— 原 著 —

Streptococcus sanguis ATCC 10557株の両親媒性 抗原の精製と性状

山本 十糸子

国立予防衛生研究所歯科衛生部

Purification and characterization of a new amphipathic antigen from *Streptococcus sanguis* ATCC 10557

Toshiko Yamamoto

Department of Dental Research, National Institute of Health

A new type of amphipathic antigen was purified from phenol-water extracts of whole cells and culture supernatant of *Streptococcus sanguis* ATCC 10557 (biotype B, serotype II) and characterized as a fatty acid-substituted heteropolysaccharide.

The phenol-water extract was applied to columns of Sepharose 6B and octyl-Sepharose CL-4B. Immunologic activity of each fraction was checked by passive hemagglutination (PHA) and immunodiffusion tests against anti-10557 serum obtained by immunizing rabbits with whole cells of strain ATCC 10557. Gel filtration of the extract on a column of Sepharose 6B showed that strong PHA activity was present in the first hexose-containing fraction eluted near the void volume, indicating that this fraction contained an amphipathic antigen. Chromatography of this fraction on a column of octyl-Sepharose CL-4B showed that strong PHA activity existed in the hexose-containing peak which was eluted with 33% (v/v) n-propanol. This peak contained only 1% of phosphorus, indicating that the cells of strain ATCC 10557 possess an amphipathic antigen which differs from lipoteichoic acids that are common in many Gram-positive bacterial strains. This amphipathic antigen was a fatty acid-substituted heteropolysaccharide composed of mannose, glucose, galactose, rhamnose, galactosamine, glycerol and fatty acids in a molar ratio of approximately 4.3:1.0:1.5:0.6:0.5:0.1:0.9. The PHA reaction was inhibited in the presence of polymelized mannose.

The second hexose-containing peak in the chromatography of Sepharose 6B produced a heavy band against anti-10557 serum in immunodiffusion test but had no PHA activity. The isolated material of this peak contained glucose, galactose, rhamnose and *N*-acetylgalactosamine in a molar ratio of approximately 1.0:1.4:0.8:0.8, which was essentially identical to serotype II carbohydrate antigen reported previously.

Key words: *Streptococcus sanguis*, amphipathic antigen, phenol-water extraction, *Streptococcus sanguis* type II antigen, biotype B *Streptococcus sanguis*

緒 言

グラム陽性菌の多くの菌株には細胞膜から菌体表層にかけて両親媒性抗原であるリポタイコ酸 (lipoteichoic acid, LTA) が存在する¹⁻³⁾。LTA はリン, グリ

セロール, 脂肪酸, 糖, アラニンから構成され, その骨格構造は直鎖のポリグリセロリン酸 (Polyglycerophosphate, PGP) で, その一端は疎水性の糖脂質を介して細胞膜に結合し, PGP 鎖は細胞壁を貫通し, 一部は菌体表面に露出しているとされる^{1,4)}。LTA は自己融解酵素の制御⁵⁾, 粘膜表面への付着⁶⁾や二価陽イオンの能動輸送の制御⁷⁾など菌の生理に重要な役割を果たしている。

Present address: Department of Dental Research, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiyosaki, Shinagawa-ku, Tokyo, 141 Japan

しかし近年, ある種のグラム陽性菌は LTA を欠き, LTA に代わる両親媒性抗原を有することが明らかとなった。すなわち *Micrococcus* 属ではリポマンナン (lipomannan, LM)⁸⁻¹⁰⁾ が LTA に代わる役割を果たすと推測され⁹⁾, また *Actinomyces* 属では脂質と結合したヘテロ多糖 (*Actinomyces amphiphile*, AcA) の存在が報告されている¹¹⁾。一方, McCarty¹²⁾ は *Streptococcus viridans* と *Streptococcus sanguis* の多くに PGP が検出できないと記載した。これに関連して *Streptococcus mitis* (*mitior*) と分類されている菌株の多くは LTA ないし PGP を欠くことが明らかにされた¹³⁾。

S. sanguis は歯の萌出とともに口腔内に定着をはじめ, プラーク (dental plaque) の主要な構成メンバーの一員である。この菌種は, 細菌性心内膜炎の有力な起原菌の一つと考えられている¹⁴⁾。しかし, その生息部位が歯の表面である¹⁵⁾ことがわかったのは 1960 年代に入ってからである。*S. sanguis* の分類学的位置付けについては, 今なお論議が絶えず, とくに *S. mitis* (*mitior*) との関連が問題となっている^{16,17)}。Hamada ら¹⁸⁾によれば, *S. sanguis* はサリシン, イヌリンを発酵し, アルギニン, エスクリンを加水分解してアンモニアを産生する生物型 A と, 非発酵性, 非加水分解性の生物型 B に分類されている。生物型 B の *S. sanguis* はすべて LTA を欠き¹⁹⁾, LTA に代わる別種の両親媒性抗原の存在が示唆されている²⁰⁾。

今回著者は, 生物型 B の *S. sanguis* ATCC 10557 株から LTA とは異なる両親媒性抗原 (*Streptococcus sanguis* Amphiphile, SSA) を抽出, 精製し, その化学的および免疫化学的性状について, LTA, LM などと比較しながら検討したので報告する。

研究材料および方法

(1) 菌株

S. sanguis ATCC 10557 株 (血清型 II/生物型 B)¹⁸⁾ は TTY ブロース²¹⁾中で 20 時間静置培養した後, 遠心して集菌し, 脱イオン水で 3 回洗浄後凍結乾燥した (1 g 乾燥菌体/l 培養)。培養上清は 4℃で限外ろ過モジュール (モデル ACL-1010, 旭化成) を用いて 10 倍に濃縮し, 濃縮液を凍結乾燥あるいは -20℃で凍結し保存した (4.2 g 凍結乾燥標品/l 培養)。また, 4℃で培養上清の 50% 飽和硫酸沈殿画分を調製し凍結乾燥した (4.1 g 凍結乾燥標品/l 培養)。

また, 比較のために *S. sanguis* ATCC 10556 株 (血

清型 I/生物型 A)¹⁸⁾, *Streptococcus pyogenes* Sv 株 (ATCC 21059, Group A, Type 3), *Actinomyces viscosus* Ny 1 株も同様に培養し実験に供した。*Micrococcus luteus* ATCC 4698 株菌体は市販品 (生化学工業, 東京) を使用した。

(2) 試薬

化学薬品は市販の試薬特級品を用いた。*Penicillium citrinum* 由来のヌクレアーゼ P₁ [Nucleate 5'-nucleotidohydrolase (3'-phosphohydrolase), EC 3.1.3.1]²²⁾ はヤマサ (銚子, 千葉) 製, Sepharose 6 B と octyl-Sepharose CL-4 B は Pharmacia (Uppsala, Sweden) 製, パン酵母由来のマンナンは Sigma (St. Louis, MO., USA) 製, 脂肪酸と脂肪酸メチルエステル標準品は Applied Science Laboratories (State College, PA, USA) 製のものを使用した。

