The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯周病原性細菌Eikenella corrodensによる異種菌体間凝集反応の解析 : モノクローナル抗体の利用
Author(s)	中江, 英明
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35339
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

歯周病原性細菌Eikenella corrodensによる異種菌体間凝集反応の解析 ——モノクローナル抗体の利用——

中江英明

大阪大学歯学部口腔治療学講座
（指導：岡田宏教授）

Studies on mechanisms of coaggregation of *Eikenella corrodens* with oral bacteria using monoclonal antibodies against bacterial lectin

Hideaki NAKAE

Department of Periodontology and Endodontology, Osaka University Faculty of Dentistry
(Director: Prof. Hiroshi OKADA)

Coaggregation of oral bacteria is considered to play an important role in colonization and maturation of dental plaque. *Eikenella corrodens* 1073, which has been shown to induce periodontal disease in experimental animals, was found to coaggregate with 8 strains of total of 42 oral bacterial strains examined. Then mechanisms of the coaggregation of *E. corrodens* 1073 with *Actinomyces viscosus* ATCC 19246, *A. viscosus* T14AV, *Streptococcus sanguis* 34, and *S. sanguis* ST 160R that would strongly coaggregate with *E. corrodens* cells were investigated. Trypsin teatment or heating (100°C, 5 min.) of *E. corrodens* cells abolished their capacity to coaggregate with these 4 strains, whereas identical treatment of *A.viscosus* cells or *S. sanguis* cells had no effect on the coaggregation. These coaggregation were remarkably inhibited by *N*-acetyl-D-galactosamine and D-galactose containing sugars. These properties of the coaggregation were similar to those of hemagglutination by *E. corrodens* cells and adherence of *E. corrodens* cells to human buccal epithelial cells that might be mediated by lectin-like-substance (LS) of *E. corrodens* which Ebisu et.al. had reported previously. In order to make sure the role of LS in the coaggregation, it was designed to purify LS from *E. corrodens* cells and produce

monoclonal antibody against it. LS was extracted in 1% Triton X-100 with sonication from cell envelope of E. corrodens 1073, and purified by galactosamine affinity chromatography based on the hemagglutinating activity. Splenocytes of BALB/c mice immunized with purified LS and myeloma cells (SP-2) were fused, and hybridomas were screened by ELISA. Four hybridoma clones were selected. Two of them were of the IgG1 isotype and the others were of the IgG2b isotype. All 4 monoclonal antibodies were unable to aggregate the whole E. corrodens cells. These monoclonal antibodies inhibited both hemagglutination of E. corrodens and coaggregation with A. viscosus or S. sanguis. Immunoelectron microscopic study revealed that LS was found to localize in cell wall or capsula, not in fimbriae, on which lots of bacteria possessed adhesin. These results concluded that coaggregation of E. corrodens with A. viscosus or S. sanguis was mediated by LS ,which was present on cell wall or capsula of E. corrodens cells.

Key words: Coaggregation, Bacterial lectin, Eikenella corrodens, Monoclonal antibodies

要旨

Eikenella corrodens 1073の付着因子であることが示唆されている細菌レクチン様物質に対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いて、E. corrodens 1073と Actinomyces viscosus T14AVおよびATCC19246、Streptococcus sanguis ST160Rおよび34との間の4通りの菌体間凝集反応の機序をin vitroで解析した。その結果、4通りの菌体間凝集反応のいずれにおいても、E.corrodens 1073の菌体成分である細菌レクチン様物質が決定的な役割を果していることが明確になった。

さらに、モノクローナル抗体を用いた免疫電顕による観察結果から、細菌レクチン様物質はE.corrodens菌体表層の莢膜様構造物あるいは細胞壁に存在することが示唆された。

索引用語：菌体間凝集、細菌レクチン、Eikenella corrodens、モノクローナル抗体

本論文の要旨は、第27回秋季日本歯周病学会（1984年11月）と第29回春季日本歯周病学会（1986年5月）において発表した。

緒言

ある種の細菌が病原性を発揮するためには、まず生体局所に定着することが必要である[1-5]。例えば、ブタ由来毒素原性大腸菌（enterotoxigenic Escherichia coli, ETEC）によるブタの下痢の発症において、腸管に定着するのに必要な菌体側の因子すなわち定着因子が重要な役割を果していることを、SmithとLinggood[6]が報告した。すなわち、E. coliがエンテロトキシン産生能を有していても、ETECの定着因子であるK88抗原の産生能を欠いていればブタに下痢を発症させないこと、つまり毒素の産生だけでは病気が起こらないことを明らかにした。このように細菌感染症では、その原因細菌が局所へ定着することが病原性発現の第一段階であると考えられているため、細菌の局所組織への定着機構の解明が重要な研究課題となっている。

歯周疾患は、プラークを構成する細菌により発生する。このプラーク形成の過程におい

て、異種細菌間の相互作用が重要視されている。例えば、Veillonella alcalescensは、歯面に直接付着する能力を有していないが、ニクロム線に付着したActinomyces viscosusに付着することにより、結果的にニクロム線上に定着することがin vitroにおいて示されている[7]。また、Bacterionema matruchotiiとStreptococcus sanguisは、互いに付着し、口腔内でcorncobを作ることが、報告されている[8-10]。このように、たとえ単一の菌としては口腔内に付着、定着しえなくとも、あらかじめ定着している異種細菌に付着することで、口腔内とりわけプラークに定着することが出来る菌もあると考えられる。

この異種菌体への細菌細胞の付着は、in vitroにおいては菌体間凝集反応として観察される。A. viscosus[11-15]およびActinomyces naeslundii[11-14]、Bacteroides gingivalis[16], Bacteroides loesheii[17]、Fusobacterium nucleatum[18]などは、in vitroで、

種々の細菌と凝集することが明らかにされている。このA. viscosusやB. gingivalisの菌体間凝集に関与する因子、すなわち付着因子はそれぞれの菌体の線毛上に存在することが示唆されている[19-22]。そして、A. viscosusでは、赤血球や頬粘膜上皮細胞などの種々の生体細胞あるいは異種細菌細胞への付着に関与する付着因子と、ハイドロキシアパタイトへの付着に関与する付着因子が異なった線毛上に存在することが報告されている[20]。また、B. gingivalisでは標的細胞の種類により付着因子がそれぞれ異なる可能性があることが示唆されている[23]。

さて、グラム陰性の通性嫌気性桿菌Eikenella corrodensは歯肉縁上および縁下のプラークから分離されるが、この臨床分離株であるE. corrodens 1073は、無菌ラットに単一感染させると顕著な歯槽骨破壊を伴う歯周疾患を惹起することが報告されている[24-26]。このようにして歯周疾患を惹起したラットは、

本菌に対して細胞性及び体液性の免疫応答が成立した[27]。これらの報告は、E.corrodensが口腔内の排除機構に打ち勝って歯肉溝または歯周ポケットに定着することを示唆している。著者の属する教室では、E.corrodensがいかなる機構で歯肉溝あるいは歯周ポケットに定着するかということが検討されており、現在までに、E.corrodensは付着因子の一つと考えられる細菌レクチン様物質（以後、LSと略す）を保有し、これを介してヒト赤血球[28]、ヒト頬粘膜上皮細胞[29]あるいはモルモット腹腔マクロファージ[30]に付着することが示唆されている。

本研究では、E.corrodensと異種細菌細胞との間の菌体間凝集反応の機序を検討したが、この菌体間凝集にE.corrodensのLSが関与しているのかどうか、あるいは、LS以外の付着因子も関与しているのかどうかを明確にするために、LSに対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いて菌体間凝集反応を解析す

るとともにE. corrodens菌体におけるLSの存在部位についても検討した。

実験材料と方法

1. 供試菌株とその培養

本研究に供試した、Streptococcus mutans E49, HS-1, AHT, FA1, BHT, Ingbritt, MT8148R, OMZ176, B13, P4, MT557, 6715, MT3791R, OMZ175およびSE11、S. sanguis ST183R, ST160R, ST3およびM5, Streptococcus salivarius HHT, HT32, HT9RおよびHT3Rの各菌株は大嶋隆博士（大阪大学）から、S. sanguis 34は鳥居光男博士（大阪大学）から、A. viscosus T14V, T14AVおよびNY1、A. naeslundii B120の各菌株は木村重信博士（大阪大学）から、B. matruchotii 14266は高添一郎博士（東京歯科大学）から、B. gingivalis 381、E. corrodens 1073および1080, Capnocytophaga sputigena #4, Capnocytophaga ochracea 25, F. nucleatum 1436はS.S.Socransky博士（Forsyth Dental Center, Boston, Mass., USA）から、Neiseria sp. L10は山崎洋治博士（ライオン第一応用研

究所、小田原）から恵与していただいた。

このうち、主として使用した菌株であるE. corrodens1073は、緬羊脱繊血（日本バイオテスト研究所、東京）を5％の割合で含むTryptic soy寒天培地（Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）の平板上で、1週間毎に継代して保存した。

E. corrodensは、2mg/mlの硝酸カリウム（和光純薬、大阪）と5μg/mlのヘミン（和光純薬）を含むTriptic Soy Brothで37℃、24時間、嫌気条件下（95% N_2, 5% CO_2）にて培養した。培養終了後、6,000xgで10分間遠心して集菌し、得られた菌体をpH7.2の10mMリン酸塩緩衝生理食塩水（以下PBSと略す）にて3回洗浄し、所定の菌濃度に懸濁して菌体間凝集実験に使用した。

E. corrodens以外の供試菌の培養条件は以下のとおりである。すなわち、S. mutans, S. sanguis, S. salivarius, A. viscosusおよびA. naeslundiiの各菌株は、Brain Heart

Infusion Broth（以下BHIと略す，Difco Laboratories）にて37℃で、24時間培養した。B. matruchotii ATCC 14266株，Propionibacterium acnes ATCC11828株はTodd Hewitt Broth（以下THBと略す，Difco Laboratories）で37℃で24時間培養した。B. gingivalis、Bacteroides melaninogenicusの各菌株は、ヘミンおよびメナジオン（和光純薬）を含むTHBで、Actinobacillus actinomycetemcomitansの各菌株はヘミンを含むTHBで、それぞれ37℃で48時間、嫌気的に培養した。F. nucleatumの各菌株はL-システイン（和光純薬）を含むTHBで24時間、またCapnocytophaga sputigena #4株，Capnocytophaga ochracea 25株およびV. alcalescens ATCC17745株はTHBで48時間、37℃で嫌気的に培養した。

2. 菌体間凝集反応の測定

E. corrodens 1073細胞と異種細菌細胞の間の菌体間凝集反応の測定は、マイクロタイターブレート（ペトレイ96V，テルモ、東京）を

用いて行った。すなわち、E. corrodens菌体を2x10⁹colony forming units(CFU)/mlの濃度にPBSで懸濁した懸濁液（80μl）と550nmでの吸光度が1.0を示す濃度の供試菌液（80μl）とをマイクロタイタープレートに加えた後、プレートミキサー（PM-1型、東洋科学産業、大阪）にて1分間攪拌し、室温で1時間静置した後、イミュノビュア（MU型、常光産業、東京）上で菌体間凝集の有無を肉眼的に判定した。

さらに、菌体間凝集反応をより客観的に評価する方法として、分光光度計（220A型、日立製作所、東京）を使用した。すなわち、分光光度計のセル中で測定する2菌液を攪拌し、凝集により引き起こされる吸光度の時間的な変化を記録し、吸光度曲線を得た。この吸光度曲線の最傾斜部の傾きの変化を指標として、種々の条件下における凝集活性を次のような計算式で算出し、%凝集活性あるいは%凝集阻害活性として表示した。

$$\%凝集活性 = \frac{測定条件下時の吸光度曲線の最傾斜部の傾き}{標準条件下時の吸光度曲線の最傾斜部の傾き} \times 100$$

$$\%凝集阻害活性 = 100 - \frac{阻害剤を添加した時の吸光度曲線の最傾斜部の傾き}{標準条件下時の吸光度曲線の最傾斜部の傾き} \times 100$$

