

主論文題名

Fusobacterium nucleatum の赤血球凝集素の
局在および付着特性に関する研究

学位申請者 日野孝宗

原 著 論 文

原 稿 総 ペ ー ジ 数

5 7

図

1 2 (写 真 の 図 2 ,

4 , 6 お よ び 7 を 除 く)

写 真

4 (図 6 は 注 釈 の

一 部 を 別 紙 記 載)

表

3

別 刷 数

1 0 0

連 絡 先

日 野 孝 宗

(所 属) 広 島 大 学 歯 学 部 歯 科 保 存 学 第 二 講 座

(電 話 内 線 番 号 3224)

(住 所) 広 島 市 南 区 出 汐 一 丁 目 4 番 7 - 203号

(郵 便 番 号 730)

電 話 082(256)6321

表 題

Fusobacterium nucleatum の 赤 血 球 凝 集 素 の 局

在 お よ び 付 着 特 性 に 関 する 研 究

Fusobacterium nucleatum の赤血球凝集素の

局在および付着特性に関する研究

日野 孝宗

Study on Adherence Properties and Localization of

Fusobacterium nucleatum Hemagglutinin

Takamune Hino

(平成7年1月19日 受付)

緒言

歯周病は口腔内微生物の感染によって発症することが一般に認められている。その感染の成立には第一段階として微生物の宿主への付着が必要である。しかし口腔には、唾液や歯肉溝液中にムチン、IgA、リゾチームなどのさまざまな抗菌物質が存在するため^{1,2)}、口腔内微生物が病原性を発揮するには、このような防御因子に抵抗して定着しなければならな

い。

一方、宿主細胞表層への細菌の付着機構としては非特異的なものとして、静電氣的相互作用、疎水相互作用、水素結合など³⁻⁶⁾があり、特異的なものとしては菌体表層のレクチン様物質と宿主細胞の糖残基との結合⁷⁻⁹⁾、細菌と宿主細胞のフィブロネクチンとの結合^{10,11)}、菌体表層のリポタイコ酸^{12,13)}、リポ多糖¹⁴⁾、脂質¹⁵⁾などの関与が報告されている。

また、口腔内異種細菌間の共凝集¹⁶⁻²¹⁾についても数多くの報告がされており、共凝集がプラーク形成に影響を及ぼす可能性が示唆されている。さらに Kolenbrander ら^{22,23)}は、グラム陰性嫌気性桿菌が、共凝集のみられない菌同士を橋渡しする、いわゆる "bridging" としての働きを示唆し、初期と後期のプラーク形成を結びつける mediator 的役割を果たすとしている。

菌周局所における細菌叢のサンプリングには一般にペーパーポイントやエキスカベーターなどを用いて採取し、培養後検出が行われる

が、その検出率は分離に用いる培地によって異なる。そのため *Porphyromonas gingivalis* では、その特異抗原であるトリプシン様酵素活性から検出する方法が推奨されている²⁴⁾。また、歯周病患者血清中の細菌の特異抗原に対するIgG抗体価の上昇が、宿主に細菌が定着・増殖することを反映するものとして、その病因論的意義が注目されている²⁵⁾。しかしながら、細菌は付着・定着後増殖する際に、その外膜タンパクの構成に変化を起こすことが知られており²⁶⁾、いかなる様式で宿主に定着し、歯周組織に作用するかについては未だ不明な点が多く、歯周病原菌の付着機構の究明は歯周病の発症機序の解明にとって重要な意義をもつと考えられる。

Fusobacterium nucleatum は口腔内に常在するグラム陰性偏性嫌気性桿菌で、成人性歯周炎患者の歯周ポケットから高頻度に分離され、歯周病原菌の一つと考えられている^{27,28)}。また同菌は、成人性歯周炎の活動期で検出率が高く

29) , 難治性の歯周炎においても高率に検出されている³⁰⁾。さらに, *F. nucleatum* を無菌ラットに接種すると歯周炎をおこすことが知られており³¹⁾, 急性壊死性潰瘍性歯肉炎にも重要な役割を果たすと考えられている³²⁾。本研究は歯周病の発症の解明の一端として *F. nucleatum* のヒト細胞への付着, 定着後の諸性質の変化を明らかにする目的で, *F. nucleatum* ATCC 10953 株由来のL-アルギニン感受性赤血球凝集素(A-HA)の免疫抗体を作製し, 液体培地および寒天平板培地上で培養した同菌の付着特性について免疫化学的に解析したものである。

材料ならびに方法

1. 供試菌株

主として, *F. nucleatum* ATCC 10953 および ATCC 25586 の2標準菌株と臨床分離株として F-0 ~ F-15 の16株を用いた。さらに, 他の歯周病原菌として, *Porphyromonas gingivalis* 381, *Porphyromonas assacharolytica*

ATCC 25260 および *Prevotella intermedia* ATCC 25261 の標準菌株ならびに *Capnocytophaga ochracea* Cp-1 , *P. gingivalis* Pg-1 , *P. gingivalis* Pg-2 , *P. intermedia* Pi-1 および *P. intermedia* Pi-2 の臨床分離株 , 計 4 種 8 株 を供試した。

2. 培養および菌懸濁液の調製

各菌株は , GAM 培地 (日水製薬 , 東京) に接種し , 嫌気ボックス (ヒラサワ , 東京) を用いて嫌气的条件下 (10%CO₂-10%H₂-80%N₂) で 37 °C , 48 時間前培養を行った。その後 , 各菌株を GAM 液体培地あるいは GAM 寒天平板培地 (2% Agar GAM Solid medium) に接種し , 嫌气的条件下 , 37 °C で静止期まで , または 72 時間培養を行った。培養後 10,000× g, 20 分間の遠心により集菌した後 , 0.15M 塩化ナトリウムを含む 10mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4, PBS) で 3 回遠心洗浄を繰り返した。洗浄後 , 所定の濃度になるように PBS 中に懸濁した。

菌増殖は , GAM 液体培地で嫌气的条件下 , 37 °C で , 適応期 (Lag phase) , 対数期 (Logarithmic phase) , 静止期 (Stationary phase) および下降期 (

Declining phase) の各段階まで培養を行い、それぞれの phase で同様に調製した。

3. ヒト赤血球浮遊液の調製

ヒト赤血球は健康成人の末梢血より分離した。採取したヘパリン加血液は、 $150\times g$, 3分間遠心し、その沈渣をPBSで3回洗浄した後、最終濃度が1% (vol/vol) になるようにPBS中に浮遊させた。尚、本菌の赤血球凝集活性はABO式血液型非特異的であったので、O型の赤血球を用いた。

4. 活性測定法

1) 赤血球凝集活性測定法

赤血球への付着は赤血球凝集反応により、microtiter plate (Corning Glass Works, USA) を用いて測定した。被検菌を最大濃度約 1×10^{10} cells/ml に調整した菌懸濁液を連続2倍希釈し、各希釈菌懸濁液の50 ul と1%赤血球浮遊液の50 ul を混合し、室温で2時間静置した。判定は肉眼的に凝集の認められる被検菌の最大希釈倍数をその凝集価として表した。

L-アルギニン感受性赤血球凝集素 (A-HA) の活性も，菌懸濁液と同様に測定し，その最大希釈倍数を凝集価として表した。

2)糖およびアミノ酸による赤血球凝集の阻害

赤血球凝集活性の阻害実験は，各阻害物質を最大濃度 50mM となるように PBS 中に溶解した後，連続 2 倍希釈を行い，その 25 ul と凝集の認められる最小濃度の 4 倍の濃度の菌懸濁液または A-HA 標品 25 ul を混合し，37℃，30 分間プレインキュベートした。さらに，50 ul の 1% 赤血球浮遊液を混合した後，完全凝集阻害の認められる阻害物質の最小濃度を求めた。

阻害物質として D-ガラクトース (和光純薬，大阪)，D-ラクトース (片山化学工業，大阪)，N-アセチル-D-ガラクトサミン，L-アルギニン，L-ヒスチジンおよび L-リジン (以上，ナカライテスク，京都) を用いた。

5. SDS-PAGE によるゲル電気泳動

SDS-PAGE は Laemmli ³³⁾ の方法に従い，0.1% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を含む 10% ポリアク

リルアミドゲルを支持体として行い、濃縮用には3%ゲルを用いた。試料は1% SDS、5% β -メルカプトエタノールを含む試料用緩衝液に溶解し、水浴中で100℃、30分間の加熱処理を行った。泳動後のゲルは銀染色(2D-銀染色試薬「第一」、第一化学薬品、東京)あるいはクーマシーブリリアントブルー-(CBB) R-250(ナカライテスク)による染色を行った。また、標準タンパク質マーカーとしては、Mw-SDSキット(Sigma, USA)を使用した。

6. *F. nucleatum* 菌体からの赤血球凝集素の精製

1) Trypsin 処理外膜の調製

A-HA の精製は竹本³⁴⁾の方法に準じて行った。*F. nucleatum* ATCC 10953 株の菌体を湿重量 0.1 g/ml になるように PBS 中に懸濁し、超音波破碎装置(トミー精工、東京)で氷冷下、6分間の処理を行った。処理後、未破壊菌体を除去するため、450×g、20分間の遠心を行った後、さらにその上清を4℃、3,000×gで20分間遠心し、得られた沈渣をPBSで3回遠心洗浄した。以下、いずれの遠心操作においても得られた沈

渣はPBSで3回遠心洗浄を行った。尚、この時得られた沈渣を細胞壁画分とした。

上記の沈渣を湿重量0.1 g/mlになるようにPBS中に懸濁後、Triton X-100（和光純薬）を2%になるように加え、37℃で30分間処理し、4℃30,000×gで20分間遠心した。さらに得られた沈渣を湿重量0.1 g/mlになるようにPBS中に懸濁し、Trypsin（Sigma）を1 mg/mlとなるように加え、37℃で30分間処理した。次にTrypsin inhibitor（Sigma）をTrypsinと等力価になるように加え、37℃、20分間処理した後、4℃30,000×gで20分間遠心した。このようにして得られた沈渣をTrypsin処理外膜画分(TOM)として各実験に供し、同標品より以下の抽出、精製を行った。尚、他の菌株も同様に処理して得た標品を、各菌株の外膜画分(TOM)として用いた。

2)赤血球凝集素の精製

A-HAをL-アルギニンアガロース（Sigma）を用いたアフィニティークロマトグラフィにより分離した。まずTOMを20mM n-オクチル-

β -D-チオグルコシド(ナカライテスク)および10% glycerolを含むPBSに懸濁させ、37℃、30分間の抽出操作の後、4℃、100,000×gで60分間超遠心を行った。この超遠心によって得られた上清を、同緩衝液で平衡化したL-アルギニンアガロースカラム(1.5×5.7cm)に添加した。

添加後、このカラムを同緩衝液により十分洗浄し、さらに1M塩化ナトリウムを含む同緩衝液でカラムを洗浄した後、100mM L-アルギニン塩酸および1M塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出を行った。流速は20 ml/hrで、2 mlごとに分取した。分取した標品は、スペクトラポア4(分画分子量1,000, Spectrum, USA)を用いてPBS中で一夜透析し、タンパク量測定、赤血球凝集活性の測定および抗体作製の試料に用いた。

7. 免疫血清の調製

1) 抗 A-HA 抗体の調製

抗 A-HA 血清は雄のウサギ(日本白色ラビット)に精製標品 A-HA を Freund の アジュバント

(DIFCO Laboratories, USA) 法に従い接種して得た。
なお、血清は 56 °C 30 分間の加熱処理を行い、
補体活性を不活化させた。

2) 抗 A-HA 抗体の免疫グロブリン分画

一般的に粗免疫グロブリン分画を得る方法³⁵⁾として用いられているイオン交換クロマトグラフィーにより、PBSで平衡化した DEAE-Sephacel (Pharmacia, Sweden) のクロマトカラム (1.0×21cm) を用い、抗 A-HA 血清の粗分画を行った。まず、抗 A-HA 血清をカラムに添加後、同緩衝液に各 0.01M、0.05M および 0.2M 塩化ナトリウムを段階的に添加し溶出させた。分取した各フラクションは、ゲル濾過またはアフィニティクロマトグラフィー (アフィゲルプロテイン A MAPS II キット, Bio-Rad, USA) を行い、アルブミンと分離した。このようにして得た画分をそれぞれ、抗 A-HA IgG, IgA および IgM 画分として、実験に用いた。