(3) 抗血清

抗 10557 血清は, *S. sanguis* ATCC 10557 株で全菌免疫したウサギ血清の中で, *S. sanguis* type II 多糖抗原と SSA に特異な抗体活性を示す 1 ロット^{20,23)}を用いた。また抗 PGP 血清は *Streptococcus mutans* MT 8148 株 (血清型 c) で全菌免疫したウサギ血清の中で PGP に特異な抗体活性を示す 1 ロットを用いた。この抗 PGP 血清は c 型多糖抗原に対する抗体を保有しないことが免疫拡散法で確認されたものである。

(4) 両親媒性抗原の抽出

1) 全菌体からの抽出

Moskowitz の方法²⁴⁾を一部改変²⁰⁾して抽出した。すなわち菌体浮遊液 (乾燥菌体 10 mg/ml 注射用蒸留水) に等量の 95% フェノールを添加し, 室温で 1 時間静かに攪拌した。この混合液を遠心して上清 (水層) を分離し, フェノール層にさらに等量の水を加え, 上述の抽出を繰り返した。水層を合体し, 脱イオン水に対して透析後, ロータリーエバポレーターで濃縮し, 再び脱イオン水に対して透析後, 凍結乾燥し, これをフェノール-水抽出物 (PWE) とした。

2) 培養上清濃縮液からの抽出

培養上清 10 倍濃縮液と同容の 95% フェノールを添加し, 全菌体からの抽出と同様に抽出した。凍結乾燥後, 凍結乾燥標品 (10 g) をアセトン (200 ml), エーテル (200 ml) およびクロロホルム-メタノール (2:1, 200 ml) で抽出し, 夾雑脂質を除去した。

3) 50% 飽和硫酸沈殿画分からの抽出

硫酸沈殿物水溶液 (硫酸沈殿物 10 mg/ml) に同容の 95% フェノールを添加し, 全菌体からの抽出と同様に

抽出した。

(5) 両親媒性抗原の精製

1) 核酸の分解

PWEに混在する核酸をヌクレアーゼ P_1 を用いて分解し除去した。0.1 mM の Mg^{++} を含有する 0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 10 ml 中に PWE 150 mg とヌクレアーゼ P_1 1 mg を溶解し、透析チューブに入れ、同緩衝液に対して透析しながら 37℃ で 24 時間作用後、脱イオン蒸留水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥してヌクレアーゼ処理 PWE (n-PWE) とした。

2) ゲルろ過クロマトグラフィー

PWE および n-PWE を Sepharose 6 B カラムに添加し、0.2 M 酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.0) で溶出した (20 ml/時)。各フラクションのヘキソース量、RNA 量、リン量およびタンパク質量と免疫化学的性状を調べた。

3) 疎水クロマトグラフィー

Sepharose 6 B カラムで分離した両親媒性抗原画分を octyl-Sepharose CL-4 B カラムに添加し、10% (v/v) n-プロパノールを含む 0.1 M 酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.0) 100 ml で溶出 (10 ml/時) 後、n-プロパノールの 10~80% の濃度勾配下で溶出した (20 ml/時)。各フラクションのヘキソース量、RNA 量およびタンパク質量と免疫化学的性状を調べた。各フラクションの n-プロパノール濃度は溶出液の屈折率により算出した。

(6) 菌体脂質の抽出

凍結乾燥菌体から Bligh and Dyer の方法²⁵⁾で抽出した。

(7) 化学分析

1) 比色定量

総ヘキソース量はアンスロン-硫酸法²⁶⁾、RNA 量はオルシノール-塩酸法²⁷⁾、総リン量はリン-モリブデン酸アンモニウム法²⁸⁾、タンパク質量は Folin 試薬を用いる Lowry らの方法²⁹⁾、脂肪酸量は Snyder and Stephenes³⁰⁾ および Lee の方法³¹⁾、デオキシヘキソース量は Dische and Shettles の方法³²⁾、ヘキソサミン量は Strominger らの方法³³⁾ により比色定量した。

2) ガスクロマトグラフィー (GC) による糖の分析

グリセロールおよび個々の糖は両親媒性抗原 (0.5~1 mg) を 2 N 塩酸 (1 ml) で、100℃、2 時間加水分解した後、トリメチルシリル (TMS) エステル³⁴⁾ およびアルジトールアセテート誘導体^{35,36)} としてガス

クロマトグラフ (モデル GC 7 AG, 島津製作所) で水素イオン検出器を用いて分析した。

TMS 化合物はガラスカラム (3 mm×260 cm) に詰めた 10% シリコン GE SE-30 (担体: クロモソルブ W, 和光純薬, 大阪) を用いて 80~200℃ まで毎分 8℃ 昇温, あるいは 150~200℃ まで毎分 3℃ 昇温して分析した。

アルジトールアセテート誘導体はガラスカラム (3 mm×210 cm) に詰めた 3% エチレンサクシネイトシアンエチルシリコンポリマー (ECNSS-M, 担体: ガスクローム Q, 和光純薬) を用いて 150℃ で 4 分間定温に保った後、200℃ まで毎分 3℃ 昇温して分析した。

3) GC による脂肪酸の分析

両親媒性抗原 (0.5~2 mg) を 5% 塩酸-メタノール (3 ml) で 105℃、3 時間メタノリシスして脂肪酸メチルエステルを得た。脂肪酸メチルエステルはガラスカラム (3 mm×210 cm) に詰めた 1.5% シリコン GE SE-30 (担体: クロモソルブ W, 和光純薬), 25% ジエチレングリコールサクシネイト (DEGS, 担体: クロモソルブ W, 和光純薬) およびガラスカラム (2.6 mm×250 cm) に詰めた 5% アドバンス DS (担体: クロモソルブ W, 和光純薬) を用いて 160~200℃ の定温で分析した。

4) GC による短鎖アシル基の分析

両親媒性抗原 (1 mg) を 2 N 塩酸 (1 ml) で 100℃、2 時間加水分解した後、加水分解液中の長鎖脂肪酸をクロロホルム (1 ml×2 回) で除去した。水層に窒素ガスを吹きつけて乾固し、ジアゾメタンのジエチルエーテル溶液 (2 ml) を加えて 25℃ で 30 分間静置してメチル化後、過剰のジアゾメタンとジエチルエーテルを窒素ガスを吹きつけて除去した。アセトンで短鎖アシルメチルエステルを抽出し、10% シリコン GE SE-30 (3 mm×260 cm) を用いて 80~200℃ まで毎分 2℃ 昇温して分析した。

