9. HeLa 細胞付着性 CWC の性状試験

1) 熱処理およびプロテアーゼ処理による影響

Crude CWC の熱処理は 100°C にて 1 時間煮沸することにより行った。Crude CWC のプロテアーゼ処理

は 1 mg/ml の trypsin, papain (E. Merck, Darmstadt, Germany) あるいは proteinase K (フナコシ, 東京) にて 37°C, 1 時間作用させることにより行った。プロテアーゼ活性を不活化させるために、trypsin の場合は 2 mg/ml の trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を添加後、37°C, 30 分間作用させ、他の場合は 100°C, 10 分間熱処理した。処理後 CWC の HeLa 細胞に対する付着性から各処理による影響を検討した。

2) 陰イオン交換樹脂に対する吸着性

TSKgel DEAE Toyopearl 650 M (8×30 mm) カラムを用いて、陰イオン交換樹脂に対する吸着性を検討した。0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.5) に対して透析した crude CWC を同緩衝液にて平衡化した同カラムに添加し、同緩衝液で洗浄後、0.5 M NaCl を含む 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.5) により溶出した。得られた非吸着画分および吸着画分の HeLa 細胞に対する付着性を検討した。

3) トリクロロ酢酸処理による影響

Crude CWC を 10% トリクロロ酢酸 (TCA) にて 4°C, 48 時間処理し、22,000×g, 20 分間遠心後の上清画分および沈殿画分の HeLa 細胞に対する付着性を検討した。

10. タイコ酸の精製

Arizono ら (1991)³⁸⁾ および Umeda ら (1992)³⁹⁾ の方法に準じ、MS 11 株からタイコ酸を精製した。9-3) 項に示した操作で得られた TCA 処理後の遠心上清画分にその 3 倍量のエタノールを加え、4°C にて 18 時間後、生じた沈殿物を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) にて溶解し、同緩衝液に対して透析した。透析した画分を同緩衝液にて平衡化した TSKgel DEAE Toyopearl 650 M (12×50 mm) カラムに添加し、同緩衝液で洗浄後、0.5 M NaCl を含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) により溶出した。溶出された各画分にその 3 倍量のエタノールを加え、4°C にて 18 時間後、生じた沈殿物を精製タイコ酸とした。精製タイコ酸は CWC 付着実験および Western blotting に用いた。また、³H にて標識したタイコ酸 (標識タイコ酸) の調製は以下のように行った。菌を *N*-アセチル-D-[1-³H] グルコサミン (specific activity, 88.8 GBq/mmol; Amersham International plc, Buckinghamshire, England) を添加したトリプチケース・ソイ液体培地にて 37°C, 3 時間振盪培養 (振幅 30 mm, 毎分 140 回) し、集菌後、PBS にて 2 回洗浄し、以下、上記と同様の方法で標識タイコ酸 (specific activity, 15 cpm/pmol) を精製した。なお、タイコ酸の濃度は試料中の

リン量から算出した³⁹⁾。

11. タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着の動力学的解析

1) タイコ酸付着の時間依存性および濃度依存性

タイコ酸付着の時間依存性は 0.06 mM の標識タイコ酸 50 μ l を Celldesk[®] 上に培養した HeLa 細胞に滴下し、湿潤下で 37°C、0.5、1、1.5、2、3 および 4 時間作用させることにより行った。PBS にて洗浄後、HeLa 細胞に付着したタイコ酸の放射活性を液体シンチレーションカウンター (LSC-903, ALOKA, 東京) にて測定し、得られた放射活性を付着タイコ酸量として表した。タイコ酸付着の濃度依存性は 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 および 2.0 mM の標識タイコ酸 50 μ l を用い、HeLa 細胞との作用時間を 30 分間として以下、上記と同様に実験を行った。

2) タイコ酸付着の可逆性試験

まず、0.06 mM の標識タイコ酸 50 μ l を Celldesk[®] 上に培養した HeLa 細胞に滴下し、37°C にて 30 分間作用させた。洗浄後、さらに PBS あるいは 2.4 mM (標識タイコ酸の 40 倍濃度) の非標識タイコ酸を 0、5、10、15、および 30 分間作用させ、各経過時間での HeLa 細胞の放射活性を測定した。タイコ酸付着の可逆性は、標識タイコ酸付着の減少の程度から判定した。

12. タイコ酸による菌付着競合阻害実験

菌株は、trypsin により付着が減少した菌株および変化しなかった菌株を 3 株ずつ用いた。MS 11 株から分離したタイコ酸 2 mM を含む菌懸濁液 50 μ l を Celldesk[®] 上に培養した HeLa 細胞に加え、3-2) 項に示した方法と同様の付着実験を行った。一方、タイコ酸を含まない場合を対照とし、菌とタイコ酸の HeLa 細胞への付着を競合させることによりタイコ酸の菌付着競合阻害の有無を調べた。

結 果

1. *S. aureus* の HeLa 細胞に対する付着に及ぼす trypsin の影響

S. aureus の HeLa 細胞に対する付着に及ぼす trypsin の影響を図 1 および図 2 に示す。24 株中 9 株において trypsin による付着の有意な減少が認められたが (図 1)、15 株においては trypsin による付着の有意な変化は認められなかった (図 2)。

