The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Actinomyces viscosusのグルカンによる菌体凝集の機序
Author(s)	和田, 甫
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/31974
rights	Copyright © 特定非営利活動法人日本歯周病学会
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Actinomyces viscosus のグルカンによる菌体凝集の機序

和田　甫

大阪大学歯学部口腔治療学講座
（主任：岡田宏教授）

（昭和52年9月20日受付）

The Mechanism of Glucan-Induced Agglutination of *Actinomyces viscosus*

Hajime Wada

Department of Oral Medicine, Osaka University Dental School
(Chief: Prof. Hiroshi Okada)

The mechanism of glucan-induced agglutination of *Actinomyces viscosus* was investigated using strain ATCC 15987 as a main test organism. *A. viscosus* cells attached only slightly to the uncoated enamel surface of extracted human premolars, whereas the cells markedly attached to the cement surface. The attachment of *A. viscosus* cells to the enamel surface was markedly enhanced by covering the surface with an artificial plaque consisting of cells and glucans of sucrose-grown *Streptococcus mutans*.

This enhanced attachment seemed to occur as a consequence of the agglutination of *A. viscosus* by the cell-associated glucan synthesized by *S. mutans*, because it was shown that a suspension of *A. viscosus* cells co-agglutinated with a suspension of sucrose-grown cells of *S. mutans*. The glucan agglutination of *A. viscosus* results from the binding of glucan molecules to a bacterial cell surface.

This agglutination activity of *A. viscosus* was shown to be lost when the cells were either digested with trypsin or heated at 100 C for 10 min, suggesting the protein nature of a glucan receptor site. Among a variety of polysaccharides examined, only high molecular weight glucans containing α-1, 6 bonds as the main glycosidic linkage exhibited the activity to agglutinate *A. viscosus* cells. A study with chemically modified dextrans has revealed that C_1-carboxylated dextran was active, but C_6-carboxylated dextran was inactive in inducing agglutination of *A. viscosus*, indicating the importance of nonreducing ends of the glucan in its attachment to the receptor of the cells.

緒　　論

放線菌は，ヒトや齧歯類の口腔内，特に歯肉溝やデンタルプラーク（dental plaque，以下プラークと略称する）から検出される微生物の一つである[1~7]。1964年のJordan と Keyes らの研究[8]以来，ヒトおよびハムスターやラットの口腔から分離される ***Actinomyces viscosus*** のなかに，齧歯類に実験的に歯周病ならびに歯頸部う蝕を誘発させるもののあることが明らかにされ，注目されている[8~14]。

一般に，口腔細菌が歯肉溝あるいは歯面に病害作用を効果的に発揮するためには，まずその部位に足場をえること（定着）が必要である。***A. viscosus*** についても例外ではなく，上記の病原性を惹起するためには，歯肉あるいは歯面に定着し，かつ増殖することにより病害作用

を発揮するのに必要な生菌数を維持しなければならないと考えられる。

さて，口腔細菌の歯面や歯肉への定着を助ける要因の一つとして重要視されているものに，プラークの主要構成メンバーである *Streptococcus mutans* や *Streptococcus sanguis* によって生成される菌体外グルカン[15]による細菌の菌体凝集という現象[16]がある。

1969年に *S. mutans* について見い出されたこのグルカンによる菌体凝集現象は，ハムスターで歯周病をひき起こすことが Jordan ら[8]により実験的に証明されている *A. viscosus* ATCC 15987 株についても起こることが，1975年に Mcbride ら[17]によって明らかにされた。すなわちこの菌は，*Leuconostoc mesenteroides* が作る α (1→6) グルコシド結合を主結合とするグルカン（高分子量デキストラン），ならびに *S. mutans* や *S. sanguis* がスクロースから菌体外多糖として作るグルカンによって凝集することが示された。

この所見は，*A. viscosus* の歯面や歯肉溝への定着に，*S. mutans* や *S. sanguis* が作り，プラークの主要な構成成分の一つであるグルカン[18~20]による菌体凝集が重要なかかわり合いを持つ可能性を強く示唆するものとして，意味がある[21]。

以上のように，*A. viscosus* のグルカンによる菌体凝集は，この菌の病害作用発現の第一歩として重要と考えられるのに，関係する菌体側およびグルカン側の因子，両者の相互作用などについては，ほとんど何も明らかにされていない。

この研究では ATCC 15987 株を主な供試菌として，まずグルカンによる菌体凝集が *A. viscosus* の歯面への定着に演じる役割についてモデル実験を行ない，ついでグルカンによる *A. viscosus* の菌体凝集の機序を種々の角度から解析した。

材料と方法

1. 供試菌株とその培養

A. viscosus ATCC 15987 株を主なテスト菌株として用いたが，他に同じ菌種に属する ATCC 15988 株，ATCC 19246 株，NY 1 株および T36 株，また *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 株および ACN-1 株，ならびに *Actinomyces odontolyticus* ATCC 17982 株などの種々の放線菌をも供試した。さらに *S. mutans* K1R 株，*S. sanguis* ATCC 10556 株，*Streptococcus salivarius* HHT 株，*Staphylococcus aureus* 209 P 株，*Escherichia coli* K12 株および *Lactobacillus casei* PS 1 株を対照実験におけるテスト菌とした。また可溶性グルカンの調製には，*S. mutans* FA1 株を用いた。なお，*A. viscosus* NY 1 株は Dr. B. Guggenheim (University of Zürich, Switzerland) より，*A. naeslundii* ACN-1 株は Dr. P.A. Mashimo (State University of New York, U.S.A.) より分与をうけた。他の菌株はすべて本学口腔細菌学教室に保存されていたものである。

供試菌株は，*A. viscosus* NY1 株および *L. casei* PS1 株を除き，すべて Trypticase Soy Broth（以下 TSB と略称，Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, Maryland, U.S.A.）に培養し，対数増殖期の菌を実験に用いた。*A. viscosus* NY 1 株の培養には Actinomyces Broth (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.) を，また *L. casei* PS 1 株の培養には，Rogosa SL Broth (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.) を使用した。

2. グルカンとフルクタン，およびデキストランとデキストランの誘導体

デキストランとしては，市販のデキストラン標品 T10，T40，T70，T250，T500 および T2000 (Pharmacia Co., Uppsala, Sweden) を用いた。他のグルカンおよびフルクタンとして，*S. mutans* OMZ 176 株が作る不溶性かつ粘着性のグルカン（グルコース残基が α (1→3) グルコシド結合した主鎖に α (1→6) グルコシド結合の側鎖がついたもの)[22] ならびに OMZ 176 株由来のグルコシルトランスフェラーゼを *Spicaria violaceae* IFO 6120 株由来の α (1→6) グルカナーゼの存在下でスクロースと反応させることによって調製した不溶性グルカン（そのグルコシド結合のほとんどが α (1→3) 結合のもの)[22]，*S. sanguis* ATCC 10556 株由来の可溶性グルカン，*Aspergillus niger* NRRL 326 株由来の不溶性グルカンおよび *S. salivarius* HHT 株由来のフルクタンは，いずれも本学口腔治療学教室恵比須繁之博士から恵与された。一方 *L. mesenteroides* NRRL 1355 株由来のデキストラン 1355，同じく *L. mesenteroides* 由来のデキストラン・メイトー，およびルテオース，ラミナラン，パキマン，C_1-カルボキシルデキストラン（デキストラン T2000 の還元末端グルコースのアルデヒド基を酸化してカルボキシル基にかえたものを，以下 C_1-カルボキシルデキストランとする)，C_6-カルボキシルデキストラン（デキストラン・メイトーの第一級アルコールを酸化してカルボキシル基にかえたものを，以下 C_6-

カルボキシルデキストランとする）ならびにデキストランポリアルコール（デキストラン T2000 を過ヨウ素酸酸化して得られたポリアルコールをデキストランポリアルコールとする，図5参照）などの標品は，大阪市立大学，生活科学部の三崎旭教授から恵与を受けた。その他可溶性デンプン（和光純薬，大阪），セルロース（フナコシ薬品，東京），グリコーゲン（半井化学，京都）およびデキストランサルフェート（Pharmacia Co., Uppsala, Sweden）はいずれも市販品を入手した。