5) アミノ酸の分析

両親媒性抗原を 6 N 塩酸で 100℃、14 時間加水分解した後、アミノ酸自動分析機 (モデル 835, 日立製作所) で分析した。

(8) 免疫化学的反応

1) ゲル内沈降反応

免疫拡散反応は 1% 寒天 (Noble Agar, Difco) を含む生理食塩水のゲルを用いて、4℃ あるいは室温で行った。

2) 受身赤血球凝集 (PHA) 反応

ヒツジ保存血 (日本バイオテスト研究所, 東京) を用いて Hewett らの方法³⁷⁾に従って行った。供試標品が PHA 能を有するか否かについては各標品で感作したヒツジ赤血球 (SRBC) 浮遊液 (2% v/v) 40 μ l に生理食塩水で 200 倍に希釈した抗血清を 40 μ l 加えて 37°C で 3 時間静置した後, 赤血球凝集の有無を肉眼で判定した。

3) ハプテンによる PHA 抑制試験

標準となる既知濃度のハプテンの希釈系列 20 μ l に 100 倍希釈の抗血清 20 μ l を加えて混合し, 37°C で 30 分間静置した。次に両親媒性抗原で感作した SRBC の 2% 浮遊液 40 μ l を加えてよく混合し, 37°C で 3 時間静置した後 SRBC の凝集の有無を肉眼で判定した。ハプテンとして D-ガラクトース, D-グルコース, L-ラムノース, α および β -メチル-D-グルコース, ゲンチビオース, D-(+)-グルコサミン塩酸, D-(+)-ガラクトサミン塩酸, N-アセチル-D-グルコサミン, N-アセチル-D-ガラクトサミン, マルトース, イソマルトース, L- α -アラニン, DL- α -グリセリン酸ナトリウム, β -グリセリン酸ナトリウム, グリセロール, リビトール, マンノース, マンナン, LM および AcA を用いた。

4) 免疫電気泳動

1% 寒天を含むバルビタール緩衝液 (pH 8.6, μ = 0.025) のゲル (5 $\times$ 7 cm, 厚さ 1 mm) を用い, 4°C, 15 mA で 75 分間泳動した。

結 果

1. 核酸分解酵素処理とゲルろ過クロマトグラフィーによる両親媒性抗原の精製

S. sanguis ATCC 10557 株 n-PWE の Sepharose 6 B によるゲルろ過クロマトグラフィーの結果を Fig. 1 に示した。ボイド容量のすぐ後 (試験管番号 47~70) に抗 10557 血清に対して PHA 反応陽性で, ゲル内沈降反応陰性の SSA を含有するヘキソース画分 I と, その後 (試験管番号 73~112) に PHA 反応陰性でゲル内沈降反応陽性の大きなヘキソース画分 II が得られた。画分 I および II ともに抗 PGP 血清に対しては PHA 反応もゲル内沈降反応もともに陰性であった。画分 I を SSA (1) とした。

Fig. 2 は *S. sanguis* ATCC 10556 株 n-PWE の Sepharose 6 B によるゲルろ過クロマトグラフィーの結果である。リンとヘキソースからなる試験管番号 56~86 の大きな画分 I と試験管番号 102~110 の小

Fig. 1 Gel filtration chromatography of nucleasetreated phenol-water extract (n-PWE) of whole cells of *S. sanguis* ATCC 10557 on Sepharose 6 B

The n-PWE (120 mg) was applied to a Sepharose 6 B column (4 $\times$ 60 cm) and eluted with 0.2 M ammonium acetate (pH 7.0). Total hexose (●) and phosphorus (O) were determined in each fraction. The bar indicates the range where the fractions gave a precipitin line against anti-10557 serum by diffusion test in agar gel.

Vo: void volume, Vt: total bed volume

Fig. 2 Gel filtration chromatography of nucleasetreated phenol-water extract (n-PWE) of whole cells of *S. sanguis* ATCC 10556 on Sepharose 6 B

The n-PWE (240 mg) was applied to a Sepharose 6 B column (4 $\times$ 60 cm) and eluted with 0.2 M ammonium acetate (pH 7.0). Total hexose (●) and phosphorus (O) were determined in each fraction. The bars indicate the range where the fractions gave a precipitin line against anti-PGP serum by diffusion test in agar gel.

な画分 II が出現した。画分 I も画分 II もともに抗 PGP 血清との沈降反応は陽性であった。PHA 反応を行うと画分 I は非常に高い PHA 価を示したが、画分

II は PHA 反応陰性であった。抗 PGP 血清に対する反応性から画分 I は LTA、画分 II は LTA から脂肪酸が解離した脱アシル LTA と推定された。

次に *M. luteus* ATCC 4698 株から PW 抽出し、その n-PWE を Sepharose 6 B によるゲルろ過クロマトグラフィーを行って非 LTA タイプの両親媒性抗原を得た (Fig. 3)。試験管番号 31~44 に多糖の大きなピーク (画分 I) と試験管番号 48~55 に脱アシル化した多糖の小さなピーク (画分 II) が認められ、多糖の構成糖はマンノースで画分 I はリボマンナン (LM) であることが明らかとなった。

Fig. 3 Gel filtration chromatography of nuclease-treated phenol-water extract (n-PWE) of whole cells of *M. luteus* ATCC 4698 on Sepharose 6 B

The n-PWE (400 mg) was applied to a Sepharose 6 B column (2.5×55 cm) and eluted with 0.2 M ammonium acetate (pH 7.0). Total hexose (●) and phosphorus (○) were determined in each fraction.

Table 1 は上記の SSA (1), LTA および LM の回収率を示している。核酸分解酵素処理段階での回収率が LTA と LM はともに 60~70% であるのに対して SSA (1) は 20% と低く、またゲルろ過クロマトグラフィー段階での回収率が LTA と LM はともに 70% であるのに対し SSA (1) は 6% と非常に低かった。すなわち出発材料である全菌体に対する回収率は LTA が 1.2%, LM が 1.8% であるのに対し SSA (1) は 0.043% ときわめて低かった。なお SSA (1) の PHA 価は 6,581/mg と算出された。

2. ゲルろ過クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィーによる *S. sanguis* ATCC 10557 株両親媒性抗原の精製

10557 株 PWE の核酸分解酵素処理段階での回収率が *S. sanguis* ATCC 10556 株や *M. luteus* ATCC 4698 株に比べ非常に低いので核酸分解酵素処理をせずに、ゲルろ過クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィーによる精製を試みた。

10557 株 PWE を Sepharose 6 B でゲルろ過クロマトグラフィーを行うと、試験管番号 33~64 に抗 10557 血清に対して PHA 反応陽性でゲル内沈降反応陰性の SSA を含有するヘキソース画分 I と、試験管番号 64~87 に PHA 反応陰性でゲル内沈降反応陽性画分が得られた (Fig. 4)。この画分 I (試験管番号 42~58, 17.5 mg) を octyl-Sepharose CL-4 B を用いて疎水クロマトグラフィーで精製を試みた (Fig. 5)。n-プロパノール濃度 10% で、octyl-Sepharose CL-4 B に吸着しないヘキソースと核酸が溶出後、n-プロパノール 15% と 33% 近辺で、ヘキソースのピークが認められた。抗