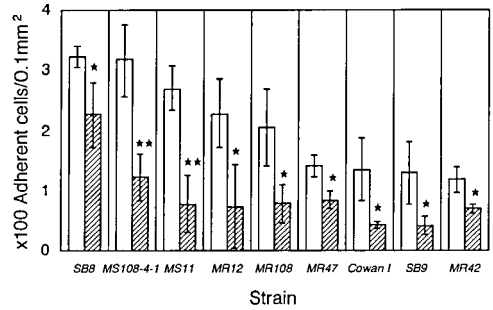


図 1 *S. aureus* の HeLa 細胞に対する付着に及ぼす trypsin の影響。

—付着が有意に減少した菌株—

□ : trypsin 未処理菌

▨ : trypsin 処理菌

★ : 0.01 < p < 0.05, ★★ : p < 0.01

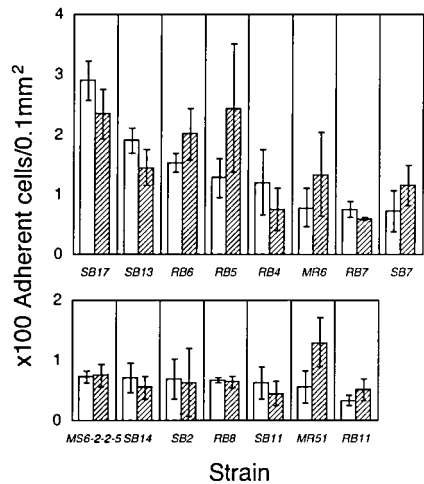


図 2 *S. aureus* の HeLa 細胞に対する付着に及ぼす trypsin の影響。

—付着が有意に変化しなかった菌株—

□ : trypsin 未処理菌

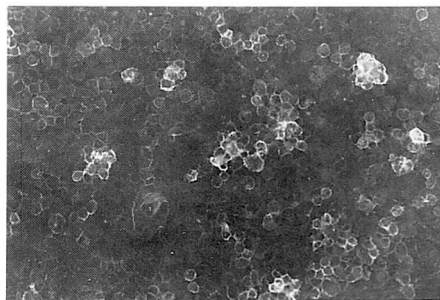
▨ : trypsin 処理菌

2. HeLa 細胞付着性 CWC の検出

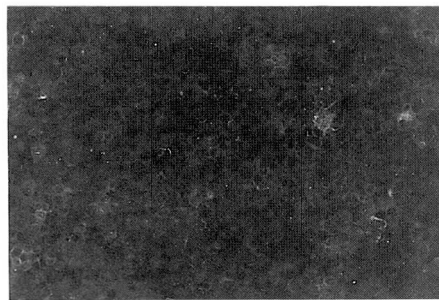
蛍光抗体法により crude CWC の HeLa 細胞に対する付着性を検討した結果を図 3 に示す。Crude CWC を HeLa 細胞に作用させた場合は蛍光が認められ (図 3A)、対照として PBS を作用させた場合は蛍光が認められなかった (図 3B)。

3. HeLa 細胞付着性 CWC の分離

図 4A および図 4B に示す高速液体クロマトグラフィーにより得られた HeLa 細胞付着性最終画分を作用させた HeLa 細胞の蛍光像を図 5 に示す。Crude



A



B

図3 Crude CWC および PBS を作用させた HeLa 細胞の蛍光像。

A : Crude CWC

B : PBS (コントロール)

直接倍率×50にて撮影

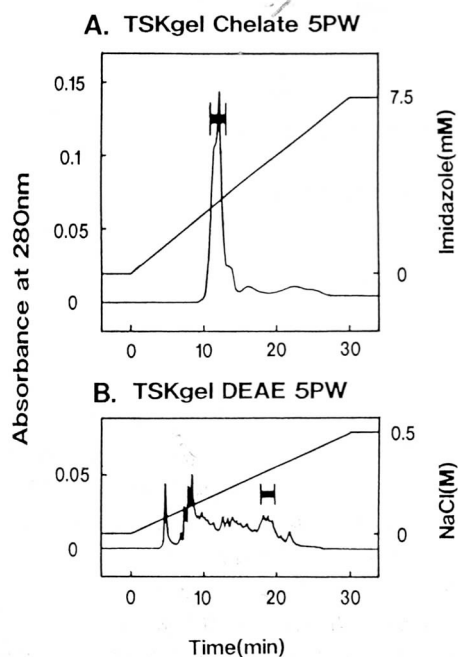


図4 分離過程における高速液体クロマトグラム。

- A : TSKgel Chelate 5PW (精製第二ステップ)
 溶離液 : I. 20 mM リン酸緩衝液 + 0.5 M NaCl (pH 7)
 II. I + 7.5 mM イミダゾール (pH 7)
- B : TSKgel DEAE 5PW (精製最終ステップ)
 溶離液 : I. 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7)
 II. I + 0.5 M NaCl (pH 7)

流速 : 1 ml/min

■ : HeLa 細胞付着性画分

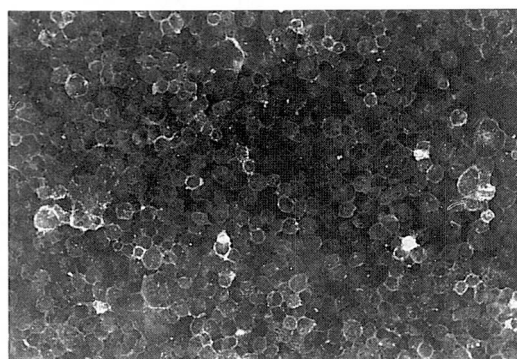


図5 HeLa 細胞付着性最終画分を作用させた HeLa 細胞の蛍光像。

直接倍率×50にて撮影

CWC と同様の蛍光像を呈する付着が認められた。分離過程での各 HeLa 細胞付着性画分の電気泳動像を図6に示す。クーマシーブルーにて染色されるバンドは精製が進むにつれ薄くなり、最終的には消失した(図6A)。しかし、Western blotting 像では最終的に約 40 kDa 以下の、境界不明瞭な幅広いバンドが認められた(図6B)。

4. HeLa 細胞付着性 CWC の性状

1) 熱およびプロテアーゼに対する感受性

熱処理およびプロテアーゼ処理した CWC を作用させた HeLa 細胞の蛍光像を図7に示す。100°C, 1時間処理によっても付着性の消失は認められなかった(図7A)。また, trypsin, papain あるいは proteinase K による処理によっても, 蛍光に若干の差が認められるものの付着性の消失は認められなかった(図7B-D)。

2) 陰イオン交換樹脂に対する吸着性

pH 2.5 における TSKgel DEAE Toyopearl 650 M (8

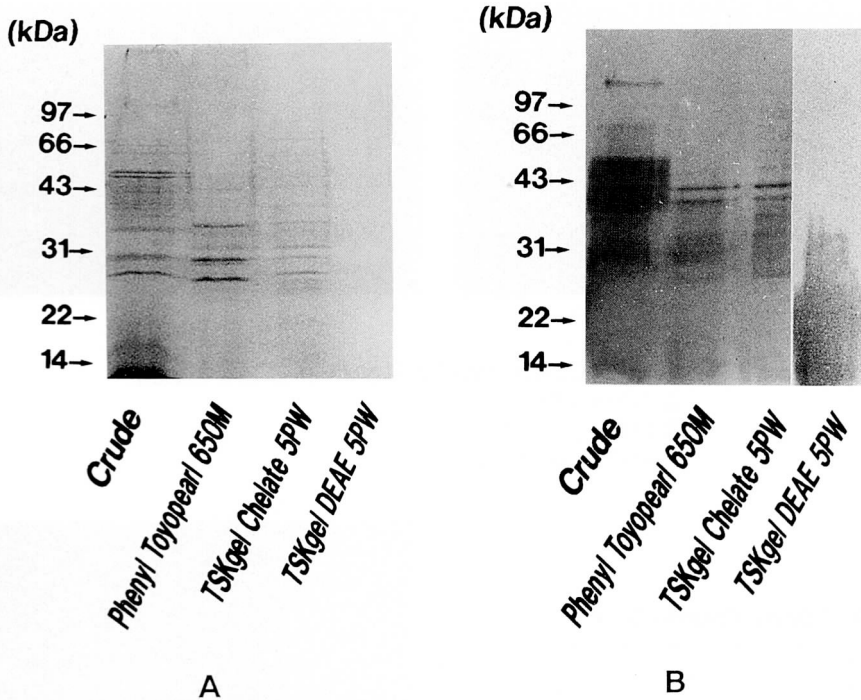


図6 分離過程での各 HeLa 細胞付着性画分の SDS-PAGE.

