

〔原 著〕

耳下腺唾液画分に対する *Streptococcus mutans* Ingbritt株の 付着性と Antigen Bとの結合性について

鎌口 有秀, 星 和明*, 宮川 博史, 今村 光孝,
猪股孝四郎*, 馬場 久衛

北海道医療大学歯学部口腔細菌学教室

(主任教授 馬場久衛)

*北海道医療大学歯学部口腔生理学教室

(主任教授 猪股孝四郎)

Adherence of *Streptococcus mutans* Ingbritt to parotid saliva fraction-coated hydroxyapatite, and binding properties of Antigen B to parotid saliva components

Arihide KAMAGUCHI, Masaaki HOSHI*, Hiroshi MIYAKAWA,
Mitsutaka IMAMURA, Koshiro INOMATA* and Hisae BABA

Department of Oral Microbiology, and* Department of Oral

Physiology, School of Dentistry, HEALTH SCIENCES UNIVERSITY OF HOKKAIDO

(Chief Prof, Hisae BABA)

(*Chief Prof, Koshiro INOMATA)

Abstract

The present study investigated the relationship between the components in parotid saliva that promote the adherence of *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite (HA) and bind with Antigen B.

Parotid saliva was fractionated into three fractions with an ultrafiltration apparatus using three kinds of ultrafilter paper with pore sizes of 50,000, 10,000, and 1,000, designated 50K UP, 10K UP and 1K UP fractions, respectively. Protein patterns on SDS-PAGE indicated that the 50K UP fraction contained species with molecular weights (Mw) above 50,000, the 10K UP fraction was mainly from Mw 25,000 to Mw 10,000, and the 1K UP fraction contained mainly proteins below Mw 20,000. *S. mutans* Ingbritt adhered to hydroxyapatite coated with these three fractions. The 1K UP, the lowest molecular weight, was applied to a Sephadex G-75 column and eluted with H₂O. Two protein bands of Mw 14,400 and 16,500 were observed in the fractions to which *S. mutans* ingbritt adhered when coating HA, but not in the fractions to which *S. mutans* did not adhere. Although Antigen B bound to many parotid saliva compo-

受付：平成6年8月23日

本論文の要旨は第32回歯科基礎医学会（平成2年10月20日）にて発表した。

nents on immunoblot, it did not bind to these two components.

The observations on immunoblot did not show whether these two components are related to the binding of Antigen B only when the components change to suitable conformations. It is suggested that nonspecific binding property of Antigen B may contain a heavy hydrophobic region anchor which is usually buried in the cell wall of *S. mutans*.

Key word: *Streptococcus mutans*, adherence, parotid saliva, Antigen B

緒 言

う蝕原因菌とされているmutans streptococciにはa~hの8つのserotypeがあり、ヒトのう蝕部位より高率に分離されるのはserotype cの*Streptococcus mutans*である^{1,2,3}。*S. mutans*はシュクロースより不溶性の多糖を形成し歯面に強固に結合する前に、菌体表層に存在する微絨毛様構造物 (fussy coat) により唾液由来のペリクルに対しシュクロース非依存性の初期付着をすることが第一歩と考えられている^{4,5,6,7,8}。このfussy coatの成分はAntigen B (または I / II, I F, P 1, PAcなどと呼ばれる) であり、分子量約190,000のタンパク質よりなる。Antigen Bを保有しない変異株は親株に比較して著しく唾液コートハイドロキシアパタイトに対し付着性が低下することより、Antigen Bは*S. mutans*のペリクルに対する初期付着の菌側の主要な因子とみなされている^{9,10}。また、実験動物におけるAntigen Bによる能動免疫、受動免疫によってう蝕が低下することが報告されており、ヒトのう蝕ワクチンとして期待されている^{11,12,13,14}。Antigen BはすでにLeeら¹⁵、Okahashiら⁸)によりクローニングされDNAのシーケンスもなされている¹⁶。一方*S. mutans*は唾液中のmucins, proline-rich proteins (PRPs), histatins, lysozyme, fibronectin, sIgA, salivary agglutininなど種々の唾液成分と結合することが報告されている^{17,18,19,20,21}。このようにAntigen Bの分子性状や菌に結合する唾液中の

成分について多くの報告がなされているが、Antigen Bと結合する唾液成分については明確にはされていない。そこで、耳下腺唾液を限外ろ過により分画し、各画分にてコートしたハイドロキシアパタイトに対する菌の付着性と各画分に対するAntigen Bの結合性を特に耳下腺唾液のタンパク質成分との関連性についてimmunoblotにより比較検討し、Antigen Bの性状の一端を明らかにすることを試みた。

