

Candida albicans の変性 I 型コラーゲンへの付着に関する研究

玉 上 真 美

Adhesion of *Candida albicans* to denatured type I collagen

Mami Tamagami

(平成11年1月11日受付)

緒 言

Candida albicans は酵母様真菌の一つであり、哺乳類において常在微生物叢を形成することが知られている¹⁾。また *C. albicans* は多くの化学療法剤に対して本質的な耐性があるため本菌による感染症は難治性疾患の一つとして重要視されている。

補綴領域においては、*C. albicans* と義歯性口内炎の関連が Cahn (1936)²⁾ により報告されて以来、*C. albicans* は義歯性口内炎の起炎菌として知られてきた。加えて、近年 *C. albicans* は象牙質齲蝕や根面齲蝕^{1,3)} あるいは重篤な歯周病^{4,5)} に罹患している病巣からも高頻度に分離されることが報告されるようになってきた。また一方で、根面齲蝕あるいは歯周病の罹患とオーバードンチャーやパーシャルデンチャーの装着との有意な関連も報告されている⁶⁻⁹⁾。これらの報告から *C. albicans* が象牙質齲蝕や根面齲蝕あるいは歯周病に関与している可能性が高いことが示唆されている¹⁰⁾。

一般に、プラーク形成は微生物の被着体への付着、増殖、凝集、バイオフィルム形成の過程を経ることが知られており¹¹⁾、なかでも初期付着は重要な一過程である。これまでに歯質の無機質成分であるハイドロキシapatite^{12,13)}、象牙質の主たる有機質成分でありまた歯周組織にも含まれている I 型コラーゲン¹⁴⁻¹⁷⁾、歯周組織の成分であるフィブロネクチン¹⁴⁻¹⁸⁾、ラミニン¹⁵⁻²⁰⁾、IV 型コラーゲン¹⁵⁻¹⁸⁾ に対する *C. albicans* の付着について検討が行われてきた。しかし、象牙質齲蝕や根面齲蝕の

病巣内あるいは歯周病に罹患した組織では、種々の程度で変性や傷害を受けているコラーゲンなどの有機質成分が存在していると考えられる。そこで本研究では象牙質、セメント質、歯周組織のいずれにも多く含まれている I 型コラーゲンを熱変性させゼラチンを調製し、このゼラチンを変性コラーゲンモデルとして用い、ゼラチンに対する *C. albicans* の付着機構について検討を行った。

古くより上皮細胞^{21,22)} やプラスチックあるいはレジン²³⁻²⁵⁾ に対する *C. albicans* の付着には細胞壁成分であるマンナン^{26,27)}、マンノプロテイン^{14,28,29)}、キチン³⁰⁻³²⁾ などの付着素の関与が報告されてきた。しかし近年になり細胞外マトリックスや血管内皮細胞などに対する *C. albicans* の付着に関して、体細胞におけるインテグリンの研究と同様にインテグリン様タンパクの関与が報告されている³³⁻³⁷⁾。そこで本研究ではゼラチンに対する *C. albicans* の付着にインテグリン様タンパクが関与していると仮説をたて以下の検討を行った。

実験材料ならびに方法

I. 被験菌株

付着実験には主として *Candida albicans* GDH 16 を用いた。その他の被験菌株として *C. glabrata* IFO 1407, *C. tropicalis* IFO 1362, *Streptococcus mutans* OMZ175, *S. mutans* NTCC10449, *Actinomyces* #NHG127NRS 及び *Lactobacillus* #SE62D3 を用いた。IFO 株は財団法人発酵学研究所 (大阪) より購入したものであり、GDH 株、*Lactobacillus* 及び *Actinomyces* は香港大学口腔生物部より供与を受けた。また *S. mutans* 2 菌株は本学小児歯科学講座より供与されたものである。

II. 前培養及び菌液の調整

Candida 3 菌株は 250 mM グルコース含有イーストナイトロジェンベース (Difco, USA) 中で一昼夜前培

広島大学歯学部歯科補綴学第二講座 (主任: 濱田泰三教授)

主な略語: Gly, glycine; Arg, arginine; Asp, aspartic acid; Ser, serine; Pro, proline; Thr, threonine; Glu, glutamic acid

養した後、バッチ培養を行った。対数増殖期後期に遠心により集菌後、3回洗浄し、血球計算盤により菌液の濃度を 1.0×10^6 cells/ml となるように調整し実験に用いた。なお菌の洗浄、菌液の調整にはハンクスバランスソルト溶液 (HBSS) (Bio Whittaker, USA) を用いた。

S. mutans はイーストエキス (Difco) を添加したトリプティックソイブロス (Difco) にて、*Actinomyces* 及び *Lactobacillus* はブレインハートインフュージョンブロス (Difco) にて前培養を行い吸光度計により $OD_{660} = 0.300$ に調整した後、最終濃度を 1.0×10^6 cfu/ml とした。

Ⅲ. 発芽管形成

発芽管形成によるゼラチンに対する付着量の影響を検討するために以下の手順で発芽管形成を行った。前培養した *C. albicans* を回収、洗浄した後メディウム 199 (三光純薬株式会社, 東京) 中で 37°C にて2時間培養し発芽管形成を行った。光学顕微鏡下にて異なる3視野の発芽管細胞数の全細胞数に対する比を求めたところ $52.1 \pm 3.0\%$ の発芽管形成を確認した。HBSS を用いて洗浄後、HBSS にて 1.0×10^6 cells/ml に調整し以下の付着実験に用いた。

Ⅳ. タンパク分解酵素処理

菌体のタンパク分解酵素による前処理は Lee と King (1983)²⁶⁾ の方法に従った。タンパク分解酵素溶液として 0.4 mM トリプシン含有 0.01 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 8.0$) と $3 \mu\text{M}$ パバイン, 5 mM システインおよび 2 mM EDTA 含有 10 mM リン酸緩衝液 ($\text{pH } 8.0$) を用いた。*C. albicans* をタンパク分解酵素溶液 2 ml に添加し、最終濃度 1.0×10^9 cells/ml に調整した後、 37°C にて60分間インキュベートした。HBSS にて3回洗浄後、 1.0×10^6 cells/ml に調整し以下の付着実験に用いた。

Ⅴ. 付着実験

1. ATP (アデノシン三リン酸) 法による定量

タンパク溶液としてウシ真皮由来 I 型コラーゲン (フナコシ, 東京), ゼラチン (I 型コラーゲンを 100°C で5分間煮沸し変性させたもの), ウシ血清由来フィブロネクチン (フナコシ) を用いた。直径 13 mm のニトロセルロースメンブラン (孔径 $0.45 \mu\text{m}$, アドバンテック社, 東京) を 10 mM リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) (含 Ca^{2+} , Mg^{2+}) で希釈した各タンパク溶液で 4°C にて18時間タンパク吸着処理を行った。メンブランに吸着していない余剰のタンパクを PBS にて洗浄除去後、24穴培養皿の底面に置いた。菌液 $200 \mu\text{l}$ をメンブラン上に接種し、 37°C にて30分間インキュベートし菌付着を行った。その後メンブランを各培養皿より取り出し PBS にて3回洗浄することにより付着していない

菌を除去した。ベンザルコニウムを主成分とする抽出試薬 (AF-2K1, 東亜電波工業株式会社, 東京) を 1 ml 添加し、30分間室温に静置し細胞内 ATP の抽出を行った。各抽出液の ATP 量を ATP-アナライザー (AF-100, 東亜電波工業株式会社) を用いて計測した。

