原 著

口腔スピロヘータ *Treponema denticola* の ガラス表面への付着

中 谷 至 宏 梅 本 利 彦 中 村 義 則
野 田 充 宏 伊 藤 卯 一 並 河 勇

朝日大学歯学部口腔細菌学講座（主任：並河 勇教授）

〔受付：平成4年2月10日〕

Adherence of an Oral spirochete *Treponema denticola* to glass surfaces *in vitro*

Yoshihiro Nakatani, Toshihiko Umemoto, Yoshinori Nakamura,
Mitsuhiro Noda, Uichi Ito and Isamu Namikawa

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Asahi University
1851 Hozumi, Motosu-gun, Gifu
(Director : Prof. Isamu Namikawa)

〔Accepted for publication : February 10, 1992〕

Key words : *Treponema denticola*/in vitro adherence/outer envelope

Abstract : Adherence of a human oral spirochete *Treponema denticola* ATCC 33520 to hard surfaces *in vitro* was studied in chambers with uncoated or coated glass coverslips and antibiotic-free Dulbecco's minimum essential media. The number of organisms adhering to the glass coverslips was dependent on the spirochetal cell concentration and incubation period up to 60 minutes, and was reduced by pretreatment of organisms with trypsin, proteinase K, lipase, lysozyme, glutaraldehyde, or formaldehyde. The optimal temperature for adherence was 37°C and the heat-treated organisms decreased their adhesive capacity. Few treponemes were attached by their tips to fibronectin-coated surfaces. Abundant organisms were found to adhere to the glass coverslips which had been coated with fibronectin, laminin, concanavalin A, type VI collagen, animal sera, or the specific rabbit polyclonal antiserum against the 53,000-dalton-protein from the outer envelopes of *T. denticola* ATCC 33520.

緒 言

ヒトの口腔の歯肉溝あるいは歯肉ポケットに生息する細菌に関する広範な研究の進展により、特定の細菌種と歯周疾患との間に深い因果関係が見

い出されつつある¹⁻³⁾。歯肉縁下歯垢の細菌叢の一部をなす口腔スピロヘータはグラム陰性の偏性嫌気性菌で、その特徴的ならせん形態と運動様式から他の細菌と容易に識別しうる。したがって、歯垢内局所におけるスピロヘータの存在状態に関する知見も少なくない。特に、ある種の口腔スピロヘータでは発育促進物質として血清成分の一部を要求する事実⁴⁾、歯肉縁下歯垢の表層部すなわち

歯肉組織と直接的に接するように存在していたとする電子顕微鏡観察⁵⁻⁷⁾、また組織内にスピロヘータ菌体が侵入する⁸⁾などの所見は、すくなくとも本菌群の一部が宿主細胞との強い親和性を有することを示唆する。われわれは *T. denticola* ATCC 33520 株の被膜表面に免疫原性の 53 kDa タンパク質が存在することを既に報告した⁹⁻¹¹⁾が、同一菌種あるいは他の *Treponema* 属の菌体の表層にも類似したタンパク質が報告されている^{12,13)}。このような菌体の表層タンパク質が、付着にどのような役割を果たしているか興味をもたれる。

スピロヘータ菌体の付着に関する研究は、梅毒の病原体である *Treponema pallidum*、ワイル病の原因菌である *Leptospira interrogans* あるいはヒト口腔から頻りに分離培養される *T. denticola* や *T. vincentii* を使用して行われている。また、付着実験において付着表面としてはガラス、ハイドロキシアパタイトあるいは上皮細胞が付着対象となっている。*T. pallidum* や *T. denticola* の付着では、血漿中あるいは細胞表面に存在する接着性タンパク質であるフィブロネクチン、あるいはラミニンが重要な役割を演じているとの報告がある¹⁴⁻²⁰⁾。しかし、スピロヘータが固相ないし細胞表面へ付着ないし吸着するメカニズムについては、実験系の不統一もあり不明な点が少ない。