A : クーマシーブルー染色

B : 抗 MS11 全菌血清を用いた Western blotting

Crude : Crude CWC

Phenyl Toyopearl 650 M : 第一ステップ画分

TSKgel Chelate 5 PW : 第二ステップ画分

TSKgel DEAE 5 PW : 最終画分

縦軸の数値は分子サイズを示す。

×30 mm) カラムに対する非吸着画分および吸着画分を作用させた HeLa 細胞の蛍光像を図 8A および図 8B に示す。非吸着画分では付着が認められなかったが、吸着画分では付着が認められた。

3) TCA 処理後の付着性

10% TCA 処理後の遠心上清画分および遠心沈澱画分を作用させた HeLa 細胞の蛍光像を図 8C および図 8D に示す。遠心上清画分では crude CWC と異なった蛍光像を呈する付着が認められたが、遠心沈澱画分では付着が認められなかった。

5. タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着

1) HeLa 細胞に対する付着

精製タイコ酸 0.3 mM および 2 mM を作用させた HeLa 細胞の蛍光像を図 9A および図 9B に示す。0.3 mM のタイコ酸では TCA 処理後の遠心上清画分と類似した蛍光像を呈する付着が認められ、2 mM のタイコ酸ではさらに HeLa 細胞全体に付着が認められた。

図には示さないが、タイコ酸精製過程におけるタイコ酸を含まない画分 (エタノール処理後の上清画分および TSKgel DEAE Toyopearl 650 M カラムに対する溶出画分でエタノール処理にて沈澱が認められない画分) では付着が認められなかった。

2) タイコ酸の Western blotting

タイコ酸の抗 MS 11 全菌血清を用いた Western blotting を図10に示す。TCA 処理後の遠心上清画分、エタノール処理後の沈澱画分および精製タイコ酸において全て境界不明瞭な幅広いバンドが認められた。特に、精製タイコ酸のバンドが示す分子サイズと幅広さは HeLa 細胞に対する付着性を指標として分離した最終画分のバンドと同様であった。

6. タイコ酸付着の動力学的解析

1) 時間依存性および濃度依存性

タイコ酸の付着は時間依存的に増加し、約 2 時間で平衡に達した (図11)。また、タイコ酸の付着は濃度

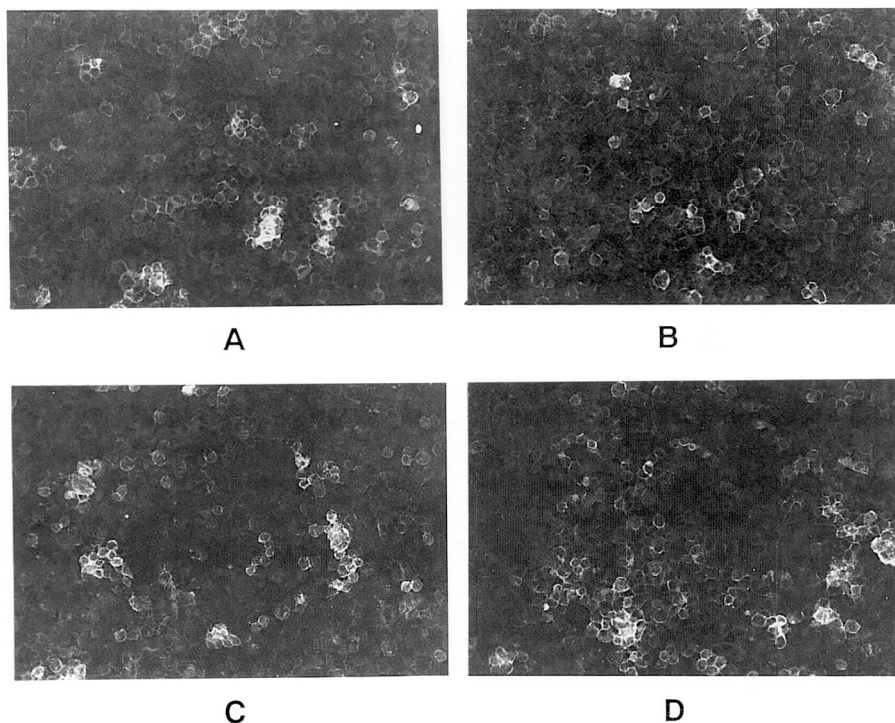


図7 熱処理およびプロテアーゼ処理した crude CWC を作用させた HeLa 細胞の蛍光像。

- A : 100°C, 1 時間処理
 B : Trypsin 処理
 C : Papain 処理
 D : Proteinase K 処理
 直接倍率×50にて撮影

依存的に増加し、作用させるタイコ酸の濃度が約 1.6 mM で飽和に達した (図12)。

3) 可逆性

標識タイコ酸を作用させた後、PBS を作用させた場合、標識タイコ酸の付着は約50%まで減少した。また 2.4 mM (標識タイコ酸の40倍濃度) の非標識タイコ酸を作用させた場合標識タイコ酸の付着は約10%まで減少したことから、タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着は可逆的であることが示された (図13)。

7. タイコ酸による菌付着競合阻害

タイコ酸を分離した MS 11株のみならず他の菌株においても、また trypsin にて付着が変化しなかった菌株3株のみならず付着が減少した菌株3株においてもタイコ酸による有意な菌付着競合阻害が認められた (図14)。