実験方法と材料

使用菌株と培養法

S. mutans Ingbritt (当教室保存株) とIngbritt株より得たhydrophilic variant (IBLと略す、当教室保存株)¹⁰を使用した。

S. mutans IngbrittはBrain Heart Infusion broth (Difco) で37°C、一夜嫌気培養 (混合ガス: CO₂10%, H₂10%, N₂80%使用) 後、遠心分離し (10,000rpm, 30min), 菌体を10mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer (pH7.2) にて3回洗浄し菌液を作成した (OD_{540nm}: 1.8)。

耳下腺唾液の採取方法と分画法

耳下腺唾液は健康被検者 (38才, 男性) よりLashley cupを用いクエン酸にて刺激し採取した²²。唾液9 mlに対しprotease inhibitor (1M 6-amino-n-capronic acid, 50mM benzamidine hydrochloride, 10mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 100mM EDTA 4Na) を1 mlの割合で

添加した²³⁾。耳下腺唾液50mlを分子量50,000のフィルター (UK-50, Advantec) を用いウルトラフィルターユニット (UHP-62, Advantec) にて限外ろ過し、約3倍量の蒸留水にて洗浄した。限外ろ過上部液を最終量50mlとし50K UP画分とした。ついで、このろ過液を分子量10,000のフィルター (UK10, Advantec) にて限外ろ過し、約3倍量の蒸留水で洗浄後、限外ろ過上部液最終量を50mlとし、10K UP画分とした。さらに、このろ過液を分子量1,000のフィルター (UK-1, Advantec) にて限外ろ過し、約3倍量の蒸留水で洗浄後、限外ろ過上部液最終量を50mlとし1K UP画分とした。これらの各画分は使用時まで -80°C にて冷凍保存した。

耳下腺唾液中の加熱処理とトリプシン処理法

Protease inhibitor無添加の耳下腺唾液を 100°C 、10分加熱処理後、8,000 rpm、10分間遠心分離処理し、その上清を加熱処理耳下腺唾液とした。また、同耳下腺唾液1mlに対しTrypsin (223U/mg P, Worthing biochemical Corp.) $10\mu\text{l}$ ($1\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ または $10\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ in 0.5M Tris-HCl buffer, pH 7.2, 10mM CaCl_2) を添加し、 37°C 、30分間反応させた。反応の停止は 100°C の加熱または0.2M Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMF)を添加することにより行った。この液をトリプシン処理耳下腺唾液とした。

Antigen Bの精製法と抗体の作成法

Antigen Bの精製法は前報に準じて行った¹⁰⁾。すなわち、Antigen Bを菌体外に多量放出するhydrophilic variantである*S. mutans* IBLをChemical defined medium (4L)²⁴⁾にて 37°C 、24時間嫌気培養(混合ガス： CO_2 10%、 H_2 10%、 N_2 80%使用)し、遠心により培養上清を得た。ついでこの上清を67%硫酸塩析、DEAE-Cellulose イオン交換クロマトグラフィー、TOYOPEAL HW 55Fによるゲルろ過を行い、分子量190,000のAntigen Bを精製した。

Antigen Bに対する抗体は家兎にAntigen B

(10mg/ml)とFreund's complete adjuvant (Difco)とを混合し、皮下に10日間隔で免疫し最終免疫より10日後に採血し、抗血清を得た。

耳下腺唾液コートハイドロキシアパタイトに対する菌の付着性の測定法

30mgのハイドロキシアパタイト(以下HAと略す; Bio-Gel HTP, Bio-Rad Laboratories)を1.5mlのマイクロチューブに分取し、1mlの10mM HEPES buffer(pH 7.2)を添加、攪拌、静置後、沈殿上清に残留する微細なHAを除去する操作を3回行った。このマイクロチューブに1mlの耳下腺唾液中の各画分を添加し、1時間、室温で、回転培養機(10 rpm; ローテーター RT50, Taitec)にかけ耳下腺唾液コートHA(以下PS-HAと略す)とした。ついで、Bovin serum albumin(BSA, 30 mg/ml)で同様に処理後、10mM HEPES buffer(pH7.2)にて3回洗浄した。ついで、このPS-HAに*S. mutans* Ingbrittの菌液1mlを添加し、回転培養機にて同様に回転させながら室温で1時間反応させた。反応後、静置し、PS-HAを沈殿させ、PS-HAに結合せず浮遊している菌を除去する操作を6回行った。ついで、1mlの10mM HEPES buffer(pH7.2)と2N HClを $200\mu\text{l}$ 添加し、HAを溶解させ菌の濁度を分光光度計(Hitachi Model 200-20, $\text{OD}_{540\text{nm}}$)にて測定した。コントロールはHAをBSAでコートしたものに菌液を反応させ同様にを行った。熱処理、トリプシン処理耳下腺唾液、Sephadex G-75にて分画した各フラクションに対する付着性の測定も同様にを行った。