3. 細菌の酵素処理

トリプシン（持田製薬、東京）を0.1mg/mlの濃度に溶解したPBS、あるいはプロナーゼ（科研化学、東京）を0.5mg/mlの濃度に溶解したPBSに、それぞれE. corrodens 1073を2x 10^9CFU/mlになるように、あるいは他の供試菌株を550nmでの吸光度が1.0になるように浮遊させた後、37℃で1時間反応させた。反応終了後、細菌細胞はPBSで3回洗浄し、菌体間凝集実験に供した。

4. 糖による菌体間凝集反応の阻害実験

種々の濃度の糖テスト標品を溶解したPBSに10^9CFU/mlのE. corrodens 1073を浮遊させた溶液（1.5ml）と550nmでの吸光度を0.45に調整

した供試細菌浮遊液（1.5ml）とを分光光度計のセル内で撹拌し、凝集により引き起こされる吸光度曲線の傾きの変化を測定した。糖としては、N-アセチル-D-ガラクトサミン（以後、GalNAcと略す）、L-フコース（以上Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA）、メリビオース、ラクトース、D-ガラクトース、D-マンノース、D-グルコース、D-キシロース（以上　和光純薬）を供試した。

5．赤血球凝集反応の測定

1）EbisuとOkadaの記載[28]に従い、ノイラミニダーゼ処理したヒト赤血球を用いて行った。すなわち、著者の末梢血液より調製した赤血球（血液型O型）をPBSで3回洗浄した後、20mM酢酸塩緩衝生理食塩水（pH5.8）に10%の濃度（V/V）になるように懸濁し、これにClostridium perfringens由来のノイラミニダーゼ（Type Ⅷ, Sigma Chmical Co.）を0.1単位/mlの濃度になるように添加し、37℃で1時間反応させた。反応終了後、赤血球はPBSで3回

洗浄し、１％の濃度になるようにPBSに再懸濁した。

赤血球凝集活性の測定は、マイクロタイタープレートを用いて行い、被検標品を50μlのPBSで連続２倍希釈し、これに50μlの赤血球懸濁液を添加した後、プレートミキサーを用いて１分間攪拌した。これを室温で１時間静置した後、赤血球の凝集の有無をイミュノビュアで肉眼的に判定した。赤血球凝集価は、凝集が認められる被検標品の最大希釈倍数とした。

E. corrodensによる赤血球凝集活性は、さらに、分光光度計を用いて測定した。すなわち、550nmでの吸光度が0.7を示すように調製したE. corrodens 1073あるいは1080懸濁液（1.5ml）と、550nmでの吸光度が0.7を示すように調製した赤血球（1.5ml）を分光光度計のセル内に加え連続的に攪拌した。そして、得られた吸光度曲線から上述した方法により％凝集活性を算出した。

モノクローナル抗体による赤血球凝集反応の阻害実験は、モノクローナル抗体を40μlのPBSで連続2倍希釈し、これに凝集価4を示すように調整したE. corrodens懸濁液40μlを添加した後、プレートミキサーで1分間攪拌し、37℃で1時間インキュベートした。次いで、80μlの赤血球懸濁液を添加し、再度プレートミキサーで1分間攪拌し、室温で1時間静置した後、赤血球の凝集の有無を判定した。モノクローナル抗体による赤血球凝集阻止効果の程度は、赤血球凝集阻止効果を示すモノクローナル抗体の最大希釈倍数で表した。

6. E. corrodens 1073からのLSの精製

山崎の記載[31]に準拠してLSを精製した。すなわち、E. corrodensの対数増殖後期の菌体をPBSで3回洗浄した後、菌体を10mM EDTAを含むPBSに懸濁した。これにガラスビーズ（直径0.17～0.18mm、B.Braun Apparatelbau, Melsungen, West Germany)を加え、Braun Cell Homogenizer (Model MSK, B. Braun

Apparatelbau）を用いて高圧炭酸ガスを吹き付けて冷却しながら6分間破砕処理を行った。450xg、20分間の遠心で未破砕菌体を除いた後、上清を10,000xgで20分間遠心して得た沈渣をPBSで2回、蒸留水で3回洗浄し、細胞エンベロープ画分（以後、CEと略す）を得た。CEを、終濃度1%のTriton X-100および10mM EDTAを含む10mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）に10mg/mlの濃度に懸濁し、超音波破砕装置（UR 2000Pトミー精工、東京）を用いて氷冷下で30分間超音波処理した。この超音波処理液を100,000xgで1時間遠心し、遠心上清を1% Triton X-100および0.1mM $CaCl_2$を含むPBSに対して透析した。次ぎに、この透析内液を同緩衝液で平衡化したアフィゲルガラクトサミン（Bio-Rad Lab., Richmond, Ca., USA）カラムに添加し、非吸着画分を溶出した後、0.2MのD-ガラクトースを含む同緩衝液をカラムに添加することによりカラムに吸着したレクチン様物質を溶出させた。そして、この溶出画

分に冷却した2倍容のエタノールを加えることにより得られた沈渣を、PBSに対して透析し、これを精製レクチン様物質とした（以後LSと略す）。

7. LSに対するモノクローナル抗体の作製

1）免疫操作及び細胞融合　Oiらの記載[32]に準拠して細胞融合を行った。すなわち、BALB/cマウス（雌、7週令）に、PBSに20μg/mlの濃度に浮遊させた1mlのLSを注射し、2週間後同量のLS、さらに1週間後50μgのLSを注射することにより感作した。最終免疫後3日目に、マウスより無菌的に脾臓を取り出し、脾細胞を調製した。この脾細胞と、ビルビン酸（和光純薬）、L-グルタミン（Flow Lab.Inc., McLean, Virginia, USA)、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび10%牛胎児血清（Irvine Scientific, Santa Ana., Ca., USA)を添加したRPMI-1640培養液（Sigma Chemical Co.以後、完全培地と略す）で培養したマウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14（鳥居

光雄博士、摂南大学から恵与していただいた。)を10：1の割合で混合し、45%ポリエチレングリコール6000(Koch Light Lab. Ltd., Bucks, England)存在下で細胞融合を行った。そして、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン(Flow Lab. Inc.)を含む完全培地に融合細胞を浮遊し、脾細胞数が$5X10^5$/ウェルとなるようにマイクロカルチャープレートのウェル(96well/ flat bottom, Corning Glass Works, Corning, N.Y., USA)に加え、10日間培養した。

２）スクリーニング及びクローニング　増殖したハイブリドーマの培養上清に抗LS抗体が存在するかどうかをEnzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA)法を用いてスクリーニングした。すなわち、0.1M炭酸緩衝液(pH 9.6)に20μg/mlの割合にLSを懸濁した溶液を96穴ELISA用マルチプレート(住友ベークライト、東京)の各ウェルに100μlずつ加えた後、4℃で一晩放置してウェル壁にLSを吸着させ

た。使用直前に0.05% Tween20（和光純薬）を含むPBS（以後PBSTと略す）で洗浄した。ウェルに、ハイブリドーマの培養上清100μlを加え、37℃で1時間インキュベートした。そして、アルカリフォスファターゼ標識ラビット抗マウスIgG抗体（Zymed Lab. Inc., South San Francisco, Ca.,USA)あるいは抗マウスIgM抗体（Zymed Lab. Inc.)を加え、37℃で1時間インキュベートした後、10%ジエタノールアミン（和光純薬）緩衝液に1mg/mlの割合に溶解したパラニトロフェニルリン酸2ナトリウム（和光純薬）溶液（以後、基質溶液と略す）を加え、室温で60分間反応させた。反応終了後、直ちに3M NaOH 50μlを各ウェルに加えて反応を止め、コロナ2波長マイクロプレート光度計（MTP-12、コロナ電気株式会社、茨城）を用いて405nmでの吸光度を測定した。そして、405nmでの吸光度が0.5以上を示すウェルのハイブリドーマを限界希釈法により3回クローニングした。このような方法により、

抗LS抗体を産生する4クローンのハイブリドーマを得た。

抗LS抗体を産生するハイブリドーマは、1x10^{6}cells/mlの細胞密度になるように無血清培地に浮遊し、これを5%CO_2存在下で3日間、37℃で培養した。Eyらの記載[33]に準拠して、この培養上清から抗体を精製した。すなわち、培養上清を0.05Mトリス-塩酸緩衝生理食塩水(pH8.6)で平衡化したプロテインAセファロースCL4Bカラム(Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden)に添加し、0.05Mグリシン塩酸緩衝生理食塩水(pH2.3)でカラムに吸着した吸着画分を溶出した。この溶出された吸着画分をPBSに対して透析したものを、抗LSモノクローナル抗体(4クローンからそれぞれ得た抗体を、以後moAnti-LS 1, 2, 3, 4と略す)として、以下の実験に使用した。

3) moAnti-LSのイムノグロブリンのクラスおよびサブクラスの測定　20μg/mlの割合に炭酸緩衝液に溶解させたラビット抗マウスIgG抗

体（Zymed Lab.）あるいはラビット抗マウスIgM抗体（Zymed Lab.）を96穴ELISA用マルチプレートのウェルに50μlずつ加え、37℃で1時間反応させ、各ウェルにこれらの抗体を吸着させた。PBSTで洗浄後、各ウェルにmoAnti-LSの4倍連続希釈溶液を50μlずつ加え、37℃で1時間反応させた。再びPBSTで洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体あるいはアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgM抗体を各ウェルに50μlずつ加え、37℃で1時間反応させた。そして、PBSTで洗浄した後、上述のELISA法により発色させ、405nmでの吸光度を測定した。

イムノグロブリンサブクラスの測定は、標識抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG1、IgG2a、IgG2bあるいはIgG3抗体（以上Zymed Lab.）を用いて上記の方法で行った。

8. 異なったmoAnti-LS間のLSへの結合における競合実験

スクリーニングと同様の方法で、LSをプレートの各ウェルに吸着させた。2種のmoAnti-LSを種々の割合で混合したものを反応させた後、上述のELISA法でLSに結合したmoAnti-LSの量の変化を測定した。

9. E. corrodensの異なった菌株間におけるLS量の比較

10^9cells/mlの割合に炭酸緩衝液に懸濁したE. corrodens溶液100μlをELISA用プレートのウエルに添加し、4℃で一晩インキュベートすることによりE. corrodens菌体をウェルにコートした。PBSTで洗浄後、100μlのmoAnti-LS 1溶液を加え、37℃で1時間反応させた。そして上述のELISA法により、405nmでの吸光度を測定した。

10. 電子顕微鏡による検索

E. corrodens 1073菌体上のLSの局在部位を、moAnti-LS 1を用いた免疫電顕法にて検索した。すなわち、銅グリッドにフォルムバールで支持膜をはり、カーボンを蒸着して補強した。

E. corrodensをこのグリッドに強固に付着させるため、グリッドを0.1%ポリ-L-リジン(Sigma Chemical Co.)で1時間処理した。このグリッドに、1%パラフォルムアルデヒド(和光純薬)、0.3%グルタールアルデヒド(Taab Lab., Berks, England)および0.2%ルテニウムレッド(和光純薬)を含んだPBSで30分間固定したE. corrodens 1073の懸濁液を滴下し、1時間静置することによりグリッドに菌体を付着させた。非特異的な反応を防ぐために3%ゼラチン(和光純薬)を加えたPBSとグリッドを室温で1時間反応させた後、moAnti-LS 1と1時間、ついでプロテインAゴールド(E.Y.Lab.Inc., San Mateo, Ca., USA)と1時間反応させたものを、透過型電子顕微鏡(JEOL 2000EX、日本電子、東京)で観察した。