Table 1 Chromatographical isolation of amphiphiles from phenol-water extracts (PWE) of *S. sanguis* ATCC 10557, *S. sanguis* ATCC 10556 and *M. luteus* ATCC 4698

Purification	% Recovery				
	<i>S. sanguis</i> ATCC 10557			<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	<i>M. luteus</i> ATCC 4698
	Whole cells ^a SSA (1)	Whole cells ^a SSA (2)	Culture sup. ^b SSA (3)	Whole cells ^a LTA	Whole cells LM
Phenol-water extract (PWE)	3.4	2.5	16.9	2.8	3.8
Nuclease-treated PWE	0.71	— ^c	—	1.7	2.6
Gel-filtration chromatography (Sepharose 6 B)	0.043 (Fig.1, I)	0.048 (Fig.4, I)	ND ^d (Fig.6, I)	1.2 (Fig.2, I)	1.8 (Fig.3, I)
Hydrophobic interaction chromatography (octyl-Sepharose CL-4 B)	—	0.013 (Fig.5, II)	0.010 (Fig.7, II)	—	—

^a: lg lyophilized cells/l culture, ^b: 4.2 g lyophilized materials/l culture, ^c: Not done, ^d: Not determined

Fig. 4 Gel filtration chromatography of phenol-water extract (PWE) of whole cells of *S. sanguis* ATCC 10557 on Sepharose 6 B. The PWE (900 mg) was applied to a Sepharose 6 B column (2.6×90 cm) and eluted with 0.2 M ammonium acetate (pH 7.0). Total hexose (●), phosphorus (○), RNA (▲) and protein (△) were determined in each fraction. The bar indicates the range where the fractions gave a precipitin line against anti-10557 serum by diffusion test in agar gel.

Fig. 5 Hydrophobic interaction chromatography of Peak I of Fig. 4 on octyl-Sepharose CL-4 B. The Peak I of Fig. 4 (Fr. No. 42~58, 17.5 mg) was applied to an octyl-Sepharose CL-4 B column (2.2×11 cm) and eluted with 10% (v/v) n-propanol in 0.1 M ammonium acetate and linear gradient 10~80% n-propanol in 0.1 M ammonium acetate. Total hexose (●) and RNA (▲) were determined in each fraction. The bars indicate the range where the fractions gave a precipitin line against anti-10557 serum by diffusion test in agar gel.

10557 血清に対する反応性をみると、10%で溶出した画分 I は PHA 反応陰性でゲル内沈降反応は強い陽性であったが、33%近辺で溶出した画分 II は PHA 反応

は強い陽性で、ゲル内沈降反応は弱いながらも陽性であった。この画分 II を SSA (2) とした。SSA (2) の菌体に対する回収率は 0.013% であった (Table 1)。なお、この SSA (2) の PHA 価は 36,164/mg と算出され、SSA (1) の 5 倍であった。

3. *S. sanguis* ATCC 10557 株の培養上清由来 PWE の精製

10557 株培養上清の限外ろ過モジュールによる 10 倍濃縮液から得た PWE を Sepharose 6 B でゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果を Fig. 6 に示す。試験管番号 34~53 に抗 10557 血清に対して PHA 反応陽性でゲル内沈降反応陰性の SSA を含むヘキソースと核酸から成る画分 I と、試験管番号 62~84 に PHA 反応陰性でゲル内沈降反応陽性の画分のほかに、試験管番号 85~112 にかけて大量のヘキソース、核酸およびタンパク質から成る画分が溶出した。

この画分 I (試験管番号 37~53) を octyl-Sepharose CL-4 B による疎水クロマトグラフィーで精製を試みた (Fig. 7)。n-プロパノール 10% で、octyl-Sepharose CL-4 B に吸着しない大量のヘキソース、核酸、タンパク質 (画分 I) が溶出後、n-プロパノール 33% 近辺でヘキソースのみから成る小さなピーク (画分 II) が溶

Fig. 6 Gel filtration chromatography of phenol-water extract (PWE) of culture supernatant of *S. sanguis* ATCC 10557 on Sepharose 6 B. The PWE (2.3 g) was delipidated, applied to a Sepharose 6 B column (2.6×95 cm) and eluted with 0.2 M ammonium acetate (pH 7.0). Total hexose (●), RNA (▲) and protein (△) were determined in each fraction. The bar indicates the range where the fractions gave a precipitin line against anti-10557 serum in diffusion test in agar gel.

Fig. 7 Hydrophobic interaction chromatography of Peak I of Fig. 6 on octyl-Sepharose CL-4B. The Peak I of Fig. 6 (Fr. No. 34~53) was applied to an octyl-Sepharose CL-4B column (1.2×31 cm) and eluted with 10%(v/v) n-propanol in 0.1M ammonium acetate and linear gradient 10~80% n-propanol in 0.1M ammonium acetate. Total hexose (●), RNA (▲) and protein (Δ) were determined in each fraction. The bars indicate the range where the fractions gave a precipitin line against anti-10557 serum by diffusion test in agar gel.

出した。抗 10557 血清に対して画分 I は強いゲル内沈降反応と弱い PHA 反応を示したが、画分 II は非常に強い PHA 反応を示しゲル内沈降反応も弱いながらも陽性を示した。この画分 II を SSA (3) とした。総 PHA 価は 231,390 と算出され、そのうちの 5% が画分 I に、95% は画分 II に検出された。SSA (3) の培養上清凍結乾燥物に対する回収率は 0.010% であった (Table 1)。SSA (3) の PHA 価は 37,253/mg と算出され SSA

(2) とはほぼ同じであった。

また *S. sanguis* ATCC 10557 株培養上清の 50% 飽和硫酸沈殿画分 (8 g) から得た PWE (180 mg) は抗 10557 血清に対して PHA 反応陰性であったので、SSA は含有されないと考えられた。

4. 両親媒性抗原の化学組成と免疫化学的性状

S. sanguis ATCC 10557 株の菌体 PWE から核酸分解酵素処理とゲルろ過クロマトグラフィーで精製した SSA (1), ゲルろ過クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィーで精製した SSA (2), および培養上清濃縮物の PWE からゲルろ過クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィーで精製した SSA (3) の化学組成を Table 2 に示した。

SSA (1), (2) および (3) は、モル比に多少の違いがみられたがいずれも、グルコース、ガラクトース、マンノース、ラムノース、ガラクトサミンおよび微量のリンとグリセロールからなり、脂肪酸と結合したヘテロ多糖であった。マンノースの含量が高いので LM と比較するためにガスクロマトグラフィーで短鎖アシル基の検出を行ったが、マロン酸、コハク酸、グルタル酸のいずれも検出できなかった。Table 3 には 10557 株菌体脂質と SSA の脂肪酸組成を示した。いずれも主要な脂肪酸は C16:0, C18:1, C16:1, C18:0 で構成比もほぼ同じであった。