3. エナメル質およびセメント質ブロック

竹村の記載[24]に従って作製した。すなわち，ヒトの新鮮抜去永久歯を浮石末で研磨し，かつ超音波洗浄器を用いて十分洗った後，頰側面あるいは舌側面部から，少なくとも肉眼的に調べた限りでは健常なエナメル質あるいはセメント質表面を含むブロック（約 3 mm×4 mm×2 mm）を採取した。滅菌ブロックを必要とする実験の場合には，試料の条件を統一するために，ブロックは高圧蒸気滅菌して用いた。

4. "人工プラーク" を形成させたエナメル質ブロックの調製

3%スクロースを添加した TSB の 200 m*l* に，滅菌エナメル質ブロックを浸し，ここに *S. mutans* K1R 株を 18 時間培養したものの 10 m*l* を加え，攪拌しながら，37°C で 48 時間培養を続行した。K1R 株ならびにこの菌がスクロースから産生したグルカンからなる "人工プラーク" でおおわれたエナメル質ブロックをとり出し，精製水で洗浄したのち，実験に供した。

5. 走査型電子顕微鏡による観察

テスト菌体を付着させる操作を施したエナメル質およびセメント質ブロックを，0.1 M（終末濃度，特に断わらない限り以下同じ）塩化ナトリウムおよび 0.5 M 燐酸緩衝液（pH 6.8）の存在下で，2.5% のグルタルアルデヒドにより 18 時間固定した。固定した標品は精製水で十分洗浄し，エタノールで脱水後，減圧乾燥した。ついでブロックの歯牙表面に相当する面に，イオンコーター（IB-3 形，エイコーエンジニアリング，茨城）を用いて，約 200Å の厚さの金蒸着を施した後，走査型電子顕微鏡（MSM-4 T 型，日立—明石製作所，茨城）を用いて観察した。

6. *A. viscosus* と *S. mutans* との異種菌体間での凝集の測定

S. mutans K 1R 株の 18 時間培養菌を約 10^6 細胞/m*l* になるように TSB に接種し，37°C で 18 時間培養した。培養を 6,000 g で 15 分間遠心して集菌し，菌体を 0.01 M 燐酸緩衝液（pH 6.5）で十分洗浄後，0.05 M 同緩衝液中に浮遊させた。この菌浮遊液に終末濃度が 3% となるようにスクロースを加えて 37°C で 1 時間反応させ，K1R 株菌体表面にグルカンを生成させた。未反応のスクロースおよび可溶性グルカンを除くために，この反応液を 3,000 g で 15 分間遠心し，沈渣を 0.01 M の上記緩衝液で十分遠心洗浄した後，精製水に適当な濃度となるように浮遊させた。

一方，*A. viscosus* ATCC 15987 株の TSB 48 時間培養菌を洗浄後，0.05 M 燐酸緩衝液（pH 6.5）の存在下で菌濃度が約 2 mg/m*l* になるように浮遊させ，この浮遊液の 1 m*l* と種々の細胞濃度の K1R 株菌浮遊液の 1 m*l* とを，37°C で反応させた。15 分毎に，反応液を攪拌しながら 2 時間反応させ，最終の攪拌から 15 分間後に，上液の濁度を Bausch & Lomb の Spectronic 20（島津製作所，京都）を用い，550 mμ の波長で測定し，この値を上記 2 種の細菌体間で起こる凝集の程度を測る指標とした。なお対照実験には，スクロースと反応させていない，すなわちグルカンを菌体表面にもたない K 1R 株菌浮遊液を用いた。

7. グルカンによる菌体凝集の測定

供試菌を約 1 mg/m*l* になるように 0.05 M 燐酸緩衝液（pH 6.8）の存在下で浮遊させたものに種々の濃度のグルカンを加え，37°C で 2 時間反応させ，菌体の凝集の有無と程度を肉眼で判定した。なお，グルカンを 1 mg/m*l* から連続 10 倍稀釈し，テスト菌体の凝集をひき起こす最少凝集濃度（minimal agglutination concentration, MAC とする）を測定し，供試した菌とグルカンの組み合せにおける凝集の強さの指標とした。

8. *S. mutans* FA 1 株の可溶性グルカン（グルカン FA 1）

S. mutans FA 1 株の培養上清由来のグルコシルトランスフェラーゼを，0.05 M の燐酸緩衝液（pH 6.8）中で，5% スクロースと 37°C で 6 時間反応させた。反応液を 12,000 g で 20 分間遠心した上清に 2 倍容のエチルアルコールを加え，4°C に 24 時間静置した。生じた沈殿を 12,000 g で 20 分間遠心して集め，75% エチルアルコールで洗浄した後，精製水に再溶解し，この液を上記条件で遠心し，上清を凍結乾燥して実験に用いた。ちなみに，このようにして得られた多糖がグルカンであることは竹村[24]により確かめられた。

同位元素により標識したものは，スクロース-^{14}C (u)（The Radiochemical Centre, Amersham, England, 556 mci/mmol）を基質として上述の条件で生合成させ，

実験には 540 ng/m*l* 溶液として用いた。

9. 結合グルカン量の測定

1 mg/m*l* の凍結乾燥菌浮遊液と種々の濃度の ^{14}C-グルカンとを，0.05 M 燐酸緩衝液（pH 6.5）中で，1時間，37°C で反応させた。反応液を 6,000 g で 10 分間遠心し，沈渣を上記緩衝液で十分遠心洗浄して未結合の ^{14}C-可溶性グルカンを洗い去った後，Suginaka ら[25]の記載に従って，0.5 m*l* の 4% ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）に溶解し，菌体に結合した放射能を液体シンチレーションスペクトロメーター（Aloka, Type LSC-653，東京）で測定した。えられた価を基準にして，供試全菌体に結合したグルカン量を算出した。

結　　果

1. *A. viscosus* の歯面への付着

A. viscosus が歯面に定着するための機構の一つとして，グルカンによる凝集という現象の関与が考えられる。そこでまず，*A. viscosus* が歯面に付着するかどうかを検討するために，ATCC 15987 株が，歯面ならびに歯面に *S. mutans* 菌体と *S. mutans* が作るグルカンからなる“人工プラーク”を形成させたものとどのように反応するかを，走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

1） 歯面への直接的付着

TSB に 48 時間培養した ATCC 15987 株の菌体を，0.01 M 燐酸緩衝液（pH 6.5）で洗浄後，0.05 M の同緩衝液に約 10^{10} 細胞/m*l* となるように浮遊させた。この菌液を 2 分し，一半にはエナメル質ブロック，他半にはセメント質ブロックを浸し，37°C で 1 時間反応させた。ブロックを精製水で洗浄後，方法の項で述べたような処理を施して電顕観察試料とした。

図 1 (a) はエナメル質面への，(b) はセメント質面への ATCC 15987 株菌体の付着の状態を示す。テスト菌は，エナメル質面にはほとんど付着しないが，セメント質面にはよく付着することが明らかである。

2） “人工プラーク” 面への付着

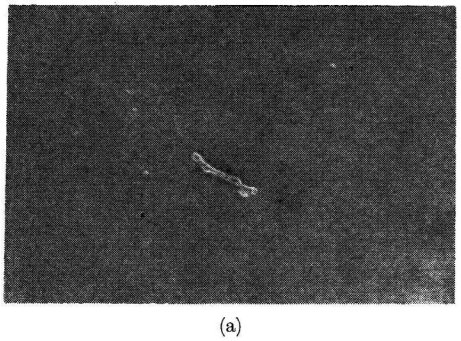
S. mutans K1R 株とこの菌が産生するグルカンによってあらかじめその表面を被覆したエナメル質ブロックを，前項で述べた実験と同様，ATCC 15987 株浮遊液に 1 時間浸し，電顕観察に供した。

図 2 に示すように，“人工プラーク” でおおわれたエナメル質面には，未処理エナメル質面に対する場合とは異なり，供試した *A. viscosus* が著明に付着するのが認められた。

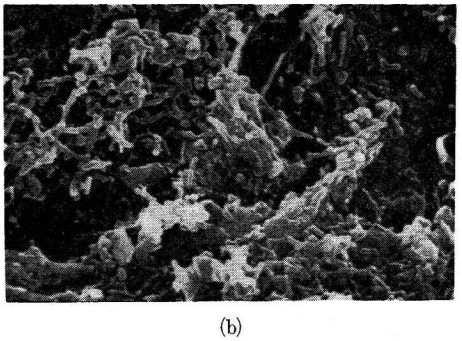
2. グルカンを介する *A. viscosus* と *S. mutans* の共同凝集