8. 抗 A-HA 抗体を用いた Western blotting

Western blotting は Kyhse-Anderson ら³⁶⁾ の方法に準じた。すなわち試料を SDS-PAGE 法を用いたゲル電気泳動後、そのゲルをセミドライ平板型転写装置 (NA-1513, 日本エイドー, 東京) を用いニトロセルロース膜 (Schleicher&Schuell, USA) または PVDF 膜 (Bio-Rad) に 180 mV, 60 分間転写させた。次に 0.05% Tween20 を含む PBS (PBS-Tw) で 3 回洗浄し、さらに蒸留水で十分に洗浄後、一次抗体として PBS で 500 倍希釈した抗 A-HA ウサギ血清を用い、暗下、37℃室温で 2 時間反応させた。PBS-Tw で同様の洗浄後、4℃で一夜、2% BSA (Bovine, Sigma) を含む同緩衝液で Blocking を行った。PBS-Tw で再度洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Organon Teknika Corp., USA) の PBS による 1,000 倍希釈液を用い、37℃、2 時間遮光し反応させ、同様に PBS-Tw で洗浄した。発色には、4-クロロ-1-ナフトール (ナカライテスク) 8 mg のエタノール溶解液 0.5 ml に、50mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩緩衝液 (Tris-HCl, pH7.5) 20

ml を加え，濾過した後，過酸化水素水を添加した反応溶液を用いた。

9. 金コロイド免疫電顕法による観察

供試菌への金コロイド標識^{37,38)}は，各菌体の PBS 懸濁液に抗 A-HA 抗体を作用させ，450× g, 20 分間の遠心洗浄後，再度 PBS に懸濁し，Protein A-Gold 15nm (EY Laboratories, USA) を作用させた。同様に遠心洗浄後集菌し，さらに蒸留水で洗浄した。その蒸留水による懸濁液をホルムバル膜を張ったシートメッシュ上に滴下し，シートメッシュを半乾燥後，3% 酢酸ウラニル染色を施した。水洗乾燥後，JEM-100S (加速電圧 80kV, 日本電子社製) 透過型電子顕微鏡で金コロイド粒子の菌体表層での存在を観察した。

10. ELISA 法による A-HA 抗原力価の測定

菌体表層の A-HA 抗原量は，抗 A-HA IgG 画分およびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いた ELISA 間接法^{39,40)}により測定した。

すなわち，660nm における吸光度 0.5 の菌懸

濁液 100 ul を , ELISA microtiter plate (96 ウェル , Corning Glass Works) の各ウェルに加え , 4 °C で一夜放置し , 抗原を吸着させた。菌体のウェルへの吸着後 , プレートを PBS-Tw で 3 回洗浄した。次に , 2% BSA (chicken egg, Sigma) を含む PBS でブロッキング後 , 一次抗体にウサギ免疫抗 A-HA IgG 画分を用い , その段階希釈系列を PBS-Tw 1/50 から 1/102,400 (12 系列) まで準備し , 希釈液を 100 ul ずつウェルに加えた。プレートをカバーし , 37 °C で 2 時間放置した後 , PBS-Tw で 3 回洗浄した。さらに二次抗体として PBS-Tw で調製した 1,000 倍希釈のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用い , これを 100 ul ずつ各ウェルに加えた。プレートを同様に 37 °C , 2 時間放置後洗浄し , 基質に α -フェニレンジアミン (ナカライテスク) を用いたクエン酸 - リン酸緩衝液 (pH 5.0) の 100 ul を各ウェルに分注し , 室温で遮光し 30 分間反応させた後 , ウェルの吸光度を ELISA マイクロプレートリーダー (MPR A4i, 東ソー , 東京) を用い 492nm

で測定した。また、抗 A-HA 抗体と液体培養した *F. nucleatum* の 18 株の全菌体および TOM あるいは平板培養した同菌株の全菌体との反応量は、液体培養した *F. nucleatum* ATCC 10953 株の全菌体の ELISA microtiter plate に吸着した試料の表面タンパク量当りの A-HA 反応量を 100 として % 表示し、これを A-HA 抗原力価とした。

11. タンパク量の測定

タンパク量の測定は BCA タンパク定量用試薬 (Pierce Chemical Company, USA) を用いて行った。標準試薬として、ウシ血清 albumin (Sigma) を用いた。また、microtiter plate に吸着させた試料の表面蛋白質量の測定には、CBB G-250 (ナカライテスク) を用い、標準タンパクとして、albumin chicken egg (Sigma) を用いた。

12. 疎水性ならびに ζ -電位の測定

疎水性の測定は Rosenberg ら⁴⁾の方法に準じて行った。細菌を PBS 2 ml に 660nm で吸光度 0.5 となるように懸濁させ、それに 500 ml の n-ヘキサデカン (片山化学工業) を加えて 1 分間

vortex mixer で混和した後，静置した。油相と水相に分離後，再び水相の吸光度を測定し，*n*-ヘキサデカンへの吸着率を求めた。

ζ-電位の測定は，顕微鏡電気泳動法⁴²⁾により，*F. nucleatum* 各菌体および赤血球のζ-電位を測定した。測定にはFACE光学式精密ゼータ電位計（協和界面科学，東京）を用いた。菌体を1mMリン酸塩緩衝液(pH7.4)に懸濁し，ゼータ電位計により，光学顕微鏡下で直接試料の同緩衝液中における泳動速度を測定した。各測定値から"静止レベル"での泳動速度を求め，これを真の泳動速度(*u*)とし，以下に示す電気泳動のSmoluchowskiの式⁴²⁾から各試料のζ-電位を算出した。

$$u = \epsilon E \zeta / 4\pi \eta$$

ε：誘電率，η：粘性定数，ζ：表面電位，

E：外部電圧

13. 検定

赤血球凝集力価と，抗A-HA IgG画分を用いたELISAによるA-HA抗原力価，*n*-ヘキサデカン

への吸着率および ζ -電位の相関は、Spearmanの順位相関係数を用いて分析し、危険率5%を有意水準とした。

結果

1. *F. nucleatum* 各菌株の液体培養および平板培養における赤血球凝集活性とその特性

1). 液体培養および平板培養した *F. nucleatum* 各菌株の赤血球凝集活性

液体培養および寒天平板培養した *F. nucleatum*

11株のヒト赤血球に対する凝集価を図1に示す。凝集価は培養状態によってF-0株のように大幅な変化を示すものから、ATCC 25586株のように両者間に変化を示さないものまで菌株によって凝集能に差が認められたが、今回使用したほとんどの菌株は、平板培養した菌体の方が液体培養した菌体に比べて高い赤血球凝集力価を示し、液体培養で赤血球凝集の

みられなかった菌株にも平板培養で凝集がみられた。

また、結果には示していないが、平板培養した菌を液体培地に接種し再培養した時の赤血球凝集価は、液体培養のみの力価と同様であった。

2). 赤血球凝集活性に対するアミノ酸および糖添加の影響

液体培養および平板培養した *F.nucleatum* の赤血球への付着におけるアミノ酸および糖添加による影響を検討した(表1)。

液体、平板どちらの培養においても ATCC 10953 株の赤血球凝集活性は 0.78mM L-アルギニンで完全凝集阻害されたが、液体培養で ATCC 25586 株のように N-アセチル-D-ガラクトサミンをはじめ D-ガラクトースを含む糖での阻害が認められたものや、液体培養の F-0 株のように今回検討したいずれのアミノ酸および糖でも凝集阻害されなかったものが、平板培養では L-アルギニンおよび L-リシンで凝集阻害を認め

た。F-3, F-4 株は液体培養で糖のみに阻害を認めしたが、平板培養では糖による阻害に加えアミノ酸でも阻害を認めた。F-11, F-13 株は液体培養で赤血球凝集がみられず平板で培養すると凝集が生じたが、これらはL-アルギニンおよびL-リシンで若干阻害が認められた。また、F-7, F-8 株のように両培養で阻害物質に対する感受性に変化のない菌株もみられた。

表1

尚、このアミノ酸および糖による凝集阻害活性の変化は赤血球凝集活性変化と同様に可逆的であった。

3). 両培養の各菌株の外膜画分の SDS-PAGE 分析

平板および液体培養した *F. nucleatum* 各菌株の外膜画分を 10% ゲルによる SDS-PAGE により泳動した後、銀染色を施したところ、ATCC 10953, F-0 株など (図 2) , 用いた *F. nucleatum* のほとんどの菌株において新たなバンドの出現や量的な変化がみられた。また、結果には示していないが、このバンドの変化はクーマシーブリアントブルー染色によっても同様に検出された。

図2

2. 抗 A-HA 抗体の作製とその赤血球凝集への影響

1). *F. nucleatum* ATCC 10953 株の菌体からの赤血球凝集素 (A-HA) の精製

TOM の *n*-オクチル - β -D-チオグルコシド可溶性画分の L-アルギニンアフィニティークロマトグラムを図 3 に示す。1M 塩化ナトリウムでカラムの不純物を洗浄した後，100mM の L-アルギニンで溶出したところ，吸光度 280nm でピークが検出された。また，同ピークに相当する各画分を透析後，赤血球凝集活性を測定した結果，ピークに一致して赤血球凝集活性がみられた。この赤血球凝集活性を示す画分を精製標品 (A-HA) とした。

図3

A-HA の精製では Pronase-E³⁴⁾ に変えて Trypsin で *F.nucleatum* の外膜を処理して行っても，十分良好な結果が得られた。

2). 抗 A-HA 抗体を用いた SDS-PAGE とその Western blotting

精製した A-HA をウサギに免疫して得た血清

を用い、*F. nucleatum* 10953 株の TOM と A-HA の SDS-PAGE および Western blotting により同定を行った結果、移動度の小さい位置に単一のバンドがみられ、A-HA 特異的に抗血清が得られた (図 4)。また、A-HA は約 370K の高分子量であった。

4

3). 抗 A-HA 抗体の免疫グロブリン分画

A-HA ウサギ免疫血清の DEAE-Sephcel を用いたイムノグロブリン分画を、図 5 に示す。結果には示していないが、これら各 IgG, IgM および IgA 画分の Western blotting では IgG 画分にも A-HA と交差がみられた。

5

4). 赤血球凝集活性への免疫グロブリンの影響

液体培養した *F. nucleatum* の赤血球凝集への免疫血清、イムノグロブリンの各画分による最大阻害希釈およびその時のタンパク量濃度を表 2 に示す。

抗血清および抗 A-HA IgG 画分は、ATCC 10953 株で特異的にその赤血球凝集を阻害した。しかし、F-0 株は microtiter plate 上で肉眼的に高濃度の

抗体により阻害されたようにみられたが，その菌体と抗体の作用後に PBS で洗浄し赤血球と作用させた場合，赤血球凝集は阻害されなかった。

表2

液体培養および平板培養した *F. nucleatum* の各菌株の赤血球凝集活性への抗体（抗血清，抗 A-HA IgG 画分）の阻害結果を表 3 に示す。

液体培養では，抗血清により，ATCC 10953 および F-0 株の計 2 株に阻害がみられ，平板培養では，F-1 株など計 7 株に阻害がみられたが，抗 A-HA IgG 画分による阻害は，液体培養で ATCC 10953 株のみ，平板培養では，ATCC 25586 株など計 5 株にみられた。また，結果には示していないが平板培養した *F. nucleatum* 全 18 株中，抗 A-HA IgG 画分による阻害を受けたものは 10 株で，これら 10 株は抗体と作用後，再現性をもって赤血球凝集が特異的に阻害された。