2. 走査型電子顕微鏡による観察

直径 1 cm , 厚さ 4 mm のガラス板を24穴培養皿上に置き、 $10 \mu\text{g/ml}$ のゼラチンを $200 \mu\text{l}$ 添加し、 4°C で18時間吸着処理を行った。PBS で洗浄することにより余剰なタンパクを除去した後、同様の付着実験を行った。すなわち 1.0×10^6 cells/ml に調整した菌液を $200 \mu\text{l}$ 接種し、 37°C にて30分間インキュベートした。ガラス板を培養皿より取り出し PBS にて3回洗浄することにより付着していない菌を除去した。試料は 4% グルタルアルデヒドにより 4°C で24時間浸漬固定を行った。その後滅菌蒸留水で3回洗浄した後、エタノール上昇系列 (30% , 50% , 70% , 100% のエタノール) にて脱水後、さらに 100% 第3ブチルアルコール (ナカライテスク株式会社, 京都) に15分間浸漬しエタノールを置換し、凍結乾燥 (JFD-300, Joel, 東京) を行った。さらに厚さ $15\text{--}20 \text{ nm}$ の金コーティング (JEC-550, Joel, 東京) を行い、通法に従い電子顕微鏡 (SEM) (JMS-6300, Joel) を用いて付着の状態を観察した。

3. 表面プラズモン共鳴装置による検討

表面プラズモン共鳴装置 (SPR) (日本レーザー電子株式会社, 名古屋) 付属のガラス面に金蒸着を行ったセンサチップを $10 \mu\text{M}$ 4,4-ジチオジブチル酸エタノール溶液に浸漬し、センサチップ上へ Self-Assembly 膜 (SA 膜) を形成した。 0.2 M の N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドと 0.05 M の N-ヒドロキシサクシニミドを 90% 1,4-ジオキサンに溶解させた溶液中に浸漬して SA 膜の活性化を行った。SPR に活性化したセンサチップを装着し、共鳴角の変化をモニタリングすることによりゼラチンに対する *C. albicans* の結合を検討した。

Ⅵ. 付着阻害実験

RGD 配列を含む生理活性ペプチドとして Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP), Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Pro (GRGDTP), Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) (バクケム社, スイス), コントロールペプチドとして Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro (GRGESP), Gly-Arg-Gly-Glu-Thr-Pro (GRGETP), Arg-Gly-Glu-Ser (RGES) (バクケム社) を用いた。*C. albicans* を 1.0×10^6 cells/ml に調整した菌液を最終濃度 1 mg/ml の各ペプチド共存下にて 37°C で15分間ブレインキュベートした後、ATP 法と SPR 法により付着阻害の検討を行った。

結 果

I. *C. albicans* のゼラチンに対する付着 まずゼラチンに対する *C. albicans* の付着に与える付

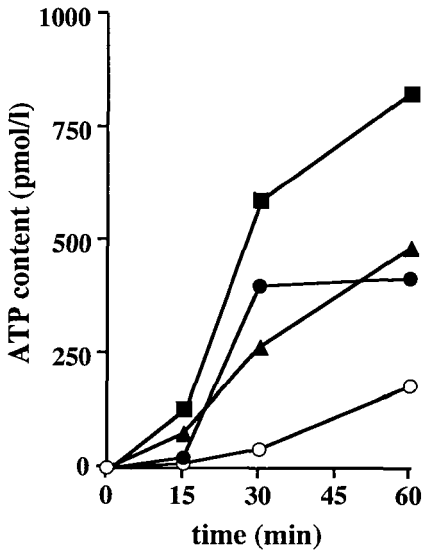


図1 付着時間の影響。
10 $\mu\text{g/ml}$ の各タンパク溶液 (○: control, ●: gelatin, ■: collagen, ▲: fibronectin) をメンブタンに吸着処理した場合の各付着時間に対する ATP 量を示す。

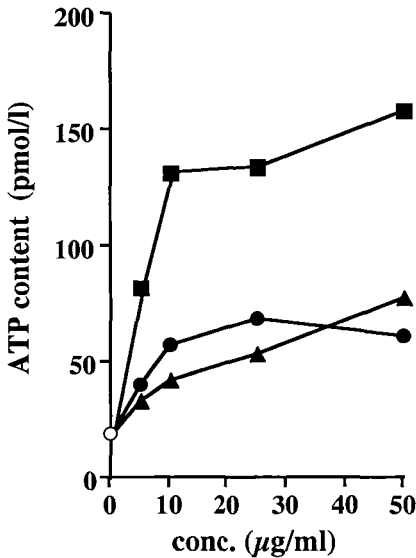


図2 タンパク溶液の濃度の影響。
各タンパク溶液 (○: control, ●: gelatin, ■: collagen, ▲: fibronectin) をメンブタンに吸着処理し、付着時間を30分とした場合の ATP 量を示す。

着時間の影響の検討を行った。菌接種後15-60分の範囲で経時的な付着菌数の増加を認めた (図1)。コラーゲン、フィブロネクチンに対する付着菌数はゼラチンと比較して特に経時的な増加傾向が強く認められた (図1)。次に、メンブタンのタンパク処理濃度の影響について検討を行った。付着時間30分では *C. albicans* のゼラチンに対する付着菌数はタンパク処理溶液の濃度5-50 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で濃度依存的に増加した (図2)。コラーゲン、フィブロネクチンについても同様に処理濃度依存的な付着菌数の増加がみられた (図2)。次に、タンパク溶液の濃度を10 $\mu\text{g/ml}$ 、インキュベートの時間を30分とし、pHの影響について検討した。緩衝液のpHを4.5-8.5に変化させたところ、中性領域においてゼラチンに対する最大の付着菌数を認めた (図3-A)。またコラーゲン、フィブロネクチンについても同様の傾向を認め、中性領域において最大の付着菌数を示した (図3-B, C)。したがって以下の付着実験はタンパク溶液の濃度を10 $\mu\text{g/ml}$ 、インキュベートの時