1 の 2） 項で述べた所見は，*S. mutans* が作るグルカンを介して *A. viscosus* がエナメル質表面に付着することを示唆する。この事を別の角度から確認するために，*A. viscosus* 浮遊液に，菌体表面にグルカンを生成させた種々の濃度の *S. mutans* 菌浮遊液，および対照として表面にグルカンをもたない *S. mutans* 菌浮遊液をそれぞれ加え，37°C で 2 時間反応させた。

グルカンを菌体表面に生成させた種々の濃度の *S. mutans* 細胞浮遊液を均一に懸濁していた *A. viscosus* 浮遊液に加えると，*A. viscosus* と *S. mutans* が，図 3 に示すような反応曲線にしたがって凝集し合って沈殿するのが観察された。一方対照では，*A. viscosus* と *S. mutans* の凝集はほとんど見られなかった。この所

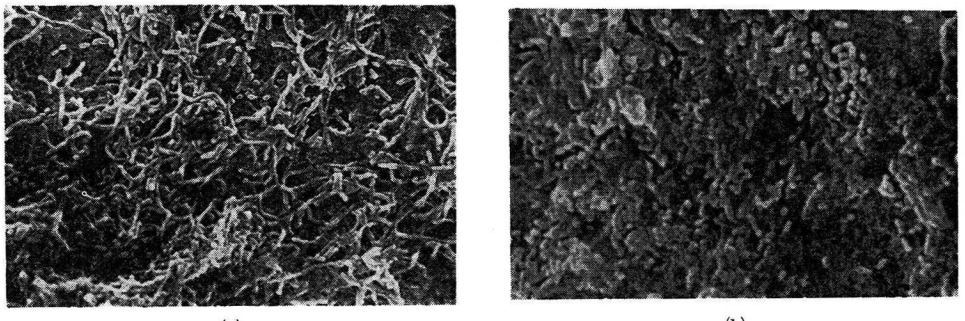


(a)



(b)

図 1　*A. viscosus* ATCC 15987 株の歯面への付着
(a) エナメル質面への付着
(b) セメント質面への付着
（いずれも直接倍率　×2,000）



(a) (b)

図 2 *S. mutans* とそれの産生するグルカンによって歯面に形成させた"人工プラーク"面への *A. viscosus* ATCC 15987 株の付着

(a) ATCC 15987 株と反応させた"人工プラーク"
(b) 対照の"人工プラーク"
(いずれも直接倍率 ×2,000)

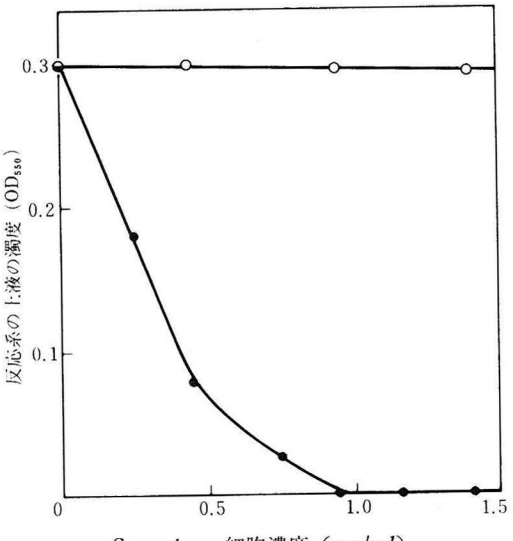


図 3 グルカンを介して起こる *A. viscosus* と *S. mutans* 菌体の共同凝集

● 菌体表面にグルカンを生成させた *S. mutans* を用いた場合
○ グルカンをもたない *S. mutans* を用いた場合

見は，"人工プラーク"面への *A. viscosus* の付着が，菌体表面にグルカンを生成した *S. mutans* との共同凝集によるものであることを示唆するものと考えられる。

3. *A. viscosus* ATCC 15987 株と他の菌株，ならびにその他の細菌種のデキストランおよびグルカン FA 1 による凝集

分子量約 200 万の高分子量デキストラン T 2000 および *S. mutans* FA 1 株に作らせた可溶性グルカン FA 1 による *A. viscosus* ATCC 15987 株の凝集を，*A. viscosus* の他の菌株及び *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, その他の菌種のそれと共に，調べた。また，*S. mutans* はスクロースによっても菌体凝集を起こすことが報告[19]されているが，同様な現象が ATCC 15987 株や他のテスト菌についても認められるかどうかをもあわせて検討した。

表1に示すように，ATCC 15987 株はデキストラン T 2000 およびグルカン FA 1 のいずれによっても，これら多糖の微量 (1 μg/ml) によって，凝集するのが認められた。また ATCC 15987 株以外の *A. viscosus* 菌株のうちの 2 株，すなわち NY 1 株および ATCC 15988 株や *A. naeslundii* ATCC 12104 株ならびに ACN-1 株，*A. odontolyticus* ATCC 17982 株を ATCC 15987 株と比べると高濃度を要するが，デキストランあるいはグルカン FA 1 により凝集を起こすことがわかった。しかし，*A. viscosus* であっても ATCC 19246 株ならびに T 36 株は，10^4 μg/ml の濃度のデキストラン T 2000，あるいは 10^3 μg/ml の濃度のグルカン FA 1 の添加によっても凝集しないことがわかった。ちなみに *S. mutans* K1R 株は，すでに Gibbons ら[16]が報告しているように，デキストラン T 2000 およびグルカン FA 1 のいずれによっても，ATCC 15987 株と同じく 1 μg/ml の濃度まで凝集を起こしたが，*S. sauguis* や *S. salivarius* では，実験に使用した濃度のグルカンの添加では凝集が見られなかった。また，スクロースを添加した対照実験において，*S. mutans* K1R 株は凝集したが，ATCC 15987 株では凝集は認められなかった。これは，*S. mutans* ではスクロースから生成されるグルカンによ

表 1 デキストラン T 2000, グルカン FA 1 ならびにスクロースによる各種の放線菌とレンサ球菌の菌体凝集

菌種と菌株	(由来)	デキストラン T 2000						グルカン FA 1					スクロース				
		糖濃度 (μg/ml)															
		10^4	10^3	10^2	10	1.0	10^{-1}	10^3	10^2	10	1.0	10^{-1}	10^3	10^2	10	1.0	10^{-1}
A. viscosus ATCC 15987	(ハムスターの歯垢)	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
ATCC 15988	(ハムスター)	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
NY1	(ラットの歯垢)	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
ATCC 19246	(ヒトの放線菌症)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
T 36	(豚の肺臓)	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
A. naeslundii ACN-1	(ヒトの歯垢)	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ATCC 12104	(ヒトの上顎洞)	+	+	+	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
A. odontolyticus ATCC 17982	(ヒト歯牙の軟化象牙質)	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
S. mutans K1R		+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−
S. sanguis ATCC 10556		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
S. salivarius HHT		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

って凝集が起こるのに対して，ATCC 15987 株は菌体外多糖としてフルクタンを生成する[26~29]が，グルカンを生成するという報告はなく[26~29]，またフルクタンでは 15987 株は凝集しないこと（表 7 参照）によると考えられる。なお，他のテスト菌でもスクロースによる凝集は認められなかった。

4. デキストランによる *A. viscosus* ATCC 15987 株の菌体凝集に対する反応条件の検討

1) テスト菌の増殖相と凝集活性

ATCC 15987 株の増殖曲線を求め，増殖の各相で集めた菌体のデキストラン T 2000 による凝集活性を比較した。その結果，対数増殖期の菌の凝集活性が最も強いことがわかった。

2) 反応温度

デキストラン T 2000 によるテスト菌の凝集の強さは，0.05 M 燐酸緩衝液（pH 6.8）の存在下，2 時間の反応では，20°C から 40°C の範囲内ではかわらず，20°C 以下あるいは 40°C 以上では，減弱した。

3) 反応時間

表 2 に示すように，ATCC 15987 株のデキストラン T 2000 による上記緩衝液存在下での 37°C での凝集は，反応 20 分後に検出できるようになり，以後時間の経過につれてより低いデキストラン濃度で凝集が認められるようになった。2 時間後には，1 μg/ml のデキストラン T 2000 によりテスト菌の凝集が認められ，その後 18 時間に至るまでこの状態は変わらなかった。