薄切切片は、以下に述べる方法で作製した。すなわち、E. corrodens菌体とmoAnti-LS 1を37℃で1時間反応させた。未反応の抗体を遠

心操作により除いた。さらに、これにプロテインAゴールドと37℃で1時間反応させた。再び、遠心操作で未反応のプロテインAゴールドを取り除いた後、1%グルタールアルデヒドで1時間、さらに1%4酸化オスミウム（和光純薬）で一晩固定した。通法に従い上昇エタノール系列で脱水し、エポン樹脂（エッポク812、応研、東京）に包埋、ガラスナイフを用いミクロトーム2188 Ultrotome NOVA (LKB Produkter AB, Bromma, Sweden)により超薄切片を作製し、これをグリッドに載せた。この切片は、酢酸ウラニルおよび酢酸鉛にて電子染色を施した後、電顕で観察した。

結果

1. E. corrodens 1073と凝集する菌の検索

供試した42菌株のうちグラム陽性菌では、S.mutans E49およびOMZ176、S. sanguis ST160Rおよび34，A. viscosus T14AVおよびATCC19246，P. acnes 11828、グラム陰性菌ではB. gingivalis 381がE. corrodens 1073との間に菌体間凝集が観察された（表1）。

2. E. corrodensの菌体間凝集機序の検討

E. corrodens 1073と凝集する8菌株のうち、プラーク形成の初期に歯面に定着すると考えられているS. sanguis およびA. viscosus の2株ずつを用いてE. corrodensとの間の4通りの菌体間凝集反応の機序を検討することにした。始めに、菌体間凝集反応の基本的条件、すなわち温度、塩濃度、pHの影響を検討した。

1）菌体間凝集におよぼす温度の影響

4通りの菌体間凝集反応において、25℃における凝集活性を100として、4℃および37℃

における相対的凝集活性を表２に示した。S. sanguis ２株では４℃、37℃ともに凝集活性に変化はなかったが、A. viscosus ２株は37℃では変化はなかったものの、４℃では凝集活性がやや低下した。

２）菌体間凝集に及ぼす塩濃度の影響

４反応ともNaClが存在しない場合に凝集活性が最も高く、S. sanguis 34との菌体間凝集反応以外の３反応ではNaCl濃度の上昇とともに凝集活性が若干低下した（図１）。

３）菌体間凝集におよぼすpHの影響

４反応ともにpH４およびpH５では凝集活性が大きく低下したが、pH６からpH９の範囲では凝集活性に変化はみられなかった（図2）。

以上の結果とE. corrodensの口腔内生息環境を考慮して、以下の凝集実験は温度25℃，NaCl濃度0.15M，pH 7.2の条件下で行った。

４）菌体間凝集におよぼすEDTAおよび２価金属イオンの影響

E. corrodens 1073と４菌株との間の菌体間

凝集はすべて、0.025mMのEDTAを反応系に添加することによりほぼ完全に阻害された（図3）。次ぎに、0.05mM EDTAにより凝集が阻害された反応系に、0.2mMのCa^{2+}を添加したところ、菌体間凝集はもとのレベルに回復した（図4）。しかし、同濃度のMn^{2+}やMg^{2+}の添加によっては凝集は完全には回復せず、凝集活性を50%回復するのに必要なMn^{2+}およびMg^{2+}の量はCa^{2+}の量のそれぞれ16倍および64倍であった。

５）菌体の酵素処理や加熱処理が菌体間凝集におよぼす影響

どのような細菌表層成分が菌体間凝集に与っているかを明らかにするために、E.corrodens 1073菌体をプロナーゼ（表３）や、トリプシン（表４）で処理すると、凝集活性が大幅に低下した。この酵素によるE. corrodens菌体の処理では、４菌株ともトリプシンの方がプロナーゼに比較して凝集活性の低下は少なかった。一方、S. sanguisあるいはA. viscosusの菌体のみを処理しても、凝集活性

はほとんど変化しなかった。そして、E. corrodensおよび相手菌体の両方を処理すると、E. corrodens菌体のみを処理した場合よりも凝集活性の低下が大きかった。

また、E. corrodens 1073菌体を100℃,10分間加熱処理すると、S. sanguis 34との菌体間凝集反応以外の3反応における凝集活性は大幅に低下した。一方、A. viscosusやS. sanguis菌体の熱処理では、凝集活性はほとんど変化しなかった（表5）。

6）糖による菌体間凝集の阻害

糖による阻害がE. corrodensとS. sanguisあるいはA. viscosusとの間の菌体間凝集反応において観察されるかどうかを検討した。その結果、図5に示したように、4通りの菌体間凝集反応における糖の凝集阻害パターンはよく似た傾向を示した。すなわち、GalNAcが最も凝集阻害活性が強く、次いでD-ガラクトースあるいは非還元性末端にD-ガラクトースを含む2糖類であるメリビオースおよびラク

トースが凝集を完全に阻害した。一方、D-マンノース、D-グルコース、D-キシロースおよびL-フコースは400mMの高濃度でも有意の凝集阻害を示さなかった。

菌体間凝集が半分阻害されるのに必要なGalNAcの濃度は、菌により異なった（表６）。すなわち、A. viscosus ATCC19246が最少で0.6mM、最高がS.sanguis34で3.4mMを必要とした。

３．E. corrodens菌体からのLSの精製

湿重量150gのE. corrodens菌体から、最終的に8.2mgのLSが得られた。このようにして精製したLSは、赤血球凝集活性を有し、またS. sanguisおよびA. viscosus菌体を凝集するとともに、その凝集反応はGalNAcの添加により阻害された（表７）。

４．モノクローナル抗体の性状

moAnti-LSを産生するハイブリドーマ４クローンを得た。４クローンの産生するmoAnti-LSは、すべてIgGクラスで、サブクラスは

moAnti-LS 1および2がIgG2bで、moAnti-LS 3および4がIgG1であった。

これら4種のmoAnti-LSは、それぞれE.corrodens菌体と混和してもすべて菌体凝集は観察されなかった。

4種のmoAnti-LSのLSへの結合における競合作用を検討した結果を図6に示した。moAnti-LS 2とmoAnti-LS 3あるいは4の組合せのときに、moAnti-LS 2の添加した濃度が高くなるにつれて、吸光度の低下が認められたが、moAnti-LS 1とmoAnti-LS 3あるいは4の組合せではmoAnti-LS 1の添加した濃度を高くしても、吸光度はほとんど変化しなかった。このことから、moAnti-LS 2とmoAnti-LS 3あるいは4のLSへの結合には競合が起こることが示唆された。

LSによる赤血球凝集反応におよぼすmoAnti-LSの影響を調べた結果を表8に示した。4クローンともに赤血球凝集反応を阻害し、最も阻害活性が強いmoAnti-LS 1が2048倍希釈まで、

最も弱いもので128倍希釈まで凝集を阻害した。

E. corrodensと4菌株との間の菌体間凝集におよぼすmoAnti-LSの作用を調べた結果、moAnti-LSの各クローンによる菌体間凝集阻害活性の強さは、赤血球凝集阻害活性と同じく、moAnti-LS 1が最も強く、次いでmoAnti-LS 2で、moAnti-LS 3と4は同じ阻害活性を示した（表９）。

5. E. corrodens 1073と1080の菌体間凝集活性および赤血球凝集活性の比較

E. corrodens 1073あるいは1080と4菌株との間の菌体間凝集活性を測定した結果、E. corrodens 1073と4菌株との間の凝集活性をそれぞれ100とすると、E. corrodens 1080とA. viscosus T14AVおよびATCC19246, S. sanguis ST160Rおよび34との間の菌体間凝集活性はそれぞれ81、85、76、75であった。

また、E. corrodens 1073と1080の赤血球凝集活性を測定した結果、1073株の凝集活性を100とすると1080株は68であった。

6. E. corrodensの2菌株のLS量の比較

E. corrodens 1073と1080のmoAnti-LS 1に対する結合性を比較した結果、E. corrodens 1073の方が有意に結合性が高いことが明らかになった（図7）。

7. E. corrodensのLSの存在部位の検討

薄切せずに観察すると、菌体表層の電子線透過性の高い層に、すなわち莢膜と思われる部位に、ゴールド粒子が認められた（図8a）。

また、薄切切片では、線毛様の構造物は認められず、菌体表層あるいは菌体表層からすこし離れた部位に沿ってゴールド粒子が散見された（図8b）。

考察

プラークを構成する細菌細胞の間で付着反応、すなわち菌体間凝集という現象が、*in vitro*で観察されることを初めて報告したのはGibbonsとNygaard[34]である。以来、菌体間凝集反応は、多種類の菌から構成されているプラークの形成機序に大きな役割を担っていると考えられ、種々の組合せの菌体間凝集反応が検討されてきた。現在まで、1）streptococciの線毛のふさ状分岐（fimbrial tuft）を介する*S. sanguis*と*B. matruchotii*[8-10,35,36]あるいは*F. nucleatum*との凝集[37]、2）*Fusobacterium*の表層蛋白質を介する*F. nucleatum*と*S. sanguis*, *Streptococcus mitis*, *B. melaninogenicus*あるいは*Staphylococcus aureus*との凝集[18]，3）*S. salivarius*の細胞壁の糖蛋白抗原を介する*S. salivarius*と*V. alcalescens*との凝集[38,39]、4）*A. israelii*の線毛と*Cytophaga*の外膜膜胞（outer membrane blebs）の間の凝集[40]、5）レ

クチン一糖レセプター間の相互作用で起こると考えられるCapnocytophagaとA. israelii, A. viscosus, A. naeslundiiあるいはS. sanguisとの間の凝集[41]、6)レクチン一糖レセプター間の相互作用で起こるA. viscosusとS. pyogenes、Streptococcus agalactiaeあるいはPseudomonas aeruginosaeとの間の凝集[15]、A. viscosusあるいはA. naeslundiiとS. sanguisあるいはS. mitisとの間の凝集[11-15]、などが報告されている。

本研究では、歯周病原性細菌の一つと考えられているE. corrodens 1073が異種細菌細胞と菌体間凝集を起こすかどうかを15菌種42菌株の細菌細胞を用いて検討した結果、5菌種8菌株がE. corrodens 1073と凝集することが観察された（表1）。E. corrodens 1073との間に菌体間凝集を生じることが観察された菌株の中で、S. sanguisとA. viscosusはプラーク形成の初期に歯面に定着することが報告[42-44]されていること、さらにA. viscosusとS.

sanguisとの間の菌体間凝集反応の機序の解明が進んでいるため、本研究の比較対照となりやすいことから、A. viscosus T14AVおよびATCC19246とS. sanguis ST160Rおよび34を選択し、E. corrodens 1073との間の菌体間凝集反応の機序を検討した。

菌体間凝集活性の測定は、菌体が凝集することにより引き起こされる吸光度の変化を分光光度計を用いて測定することにより行った。この分光光度計を用いる方法は、E. coliと赤血球あるいはマンナンとの凝集反応[45,46]、また、A. viscosusあるいはA. naeslundiiによる赤血球凝集反応[47]、またA. viscosusと糖蛋白-ラテックス結合体との凝集反応[48]の解析に利用された。この分光光度計を用いた方法は、凝集の程度を肉眼的に数段階に分類するといった従来行われてきた判定法に比べて、主観に基づく測定者による差がなく、客観性に優れているとともに、凝集活性の微妙な変化をも測定できるという長所を備えてい

る。

E. corrodens 1073と4菌株との間の菌体間凝集反応では、4℃から37℃の間の温度差はほとんど凝集活性に影響しなかった（表2）。このことから、これらの凝集反応においては酵素反応は関係していないものと考えられる。

また反応系のNaCl濃度が高くなるにつれて凝集活性が低下したが、1MのNaCl濃度で約20%の凝集活性の低下しか認められなかったことから、本研究での4通りの菌体間凝集には静電気的な結合力のような非特異的な結合力の関与は弱いと考えられる（図1）。

E. corrodens 1073の菌体間凝集反応は、pHに依存した反応であった。すなわち、pH6から9の間では凝集活性はほとんど変化しなかったが、pH4から5では凝集活性は大きく低下した（図2）。E. corrodensのヒト頬粘膜上皮細胞[29]あるいはモルモット腹腔マクロファージ[30]への付着においては、それぞれ至適pHは、5および6.5であり、今回の結果と異