耳下腺唾液中の各画分とAntigen Bとの結合性の測定法

耳下腺唾液中の各画分をLaemmliの方法²⁵⁾によりSDS-PAGE(4-20%グラジエントゲルまたは15%ゲルを使用)後、western blotting(semidry electro-blotter, Sartorius)を行い²⁶⁾、skim milkでブロッキングした。ついで、Antigen B(200

μg/ml)を反応させた後、一次抗体としてanti-Antigen B 抗体、二次抗体としてAnti-rabbit Ig, biotinylated species-specific whole antibody(from donkey, Amersham) を反応させ、ついでVecta stain Elite ABC Kit (フナコシ薬品KK) を用いて発色させた。

HAに結合する耳下腺唾液成分

HAに結合した耳下腺唾液とnative耳下腺唾液のタンパク成分を比較するため耳下腺唾液をバッチ法とカラム法にて結合させ0.5Mリン酸buffer(pH7.2)にて溶出させ、透析チューブにて脱塩後、SDS-PAGE(4-20%グラジエントゲル) にかけてタンパク染色した。

Sephadex G-75による分画法

1K UP 画分の3 mlをSephadex G-75 カラム(2.5×90 cm)にかけ、蒸留水にて溶出し、5 mlずつ分画した(flow rate, 100ml/h)。各フラクションにてコートしたHAに対する*S. mutans*の結合性を測定後、凍結乾燥し、SDS-PAGE, immunoblotの試料とした。

結 果

加熱処理、トリプシン処理耳下腺唾液にてコートしたHAに対する*S. mutans* Ingbrittの結合性

耳下腺唾液を加熱処理しても*S. mutans* Ingbrittの付着性は低下せず若干増加傾向を示した。これに対して10μgのトリプシン処理をすることにより、著しい付着性の低下がみられた(Fig. 1)。これらの処理をした耳下腺唾液のSDS-PAGEのタンパク染色パターンをnative耳下腺唾液と比較してみると(Fig. 2)、加熱処理により変性沈澱するものは分子量50,000付近のアミラーゼを主体としたものであった。その他のタンパク染色バンドには変化はみられなかった。1μgのトリプシン処理では大きな変化はみられなかったが、10μgのトリプシンにて処理することにより、ほとんどのタンパクバンド

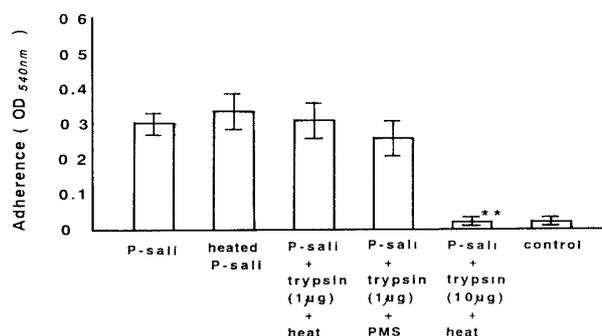


Fig. 1. Adherence of *S. mutans* Ingbritt cells to parotid saliva-, heated parotid saliva-, and trypsin-treated parotid saliva-coated hydroxyapatite (HA). Procedures as described in Materials and Methods. P values by Student's t test.

* p<0.05, * * p<0.01 as compared with parotid saliva values.

Abbreviation: P-sali, parotid saliva; PMS, phenylmethylsulfonyl fluoride.

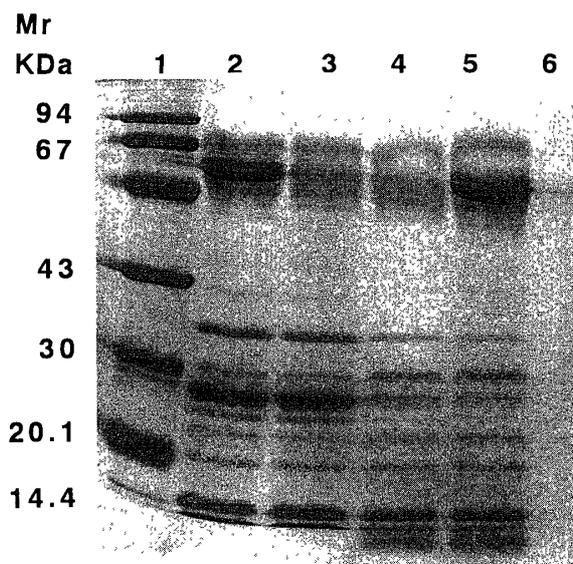


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of parotid saliva, heated parotid saliva, and trypsin-treated parotid saliva. Samples were electrophoresed on a 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. Lanes: 1, Molecular weight markers (Pharmacia, Sweden) phosphorylase b (94,000), albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100), and α-lactalbumin (14,400); 2, Native parotid saliva, 3, Heated parotid saliva; 4, Trypsin (1μg)-treated parotid saliva (reaction stopped with heating) 5, Trypsin (1μg) treated parotid saliva (reaction stopped by 5μl 0.5M phenylmethylsulfonyl fluoride); 6, Trypsin (10μg) treated parotid saliva (reaction stopped with heating).