Table 4 には *S. sanguis* ATCC 10556 株の LTA と *M. luteus* ATCC 4698 株の LM の化学組成を、Table 5 にはそれらの脂肪酸組成と両株の菌体脂質の脂肪酸組成を示した。

Table 2 Chemical composition of chromatographically purified SSA from phenol-water extracts of *S. sanguis* ATCC 10557^a

Component	SSA (1) (Whole cells)		SSA (2) (Whole cells)		SSA (3) (Culture sup.)	
	Amount μg/mg	Molar ratio	Amount μg/mg	Molar ratio	Amount μg/mg	Molar ratio
Glucose	100	1.0	69	1.0	65	1.0
Galactose	128	1.7	109	1.6	95	1.5
Mannose	274	2.7	317	4.6	358	5.5
Rhamnose	38	0.4	39	0.6	52	0.8
Galactosamine	28	0.3	32	0.5	52	0.8
Glycerol	13	0.3	3	0.04	3	0.04
Phosphorus	17	1.0	13	1.1	8	0.7
Fatty acids ^b	153	1.0	84	0.9	77	0.8
Peptide	46		53		59	

^a: Succinic acid was not detected, ^b: Calculated as C16:0

Table 3 Fatty acid composition^a of cellular lipids and SSA of *S. sanguis* ATCC 10557

Fatty acid	Cellular lipid	SSA (1) (Whole cells)	SSA (2) (Whole cells)	SSA (3) (Culture sup.)
C ₁₂ :0	2.3	<1	<1	<1
C ₁₄ :0	6.1	5.9	2.8	1.8
C ₁₄ :1	1.1	<1	<1	<1
C ₁₆ :0	32.5	38.2	41.2	39.6
C ₁₆ :1	15.1	14.8	14.4	8.6
C ₁₈ :0	8.0	8.7	10.8	12.0
C ₁₈ :1	33.6	31.7	30.8	36.3

^a: Weight percentTable 4 Chemical composition of chromatographically purified LTA of *S. sanguis* ATCC 10556 and LM of *M. luteus* ATCC 4698

Component	LTA <i>S. sanguis</i> ATCC 10556		LM <i>M. luteus</i> ATCC 4698	
	Amount μg/mg	Molar ratio	Amount μg/mg	Molar ratio
Glucose	490	0.80	0	0
Mannose	0	0	796	55
Glycerol	313	1.00	7	1
Phosphorus	112	1.06	0	0
Fatty acids ^a	139	0.16	45	2
Peptide	18		18	
Alanine	4	0.12	ND	
Succinic acid	ND ^b		134	14

^a: Calculated as C₁₆:0, ^b: Not determinedTable 5 Fatty acid composition^a of cellular lipids (CL) and amphiphiles of *S. sanguis* ATCC 10556 and *M. luteus* ATCC 4698

Fatty acid	<i>S. sanguis</i> ATCC 10556		<i>M. luteus</i> ATCC 4698	
	CL	LTA	CL	LM
C ₁₂ :0	<1	5	—	—
C ₁₄ :0	4	10	<1	<1
C ₁₄ iso	— ^b	—	2	2
C ₁₄ anteiso	—	—	1	1
C ₁₄ :1	<1	<1	—	—
C ₁₅ :0	—	—	1	1
C ₁₅ iso	—	—	24	10
C ₁₅ anteiso	—	—	44	46
C ₁₆ :0	35	49	3	3
C ₁₆ iso	—	—	8	11
C ₁₆ :1	9	7	—	—
C ₁₇ iso	—	—	1	1
C ₁₇ anteiso	—	—	15	26
C ₁₈ :0	18	13	—	—
C ₁₈ :1	32	16	—	—

^a: Weight percent, ^b: Not detected

Table 6 Chemical composition of Peak II of nuclease-treated phenol-water extract (n-PWE) and type II antigen of *S. sanguis* ATCC 10557

Component	Peak II of n-PWE ^a		Type II antigen ^b	
	Amount μg/mg	Molar ratio	Amount μg/mg	Molar ratio
Glucose	232	1.0	209	1.0
Galactose	322	1.4	356	1.7
Mannose	23	0.1	0	0
Rhamnose	163	0.8	193	0.9
Galactosamine	183	0.8	146	0.7
Phosphorus	30	0.8	2	0.05
Peptide	48		40	

^a: Glycerol and fatty acids were not detected. ^b: Data from Koga et al.²³⁾

S. sanguis 10556 株 LTA はリン：グリセロール：グルコース：アラニン：脂肪酸のモル比が 1.06：1.00：0.80：0.12：0.16 で、PGP 骨格にグルコースとアラニンが結合した構造が推定された。*M. luteus* 4698 株 LM はマンノース：グリセロール：コハク酸：脂肪酸のモル比が 55：1：14：2 であった。

S. sanguis ATCC 10556 株では菌体脂質、LTA とともに炭素数が偶数の C16：0、C18：1、C18：0、C16：1 が主要な脂肪酸で、ほかに C14：0 と C12：0 も検出された。この脂肪酸組成は、10557 株の菌体脂質および SSA の脂肪酸組成とほぼ同じであった。ところが、4698 株では菌体脂質、LM とともに炭素数が奇数でしか

も分枝の C15 anteiso, C17 anteiso, C15 iso が主要な構成脂肪酸で、ほかに C16 iso, C14 iso, C16：0 も検出された (Table 5)。

Table 2～5 の結果から SSA は LTA および LM と化学組成の異なる両親媒性抗原であることが明らかである。

一方、*Actinomyces viscosus* Ny 1 の両親媒性物質 AcA¹¹⁾ もマンノース、グルコース、ガラクトースと脂肪酸から構成されるので AcA と比較するために AcA と抗 10557 血清間で PHA 反応を行ったが、反応は陰性で SSA と AcA 間の免疫化学的な交叉反応は見出

Photo 1 Immunodiffusion of antigens of *S. sanguis* ATCC 10557
Well A: anti-10557 serum, Well 1: purified type II antigen²³⁾ (100 μg/ml, 6 μl), Well 2: Peak II of Fig. 1 (100 μg/ml, 6 μl), Well 3: n-PWE of whole cells (100 μg/ml, 10 μl)

Photo 2 Immunodiffusion of antigens of *S. sanguis* ATCC 10557
Well A: anti-10557 serum, Well 1: purified type II antigen²³⁾ (100 μg/ml, 6 μl), Well 2: SSA (1) (1 mg/ml, 3 μl), Well 3: SSA (2) (1 mg/ml, 8 μl), Well 4: SSA (3) (1 mg/ml, 8 μl), Well 5: n-PWE of whole cells (100 μg/ml, 10 μl)