なっていた。このようにE. corrodensの付着反応という点では同じ反応ではあるが、標的細胞が異なることにより、pHの影響に差異がみられた。このpHの影響の違いが何に由来するのかは、現在のところ不明である。ちなみに、A. viscosus T14VとS. sanguis 34との間の凝集もpH依存性で、pH6.5から8で凝集を起こすと報告[49]されており、本研究での結果と類似している。

E. corrodens 1073と4菌株との間の菌体間凝集は、EDTAの存在により完全に阻害されたが（図3）、このEDTAによる阻害は反応系へのCa^{2+}の添加により回復した（図4）。しかし、Ca^{2+}を過剰に加えても、凝集活性はほとんど増加しなかった。さらに、Mn^{2+}やMg^{2+}の場合には高濃度に添加しても菌体間凝集はある程度しか回復しなかった。これらの結果は、E. corrodens 1073の菌体間凝集にはCa^{2+}の存在が必要ではあるが、その必要量は僅かで、細菌が通常保有している量で十分であること

を示唆するものであろう。EDTAでの菌体間凝集反応の阻害は、A. viscosusとS. sanguisの間の凝集[49]、B. matruchotiiとS. sanguisとの間の凝集[35]においても報告されている。

E. corrodens 1073菌体をプロナーゼやトリプシンで処理したり（表３および４）、100℃で10分間加熱すると（表５）、大幅に凝集活性が消失したが、相手菌体であるA. viscosusあるいはS. sanguis菌体に対する同様の処理によっては菌体間凝集活性はそれほど低下しなかった。そして、双方の菌体を処理すると、凝集活性の低下は最も大きかった。さらに、糖による菌体間凝集反応の定量阻害実験において、GalNAcが最も強く菌体間凝集を阻害した。本研究における各種の糖の阻害活性は、E. corrodens 1073菌体に存在するLSが中心的な役割を果たすことが既に示唆されている、ヒト赤血球[28]、ヒト頬粘膜上皮細胞[29]、モルモット腹腔マクロファージ[30]への付着におけるそれぞれの糖の阻害活性と類似してい

た。以上の結果から、E. corrodensとA. viscosusあるいはS. sanguisとの間の菌体間凝集においても、E. corrodens上のLSが決定的な役割を果たす可能性が示唆された。

そこで、このE. corrodensのLSに対するモノクローナル抗体を作製し、それを用いて凝集反応におけるLSの役割をより詳細に検討することにした。得られたmoAnti-LSは、E. corrodens菌体およびLSによる赤血球凝集を阻害し、その阻害活性はmoAnti-LS 1が最大で、次いで2，3，4の順であった（表８）。さらに、E. corrodensとA. viscosusおよびS.sanguisとの菌体間凝集反応をもmoAnti-LSは阻害し、その阻害活性もmoAnti-LS 1が最大で、次いで2，3，4の順であった（表９）。このようにmoAnti-LSで菌体間凝集反応が完全に阻害されたこと、およびmoAnti-LSの赤血球凝集阻害活性および菌体間凝集阻害活性が同じ結果を示したことから、この２種の反応は基本的に極めて類似した機構であると考えられる。また、

E. corrodensから精製したLSとA. viscosusの2株あるいはS. sanguisの2株をそれぞれ混合すると、いずれの菌株においても菌体凝集が観察された（表7）。以上のことから、E. corrodens 1073と4菌株との菌体間凝集反応においては、E. corrodensのLSが決定的な役割を果たすことが明らかとなった。

本研究ではE. corrodens 1073のLSに対する抗体を産生する4クローンの細胞を得たが、この4クローンからそれぞれ調製したmoAnti LSがLS上の同一部位を認識するのかどうかをELISA法を用いて検討した結果（図6）、moAnti-LS 2とmoAnti-LS 3あるいは4との組合せのときに、それぞれのmoAnti-LSのLSに対する結合性が低下した。このことから、moAnti LS 2,3,4はLSへの結合に際して競合作用を示すことが示唆され、互いにLSの近接した部位を認識する抗体と考えられる。さらに、moAnti-LS 1が最も凝集阻害活性が強かったことを考慮すると、moAnti-LS 1がLSの付着活性

部位の最も近くを認識し、moAnti-LS 2, 3, 4はそれよりやや離れたところ、すなわちLSの付着活性部位の少し離れたところを認識するものと推定される。

E. corrodens 1073株は1080株よりも赤血球凝集活性が高く、また菌体間凝集活性も高かった。さらに、E. corrodens 1073株と1080株に対するmoAnti-LS 1の結合性が異なり、凝集活性の強い1073株の方がmoAnti-LSの結合性が高かったこと（図７）から、E. corrodensの２株間の凝集活性の差は菌体表層に存在するLSの量に相関することが示唆された。

ところで、互いに異なる細菌細胞間に生じる菌体間凝集反応においては、単一様式(unimodal)の反応が関与している場合と二様式(bimodal)の反応が関与している場合の両者が知られている[50]。たとえば、A. viscosusあるいはA. naeslundiiとS. sanguisとの菌体間凝集反応では、組み合わせる菌株の違いにより、1)A. viscosusあるいはA. naeslundii

のレクチンとS. sanguisの糖レセプターによる単一様式反応、2)S. sanguisの熱および蛋白分解酵素感受性の付着因子とA. viscosusあるいはA. naeslundiiの耐熱性レセプターによる単一様式反応、3)前記の1)と2)の両方が関与する二様式反応、の3つの型が存在することが報告[51]されている。しかしながら、E. corrodens 1073と本研究で用いた4菌株との菌体間凝集では、E. corrodensのLSと4菌体表層の糖レセプター間の反応という単一の機序しか認められなかった。E. corrodens 1073と菌体間凝集を生じたA.viscosus ATCC 19246あるいは菌体間凝集を生じなかったA. viscosus T14Vは、S. sanguisとの間にA. viscosusのレクチンを介して菌体間凝集反応を起こすことが報告[49,52]されている。さらに、結果には示していないが、本研究で使用したA. viscosus ATCC19246およびT14Vの2株ともノイラミニダーゼで処理した赤血球を凝集させたことから、これらA.viscosusの2株

は、レクチン活性を保有していることが推察された。しかし、A.viscosus ATCC19246やT14Vのレクチン活性はE. corrodens 1073に対しては発揮されなかったことから、E.corrodens菌体にはA. viscosusレクチンに対する糖レセプターが存在しないことが示唆された。

また、E. corrodens 1073とtype aからgまでの血清型のS.mutansとの間の菌体間凝集の有無を調べた結果、a型のE49とd型のOMZ176がE. corrodens 1073と菌体間凝集を起こした（表1）。この血清型の型特異的抗原はガラクトースあるいはガラクトサミンを含んでいる[53]が、FA-1(type b)にもガラクトースやガラクトサミンが含まれていること、さらにtype aとdの他の菌株との間に菌体間凝集を起こさなかったことから、E. corrodensのLSはS. mutansの型特異的抗原を認識しているのではないと思われる。

E. corrodens 1073が相手菌体のどのような特異構造を認識しているかは興味ある点であ

るが、E. corrodensのLSのレセプターに関しては、糖による阻害実験による知見、すなわちGalNAcあるいはGalNAcに構造が類似した糖レセプターであろうということ以外、現在のところ明らかではない。

E. corrodens 1073菌体上でのLSの存在部位を免疫電顕法により検討した。Ebisuら[54]は、E. corrodens 1073には線毛様の構造物が認められないことを報告している。さらにE. corrodens 1073の菌体をSorvall Omni-mixerにより攪拌したり、超音波処理あるいはBraun Cell Homogenizerにより破壊しても、LSは遊離せず、LSは細胞エンベロープに検出された[31]。以上のことから、LSは細胞エンベロープに強固に結合していると推察された。今回の免疫電顕による観察では、E. corrodensに線毛は認められず、LSの存在部位を示すゴールドコロイド粒子は菌体表層に沿って観察され、またE. corrodensに莢膜様の構造物が認められた。これらの観察結果から、LSは莢膜ある

いは細胞壁に存在することが推測される。

この結果は、多くの細菌が線毛様構造物に付着因子を備えているという報告とは異なっている[55-57]。しかしながら、ある種の菌では、線毛以外にも付着因子が存在していることが知られている。例えば、Neisseria gonorrhoeaは、線毛を保有し、そこに付着因子が存在しているが、さらにprotein IIという付着因子を線毛以外の部位に保有している[58,59]。また、ある種のグラム陽性連鎖球菌ではリポタイコ酸が付着因子として働くことが報告[60-62]されている。さらに、E. coliのある菌株では、赤血球への付着因子が莢膜に存在していることも報告[63]されている。

ところで、A. viscosusやA. naeslundiiは、1型および2型線毛を所有し、それぞれに異なった付着因子、すなわち1型線毛にはハイドロキシアパタイトへの吸着、2型線毛には赤血球凝集、頬粘膜上皮細胞への付着および異種菌体との凝集に関与する付着因子が存在

することが、それぞれの線毛に対するモノクローナル抗体を用いて明らかにされている[64-69]。また、Yoshimuraら[70,71]は、B. gingivalisの線毛を精製したが、その画分には赤血球凝集活性が認められなかったことを報告している。さらに、磯貝ら[23]は、この精製した線毛に対するモノクローナル抗体を作製したところ、このモノクローナル抗体は赤血球凝集阻害活性より頬粘膜上皮細胞への付着阻害活性の方がはるかに強かったことから、B. gingivalisには頬粘膜上皮細胞あるいは赤血球に対する異なった付着因子を有する異なった線毛が存在し、標的細胞により異なった付着因子が働くことを示唆した。一方、E. corrodens 1073はこれまでの研究から、LSという単一物質を介して菌体間凝集、赤血球凝集、頬粘膜上皮細胞およびモルモット腹腔マクロファージに付着することが示されている。このように、付着という現象においても、菌種により非常に多様性がみられることは興味

あることである。

今回の実験から、E. corrodensは細菌レクチン様物質を介して菌体間凝集を起こすことが明らかになり、この機構を介して口腔内に定着する可能性が示唆された。今後、相手菌体のレセプターを解析するとともに、この様なin vitroで明らかとなったE. corrodens 1073の細菌レクチン様物質を介した菌体間凝集がin vivoのプラーク中で認められるかということは興味ある課題と考えられる。

結論

歯周病原性細菌E. corrodens 1073と15菌種42菌株との間の菌体間凝集の有無を調べた結果、5菌種8菌株の細菌細胞との間に菌体間凝集を生じた。この菌体間凝集を生じた組合せのうち、E. corrodens 1073とA. viscosus T14AVおよびATCC19246、S. sanguis ST160Rおよび34との間の菌体間凝集機構を解析し、以下の結論を得た。

(1)これらの菌体間凝集反応は、いずれも温度やNaCl濃度には依存しない反応であったが、pHに依存した反応であった。

(2)E. corrodens菌体をトリプシンやプロナーゼで処理したり、加熱(100℃、10分間)することにより菌体間凝集活性は大幅に低下したが、相手菌体のみを同じように処理しても菌体間凝集活性はほとんど変化しなかった。

(3)これらの菌体間凝集反応は、EDTAの存在によりほぼ完全に抑制されたが、Ca^{2+}を反応系に添加することによって回復した。

(4)これらの菌体間凝集反応は、GalNAcおよびD-ガラクトースを含む糖により特異的に抑制された。

以上の結果から、E. corrodens 1073と4菌株の細菌細胞との間の菌体間凝集反応において、E. corrodens菌体に存在するLSが重要な役割を演じていることが示唆されたので、このLSに対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いて以下に示す結果を得た。

(5)E. corrodensのLSに対するモノクローナル抗体を作製した結果、抗LS抗体(moAnti-LS)を産生する4種のハイブリドーマを得た。

(6)4種のmoAnti-LSはいずれも、LSによる赤血球凝集反応およびE. corrodens 1073と4菌株との間の菌体間凝集反応を完全に阻害した。

(7)E. corrodens 1073と1080の菌株間における赤血球凝集活性および菌体間凝集活性の差は、それぞれの菌体表層に存在するLSの量の差であることが示唆された。

(8)moAnti-LSを用いた免疫電顕による観察結

果から、LSはE. corrodens菌体表層の莢膜様構造物あるいは細胞壁に存在することが示唆された。

これらの結果から、E. corrodens 1073と4菌株間の菌体間凝集反応においては、E. corrodens菌体表層に存在するLSが決定的な役割を果していることが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました口腔治療学講座岡田宏教授に心から感謝いたします。また、実験の実施にあたり直接御指導を頂きました口腔治療学講座恵比須繁之助教授に深く感謝いたします。

さらに、本研究に対して種々御協力下さった口腔治療学講座教室員の皆様および電子顕微鏡の操作にあたり親切な助言を賜りました中央研究室の石丸昌司技官および大阪大学微生物病研究所中央実験室の和田多佳志技官に厚く御礼申し上げます。

文献

1)Ofek, I. and Beachey, E.H.: General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. Beachey, E.H., Bacterial adherence, Chapman and Hall, London and New York, 1980, 3-29.