表3

3. ATCC 10953 株由来の L-アルギニン感受性赤血球凝集素 (A-HA) の局在と特異性

1). 液体培養の外膜画分の抗 A-HA 抗体を用い

た Western blotting 解析

液体培養した *F. nucleatum* および他の歯周病原菌の外膜画分 (TOM) と抗血清との反応の Western blotting の結果を図 6 に示す。

F. nucleatum の ATCC 25586 , F-7 株など今回使用した *F. nucleatum* の菌株すべてにおいて , ATCC 10953 株と同様に , A-HA に相当する約 370K の高分子量の位置にバンドが認められ , F-0 株では分子量約 35K に相当する位置にもバンドが認められたが , 他の歯周病原菌 4 種 8 菌株にはいずれもバンドは認められなかった。

46

2). 金コロイド免疫電子顕微鏡による *F. nucleatum* 菌体表層の観察

Western blotting により反応が認められた *F. nucleatum* の 18 株について , 菌体表層での A-HA の局在の有無を調べるために , 液体培養した全菌体に抗 A-HA 抗体を用いて , 金コロイド免疫電顕法に従い処理した後 , ネガティブ染色を施し , 電子顕微鏡で観察した (図 7) 。

F. nucleatum ATCC 10953, ATCC 25586 および F-0 株の菌

体表層に比較的均一にコロイド金粒子が認められたが、*F. nucleatum* の F-7, F-9, F-11 株などその他の計 15 株の菌体表層にはコロイド金粒子の存在は認められなかった。

図 7

3). 両培養の菌体表層外膜の ELISA 分析による A-HA 抗原力価の比較

F. nucleatum の菌体表層の A-HA の量的要因を検討するため、全菌体および TOM の A-HA 量を ELISA 法を用いて測定した。

液体培養した *F. nucleatum* の全菌体および TOM と抗 A-HA 抗体との反応量は、すべての菌株で A-HA 抗原力価が全菌体に比べ TOM で増加していた。また、液体培養した ATCC 25586, F-0 株の全菌体は凝集活性を示すに十分な抗原力価を示した (図 8)。

図 8

液体培養および平板培養した各全菌体についての抗 A-HA 抗体との反応量の比較を図 9 に示す。

ATCC 10953, F-0 株など液体培養、平板培養両方に、抗体との反応の認められた菌株の A-HA 抗

原力価は、液体培養と比べ平板培養の方が高くなつた。また、F-3, F-4株などのように液体培養で抗原力価が0.1%以下であつたものが、平板培養した場合、ほとんどにおいて30%以上の値を示した。

図9

さらに、液体および平板の各培養におけるA-HA抗原力価と赤血球凝集価との間には相関係数 $r_s=0.704$ ($N=36$)で、正の相関があつた(図10)。

図10

4. *F. nucleatum* 菌体の疎水性および ζ -電位

1). 菌増殖中の菌体の疎水性

液体培養した*F. nucleatum* ATCC 10953株の増殖曲線とその菌体の疎水性の変化を図11に示す。

疎水性は適応期から徐々に増加し、対数増殖期において最も高くなり、静止期以降急速に減少した。下降期に達すると疎水性は適応期より減少した。

図11

また、各増殖期における赤血球凝集活性の変化(図12)を調べると、赤血球凝集力価は対数増殖期よりも静止期後期において最も高い値を示した。

図12

液体培養した *F. nucleatum* 菌体の疎水性と赤血球凝集活性との間には直接的な関係は見られなかった (図 11, 12) 。尚 , 結果には示していないが他の菌株においても同様の傾向を示した。

2). 液体および平板培養した菌体の疎水性

各菌株の疎水性を二液分配法による n-ヘキサデカンへの吸着率により検討したところ , 液体培養および平板培養した *F. nucleatum* の各菌体の n-ヘキサデカンへの吸着率は , ATCC 10953 株のように , 液体培養で 30% , 平板培養では 46% と増加しているものや , F-1 株のように液体培養で 83% , 平板培養では 53% と減少しているものもあった (図 13) が , この実験に用いた 17 菌株中 10 菌株で , 平板培養での n-ヘキサデカンへの吸着率が増加した。

13

次に , 赤血球凝集活性の増加変位と n-ヘキサデカンへの吸着率の変化との関係を図 14 に示す。凝集活性の増加に対して n-ヘキサデカンの吸着率は増減両方見られ , 相関係数は

$r_s = -0.235$ (N=34) で全く相関はみられなかった。

図14

3). 液体および平板培養した菌体とヒト赤血球の ζ -電位

顕微鏡電気泳動法を用いて ζ -電位を測定したところ、いずれの培養における菌株および赤血球も負の ζ -電位を持つことが示された(図15)。液体培養と比較し、平板培養した *F. nucleatum* の菌体の ζ -電位は、F-4株を除いたほとんどの菌株で、より負の電荷を帯びていた。

図15

また、 ζ -電位の変化と赤血球凝集活性の液体培養から平板培養への増加変位との関係は、相関係数 $r_s = -0.063$ (N=34) で有意な相関ではなかった(図16)。しかしながら、両培養間で比較すると、菌体表層の負の電荷が大きいはほど赤血球凝集力価が大きくなる傾向にあった。

図16

考 察

感染症である歯周病の発症の第一段階は、細菌の宿主への付着によって始まる。その中で、生育環境に適した細菌が定着という次の段階へ進み、歯周細菌叢において優位となって増殖し、病原性を発揮するようになる。このため、細菌による歯周病発症機序を探るには、その一つとして細菌の付着機構を究明することが重要である。著者は、歯周病原菌の一つと考えられている *F.nucleatum* を用いて、同菌の赤血球凝集素に対する抗体を作製し、付着因子である赤血球凝集素の局在および異なる培養条件下での付着特性について免疫化学的に検討した。

現在まで、様々な種類の細菌と細胞との付着が報告されている。また、多くの細菌について赤血球凝集素の存在が知られており、口腔内細菌においても *Eikenella corrodens*⁴³⁾、*Streptococcus sanguis*⁴⁴⁾、*Bacteroides(Porphyromonas) gingivalis*^{45,46)} などから赤

血球凝集素が抽出，精製されている。また *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953株の外膜から精製された赤血球凝集素は，その凝集活性がL-アルギニンにより特異的に阻害されることが報告されている^{34,47)}。

一方，最近では *P.gingivalis* において，ある特定の標準菌株の使用結果が問題となっており⁴⁸⁾，不均一性に関する研究が広く展開されており，特定菌株以外の臨床分離株など，多くの菌株についても検討すべきだと考えられている。菌種菌株が同一でも変異を起こした菌株とでは，表層構造や酵素活性などが異なるのは当然といえる。しかも，たとえ菌株が変異していなくても細菌の培養に用いる培地組成や浸透圧により，容易に外膜タンパク合成に影響があらわれる⁴⁹⁾。このような細菌の培養に関する研究に加えて，最近は熱処理による細菌細胞膜の特殊タンパク合成 (heat shock protein)⁵⁰⁾，菌体外酵素の変化，ヘミンやビタミンKの培地への添加による変化⁵¹⁾，気圧，

酸素の影響^{52,53)}などによる細菌の性状変化が注目されている。また、培地に含まれる各成分の細菌への影響を明らかにした基礎培地 (chemically defined medium) の検索も求められている^{54,55)}。

今回、著者は *F. nucleatum* を対象として液体培養および寒天平板培養といった2つの異なる条件で培養をおこない、*F. nucleatum* の性状に種々の違いを生ずることを見出した。*F. nucleatum* の赤血球凝集活性は、液体培養に比べ平板培養した菌体で有意に高く、その糖、アミノ酸による阻害感受性は、多くがアミノ酸感受性に变化することが明らかとなった。また、平板培養した *F. nucleatum* 菌体を液体培養に戻し、再培養した後の凝集活性および糖、アミノ酸感受性は、液体培養のみ行った場合と同様であったことから、その変化は可逆的であり phenotypic なものであることが示された。

細菌は付着・定着後増殖する際に、その外膜タンパクの構成に変化を起こすと報告²⁶⁾

されているが，著者の行った *F. nucleatum* の外膜面分の SDS-PAGE 分析から，平板培養を行うことにより細胞壁のタンパクに変化を起こすことが示された。これらのことは，発育条件が異なると，細菌の持つタンパク合成や代謝産物などの様々な生理活性，細胞表層構造に影響があらわれることを裏付けるものである。

液体培養は歯周ポケット内の滲出液中の浮遊状態を，寒天平板培養は細菌の付着，定着状態の発育環境モデルと考えられるが，平板上では細菌が直接ガスに触れないウェットの状態で培養しており，酸素などの影響はないものと思われる。平板培養で赤血球凝集活性が増加したのは，液体培養と違って細菌が付着状態で増殖していることであり，この *F. nucleatum* の付着・定着による変化が凝集活性に影響を及ぼしたと考えられる。このことは，歯周病原菌の培養は実際の発育環境に出来る限り近い条件で行うことの重要性を示唆している。

この *F. nucleatum* の付着・定着後の赤血球凝集

活性の変化をさらに詳しく調べるために、A-HA に対する抗体を作製し、検討した。A-HA の精製では Pronase-E³⁴⁾ に変えて Trypsin で *F.nucleatum* の外膜を処理して行っても、十分良好な結果が得られた。精製した A-HA の分子量は SDS-PAGE から約 370K の高分子であり、今までに報告され ATCC 10953 株の赤血球凝集活性の特性⁵⁶⁾ と一致しており、竹本³⁴⁾ の分離した A-HA と同一のものであることが示された。A-HA が Trypsin に耐性であることは、すでに Ozaki ら⁵⁶⁾、Dehazy ら⁵⁷⁾ の研究により明らかにされているが、他に赤血球凝集活性が L-アルギニンによって阻害されるものとしては実験に供試した *P.gingivalis* があり、この菌には Trypsin に似た基質特異性を持った強いプロテアーゼが知られている^{58,59)}。

P.gingivalis と *F.nucleatum* が共凝集^{60,61)} をすることからみても、また *Treponema denticola*⁶²⁾、*Bacteroides forsythus*⁶³⁾ などの他の菌周病原菌も Trypsin 様酵素活性を持つものがあり、菌周細菌叢において共存

し、且つ付着・定着の場を確保するためには、*F. nucleatum* も Trypsin 耐性の付着因子を持ち自己破壊から身を守る必要がある。翻って *F. nucleatum* は Trypsin 耐性の付着因子を持つことから歯周細菌叢において重要な役割を担っていると考えられる。また、Gibbons ら⁶⁴⁾、Naito ら⁶⁵⁾ は、*P. gingivalis* などの細菌が酵素活性を有するのは宿主上皮細胞表層に立体的変化を起こし、細菌の付着を有利にするためとしている。しかし、著者の行った研究では、強い酵素活性を有さない細菌でも、*F. nucleatum* のように、細菌自身の表層構造に変化を生じさせ、宿主細胞への付着を導く細菌が存在することが示された。

A-HA に対するウサギ抗血清は、DEAE-Sephacel カラムを用いた分画の内、抗 A-HA IgG 画分に A-HA の赤血球凝集阻害が認められた。また、抗 A-HA IgG 画分の最大阻害希釈濃度から、ウサギ血清中に高力価の抗体の産生が生じたことが示され、A-HA は強力な抗原物質であることが示唆された。最近では、A-HA のような歯周病原菌の特異抗原に対する血清中の抗体価が

歯周局所での歯周病原菌の消長を反映するとして詳細に研究されている⁶⁶⁻⁶⁸⁾。このことは A-HA も歯周病患者の *F. nucleatum* の感染を間接的に調べるための優れたマーカーになりうることを示唆している。