されなかった。

また、PHA 抑制試験では、用いたハブテンの中で SSA に対して 72 μg /ウェルのマンナンのみが、また 10556 株 LTA に対しては 1 μmol /ウェルの DL- α -グリセリン酸ナトリウムと、2.6 μmol /ウェルの β -グリセリン酸ナトリウムが PHA 反応を阻害した。すなわち SSA の抗原決定基はマンノースのポリマーであり、10556 株 LTA の抗原決定基はグリセリン酸であることが示された。

Table 6 に *S. sanguis* ATCC 10557 株菌体の n-PWE から Sepharose 6 B で分離した多糖抗原 (Fig. 1, 画分 II) と、10557 株細胞壁からトリクロロ酢酸で抽出し、イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーで精製した *S. sanguis* 血清型 II 多糖抗原²³⁾の化学組成を示した。いずれもグルコース、ガラクトース、ラムノースから成る多糖抗原で脂肪酸は含有されなかった。この Fig. 1 の画分 II の多糖抗原は抗 10557 血清に対して血清型 II 多糖抗原と融合する沈降線を形成し (Photo 1)、化学組成もほぼ一致するので血清型 II 抗原であると考えられた。

また、SSA はゲルろ過クロマトグラフィーでは抗 10557 血清に対してゲル内沈降反応は陰性であった (Fig. 1, 4, 6) が、疎水クロマトグラフィーでは弱いながらも陽性であった (Fig. 5, 7)。

SSA (1), SSA (2) および SSA (3) はともに高濃度で *S. sanguis* 血清型 II 多糖抗原と融合する沈降線を形成した (Photo 2)。免疫電気泳動では血清型 II 多糖抗原はわずかに陽極側に移動したが SSA はほとんど移動せず (Photo 3) 荷電していないことが明らかとなった。

考 察

LTA/PGP の保有に関して不均一性を示す *S. sanguis* は、生物学的性状によって A 型と B 型に分類され¹⁸⁾、さらに生物型 A に属する *S. sanguis* の菌株はすべて LTA を保有するのに対し、B 型に属する菌株のすべてが LTA を保有しないと報告されている^{19,20)}。

今回 LTA を欠く生物型 B の *S. sanguis* ATCC 10557 株から抽出、精製した両親媒性抗原 SSA は主にマンノース、ガラクトース、グルコース、ラムノース、ガラクトサミンおよび脂肪酸から構成され、そのモル比は精製法により多少の変動はあるが、平均 4.3 : 1.5 : 1.0 : 0.6 : 0.5 : 0.9 で、ほかに微量のグリセロールとリンが検出された。*S. sanguis* ATCC 10556

株の LTA はリン、グリセロール、グルコース、アラニンおよび脂肪酸で構成され、そのモル比は 1.06 : 1.00 : 0.80 : 0.12 : 0.16 であった。また *M. luteus* ATCC 4698 株の LM はマンノース、グリセロール、コハク酸および脂肪酸で構成され、そのモル比は 55 : 1 : 14 : 2 であった。LTA と LM のいずれからでもガラクトース、ラムノース、ガラクトサミンは検出されなかった。これらの実験結果は、SSA は血清学的反応ならびに化学組成から、LTA や LM とはまったく異なる両親媒性抗原であることを強く示唆している。

グラム陽性菌の両親媒性抗原としては上記のほか、*Streptococcus pneumoniae* のフォルスマン抗原²⁸⁾や *A. viscosus* Ny 1 株の脂肪酸と結合したヘテロ多糖 (AcA)¹¹⁾が報告されている。AcA はマンノース、グルコース、ガラクトース、グリセロール、リンおよび脂肪酸から成り化学組成が SSA と似ている。しかし PHA 反応で調べた限りでは AcA と SSA の間に免疫化学的な交叉反応は見出されなかった。

両親媒性抗原の疎水性は脂肪酸に荷われているが SSA の主要な脂肪酸は C16 : 0, C16 : 1, C18 : 1, C18 : 0 で細胞膜の脂肪酸および 10556 株の LTA や細胞膜の脂肪酸組成とほぼ同じであった。

SSA の菌体からの回収率は LTA や LM のそれに比べて非常に低い。培養上清からは培養 1 l あたり菌体からの約 3 倍の SSA が得られたが、これらを合算しても LTA や LM の回収率にははるかに及ばない。SSA の回収率がこのように低いのは、SSA が①本来わずかしき存在しないか、②非常に分解されやすいか、あるいは③両親媒性抗原の抽出法として広く用いられているフェノール-水法が SSA の抽出に適切でないかのいずれかと考えられる。そこで、フェノール-水法以外に、ブタノール-水法、アセトン抽出法、クロロホルム-メタノール-水系の抽出を試みたが、PHA 価でみる限り、フェノール-水法に勝るものはなかった。

フェノール-水抽出による SSA の精製法としては回収率や操作の単純化を考えると、核酸分解酵素処理することなく、Sepharose 6 B によるゲルろ過を行い、PHA 反応陽性画分を octyl-Sepharose CL-4 B に吸着させ、n-プロパノールの濃度勾配下に溶出させる方法が最適と考えられる。SSA は octyl-Sepharose CL-4 B による疎水クロマトグラフィーで n-プロパノール濃度 33% 近辺で溶出した。Fischer ら³⁹⁾は LTA の精製に際し、LTA が n-プロパノール 30% 近辺で octyl-Sepharose CL-4 B から溶出したと報告しているので、

Photo 3 Immunoelectrophoresis of antigens of *S. sanguis* ATCC 10557
Immunoelectrophoresis was performed on 1% agar in 0.025 M barbital buffer (pH 8.6) at 15 mA for 75 min.
Line A: anti-10557 serum, Well 1: purified type II antigen²³⁾ (100 μ g/ml, 10 μ l), Well 2: SSA (1) (1 mg/ml, 10 μ l), Well 3: SSA (2) (1 mg/ml, 10 μ l), Well 4: SSA (3) (1 mg/ml, 10 μ l)

SSA と LTA の疎水性は同程度と考えられる。しかしながら電荷に関しては、SSA はほとんど荷電しておらず (Photo 3), LTA, LM, および AcA がともに強く負に荷電している⁴⁰⁾のとは非常に対照的である。

Rosan¹³⁾は ATCC 10557 株のフェノール-水抽出物と抗 10557 血清を用いて PHA 反応を行ったが、PHA 反応は陰性で両親媒性抗原の検出ができなかったと報告している。しかしこの結果だけでは両親媒性抗原の存在は否定できない。PHA 反応の条件、特に彼が用いた抗 10557 株血清中に両親媒性抗原に対する抗体が存在するの否かなどについても検討の余地があるのかもしれない。