今回、われわれはスピロヘータが組織に付着する機序を解明することを目的として、口腔スピロヘータの一種 *T. denticola* について *in vitro* 系におけるガラス表面への付着を、温度の影響、各種のコーティング材料への付着量の比較、菌体の加熱処理、酵素あるいは化学試薬処理の影響など基本的な付着条件を検討した。この小論は、口腔スピロヘータが歯肉溝局所で宿主細胞に付着する機構を研究する際の基礎的な知見を提供するものである。

材料と方法

1. 供試菌株

実験に供試したスピロヘータは、ヒト口腔の歯肉縁下歯垢に常在する *Treponema denticola* ATCC 33520 株である。本菌を 60°C、30 分間の不活化処

Fig. 1 A procedure showing measurement of adherence of *Treponema denticola* ATCC 33520 to glass coverslips *in vitro*.

理を行った10%ウサギ血清 (Pel-Freez Biologicals, Arkansas, U.S.A.) を添加した Trypticase soy-yeast extract-gelatin-volatile fatty acids-serum (TYGVS) 培地で、嫌気性混合ガス (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) の嫌気培養装置 (平沢, 東京) 内で、対数増殖後期にあたる 4 日間 37°C で培養した。次に菌体を 3,000 rpm、5 分間の遠心操作で集菌し、菌体を prereduced anaerobic Ringer's solution (PRAS) 中で 2 回洗浄した。それぞれの遠心操作による菌体の洗浄は、菌懸濁を穏やかに行い、処理時間を 7 分以内とした。洗浄済みの細菌を適量の PRAS で再懸濁した後、Petrohauser 細菌数算定板で菌数測定を行った。

2. 細菌付着量の測定

スピロヘータ細胞のガラス表面への付着量の測定の概要を Fig. 1 に示す。すなわち、円形平底マイクロプレート (Corning, New York, U.S.A.) の各ウェル (直径 22 mm) に 1 枚の無菌円形カバーガラス (直径 15 mm)、不活化10%胎児ウシ血清 (Gibco, Grand Island, U.S.A.) を添加した 1.2 ml の Dulbecco's Minimum Essential Medium 培地 (D-MEM: コスモ・バイオ, 東京) に菌数調製を

行った一定量の細菌懸濁液（最大液量 200 μ l）を加えた。D-MEM 培地には抗生物質を添加していないものを使用した。まず、円形カバーガラスの表面に、対照ではリン酸緩衝液—生理食塩液（67 mM PBS, pH 7.0）を、その他は PBS で使用濃度に溶解したコーティング材料の 40 μ l ずつをマウントし、室温で乾燥した。次にこれらのカバーガラスを PBS で10回軽く洗浄した後、風乾したものを被覆カバーガラスとして実験に使用した。マイクロプレートを水平回転振盪機（40 回転/分、萱垣、東京）に載せ、温度調製されたインキュベータ内に一定時間放置した。その後、マイクロプレートのウェルから円形カバーガラスを静かに取り出し蒸留水で2回洗浄後、フォンタナ鍍銀染色標本作製して顕微鏡（400 倍）で10視野（一視野の面積：0.0625 mm²）を観察し、その平均菌数を付着菌数とした。また、鍍銀染色を施す直前の標本について、スピロヘータの一端が付着している菌数の割合を位相差顕微鏡（倍率1,000）下で測定した。

