嫌気性細菌 *Propionibacterium acnes* の 上皮細胞への付着能

梅 本 利 彦 林 敦 子 並 河 勇
加 登 基 弘 堀 雅 彦

朝日大学歯学部口腔細菌学講座（主任：並河 勇教授）

〔受付：昭和61年8月25日〕

Adherence of an anaerobic bacterium *Propionibacterium acnes* to human epithelial cells

Toshihiko Umemoto, Atsuko Hayashi, Isamu Namikawa,
Motohiro Kato, and Masahiko Hori

Department of oral Microbiology, School of Dentistry, Asahi University,
Motosu-gun, Hozumi-cho, Gifu 501-02
(Director: Prof. Isamu Namikawa)

[Accepted for publication: August 25, 1986]

Key words: *Propionibacterium acnes* / adherence / epithelial cells / electron microscopy / fuzzy structures

Abstract: Adherence of a Gram positive, anaerobic bacterium *Propionibacterium acnes* to epithelial cells was examined using an *in vitro* assay system. The adherence of three strains ATCC 6919, 11827, and 11828 of *P. acnes* to human buccal epithelial cells was dependent on bacterial concentration, incubation time, and pH. Heat treatment of the bacterial cells decreased the subsequent bacterial adherence to the epithelial surfaces but the bacterial adherence was not completely eliminated by heat treatment. Trypsin added to an adherence assay system significantly inhibited the adherence of *P. acnes* ATCC 11828.

Scanning electron microscopy demonstrated projecting structures up to 300 m μ long on the surface of strain ATCC 11828 associated with the bacterial attachment to the surface of the epithelial cells. Negative staining technique and an ultrathin section of a strain ATCC 11828 adherent to an epithelial cell also showed fuzzy structures mediating the bacterial binding to the epithelial cell. These results suggest that *P. acnes* adheres to human buccal epithelial cells by the heat-resistant fuzzy structures on the surface of the bacteria.

結 言

細菌の感染過程の初期には、細菌が宿主の一定部位に付着および定着する必要がある。環境としてのヒト口腔は、硬組織である歯牙と軟組織である粘膜から成り、唾液が両組織の表面を被っている。口腔内に侵入する機会をもつ細菌は、口腔特

有の咀嚼運動や唾液流により口腔環境から絶えず排除される危険に曝されているので、これらの細菌が口腔に常在する為には口腔内の組織である歯牙や粘膜表面に付着ないしは吸着することが必要条件である¹⁾。事実、ヒト口腔に常在する細菌の中で、グラム陽性の通性嫌気性細菌である *Streptococcus mutans*¹⁾, *Streptococcus salivarius*²⁾, *Actinomyces viscosus*³⁾ は歯牙表層に対し、また、グラム陰性の嫌気性桿菌である *Bacteroides gin-*

*givalis*⁴⁾, *Haemophilus actinomycetemcomitans*⁵⁾ は口腔粘膜細胞にそれぞれ付着することが明らかにされ、これらの細菌と口腔疾患である歯牙齦蝕症や歯周疾患との関係が示唆されている。

Propionibacterium acnes はグラム陽性の嫌気性桿菌であり皮膚の常在菌である⁶⁾。本菌は、口腔にも常在菌の一種として見出され、歯周疾患病巣部位に検出されている細菌である⁷⁾。しかし、本菌の口腔内での定着のメカニズムについては、現在のところ、ほとんど知られていない。そこで、今回、本菌の粘膜上皮細胞への付着に対する基礎的な性質を検討した。

実験材料および方法

1. 供試菌株：実験に供試した細菌は、*Propionibacterium acnes* (以下 *P. acnes* と略) の3株で、ATCC 6919 と ATCC 11828は岐阜大学医学部微生物学教室から、ATCC 11827は大阪大学微生物病研究所からそれぞれ分与されたものである。各菌株を trypticase soy agar (BBL) 平板上で嫌気条件(80%N₂, 10%CO₂, 10%H₂)で継代し、付着実験に使用する場合には、まえて、1晩37°Cで嫌気条件下に放置した100mlの trypticase soy broth (BBL) にそれぞれ接種し、18時間攪拌培養を行った。遠心操作(8,000×g, 5分)で集菌後、Ca 不含リン酸緩衝液(PBS, pH 7.2)あるいは生理食塩水で2回洗浄した後、同緩衝液あるいは所定の pH 調整済みの PBS 中に均一に懸濁し、550nm の吸光度(OD₅₅₀)が0.5(5.1×10⁸細菌/ml)になるように菌濃度を調製した後、すみやかに付着実験に使用した。