表 2 デキストラン T 2000 による *A. viscosus* ATCC 15987 株の凝集の時間による推移

反応時間	凝集 デキストラン濃度 (μg/ml)				
	1,000	100	10	1.0	0.1
5 (分)	−	−	−	−	−
10	±	−	−	−	−
20	+	±	−	−	−
30	+	+	±	−	−
45	+	+	±	−	−
60	+	+	+	±	−
2 (時)	+	+	+	+	−
4	+	+	+	+	−
6	+	+	+	+	−
8	+	+	+	+	−
18	+	+	+	+	−

4) 反応 pH の影響

表 3 に，使用した緩衝液の種類と pH，および各反応 pH において 37°C，2 時間の反応により ATCC 15987

表 3 デキストラン T 2000 による *A. viscosus* ATCC 15987 株の凝集に及ぼす反応 pH の影響

緩衝液	pH	最少凝集濃度 (μg/ml)
酢酸緩衝液	4.0	>1,000
	4.5	1,000
	5.0	1,000
	5.5	10
	6.0	10
リン酸緩衝液	6.0	1
	6.5	1
	7.0	10
	7.5	10
	8.0	10
グリシルーグリシン緩衝液	8.0	10
	8.5	10
	9.0	100

表 4 デキストラン T 2000 による *A. viscosus* ATCC 15987 株の凝集に及ぼす塩濃度の影響

標準反応系に加えた塩化ナトリウムの濃度(M)	最少凝集濃度 (μg/ml)
0.05	1
0.10	1
0.5	1
1.0	1
2.0	100
3.0	1,000

株を凝集させるデキストラン T 2000 の最少凝集濃度(MAC)を示した。反応の至適 pH は，6.5 付近であった。

5) 反応系の塩濃度の影響

標準反応系に塩化ナトリウムを 0.05～3.0 M となるように加え，塩濃度がデキストラン T 2000 による ATCC 15987 株の凝集に及ぼす影響を調べた。塩化ナトリウムの濃度が 1 M ではほとんど影響はみられなかったが，2.0 および 3.0 M になると強い阻止的影響が認められた（表 4）。

5. 凝集に関与する菌体側の因子

凝集にあずかる菌体側の因子の本態についての手掛りを得るため，供試 *A. viscosus* ATCC 15987 株に加熱あるいはトリプシン処理を施し，凝集活性がどのように影響されるかを調べた。まず，0.075 M 燐酸緩衝液（pH 6.8）中で，100°C，10分間加熱処理したテスト菌では，凝集活性は完全に失われた（表 5）。つぎに，上記緩衝液中に浮遊させた ATCC 15987 株の菌液に結晶トリプシン（トリプシリン，持田製薬，東京）を終末濃度が 1 mg/ml になるように加え，37°C で 30 分間反応させた。処理菌液を 6,000 g で 15 分間遠心して集め，精製水で十分洗った後，標準反応系で 37°C で 2 時間，デキストラン T 2000 と反応させた。トリプシン処理した ATCC 15987 株菌体では凝集は全く認められなかった。なお，凍結乾燥した ATCC 15987 株のデキストラン T 2000 による凝集活性は生菌のそれと変わらないことがわかったので，以下の実験では，菌側の条件を一定にするために凍結乾燥した同一菌体標品を通して使用することとした。

表 5 加熱あるいはトリプシン処理した *A. viscosus* ATCC 15987 株のデキストラン T 2000 による凝集

処理	凝集 デキストラン濃度(μg/ml) 1,000	100	10	1	0.1
無し	+	+	+	+	−
100℃で 10 分間加熱処理	−	−	−	−	−
トリプシン処理	−	−	−	−	−

表 6 種々の分子量のデキストランTによる *A. viscosus* ATCC 15987 株の凝集

デキストラン	分子量	凝集 デキストラン濃度(μg/ml) 10^4	10^3	10^2	10	1.0	10^{-1}
T 10	1×10^4	−	−	−	−	−	−
T 40	4×10^4	−	−	−	−	−	−
T 70	7×10^4	−	−	−	−	−	−
T 250	2.5×10^5	+	−	−	−	−	−
T 500	5×10^5	+	+	+	+	−	−
T 2000	2×10^6	+	+	+	+	+	−

6. 凝集をひき起こさせるグルカン側の化学的特性

1) グルカンの分子量

分子量がわかっている種々のデキストラン標品を使い，*A. viscosus* ATCC 15987 株の凝集に，グルカンのどの程度の分子量が必要であるかを検討した。表 6 に示

表 7　種々の多糖による *A. viscosus* ATCC 15987 株の凝集

多　　糖	主結合	凝集（1 mg/ml）	最少凝集濃度（MAC, μg/ml）
デキストラン　T 2000	α(1－6)	＋	(1.0)
デキストラン　1355[1]	α(1－6), α(1－3)	＋	(10)
不溶性グルカン (*S. mutans*)[2]	α(1－3), α(1－6)	＋	(1.0)
α(1→6)グルカナーゼ処理グルカン[3]	α(1－3)	－	
可溶性グルカン (*S. mutans*)[4]	α(1－3), α(1－6)	＋	(1.0)
可溶性グルカン (*S. sanguis*)[5]	α(1－6), α(1－3)	＋	(1.0)
不溶性グルカン (*A. niger*)[6]	α(1－3)	－	
可溶性デンプン	α(1－4)	－	
グリコーゲン	α(1－4), α(1－6)	－	
ルテオース	β(1－6)	－	
ラミナラン	β(1－3), β(1－6)	－	
パキマン	β(1－3)	－	
セルロース	β(1－4)	－	
フルクタン (*S. salivarius*)[7]	β(2－6)	－	

(1) *L. mesenteroides* NRRL 1355 株由来
(2) *S. mutans* OMZ 176 株由来
(3) *S. mutans* OMZ 176 株由来のグルコシルトランスフェラーゼを，*Spicaria violaceae* IFO 6120 株由来の α(1→6)グルカナーゼの存在下で，スクロースと反応させることにより生成したグルカン
(4) *S. mutans* FA 1 株由来
(5) *S. sanguis* ATCC 10556 株由来
(6) *A. niger* NRRL 326 株の細胞壁より描出したもの
(7) *S. salivarius* HHT 株由来
なお，デキストラン 2000 を除き，ここに用いたグルカンはいずれも高分子量であるが，具体的な分子量は不明である。

されているように，分子量が約 7 万以下のデキストランではテスト菌の凝集は認められず，分子量 25 万以上のデキストランでは，分子量の高いものほどより低い濃度で凝集が起こることがわかった。

2)　主たるグルコシド結合の種類と凝集作用

主たるグルコシド結合の種類を異にする種々のグルカンの *A. viscosus* ATCC 15987 株に対する凝集作用を調べた結果が表 7 にまとめて示されている。ほとんど α (1→6) グルコシド結合のみからなるデキストラン T 2000 のみならず，α (1→6) および α (1→3) グルコシド結合の両者を主な結合とする可溶性グルカン，すなわちデキストラン 1355，*S. mutans* が産生する可溶性グルカンならびに *S. sanguis* が産生する可溶性グルカンのいずれもが ATCC 15987 株を凝集させることがわかった（ただしデキストラン 1355 は，他のものに比べて，凝集をひき起こすのに約 10 倍の濃度を必要とした）。また，*S. mutans* が産生する不溶性グルカンも，テスト菌の凝集をひき起こすことが認められた。

一方，*S. mutans* OMZ 176 株由来のグルコシルトランスフェラーゼを *Spicaria violaceae* IFO 6120 株が作る α (1→6) グルカナーゼ[23]の存在下でスクロースと反応させることにより生成した不溶性グルカン，すなわちそのグルコシド結合のほとんどが α (1→3) 結合であるグルカン[22]では，テスト菌の凝集は認められなかった。かつこの所見に一致して，*A. niger* 由来の α (1→3) グルコシド結合のみからなるグルカン[30]によってもテスト菌の凝集は認められなかった。また，α (1→4) や β グルコシド結合を主結合とするグルカン，さらには *S. salivarius* が作るフルクタンは，*A. viscosus* を凝集する作用を全く欠いていた。なお表示しなかったが，グル