2)Gibbons, R. J. and van Houte, J. : Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann. Rev. Microbiol., 29: 19-44, 1975.

3)Gaastra, W. and de Graaf, F. : Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. Microbiol. Rev., 46: 129-161, 1982.

4)Smith, H. : Microbial surfaces in relation to pathogenicity. Bacteriol. Rev., 41: 475-500, 1977.

5)Reed, W.P. and Williams, R.C.Jr. : Bacterial adherence: First step in pathogenesis of certain infections. J. Chron. Dis., 31: 67-72, 1978.

6)Smith, H. W. and Linggood, M. : Observation on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of Escherichia coli with paticular reference to porcine diarrhoea. J. Med. Microbiol., 4: 467-485, 1971.

7)Bladen, H., Hageage, G., Pollock, F., and Harr, R.: Plaque formation in vitro on wires by gram-negative oral microorganisms (Veillonella). Archs. Oral Biol., 15: 127-133, 1970.

8)Mouton. C., Reynolds, H. S., and Genco, R.J. : Characterization of tufted streptococci isolated from the "corn cob" configuration of human dental plaque. Infect. Immun., 27: 235-245, 1980.

9)Mouton, C., Reynolds, H.S., Gasiecki, E.A., and Genco, R.J.: In vitro adhesion of tufted oral streptococci to Bacterionema matruchotii. Curr. Microbiol., 3: 181-186, 1979.

10)Dirienzo, J. M., Porter-Kaufman, J., Haller, J., and Rosan, B. : Croncob formation : a morphological model for molecular studies of bacterial interactions. Megenhagen, S.E. and Rosan,

B., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1985, 172-176.

11)Cisar, J.O., Kolenbrander, P.E., and McIntire, F.C.: Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of Actinomyces viscosus or Actinomyces naeslundii. Infect. Immun., 24: 742-752, 1979.

12)Kolenbrander, P.E. and Williams, B.L. : Lactose-reversible coaggregation between oral actinomycetes and Streptococcus sanguis. Infect. Immun., 33: 95-102, 1981.

13)Kolenbrander P.E. and Williams, B.L. : Prevalence of viridans streptococci exhibiting lactose-inhibitable coaggregation with oral actinomycetes. Infect. Immun., 41: 449-452, 1983.

14)Kolenbrander, P.E., Inouye, Y., and Holdeman, L.V. : New Actinomyces and Streptococcus coaggregation groups among human oral isolates from the same site. Infect. Immun., 41: 501-506, 1983.

15)Komiyama, K. and Gibbons, R.J.: Interbacterial adherence between Actinomyces viscosus and strains of Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, and Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun., 44: 86-90, 1984.

16)井下英二，天野敦夫，玉川裕夫，埴岡隆，雫石聰，常光旭：Bacteroides gingivalis 381株の菌体外赤血球凝集素の部分精製とその性状．日歯周誌，27: 807-815, 1985.

17)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.

18)Kelstrup, J. and Funder-Nielson, T.D. : Aggregation of oral streptococci with Fusobacterium and Actinomyces. J. Biol. Buccale, 2: 347-362, 1974.

19)Cisar, J.O., Vatter, A.E., and McIntire, F.C. : Identification of virulence-associated antigen on the surface fibrils of Actinomyces viscosus T14. Infect. Immun., 19: 312-319, 1978.

20)Cisar, J.O., Sandberg, A.L., and Mergenhagen, S.E.: The function and distribution of different fimbriae on strains of Actinomyces viscosus and Actinomyces naeslundii, J. Dent. Res., 63: 393-396, 1984.

21)高添一郎： 黒色色素産生性Bacteroidesの病原性．日本細菌学雑誌，40: 459-470, 1985.

22)Okuda, K., Slots, J., and Genco, R.J. : Bacteroides gingivalis, Bacteroides asaccharolyticus and Bacteroides melaninogenicus subspecies : cell surface morphology and adherence to erythrocytes and human buccal epithelial cells. Curr. Microbiol., 6: 7-12, 1981.

23)磯貝浩，磯貝恵美子，吉村文信，鈴木武，高野一雄，井藤信義：単クロン性抗体を用いたB. gingivalisの線毛機能の解析．日本細菌学雑誌，41: 451, 1986.

24)Crawford, A.C.R., Socransky, S.S., Smith, E., and Phillips,R.: Pathogenicity testing of oral isolates in gnotobiotic rats. J. Dent. Res., 56: B120, 1977.

25)Listgarten, M.A., Johnson, D., Nowotny, A., Tanner, A.C.R., and Socransky, S.S. : Histopathology of periodontal disease in gnotobiotic rats monoinfected with Eikenella corrodens. J. Periodont. Res., 13: 134-148, 1978.

26)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.

27)Johnson, D. A., Behling, U.H., Lai, C.H., Listgarten, M.,

Socransky, S.S., and Nowotny, A. : Role of bacterial products in periodontitis: Immune response in gnotobiotic rats monoinfected with Eikenella corrodens. Infect. Immun., 19: 246-253, 1978.

28)Ebisu, S. and Okada, H. : Agglutination of human erythrocytes by Eikenella corrodens. FEMS Microbiol. Lett., 18: 153-156, 1983.

29)Yamazaki, Y., Ebisu, S., and Okada, H. : Eikenella corrodens adherence human buccal epithelial cells. Infect. Immun., 31: 21-27, 1981.

30)Miki, Y., Ebisu, E. and Okada, H. : The adherence of Eikenella corrodens to guinea pig macrophages in the absence and presence of anti-bacterial antibodies. J. Periodont. Res., in press, 1987.

31)山崎洋治：歯周病原性細菌Eikenella corrodensのヒト頬粘膜上皮細胞への付着機構の解析と付着に関与する細菌レクチン様物質の部分精製について．日歯周誌，26：223-242，1984.

32)Oi, V.T. and Herzenberg, L.A. : Immunoglobulin-prducing hybrid cell lines. Mishell, B.B. and Shiigi, S.M., Selected methods in cellular immunology, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1980, 351-370.

33)Ey, P.L., Prowse, S.J., and Jenkin, C.R. :Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. Immunochemistry, 15: 429-436, 1978.

34)Gibbons, R. J. and Nygaard, M. : Interbacterial aggregation of plaque bacteria. Archs. Oral Biol., 15: 1397-1400, 1970.

35)Lancy, P., Appelbaum, Jr.B., Holt, S.C., and Rosan, B. : Quantitative in vitro assay for "corncob" formation. Infect. Immun., 29: 663-670, 1980.

36)Mouton, C., Reynolds, H., and Genco, R.J. : Combined micro-manipulation, culture, and immunofluorescent techniques for isolation of the coccal organisms comprising the

"corncob" configuration of human dental plaque. J. Biol. Buccale, 5: 321-332, 1978.

37)Lancy, P., Dirienzo, J.M., Appelbaum, B., Rosan, B., and Holt, S.C. : Corncob formation between Fusobacterium nucleatum and Streptococcus sanguis. Infect. Immun., 40: 303-309, 1983.

38)Weerkamp, A.H. and McBride, B.C. : Characterization of the adherence properties of Streptococcus salivarius. Infect. Immun., 29: 459-468, 1980.

39)Weerkamp, A.H. and McBride, B.C.: Identification of a Streptococcus salivarius cell wall component mediating coaggregation with Veillonella alcalescens V1. Infect. Immun., 32: 723-730, 1981.

40)Kagermeier, A. S., London, J., Kolenbrander, P.E. : Evidence for the participation of N-acetylated amino sugars in the coaggregation between Cytophaga species strain DR2001 and Actinomyces israelii PK16. Infect. Immun., 44: 299-305, 1984.

41)Kolenbrander, P. E. and Hurst-Calderon, S. : Lactose-reversible coaggregation between Capnocytophaga and oral streptococci and Actinomyces. J. Dent. Res., 60: 333, 1981.

42)Socransky, S.S., Manganiello, A.D., Propas, D., Oram, V., and van Houte, J. : Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. J. Periodontal Res., 12: 90-106, 1977.

43)Theilade, E., Fejerskov, O., Prachyabread, W., and Kilian,M.: Microbiologic study on developing plaque in human fissures. Scand. J. Dent. Res., 82: 420-427, 1974.

44)Tinanoff,N., Gross, A., and Brady, J.M. : Development of plaque on enamel. Parallel investigations. J. Periodontal Res., 11: 197-209, 1976.

45)Firon, N., Ofek, I., and Sharon, N. : Carbohydrate specificity

of the surface lectins of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Salmonella typhimurium. Carbohydr. Res., 120: 235-249, 1983.

46)Ofek, I. and Beachey, E.H. : Mannose binding and epithelial cell adherence of Escherichia coli. Infect. Immun., 22: 247-254, 1978.

47)Costello, A. H., Cisar, J.O., Kolenbrander, P.E., and Gabriel, O. : Neuraminidase-dependent hemagglutination of human erythrocytes by human strains of Actinomyces viscosus and Actinomyces naeslundii. Infect. Immun., 26: 563-572, 1979.

48)Heeb, M. J., Costello, A.H., and Gabriel, O. : Characterization of a galactose-specific lectin from Actinomyces viscosus by a model aggregation system. Infect. Immun., 38: 993-1002, 1982

49)McIntire, F. C., Vatter, A.E., Baros, J., and Arnold, J. : Mechanism of coaggregation between Actinomyces viscosus T14V and Streptococcus sanguis 34. Infect. Immun., 21: 978-988, 1978.

50)Cisar, J.O. : Coaggregation reactions between oral bacteria: studies of specific cell-to-cell adherence mediated by microbial lectins. Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E., Host-parasite interactions in peridontal diseases. American Society of Microbiology, Washington, D.C.,1982, 121-131.

51)McIntire, F. C. : Specific surface components and microbial coaggregation. Mergenhagen, S.E. and Rosan, B., Molecular basis of oral microbial adhesion, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1985, 153-158.

52)Sato, S., Koga, T., and Inoue, M. : A possible mechanism for the cellular coaggregation between Actinomyces viscosus ATCC19246 and Streptococcus sanguis ATCC10557. J. General Microbiol.,130: 1351-1357, 1984.

53)Hamada, S. and Slade, H.D. : Biology, immunology, and

cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiol. Rev., 44: 331-384, 1980.

54)Ebisu, S., Miki, Y., Fukuhara, H., Okada, H., and Nakao, M. : An electorn microscopic study on the morphology of Eikenella corrodens. J. Osaka Univ. Dent. Sch., 21: 137-143, 1981.

55)Isaacson, R. E. : Pilus adhesins, Savage, D. C. and M. Fletcher, Bacterial adhesion, Plenum press, New York, 71-88, 1985.

56)Fives-Taylor, P. M. and Thompson, D.W. : Surface properties of Streptococcus sanguis FW213 mutants nonadherent to saliva-coated hydroxyapatite. Infect. Immun., 47: 752-759, 1985.

57)Handley, P.S., Carter, P.L., and Fielding, J. : Streptococcus salivarius strains carry either fibrils of fimbriae on the cell surface. J. Bacteriol., 157: 64-72, 1984.