3. コーティング材料

菌体付着に及ぼすコーティング材料の影響を検討するために使用したものは合計20種であり、使用目的により2つに大別した。すなわち、前もって円形ガラス表面を一定濃度の供試材料で被覆するために、ヒト血清アルブミン（1 mg/ml, Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, U.S.A.）、ウシ血清アルブミン（1 mg/ml, 半井化学、京都および Sigma, St. Louis, U.S.A.）、卵白アルブミン（1 mg/ml, 半井化学）、コンカナバリン A（1 mg/ml, Sigma）、ヒトコラーゲン（1 mg/ml, VI 型, Sigma）、フィブロネクチン（1 mg/ml, ヒト血清由来, Collaborative Research, Bedford, U.S.A.）、ラミニン（1 mg/ml, マウス腫瘍由来, Collaborative Research）、ヒト全唾液、ヒト血清、胎児ウシ血清（Gibco）、ウシ血清（阪大微生物病研究会、大阪）、ウマ血清（阪大微生物病研究会）、ウサギ血清（Pel-Freez Biologicals）および当研究室で採取したウサギ正常血清およびウサギ抗血清である。唾液は健康な成人男性の口腔から自然に流出した全唾液を 10,000 rpm, 10 分間の遠心分離操作を行い、その上清をミリポアフィルターメ

ンブラン（孔径、0.22 μ m）で濾過したものを試料とした。使用時に唾液および血清は PBS で10倍に希釈した。抗 53 kDa 抗原ウサギ血清は、*T. denticola* ATCC 33520 株の被膜表層タンパク質である 53 kDa 抗原でウサギを免疫して作製したもので、詳細は前報¹¹⁾に記載した。また、供試血清はすべて不活化処理を行った後に付着実験に使用した。

一方、菌体の前処理に使用した供試材料は、トリプシン（500 μ g/ml, Merck, Darmstadt, Germany）、プロテアーゼ K（500 μ g/ml, Merck）、コラゲナーゼ（500 μ g/ml, *Clostridium histolyticum* 由来, Sigma）、リパーゼ（500 μ g/ml, ナカライテスク、京都）、リゾチーム（500 μ g/ml, Sigma）、グルタルアルデヒド（0.25%, キンダ化学、大阪）、ホルムアルデヒド（0.25%, キンダ化学）、 β -メルカプトエタノール（0.25%, ナカライテスク）および過ヨウ素酸塩（0.25%, キンダ化学）である。PBS で各処理材料の濃度調製後、細菌懸濁液に加えた。37°C のインキュベータ内で1時間放置後、遠心操作（10,000 rpm, 5 分）で処理細菌を PBS で3回洗浄して実験に使用した。

4. 走査型電子顕微鏡による付着菌体の観察

スピロヘータ細胞のガラス表面への付着状態を観察するために、2%グルタルアルデヒド液による固定標本作製して走査型電顕観察を行った。すなわち、500 μ g/ml のフィブロネクチン溶液あるいは PBS を 40 μ l ずつ円形カバーガラス表面に載せ、風乾した後、滅菌生理食塩液で10回洗浄した。風乾後、上記の付着実験用のウェル内に被覆カバーガラスを入れ、所定量の培地と菌懸濁液を加え、37°C, 60 分間インキュベーションを行った。次にウェル内の培地を除き円形ガラス表面を蒸留水で軽く2回洗浄し、2%グルタルアルデヒド—カコジル酸緩衝液（pH 7.2）中で室温、1時間の処理を行い試料を固定した。その後、30%から100%のエチルアルコール系で各10分間ずつ脱水処理を行い、臨界点乾燥処理を行った後、蒸着装置（E-1030型、日立、東京）による白金—パラジウム（成分重量比、8:2）蒸着を行った。走査型電子顕微鏡（JSM-35C、日本電子、東京）で加速電圧 25 KV 下で細菌の付着状態を観察した。

Fig. 2 Change in the numbers of *T. denticola* ATCC 33520 adhering to coverslips at different incubation periods. Number of the spirochetes were 1.2×10^8 per microplate well. Points and bars represent the mean $\pm$ S.D. of triplicates.