2. 上皮細胞の調製：付着実験に供した細胞は、活動性齦蝕歯牙のない健全な歯周組織からなる成人(女性、25歳)から採取したもので、採取に先だち蒸留水で数回うがいを行わせ、頬粘膜部を無菌の竹製アプリータで数回軽く擦り、アプリータ上に掻き取られた上皮細胞を冷 PBS に懸濁させた。採取された上皮細胞を冷 PBS 緩衝液で3回遠心(1回, 180×g, 5分)洗浄した。細胞の生死判定は0.25%トリパンブルー液による染色性の有無で行い、最終の細胞濃度が10⁵/ml となるように調整し、付着実験に使用した。

3. 付着実験：各菌株の上皮細胞への付着量は次のように行った。無菌のガラス製培養瓶(底辺15mm×15mm, 高さ40mm)に、0.5mlの細菌懸濁液と、同量の洗浄済みの上皮細胞懸濁液を加え、37°Cの恒温槽中で一定時間振蕩しながら付着を行わせた。細胞に付着していなかった細菌を除去する為 PBS で3回遠心洗浄した後、得られた細胞にクリスタル紫染色を施し、光顕(対物40倍, 接眼10倍)下で、任意に選んだ50個の上皮細胞の表面に付着している細菌数を算定した。供試した上皮細胞表面には、PBS による3回洗浄を行っても除去されなかった細菌が観察された。これらの細菌は形態学的には球形を呈するものが多く、細胞当たり平均で10個以下であった。付着菌数を算定する際、細胞表面に付着していたこれらの細菌は光顕下では *P. acnes* と形態学的に必ずしも明確に区別されず、それ故、各細胞表面の付着菌数を全て測定しその平均付着菌数から、未処理(対照)の細胞の平均付着菌数を差し引いた付着菌数を真の付着菌数とした。

供試菌の加熱処理が上皮細胞表面への菌付着におよぼす影響を調べる場合は、各株の菌液0.5mlを反応瓶に入れ、密閉し、40°C, 60°C, 80°C および100°Cの浴槽内にそれぞれ5分間加熱後、直ちに各反応瓶を水道水中で冷却、これに0.5mlの上皮細胞懸濁液を加え、60分間37°Cの恒温槽内で振蕩しながら付着反応を行わせた。

付着におよぼす pH の影響を調べる為の pH 調整は次の様に行った。18時間培養菌を遠心集菌後、生理食塩水で2回洗浄しその生理食塩水による菌懸濁液を、まえて、PBS (pH 7.2)を1Nの水酸化ナトリウム液あるいは酢酸液で所定の pH に調整した付着反応用緩衝液(pH 4-12)を用いて OD₅₅₀ = 0.5になるように菌懸濁液を希釈後、その各0.5mlを付着実験に供した。

菌付着におよぼす糖類の効果は、濃度 200mM (pH 7.2の PBS 中)の D-グルコース、D-フラクトース、D-ガラクトース、D-マンノース、D-ラクトース、D-マルトースあるいは塩酸グルコサミン(いずれも半井化学製)の各0.25mlに、洗浄済みの各株の細菌懸濁液(OD₅₅₀ = 1.0)の0.25mlを加え、37°C, 45分間の振蕩後、これに0.5mlの上

皮細胞を加え、さらに37°C、45分間のインキュベーションを行い菌付着を行わせた。

トリプシンの *P. acnes* ATCC 11828 と上皮細胞の両者に対する影響は、トリプシン (Difco 製) の最終濃度が1.25mg/ml および12.5mg/ml となるように上述の細菌—細胞共存系に加え、37°C、60分間後の菌付着量をトリプシン不含対照 (PBS のみ) のそれと比較した。