は消失した。このことにより、トリプシンにより分解を受ける耳下腺のタンパク質も *S. mutans* 付着に関与することがわかった。

耳下腺唾液とHA結合耳下腺唾液成分のSDS-PAGEでの比較

Native耳下腺唾液とHA結合耳下腺唾液成分のタンパク染色パターンにおいて、量的な違いはみられたが、タンパクバンドのパターンには殆ど違いがみられなかった(Fig. 3)。このことより、*S. mutans* Ingbrittの付着性および

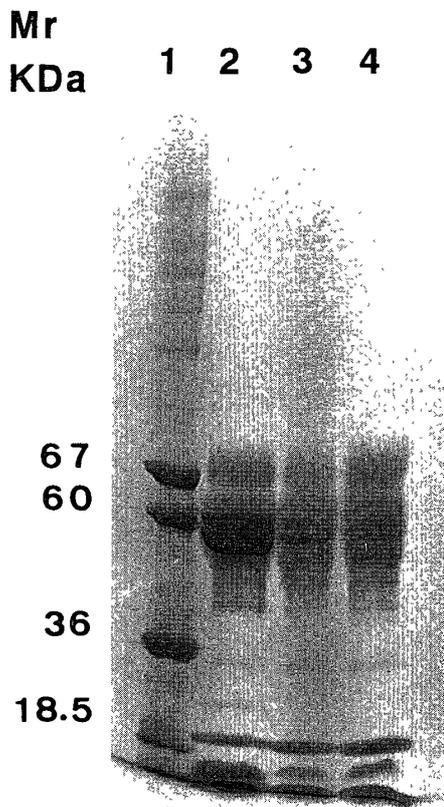


Fig. 3. SDS-PAGE pattern of hydroxyapatite-binding components of parotid saliva eluted by batch and column methods. Samples were electrophoresed on a 4-20% polyacrylamide gradient gel and stained with Coomassie brilliant blue. Lanes: 1, Molecular weight markers (Pharmacia, Sweden) ferritin (220,000), albumin (67,000), catalase (60,000), lactate dehydrogenase (36,000), and ferritin (18,500); 2, Native parotid saliva; 3, Hydroxyapatite-binding components of parotid saliva eluted by the batch method; 4, Hydroxyapatite-binding components of parotid saliva eluted by the column method.

Antigen Bと結合する耳下腺唾液成分の検討のための出発材料として、native耳下腺唾液を使用した。

耳下腺唾液各画分コートHAに対する*S. mutans* Ingbrittの付着性

S. mutans Ingbrittはnative耳下腺唾液、50K UP, 10K UP, 1K UP画分の各画分にてコートしたHAに付着した。中でも10K UP画分に最も強い付着性がみられた。50K UP画分と1K UP画分はnative耳下腺唾液コートHAに対するより弱い付着ではあるが、ほぼ同等の付着がみられた(Fig. 4)。各画分のSDS-PAGEのタンパク染色パターンをみても(Fig. 5)、50K UP画分は分子量50,000近傍にメジャーな2本のバンドと分子量50,000から70,000にブロードなタンパクバンドがみられたがnative耳下腺唾液にみられる分子量50,000以下の多数のバンドはみられず、低分子の物質はろ液に移行したことが確認された。このことにより、50K UP画分は分子量が50,000以上の成分よりなる画分であった。10K UP画分は50K UP画分にみられ

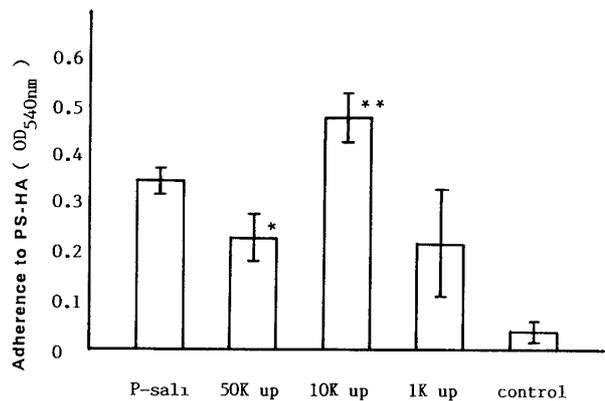


Fig. 4. Adherence of *S. mutans* Ingbritt cells to parotid saliva and to parotid saliva fraction-coated hydroxyapatite (PS-HA). All procedures as described in Materials and Methods. P values by Student's t test. * p<0.05, ** p<0.01 as compared with parotid saliva values. Abbreviations: P-sali, parotid saliva; 50K UP, 50K UP fraction; 10K UP, 10K UP fraction; 1K UP, 1K UP fraction.