また、最近 van de Rijn and George⁴¹⁾は、"nutritionally variant streptococci"—しばしば亜急性細菌性心内膜炎の患者から分離され、*S. mitis* (*mitior*), *S. sanguis* (血清型 II) など *S. viridans* に属するレンサ球菌⁴²⁾ですべての株が LTA を欠

Streptococcus Sanguis Amphiphile (SSA)

Fig. 8 Schematic representation of proposed structure of SSA

く⁴³⁾—のフェノール-水抽出物中に LTA とは異なる両親媒性抗原の存在が認められたと報告している。

10557 株菌体からフェノール-水抽出法で得られた多糖抗原 (Fig. 1, 画分 II) は 10557 株細胞壁から TCA 抽出により得られた血清型 II 多糖抗原²³⁾と免疫化学的性状も化学組成もよく一致し、血清型 II 多糖抗原と同定された。すなわち、10557 株ではフェノール-水抽出法は細胞壁の多糖抗原の抽出にも有効であることが示された。SSA は、ゲルろ過クロマトグラフィーで分画すると、抗 10557 血清に対して沈降線を形成しない (Fig. 1, 4, 6) が、疎水クロマトグラフィーを行うと沈降線を形成した (Fig. 5, 7)。PHA 価が最大のクロマトグラフィーのヘキソース濃度は Fig. 4 の画分 I では 100 μ g/ml で、Fig. 5 の画分 II と Fig. 7 の画分 II は 50 μ g/ml であるから沈降線の出現はヘキソース濃度のみに依存しているのではなく、n-プロパノールの存在により SSA の会合形態や立体構造に変化を生じ、沈降線を形成したと推測された。また SSA (1), SSA (2) および SSA (3) の凍結乾燥標品は比較的高濃度で血清型 II 多糖抗原と融合する沈降線を生ずることや化学組成の点から考えると、これら SSA 抗原は血清型 II 多糖抗原と全く異なる物質ではなく Fig. 8 に示すような、マンノースのポリマーと脂肪酸からなる糖脂質と血清型 II 多糖抗原の複合体が推測される。

SSA の生物学的機能の解明は重要な研究課題である。SSA は LTA と同じ方法で抽出されること、LTA と同様に親水性の多糖部分と疎水性の脂質部分とで構成される両親媒性物質で赤血球に直接結合する能力を有することなどから、LTA を欠く *Micrococcus* 属では LM が LTA に代わる機能を果たすと推測されている⁴⁾ように、生物型 B の *S. sanguis* では SSA が LTA に代わる役割を果たすと推測される。特に、*S. sanguis* が歯面に最初に集落を形成する細菌である¹⁵⁾ことや、亜急性細菌性心内膜炎の患者血液から分離される¹⁴⁾ことなどから考えると、SSA は LTA と同様に菌体の宿主細胞表面への付着に関与していると推測される。また LTA のみならず SSA も免疫修飾物質として作用

するとの状況証拠もある⁴⁴⁾。SSA の生物学的機能はグラム陰性菌も含めた細菌表層の両親媒性抗原⁴⁰⁾とも比較しながら今後検討を要する大きな課題である。

結 論

S. sanguis ATCC 10557 株 (血清型 II/生物型 B) はグラム陽性菌の多くが細胞膜から菌体表層にかけて含有する LTA を欠く。この菌株の菌体と培養上清から LTA とは異なる両親媒性抗原 SSA を分離・精製し、その化学的および免疫化学的性状について検討し次のような結論を得た。

1) 菌体からフェノール-水抽出法で得た抽出物から高純度の SSA を効率よく得るための分離・精製法として、同抽出物を Sepharose 6 B でゲルろ過クロマトグラフィーを行い、得られた SSA の粗画分を濃縮し、次いで octyl-Sepharose CL-4 B に吸着後、n-プロパノールの濃度勾配下に疎水クロマトグラフィーを行う方法を開発した。

2) 培養上清から高純度の SSA を効率よく得るために、培養上清を限外ろ過モジュールで 10 倍に濃縮後、濃縮液からフェノール-水抽出法で抽出物を得、凍結乾燥後十分に脱脂して精製の出発材料とした。培養上清の 50% 飽和硫酸沈殿物のフェノール-水抽出物には SSA は検出されなかった。精製は菌体のフェノール-水抽出物と同様に行った。

3) SSA はマンノース、グルコース、ガラクトース、ラムノース、ガラクトサミン、脂肪酸、グリセロール、リンで構成され、そのモル比は 4.3 : 1.0 : 1.5 : 0.6 : 0.5 : 0.9 : 0.1 : 0.9 であった。また SSA と LTA, LM, AcA 間にはいずれも免疫化学的な交叉反応は見出されず、SSA が LTA, LM および AcA のいずれとも異なる新しい両親媒性抗原であることが示された。その構造は、マンノースのポリマーと脂肪酸からなる糖脂質と血清型 II 型多糖抗原の複合体であると推定された。SSA と抗 10557 株血清間の PHA 反応はマンノースのポリマーによって阻害された。

4) フェノール-水法によって菌体から多糖抗原も抽出され、核酸分解酵素処理とゲルろ過クロマトグラフィーにより精製された。この多糖抗原はグルコース、ガラクトース、ラムノース、ガラクトサミンから成り、そのモル比は 1.0 : 1.4 : 0.8 : 0.8 で、*S. sanguis* 血清型 II 多糖抗原と同一と推測された。

稿を終えるにあたり、本研究の御指導と御校閲を賜った国立予

防衛生研究所、歯科衛生部浜田茂幸部長、および御校閲を賜った日本医科大学、微生物学免疫学教室横室公三教授ならびに大田寿士助教授に深謝致します。また本研究の遂行に御教示を戴いた前鹿児島大学歯学部、予防歯科学教室水野純助教授に厚く御礼申し上げるとともに、終始御援助を戴いた歯科衛生部疫学室古賀敏比古室長をはじめ部員諸氏に感謝致します。