4. 形態観察： *P. acnes* ATCC 11828株を供試菌として、上皮細胞表面におけるその付着状態を観察する為に、走査型または透過型電子顕微鏡を使用した。走査型電顕観察用の試料は次のように作製した。付着実験による反応終了後、PBS で2回洗浄し東洋 No.2ろ紙で作製した小封筒 (10×10 mm) に入れ、2%グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液 pH 7.2中) で室温で1時間固定した。次に、同緩衝液中で2回 (各20分) 洗浄した後、1%オスミウム酸固定液 (0.1M カコジル酸緩衝液中) で室温で1.5時間処理した後、同緩衝液で1回洗浄を行った。エチルアルコール (30, 50, 70, 90, 100, 100%, 各15分) による脱水操作に続いて、冷酢酸イソアミル液に浸し、小封筒をそのまま臨界点乾燥法で乾燥を行った。次に封筒内面に保持されていた試料を傷つけないように開封し、大きさ約3×3mmのろ紙片として切りとり、試料面を上にして試料台にマウント後、Fine Coat Ion Sputter (日本電子, JFC-1100) で10分間金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡 (日本電子, JSM-35C) で加速電圧 25 kV, 直接倍率 5,000–10,000倍で観察を行った。また、透過型電顕観察用の試料は、250×g, 10分間の遠心分離して得た ATCC 11828株の細菌の沈査を前述の走査型電顕用の試料と同様の前固定、後固定および脱水操作を行った。ただし、菌体表層の糖質の染色を目的として0.05%のルテニウムレッド (半井化学製) を加えた2%グルタルアルデヒド液による前固定を行った。Luft 法⁸⁾ に準じてエポン812で包埋し、LKB 8800 A-NM ウルトロトームで超薄切片を作製した。コロジオン膜で皮膜した銅製グリッド上に切片を取り、酢酸ウラニウム飽和溶液で30分間、次に0.4%硝酸鉛液で5分間それぞれ電子染色を行った。また、陰性染色法による菌体表層の

観察には、37°C、1晩の平板培養集落を0.2%リントングステン酸液 (pH 7.0) で染色した標本を作製した。観察は JEM-100B 電子顕微鏡 (日本電子) で加速電圧80kV で観察を行った。

結 果

まず、供試した細菌付着量測定系における細菌濃度と付着菌数との関係を検討した (Fig. 1)。

Fig. 1 Effect of bacterial concentration on adherence of *Propionibacterium acnes* to human buccal epithelial cells.

Fig. 2 Effect of incubation time on adherence of *Propionibacterium acnes* to human buccal epithelial cells. Reaction mixture (1.0ml) contained epithelial cells and bacteria. Dotted lines show mean of the numbers of bacteria originally adherent to the human buccal epithelial cells used.

Fig. 3 *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 (a), ATCC 11827 (b) and ATCC 11828 (c) adherent to a human buccal epithelial cell after 60-min incubation. Reaction mixture (1.0ml) contained epithelial cells and bacteria. Bar=10 μ m.

ずれの菌株も上皮細胞数 5×10^4 個当りの付着数が菌濃度 OD₅₅₀ 値が約1.5までは増加したが、それ以上の菌濃度では付着菌数は増加せず一定であった。

次に、供試菌株の上皮細胞への付着とインキュベーション時間との関係を検討した。各菌株と上皮細胞の所定量を付着反応瓶に加え、37°C で2時間振蕩し上皮細胞への付着菌数を算定した (Fig. 2)。ATCC 11828株および ATCC 6919株は、少なくとも2時間まで付着数が増加したが、ATCC 11828株では、1時間で付着数が飽和に達した。

実験に供試したヒト上皮細胞に細菌付着を行わせ、細胞表面に付着しているクリスタル紫で染色された *P. acnes* の3株を顕微鏡観察すると、上皮細胞に付着している *P. acnes* の一端が上皮細胞表面に固定され、その結果として菌体の遊離端が

揺れて観察される事が多かった (Fig. 3)。

3菌株のヒト上皮細胞への付着におよぼす反応系の pH の影響を調べた (Fig. 4)。ATCC 11827株および ATCC 11828株は pH の上昇に伴って、細菌付着能の低下が認められたが、ATCC 6919株では、pH 4-12の間では、殆ど細菌付着量の変化は見られなかった。