抗 A-HA 抗体は平板培養した *F. nucleatum* の赤血球凝集活性を一部の菌株で阻害した。これは平板培養した *F. nucleatum* の菌体表層に A-HA が存在し凝集活性を増加または生じさせたと考えられる。そこで、A-HA の免疫学的性状を調べるため、作製した同抗原に対するウサギ抗血清を用いた Western blotting 解析を行った。その結果、*F. nucleatum* ATCC 10953 株をはじめ、供試した全ての *F. nucleatum* 外膜画分と反応し、*F. nucleatum* 菌株間において共通抗原性を有することが示された。しかしながら *P. gingivalis* , *P. intermedia* , *P. asaccharolytica* および *C. ochracea* のいずれの菌体の外膜画分とも全く反応せず、*F. nucleatum* A-HA 抗原はきわめて種特異性の高いことが明らかにされた。

また、A-HA に対する金コロイド免疫電顕による観察から、液体培養した 18 株の *F. nucleatum*

のうちで， ATCC 10953, ATCC 25586 および F-0 株は菌体表面層にコロイド金粒子の存在が認められたが，他の *F. nucleatum* の菌株には認められず，これら 15 株は外膜内部に A-HA を有すると考えられた。しかし， ATCC 25586 および F-0 株は菌体表面層に A-HA の存在が示されたにもかかわらず，赤血球凝集反応において ATCC 10953 株のように L-アルギニンによって阻害を受けなかった。これは A-HA とは heterogeneous な抗原を有するためとも考えられるが，抗 A-HA 抗体により同赤血球凝集反応が阻害されなかったことから，その可能性は低い。むしろ L-アルギニン以外の，たとえば D-ガラクトースなどを認識する因子が優位な立場で付着に関与しているからであろう。実際， *F. nucleatum* には複数の赤血球凝集因子の存在が示唆されており^{56,69,70}，さらには，液体培養および平板培養した *F. nucleatum* 菌体の赤血球凝集反応の糖やアミノ酸による阻害変化が菌株により異なり，発育環境に伴うこれらの変化から，赤血球凝集因子間にはその活

性をコントロールする "capping"⁷¹⁾ のような補助機構の存在も考えられる。

次に、液体培養した *F. nucleatum* の全菌体および外膜画分の ELISA により、液体および平板培養した *F. nucleatum* における A-HA の局在を量的要因から検討を行った。その結果、液体培養した *F. nucleatum* の全菌体で抗 A-HA 抗体と反応が認められなかった菌株でも、外膜画分で反応が認められたことから、A-HA は外膜内部にも存在することが示された。また、液体培養で菌体表層に A-HA 抗原力価が認められなかった菌株を平板培養すると、その菌体表層は抗 A-HA 抗体と反応を示したことから、A-HA は *F. nucleatum* の外膜内部にも存在し、平板培養することにより菌体表層に移動すると考えられた。さらに、液体培養および平板培養した *F. nucleatum* の菌体表層の A-HA 抗原力価の変化と赤血球凝集価との間に正の相関がみられたことから、A-HA は宿主に付着、定着後増殖する際の重要な因子であることが示唆された。

一方、微生物は、その周囲に粒状のある種

の化学成分の濃度勾配が生じると、その粒状有機物表面に向かって走化性を示すという報告もあり^{72,73)}、A-HA 抗原の *F. nucleatum* の菌体表層への出現は宿主への付着をより確固なものとするためでなく、付着した宿主細胞からさらに栄養摂取するための走化性に関与している可能性も考えられる。また、細菌は抗原の調整または感染部に十分な量の細菌細胞抗原を与えることによって、貪食能を受けないという報告もある^{74,75)}。

細菌の付着には、菌体表層の疎水性が密接に関与しているという報告がある^{76,77)}。Zehnder⁷⁸⁾ は培養の時期別に測定し、細胞表面は対数期が静止期よりも疎水的であるという。今回著者の研究でも液体培養した *F. nucleatum* の菌体表層の疎水性は対数期において最も高く、彼らの報告と一致していたが、疎水性と赤血球凝集活性との間には関係はみられなかった。また、Haapasalo⁷⁹⁾ は同一菌株でも培養条件を変えて生育させると疎水性にある程度の差が

生じ、高い疎水性を示す菌株は常に高い傾向を示したと報告している。本研究でも液体培養および平板培養した *F. nucleatum* の菌体表層の疎水性はすべての菌株で差が生じ、増減両方認められたが、高い疎水性を示す菌株が常に高い傾向を示すとは限らず、かならずしも一致するものではなかった。しかも、疎水性の変化と赤血球凝集価との間には全く相関がみられなかった。

一方、非特異的な付着には静電的相互作用も関与しているという報告がある^{3,80)}。そこで、*F. nucleatum* の各菌体の表層電荷の指標として ζ -電位を測定したところ、液体培養と比較し平板培養した菌体の ζ -電位はほとんどの菌株で減少した。その ζ -電位の変化と赤血球凝集活性との関係を検討したところ、有意な相関はみられなかったが、負の電荷が大きいほど凝集力価が大きくなる傾向にあった。*F. nucleatum* の菌体表層の負電荷の増加にもかかわらず負に帯電した赤血球に対する付着が増加したことから、*F. nucleatum* は付着に関して障壁

となっている静電的な反発力よりも強く働く付着因子を有しており、A-HA は強力な付着因子の一つであることが示唆された。

以上の結果は、培養条件の違いが *F. nucleatum* の細胞壁および表層構造に変化を起し、ヒト細胞への付着・定着に影響を及ぼすことを明らかにしたものである。特に L-アルギニン感受性の付着因子（A-HA）は、*F. nucleatum* の宿主細胞に対する付着・定着に重要な役割を果たし、局所の感染に関与することが示された。

総 括

歯周病原菌の一つである *F. nucleatum* ATCC 10953 株の L-アルギニン感受性赤血球凝集素 (A-HA) の抗体を作製し、異なる培養条件下での *F. nucleatum* の付着特性と A-HA の局在について免疫化学的に検討し、以下の結果を得た。

1) *F. nucleatum* の赤血球凝集活性は、液体培養に比べ平板培養した菌体で有意に高く、その糖、アミノ酸による赤血球凝集阻害活性も両者で異なることが示された。

2) *F. nucleatum* の外膜画分の SDS-PAGE 分析から、平板培養を行うことにより細胞壁のタンパクに変化が起こることが示された。

3) 抗 A-HA 抗体を用いた Western blotting 解析により、*F. nucleatum* ATCC 10953 株以外の同種菌株にも A-HA の存在が認められたが、他の歯周病原菌の *P. gingivalis* , *P. asaccharolytica* , *P. intermedia* および *C. ochracea* の 4 種 8 菌株には認められなかった。

4) 金コロイド免疫電顕法による観察から、液

体培養した *F.nucleatum* の ATCC 10953 , ATCC 25586 および F-0 株の表層に抗 A-HA 抗体との反応がみられたが、その他の 15 菌株の表層にはみられなかった。

5) 液体および平板培養した *F.nucleatum* の全菌体および外膜画分 (TOM) の ELISA 法による分析から、A-HA は外膜内部にも存在し、液体培養で菌体表層に A-HA が認められなかった菌株にも平板培養することにより認められた。この菌体表層の抗 A-HA 抗体との反応量変化と赤血球凝集活性変化との間には相関がみられた。

6) 液体培養および平板培養した *F.nucleatum* の凝集活性、A-HA 量の変化は、非特異的因子の疎水性、静電的相互作用と直接的な相関関係はみられなかった。

以上の結果、A-HA は *F.nucleatum* 種特異性の高いことが明らかとなった。また、A-HA は *F.nucleatum* が宿主細胞に付着、定着後増殖する際の重要な因子であり、局所の感染に関与することが示唆された。さらに、*F.nucleatum* の付着、定着に

よる変化は、病原性に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の御指導および御校閲を賜った本学歯科保存学第二講座岡本莫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究遂行上、御指導、御助言を頂いた本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授ならびに本学予防歯科学講座岩本義史教授に深謝いたします。また、本研究の遂行、まとめおよび論文の作成上、終始御指導、御助言頂いた、本学歯科保存学第二講座竹本俊伸助手ならびに徳島大学歯学部口腔細菌学講座三宅洋一郎教授、本学口腔細菌学講座菅井基行助教授および小松澤均助手に心から感謝の意を表します。さらに、 ζ -電位の測定にあたり御指導、御助言下さった本学歯科保存学第一講座新谷英章教授および佐藤尚

毅助教授，ならびに電子顕微鏡による観察にあたり御指導，御協力下さった本学歯科保存学第二講座小川哲次講師に深謝いたします。最後に本研究を進めるに際し，多大なる御支援を頂いた本学歯科保存学第二講座ならびに本学口腔細菌学講座関係各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Gibbons,R.J. and van Houte,J. : Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 29, 19-44, 1975.
- 2) Gibbons,R.J. : Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J. Dent. Res.* 63, 378-385, 1984.
- 3) Weerkamp,A.H., Uyen,H.M. and Busscher,H.J. : Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. *J. Dent. Res.* 67, 1483-1487, 1988.
- 4) Minagi,S., Miyake,Y., Inagaki,K., Tsuru,H. and Suginaka,H. : Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect. Immun.* 47, 11-14, 1985.
- 5) Garber,N., Sharon,N., Shonet,D., Lam,J.S. and Doyle,R.J. : Contribution of hydrophobicity to hemagglutination reactions of *Pseudomonas aeruginosa* *Infect. Immun.* 50, 336-337, 1985.
- 6) van Oss,C.J. : Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 19-39, 1978.
- 7) Yamazaki,Y., Ebisu,S. and Okuda,H. : *Eikenella corrodens* adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 31, 21-27, 1981.
- 8) Costello,A.H., Cisar,J.O., Kolenblander,P.E. and Gagriel,O. : Neuraminidase-

- dependent hemagglutinin of human erythrocytes by human strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. *Infect. Immun.* 26, 563-572, 1979.
- 9) Brennan, M.J., Cisar, J.O., Vatter, A.E. and Sandberg, A.L. : Lectin-dependent attachment of *Actinomyces naeslundii* to receptors on epithelial cells. *Infect Immun.* 46, 459-464, 1984.
- 10) Mangan, D.F. and Snyder, I.S. : Mannose-sensitive interaction of *Escherichia coli* with human peripheral leukocytes in vitro. : *Infect. Immun.* 26, 520-527 1979
- 11) Isogai, E., Hirose, K., Fujii, N. and Isogai, H. : Three types of binding by *Porphyromonas gingivalis* and bacteria to fibronectin, buccal epithelial cells and erythrocytes. *Archs. Oral Biol.* 37, 667-670, 1992.
- 12) Neelson, T.J. and Mattingly, S.J. : Role of cellular lipoteichoic acid in mediating adherence of serotype III strains of group B streptococci to human embryonic, fetal, and adult epithelial cells. *Infect. Immun.* 43, 523-530, 1984.
- 13) 松浦尚志 : 黄色ブドウ球菌の HeLa 細胞に対する adhesin の分離と性状 . 広大歯誌 26, 29-43, 平成 6.
- 14) Okuda, K. and Kato, T. : Hemagglutinating activity of lipopolysaccharides

- from subgingival plaque bacteria. *Infect. Immun.* 55, 3192-3196, 1987.
- 15) Ghannoum, M.A., Burns, G.R., Abu Elteen, K. and Radwan, S.S. :
Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida*
spp. to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 54, 189-193,
1986.
- 16) Gibbons, R.J. and Nygaard, M. : Interbacterial aggregation of plaque
bacteria *Archs. Oral Biol.* 15, 1397-1400, 1970.
- 17) Ellen, R.P. and Balcerzak-Raczkowski, L.B. : Interbacterial aggregation of
Actinomyces naeslundii and dental plaque streptococci. *J. Periodont. Res.*
12, 11-20, 1977.
- 18) Kolenbrander, P.E. and Andersen, R.N. : Multigeneric aggregations among
oral bacteria: A network of independent cell-to-cell interactions. *J.*
Bacteriol 168, 851-859, 1986.
- 19) Slots, J. and Gibbons, R.J. : Attachment of *Bacteroides melaninogenicus*
subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in
colonization of the mouth and of periodontal pockets. *Infect. Immun.*
19, 254-264, 1978.
- 20) Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N. and Holdeman, L.V. : Coaggregation of
oral *Bacteroides* species with other bacteria: Central role in
coaggregation bridges and competitions. *Infect. Immun.* 48, 741-746,

1985.