考 察

現在までに証明されている *S. aureus* の adhesin は

3種類のみであり、それらはタンパクである laminin receptor¹⁷⁾, fibronectin receptor¹⁸⁻²¹⁾ および collagen receptor^{22,23)} である。Adhesin の可能性がある物質にはタイコ酸²⁴⁻³⁰⁾, リポタイコ酸^{29,31)}, プロテイン A^{29,32)}, vitronectin-binding protein⁴⁰⁾, fibrinogen-binding protein⁴¹⁾ などが挙げられるが、現在のところいずれも推測の域を出ていない。このように *S. aureus* の宿主への付着は未だ不明な部分が多く、未知のあるいは証明されていない adhesin が付着に関与する可能性は十分に考えられる。*S. aureus* が持つ全ての adhesin を明らかにするには全ての細菌細胞表層成分を出発材料に用いる必要があり、同様に宿主細胞をそのまま実験に用いる必要がある。そこで本研究では、細菌細胞表層成分の出発材料に粗細胞壁成分、宿主細胞に HeLa 細胞を用いて、可及的に多種類の *S. aureus* の HeLa 細胞に対する adhesin を分離することを試みた。

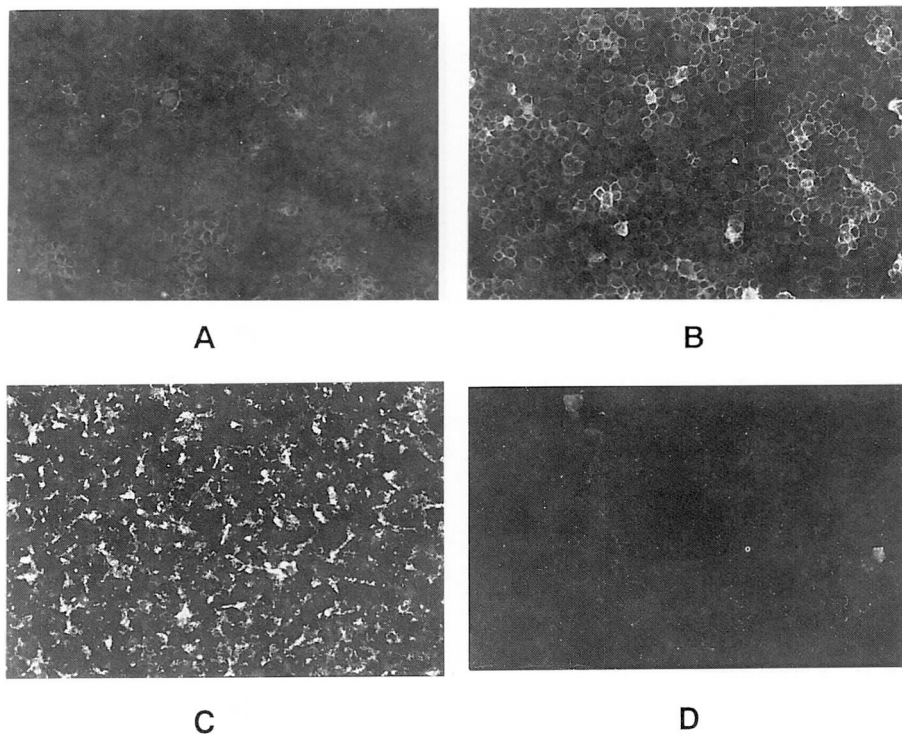


図8 HeLa 細胞附着性 CWCの陰イオン交換カラムに対する吸着性および TCA 処理による影響.
 A～Dは、以下の各画分を作用させた HeLa 細胞の蛍光像
 A：TSKgel DEAE Toyopearl 650 M カラム (pH 2.5) に対する非吸着画分
 B：Aと同じカラム (pH 2.5) に対する吸着画分
 C：10% TCA 処理 crude CWC の遠心上清画分
 D：Cと同じ成分の遠心沈澱画分
 直接倍率×50にて撮影

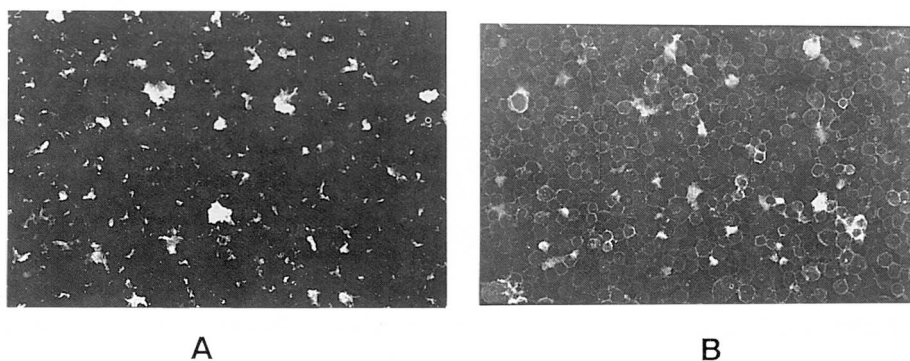


図9 精製タイコ酸を作用させた HeLa 細胞の蛍光像.
 A：0.3 mM タイコ酸
 B：2 mM タイコ酸
 直接倍率×50にて撮影

1. タンパクおよび非タンパクの付着への関与
 現在までに証明あるいは推測されている adhesin はほとんどがタンパクであることから、adhesin 分離を

試みる前にタンパクの付着関与の程度を知ることは重要である。そこで、trypsin 処理が菌付着に及ぼす影響を調べることにより、タンパクの付着への関与の有

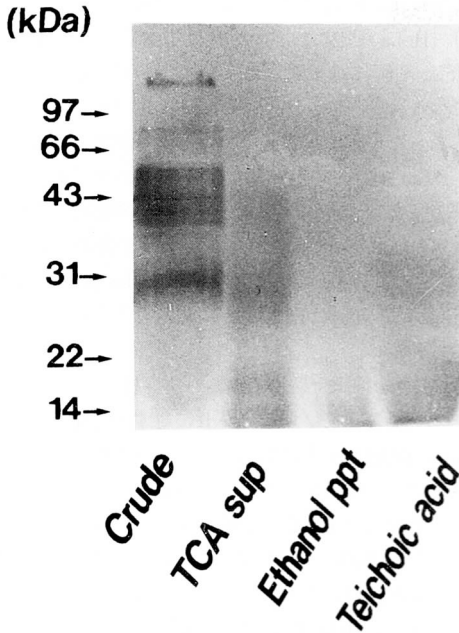


図10 タイコ酸画分の抗 MS11 全菌血清を用いた Western blotting.
 Crude : Crude CWC
 TCAsup : 10% TCA 処理 crude CWC の遠心上清画分
 Ethanol ppt : エタノール処理 TCAsup の沈澱画分
 Teichoic acid : 精製タイコ酸
 縦軸の教値は分子サイズを示す。