異なる4種の温度で *P. acnes* 3菌株を加熱することによって、上皮細胞への付着がどのように変化するかを調べた。供試菌株を5分間加熱処理した後、37°C、1時間の上皮細胞への付着量を比較した (Fig. 5)。ATCC 6919株および ATCC 11828株は、菌体の処理温度の上昇に伴い上皮細胞に対する付着量が徐々に減少し、100°C におけるその細菌付着量は40°C における付着菌量の約半分であった。これに対し、ATCC 11827株では同様の菌体の加熱処理によって菌付着量の変化は

Fig. 4 Effect of pH on adherence of *Propionibacterium acnes* to human buccal epithelial cells.

Fig. 5 Effect of heat treatment of *Propionibacterium acnes* on adherence to human buccal epithelial cells. Bacterial suspension (0.5ml) was heated at 40°C, 60°C, 80°C, or 100°C for 5min, cooled and then incubated for 60min at 37°C with epithelial cells (0.5ml).

ほとんど認められなかった。

供試した7種の糖類について、100mM 濃度での ATCC 11828株の付着におよぼす影響を調べると、フラクトース、ガラクトース、ラクトース、グルコサミンの効果は見られず、マルトースとマンノースについて菌付着促進効果、グルコースについて抑制効果が認められた (Table 1)。また、1.25mg/ml のトリプシンによって同菌株の付着が著しく抑制された (Table 2)。

上皮細胞の表面に付着する ATCC 11828株の

Table 1 Effect of pretreatment of *Propionibacterium acnes* ATCC11828 with carbohydrates on bacterial adherence to human buccal cells *in vitro*.

Sugars (100mM)	Relative adherence ^{a)}
PBS (control)	100
D-glucose	78 (S D) ^{b)}
D-fructose	104
D-galactose	111
D-mannose	136 (S D)
D-lactose	115
D-maltose	149 (S D)
HCl-glucosamine	107

a) 100×average number of treated bacteria per cell/average number of untreated bacteria per cell. ATCC11828 was incubated with each sugar for 45 min at 37°C, mixed with epithelial cells, and incubated for 45 min at 37°C.

b) Statistically different, using chi square test with a critical value of $P=0.05$, as compared with treatment of PBS.

Table 2 Adherence of *Propionibacterium acnes* ATCC11828 to human buccal epithelial cells in the presence of trypsin *in vitro*.

Treatment	Relative adherence ^{a)}
PBS (control)	100
Trypsin (12.5 mg/ml)	17
Trypsin (1.25 mg/ml)	26

a) 100×average number of treated bacteria per cell/average number of untreated bacteria per cell. Number of bacteria adherent to an epithelial cell was counted after 60min of incubation at 37°C.

走査型電顕観察では、細菌の上皮細胞表面付着に参与していると思われた数個の突起様構造物を認めた (Fig. 6)。走査型電顕観察によれば、これらの構造物の数は多いもので細胞当たり1-2個で、0.3 μm 以内の長さのものが多かった。また、透過型電顕による細菌-細胞間付着部位の観察では、細菌細胞壁の表層に電子密度が粗で厚さ不定の構造物が観察され、その一部が上皮細胞表面と結合している像が得られた (Fig. 7)。同株の陰性染色標本観察では、細胞壁表層は不均一な染色性を停止、その境界は明瞭ではなかった (Fig. 8)。

Fig. 6 Scanning electron micrograph showing *Propionibacterium ances* ATCC 11828 on the surface of a human buccal epithelial cell (a) and the magnified area (b). Note projecting structures (arrows) mediating bacterial adherence to the surface of the epithelial cell. Coccal bacteria which originally had adhered to the epithelial cell were also seen. Bars=10 μ m in a and 1 μ m in b.

Fig. 7 An ultrathin section of 0.05% ruthenium red-stained *Propionibacterium acnes* ATCC 11828 adhering to the surface of a buccal epithelial cell (EC). Note fuzzy structures (arrows) on bacterial outer membrane mediating bacterial adherence to the epithelial surface. Bar=100nm.