た分子量50,000近傍の成分がトレース程度みられた。また分子量25,000から10,000前後にかけて6本のバンドがみられた。10K UP画分は

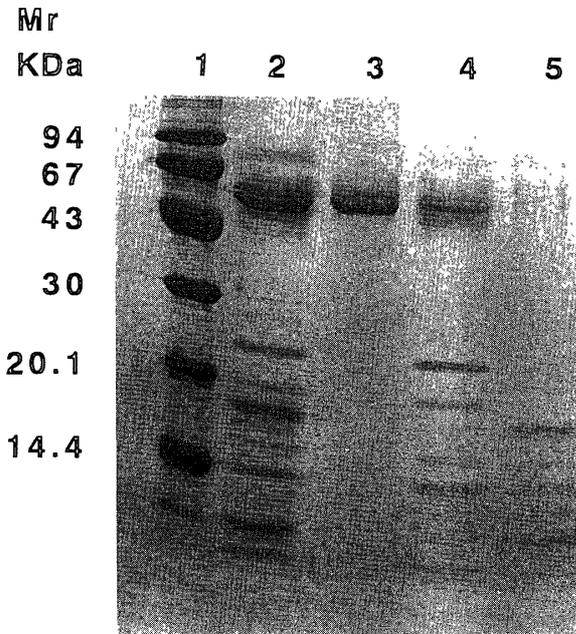


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of 50K UP, 10K UP, and 1K UP of parotid saliva fractions. Samples were electrophoresed on 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. Lanes: 1, Molecular weight markers as in Fig. 2; 2, Native parotid saliva; 3, 50K UP fraction; 4, 10K UP fraction; 5, 1K UP fraction.

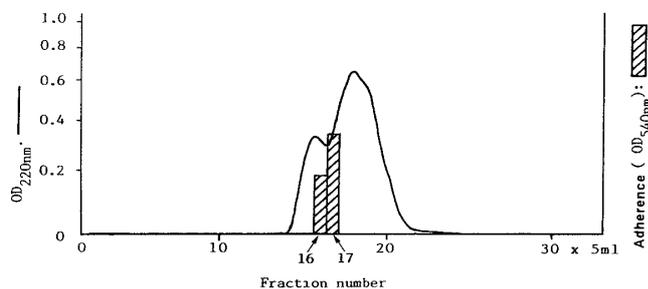


Fig. 6. Elution profile for gel filtration on Sephadex G-75 and adherence of *S. mutans* Ingbritt to the fraction-coated HA. The 1K UP fraction was applied to a Sephadex G-75 gel column (2.5×90cm). Elution was carried out with H₂O at a flow rate of 100 ml/h. The elute was monitored at 220 nm, and 5 ml of fractions were collected. Adherence of *S. mutans* Ingbritt HA coated with each fraction was assayed.

native耳下腺唾液にみられる分子量10,000以下の2本のバンド以外はほぼnative耳下腺唾液中のタンパク染色パターンと類似のパターンを示した。1K UP画分のタンパク染色パターンは分子