- 21) Takemoto,T., Hino,T., Yoshida,M., Nakanishi,K., Shirakawa,M. and Okamoto,H. : Characteristics of multimodal coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and streptococci. *J. Periodont. Res.* in press.
- 22) Kolenbrander,P.E., Ganeshkumar,N., Cassels,F.J. and Hughes,C.V. : Coaggregation : specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J.* 7, 406-413, 1993.
- 23) Kolenbrander,P.E. and London,J. : Adherence today, here tomorrow : Oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* 175, 3247-3252, 1993.
- 24) Slots,J. : Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescence assay for trypsin-like activity. *Oral Microbiol. Immunol.* 2, 139-141, 1987.
- 25) Ebersole,J.L., Holt,S.C., Cappelli,D. and Kesavalu,L. : Significance of systemic antibody responses in the diagnostic and mechanistic aspects of progressing periodontitis. *Quintessence Publishing Co. Tokyo* , pp.343-357, 1991.
- 26) Costerton,J.W., Irvin,R.T., and Cheng,K.J. : The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 299-324, 1981.
- 27) Moore,W.E.C., Holdeman,L.V., Smibert,R.M., Good,I.J., Burmeister,J.A., Palcanis,K.G. and Ranney,R.R. : Bacteriology of experimental gingivitis

- in young adult humans. *Infect. Immun.* 38, 651-667, 1982.
- 28) Haffajee,A.D., Socransky,S.S., Dzink,J.L., Taubman,M.A., Ebersole,J.L. and Smith,D.J. : Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 15, 240-246, 1988.
- 29) Dzink,J.L., Socransky,S.S. and Haffajee,A.D. : The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 15, 316-323, 1988.
- 30) Haffajee,A.D., Socransky,S.S., Dzink,J.L., Taubman,M.A. and Ebersole,J.L. : Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 15, 390-398, 1988.
- 31) Irving,J.T., Socransky,S.S. and Tanner,A.C.R. : Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with gram-negative organisms. *J. Periodont. Res.* 13, 326-332, 1978.
- 32) Loesche,W.J., Syed,S.A., Laughon,B.E. and Stoll,J. : The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J. Periodontol.* 53, 223-230, 1982.
- 33) Laemmli,U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- 34) 竹本俊伸 : *Fusobacterium nucleatum* の赤血球凝集素

の分離とその菌凝集活性 . 広 大 歯 誌 23, 61-74,
平成 3.

- 35) 松橋 直 , 成内秀雄 , 臼井美津子 : 免疫学
実験入門 , 生物化学実験法 15. 学会出版セン
ター , 62-63, 昭和 56.
- 36) Kyhse-Anderson, J. : Electroblotting 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.
- 37) McLean, I.W. and Nakane, P.K. : Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative,
a new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*
22, 1077-1083, 1974.
- 38) Umemoto, T., Namikawa, I., Suido, H. and Asai, S. : A major antigen on
the outer envelope of a human oral spirochete, *Treponema denticola*.
Infect Immun. 57, 2470-2474, 1989.
- 39) Ebersole, J.L., Frey, D.E., Taubman, M.A. and Smith, D.J. : An ELISA
for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
J. Periodont. Res. 15, 621-632, 1980.
- 40) Evans, D.G., Evans, Jr., D.J., Moulds, J.J. and Graham, D.Y. : N-
acetylneuraminylactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*

- : apulative colonization factor antigen. *Infect. Immun.* 56, 2896-2906, 1988.
- 41) Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. : Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29-33, 1980.
- 42) 北原文雄, 古澤邦夫 : 界面動電現象 ; 分散・乳化系の化学 . 3版, 工学図書株式会社, 東京 . 86-104, 昭和 58.
- 43) Yamazaki, Y., Ebisu, S. and Okuda, H. : Partial purification of a bacterial lectinlike substance from *Eikenella corrodens*. *Infect. Immun.* 56, 191-196, 1988.
- 44) Nagata, K., Nakao, M., Shibata, S., Shizukuishi, S., Nakamura, R. and Tsunemitsu, A. : Purification and characterization of galactosephilic component present on the cell surfaces of *Streptococcus sanguis* ATCC 10557. *J. Periodontol.* 54, 163-172, 1983.
- 45) Okuda, K., Yamashita, A., Naito, Y., Takazoe, I., Slots, J. and Genco, R.J. : Purification and properties of hemagglutinin from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.* 54, 659-665, 1986.
- 46) Inoshita, E., Amano, A., Hanioka, T., Tamagawa, H., Shizukuishi, S. and Tsunemitsu, A. : Isolation and some properties of exohemagglutinin from

- the culture medium of *Bacteroides gingivalis* 381. *Infect. Immun.* 52, 421-427, 1986.
- 47) Takemoto,T., Ozaki,M., Shirakawa,M., Hino,T. and Okamoto,H. : Purification of arginine-sensitive hemagglutinin from *Fusobacterium nucleatum* and its role in coaggregation. *J. Periodont. Res.* 28, 21-26, 1993.
- 48) Lee,J.Y., Sojar,H.T., Bedi,G.S. and Genco,R.J. : *Porphyromonas(Bacteroides) gingivalis* fimbrillin: size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. *Infect. Immun.* 59, 383-389, 1991.
- 49) Mizuno,T., Shinkai,A., Matsui,K. and Mizushima,S. : Osmoregulatory expression of porin genes in *Escherichia coli*: a comparative study on strains B and K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* 68, 289-294, 1990.
- 50) Maeda,H., Miyamoto,M., Hongyo,H., Nagai,A., Kurihara,H. and Murayama,Y. : Heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*: molecular cloning and sequence analysis of its gene and purification of the recombinant protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 119, 129-135, 1994.
- 51) Carman,R.J., Ramakrishnan,M.D. and Happer,F.H. : Hemin levels in culture medium of *Porphyromonas(Bacteroides) gingivalis* regulate both hemin binding and trypsinlike protease production. *Infect. Immun.* 58,

4016-4019, 1990.

- 52) Walden,W.C. and Hentges,D.J. : Differential effects of oxygen and oxidation-reduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* 30, 781-785, 1975.
- 53) Matsuyama,T., Murakami,T., Shiraishi,S. and Hagihara,B. : Cultivation of *Bacteroides fragilis* in tissue culture. *J. Infect. Dis.* 145, 859-862, 1982.
- 54) Hussain,M., Hastings,J.G. and White,P.J. : A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 34, 143-147, 1991.
- 55) Rogers,A.H., Zilm,P.S., Gully,N.J., Pfenning,A.L. and Marsh,P.D. : Aspects of the growth and metabolism of *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 in continuous culture. *Oral Microbiol. Immunol.* 6, 250-255, 1991.
- 56) Ozaki,M., Miyake,Y., Shirakawa,M., Takemoto,T., Okamoto,H. and Suginaka,H. : Binding specificity of *Fusobacterium nucleatum* to human erythrocytes, polymorphonuclear leukocytes, fibroblasts and Hela cells. *J. Periodont. Res.* 25, 129-134, 1990.
- 57) Dehazya,P. and Coles,Jr.,R.S. : Agglutination of human erythrocytes by *Fusobacterium nucleatum*: Factors influencing hemagglutination and some

- characteristics of the agglutinin. *J. Bacteriol.* 143, 205-211, 1980.
- 58) Chen,Z., Potempa,J., Polanowski,A., Renvert,S., Wikstorm,M. and Travis,J.
: Stimulation of proteinase and amidase activities in *Porphyromonas*
(*Bacteroides*) *gingivalis* by amino acids and dipeptides. *Infect. Immun.*
59, 2846-2850, 1991.
- 59) Yoshimura,F., Nishikata,M., Suzuki,T., Hoover,C.I. and Newbrun,E. :
Characterization of a trypsin-like protease from the bacterium
Bacteroides gingivalis isolated from human dental plaque. *Archs. Oral*
Biol. 29, 559-564, 1984.
- 60) Kinder,S.A. and Holt,S.C. : Characterization of coaggregation between
Bacteroides gingivalis T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. *Infect.*
Immun. 57, 3425-3433, 1989.
- 61) Kinder,S.A. and Holt,S.C. : Localization of the *Fusobacterium*
nucleatum T18 adhesin activity mediating coaggregation with
Porphyromonas gingivalis T22. *J. Bacteriol.* 175, 840-850, 1993.
- 62) Suido,H., Eguchi,T., Tanaka,T. and Nakamura,M. : Identification of
periodontopathic bacteria based upon their peptidase activities. *Adv.*
Dent. Res. 2, 304-309, 1988.
- 63) Loesche,W.J. : The identification of bacteria associated with
periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral*

- Microbiol. Immunol.* 1, 65-70, 1986.
- 64) Gibbons,R.J., Hay,D.I., Childs,W.C.I. and Davis,G. : Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Archs. Oral Biol.* 35, 107-114, 1990.
- 65) Naito,Y. and Gibbons,R.J. : Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. *J. Dent. Res.* 67, 1075-1080, 1988.
- 66) Chen,H.A., Johnson,B.D., Sims,T.J., Darveau,R.P., Moncla,B.J., Whitney,C.W., Engel,D. and Page,R.C. : Humoral immune response to *Porphyromonas gingivalis* before and following therapy in rapidly progressive periodontitis patients. *J. Periodontol.* 62, 781-791, 1991.
- 67) Ogawa,T. Kiyono,H., Kusumoto,Y., Shimauchi,H., McGhee,J.R. and Hamada,S. : Immune response to *Porphyromonas(Bacteroides) gingivalis* components in various human periodontal diseases. *Quintessence Publishing Co., Tokyo.* 187-198, 1991.
- 68) Lopatin,D.E., LaBelle,D. and Lee,S.W. : Measurement of relative avidity of antibodies reactive with *Porphyromonas(Bacteroides) gingivalis* in the sera of subjects having adults periodontitis. *J. Periodont. Res.* 26, 167-175, 1991.
- 69) Mongiello,J.R. and Falker,Jr.,W.A. : Sugar inhibition of oral *Fusobacterium nucleatum* hemagglutinin and cell binding. *Archs. Oral*

Biol. 24, 539-545, 1979.

- 70) 小崎正晴 : *Fusobacterium nucleatum* のヒト由来細胞への付着 . 広大歯誌 19, 33-45, 昭和 62.
- 71) Metzger,J.W., Sawyer,W.H., Wille,B., Biesert,L., Bessler,W.G. and Jung,G. : Interaction of immunologically-active lipopeptides with membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1149, 29-39, 1993.
- 72) Berg,H.C. : Bacterial behaviour. *Nature.* 254, 389-392, 1975.
- 73) Koshland,Jr.,D.E. : Biochemistry of sensing and adaptation in a simple bacterial system. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 765-782, 1981.
- 74) Gibbons,R.J. and Qureshi,J.V. : Virulence-related physiological changes and antigenic variation in populations of *Streptococcus mutans* colonizing gnotobiotic rats. *Infect. Immun.* 29, 1082-1091, 1980.
- 75) Griffin,Jr.,F.M. : Mononuclear cell phagocytic mechanism and host defence. In *Advances in Host Defense Mechanisms*, ed. Gallin,J.I. and Fauci,A.S. 1, pp.31-55, New York: Raven Press, 1993.
- 76) van Loosdrecht,M.C., Lyklema,J., Norde,W., Schraa,G. and Zehnder,A.J. : Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1898-1901, 1987.
- 77) Gibbons,R.J. : Bacterial adhesion to oral tissues: A model for

- infectious disease. *J. Dent. Res.* 68, 750-760, 1989.
- 78) Gibbons,R.J. and Hay,D.I. : Adsorbed salivary proline-rich proteins as bacterial receptors on apatitic surfaces. *Molecular Mechanisms of Microbial Adhesion*, Springer-Verlag, New York, pp.143-169, 1989.
- 79) Haapasalo,M., Kerosuo,E. and Lounatmaa,K. : Hydrophobicities of human polymorphonuclear leukocytes and oral *Bacteroides* and *Porphyromonas spp.*, *Wolinella recta*, and *Eubacterium yurii* with special reference to bacterial surface structures. *Scand. J. Dent. Res.* 98, 472-481, 1990.
- 80) Satou,J., Fukunaga,A., Satou,N., Shintani,H. and Okuda,K. : Streptococcal adherence on various restorative marterials. *J. Dent. Res.* 67, 588-591, 1988.