58)Draper, D. L., Sweet, R.L., and Brooks, G.F. : Structural analysis of gonococcal protein II. Schoolnik, G. K., The pathgenic Neisseriae, American Society for Micorbiology, Washington, D. C., 1985, 265-270.

59)Draper, D. L., Lammel, C.J., Sweet, R.L., and Brooks, G.F. : Attachment of gonococcal outer membranes containing protein II variants to HeLa 229 cells. Schoolnik, G. K., The pathogenic Neisseriae, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1985, 271-275.

60)Beachey, E. H., Chiang, T.M., Ofek, I., and Kang, A.H. : Interaction of lipoteichoic acid of group A streptococci with human platelets. Infect. Immun., 16: 649-654, 1977.

61)Beachey, E. H., Dale, J., Grebe, S., Ahmed, A., Simpson, W.A., and Ofek, I. : Lymphocyte binding and T-cell mitogenic properties of group A streptococcal lipoteichoic acid. J. Immunol., 122: 189-195, 1979.

62)Beachey, E. H., Dale, J.B., Simpson, W.A., Evans, J.D., Knox,

K.W., Ofek, I., and Wicken, A.J. : Erythrocyte binding properties of streptococcal lipoteichoic acids. Infect. Immun., 23: 618-625, 1979.

63)Ørskov, I., Andersen, A.B., Duguid, J.P., Stenderup, J., and Ørskov, F.: An adhesive protein capsule of Escherichia coli. Infect immun., 47: 191-200, 1985.

64)Cisar, J.O., Barsumian, E.L., Curl,S.H., Vatter, A.E., Sandberg, A.L., and Siraganian, R.P. : Detection and localization of a lectin on Actinomyces viscosus T14V by monoclonal antibodies. J.Immunol., 127: 1318-1322, 1981.

65)Cisar, J. O., Curl, S.H., Kolenbrander, P.E., and Vatter, A.E.: Specific absence of type 2 fimbriae on a coaggregation-defective mutant of Actinomyces viscosus T14V. Infect. Immun., 40: 759-765, 1983.

66)Cisar, J. O., Barsumian, E.L., Curl, S.H., Vatter, A.E., Sandberg, A.L., and Siraganian, R.P. : The use of monoclonal antibodies in the study of lactose-sensitive adherence of Actinomyces viscosus T14V. J. Reticuloendothel. Soc., 28(suppl.): 73-79, 1980.

67)Clark, W.B., Wheeler, T.T., and Cisar, J.O., : Specific inhibition of adsorption of Actinomyces viscosus T14V to saliva-treated hydroxyapatite by antibody against type 1 fimbriae. Infect. Immun., 43: 497-501, 1984.

68)Revis, G. J., Vatter, A.E., Crowle, A.J., and Cisar, J.O. : Antibodies against the Ag2 fimbriae of Actinomyces viscosus T14V inhibit lactose-sensitive bacterial adherence. Infect. Immun., 36: 1217-1222, 1982.

69)Cisar, J. O., David, V.A., Curl, S.H., and Vatter, A.E. : Exclusive presence of lactose-sensitive fimbriae on a typical strain(WVU45) of Actinomyces naeslundii. Infect. Immun., 46: 453-458, 1984.

70)Yoshimura, F., Takahashi, K., Nodasaka, Y., and Suzuki, T. : Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe Bacteroides gingivalis. J. Bacteriol., 160: 949-957, 1984.

71)Yoshimura, F., Takasawa, T., Yoneyama,M., Yamaguchi,T., Shiokawa, H., and Suzuki, T. : Fimbriae from the oral anaerobe Bacteroides gingivalis: Physical, chemical, and immunological properties. J. Bacteriol., 163: 730-734, 1985.