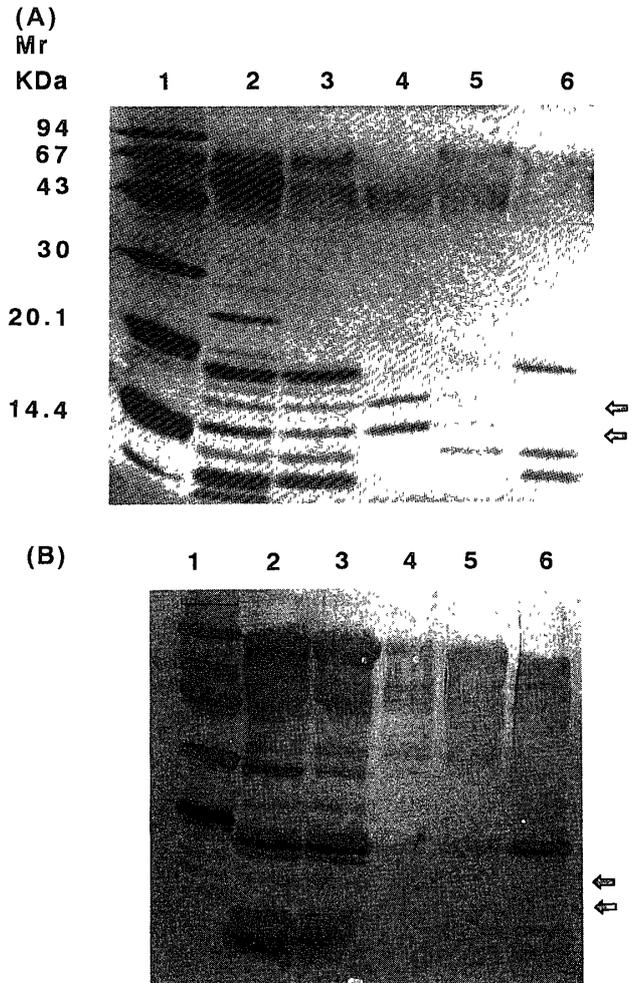


Fig. 7. SDS-PAGE pattern of parotid saliva and fractions from Sephadex G75 gel filtration, and binding properties of Antigen B to these components. (A). Samples were electrophoresed on a 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. (B): After western blotting of the gel shown in (A), the filter was treated with Antigen B, anti-Antigen B antibody, and then developed by the avidin biotinylated enzyme complex procedure. Lanes: 1, Molecular weight markers (same marker protein as in Fig. 2); 2, Parotid saliva; 3, 1K UP fraction; 4, Fraction No 16; 5, fraction No 17; 6, Fraction No 18. Arrows indicate proteins with molecular weights of 14,400 and 16,500.

量20,000以下の6本のバンド以外に分子量50,000から70,000にかけてのブロードなバンドもかすかにみられたが、50K UP, 10K UP 画分とは異なり主に分子量20,000以下の低分子のタンパク成分を含む画分であった。

1K UP 画分のSephadex G75各fractionに対する付着性, SDS-PAGEパターンおよびAntigen Bの結合性

Fraction No 16, 17のみに付着性がみられたが、他のfractionにおいては付着性はみられなかった。付着性がみられたfraction No. 16, 17と付着性のみられなかったfraction No 18をSDS-PAGEにかけタンパク染色パターンを比較したところ、fraction No. 16, 17にはみられるタンパクバンドのうち分子量14,400, 16,500の2つのバンドがfraction No 18にはみられなかった(Fig 6, Fig. 7A)。しかし、これらの画分に対するAntigen Bの結合性をimmunoblotにより検討したところAntigen Bは一部の分子量マーカーをはじめ多くの耳下腺唾液成分に対して結合性を示したにもかかわらず分子量14,400, 16,500の成分との結合は観察されなかった(Fig 7B)。ImmunoblotにおいてAntigen B以外の抗体、試薬等を用いて反応させても反応バンドは検出されなかった。このことにより、多くの反応バンドは用いた抗体による非特異的反応でなくAntigen Bが多くの物質と反応した結果であった。この様な性状は培養上清より精製したAntigen Bの性状の1つであることはわかったが、分子量14,400, 16,500の2成分との結合性はimmunobotでは明らかにできなかった。分子量50,000から70,000にかけてタンパク染色性の弱い物質は限外ろ過、ゲルろ過においてもみられた(Fig. 7A)。さらにAntigen Bもこの物質と結合性を示した(Fig. 7B)。よって、この物質の付着への関与も明確にはできなかった。しかし、トリプシン処理により、この物質が若干残っても*S mutans*の付着

は著しく低下することよりこの物質の関与は弱いものと思われた(Fig. 1 and 2)。

考 察

*S. mutans*の実験的ペリクルに対する付着を促進する唾液中の因子としてGibbonsとHayは¹⁹⁾酸性PRPsを上げている。特にPRP-1がその作用が強く、ついでPRP-3に若干みられるが、statherin, fibrinogen, fibronectin, collagen (type-1)には付着に対する促進作用はみられないことを報告している。また、Gibbonsらは²⁰⁾顎下腺唾液の高分子成分であるmucinが*S mutans*の付着を促進することをあげており、このmucinと同様の活性を示す画分は耳下腺唾液にも存在することを示している¹⁹⁾。今回行った、耳下腺唾液を限外ろ過した各画分でコートしたHAに対する*S mutans*の付着性とSDS-PAGEパターンとの比較から分子量50,000以上の比較的高分子のみからなる50K UP画分、また分子量が20,000以下の比較的低分子よりなる1K UP画分においても*S. mutans*の付着がほぼ同程度みられることと一致するものと思われた。中でも10K UP画分に強い付着がみられたのは10K UP画分はSDS-PAGEのタンパク染色パターンより、50K UP, 1K UP画分においてみられる高分子成分と低分子成分の両成分を含むため強い付着性を示したものと思われた。PRP-1, PRP-2, PIF-sはアミノ酸残基が150よりなり、PRP-3, PRP-4, PIP-fは106のアミノ酸残基より成ることがすでに明らかにされている^{27,28)}。しかし、これらの分子量に匹敵する部位に対するAntigen Bの結合はニトロセルロースメンブラン上では見られなかった。これに反してAntigen Bは多くの耳下腺唾液成分と結合する像がimmunoblotにより得られた。さらに、6種の分子量マーカーのうち、4種のマーカーとも結合した。これらのことと、抗Antigen B抗体と耳下腺唾液成分間においては反応がみられない