表題脚注

* 広島大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任：岡本 莫教授)

本論文の要旨は、平成5年6月第98回日本歯科保存学会春季学会、平成5年10月第35回歯科基礎医学会総会、平成5年10月第36回秋季日本歯周病学会学術大会、平成6年4月第37回春季日本歯周病学会学術大会、平成6年6月第27回広島大学歯学会総会において発表した。

表 1 . 液体培養 (A) および平板培養 (B)
 した *F.nucleatum* のヒト赤血球凝集反応に及
 ぼすアミノ酸および糖添加の影響

A

Liquid culture

Inhibitor	Minimum inhibitory concentration (mM)								
	ATCC 10953	ATCC 25586	F-0	F-3	F-4	F-7	F-8	F-11	F-13
L-arginine	0.78	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
L-histidine	50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
L-lysine	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
D-galactose	>50	25	>50	12.5	12.5	6.25	>50	-	-
N-acetyl-D-galactosamine	>50	6.25	>50	6.25	12.5	3.13	>50	-	-
lactose	>50	12.5	>50	6.25	3.13	6.25	>50	-	-

- ; No hemagglutination

B

Solid culture

Inhibitor	Minimum inhibitory concentration (mM)								
	ATCC 10953	ATCC 25586	F-0	F-3	F-4	F-7	F-8	F-11	F-13
L-arginine	0.78	50	25	25	50	>50	>50	50	50
L-histidine	50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
L-lysine	>50	25	25	50	50	>50	>50	50	>50
D-galactose	>50	>50	>50	25	12.5	12.5	>50	>50	>50
N-acetyl-D-galactosamine	>50	>50	>50	12.5	25	6.25	>50	>50	>50
lactose	>50	>50	>50	12.5	6.25	6.25	>50	>50	>50

表 2 . *F. nucleatum* の ヒ ト 赤 血 球 凝 集 反 応 に 及 ぼ す
 免 疫 血 清 の 各 免 疫 グ ロ ブ リ ン 画 分 の
 影 響

Inhibitor	Maximum inhibitory dilution titer			
	<i>F. nucleatum</i> strain			
	ATCC 10953	ATCC 25586	F-0	F-7
anti A-HA serum	640(0.120)	<1	2(38.1)	<1
anti A-HA IgG fraction	60(0.020)	<1	<1	<1
anti A-HA IgA fraction	16(0.190)	N.D.	<1	N.D.
anti A-HA IgM fraction	1(0.950)	N.D.	<1	N.D.
normal rabbit serum	16(4.41)	<1	2(35.3)	<1

() ; mg/ml , <1 ; No inhibition , N.D. ; Not done .

表 3 . 液体培養 (A) および平板培養 (B)
 における *F.nucleatum* の赤血球凝集反応に及
 ぼす抗 A-HA 抗体 (抗血清 , 抗 A-HA IgG 画
 分) の影響

A

Strain	Liquid culture	
	Maximum inhibitory dilution titer	
	Anti A-HA serum	Anti A-HA IgG
ATCC10953	640 (0.12)	60 (0.02)
ATCC25586	<1	<1
F-0	2	<1
F-1	<1	<1
F-2	<1	<1
F-7	<1	<1
F-8	<1	<1
F-11	-	-
F-13	-	-

() ; mg/ml , <1 ; No inhibition , - ; No hemagglutination .

B

Strain	Solid culture	
	Maximum inhibitory dilution titer	
	Anti A-HA serum	Anti A-HA IgG
ATCC10953	128 (0.60)	16 (0.07)
ATCC25586	8	2
F-0	8	4
F-1	4	<1
F-2	2	<1
F-7	<1	<1
F-8	<1	<1
F-11	4	1
F-13	8	4

() ; mg/ml , <1 ; No inhibition .

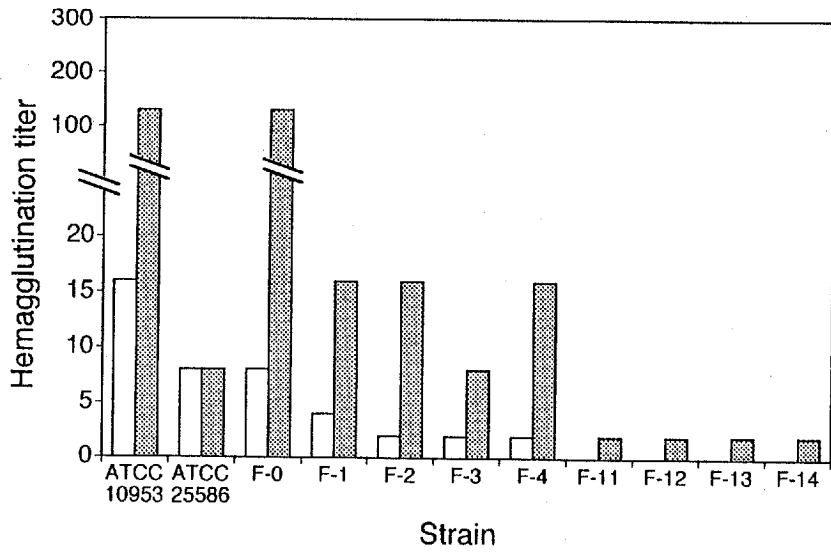


図 1 . 液体培養および平板培養した *F. nucleatum* によるヒト赤血球凝集反応 .

□ ; 液体培養した *F. nucleatum* ,

▨ ; 平板培養した *F. nucleatum* .

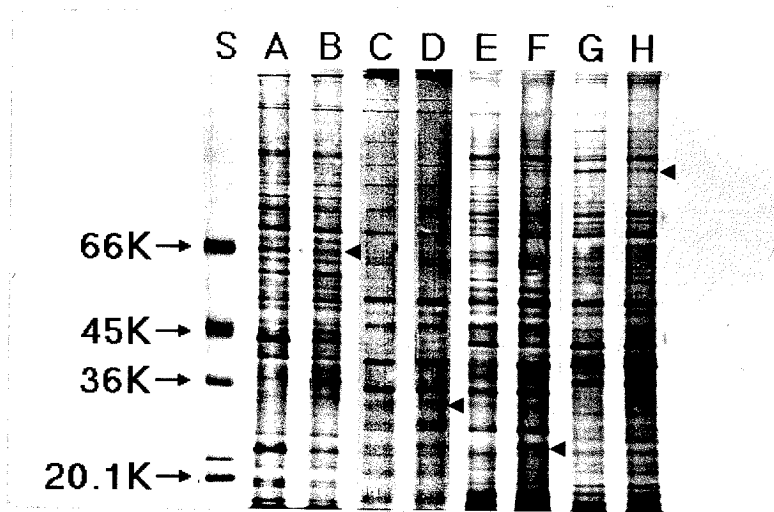


図 2 . 液体培養および平板培養した *F. nucleatum* の外膜画分の SDS-PAGE .

S; 標準タンパク質マーカー , A,B; ATCC 10953株 , C,D; ATCC 25586株 , E,F; F-0株 , G,H; F-7, A,C,E,G; 液体培養した *F. nucleatum*, B,D,F,H; 平板培養した *F. nucleatum* , ◀; 矢尻はバンドに変化が見られた主な箇所の一部を示す.

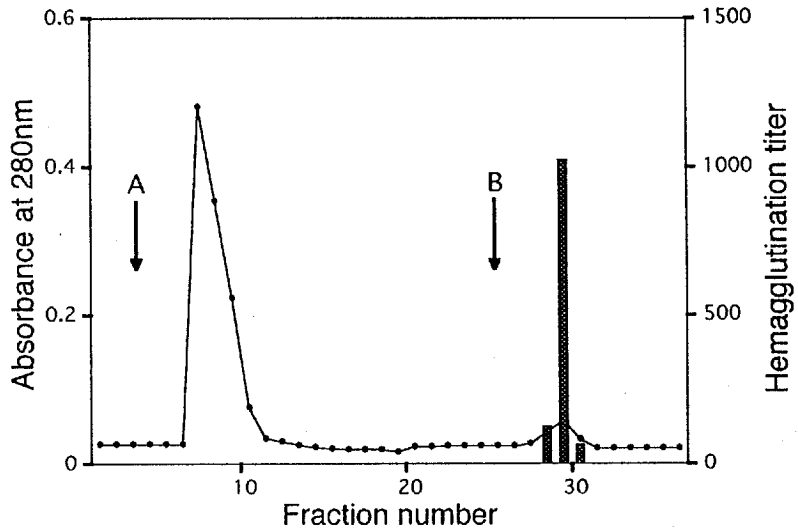


図 3 . トリプシン処理外膜標品の *n*-オクタール
 β -D-チオグルコシド可溶性画分の L-ア
 ルギニンアフィニティークロマトグラム
 ム .
 A; 10mM PBS + 20mM *n*-オクタール β -D-チオグ
 ルコシド + 1M NaCl , B; 10mM PBS + 20mM *n*-
 オクタール β -D-チオグルコシド + 100mM L-
 アルギニン塩酸塩 + 1M NaCl , ■ ; L-アル
 ルギニン溶出画分の透析後の赤血球凝集
 活性 .

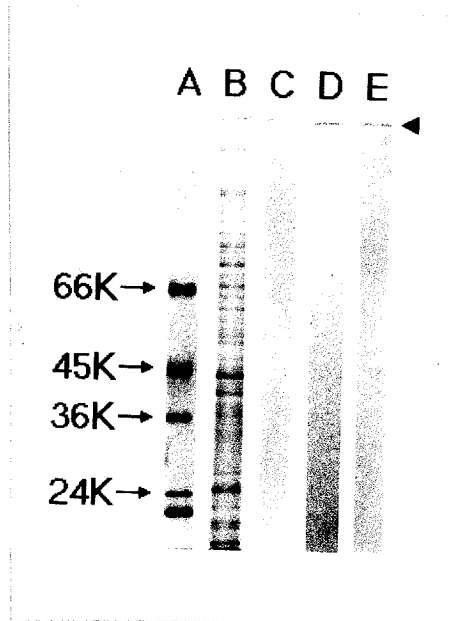


図 4 . *F. nucleatum* ATCC 10953 株 の TOM および A-HA の SDS-PAGE と 抗 A-HA 抗体 を 用 いた Western blotting. A; 標 準 タ ン パ ク 質 マ ー カ ー , B; TOM の SDS-PAGE , C; A-HA の SDS-PAGE , D; TOM の Western blotting , E; A-HA の Western blotting , ◀ ; 矢 尻 は A-HA の バ ン ド の 位 置 を 示 す .