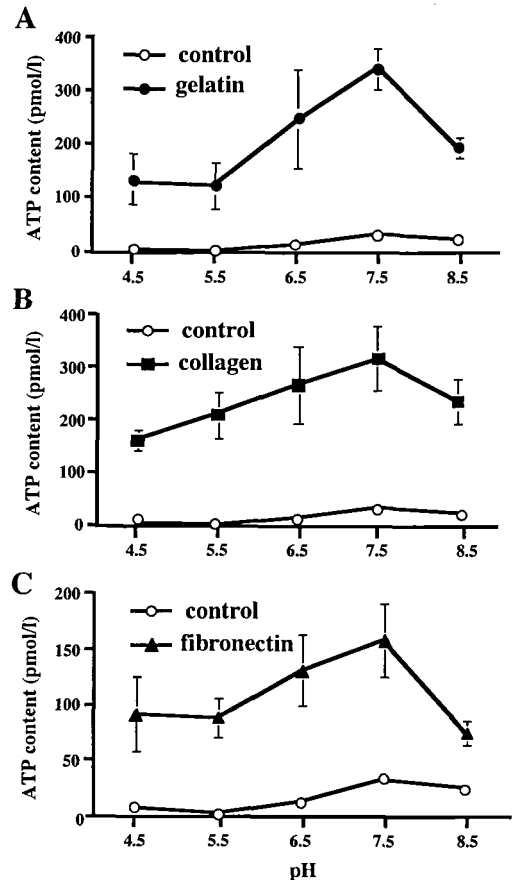


図3 pHの影響。
各数値は3穴の平均値 \pm SDを示す。

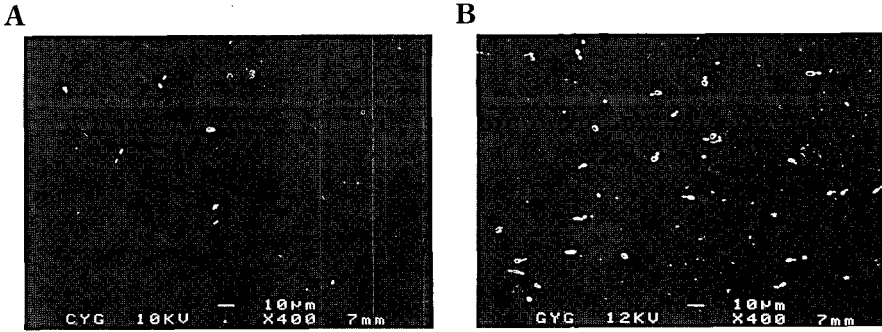


図4 ゼラチンに対する *C. albicans* の付着。
 A: コントロールガラス
 B: ゼラチンを吸着処理したガラス

間を30分、緩衝液の pH を 7.5 として行った。

次に SEM を用いて *C. albicans* のゼラチンに対する付着の検討を行った。*C. albicans* はゼラチンで処理したガラスには多くの菌が付着したが、コントロールのガラスにはほとんど付着していなかった (図 4-A, B)。

図 5 に SPR 法により *C. albicans* のゼラチンに対する付着能の検討を行った結果を示す。活性化させた SA 膜に 100 µg/ml のゼラチン 100 µl を添加したところ共鳴角の増加がみられた (図 5-①)。HBSS による洗浄後 (図 5-②) 1 mg/ml のウシ血清アルブミン (BSA) (片山化学工業株式会社, 大阪) 100 µl を添加しブロッキングを行ったところ共鳴角の変化は認めなかった (図 5-③-④)。HBSS による洗浄後, 1.0×10^7 cells/ml に

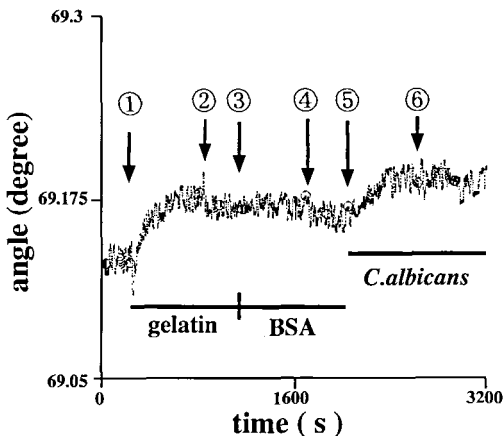


図5 ゼラチンに対する *C. albicans* の付着。

- ①ゼラチン添加 (100 µg/ml)
- ②HBSS による洗浄
- ③BSA によるブロッキング
- ④HBSS による洗浄
- ⑤ *C. albicans* (10^8 cells/ml) による添加
- ⑥HBSS による洗浄

調整した *C. albicans* 100 µl の接種により共鳴角の増加がみられ (図 5-⑤-⑥), この増加はHBSSによる洗浄によって消失せず (図 5-⑥), ゼラチンに対する *C. albicans* の結合が起こっていることが示された。

II. 他菌との比較

7種類の菌すなわち, *C. albicans* GDH16, *C. glabrata* GDH1407, *C. tropicalis* IFO1362, *S. mutans* OMZ175, *S. mutans* NTCC10449, *Actinomyces* #NHG127NRS 及び *Lactobacillus* #SE62D3 の各タンパクに対する付着能を ATP法を用いて計測し比較検討した。図 6 にそれぞれの菌のコントロールメンブランに対する付着を 1とした場合の各タンパクによる付着増加の割合を示す。7菌株の中で *C. albicans* はゼラチン, コラーゲン, フィブロンネクチンいずれのタンパクに対しても付着比は最大であった。一方 *C. glabrata*と *C. tropicalis* はコントロールメンブランと比較して各タンパクによる付着能の増加を認めなかった。また *S. mutans* はコントロールメンブランと比較し, コラーゲンまたフィブロンネクチンによって 2菌株とも約 2 倍の付着能増加を示したが, ゼラチンによる付着能の増加は認めなかった。*Actinomyces* はコントロールメンブランと比較してコラーゲンにより約 3 倍, フィブロンネクチンにより約 4.5 倍の付着能を示したが, ゼラチンによる付着能の増加は認めなかった。*Lactobacillus* はいずれのタンパクに対してもコントロールメンブランと比較して付着能の増加を認めなかった。

III. 付着に影響すると考えられる因子の検討

C. albicans のゼラチンに対する付着にインテグリン様タンパクが関与していると仮説をたて, 以下の因子について付着に対する影響の検討を行った。

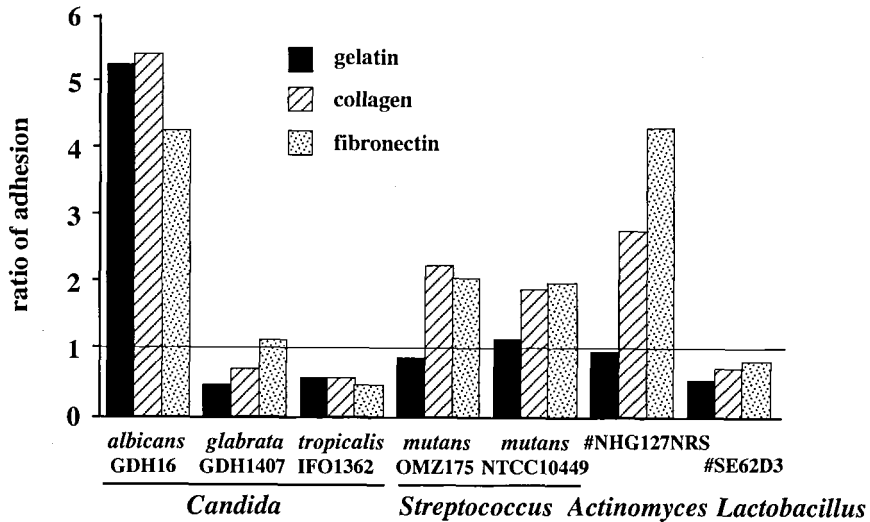


図6 各菌株における付着の割合。

各菌株のコントロールメンブランに対する付着量を1としたときの各タンパク溶液を吸着処理したメンブランに対する付着の割合を示す。

1. 温度

体細胞の場合 37°C でみられるインテグリンを介した接着が 4°C ではみられないという報告がある³⁸⁾。そこで、37°C と 4°C で付着実験を行った場合の付着を比較検討した。37°C では *C. albicans* のゼラチンに対する付着能が認められたが 4°C ではその付着能は有意に減少した (図7)。コラーゲンに対する付着能についても同様の傾向を認めた。フィブロネクチンに対しては 4°C における付着菌数は 37°C と比較して約50%に減少した。