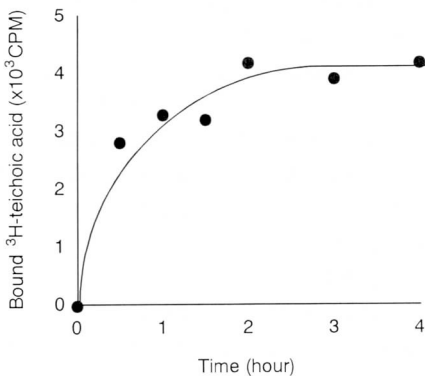


図11 タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着の経時変化。
 タイコ酸の濃度 : 0.06 mM

無を判定した。Trypsin は、タンパクの付着への関与を判定する際にしばしば用いられる試薬であることと、現在までに証明されている全ての adhesin が trypsin に感受性を示すことから選択した。24株中9

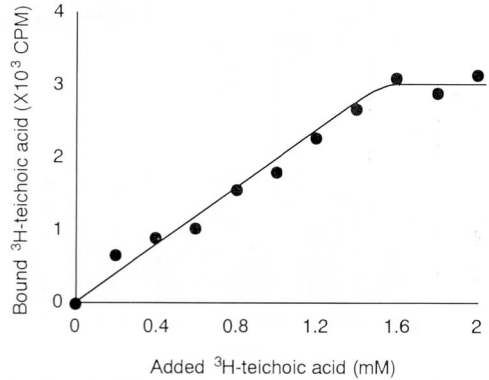


図12 タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着におけるタイコ酸濃度の影響。
 タイコ酸の作用時間 : 30分

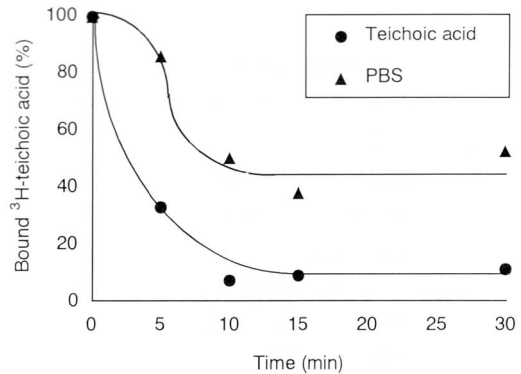


図13 タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着の可逆性。
 各プロットは0タイムにおける標識タイコ酸付着量を100%とした場合の、各経過時間における標識タイコ酸付着%を示す。
 ▲ : 標識タイコ酸作用後 PBS を作用させた場合
 ● : 同操作後40倍濃度の非標識タイコ酸を作用させた場合

株において trypsin により有意な付着の減少が認められたが、15株においては有意な付着変化が認められなかった。この結果は菌の付着にタンパクおよび非タンパクの両者が関与することを示唆しており、現在主にタンパク性 adhesin が着目されている中で非タンパクも菌の付着に重要な役割を担っていることが推測される。

2. HeLa 細胞付着性 CWC の検出

多種類かつタンパクおよび非タンパク両方の adhesin を分離するために、HeLa 細胞に高付着性を示し、トリプシンにて付着の減少が認められた臨床分離株

唆された。

3) HeLa 細胞付着性 CWC としてのタイコ酸の分離

精製タイコ酸には TCA 処理後の遠心上清画分と類似した蛍光像を呈する付着が認められ、精製過程でのタイコ酸を含まない画分には付着が認められなかったことから、今回の実験方法にて最終的に HeLa 細胞付着性 CWC として分離された物質はタイコ酸のみであった。HeLa 細胞に対する付着性を指標として分離した最終画分は、Western blotting においてタイコ酸と同様の分子サイズを示すこと、クーマシーブルー非染色性であること、TCA 処理後遠心上清画分に含まれることおよび電的に極めて陰性度の高い物質であることから、最終画分はタイコ酸であると思われる。精製タイコ酸および TCA 処理後遠心上清画分に crude CWC と異なった蛍光像を呈する付着が認められたが、その原因は明らかでない。しかし、TCA 処理によりタンパクが完全に除去されることおよびタイコ酸とペプチドグリカンの結合が解離すること⁴⁴⁾ を考えあわせると、タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着にタンパクが何らかの形で関与しているかあるいはペプチドグリカンの解離による立体的構造の変化が影響していることが推測される。

HeLa 細胞付着性 CWC としてタイコ酸のみが分離されたが、タイコ酸以外の物質も adhesin である可能性は十分に考えられる。MS 11 株は trypsin 処理による菌の付着性の低下からタンパクが付着に関与すると考えられるにも関わらず、その CWC からタンパク性の adhesin が分離されなかった。その理由として次の 3 つの可能性が考えられる。(1)CWC 調製時に失活する adhesin が存在する可能性、(2)ウサギに対し抗原性のないあるいは非常に弱い adhesin が存在する可能性、(3)細胞質膜に強固に結合しているため調製した CWC に含まれない adhesin が存在する可能性である。Tompkins ら (1992)⁴⁵⁾ はヒト内皮細胞に付着する *S. aureus* の菌体表層タンパクの検出を行っている。彼らは Triton X-100 あるいは lysostaphin 処理にて調製した菌体表層タンパクを用いているが、それらの調製方法の相違により付着するタンパクが異なることを報告している。したがって、今後 CWC の調製方法あるいは付着実験などを改良することにより、タイコ酸以外の HeLa 細胞付着性 CWC の分離が可能であると思われる。

また、既知の菌体表層物質の可能性について論ずると、まずペプチドグリカンが adhesin である可能性は少ないと考えられる。ペプチドグリカンはウサギを用いて抗体作製が可能であるにも関わらず³⁹⁾ 蛍光抗体

法にて分離されなかったことと、現在まで adhesin としての報告がみあたらないことからである。プロテイン A に関しては一部 adhesin と推測する報告もあるが^{29,32)}、抗体の Fc 部分と結合するにも関わらず蛍光抗体法を用いて分離されなかったことから、プロテイン A の可能性も少ないと思われる。リポタイコ酸に関してはレンサ球菌において adhesin であることが明らかにされているが⁴⁶⁻⁴⁸⁾、*S. aureus* においては adhesin と推測する報告^{29,31)} と否定する報告^{12,49,50)} がなされ、見解の一致をみていない。リポタイコ酸は一般に細胞質膜に結合していることから、今回用いた CWC 中にリポタイコ酸はほとんど含まれていないと考えられるため、本研究の結果から adhesin である可能性の否定はできない。タイコ酸以外に adhesin が存在することは十分に考えられるものの、タイコ酸は細胞壁の30%を占める主要な菌体表層物質であることを考慮すると、タイコ酸の付着への関与は少なくないものと推測される。