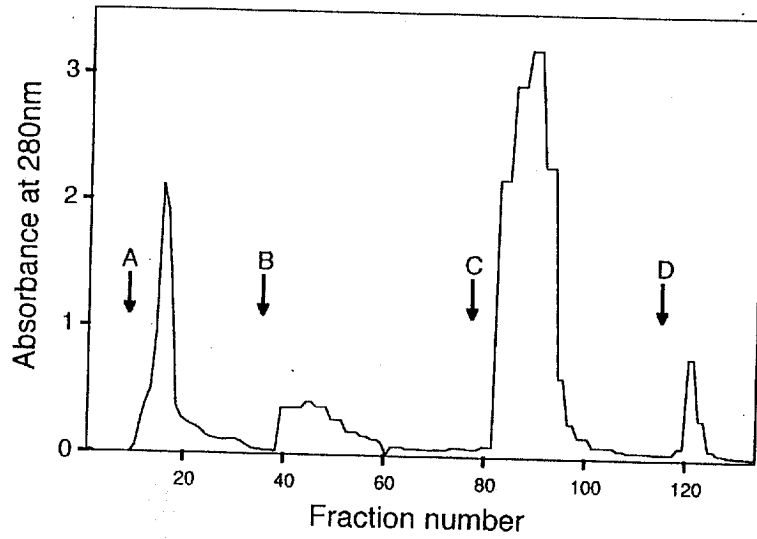


図 5 . A-HA ウ サ ギ 免 疫 血 清 の DEAE-Sepharcel の 免 疫 グ

ロ ブ リ ン 分 画 の 溶 出 パ タ ー ン :

A; 0.01M NaCl,

B; 0.05M NaCl,

C; 0.2M NaCl,

D; 1.0M NaCl.

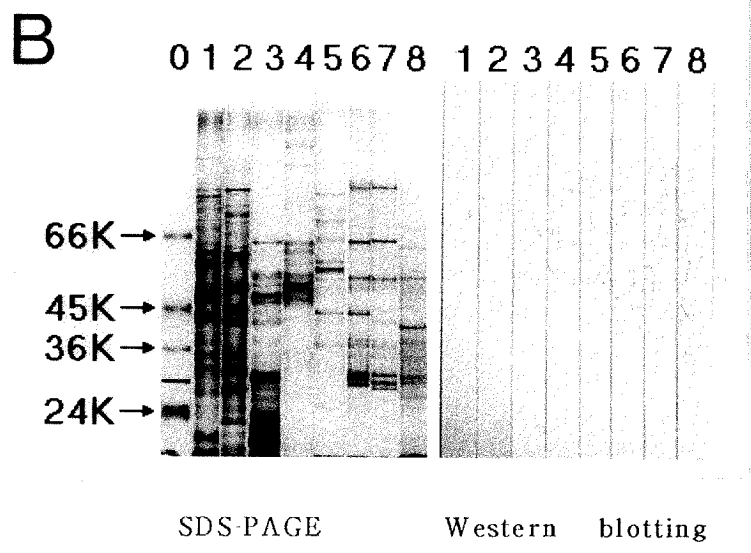
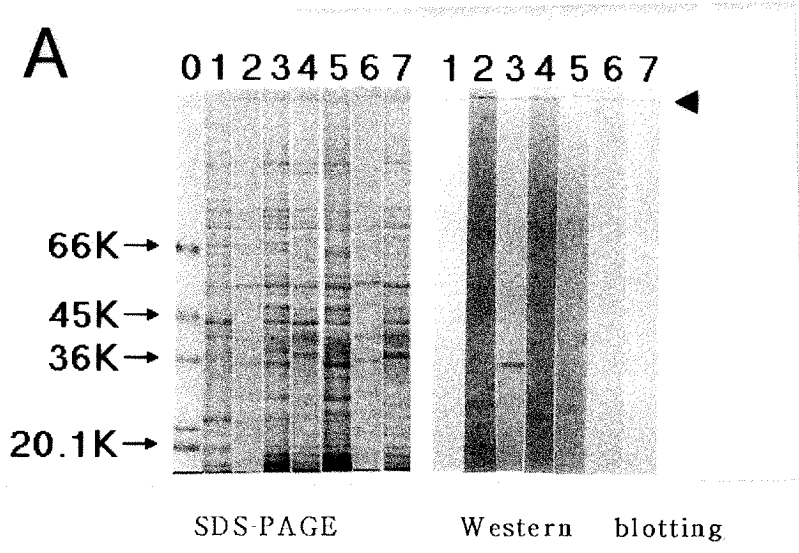


図 6 . 液体培養した *F. nucleatum* (A) および他の歯周病原菌 (B) の各菌株の外膜画分の SDS-PAGE と抗 A-HA 抗体を用いた Western blotting .

【図 6 中の数字の注釈については次ページに記載】

日野孝宗

A : 0 ; 標準タンパク質マーカー , 1 ; ATCC
10953株 , 2 ; ATCC 25586株 , 3 ; F-0株 , 4 ; F-7株 ,
5 ; F-9株 , 6 ; F-11株 , 7 ; F-13株 ,

B : 1 ; *C. ochracea* Cp-1株 , 2 ; *P. asaccharolytica* ATCC25260株 , 3
; *P. gingivalis* 381株 , 4 ; *P. gingivalis* Pg-1株 , 5 ; *P. gingivalis*
Pg-2株 , 6 ; *P. intermedia* ATCC25261株 , 7 ; *P. intermedia* Pi-1
8 ; *P. intermedia* Pi-2株 ,

◀ ; 矢尻は反応の見られたバンドの位置を示
す .

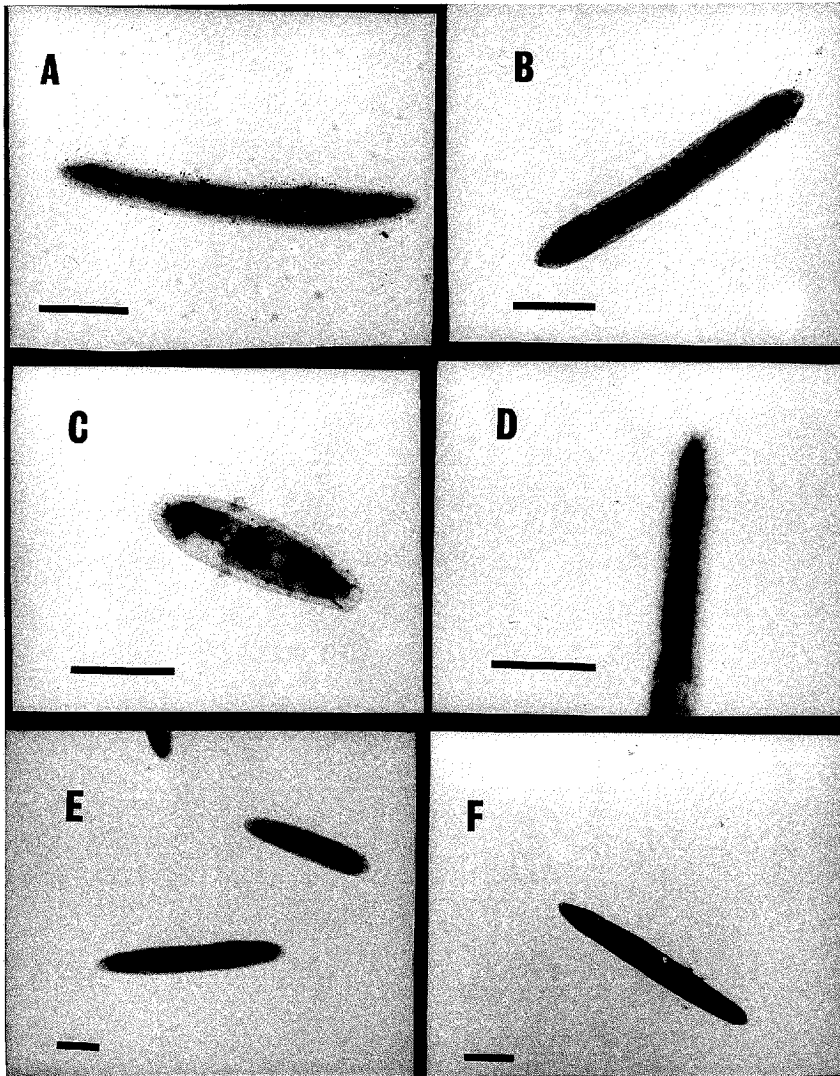


図 7 . 液体培養した *F. nucleatum* の全菌体のネガティブ染色による金コロイド免疫の透過型電子顕微鏡像 .

A; ATCC 10953株 , B; ATCC 25586株 , C; F-0株 , D; F-7株 , E; F-9株 , F; F-11株 , バー ; 1 μ m .

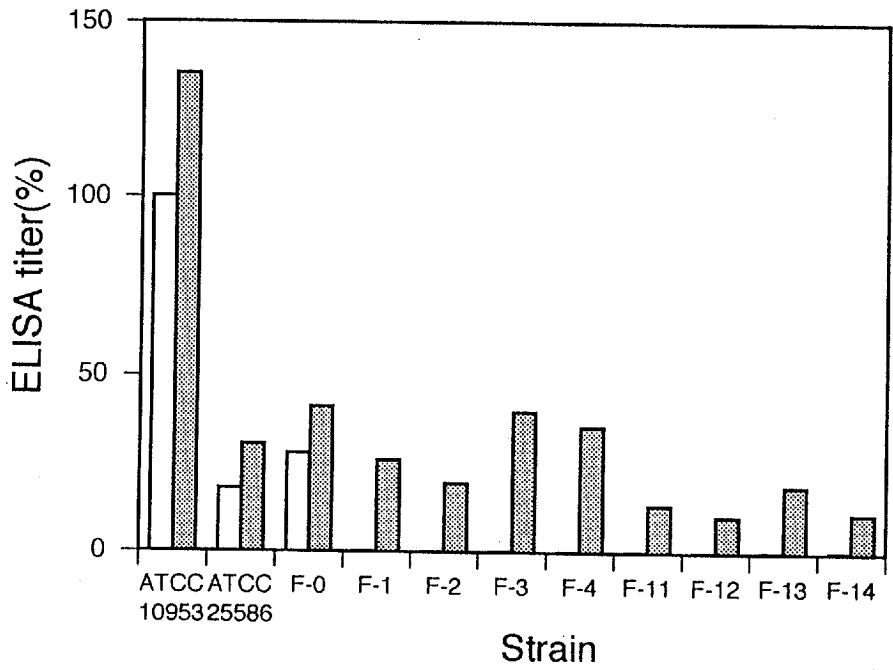


図 8 . 液体培養した *F. nucleatum* の全菌体および
 TOM と抗 A-HA 抗体との ELISA による抗原
 力価 .
 □ ; *F. nucleatum* の全菌体 ,
 罫 ; *F. nucleatum* の TOM .

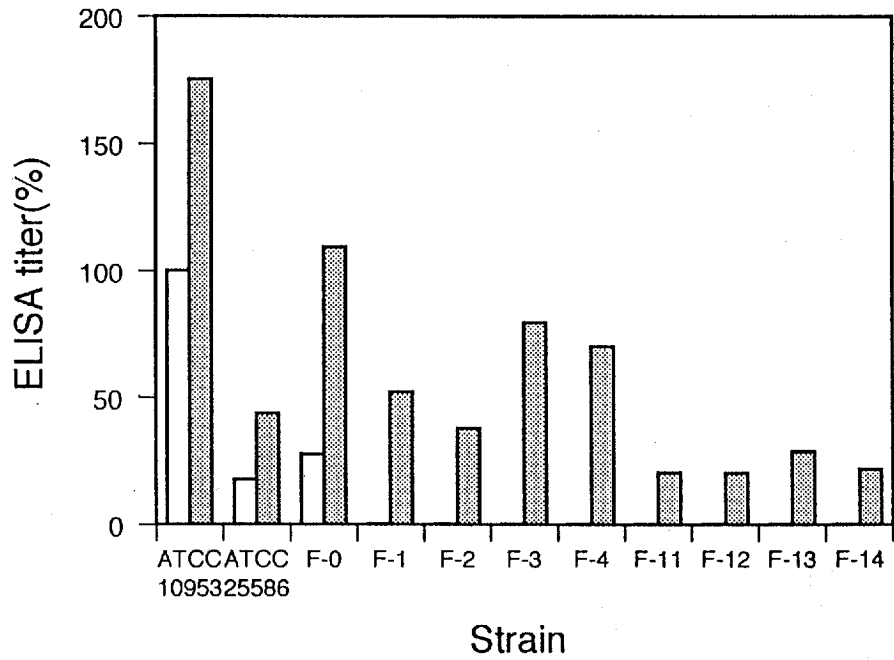


図 9 . 液体および平板両培養における *F.nucleatum* の全菌体と抗 A-HA 抗体との ELISA による抗原力価 .