ことより、Antigen Bは非特異的に多くの物質と結合する性状を有することがわかった。また、OkahashiらはPAC(Antigen Bと同一物)のDNAおよびアミノ酸のシーケンスを報告した。このアミノ酸の一次構造からproline rich regionとC末の近くに強いhydrophobic regionが存在し、おそらく後者は細胞壁のアンカー部分であろうと報告している¹⁶⁾。*S. mutans* IBLの培養上清より精製したAntigen Bは分子量は190,000であり、Okahashiらの報告したPACと同等の分子量を示すことより、PACにて報告された全アミノ酸の一次構造を保有し、hydrophobicityが強いアンカー部も含まれていると思われる。このために耳下腺唾液の多くの成分と非特異的結合が観察されるものと推察された。Antigen Bがアンカー部も露出した状態にあるため、その強いhydrophobicityにより非特異的結合性を示したとしても、それらの多くの結合の一部にはnativeな菌の菌体表層に存在するAntigen B成分の特異的結合も含まれているものと思われた。しかし、1K UP画分をSephadex G75にてゲルろ過後、HAに対して*S. mutans*の付着を促進する画分のみにもみられた分子量14,400と16,500の2つのタンパク成分のAntigen Bとの結合がimmunoblotではみられなかった。immunoblotで結合が検出されなかったことに対して次の3つの事柄が推察された。第1は、この2成分はAntigen Bとの結合にまったく関与しない。第2は、Antigen Bの強いhydrophobicityの性状のため多くの非特異的な結合がみられるが、6種の分子量マーカーのうち2種に対しては結合性を示していないことより、hydrophobicityのみでは全ての物質と結合できない。第3は、これらの2成分はHAに結合している時にはAntigen Bと結合できるconformationを形成できるが、ニトロセルロースメンブラン上ではその様なconformationを形成できない。この第3の推察に関してGibbons

はPRP-1は溶液中に存在する時は*S. mutans*, *Actinomyces naeslundii*とは結合しないが、PRP-1がHAに結合するとconformationの変化が生じ、分子中の隠蔽されていた部位が露出し*S. mutans*や*A. naeslundii*と結合することを見いだしており、この様なものをcryptitopeとした^{19,29)}。このcryptitopeの概念により細菌がペリクル中の唾液成分と結合できることが説明された。つまり、唾液中に溶液として存在している時はペリクルと成る成分によりadhesinがマスクされることなくペリクル形成後に菌のadhesinは特異的にペリクル成分と結合できることが示された。今回我々が分画した1K UP画分をゲルろ過した画分において*S. mutans*の付着に関与すると推察した2成分がimmunoblotにてAntigen Bと結合バンドはみられなかった。この理由として第2、第3を合併した推測の可能性が考えられたが、しかし、これら2成分を含めどの成分がAntigen Bと結合し、さらに*S. mutans*の初期付着に関与しているか明確にはできなかった。

一方、*S. mutans*が初期付着する機構としてはペリクルに直接結合しなくとも、すでに歯面に付着している菌に結合することでも初期付着が達成できると考えられている。この現象は試験管内ではcoaggregationとして肉眼的に観察できる。しかし、*S. mutans*は他の口腔細菌と殆どcoaggregationを行わないので³⁰⁾、他の口腔細菌との結合は考慮されていなかった。しかし、LamontとRosan³¹⁾により、*S. mutans*は歯面に対するinitial colonizerである、*Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*と肉眼で観察できるcoaggregationの菌塊はみられないが、*S. mutans*とこれらの菌と結合が生じることが報告され、ペリクルに*S. mutans*が直接付着しなくても*S. mutans*は歯面に他の菌を介して初期付着できる可能性が唆された。これらの結合は唾液が存在しても起こ

り、さらに唾液処理により結合が促進される菌株もあり、salivary agglutinin receptorが関与すると考えられている³²⁾。この場合両菌の表層物質により直接結合するか、または唾液成分がbridgeとして働き他の菌との結合を媒介すること等が考えられる。このように*S. mutans*の初期付着の機構を解明する上で、付着因子として最も重要と考えられているAntigen Bと唾液成分との結合性を解明することは意義のあることと考えられる。

以上のことより培養上清より精製したAntigen Bの性状の一部を知ることはできたが、今回用いた方法ではAntigen Bと特異的に結合する耳下腺唾液成分については特定できなかった。今後、Antigen Bと特異的に結合するペリクル成分を解明するためにさらに検討する予定である。