表 8 高分子量デキストラン誘導体による *A. viscosus* ATCC 15987 株の凝集

デキストラン	誘導体	凝集(1mg/ml)	最少凝集濃度 (MAC, μg/ml)
デキストラン・メイトー*	未処理	+	(10)
	C_6位をカルボキシル化したもの	−	
デキストランT 2000	未処理	+	(1.0)
	C_1位をカルボキシル化したもの	+	(1.0)
	ポリアルコールとしたもの	−	
デキストランT 500	未処理	+	(10)
	C_2位に硫酸基を導入したもの	−	

*デキストラン・メイトーは *L. mesenteroides* 由来のデキストランで，デキストランTと同様な構造を持つ。

表 9 高分子量デキストラン T 2000 による *A. viscosus* ATCC 15987 株の菌体凝集の種々の糖による競合阻害

阻害物質	凝集阻害 阻害物質の濃度(μg/ml)* 10	1.0	0.1
デキストラン T 10	+	+	−
デキストラン T 40	+	−	−
デキストラン T 70	+	−	−
グルコース	−	−	−
フルクトース	−	−	−
スクロース	−	−	−
不溶性グルカン(*A. niger*由来)	−	−	−
フルクタン(*S. salivarius*由来)	−	−	−
C_6-カルボキシルデキストラン	−	−	−
デキストランポリアルコール	−	−	−
デキストランサルフュート	−	−	−

高分子デキストランT 2000 の濃度は，ATCC 15987株の凝集をひき起こさせる最終有効濃度 1μg/ml とした(表2 参照)。

* 種々の糖を 10 μg/ml, 1 μg/ml および 0.1 μg/ml になるように加えた標準反応系をつくり，37℃で 2時間反応させ，*A. viscosus* ATCC 15987 株の凝集の有無を肉眼で観察することにより，凝集の阻害の判定を行なった。

コースおよびフルクトースもテスト菌を凝集させることはなかった。

以上の結果から，*A. viscosus* を凝集させるにはグルコース多糖，しかも α (1→6) グルコシド結合を主たる結合の少なくとも1つとするグルカンが必要なことがわかった。

3) 凝集にあずかるグルカン構造

化学修飾を加えた高分子量デキストランの誘導体の *A. viscosus* ATCC 15987株に対する凝集作用を調べることにより，グルカン構造のどの部分が凝集に関係しているかを検討した（表8）。デキストランの還元末端グルコースの C_1 位をカルボキシル化してももとのデキストランと同程度にテスト菌を凝集させるが，非還元末端グルコースの C_6 位をカルボキシル化すると凝集作用が失われた。また，デキストランをポリアルコールに変えたり，グルコース残基の C_2 位に硫酸基を導入した場合にも，ATCC 15987 株を凝集する作用が見られなくなった。

4) 種々の糖による高分子量デキストランでの菌体凝集の競合阻害

それ自身では ATCC 15987 株菌体の凝集をひき起こさなかった低分子量デキストランやその他の糖が，高分子量デキストラン T 2000 によるテスト菌の菌体凝集に競合的に抑制的に作用するかどうか検討した。表9に示すように，デキストランでは低分子量のためにそれ自身では凝集を示さなかったものも明確な阻止効果を示すこと，しかし *A. niger* の不溶性グルカン，C_6-カルボキシルグルカン，グルカンポリアルコールなどでは，凝集を阻止する効果も認められないことがわかった。

7. グルカンの菌体への結合

1) *A. viscosus* ATCC 15987 株菌体表層への ^{14}C-グルカン FA 1 の結合

種々の濃度の ^{14}C-グルカン FA 1 を ATCC 15987 株の凍結乾燥菌体と標準反応系で作用させ，グルカンの菌体への結合量を求めた結果を図4に示した。グルカン濃度の増加に比例して，菌体へのグルカンの結合量も増加

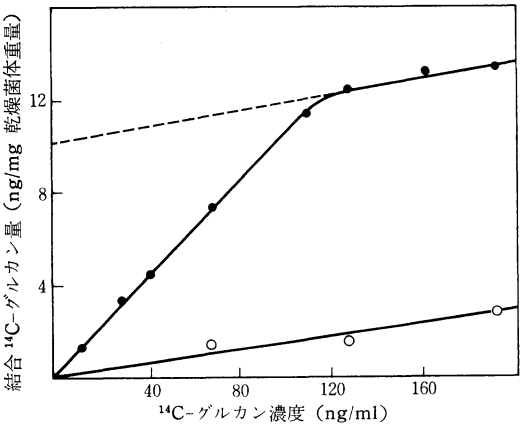


図 4 *A. viscosus* ATCC 15987 株菌体への ^{14}C-グルカン FAI の結合

● 供試菌体への ^{14}C-グルカンの結合
○ 加熱処理菌体への ^{14}C-グルカンの結合

し，約 120 ng/m*l* のグルカン濃度で菌体への結合量が飽和点に達し，飽和点をこえてグルカン濃度をさらに増加させると結合量が直線的に増加した。一方，100°C，10 分間加熱処理して凝集活性を失わせた菌体を用い，添加するグルカン量と結合するグルカン量との関係を求めたところ，非加熱菌体を用いた場合にみられた飽和点以後の直線と平行して，結合グルカン量が加えたグルカン濃度の増加に比例して増加することがわかった。この直線的増加は，供試菌体のグルカン凝集にあずかる部位へのグルカンの特異結合によるものではなく，非特異的な結合によるものと考えられる。したがって，非加熱供試菌体で認められた飽和点における，すなわち約 120 ng/m*l* のグルカン濃度での供試菌体へのグルカンの結合量から加熱処理菌体への非特異結合量を差引いた値，すなわちテスト菌 1 mg 当り約 10 ng が，ATCC 15987 株菌体へのグルカン FA 1 の不可逆的な特異結合量ということになる。

以上要するに，*S. mutans* FA 1 株が作るグルカンの *A. viscosus* ATCC 15987 株菌体への結合は，その結合に飽和点が認められる特異的な反応であると考えられる。

2) *A. viscosus* 以外の菌種の菌体表層への ^{14}C-グルカン FA 1 の結合

A. viscosus ATCC 15987 株菌体を飽和させるに必要な約 120 ng/m*l* の濃度のグルカン FA 1 を用い，他の菌種の菌体へのグルカン FA 1 の結合の有無，程度を調べた。表 10 に示すように，グルカンによる凝集活性を有する *S. mutans* K1R 株ではグルカンの結合量は

表 10 種々の供試菌の菌体に結合する ^{14}C-グルカン（グルカン FA 1）量の比較

菌種と菌株	結合グルカン量 (ng/mg 乾燥菌体重量)	凝集
A. viscosus ATCC 15987	12.4	+
S. mutans K 1R	15.4	+
S. sanguis ATCC 10556	1.90	−
S. salivarius HHT	2.22	−
S. aureus 209P	2.20	−
E. coli K12	2.21	−
L. casei PS1	1.10	−

表 11 *A. viscosus* ATCC 15987 株菌体への ^{14}C-グルカン FA 1 の結合のデキストランによる競合阻害

添加グルカン (1 mg/m*l*)	結合グルカン量 (dpm/mg 乾燥菌体重量)	阻害度 (%)
無　し	35,900	
グルカンFA 1	4,270	88.2
デキストランT2000	3,800	89.6
デキストランT10	4,790	86.7

ATCC 15987 株とほぼ同程度であった。一方，グルカンにより凝集されない他の菌種では，結合されるグルカンははるかに少く，ATCC 15987 株加熱菌体への非特異結合量程度であった。すなわちグルカンにより凝集しない菌種では，菌体へのグルカンの特異的な結合はほとんど認められないと考えられる。

3) ^{14}C-グルカン FA 1 の *A. viscosus* 菌体への結合に対する高分子量および低分子量デキストランの競合阻止

A. viscosus ATCC 15987 株菌体を飽和させる濃度 (120 ng/m*l*) の ^{14}C-グルカン FA 1 を，1 mg/m*l* のデキストラン T 2000 あるいは T 10 とともに，方法の項で述べたような反応条件で ATCC 15987 株菌体に作用させ，菌体への結合グルカン量を求め，その値をデキストラン T 2000 か T 10 を加えない時の菌体への結合量と比較した。ちなみに陽性対照としてラベルしていないグルカン FA 1 を用いた。表 11 に示すように，供試菌に対して凝集作用を示すデキストラン T 2000 のみならず凝集作用を示さない T 10 によっても，^{14}C-グルカン FA 1 の ATCC 15987 株への結合が，陽性対照実験と同程度，阻害されることがわかった。この実験の結果は，高分子量デキストランも，あるいは凝集をひき起さない低分子量デキストランがともに，グルカン FA 1 に