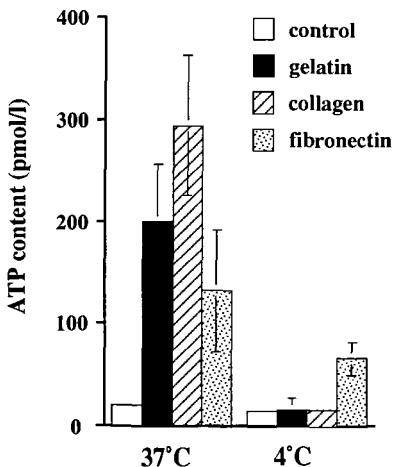


図7 付着温度の影響。

各数値は3穴の平均値 ± SD を示す。

2. 添加糖

以前の研究において、前培養時にイーストナイトロジェンベースに高濃度のガラクトースを添加することによって菌体表層の付着素が増加することが報告されている^{34,39,40)}。そこで *C. albicans* のゼラチンに対する付着に与える添加糖の影響について検討した。添加糖として、それぞれ 250 mM グルコース、ガラクトース及びスクロースを用いた。図8に示すように、ガラクトースを前培養時に添加糖として用いた場合にゼラチンに対する付着菌数は最大値を示した。またコラーゲン、フィブロネクチンに対しても同様にガラクトースを用いた場合に最大の付着菌数を示した (図8)。

3. 2価金属イオン

インテグリンが2価の金属イオン要求性であることから⁴¹⁾、カルシウムイオンまたはマグネシウムイオンがゼラチンに対する *C. albicans* の付着能に与える影響を検討した。一連の付着実験に用いた HBSS には 1.41 mM のカルシウムイオンと 0.81 mM のマグネシウムイオンが含まれていたが、2価金属イオンの影響を検討するためにカルシウムイオンとマグネシウムイオンを含まない HBSS と、これに 2 mM のカルシウムイオンまたはマグネシウムイオンを添加した HBSS を用いて菌液を調整し同様の付着実験を行った。図9-Aに示すように *C. albicans* のゼラチンに対する付着菌数はカルシウムイオンの添加によりカルシウムイオン非存在下における付着菌数の約7倍に増加した。同様にコラーゲンに対しては約2倍、フィブロネクチンに対し

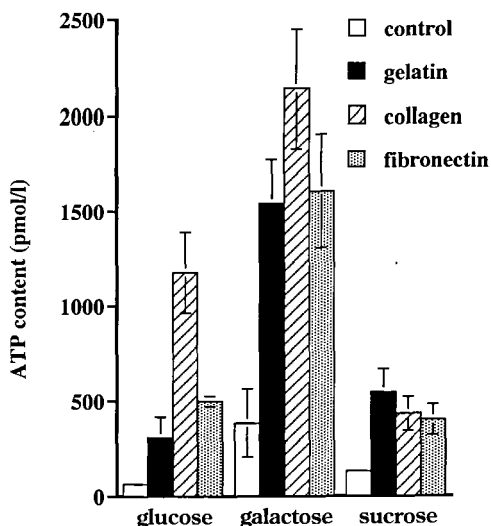


図8 培養糖の影響。
250 mM グルコース、ガラクトースあるいはスクロース含有 YNB 培地中で前培養した *C. albicans* を用いて付着実験を行った。各数値は 3 穴の平均値 ±SD を示す。

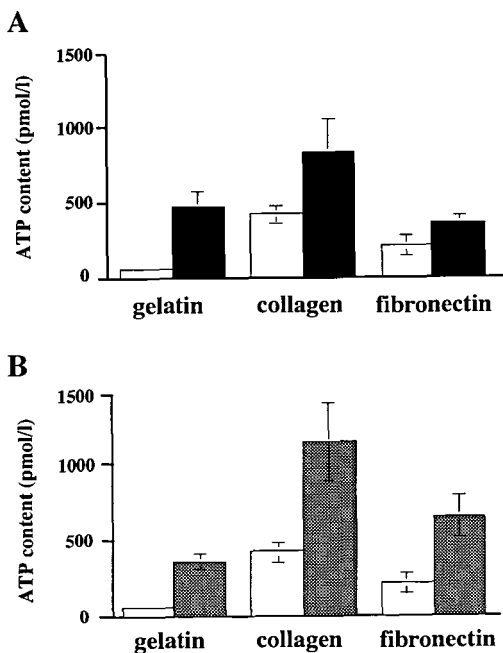


図9 カルシウムイオンあるいはマグネシウムイオンの影響。
カルシウムイオンとマグネシウムイオン非含有の HBSS (□), カルシウムイオン (2mM) を添加した HBSS (■) あるいはマグネシウムイオン (2mM) を添加した HBSS (▨) 中で付着実験を行った場合の ATP 量を示す。各数値は 3 穴の平均値 ±SD を示す。

ては約1.5倍の付着菌数の増加が認められた (図9-A)。また図9-B に示すようにマグネシウムイオンの添加によりゼラチンに対する付着菌数はマグネシウムイオン非存在下における付着菌数の約6倍に増加した。同様にコラーゲンに対しては約2.5倍、フィブロネクチンに対しては約3倍に増加した (図9-B)。

4. タンパク分解酵素処理

インテグリンが膜タンパク質であること⁴²⁾ から、タンパク分解酵素であるトリプシンとパパインで菌体を前処理し、その付着への影響を検討した。なお、酵素処理細胞と未処理細胞の間で1細胞あたりのATP量には有意な差を認めなかった。図10に示すようにトリプシンの菌体処理によりゼラチンに対する *C. albicans* の付着菌数は酵素未処理細胞の約12%に減少した。同様にコラーゲンに対しては約11%、フィブロネクチンに対しては約13%に減少した (図10)。またパパインによる菌体処理によりゼラチンに対する付着菌数は酵素未処理細胞の約20%、コラーゲンに対しては約13%、フィブロネクチンに対しては約25%まで減少した (図10)。

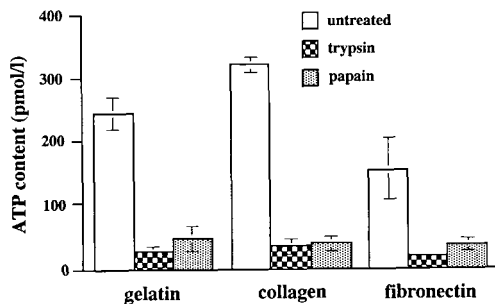


図10 トリプシンあるいはパパインの影響。
0.4 mM トリプシン (▣) あるいは 3 μM パパイン (▤) で 37°C にて60分間前処理した *C. albicans* を用いて付着実験を行った。各数値は 3 穴の平均値 ±SD を示す。

5. 発芽管形成

発芽管形成に伴いインテグリン様タンパクの発現が増加するという報告があることから³⁶⁾、発芽管形成に伴うゼラチンに対する付着能の変化をSEMにより観察した。図11に示すように酵母型に比べ発芽管ではゼラチンに対してより多くの菌の付着を認めた。またATP法による定量においても発芽管のゼラチンに対する付着菌数は酵母型の約40倍であった (図11)。