4. タイコ酸の adhesin としての性状

タイコ酸は以前から *S. aureus* の adhesin と推測されており、1980年に Aly らによりタイコ酸が *S. aureus* のヒト鼻粘膜細胞に対する付着に関与することが報告された²⁴⁾。以来、Bibel らによりタイコ酸の関与は鼻粘膜細胞の中でも角化細胞に対する付着のみであること²⁵⁾、タイコ酸に対する receptor の一つが fibronectin であること^{26,28)}、タイコ酸のヒト外陰部上皮細胞に対する付着への関与²⁷⁾ が報告され、他にも Haagen らはヒト腹膜中皮細胞に対する付着への関与²⁹⁾ を、Ward は MRSA のヒト鼻粘膜細胞に対する付着への関与³⁰⁾ を示している。しかし、上記の報告はいずれもタイコ酸が *S. aureus* の付着を阻害したことを根拠としており、タイコ酸が adhesin であることの証明はなされていない。タイコ酸を adhesin として証明するには、非特異的、特異的付着を問わず、タイコ酸の宿主細胞に対する付着を動力学的に解析する必要がある。そこで今回 ³H にて標識したタイコ酸を用いてタイコ酸の HeLa 細胞に対する付着を動力学的に解析した。タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着に時間依存性かつ濃度依存性が認められたことから、タイコ酸が動力学的に HeLa 細胞に付着することが示され、HeLa 細胞に対する adhesin であることが明らかとなった。また、他の宿主細胞においてタイコ酸による *S. aureus* 付着阻害が認められることが報告されていることから²⁴⁻³⁰⁾、HeLa 細胞以外の細胞に対してもタイコ酸は adhesin として働くものと考えられる。

HeLa 細胞に付着した標識タイコ酸量がその40倍濃

度の非標識タイコ酸を作用させることにより約10%まで減少したことはタイコ酸の HeLa 細胞に対する付着が可逆性であることを示している。S. aureus の fibronectin に対する付着¹⁹⁾を例外として、collagen に対する付着²²⁾、bone sialoprotein に対する付着⁵¹⁾、血小板表層成分である thrombospondin に対する付着⁵²⁾ および heparan sulfate に対する付着⁵³⁾ は可逆性であると報告されており、タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着も同様に可逆的であることが明らかとなった。

S. aureus が持つタイコ酸は全てリピートルタイコ酸である^{43,54,55)} (図15)。MS 11株から分離されたタイコ酸が MS 11株のみならず他の菌株の付着も阻害したことは、タイコ酸が普遍的に S. aureus の HeLa 細胞に対する付着に関与している可能性を示唆している。また、トリプシンにより付着が減少する菌株、変化しない菌株のいずれにおいても付着阻害が認められたことはタンパクが付着に関与する菌株においてもタイコ酸が付着に関与することを示唆している。ただし、タイコ酸により顕著な付着阻害が認められたが、この付着阻害の度合からタイコ酸の付着関与の度合を定量することはできない。細菌は宿主細胞表層の多数の binding site と結合するが、分子としてのタイコ酸はより少数の binding site と結合することが想像されるためである。実際に Courtney らによるレンサ球菌のリポタイコ酸の多核形白血球に対する付着の研究⁴⁷⁾においてリポタイコ酸の総 binding site 数に対する付着占拠率がそのまま菌付着阻害率に反映しないことが示されている。したがって、タイコ酸の菌付着への関与の定量化は今後の課題である。

タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着が特異的である可能性は、タイコ酸の付着に飽和性が認められたことに加え、タイコ酸による菌付着競合阻害がみられたことから示唆される。今回の実験ではタイコ酸に対する receptor の検出、分離までは行っていない。Bibel ら²⁶⁾はタイコ酸に対する receptor の一つが fibronectin であると報告しているが、HeLa 細胞は悪性腫瘍細胞由来であることから fibronectin が表層にほとんど存在しないと考えられる⁵⁶⁻⁵⁸⁾。結果は示していないが、FITC 結合抗 fibronectin 抗体を作用させた HeLa 細胞に蛍光が全く認められなかったことから、タイコ酸は fibronectin 以外の receptor と結合している可能性が考えられる。また、タイコ酸の付着機序を考える上で静電的相互作用も重要である。電気的陰性度の強いタイコ酸はそのリン酸基部分に陽イオン、特にマグネシウムイオンが結合することが知られており^{59,60)}、タイコ酸が陽イオンを介して HeLa 細胞表層の負に帯電した物質と結合する可能性も考えられ

る³⁰⁾。しかし結果は示していないが、マグネシウムイオンの有無によりタイコ酸の HeLa 細胞に対する付着が有意に変化しなかったこととタイコ酸の付着に飽和性が認められることを考慮すると、静電的相互作用は一次的作用というよりもむしろ二次的作用である可能性が強いと思われる。いずれにせよ、タイコ酸の付着機序を解明するにはタイコ酸に対する receptor の存在を明らかにする必要がある、タイコ酸の付着機序が解明されることにより S. aureus の宿主への付着機序が一層解明されるものと思われる。

総 括

可及的に S. aureus の HeLa 細胞に対する多種類の adhesin を明らかにするため、S. aureus の crude CWC を出発材料として HeLa 細胞に付着する成分を分離し、分離された成分の adhesin としての性状を検討することにより、以下の結果を得た。

1) S. aureus の HeLa 細胞に対する付着は trypsin により24菌株中9菌株において有意な減少が認められ、15菌株において有意な変化が認められなかった。

2) Trypsin により付着が減少する菌株から分離された HeLa 細胞付着性 CWC はタンパクではなく非タンパクのタイコ酸であった。

3) タイコ酸の HeLa 細胞に対する付着において時間依存性、濃度依存性、飽和性および可逆性が認められた。

4) タイコ酸を分離した菌株のみならずそれ以外の菌株においても、また trypsin により付着が変化しない菌株のみならず減少する菌株においても、タイコ酸による菌付着競合阻害が認められた。