対する ATCC 15987 株菌体のレセプター部位に結合しえることを示唆するものと考えられる。

考　　察

歯周病の発症と進行に，口腔内に棲息する細菌が重要な役割を演じていることは，いまや当然のこととして受けとめられている[31,32]。そこで，細菌が歯周組織に対して効果的に病害作用を発揮するための前提条件と考えられる歯面への定着という問題を，歯周病の発症にあずかる可能性が高いと考えられる口腔細菌の一つである *A. viscosus* のグルカンによる凝集という課題に的を絞って，検討を加えた。

さて口腔細菌の歯面に対する定着機構を研究する上で，まず検討を要するのは，問題としている菌が直接歯面に付着しえるかどうかということである。この研究では，供試した *A. viscosus* がセメント質面には直接付着するが，エナメル質面にはほとんど付着しないという所見を出発点とした。*S. sanguis*, *S. salivarius* および *S. mutans* のような口腔レンサ球菌についても，これらの菌が何ものも介さずにはエナメル質面に付着しにくいことを ϕrstavik ら[33] が報告しており，*A. viscosus* も含めて細菌が直接的にエナメル質の平滑面に付着し，足場をえることは困難なようである。

A. viscosus の歯面への定着の一つの機構としてここで取り上げたグルカンによる菌体凝集という現象は，最初 Mcbride ら[17]によって報告された。歯垢中に放線菌が存在することはよく知られた事実[1,2,4,5,7]であるのに，歯牙のエナメル質に直接的には *A. viscosus* が付着しないという所見を前記 Mcbride らの報告[17]と考え合わせると，グルカンによる凝集によって *A. viscosus* がプラークにとり込まれる可能性が浮かび上がる。実際に著者は，*A. viscosus* ATCC 15987 株が *S. mutans* とそのグルカンによって"人工プラーク"をあらかじめ形成させた歯面には著明に付着し，かつ ATCC 15987 株が *S. mutans* や *S. sanguis* が作るグルカンによって凝集することを示した。Ritz の報告[1]によると，初期のプラーク中には放線菌が少なく，時間の経過とともにプラーク細菌の中で放線菌が占める割合が増加するという。この所見は，プラーク形成の初期に，グルカンを産生する *S. mutans* などが付着し，プラークの形成が進行するにつれて，放線菌などがグルカンを介してプラーク中にとり込まれて行くことを示唆すると考えることができよう。

もっとも，*A. viscosus* の歯面への定着という現象が，グルカンによる凝集という機構だけで解明できるほど簡単なものではないということはいうまでもない。実験結果のところでは記さなかったが，著者は唾液成分由来の獲得被膜を歯面に形成させると，*A. viscosus* が対照として用いた獲得被膜を形成させない歯面に比べて付着しやすくなるという所見を得ている。ちなみに ϕrstavik らは，*S. sanguis* について同様な所見を報告[33] している。また Gibbons らは，*A. viscosus* ATCC 15987 株をヒト全唾液とインキュベートすると菌体凝集を起こすことを報告[34] している。獲得被膜および唾液中の *A. viscosus* を凝集させる因子の本態については，まだ十分な研究が行なわれていないが，これらの因子が *A. viscosus* さらには他の口腔細菌の歯面への定着に関与している可能性も，当然考慮されなければならない。

グルカンによる *A. viscosus* の菌体凝集に関与する菌体側の因子が，非耐熱性で蛋白質性であることが，この研究で明らかにされた。*S. mutans* について，菌体側のレセプターは蛋白質性のものであると Kelstrup らは報告[35] している。さらに *S. mutans* の菌体側のレセプターの本態について，Gibbons ら[16]が菌体表層に結合したグルコシルトランスフェラーゼであるという説をとっているのに対し，Olson ら[36]はグルコシルトランスフェラーゼに対する抗血清を反応させた *S. mutans* がグルカンにより凝集するという所見に基づいて，菌体表層に結合しているグルコシルトランスフェラーゼとは別に，グルカンに対するレセプターが存在すると主張している。Kelstrup ら[35], Germaine ら[37], Mukasa ら[38] および Mccabe ら[39] も，*S. mutans* ではグルコシルトランスフェラーゼとは別に，レセプター部位が存在するという立場をとっている。しかし *A. viscosus* では，グルコシルトランスフェラーゼ活性は捻出されないので，グルコシルトランスフェラーゼとグルカンに対するレセプターとの関係は問題にならない。

凝集をひき起こさせる側のグルカンの化学的特性については，まず *A. viscosus* の凝集をひき起こさせるには，最低 25 万以上の分子量のグルカンが必要であることが明らかにされた。また，分子量の大きいグルカンほどより低濃度で *A. viscosus* を凝集させ得ることが示された。この現象は，分子量の大きいグルカンほど菌側のレセプター部位と反応する構造部分の数も多いということの他に，分子量が大きいほど，菌と菌との間を架橋して凝集を起こさせやすいためと考えられる[16]。

A. viscosus 菌体に結合し，さらに条件がととのえば

菌体凝集をひき起こさせる多糖の構造としては，それがグルコース多糖であり，しかも主たるグルコシド結合として α (1→6) 結合を構造中に保有することが必要なことがわかった。他方 α (1→3) グルコシド結合のみからなるグルカンは，*A. viscosus* を凝集する作用を欠いていることが明らかにされた。しかし，α (1→3) グルコシド結合のほかに，α (1→6) グルコシド結合を構造中に有するグルカンでは凝集作用が認められるので，α (1→3) グルコシド結合は必ずしも凝集を阻止するように働くわけではないようである。

要は，図5に示すように，多糖が *A. viscosus* の凝集をひき起こす，あるいは凝集させるに至らないまでも供試菌体に結合するためには，それがグルコースポリマーで，しかも主たるグルコシド結合の一つが α (1→6) 結合であることが必要である。また，グルカンの還元末端グルコースは凝集される菌体への結合には関与せず，この結合には非還元末端グルコースが関与していることを示す所見が得られた。

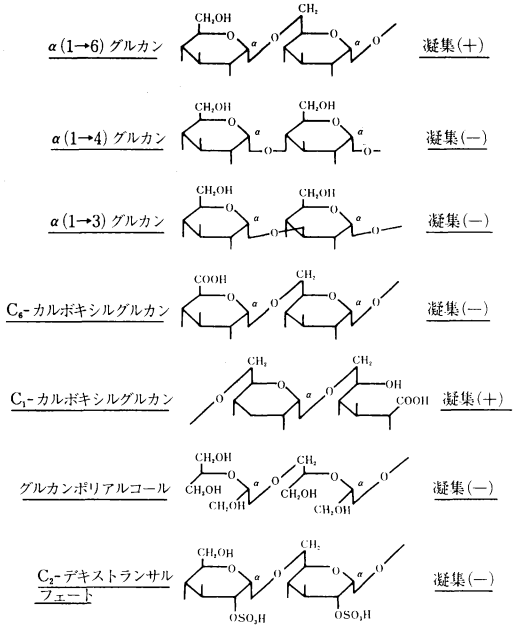


図 5 グルカンの構造と *A. viscosus* ATCC 15987 株に対する凝集作用との関係

またグルカンの口腔細菌凝集作用にあずかる構造については，従来これといった研究がほとんどなく，わずかに過ヨウ素酸酸化したデキストランが *S. mutans* を凝集しなくなることを示した Kelstrup ら[35]の研究をあげうるのみである。彼等は，供試した過ヨウ素酸酸化したグルカンでは C_1，C_5 および C_6 位が修飾を受けていないので，凝集には C_2，C_3 および C_5 位が重要であるという説をとっている。しかし，過ヨウ素酸酸化法ではグルカンが一挙に大幅に化学構造を変じるので，Kelstrup らの推論に飛躍があるといわざるを得ない。

著者の研究では，グルカンによる *A. viscosus* の凝集がグルコースやフルクトースによって阻害されないことを認めた。一方 Gibbons ら[16]および Kelstrup ら[35]は，*S. mutans* のグルカンによる凝集がグルコースやフルクトースによって阻止されたと述べている。著者の実験結果との食い違いは，供試した菌種が異なるためかも知れないが，また彼等の実験では大過剰にグルコースやフルクトースが反応系に加えられ，したがって認められた阻止効果が，加えられた糖の特異的な作用によるのかどうか問題ではないかと考えられる。