Fig. 8 Electron micrograph of *Propionibacterium acnes* ATCC 11828 negatively stained with phosphotungstic acid showing irregularly stained periphery of the bacterial cell wall (arrows). Bar=200nm.

考 察

P. acnes はヒトの皮膚、腸管、口腔に常在する嫌気性のグラム陽性桿菌の1種である。特に、成脂腺の発達している成人では皮膚表面1cm² 当り10⁴~10⁵に達し⁹⁾、座瘡の発症、進展と関連を有する細菌と知られている¹⁰⁾。本菌は、細胞壁成分の抗原性の差違に基き、血清学的に2つのグループに分けられ、ATCC 6919と ATCC 11827が属する

血清型グループIは、細胞壁中にグルコース、マンノース および ガラクトースを含有し、ATCC 11828 の属する グループIIは、形態学的にやや球形を呈し、その細胞壁にはグルコース、マンノースが存在するがガラクトースは含有されていない¹⁰⁾。

本菌はプロピオン酸、インドールなどの代謝産物を産生する他、組織破壊に関与する数種の酵素、たとえば、ヒアルロネートリナーゼ、酸性フォスファターゼ、リパーゼ、プロテアーゼを産生することが知られている¹¹⁾。特に、プロテアーゼの有無が本菌の分類基準となっており¹²⁾、グループIに属するP-37株では分子量の異なる少なくとも3種のプロテアーゼが産生される¹³⁾。また、*P. acnes* はリンパ球の走化性促進能^{9,11)}や補体活性化能¹⁴⁾をも有し、加えて、他のグラム陽性の類縁桿菌である *Actinomyces* sp., *Arachnia propionicus* と同様に、リンパ球に対するマイトジェン活性を示す⁹⁾。このように、*P. acnes* は、代謝産物や蛋白質分解酵素などによる組織破壊作用ばかりでなく、免疫細胞に関与して歯周組織に対する障害作用を示すことから、本菌が歯周疾患病巣部位からかなりの頻度で検出される事実¹⁵⁾と考えると、歯周病原性細菌としての資格をかな

り充たすものと思われる。

供試した3菌株のいずれもヒト上皮細胞表面に付着することが出来、最適条件下での細胞当りの付着数は平均40-50であった。ATCC 11828株はHeLa細胞には同条件で平均5以下でほとんど付着しかかった(データは示されていない)。この事実は、*P. acnes*の内少なくともATCC 11828株の付着が細胞特異性を有することを示すものである。

また、*P. acnes*のヒト上皮細胞への付着能はpH上昇に伴って減少する傾向が見られた。このような酸性条件下での細菌付着量の増加傾向は他の細菌の付着でも知られており、山崎らは嫌気性グラム陰性桿菌である*Eikenella corrodens*の上皮細胞に対する付着量は、pH 7の時よりpH 5の時の方で増加することを報告している¹⁶⁾。また、*Klebsiella pneumoniae*¹⁷⁾や*Streptococcus* sp.¹⁸⁾でも知られている。一般的に、pHの低下は、細菌細胞の表面の負電荷の減少をもたらす¹⁹⁾。したがって、こうした条件下における細菌と上皮細胞との結合は、単に静電気力によるとは考えられず、pHの影響を受ける他の付着機構が考えられねばならない。

一方、加熱処理を施された*P. acnes* ATCC 11827株の付着量はほとんど低下しなかったが、ATCC 6919株およびATCC 11828株では、上皮細胞表面への付着量が減少した(Fig. 5)。たとえば、40°C、5分間の加熱処理を行ったATCC 6919株あるいはATCC 11828株の上皮細胞付着量を100とした時、100°C、5分間の加熱処理したおのの菌株の示した相対的菌付着量はそれぞれ48と43であった。現在のところ、菌体の加熱処理が具体的にどのような影響を菌作に与えるか不明である。Saundersらは、*Actinomyces naeslundii*を100°C、15分間の加熱をすることにより37°Cにおける菌体付着量が15%に抑制されたことから、細菌細胞の表層に存在する付着に関与する成分が破壊、変性あるいは除去されることによるのではないかと考えている²⁰⁾。