文 献

- 1 Coykendall A L, Gustafson K B Taxonomy of *Streptococcus mutans* In Molecular Microbiology and Immunology of *Streptococcus mutans* Elsevier Science Publishers, 1986, pp 21-28
- 2 Hamada S, Slade H D Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans* Microbiol Rev 44 331-384, 1980
- 3 Loeshce W J Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay Microbiol Rev 50 353-380, 1986
- 4 Russell R R B Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans* J Gen Microbiol 114 109-115, 1979
- 5 Russell M W, Bergmeier L A, Zanders E D, Lehner T Protein antigens of *Streptococcus mutans* Purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component Infect Immun 28 486-493, 1980
- 6 Hughes M, Machardy S M, Sheppard A J, Woods N C Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue Infect Immun 27 576-588, 1980
- 7 Forester H, Hunter N, Knox K W Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans* J Gen Microbiol 129 2779-2788, 1983
- 8 Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, Hamada H, Koga T Cloning of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans* Mol Microbiol 3 221-228, 1989
- 9 McBride B C, Song M, Krasse B, Olsson J Biochemical and Immunological differences between hydrophobic and hydrophilic strains of *Streptococcus mutans* Infect Immun 44 68-75, 1984
- 10 Kamaguchi A, Baba H Productivity of Antigen I/II from hydrophilic variant of *Streptococcus mutans* Ingbritt Frontiers of mucosal immunol 1 371-373, 1991
- 11 Lehner T, Russell M W, Caldwell J, Smith R Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* antigens against dental caries in Rhesus monkeys Infect Immun 34 407-415, 1981
- 12 Lehner T, Caldwell J, Smith R Local passive immunization by monoclonal antibodies against streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries Infect Immun 50 796-799, 1985
- 13 Russell M W, Hong-Yin Wu Distribution, persistence, and recall of serum and salivary antibody responses to peroral immunization with protein Antigen I/II of *Streptococcus mutans* couples to the cholera toxin B subunit Infect Immun 59 4061-4070, 1991
- 14 Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara T, Ohshima T Oral Passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* Infect Immun 59 4161-4167, 1991
- 15 Lee S F, Progulsk-Fox A, Bleiweis A S Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen, PI(I/II), in *Escherichia coli* Infect Immun 56 2114-2119, 1988
- 16 Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, Hamada S, Koga T Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries Mol Microbiol 3 673-678, 1989

- 17 Babu J P, Dabbous M K Interaction of salivary fibronectin with oral streptococci J Dent Res 65 1094-1100, 1986
- 18 Douglas C W I, Russell R R B The adsorption of human salivary components to strains of the bacterium *Streptococcus mutans* Arch Oral Biol 29 751-757, 1984
- 19 Gibbons R J, Hay D I Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces J Dent Res 68 1303-1307, 1989
- 20 Gibbons R J, Cohen L, Hay I Strain of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors Infect Immun 52 555-561, 1986
- 21 Mackay B J, Denepitiya L, Iacono V J, Krost S B, Pollock J J Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans* Infect Immun 44 695-701, 1984
- 22 Lashley K S Reflex secretion of the human parotid gland J Exp Psychol 1 461-432, 1916
- 23 Miyake M Sanjo O, Kuboki Y, Sasaki S A histidine-rich protein isolated from human parotid saliva having a high affinity to hydroxyapatite Jpn J Oral Biol 29 477-481, 1987
- 24 馬場久衛, 鎌口有秀: *Streptococcus mutans*の産生する溶菌酵素に関する研究 IV *Streptococcus mutans* AL7-1株による溶菌酵素産生のための chemically defined mediumの調製. 歯基礎誌, 26 686-697, 1984
- 25 Laemmli UK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Nature 227 680-685, 1970
- 26 Burnette W N Western blotting Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A Anal Biochem 112 195-203, 1981
- 27 Bennick A Structural and genetic aspects of proline-rich proteins J Dent Res 66 457-461, 1987
- 28 Hay D I, Bennick A, Schlesinger D H, Minaguchi K, Madapallimattam G, Schluckebier S K The primary structures of six human salivary acidic proline-rich proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, PIF-s and PIF-f) Biochem J 255 15-21, 1988
- 29 Gibbons R J, Hay D I Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces Infect Immun 56 439-445, 1988
- 30 Crowley P J, Frischlschweiger W, Coleman S E, Bleiweis A Intergeneric bacterial coaggregations involving mutans streptococci and oral actinomyces Infect Immun 55 2695-2700, 1987
- 31 Lamont R J, Rosan B Adherence of mutans streptococci to other oral bacteria Infect Immun 58 1738-1743, 1990
- 32 Lamont R J, Demuth D R, Davis C A, Malamud D, Rosan B Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria Infect Immun 59 3446-3450, 1991