ここで，供試菌体のグルカン凝集実験に主として用いたデキストランTならびに供試菌体への結合実験に用いたグルカン FA 1 についてメチル化分析により調べた各種のグルコシド結合の割合を，両者を対比させて表12に示す。デキストランTについてのデーターは，Lindberg らの記載[40]から引用したものであり，一方グルカン FA 1 についての分析結果は，前記恵比須博士の研究データー（未発表）にもとづいている。

すなわちデキストランTでは，α (1→6) グルコシド

表 12 デキストランTとグルカン FAI のグルコシド結合の分析（メチル化法による）

O-メチル-D-グルコース	結合様式	モル百分率 デキストランT	モル百分率 グルカンFA 1
2, 3, 4, 6－テトラー	Glcp－(1→	4.2	19.1
2, 4, 6－トリー	→3)－Glcp－(1→	0	17.0
2, 3, 4－トリー	→6)－Glcp－(1→	91.2	47.1
2, 4－ジー	→6)－Glcp－(1→ ↑3	4.6	16.8

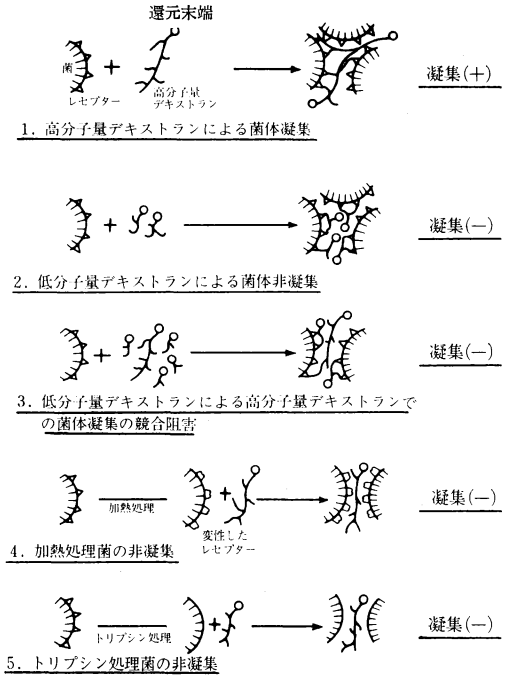


図 6 *A. viscosus* ATCC 15987 株のグルカンによる菌体凝集の起こり方を示すモデル

結合に由来する2，3，4—トリーメチルグルコースのモル百分率が91と高く，また分岐部由来の2，4—ジーメチルグルコースのモル百分率が約5であるところから，そのグルコシド結合がほとんど直鎖型の α (1→6) 結合であり，グルコース分子約20コに1コの割合にしか →6)—グルコース—(1→グルコシド結合の分岐が存在しないことがわかる。一方，グルカン FA 1 では非還元末端に由来する2，3，4，6—テトラ—メチルグルコース，ならびに2，4—ジ—メチルグルコースや2，4，6—トリ—メチルグルコースのように α (1→3) 結合部に由来するもののモル百分率がいずれもデキストランに比べると高く，デキストランに比較して分岐ならびに α (1→3) グルコシド結合部（分岐や側鎖を含めて）が多いことがわかる。

さて図6に，*A. viscosus* 菌体の高分子量グルカンによる凝集機序のモデルを示した。表12に示したように，分子量約200万のデキストラン T 2000 では一分子に多くの非還元末端が存在する。また，T 2000 は，その一分子が二つ以上の菌と非還元末端部分で同時に結合し，凝集をひき起こすのに十分な大きさを有すると考えられる（図6の1）。一方分子量約1万のデキストラン T 10 では，一分子に存在する非還元末端は2～3コであり，かつサイズが小さいので，2つ以上の菌のレセプター部位に結合して，凝集を起こすことはむつかしい（図6の2）。しかし，低分子量デキストランも菌側のレセプター部位には結合できるので，このものが大過剰に存在すると供試菌のレセプターの大部分を占拠してしまい，高分子量デキストランの凝集作用が競合的に阻害されることになる（図6の3）。なお，菌体を加熱処理すると菌側のレセプターが変性ないし破壊され（図6の4），またトリプシン処理によりレセプターが失われ（図6の5），デキストランが結合できなくなり，したがってこれらの処置を行なった菌ではデキストラン凝集が起こらなくなってしまう。

グルカンによる凝集の第一歩と考えられる *A. viscosus* への当該グルカンの結合については，^{14}C でラベルされたグルカンを用いた実験によって，グルカンが確かに供試菌（そのレセプター）に結合すること，この結合は結合グルカン量に飽和点が認められる特異的な結合であることが明らかになった。ちなみにグルカンの菌体への結合に対する低分子量グルカンの阻害を低分子量グルカンと ^{14}C-グルカンとを同時に加えることにより調べたが，*S. mutans* について，低分子量デキストランと反応させ，洗浄後この *S. mutans* 菌体に ^{14}C-グルカンを反応させても ^{14}C-グルカンの結合が阻害されることが Suginaka[41] により明らかにされているので，*A. viscosus* の場合にも低分子量デキストランは菌体のグルカン凝集に与るレセプター部位にまず結合し，^{14}C-グルカン FA 1 の菌体への結合，したがって凝集を阻害するものと考えられる。

この研究で供試した放線菌のうち6株（*A. viscosus* 3株，*A. naeslundii* 2株および *A. odontolyticus* 1株）は，程度の差はあったがいずれもグルカンによる凝集活性を有していた。しかし *A. viscosus* の他の2株，すなわち ATCC 19246 株ならびに T 36 株ではその活性が認められなかった。しかし，この2株は歯肉溝やプラークあるいは軟化象牙質といったような部位以外から分離された菌株であり，したがって上記の部位から分離された放線菌菌株とはグルカンによる凝集についても態度を異にするのも，考え方によれば，当然といえるかも知れない。また，供試した放線菌は，人工培地で継代を重ねたものが大半を占めており，分離された頃に保有されていたグルカン凝集活性が，実験に用いた時点で低下していた可能性も考慮されなければならない。さらにつけ加

えるなら，この研究で供試した放線菌菌株は，そのあるもの（例えば，*A. viscosus* ATCC 15987 株）は動物実験で歯周病をひき起こす事が確認されているが，別の菌株はこの点について十分な検討が未だ行われていない。したがって，*A. viscosus* のグルカンによる凝集と病原性との間にどのような関係があるかについての最終的な評価は，今後に残された研究課題だというべきである。

最後に，セメント質面に *A. viscosus* が直接付着するという所見については，セメント質表面とエナメル質表面との間には，物理的にも化学的にも大きな相違が認められるので，エナメル質面とは別の検討を要すると考えられる。*A. viscosus* のセメント質面への直接付着については，今回の研究では検討を行わなかったが，*A. viscosus* に特異的な現象であるかどうかなどは，今後検討を要する研究課題といえよう。

総　　括

A. viscosus のグルカンによる凝集の機序を ATCC 15987 株を主なテスト菌として，種々の角度から，研究した。

1．*A. viscosus* は，抜去ヒト歯牙小臼歯セメント質には付着するが，エナメル質にはほとんど付着しなかった。

2．しかし，エナメル質表面にあらかじめ *S. mutans* およびこの菌が作るグルカンからなる“人工プラーク”を形成させたものには，*A. viscosus* はきわめてよく付着した。この付着は，*A. viscosus* 浮遊液とグルカンを生成した *S. mutans* 浮遊液とが共同凝集することから，*S. mutans* の菌体表面のグルカンを介して起こっていることが強く示唆された。

3．*A. viscosus* 菌体のグルカンによる凝集に，100°C で 10 分間の加熱およびトリプシン処理で失活する蛋白質性の因子（レセプター）が関与していることが示された。

4．一方種々の多糖のなかで，菌体の凝集をひき起こすのは高分子量のグルコース多糖であり，しかも主な結合が α (1→6) グルコシド結合であることが必要なことが明かにされた。またグルカンが菌体レセプターへ結合するには必ずしも高分子量であることを要しないこと，さらにこの結合にはグルカンの還元末端グルコースは重要でなく，非還元末端グルコースが関与していることが明らかにされた。

謝　辞

稿を終えるにあたり，本研究についてご指導とご校閲を賜わった口腔細菌学講座小谷尚三教授および臨床面でいろいろご教示ご鞭撻を賜わった横溝一郎大阪大学名誉教授に深く謝意を表します。

なおその間，終始ひとかたならぬご指導とご助言を頂いた口腔細菌学講座杉中秀寿講師に厚くお礼を申し上げます。

また本研究に際して，種々のご援助を受けた口腔治療学講座恵比須繁之博士をはじめ走査型電顕写真の撮影にあたって便宜を計って頂いた歯学部中央研究室の石丸昌司技官，および口腔治療学教室ならびに口腔細菌学教室の諸氏に対して深く感謝いたします。

（本論文の要旨は昭和 52 年 4 月の第 50 回日本細菌学会総会ならびに同年 5 月の第 20 回日本歯周病学会総会において発表した）

文　　献

1) Howell, A.Jr. : A filamentous microorganism isolated from periodontal plaque in hamster. 1. Isolation, morphology and general cultural characteristics. Sabour. 3 : 81–92, 1963.