なお本論文の要旨は第 59 回日本細菌学会総会 (1986 年 3 月) において発表した。

文 献

- 1) Wicken, A.J. and Knox, K.W.: Lipoteichoic acids; New class of bacterial antigen. *Science*, 187, 1161~1167, 1975.
- 2) Fisher, M., Nakano, M., Laine, R.A. and Bohrer, W.: On the relationship between glycerophosphoglycolipid and lipoteichoic acids in gram-positive bacteria. I. The occurrence of phosphoglycolipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 528, 288~297, 1978.
- 3) 浜田茂幸: 細菌の付着; 両親媒性物質の役割. 表面, 21, 554~563, 1983.
- 4) Lambert, P.A., Hancock, I.C. and Baddiley, J.: Occurrence and function of membrane teichoic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 472, 1~12, 1977.
- 5) Tomasz, A.: The role of autolysins in cell death. *Ann. NY Acad. Sci.*, 235, 439~448, 1974.
- 6) Ofek, I., Beachey, E.H., Jefferson, W. and Campbell, G. C.: Cell membrane-binding properties of group A streptococcal lipoteichoic acid. *J. Exp. Med.*, 141, 990~1003, 1975.
- 7) Hughes, A.H., Hancock, I.C. and Baddiley, J.: The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. *Biochem. J.*, 132, 83~93, 1973.
- 8) Owen, P. and Salton, M.R.J.: A succinylated mannan in the membrane system of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 875~880, 1975.
- 9) Pless, D.D., Schmit, A.S. and Lennarz, W.J.: The characterization of mannan of *Micrococcus lysodeikticus* as an acidic lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 250, 1319~1327, 1975.
- 10) Powell, D.A., Duckworth, M. and Baddiley, J.: A membrane-associated lipomannan in micrococci. *Biochem. J.*, 151, 387~397, 1975.
- 11) Wicken, A.J., Broady, K.W., Evans, J.D. and Knox, K.W.: New cellular and extracellular amphipathic antigen from *Actinomyces viscosus* NY1. *Infect. Immun.*, 22, 615~616, 1978.
- 12) McCarty, M.: The occurrence of polyglycerophosphate as an antigenic component of various gram-positive bacterial species. *J. Exp. Med.*, 109, 361~378, 1959.
- 13) Rosan, B.: Absence of glycerol teichoic acids in certain oral streptococci. *Science*, 201, 918~920, 1978.
- 14) White, J.C. and Niven, C.F., Jr.: *Streptococcus s.b.e.*; *Streptococcus* associated with subacute bacterial endocarditis. *J. Bacteriol.*, 51, 717~722, 1946.
- 15) Carlsson, J., Grahnes, H., Johnson, G. and Winkler, S.: Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouth of infants. *Arch. Oral Biol.*, 15, 1143~1148, 1970.
- 16) Coykendall, A.L. and Specht, P.A.: DNA base sequence homologies among strains of *Streptococcus sanguis*. *J. Gen. Microbiol.*, 91, 92~98, 1975.

- 17) Facklam, R.R.: Physiological differentiation of viridans streptococci. J. Clin. Microbiol., 5, 184~201, 1977.
- 18) Hamada, S., Torii, M., Tsuchitani, Y. and Kotani, S.: Isolation and immunobiological classification of *Streptococcus sanguis* from human tooth surface. J. Clin. Microbiol., 12, 243~249, 1980.
- 19) Hamada, S., Mizuno, J., Kotani, S. and Torii, M.: Distribution of lipoteichoic acids and other amphipathic antigens in oral streptococci. FEMS Microbiol. Lett., 8, 93~96, 1980.
- 20) Mizuno, J., Torii, M., Yamamoto, T. and Hamada, S.: Detection of amphipathic antigen unique to biotype B *Streptococcus sanguis*. FEMS Microbiol. Lett., 16, 209~212, 1983.
- 21) Hamada, S. and Torii, M.: Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. Infect. Immun., 20, 592~599, 1978.
- 22) Fujimoto, M., Kuninaka, A. and Yoshino, H.: Purification of a nuclease from *Penicillium citrinum*. Agr. Biol. Chem., 38, 777~783, 1974.
- 23) Koga, T., Okahashi, N., Yamamoto, T., Mizuno, J., Inoue, M. and Hamada, S.: Purification and immunochemical characterization of *Streptococcus sanguis* ATCC 10557 serotype II carbohydrate antigen. Infect. Immun., 42, 696~701, 1983.
- 24) Moskowit, M.: Separation and properties of a red cell sensitizing substance from streptococci. J. Bacteriol., 91, 2200~2204, 1966.
- 25) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911~917, 1959.
- 26) Scott, T.A. and Melvin, E.H.: Determination of dextran with anthrone. Anal. Chem., 25, 1656~1661, 1953.
- 27) Mejbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Z. Physiol. Chem., 258, 117~120, 1939.
- 28) Lowry, O.H., Roberts, N.R., Leiner, K.Y., Wu, M.-L. and Farr, A.L.: The quantitative histochemistry of brain. I. Chemical methods. J. Biol. Chem., 207, 1~17, 1954.
- 29) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265~275, 1951.
- 30) Snyder, F. and Stephens, N.: A simplified spectrophotometric determination of ester group in lipids. Biochim. Biophys. Acta, 34, 244~245, 1959.
- 31) Lee, Y.C.: Isolation and characterization of lipopolysaccharides containing 6-O-methyl-D-glucose from *Mycobacterium* species. J. Biol. Chem., 241, 1899~1908, 1966.
- 32) Dische, Z. and Shettles, L.B.: A specific color reaction of methylpentose and a spectrophotometric micromethod for their determination. J. Biol. Chem., 175, 595~603, 1948.
- 33) Strominger, J.L., Park, J.T. and Thompson, R.E.: Composition of the cell wall of *Staphylococcus aureus*; Its relation to the mechanism of action of penicillin. J. Biol. Chem., 234, 3263~3268, 1959.
- 34) Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M. and Wells, W.W.: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. J. Am. Chem. Soc., 85, 2497~2507, 1963.
- 35) Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H. and Jeanes, A.: Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal. Chem., 37, 1602~1604, 1965.
- 36) Niedermeier, W.: Gas chromatography of neutral and amino sugars in glycoproteins. Anal. Biochem., 40, 465~475, 1971.
- 37) Hewett, M.J., Knox, K.W. and Wicken, A.J.: Studies on group F antigen of lactobacilli; Detection of antibodies by haemagglutination. J. Gen. Microbiol., 60, 315~322, 1970.
- 38) Holtje, J.V. and Tomasz, A.: Biological effects of lipoteichoic acids. J. Bacteriol., 124, 1023~1027, 1975.
- 39) Fischer, W., Koch, H.W. and Hass, R.: Improved preparation of lipoteichoic acids. Eur. J. Biochem., 133, 523~530, 1983.
- 40) Wicken, A.J. and Knox, K.W.: Bacterial cell surface amphiphiles. Biochim. Biophys. Acta, 604, 1~26, 1980.
- 41) van de Rijn, I. and Goerge, M.: Immunochemical study of nutritionally variant streptococci. J. Immunol., 133, 2220~2225, 1984.
- 42) Cooksey, R.C., Thompson, F.C. and Facklam, R.R.: Physiological characterization of nutritionally variant streptococci. J. Clin. Microbiol., 10, 326~330, 1979.
- 43) Bouvet, A., van de Rijn, I. and McCarty, M.: Nutritionally variant streptococci from patients with endocarditis; Growth parameters in a semi-synthetic medium and demonstration of a chromophore. J. Bacteriol., 146, 1075~1082, 1981.
- 44) 山本十糸子, 古賀敏比古, 浜田茂幸: グラム陽性菌, 両親媒性抗原の免疫化学的ならびに生物学的活性の比較. 日細菌誌, 40, 283, 1985.

(受付: 1986年9月25日)