ATCC 11828株の付着におよぼすトリプシンの抑制効果はこの酵素によって細菌あるいは細胞表層が変化を受け、その結果菌付着が抑制されたも

のと考えられた。一方、同菌株をマンノースとマルトースで前処理すると上皮細胞への菌付着が促進され、グルコースにより抑制された。本菌の付着現象が、調べた糖類以外の糖類と特異的に親和性を持つ菌体表層物質、たとえばレクチン様物質と細胞表層の糖との結合に基づくものか明らかではない^{16, 20, 21)}。この点に関して、現在検討中である。

光顕観察による菌付着量を測定した際、上皮細胞表面の*P. acnes*はその表面の1点ないし数点で固定され、菌体の遊離端が動いている、いわゆる「つながれた」状態で観察される事が多かった。この点に関し興味ある所見は、走査型電顕でATCC 11828株の上皮細胞表面の付着部を観察する際、菌体-細胞間結合に寄与と思われる短い突起した構造が観察されたことである(Fig. 6)。3菌株の陰性染色標本では、菌体表層構造としての鞭毛や線毛を観察出来なかった。しかし、細菌細胞壁の表層は均一には染色されず細胞表層物質の存在が示唆された(Fig. 8)。したがって、走査型電顕下の突起様構造は菌体表層物質の一部が局所的に集合した結果生じたものと思われた。*P. acnes*の上皮細胞付着はこれらの突起した構造によって菌体が細胞表面に結合された結果と考えられた。走査型電顕観察ではこのような突起様構造が必ずしも全ての菌体に観察されるとは限らず、多いもので菌体当たり2個であった。同じ試料を透過型電顕で観察すると、*P. acnes*菌体-上皮細胞間に不定形で比較的電子密度が小の繊維状構造が存在し、本構造が菌体の付着に関与しているものと推測された。超薄切片標本で観察されたこのような構造が、走査型電顕で観察された突起様構造と同一であるか否かの疑問が残る。しかしながら、両構造は、陰性染色標本観察所見と併せて、菌体の最外層に存在することおよび菌体の付着に寄与していることから、同一物が極めて近似する構造と思われた。

結 論

ヒト口腔内に常在するグラム陽性嫌気性桿菌*Propionibacterium acnes* ATCC 6919, 11827, 11828株のヒト上皮細胞に対する付着について次

の結論を得た。

(1) 菌濃度、インキュベーション時間、pH に依存して、付着菌数が変動した。(2) 細菌をまえてもって加熱処理すると、処理温度の上昇に伴って付着菌数が減少した。(3) 付着反応系に加えられたトリプシンは、菌付着を著しく阻害した。(4) 上皮細胞に付着する ATCC 11828株の細菌表面を走査型および透過型電顕で観察すると、細菌の

付着に関与していると思われる突起様構造ないしは表層物質が観察された。

謝辞：本実験に供試した菌株を供与して下さいました岐阜大学医学部微生物学教室および大阪大学微生物病研究所に対し謝意を表します。また、技術的援助を頂いた本学中央研究施設の森 春義氏と視聴覚室の青柳房二氏に謝意を表します。

抄録：ヒト口腔に常在するグラム陽性で嫌気性桿菌の一種 *Propionibacterium acnes* の上皮細胞付着能についての基礎的性質を *in vitro* 系で検討した。本菌 ATCC 株6919, 11827および11828のヒト頬粘膜上皮細胞に対する付着量は、菌濃度、インキュベーション時間および pH 依存性であった。加熱処理を施した菌体は、処理温度の上昇に伴ってその付着能が低下したが、付着能は完全には消失しなかった。また、供試した ATCC 11828株の上皮細胞に対する付着量はトリプシン存在下で抑制された。

ATCC 11828株の走査型電子顕微鏡所見によれば、付着菌体と上皮細胞の間に菌体の細胞表層付着に関与していると思われる長さ300nm 以内の突起様構造が観察された。ルテニウムレッド染色標本の超薄切片を観察すると、菌体表層に電子密度の小さいけば様構造が存在し、その一部が上皮細胞表面と連絡している像が得られた。また、陰性染色標本では菌体表層物質が観察された。*P. acnes* のヒト上皮細胞に対するこのような付着能は本菌の口腔内定着に重要であると推測された。