以上より、S. aureus の HeLa 細胞に対する付着にはタンパクのみならず非タンパクも関与しており、HeLa 細胞付着性 CWC として唯一分離された非タンパクであるタイコ酸が S. aureus の HeLa 細胞に対する adhesin であることが明らかとなった。また、その付着は特異的である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科補綴学第一講座赤川安正教授ならびに終始御懇篤なる御指導を賜りました前本学歯科補綴学第一講座教授津留宏道名誉教授に衷心より感謝の意を表します。また、御教示、御校閲を賜りました本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授ならびに御校閲を賜りました同歯科薬理学講座土肥敏博教授に深甚なる謝意を表します。研究遂行上および本論文作成上、御助言と御鞭撻をいただきました本学口腔細菌学

講座三宅洋一郎助教授および元同歯科補綴学第一講座助手小羽田敦正博士に厚く御礼申し上げます。さらに、多くの御支援をいただきました橋本正毅講師および佐藤裕二講師をはじめとする歯科補綴学第一講座教室員各位ならびに菅井基行博士および小松澤均博士をはじめとする口腔細菌学講座関係者各位に深謝いたします。また、菌の使用に際し快く菌株を分与していただいた三菱油化 BCL 化学療法小林寅詰博士および順天堂大学医学部細菌学講座平松啓一教授に深謝します。

文 献

- 1) Peacock, J.E.Jr., Marsik, F.J. and Wenzel, R.P.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Introduction and spread within a hospital. *Ann. Intern. Med.* **93**, 526-532, 1980.
- 2) Haley, R.W., Hightower, A.W. and Khabbaz, R.F.: The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States hospitals; Possible roles of the house staff-patients transfer circuit. *Ann. Intern. Med.* **97**, 297-308, 1982.
- 3) Linnemann, C.C.Jr., Manson, M., Moore, P., Korfhagen, T.R. and Staneck, J.L.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Experience in a general hospital over four year. *Am. J. Epidemiol.* **115**, 941-950, 1982.
- 4) Melo Cristino, J.A., Perenia, A.T., Afonso, F. and Naidoo, J.N.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; A 6-month survey in a Lisbon paediatric hospital. *J. Hyg.* **97**, 265-272, 1986.
- 5) Brumfitt, W. and Hamilton-Miller, J.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *New Engl. J. Med.* **320**, 1188-1196, 1989.
- 6) 熊田秀文, 金子信雄, 菅沼宏行, 鹿谷 実: 口腔より分離したブドウ球菌の性状と分離に関する研究. 神奈川歯学 **15**, 623-635, 1981.
- 7) 高橋政文: ヒト, 実験動物および野性げっ歯類の口腔ブドウ球菌の分布. 愛院大歯誌 **20**, 268-286, 1982.
- 8) DePaola, L.G. and Minah, G.E.: Isolation of pathogenic microorganism from dentures and denture-soaking containers of myelosuppressed cancer patients. *J. Prosthet. Dent.* **49**, 20-27, 1983.
- 9) Thilade, E., Budtz-Jørgensen, E. and Thilade, J.: Predominant microflora of plaque on removable dentures in patients with healthy oral mucosa. *Archs oral Biol.* **28**, 675-680, 1983.
- 10) Hoshino, E. and Sato, M.: Predominant microorganism of plaque on complete dentures. *J. Jpn. Prosthodont. Soc.* **32**, 763-766, 1988.
- 11) Koopmans, A.S.F., Kippuw, N. and de Graaff, J.: Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. *J. Dent. Res.* **67**, 1246-1250, 1988.
- 12) 小羽田敦正: 黄色ブドウ球菌の HeLa 細胞およびヒト好中球への付着に及ぼす抗生物質の影響. 学位論文, 1-69, 1990.
- 13) Martin, M.V. and Hardy, P.: Two cases of oral infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Brit. Dent. J.* **170**, 63-64, 1991.
- 14) Palmgrist, S., Unell, L. and Lindquist, B.: Denture stomatitis in nursing home patients. *Swed. Dent. J.* **8**, 73-80, 1984.
- 15) 永武 毅: 慢性難治性呼吸器感染症—繰り返し感染を中心に—. 化学療法の領域 **4**, 64-70, 1988.
- 16) Beachey, E.H.: Bacterial adherence; Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosa surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**, 325-345, 1981.
- 17) Lopes, J.D., dos Reis, M. and Brentani, R.R.: Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. *Science* **229**, 275-277, 1985.
- 18) Espersen, F. and Clemmensen, I.: Isolation of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **37**, 526-531, 1982.
- 19) Rydén, C., Rubin, K., Speziale, P., Höök, M., Lindberg, M. and Wadström, T.: Fibronectin receptors from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **258**, 3396-3401, 1983.
- 20) Maxe, I., Rydén, C., Wadström, T. and Rubin, K.: Specific attachment of *Staphylococcus aureus* to immobilized fibronectin. *Infect. Immun.* **54**, 695-704, 1986.
- 21) Fröman, G., Switalski, L.M., Speziale, P. and Höök, M.: Isolation and characterization of a fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **262**, 6564-6571, 1987.
- 22) Holderbaum, D., Hall, G.S. and Ehrhart, L.A.: Collagen binding to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **54**, 359-364, 1986.
- 23) Switalski, L.M., Speziale, P. and Höök, M.: Isolation and characterization of a putative collagen receptor from *Staphylococcus aureus* strain Cowan I. *J. Biol. Chem.* **264**, 21080-21086, 1989.
- 24) Aly, R., Shinefield, H.R., Litz, C. and Maibach, H.I.: Role of teichoic acid in the binding of *Staphylococcus aureus* to nasal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **141**, 463-465, 1980.
- 25) Bibel, D.J., Aly, R., Shinefield, H.R., Maibach, H.I. and Strauss, W.G.: Importance of the keratinized epithelial cell in bacterial adherence. *J. Invest. Dermatol.* **79**, 250-253, 1982.
- 26) Bibel, D.J., Aly, R., Shinefield, H.R. and Maibach, H.I.: The *Staphylococcus aureus* receptor for fibronectin. *J. Invest. Dermatol.* **80**, 494-496, 1983.