IV. RGD ペプチドを用いた付着阻害実験

RGD ペプチドにより *C. albicans* のフィブロネクチンに対する付着が阻害されることが報告されてお

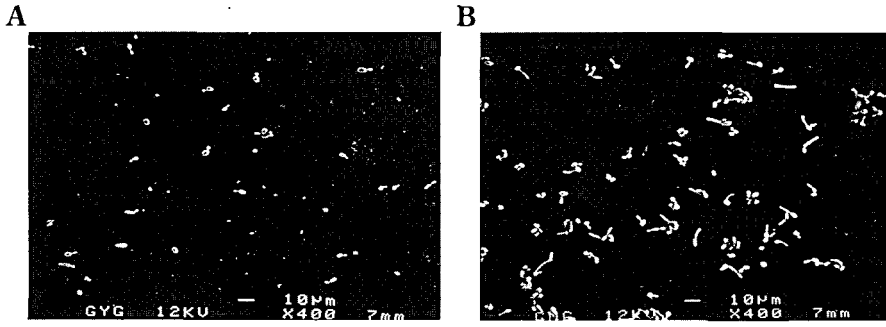


図11 ゼラチンに対する *C. albicans* の付着における発芽管形成の影響。
 A: 酵母型を用いて付着実験を行った場合、ATP量は $64.5 \pm 15.1 \times 10^{-3}$ pmol/filterであった。
 B: TC199を用いて発芽管を形成させた *C. albicans* を用いて付着実験を行った場合、ATP量は $2633.3 \pm 75.4 \times 10^{-3}$ pmol/filterであった。

り^{35,36,43}，一方ではゼラチンもフィブロネクチン同様に RGD 配列を有していることが報告されている^{16,17}。このためゼラチンに対する *C. albicans* の付着能が RGD ペプチドにより影響される可能性があり，この点を ATP 法と SPR 法を用いて検討した。

まず図 12-A に ATP 法による結果を示す。GRGDSP 添加によりペプチド非添加のコントロールに比べゼラチンへの付着菌数は有意に減少した。一方コントロールペプチドとして用いた GRGESP を添加した場合，ペプチド非添加のコントロールの付着菌数との間に有意差は認められなかった。一方，コラーゲンに対する付着菌数は GRGDSP あるいは GRGESP 添加により増加した。図 12-B には GRGDTP 及びそのコントロールペ

プチドとして GRGETP を用いた場合の結果を示す。ペプチド非添加のコントロールに比べ，GRGDTP 添加によってゼラチンに対する付着は有意に減少した。一方コントロールペプチドである GRGETP を添加した場合，コントロールに対する付着との間に有意差は認められなかった。コラーゲンに対する付着では GRGDTP あるいは GRGETP いずれを添加しても有意な阻害はみられなかった。

次に SPR 法による検討を行った。RGDS ペプチド存在下で *C. albicans* を接種した場合の結果を図 13-A に示す。はじめに活性化した SA 膜に 100 μg/ml のゼラチンを 100 μl 添加すると，共鳴角は変化しその変化は HBSS による洗浄により消失しないことを確認した。

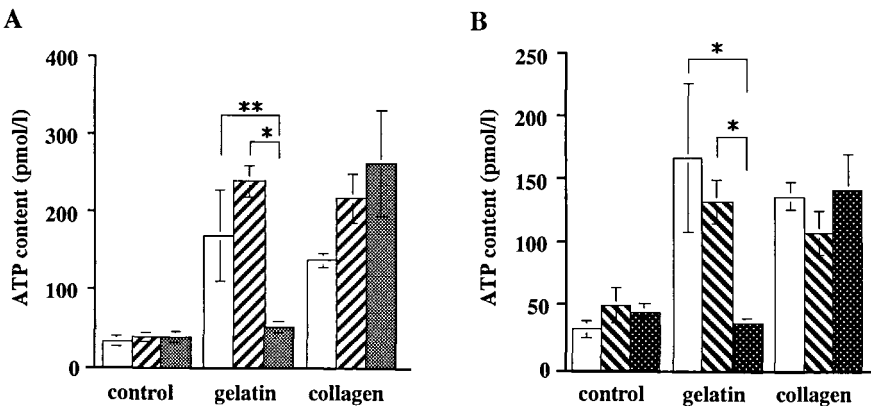


図12 合成ペプチドの影響。
 合成ペプチド非添加 (□: control), 1 mg/ml のコントロールペプチド添加 (▨: GRGESP, ▩: GRGETP), 1 mg/ml の RGD ペプチド添加 (▣: GRGDSP, ▤: GRGDTP) の条件で *C. albicans* を 37°C にて15分間ブレインキュベートしたのち，付着実験を行った。
 各数値は3穴の平均値 ±SD を示す。

* : (p<0.05) ** : (p<0.1)

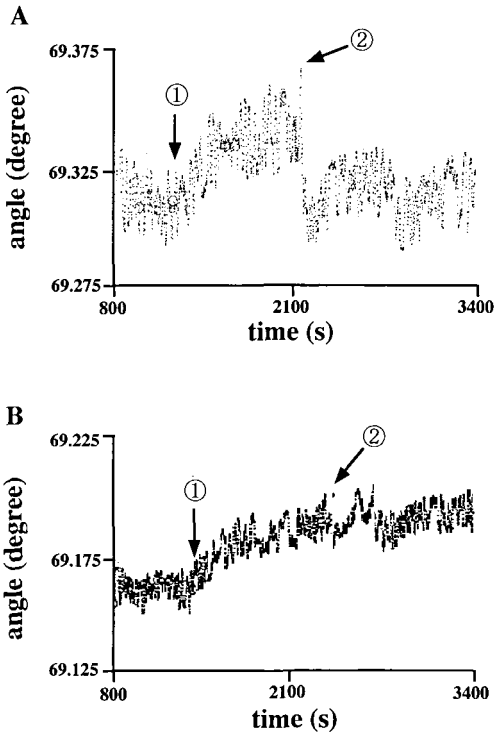


図13 合成ペプチドの影響 (SPRを用いて)。

SA膜上にゼラチンを結合させたのち、RGDSペプチドとともに *C. albicans* を添加し (A-①)、HBSSを用いて洗浄した (A-②)。

同様にSA膜上にゼラチンを結合させたのち、コントロールペプチドとして用いたRGESペプチドとともに *C. albicans* を添加し (B-①)、HBSSを用いて洗浄した (B-②)。

さらにRGDSペプチド存在下で *C. albicans* を接種した場合 (図13-A-①)、共鳴角の変化はみられたが洗浄により完全に消失した (図13-A-②)。次にRGDSペプチドに対するコントロールペプチドとしてRGESペプチドを用いた結果を図13-Bに示す。はじめに活性化したSA膜に100 µg/mlのゼラチンを100 µl添加すると、共鳴角は変化しその変化はHBSSによる洗浄により消失しないことを確認した。RGESペプチド存在下で *C. albicans* を接種した場合 (図13-B-①)、共鳴角の変化がみられ、その変化は洗浄により消失しなかった (図13-B-②)。

考 察

他菌と比較した結果、*C. albicans* はゼラチンに対して特異的に付着していることが明らかとなった。*C. glabrata* と *C. tropicalis* は、レジン上でのバイオフィルム形成量が *C. albicans* について多い⁴⁴⁾ にもかかわらず

ず、ゼラチンには付着しないことは、義歯性口内炎にみられる *Candida* 属の病原性と象牙質齲蝕や歯周病にみられる *Candida* 属の病原性の間の違いに関連していると推察される。また齲蝕病原菌として知られる *S. mutans*⁴⁵⁾ に関してはこれまでの報告どおりI型コラーゲン^{46, 47)} やフィブロネクチン⁴⁸⁻⁵⁰⁾ に対する付着が認められた。また根面齲蝕との関連が報告されている *Actinomyces*⁴⁵⁾ に関してはこれまでの報告どおりI型コラーゲン^{51, 52)} に対する付着が認められたが、フィブロネクチン⁵³⁻⁵⁵⁾ に対する付着の結果は過去の報告とは一致しなかった。ゼラチンに対しては *S. mutans*, *Actinomyces* ともに必ずしも特異的な付着を起さないことが示唆された。*Lactobacillus* に関してはI型コラーゲン⁵⁶⁻⁵⁸⁾ やフィブロネクチン^{59, 60)} に対する付着が報告されているが、本実験ではゼラチンと同様にいずれのタンパクに対しても特異的な付着を認めなかった。この理由として、一般に付着は菌種・菌株に依存性であるためと考えられるが、この点についてはさらに菌株を増やして検討する必要があると思われる。