文 献

- 1) Hamada, S. and Slade, H. S.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. **44** : 331-384, 1980.
- 2) van Houte, J., Gibbons, R. J. and Banghart, S. B.: Adherence as a determinant of the presence of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* on the human tooth surface. Arch. Oral Biol. **15** : 1025-1034, 1970.
- 3) Wheeler, T. M., Clark, W. B. and Birdsell, D. C.: Adherence of *Actinomyces viscosus* T14V and T14AV to hydroxyapatite surfaces *in vitro* and human teeth *in vivo*. Infect. Immun. **25** : 1066-1074, 1979.
- 4) Okuda, K., Slots, J. and Genco, R. J.: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides asaccharolyticus*, and *Bacteroides melaninogenicus* subspecies: Cellsurface morphology and adherence to erythrocyte and human buccal epithelial cells. Current Microbiol. **6** : 7-12, 1981.
- 5) Umemoto, T., Zambon, J. J., Bonta, Y., Bochacki, V. and Genco, R. J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* adherence to human buccal epithelial cells. J. Dent. Res. **64** : 330, 1983.
- 6) McGinley, K. J., Webster, G. F. and Leyden, J. J.: Regional variations of cutaneous propionibacteria. Appl. Environ. Microbiol. **35** : 62-67, 1978.
- 7) Newman, M. G. and Sagle, F. R.: The role of microorganisms in periodontal disease. Glickman's clinical periodontology, 6th edn. (ed. Carranza, F. A. Jr.), pp. 361-390. W. B. Saunders, 1984.
- 8) Luft, J. H.: Improvements in epoxyresin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. **9** : 409-414, 1961.
- 9) Sandberg, A. L. and Mergenhagen, S. E.: Periodontal disease: Potential immunologic mechanisms of tissue injury. Dental microbiology, (ed. McGhee, J. R., Michalek, S. M. and Cassell, C. H.), pp. 752-764, 1982.
- 10) Johnson, J. L. and Cummins, C. S.: Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria, and strains of *Arachnia propionica*. J. Bacteriol. **109** : 1047-1066, 1972.
- 11) Holland, K. T., Ingram, E. and Cunliffe, W. J.: The microbiology of acne. J. Appl. Bacteriol. (review) **51** : 195-215, 1981.
- 12) Moore, W. E. C. and Holland, L. V.: Genus 1. *Propionibacterium*. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn. (ed. Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E.)

- pp.633-641, Baltimore, Williams and Wilkins, 1974.
- 13) Ingram, E., Holland, K. T., Gowland, G. and Cunliffe, W. J. : Studies of the extracellular proteolytic activity produced by *Propionibacterium acnes*. J. Appl. Bacteriol. **54** : 263-271, 1983.
 - 14) Okuda, K., Nanagi, K. and Takazoe, I. : Complement activity by *Propionibacterium acnes* and *Bacteriodes melaninogenicus*. Arch. Oral Biol. **23** : 911-915, 1978.
 - 15) Tanner, A. C. R., Haffer, C., Brattall, G. T., Visconti, R. A. and Socransky, S. S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J. Clin. Periodontol. **6** : 278-307, 1979.
 - 16) Yamazaki, Y., Ebisu, S. and Okada, H. : *Eikenella corrodens* adherence to human buccal epithelial cells. Infect. Immunol. **31** : 21-27, 1981.
 - 17) Fader, R. C., Avots-Avotins, A. E. and Vavis, C. P. : Evidence for pili-mediated adherence of *Klebsiella pneumoniae* to rat bladder epithelial cells *in vitro*. Infect. Immun. **25** : 729-737, 1979.
 - 18) Zawaneh, S. M., Ayoub, E. M., Baer, H., Cruz, A. C. and Spellacy, W. N. : Factors influencing adherence of group B streptococci to human vaginal epithelial cells. Infect. Immun. **26** : 441-447, 1979.
 - 19) Olsson, J. and Glantz, P. O. : Effect of pH and counter ions on the zeta-potential of oral streptococci. Arch. Oral Biol. **22** : 461-466, 1977.
 - 20) Saunders, J. M. and Miller, C. H. : Attachment of *Actinomyces naeslundii* to human buccal epithelial cells. Infect. Immun. **29** : 981-989, 1980.