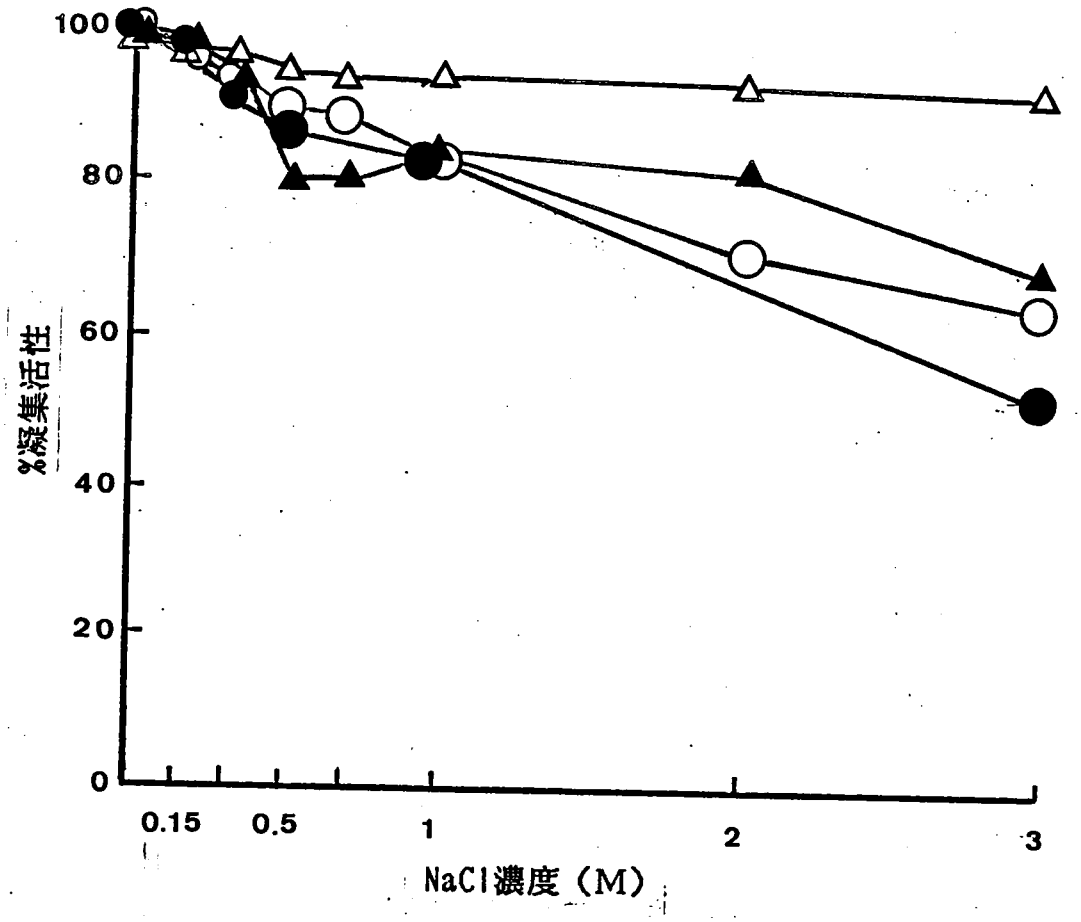


図 1

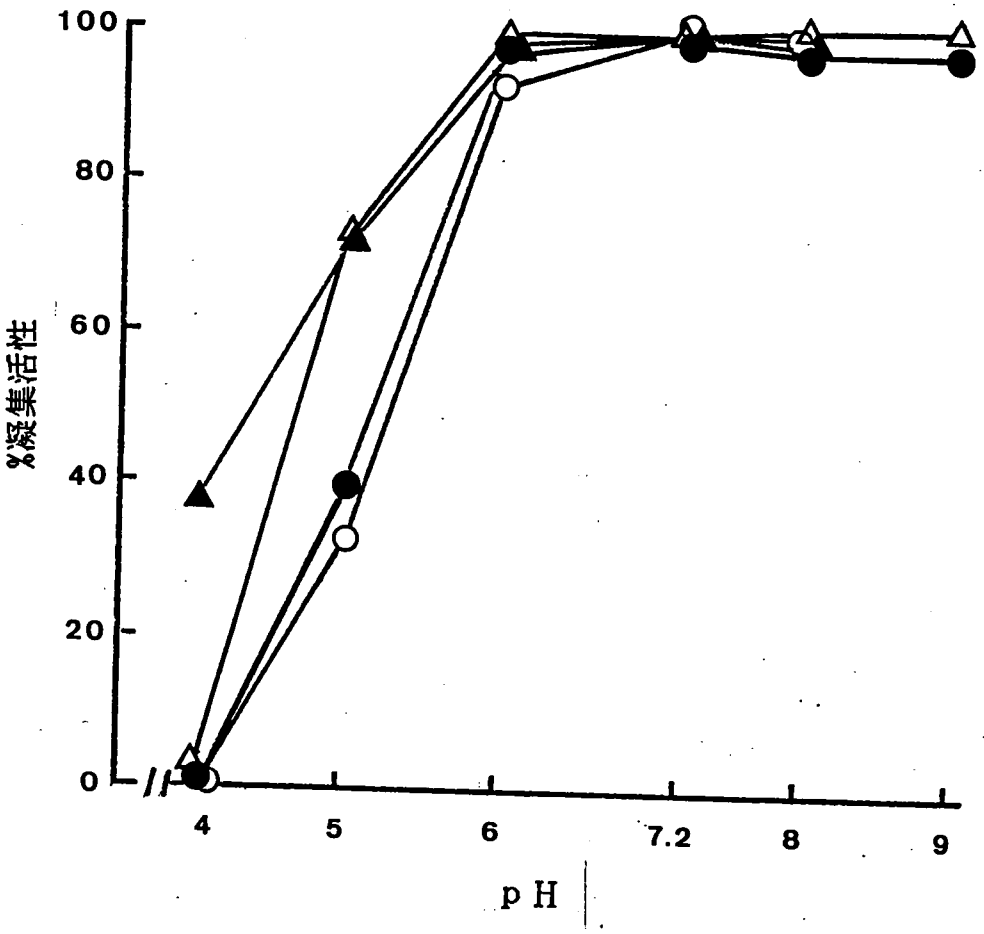


図2

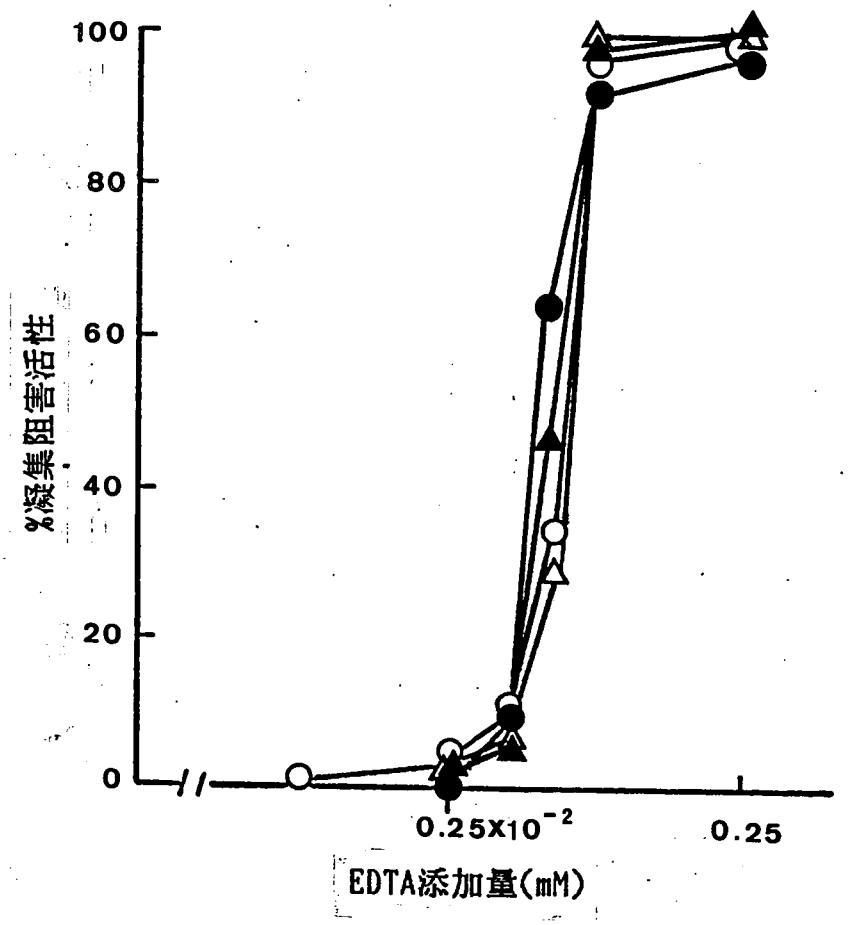
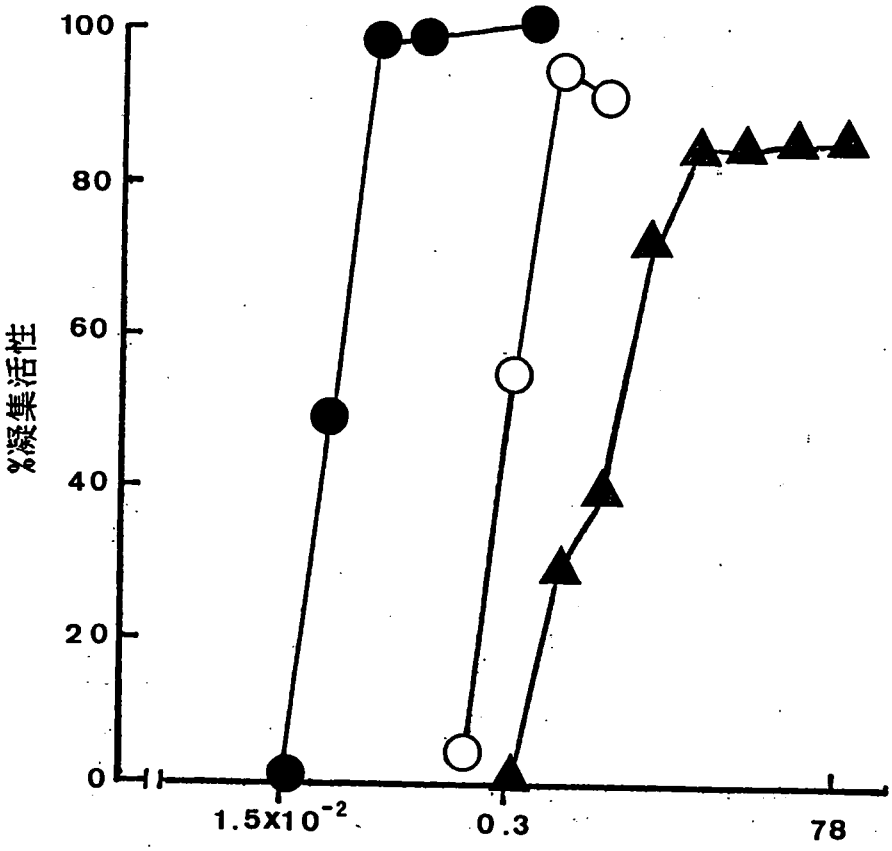
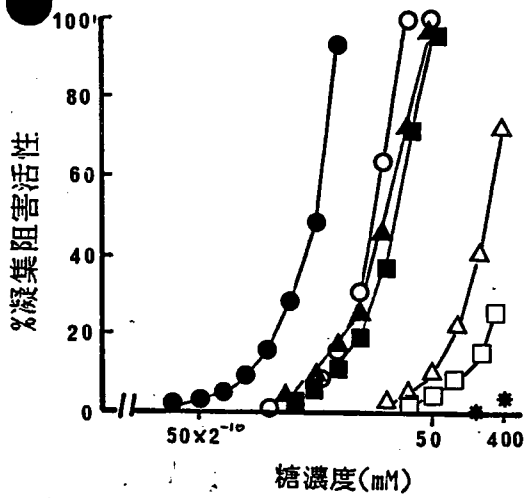


図3

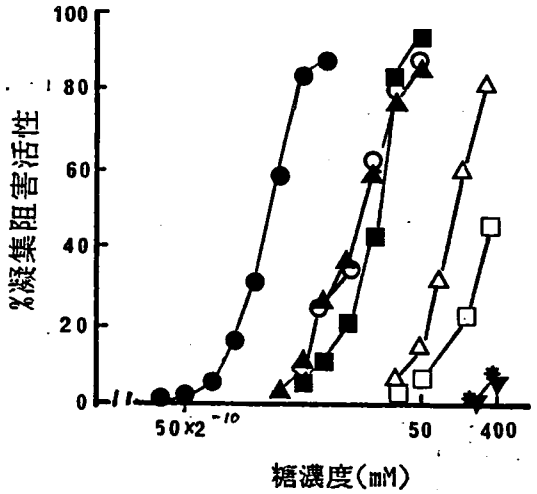


２価金属イオンの添加量(mM)

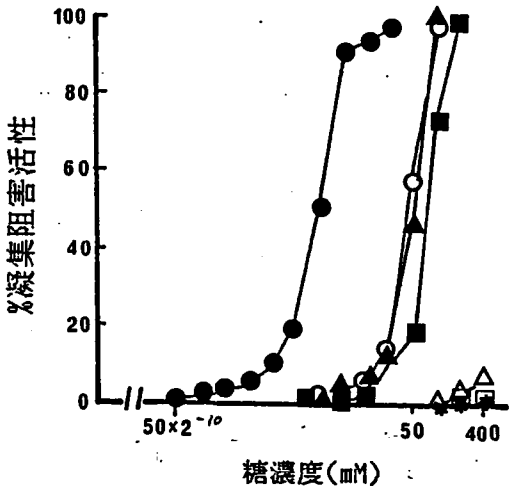
図４



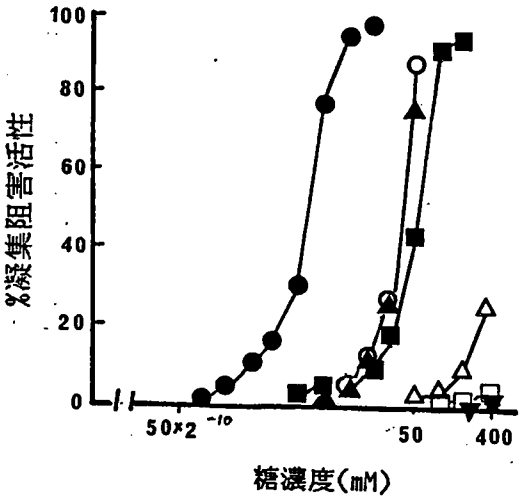
E. corrodens 1073-A. viscosus T14AV



E. corrodens 1073-A. viscosus ATCC19246



E. corrodens 1073-S. sanguis 34



E. corrodens 1073-S. sanguis ST160R

図5

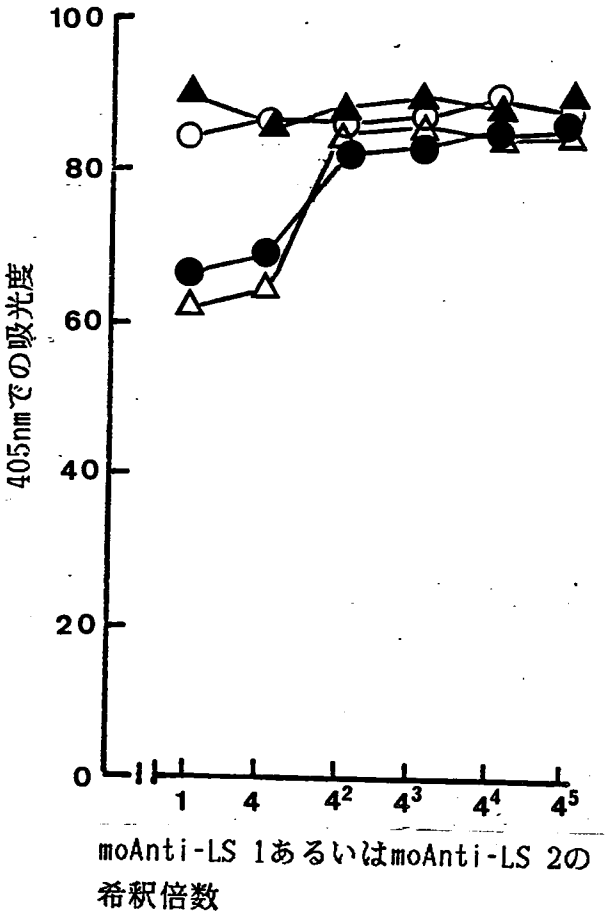

100
80
60
40
20
0
405nmでの吸光度
1
4
4²
4³
4⁴
4⁵
moAnti-LS 1あるいはmoAnti-LS 2の
希釈倍数

図6

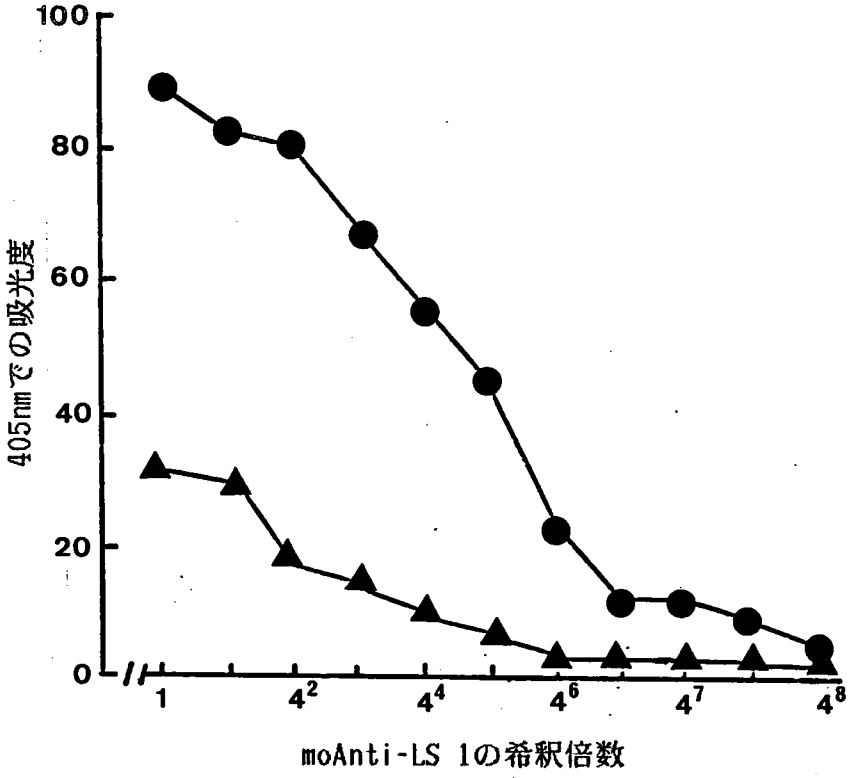


図7

図8a

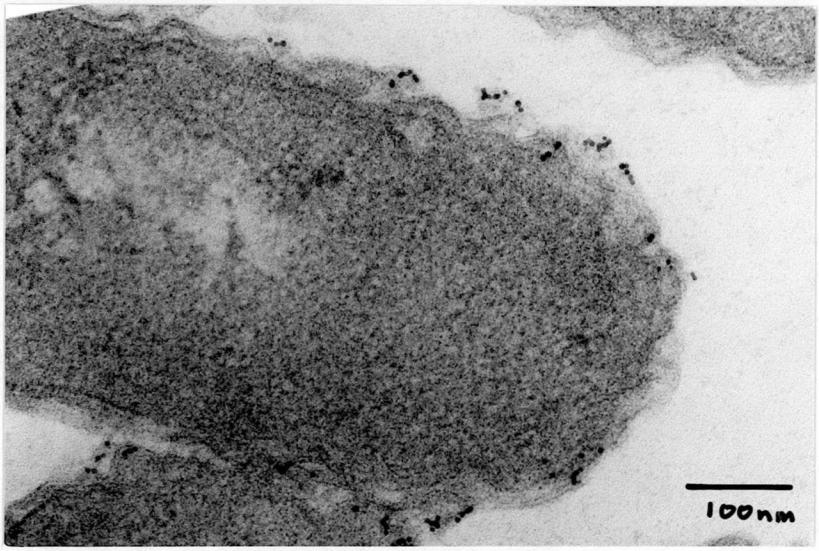


図8b

付図説明

図１．菌体間凝集におよぼすNaCl濃度の影響

種々の濃度のNaClを含むリン酸塩緩衝液中でE. corrodens(10^9 CFU/ml)とA. viscosusあるいはS. sanguis（550nmでの吸光度が0.45を示すように調製）を25℃でインキュベートした。凝集活性はNaClを添加しなかったときの測定値を100とした相対値で表した。