体細胞の場合、インテグリンを介した接着が37°Cでは認められるが4°Cでは認められないという報告がある³⁸⁾。本実験結果においてもゼラチンあるいはI型コラーゲンに対する菌の付着は37°Cでは認められたが4°Cでは有意に減少した。フィブロネクチンに対しては4°Cにおける付着菌数は37°Cにおける付着量の約50%に減少した。これらの結果より *C. albicans* のタンパクに対する付着能には温度に依存する付着機構が関与していることが示唆され、この付着にはインテグリン様タンパクが関与していることが推測された。またゼラチンあるいはI型コラーゲンとフィブロネクチンの間で付着菌数の減少の割合が異なる点については、Klotzら(1991)⁴³⁾ が *C. albicans* のフィブロネクチンに対する付着には複数のレセプター(菌体タンパク)が発現していると報告していることから、各タンパクに対する付着機構の相違によるものと考えられる。

これまでに *C. albicans* に与える培養時の添加糖の影響に関していくつか報告されている^{34, 39, 40, 61)}。McCourtieとDouglas(1984)³⁹⁾ はさまざまな炭素源を培養液に添加したところ活動性の感染者から採取した株はガラクトースによりアクリリックレジンと上皮細胞に対する付着量が最も増加したと報告している。このように培養時にガラクトースを添加した場合、細胞やプラスチックに対する付着、すなわち細胞壁の最外層に認められる線維状あるいはケバ状構造が増加することが報告されており³⁴⁾、また付着や凝集などとも関連のある菌体表面の疎水性が増加することも報告されている⁴⁰⁾。本実験の結果でもガラクトースにより最大の付着菌数

が認められた。しかしタンパクを吸着させていないコントロールメンブランにおいてもガラクトースにより付着菌数が同程度まで増加したため、培養時の添加糖の影響に関してはタンパクに対する特異的な付着の増加ではなく菌体表面のケバ状構造の発現などに伴う付着能の増加が起こったものと考えられる。

インテグリンとリガンドの相互作用は2価金属イオンに依存していることが知られている⁴¹⁾。これまでのところ *C. albicans* のインテグリン様タンパクについて2価金属イオンの影響を検討した報告はない。しかし *C. albicans* の α M あるいは α X インテグリン様タンパク (α INT1) には2価金属イオン結合ドメインが存在することはすでに報告されているので⁶²⁾、おそらく体細胞インテグリン同様に2価金属イオンの影響を受けるであろうと推測して、カルシウムイオンとマグネシウムイオンが付着能に与える影響を検討した。今回の結果ではマグネシウムイオンまたはカルシウムイオンの添加はゼラチン、I型コラーゲン、フィブロネクチンのいずれに対する付着をも促進した。データには示さないが、1.41 mM のカルシウムイオンと 0.81 mM のマグネシウムイオンが含まれている標準の HBSS に対して 5 mM の EDTA を添加した場合、ゼラチンに対する付着能は逆に $39.7 \pm 8.6\%$ まで減少した。このことより *C. albicans* のゼラチンに対する付着には2価の金属イオン要求性の付着機構が関与していることが示唆された。本実験の結果と類似して、これまでに Klotz ら (1993)⁶³⁾ によって I 型コラーゲンとフィブロネクチンに対する *C. albicans* の付着にカルシウムイオン依存性の糖タンパクが関与していることが報告されている。この一方で2価の金属イオンはマイナスに帯電した真菌とプラスチックの表面にイオン架橋を形成することが報告されている^{23, 64, 65)}。したがって2価の金属イオンを要求する付着にはインテグリン様タンパクのような糖タンパクを介した特異的付着だけでなくイオン架橋のような非特異的付着も関与していることが考えられる。

タンパク分解酵素としてトリプシンとパパインを用い菌体の前処理を行った場合、ゼラチン、I型コラーゲン、フィブロネクチンに対する付着能は有意に減少した。このことよりゼラチン、I型コラーゲン、フィブロネクチンに対する付着には *C. albicans* の菌体タンパクの関与が考えられる。これと一致して、Lee と King (1983)²⁸⁾ は *C. albicans* をタンパク分解酵素 (トリプシン、サブチリシン、プロナーゼ、キモトリプシン、パパイン) で処理することによりヒト上皮細胞への付着能が有意に減少することを報告している。また、唾液コートレジンに対する付着あるいは *C. albicans* とムチンなどの唾液タンパクの結合も菌体のタ

ンパク分解酵素処理によって有意に減少することが報告されている⁶⁶⁾。したがって *C. albicans* の菌体表面層タンパクが細胞やタンパクに対する付着と同様に、ゼラチンに対する付着においても重要な役割を果たしていると考えられる。

本実験の結果より、ゼラチンと *C. albicans* の結合にインテグリン様タンパクが関与していることが示唆された。インテグリンとは細胞膜に発現し、細胞と細胞外基質、あるいは細胞と細胞の接着に関与する糖タンパク質である。インテグリンは α 鎖と β 鎖が結合したヘテロダイマーを形成している。 α 鎖は2価金属結合ドメインを有しており両鎖に膜貫通ドメインが存在している。16種類の α 鎖と8種類の β 鎖が見いだされており、これらの組み合わせによりリガンド特異性が決定される⁶⁷⁾。Bendel ら (1993)³⁵⁾ は *C. albicans* に関して白血球インテグリンである α M あるいは α X インテグリン様タンパクの発現を報告している。それによると *C. albicans* は $67.8 \pm 1.7\%$ 、*C. tropicalis* は $32.0 \pm 2.6\%$ 、*C. glabrata* は $3.3 \pm 0.8\%$ の細胞にこのインテグリン様タンパクが発現しており、この発現は上皮細胞への付着との間に有意な相関があった。さらに α INT1 インテグリン遺伝子を単離し、 α INT1 を *Saccharomyces cerevisiae* と対応する *ste12* 変異体に強制発現させることにより発芽管形成が誘導された⁶²⁾。このように α INT1 は *C. albicans* の形態変化に関与していることが示唆されている。またこの一方で *C. albicans* に抗ヒト $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン抗体と反応するタンパクが発現し、その発現が発芽管形成とともに増加することが報告されている³⁶⁾。 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン様タンパクも形態変化に関与している可能性は考えられるので、発芽管形成と付着素の発現および病原性の増強メカニズムにこれらのインテグリン様タンパクは関与していると考えられる。

これまでに上皮細胞³⁵⁾ やフィブロネクチン³⁶⁾ に対する *C. albicans* の付着を RGD ペプチドが阻害することが報告されている。さらにゼラチンも RGD 配列を有していることが報告されているため¹⁷⁾、RGD ペプチドによるゼラチンに対する *C. albicans* の付着阻害実験を行った。その結果、ATP 法と SPR 法によりゼラチンに対する *C. albicans* の付着は RGD ペプチドにより特異的に阻害されることが示された。一方 I 型コラーゲンは RGD ペプチドにより特異的に阻害されなかった。これらの結果より、3本鎖ヘリックスである I 型コラーゲンに対する *C. albicans* の付着には RGD サイトが関与していないが、熱変性により高次構造が変化したゼラチンに対する付着には RGD サイトが関与していることが示唆された。体細胞においてもウサギ平滑筋細胞