2) Howell, A.Jr., Rizzo, A. and Paul, F. : Cultivable bacteria in developing and mature human dental calculus. Archs oral Biol. 10 : 307–313, 1965.

3) Snyder, M.L., Bullock, W.W. and Parker, A.B. : Morphology of gram positive filamentous bacteria identified in dental plaque by fluorescent antibody technique. Archs oral Biol. 12 : 1269–1273, 1967.

4) Ritz, H.L. : Microbial population shifts in developing human dental plaque. Archs oral Biol. 12 : 1561–1568, 1967.

5) Gerencser, M.A. and Slack, J.M. : Identification of human strains of *Actinomyces viscosus*. Appl. Microbiol. 18 : 80–87, 1969.

6) Slack, J.M., Landfried, S. and Gerencser, M.A. : Identification of actinomyces and related bacteria in dental calculus by the fluorescent antibody technique. J. Dent. Res. 50 : 78–82, 1971.

7) Ellen, R.P. : Establishment and distribution of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in the human oral cavity. Infect.

Immunity. 5 : 1119–1124, 1976.

8) Jordan, H.V. and Keyes, P.H. : Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. Archs oral Biol. 9 : 401–414, 1964.

9) Keyes, P.H. and Jordan, H.V. : Periodontal lesions in the syrian hamster–III. Findings related to an infectious and transmissible component. Archs oral Biol. 9 : 377–400, 1964.

10) Jordan, H.V., Fitzgerald, R.J. and Stanley, H.R. : Plaque formation and periodontal pathology in gnotobiotic rats infected with an oral actinomycete. Amer. J. Path. 47 : 1157–1167, 1965.

11) Llory, H., Guillo, B. and Frank, R.M. : A cariogenic *Actinomyces viscosus*-a bacteriological and gnotobiotic study. Helv. Odont. Acta. 15 : 134–138, 1971.

12) Jordan, H.V. and Hammond, B.F. : Filamentous bacteria isolated from human root surface caries. Archs oral Biol. 17 : 1333–1342, 1972.

13) Jordan, H.V., Keyes, P.H. and Bellack, S. : Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. J. Periodontal Res. 7 : 21–28, 1972.

14) Guggenheim, B. and Schroeder, H.E. : Reactions in the periodontium to continuous antigenic stimulation in sensitized gnotobiotic rats. Infect. Immunity. 10 : 565–577, 1974.

15) Fitzgerald, R.J. and Jordan, H.V. : Polysaccharide-producing bacteria and caries. In Harris, H.R. (ed.), Art and science of dental caries research. New York. 1968, Academic Press Inc., 79–86.

16) Gibbons, R.J. and Fitzgerald, R.J. : Dextran-induced agglutination of *Streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plaques. J. Bacteriol. 98 : 341–346, 1969.

17) Mcbride, B.C. and Bourgeau, G. : Dextran-induced aggregation of *Actinomyces viscosus*. Archs oral Biol. 20 : 837–841, 1975.

18) Critchley, P., Wood, J.M., Saxton, C.A. and Leach, S.A. : The polymerisation of dietary sugars by dental plaque. Caries Res. 1 : 112–129, 1967.

19) Guggenheim, B. and Schroeder, H.E. : Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. Helv. Odont. Acta. 11 : 131–152, 1967.

22) Guggenheim, B. : Extracellular polysaccharide and microbial plaque. Int. Dent. J. 20 : 657–678, 1970.

21) Bourgeau, G. and Mcbride, B.C. : Dextran-mediated interbacterial aggregation between dextran-synthesizing streptococci and actinomyces viscosus. Infect. Immunity. 13 : 1228–1234, 1976.

22) Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K. and Kotani, S. : The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase. Carbohydr. Res. 38 : 374–381, 1974.

23) Murayama, Y., Wada, H., Hayashi, H., Uchida, T., Yokomizo, I. and Hamada, S. : Effect of dextranase from *Spicaria violaceae* (IFO 6120) on the polysaccharide produced by oral streptococci and on human dental plaque. J. Dent. Res. 52 : 658–667, 1973.

24) 竹村金造：クロールヘキシジンの歯垢抑制機序の in vitro における解析. 日歯保誌. 18 : 35–56, 1975.

25) Suginaka, S., Ichikawa, A. and Kotani, S. : Penicillin-resistant mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* : Binding of penicillin to *Pseudomonas aeruginosa* KM 338. Antimicrob. Agents Chemother. 7 : 629–635, 1975.

26) Howell, A.Jr. and Jordan, H.V. : Production of an extracellular levan by *Odontomyces viscosus*. Archs oral Biol. 12 : 571–573, 1967.

27) Krichevsky, M.I., Howell, A. Jr. and Lim, S. : Levan formation by *Odontomyces vis-*

cosus. J. Dent. Res. 48 : 938–942, 1969.

28) Miller, C.H., Warner, T.N., Palenik, C.J. and Somers, P.J.B. : Levan formation by whole cells of *Actinomyces viscosus* ATCC 15987. J. Dent. Res. 54 : 906, 1975.

29) Suginaka, H., Wada, H. and Kotani, S. : Initial products in utilization of sucrose by *Actinomyces viscosus*. Biken J. 18 : 271–274, 1975.

30) Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S. and Misaki, A. : Isolation and purification of *Flavobacterium* α-1, 3 glucanase hydrolyzing insoluble, sticky glucan of *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 124 : 1489–1501, 1975.

31) Socransky, S.S. : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J. Dent. Res. 49 : 203–222, 1970.

32) Löe, H. : Present day status and direction for future research on the etiology and prevention of periodontal disease. J. Periodontol. 40 : 678–682, 1969.

33) ϕrstavik, D., Kraus, F.N. and Henshaw, L. C. : In vitro attachment of streptococci to the tooth surface. Infect. Immunity. 9 : 794–800, 1974.

34) Gibbons, R.J. and Spinell, D.M. : Salivary-induced aggregation of plaque bacteria. Dental plaque. Livingston, Edinburgh. 1970. In W.D. Mchugh (ed.), 207–216.

35) Kelstrup, J. and Funder-Nielsen, T.D. : Adhesion of dextran to *Streptococcus mutans*. Gen. Microbiol. 81 : 485–489, 1974.

36) Olson, G.A., Guggenheim, B. and Parker, A.S. : Antibody-mediated inhibition of dextran/sucrose-induced agglutination of *Streptococcus mutans*. Infect. Immunity. 9 : 273-278, 1974.

37) Germaine, G.R. and Schachtele, C.F. : *Streptococcus mutans* dextransucrase : Mode of interaction with high-molecular-weight dextran and role in cellular agglutination. Infect. Immunity. 13 : 365–372, 1976.

38) Mukasa, H. and Slade, D. : Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surface. II. Nature of the binding site and the adsorption of dextran-levan synthetase enzymes on the cell-wall surface of the streptococcus. Infect. Immunity. 9 : 419–429, 1974.

39) Mccabe, M.M. and Smith, E.E. : Relationship between cell-bound dextransucrase and the agglutination of *Streptococcus mutans*. Infect. Immunity. 12 : 512–520, 1975.

40) Lindberg, B. and Swensson, S. : Structual studies of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512. Acta Chem. Scand. 22 : 1907–1912, 1968.

41) Suginaka, H. : Mechanisms of glucan-induced agglutination in *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res. 55 : 175, 1976.