□ ; 液体培養した *F. nucleatum* ,

▨ ; 平板培養した *F. nucleatum* .

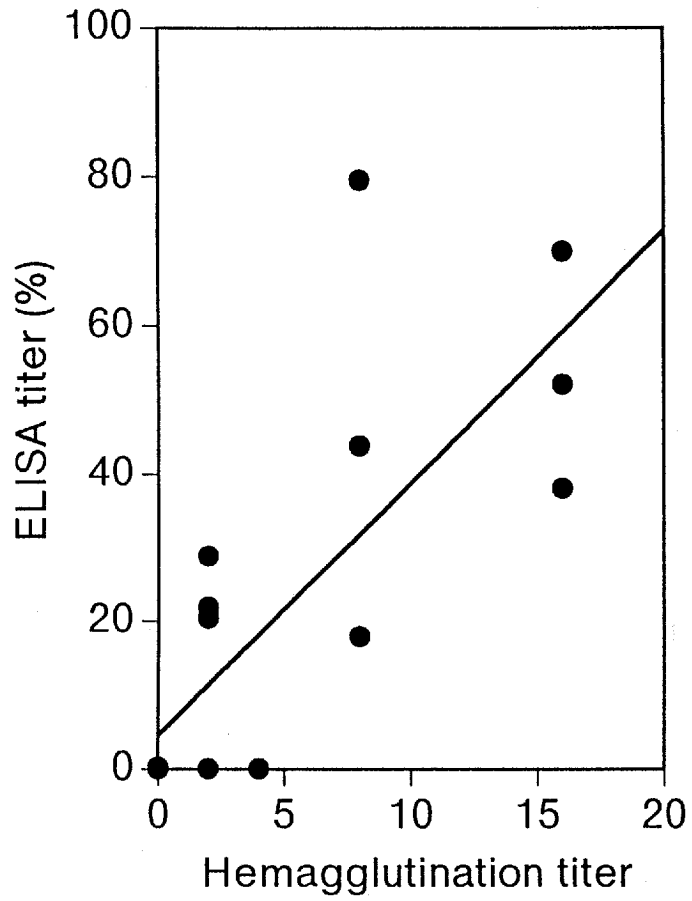


図 1 0 . A-HA 抗 原 力 価 と 赤 血 球 凝 集 価 と の 関
係 .

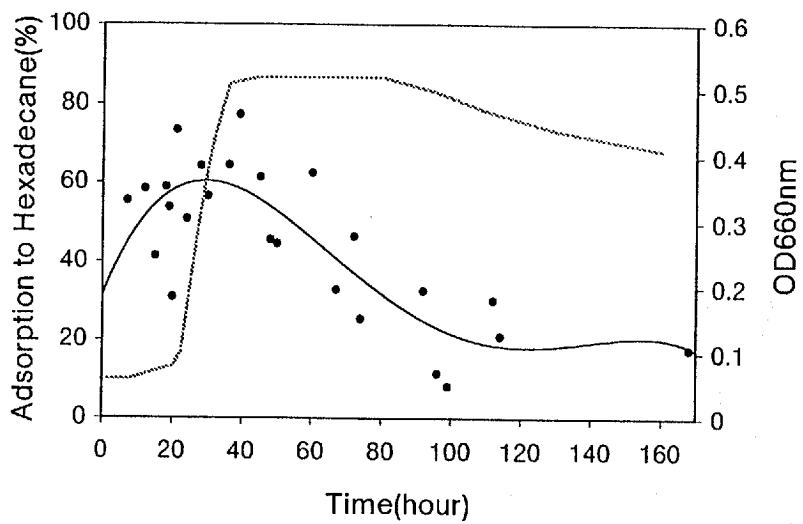


図 1.1 . *F. nucleatum* ATCC 10953株 の 増 殖 曲 線 と n-ヘ キ サ
 デ カ ン へ の 吸 着 率 .
 実 線 - ; 吸 着 率 曲 線 ,
 破 線 ... ; 増 殖 曲 線 .

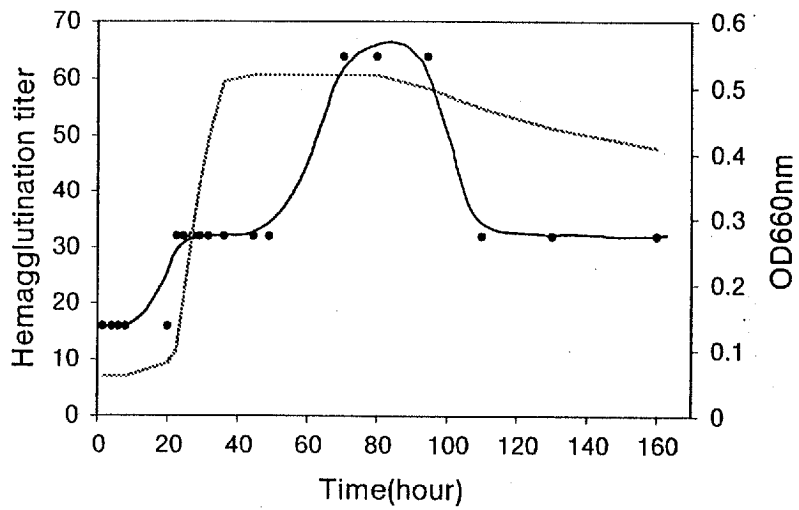


図 1 2 . *F. nucleatum* ATCC 10953株 の 増 殖 曲 線 と 赤 血 球

凝 集 活 性 の 推 移 .

実 線 - ; 赤 血 球 凝 集 活 性 曲 線 ,

破 線 ... ; 増 殖 曲 線 .

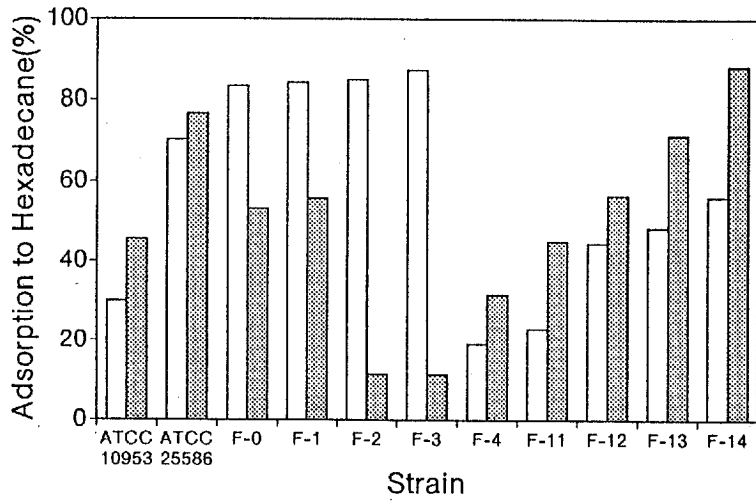


図 1 3 . 液体および平板両培養における
F.nucleatum 各菌株の n-ヘキサデカンへの
 吸着率 .

□ ; 液体培養した *F.nucleatum* ,

▨ ; 平板培養した *F.nucleatum* .

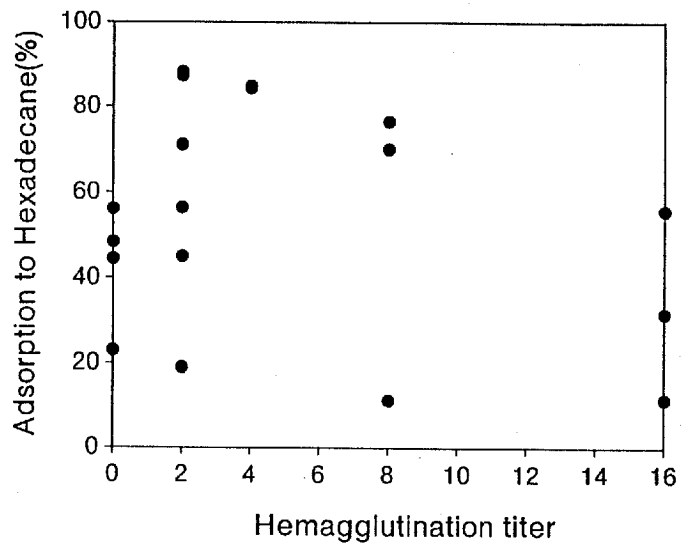


図 1 4 . n-ヘキサデカンへの吸着率と赤血球凝集価との関係 .

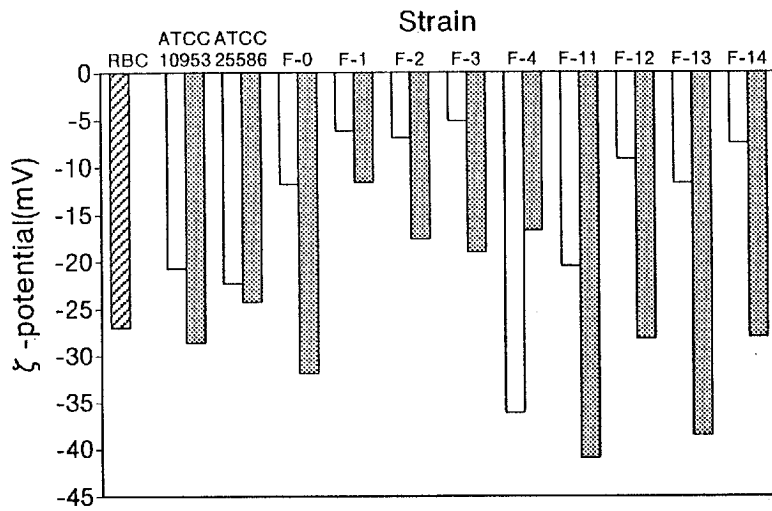


図 1 5 . 液体および平板両培養における
F. nucleatum 各菌株とヒト赤血球の
 ζ - 電位 .

□ ; 液体培養した *F. nucleatum* ,

▨ ; 平板培養した *F. nucleatum* ,

▩ ; ヒト赤血球 (RBC) .

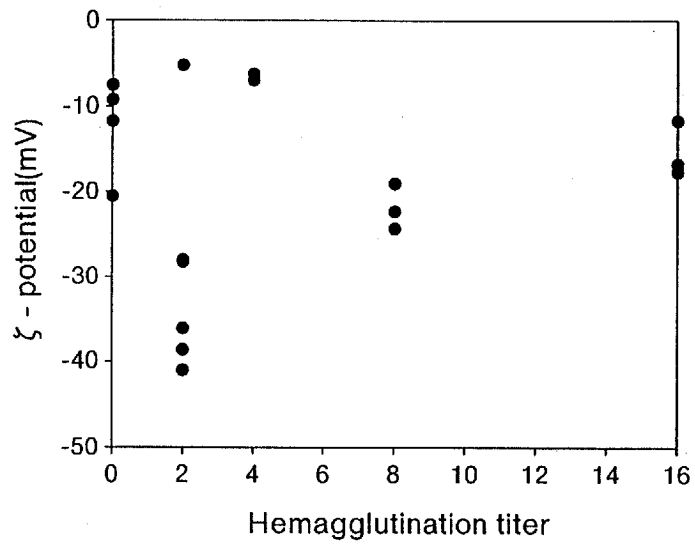


図 1 6 . ζ - 電位 と 赤 血 球 凝 集 価 と の 関 係 .