と I 型コラーゲンあるいはゼラチンに対する付着が検討されている⁶⁸⁾。その結果、ゼラチンに対する付着は RGD ペプチドにより阻害され、I 型コラーゲンに対しては阻害されないという同様の現象が報告されている。

以上、本実験より得られた結果から *C. albicans* のゼラチンに対する付着はゼラチンの RGD サイトの認識が関与し、I 型コラーゲンに対する付着機構とは異なっていることが明らかとなった。また *C. albicans* のゼラチンへの付着能は、*C. albicans* の二次齲蝕や根面齲蝕への寄与に関与しているものと推察される。

結 論

1. *C. albicans* のゼラチンに対する付着は *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *S. mutans*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* に比べ特異的であった。

2. 37°C では *C. albicans* はゼラチンに付着し、4°C では付着しなかった。

3. カルシウムイオンまたはマグネシウムイオンの存在により *C. albicans* のゼラチンに対する付着能は増加した。

4. *C. albicans* のゼラチンに対する付着能は菌体のタンパク分解酵素処理により著しく減少した。

5. *C. albicans* のゼラチンに対する付着能は発芽管形成により増加した。

6. *C. albicans* のゼラチンに対する付着は RGD ペプチドにより阻害された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、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二講座濱田泰三教授に感謝致します。さらに論文作成上、御助言を賜りました本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授および本学口腔生化学講座加藤幸夫教授に深謝致します。また本研究遂行上御指導、御鞭撻を賜りました本学歯科補綴学第二講座二川浩樹講師および牧平清超博士に深謝致します。さらに本研究遂行上および本論文作成上御助言、御協力を頂きました本学歯科補綴学第二講座西村正宏博士、山城啓文先生、金辰先生、江草宏先生に心より感謝致します。また本研究遂行上御指導、御鞭撻を賜りました白求恩医科大学付属地方病研究所 Yan Weiqun 教授 (副所長)、本学口腔生化学講座能城光秀助教授、中舛和子博士、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所大宅芳枝博士、東京大学医学部整形外科科学講座来田吉弘先生に心より感謝致します。最後に本研究を進める際に多大なる御支援を頂いた本学歯科補綴学第二講座ならびに口腔生化学講座の教室員の方々に感謝致します。

- 1) 森 智昌：象牙質齲蝕における *C. albicans* の役割について。九州歯会誌 39, 588-600, 1985.
- 2) Cahn, L.R.: The denture sore mouth. *Ann. Dent.* 3, 33-36, 1936.
- 3) 小林やす子：酵母様真菌の口腔内分布。愛院大歯誌 11, 142-151, 1973.
- 4) Slots, J., Rams, T.E. and Listgarten, M.A.: Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 3, 47-52, 1988.
- 5) Rams, T.E. and Slots, J.: *Candida* biotypes in human adult periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 6, 191-192, 1991.
- 6) Ettinger, R.L.: Tooth loss in an overdenture population. *J. Prosthet. Dent.* 60, 459-462, 1988.
- 7) Budtz-Jørgensen, E.: Effect of controlled oral hygiene in overdenture wearers: a 3-year study. *Int. J. Prosthodont.* 4, 226-231, 1991.
- 8) Budtz-Jørgensen, E.: Prognosis of overdenture abutments in the aged: effect of denture wearing habits. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 20, 302-306, 1992.
- 9) Budtz-Jørgensen, E.: Effects of denture-wearing habits on periodontal health of abutment teeth in patients with overdentures. *J. Clin. Periodontol.* 21, 265-269, 1994.
- 10) Nikawa, H., Hamada, T. and Yamamoto, T.: Denture plaque -past and recent concerns-. *J. Dent.* 26, 299-304, 1998.
- 11) 浜田泰三, 二川浩樹：デンチャープラーク；デンチャープラーク。医歯薬出版株式会社, 東京, 55-64, 1991.
- 12) Cannon, R.D., Nand, A.K. and Jenkinson, H.F.: Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiol.* 141, 213-219, 1995.
- 13) Nikawa, H., Hamada, T., Yamashiro, H., Murata, H. and Subiwahjudi, A.: The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxylapatite beads. *J. Dent.* 26, 31-37, 1998.
- 14) Skerl, K.G., Calderone, R.A., Segal, E., Sreevalsan, T. and Scheld, W.M.: *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. *Can. J. Microbiol.* 30, 221-227, 1984.
- 15) Klotz, S.A.: Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 249-254, 1990.
- 16) Klotz, S.A. and Smith, R.L.: Glycosaminoglycans inhibit *Candida albicans* adherence to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 78, 205-208, 1992.
- 17) Klotz, S.A. and Smith, R.L.: Gelatin fragments

- block adherence of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins. *Microbiol.* **141**, 2681–2684, 1995.
- 18) Silva, T.M.J., Glee, P.M. and Hazen, K.C.: Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**, 117–122, 1995.
 - 19) Bouchara, J.P., Tronchin, G., Annaix, V., Robert, R. and Senet, J.M.: Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.* **58**, 48–54, 1990.
 - 20) Tronchin, G., Bouchara, J.P. and Robert, R.: Dynamic changes of the cell wall surface of *Candida albicans* associated with germination and adherence. *Eur. J. Cell Biol.* **50**, 285–290, 1989.
 - 21) Kimura, L.H. and Pearsall, N.N.: Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **21**, 64–68, 1978.
 - 22) Bailey, A., Wadsworth, E. and Calderone, R.: Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells: host-induced protein synthesis and signaling events. *Infect. Immun.* **63**, 569–572, 1995.
 - 23) McCourtie, J. and Douglas, L.J.: Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect. Immun.* **32**, 1234–1241, 1981.
 - 24) Samaranyake, L.P. and MacFarlane, T.W.: An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Archs. Oral Biol.* **25**, 603–609, 1980.
 - 25) Nair, R.G. and Samaranyake, L.P.: The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An *in vitro* study. *APMIS.* **104**, 339–349, 1996.
 - 26) Sandin, R.L., Rogers, A.L., Patterson, R.J. and Beneke, E.S.: Evidence for mannose-mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells *in vitro*. *Infect. Immun.* **35**, 79–85, 1982.
 - 27) Sandin, R.L.: The attachment to human buccal epithelial cells by *Candida albicans*: an *in vitro* kinetic study using concanavalin A. *Mycopathologia*, **98**, 179–184, 1987.
 - 28) Lee, J.C. and King, R.D.: Characterization of *Candida albicans* adherence to human vaginal epithelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* **41**, 1024–1030, 1983.
 - 29) Tronchin, G., Bouchara, J.P., Robert, R. and Senet, J.M.: Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. *Infect. Immun.* **56**, 1987–1993, 1988.
 - 30) Segal, E., Lehrer, N. and Ofek, I.: Adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells: inhibition by amino sugars. *Exp. Cell Biol.* **50**, 13–17, 1982.
 - 31) Segal, E., Gottfried, L. and Lehrer, N.: Candidal vaginitis in hormone-treated mice: prevention by a chitin extract. *Mycopathologia*, **102**, 157–163, 1988.
 - 32) Lehrer, N., Segal, E., Lis, H. and Gov, Y.: Effect of *Candida albicans* cell wall components on the adhesion of the fungus to human and murine vaginal mucosa. *Mycopathologia*, **102**, 115–121, 1988.
 - 33) Gustafson, K.S., Vercellotti, G.M., Bendel, C.M. and Hostetter, M.K.: Molecular mimicry in *Candida albicans*. Role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. *J. Clin. Invest.* **87**, 1896–1902, 1991.
 - 34) Fukazawa, Y. and Kagaya, K.: Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**, 87–99, 1997.
 - 35) Bendel, C.M. and Hostetter, M.K.: Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Identification of the participating ligands and development of inhibitory peptides. *J. Clin. Invest.* **92**, 1840–1849, 1993.
 - 36) Santoni, G., Gismondi, A., Liu, J.H., Punturieri, A., Santoni, A., Frati, L., Piccoli, M. and Djeu, J.: *Candida albicans* expresses a fibronectin receptor antigenically related to $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *Microbiol.* **140**, 2971–2979, 1994.
 - 37) Bendel, C.M., St Sauver, J., Carlson, S. and Hostetter, M.K.: Epithelial adhesion in yeast species: correlation with surface expression of the integrin analog. *J. Infect. Dis.* **171**, 1660–1663, 1995.
 - 38) Xia, Y., Gil, S.G. and Carter, G.: Anchorage mediated by integrin $\alpha 6 \beta 4$ to laminin 5 (epiligrin) regulates tyrosine phosphorylation of a membrane-associated 80-kD protein. *J. Cell Biol.* **132**, 727–740, 1996.
 - 39) McCourtie, J. and Douglas, L.J.: Relationship between cell surface composition, adherence, and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **45**, 6–12, 1984.
 - 40) Hobden, C., Teevan, C., Jones, L. and O'Shea, P.: Hydrophobic properties of the cell surface of *Candida albicans*: a role in aggregation. *Microbiol.* **141**, 1875–1881, 1995.
 - 41) Mould, A.P., Akiyama, S.K. and Humphries, M.J.: Regulation of integrin $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* **270**, 26270–26277, 1995.
 - 42) Tamkun, J.W., DeSimone, D.W., Fonda, D., Patel, R.S., Buck, C., Horwitz, A.F. and Hynes, R.O.: Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and