- 27) Bibel, D.J., Aly, R., Lahti, L., Shinefield, H.R. and Maibach, H.I.: Microbial adherence to vulvar epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* **23**, 75-82, 1987.
- 28) Aly, R. and Levit, S.: Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium; Role of fibronectin and teichoic acid. *Rev. Infect. Dis.* **9**, S341-350, 1987.
- 29) Haagen, I.A., Heezius, H.C., Verkooyen, R.P., Verhoef, J. and Verbrugh, H.A.: Adherence of peritonitis-causing staphylococci to human peritoneal mesothelial cell monolayers. *J. Infect. Dis.* **161**, 266-273, 1990.
- 30) Ward, T.T.: Comparison of in vitro adherence of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to human nasal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **166**, 400-404, 1992.
- 31) Carruthers, M.M. and Kabat, W.J.: Mediation of staphylococcal adherence to mucosal cells by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.* **40**, 444-446, 1983.
- 32) Doran, J.E. and Raynor, R.H.: Fibronectin binding to protein A-containing staphylococci. *Infect. Immun.* **33**, 683-689, 1981.
- 33) Sanford, B.A., Darison, V.E. and Ramsay, M.A.: *Staphylococcus aureus* adherence to influenza A virus-infected and control cell cultures; Evidence for multiple adhesins (42230). *P. Soc. Exp. Biol. Med.* **181**, 104-111, 1986.
- 34) Hasty, D.L., Ofek, I., Courtney, H.S. and Doyle, R.J.: Multiple adhesins of streptococci. *Infect. Immun.* **60**, 2147-2152, 1992.
- 35) Choi, S.K. and Stinson, M.W.: Purification of a *Streptococcus mutans* protein that binds to heart tissue and glycosaminoglycans. *Infect. Immun.* **57**, 3834-3840, 1989.
- 36) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, 1970.
- 37) Kyhse-Andersen, J.: Electrophoretic blotting of multiple gels; A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209, 1984.
- 38) Arizono, T., Umeda, A. and Amako, K.: Distribution of capsular materials on the cell wall surface of strain Smith diffuse of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**, 4960-4962, 1991.
- 39) Umeda, A., Yokoyama, S., Arizono, T. and Amako, K.: Location of peptidoglycan and teichoic acid on the cell wall surface of *Staphylococcus aureus* as determined by immunoelectron microscopy. *J. Electron Microsc.* **41**, 46-52, 1992.
- 40) Paulsson, M., Liang, O.D., Ascencio, F. and Wadström, T.: Vitronectin-binding surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt.* **277**, 54-64, 1992.
- 41) Bodén, M.K. and Flock, J.I.: Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* Newman. *Microb. Pathogenesis* **12**, 289-298, 1992.
- 42) Miyake, Y., Kohada, A., Sugai, M. and Suginaka, H.: Mechanism of aminoglycoside enhancement of *Staphylococcus aureus* adherence to HeLa cells. *J. Antimicrob. Chemoth.* **28**, 811-817, 1991.
- 43) 小谷尚三, 加藤慶二郎: II-2 表層構造と機能; プドウ球菌 (プドウ球菌研究会). 医歯薬出版, 東京, 46-54, 1986.
- 44) McArthur, H.A.I., Roberts, F.M., Hancock, I.C. and Baddiley, J.: Lipid intermediates in the biosynthesis of the linkage unit between teichoic acids and peptidoglycan. *FEBS Lett.* **86**, 193-200, 1978.
- 45) Tompkins, D.C., Blackwell, L.J., Hatcher, V.B., Elliott, D.A., O'hagan-Sotsky, C. and Lowy, F.D.: *Staphylococcus aureus* proteins that bind to human endothelial cells. *Infect. Immun.* **60**, 965-969, 1992.
- 46) Chiang, T.M., Alkan, M.L. and Beachey, E.H.: Binding of lipoteichoic acid of group A streptococci to isolated human erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* **26**, 316-321, 1979.
- 47) Courtney, H., Ofek, I., Simpson, W.A. and Beachey, E.H.: Characterization of lipoteichoic acid binding to polymorphonuclear leukocytes of human blood. *Infect. Immun.* **32**, 625-631, 1981.
- 48) Courtney, H.S., Simpson, W.A. and Beachey, E.H.: Binding of streptococcal lipoteichoic acid to fatty acid-binding sites on human plasma fibronectin. *J. Bacteriol.* **153**, 763-770, 1983.
- 49) Miyake, Y., Kohada, A., Fujii, I., Sugai, M. and Suginaka, H.: Aminoglycosides enhance the adherence of *Staphylococcus aureus* to HeLa cells. *J. Antimicrob. Chemoth.* **23**, 79-86, 1989.
- 50) Miyake, Y., Sugai, M., Kohada, A., Minagi, S. and Suginaka, H.: Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured epidermal cells during differentiation. *J. Med. Microbiol.* **32**, 9-14, 1990.
- 51) Rydén, C., Yaçoub, A.I., Maxe, I., Heinegård, D., Oldberg, Å., Franzén, A., Ljungh, Å. and Rubin, K.: Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *Eur. J. Biochem.* **184**, 331-336, 1989.
- 52) Herrmann, M., Suchard, S.J., Boxer, L.A., Waldvogel, F.A. and Lew, P.D.: Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. *Infect. Immun.* **59**, 279-288, 1991.

- 53) Liang, O.D., Ascencio, F., Fransson, L.-Å. and Wadström, T.: Binding of heparan sulfate to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **60**, 899-906, 1992.
- 54) Armstrong, J.J., Baddiley, J., Buchanan, J.G., Davison, A.L., Kelemen, M.V. and Neuhaus, F.C.: Teichoic acids from bacterial walls. *Nature* **184**, 247-249, 1959.
- 55) Harrington, C.R. and Baddiley, J.: Biosynthesis of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* H, *Micrococcus varians* and *Bacillus subtilis* W23; Involvement of lipid intermediates containing the disaccharide *N*-acetylmannosaminyl *N*-acetylglucosamine. *Eur. J. Biochem.* **153**, 639-645, 1985.
- 56) 関口清俊: 10 がん細胞とフィブロネクチン; 細胞認識と動物レクチン (大沢利明編). 講談社, 東京, 194-242, 1982.
- 57) Peehl, D.M. and Stanbridge, E.J.: Characterization of human keratinocyte × HeLa somatic cell hybrids. *Int. J. Cancer* **27**, 625-635, 1981.
- 58) Morgan, J. and Garrod, D.: HeLa cells form focal contacts that are not fibronectin dependent. *J. Cell Sci.* **66**, 133-145, 1984.
- 59) Doyle, R.J., McDannel, M.L., Streips, U.N., Birdsell, D.C. and Young, F.E.: Polyelectrolyte nature of bacterial teichoic acid. *J. Bacteriol.* **118**, 606-615, 1974.
- 60) Lambert, P.A., Hancock, I.C. and Baddiley, J.: The interaction of magnesium ions with teichoic acid. *Biochem. J.* **149**, 519-524, 1975.