●： A. viscosus T14AV, ○： A. viscosus ATCC19246,

▲： S. sanguis ST160R, △： S. sanguis 34

図２．菌体間凝集におよぼすpHの影響

E. corrodens 1073(10^9CFU/ml)とA. viscosusあるいはS.sanguis（550nmでの吸光度が0.45となるように調製）を、pH4.0からpH 9.0までの種々のpHの緩衝生理食塩水中で25℃でインキュベートした。凝集活性はpH7.2の時の測定値を100とした相対値で表した。使用した緩衝生理食塩水は、酢酸塩緩衝生理食塩水（pH4.0-6.0）、リン酸塩緩衝生理食塩水（pH6.0-8.0）、トリスー塩酸緩衝生理食塩水（pH8.0-9.0)である。

●：A. viscosus T14AV, ○：A. viscosus ATCC19246,

▲：S. sanguis ST160R, △：S. sanguis 34

図３．菌体間凝集におよぼすEDTAの影響

E. corrodens 1073(10^9CFU/ml)と550nmでの吸光度が0.45になるように調製したA. viscosusあるいはS. sanguisを、種々の濃度のEDTAを含むPBS中で25℃でインキュベートした。凝集阻害活性は、反応系にEDTAを加えない場合を標準条件下時として本文に示した方法で算出した。

●：A. viscosus T14AV, ○：A. viscosus ATCC19246,

▲：S. sanguis ST160R, △：S. sanguis 34

図４．EDTAで阻害された菌体間凝集反応に対する２価金属イオンの

影響

E. corrodens 1073とA. viscosus T14AVとの菌体間凝集を0.05mMのEDTAで阻害した後、種々の濃度のCa^{2+}(●)、Mn^{2+}(▲)、Mg^{2+}(○)を加え凝集活性を測定した。凝集活性はEDTAを反応系に加えない場合における測定値を100とした相対値で表した。

図5. 糖による菌体間凝集の定量阻害曲線

E. corrodens 1073(10^9CFU/ml)とA. viscosusあるいはS. sanguis(550nmでの吸光度がそれぞれ0.45になるように調製した)の菌体間凝集反応で、各濃度の糖の%凝集阻害活性を測定した。
●:GalNAc, ○:メリビオース、▲:ラクトース、■:D-ガラクトース、△:L-アラビノース、□:D-マンノース、✱:D-グルコース、▼:D-キシロース

図6. サブクラスの異なるmoAnti-LSのLSへの結合に対する競合作用

moAnti-LS 1とmoAnti-LS 3(▲)、moAnti-LS 1とmoAnti-LS 4(○)、moAnti-LS 2とmoAnti-LS 3(△)、moAnti-LS 2とmoAnti-LS 4(●)の組合せにおいて、moAnti-LS 1あるいはmoAnti-LS 2の反応系での存在量を変化させたとき、moAnti-LS 3あるいはmoAnti-LS 4のLSへの結合量の変化をELISA法で測定した。

図7. E. corrodens 1073と1080のmoAnti-LSに対する結合性の比較

E. corrodens 1073(●)あるいはE. corrodens 1080(▲)をマイクロタイタープレートのウェルに吸着させた後、moAnti-LS 1のPBSTによる4倍連続希釈溶液(100μl)をウェルに添加し、37℃で1時間インキュベートした。PBSTで洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ラビット抗マウスIgG抗体100μlをウェルに添加し、37℃で1時間インキュベートした。PBSTで洗浄後、基質溶液を添加し、発色後、405nmでの吸光度を測定した。

図８．E. corrodensの免疫電顕写真

a)E. corrodens 1073をmoAnti-LS 1と37℃で１時間、ついでプロテインＡゴールドコロイドと37℃で１時間反応させた後、検鏡した。

b)E. corrodens 1073をmoAnti-LS 1と37℃で１時間、ついでプロテインＡゴールドコロイドと37℃で１時間反応させた後、グルタールアルデヒドおよび四酸化オスミウムで固定した。通法に従い脱水後、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作製した。

表1　E. corrodens 1073と種々の口腔細菌との間の菌体間凝集

菌名	菌体間凝集 a)	菌名	菌体間凝集
グラム陽性菌		*Actinomyces viscosus* T14V	−
Streptococcus mutans E 49	+	T14AV	+
HS 1	−	ATCC19246	+
AHT	−	ATCC15987	−
FA-1	−	Ny1	−
BHT	−	*Actinomyces naeslundii* ATCC12104	−
Ingbritt	−	B120	−
MT8148R	−	*Propionibacterium acnes* 11828	+
OMZ 176	+	*Bacterionema matruchotii* 14266	−
B 13	−	*Neiseria sp.* L10	−
P 4	−		
MT557	−	グラム陰性菌	
6715	−	*Bacteroides gingivalis* 381	+
MT3791R	−	*Bacteroides melaninogenicus* ATCC25845	−
OMZ 175	−	*Actinobacillus actinomycetemcomitance* ATCC29522	−
SE 11	−	ATCC29523	−
Streptococcus sanguis ST183R	−	*Veillonella alcalescens* ATCC17745	−
ST160R	+	*Capnocytophaga sputigena* #4	−
ST3	−	*Capnocytophaga ochracea* 25	−
M5	−	*Fusobacterium nucleatum* 1436	−
34	+		
Streptococcus salivalius HHT	−		
HT32	−		
HT9R	−		
HT3R	−		

a)＋は菌体間凝集の認められたことを、－は認められなかったことを示す。

表２　菌体間凝集におよぼす温度の影響

菌名	%凝集活性		
	4℃	25℃	37℃
A. viscosus T14AV	84	100	102
A. viscosus ATCC19246	88	100	101
S. sanguis ST160R	97	100	99
S. sanguis 34	99	100	98

E. corrodens(10^9CFU/ml)とA. viscosusあるいはS. sanguis(550nmでの吸光度が0.45を示すように調製)を種々の温度でインキュベートした。凝集活性は25℃における測定値を100とした相対値で表した。

表３　菌体のプロナーゼ処理が菌体間凝集におよぼす影響

菌名		%凝集活性	
		E.corrodens 1073 T.[a]	E.corrodens 1073 N.T.[b]
A. viscosus T14AV	T.	4	99
	N.T.	4	100
A. viscosus ATCC19246	T.	3	99
	N.T.	12	100
S. sanguis ST160R	T.	0	100
	N.T.	0	100
S. sanguis 34	T.	0	100
	N.T.	0	100

a)T.は5mg/mlのプロナーゼで菌体を処理したことを示す。

b)N.T.はプロナーゼ処理を行わなかったことを示す。

凝集活性は未処理の菌体どうしを反応させたときに測定された数値を100とした相対値で表した。

表4　菌体のトリプシン処理が菌体間凝集におよぼす影響

菌名		%凝集活性	
		E.corrodens 1073 T.[a]	E.corrodens 1073 N.T.[b]
A. viscosus T14AV	T.	10	92
	N.T.	13	100
A. viscosus ATCC19246	T.	21	90
	N.T.	35	100
S. sanguis ST160R	T.	0	95
	N.T.	30	100
S. sanguis 34	T.	0	95
	N.T.	49	100

a)T.は1mg/mlのトリプシンで菌体を処理したことを示す。

b)N.T.はトリプシン処理を行わなかったことを示す。

凝集活性は未処理の菌体どうしを反応させたときに測定された数値を100とした相対値で表した。

表５　菌体の加熱処理が菌体間凝集におよぼす影響

菌名		%凝集活性	
		E.corrodens 1073 T.[a]	E.corrodens 1073 N.T.[b]
A. viscosus T14AV	T.	27	104
	N.T.	22	100
A. viscosus ATCC19246	T.	21	79
	N.T.	25	100
S. sanguis ST160R	T.	55	95
	N.T.	83	100
S. sanguis 34	T.	5	100
	N.T.	11	100

a)T.は菌体を100℃で10分間加熱処理したことを示す。

b)N.T.は加熱処理を行わなかったことを示す。

凝集活性は加熱処理しなかった菌体どうしを反応させたときに測定された数値を100とした相対値で表した。

表6　E. corrodensの菌体間凝集に対する糖の阻害能

菌名	50%阻害するのに必要なGalNAcの濃度(mM)	各種の糖のGalNAcに対する相対阻害能[a]							
		メリビオース	ラクトース	D-ガラクトース	D-アラビノース	D-マンノース	D-グルコース	D-キシロース	L-フコース
A. viscosus T14AV	1.5	1/4	1/9	1/11	1/150	* [b]	*	*	*
A. viscosus ATCC19246	0.6	1/15	1/15	1/22	1/238	*	*	*	*
S. sanguis 34	3.4	1/13	1/16	1/24	*	*	*	*	*
S. sanguis ST160R	1.1	1/14	1/16	1/25	*	*	*	*	*

a)凝集を50%阻害するのに必要なGalNAcの濃度(mM)／凝集を50%阻害するのに必要な種々の糖濃度(mM)で表した。

b)400mMの濃度でも凝集阻害活性が50%に達しなかったことを示す。

表７　LSによるA.viscosusあるいはS.sanguisの凝集
　　およびGalNAcによる凝集阻害

菌名	凝集価[a]	GalNAcによる凝集阻害[b]
A.viscosus T14AV	2^{7}	＋
A.viscosus ATCC19246	2^{5}	＋
S.sanguis ST160R	2^{6}	＋
S.sanguis 34	2^{6}	＋

a)赤血球凝集価が2^{12}を示すよううに調製したLSを倍数希釈したもの60μlに550nmによる吸光度が1.0を示すように調製した菌懸濁液60μlを加え、混和後室温で１時間静置後凝集価を測定した。凝集価は凝集を引き起こすLSの最大希釈倍数で表した。

b)上記の反応系に100mMのGalNAc 30μlを加え凝集が阻害されるか調べた。＋は凝集が阻害されたことを表す。

表８　LSの赤血球凝集におよぼすmoAnti-LSの影響

モノクロナール抗体	赤血球凝集阻害価
moAnti-LS 1	2048
moAnti-LS 2	256
moAnti-LS 3	128
moAnti-LS 4	128

赤血球凝集価が４になるように調製したLS溶液(50μl)とPBSで連続希釈したmoanti-LS溶液(50μl)を混和し、60分間インキュベートした。次いで1%ノイラミニダーゼ処理ヒト赤血球(50μl)を加え混和後、室温で１時間静置し、凝集の有無を判定した。赤血球凝集阻害価は凝集阻害を起こすmoAnti-LSの最大希釈倍数で表示した。

表9　菌体間凝集におよぼすmoAnti-LSの影響

モノクローナル抗体	凝集阻害価			
	A.viscosus ATCC19246	A.viscosus T14V	S.sanguis ST160R	S.sanguis 34
moAnti-LS 1	1024	512	1024	1024
moAnti-LS 2	512	128	256	256
moAnti-LS 3	64	64	128	128
moAnti-LS 4	64	64	128	128

moAnti-LSをPBSで連続希釈した溶液(50μl)と、E.corrodens 1073懸濁液(10^9CFU/ml)とをマイクロタイタープレートのウェル内に添加し、混和攪拌後、37℃で1時間インキュベートした。さらに550nmでの吸光度が0.45を示すように調製した各菌の懸濁液(50μl)を添加し、攪拌した後、菌体凝集の有無を肉眼的に判定した。凝集阻害価は、凝集阻害をおこすmoAnti-LSの最大希釈倍数とした。