- actin. *Cell*, **46**, 271–282, 1986.
- 43) Klotz, S.A. and Smith, R.L.: A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J. Infect. Dis.* **163**, 604–610, 1991.
- 44) Nishimura, H.: Biofilm formation of *Candida* species on acrylic resin surfaces. Thesis, 広島大学, **35**, 1997.
- 45) 口腔感染症；歯学微生物学（口腔細菌学談話会編）。医歯薬出版株式会社，東京，406–441, 1996.
- 46) Switalski, L.M., Butcher, W.G., Caufield, P.C. and Lantz, M.S.: Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin. *Infect. Immun.* **61**, 4119–4125, 1993.
- 47) Wang, H.L., Yuan, K., Burgett, F., Shyr, Y. and Syed, S.: Adherence of oral microorganisms to guided tissue membranes: an *in vitro* study. *J. Periodontol.* **65**, 211–218, 1994.
- 48) Babu, J.P., Simpson, W.A., Courtney, H.S. and Beachey, E.H.: Interaction of human plasma fibronectin with cariogenic and non-cariogenic oral streptococci. *Infect. Immun.* **41**, 162–168, 1983.
- 49) Babu, J.P. and Dabbous, M.K.: Interaction of salivary fibronectin with oral streptococci. *J. Dent. Res.* **65**, 1094–1100, 1986.
- 50) Imai, S., Okahashi, N., Koga, T., Nisizawa, T. and Hamada, S.: Ability of various oral bacteria to bind human plasma fibronectin. *Microbiol. Immunol.* **28**, 863–871, 1984.
- 51) Winkler, J.R., John, S.R., Kramer, R.H., Hoover, C.I. and Murray, P.A.: Attachment of oral bacteria to a basement-membrane-like matrix and to purified matrix proteins. *Infect. Immun.* **55**, 2721–2726, 1987.
- 52) Liu, T., Gibbons, R.J., Hay, D.I. and Skobe, Z.: Binding of *Actinomyces viscosus* to collagen: association with the type 1 fimbrial adhesin. *Oral Microbiol. Immunol.* **6**, 1–5, 1991.
- 53) Lammler, C., Chhatwal, G.S. and Blobel, H.: Binding of alpha 2-macroglobulin and haptoglobin to *Actinomyces pyogenes*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 657–659, 1985.
- 54) Clark, W.B., Beem, J.E., Nesbitt, W.E., Cisar, J.O., Tseng, C.C. and Levine, M.J.: Pellicle receptors for *Actinomyces viscosus* type 1 fimbriae *in vitro*. *Infect. Immun.* **57**, 3003–3008, 1989.
- 55) Wikstrom, M. and Linde, A.: Ability of oral bacteria to degrade fibronectin. *Infect. Immun.* **51**, 707–711, 1986.
- 56) Roos, S., Aleljung, P., Robert, N., Lee, B., Wadstrom, T., Lindberg, M. and Jonsson, H.: A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system? *FEMS Microbiol. Lett.* **144**, 33–38, 1996.
- 57) McGrady, J.A., Butcher, W.G., Beighton, D. and Switalski, L.M.: Specific and charge interactions mediate collagen recognition by oral lactobacilli. *J. Dent. Res.* **74**, 649–657, 1995.
- 58) Aleljung, P., Shen, W., Rozalska, B., Hellman, U., Ljungh, A. and Wadstrom, T.: Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr. Microbiol.* **28**, 231–236, 1994.
- 59) Lindgren, S.E., Swaisgood, H.E., Janolino, V.G., Axelsson, L.T., Richter, C.S., Mackenzie, J.M. and Dobrogosz, W.J.: Binding of *Lactobacillus reuteri* to fibronectin immobilized on glass beads. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* **277**, 519–528, 1992.
- 60) Harty, D.W., Oakey, H.J., Patrikakis, M., Hume, E.B. and Knox, K.W.: Pathogenic potential of lactobacilli. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 179–189, 1994.
- 61) Hostetter, M.K., Lorenz, J.S., Preus, L. and Kendrick, K.E.: The iC3b receptor on *Candida albicans*: subcellular localization and modulation of receptor expression by glucose. *J. Infect. Dis.* **161**, 761–768, 1990.
- 62) Gale, C., Finkel, D., Tao, N., Meinke, M., McClellan, M., Olson, J., Kendrick, K. and Hostetter, M.: Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 357–361, 1996.
- 63) Klotz, S.A., Rutten, M.J., Smith, R.L., Babcock, S.R. and Cunningham, M.D.: Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. *Microb. Pathog.* **14**, 133–147, 1993.
- 64) Klotz, S.A., Drutz, D.J. and Zajic, J.E.: Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect. Immun.* **50**, 97–101, 1985.
- 65) Kennedy, M.J.: Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. *Curr. Top. Med. Mycol.* **2**, 73–169, 1988.
- 66) Nikawa, H. and Hamada, T.: Binding of salivary or serum proteins to *Candida albicans in vitro*. *Archs. Oral Biol.* **35**, 571–573, 1990.
- 67) 松浦成昭，加藤玲子，高田義一：インテグリン概論；Bio Science 用語ライブラリー細胞接着（宮坂昌之，矢原一郎編）。羊土社，東京，**80**, **81**, 1996.
- 68) Yamamoto, M., Yamato, M., Aoyagi, M. and Yamamoto, K.: Identification of integrins involved in cell adhesion to native and denatured type I collagens and the phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* **219**, 249–256, 1995.