結 果

1. 付着条件の検討

ウェルに 1.4×10^8 の菌数を加え振盪器に載せ 37°C で一定時間毎に、カバーガラス表面に付着したスピロヘータ数を算定した結果を Fig. 2 に示す。付着菌数は、実験開始後最初の 1 時間で急速に増加したがその後減少した。約 2.5 時間後には最大数の約 20% にまで減少し、その後 5 時間まではほとんど変化しなかった。このことから、以後の付着実験ではインキュベーション時間を 1 時間とした。

スピロヘータ細胞の付着量とウェルに加える菌数との関係を調べた結果を Fig. 3 に示す。ウェル当たりの菌数が 10^7 から 10^9 の範囲では菌数の増加に伴って付着菌数も増加した。付着菌数と付着菌数測定に要する時間を考慮して、以後の実験ではウェルあたり菌数を 10^8 から 3×10^8 とした。

Fig. 3 Relationship between adherence of *T. denticola* ATCC 33520 and the number of spirochetes added to a microplate well after 60 min incubation at 37°C . Mean $\pm$ S.D. of triplicates.

Fig. 4 Effect of pretreatment of *T. denticola* ATCC 33520 with heat on adherence to coverslips. Heating time, 10 min. Mean $\pm$ S.D. of triplicates.

2. 付着に及ぼす温度条件およびコーティング材料の影響

Fig. 4 は、スピロヘータ細胞に対する加熱処理の影響を検討した結果である。濃度調整を行った菌液を 0, 20, 37, 60 および 100°C でそれぞれ 10 分間の温度処理を行った後、 37°C , 60 分間の付

着数を比較すると 0°C から 37°C では付着量については有意の差異は認められず、 60°C 処理で 37°C での付着量の約50%, 100°C 処理で約80%であった。また、濃度調整を行ったスピロヘータを0, 17, 27, 37 および 47°C の温度下で60分間の付着量を比較検討したところ、 37°C における付着菌量を100%とした場合、 0°C で7%, 17°C

で14%, 27°C で29%および 47°C で33%であった。

円形ガラス表面に被覆するラミニンは約 $2 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$ およびフィブロネクチンの濃度と菌体付着の関係を調べた結果をそれぞれ Fig. 5 および Fig. 6 に示した。ラミニンおよびフィブロネクチンはそれぞれ約 $2 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$ および $40 \mu\text{g/ml}$ 以上の被覆濃度で付着菌量が増加した。

Fig. 7 は、フィブロネクチン被覆ガラス表面に

Fig. 5 Adherence of *T. denticola* ATCC 33520 to laminin-coated coverslips after 60 min incubation at 37°C . Forty μl of each concentration of laminin was coated on glass coverslips. Mean $\pm$ S.D. of triplicates.

Fig. 6 Adherence of *T. denticola* ATCC 33520 to fibronectin-coated coverslips after 60 min incubation at 37°C . Forty μl of each concentration of fibronectin was coated on glass cover slips. Mean $\pm$ S.D. of triplicates.

Fig. 7 Scanning electron micrographs showing *T. denticola* ATCC 33520 adhering to the surface of PBS-coated (A) or fibronectin ($20 \mu\text{g/coverslip}$)-coated (B and C) coverslips. Bars, $1.0 \mu\text{m}$.

Fig. 8 Effect of pretreatment of *T. denticola* ATCC 33520 with substrates on adherence to glass coverslips. After 60 min incubation at 37°C. Mean $\pm$ S.D. of triplicates. Asterisks, significantly different from control ($p < 0.001$) by Student's *t* test.

Fig. 9 Adherence of *T. denticola* ATCC 33520 to substrate-coated coverslips after 60 min incubation at 37°C. Forty μ l of each solution (1 mg/ml, or 1:10 dilution) of substrates was coated on glass coverslips. Mean $\pm$ S.D. of triplicates. Asterisks, significantly different from control ($p < 0.001$) by Student's *t* test.

付着した *T. denticola* ATCC 33520 株の走査型電子顕微鏡像である。500 μ g/ml のフィブロネクチン被覆ガラス表面への付着菌体は、対照の PBS 被膜カバーガラス表面に付着している菌体の形態、あるいは付着状態に違いは認められなかった。同一濃度のフィブロネクチン 40 μ l を被覆したガラス標本について、菌体の一端がカバーガラス表面に付着している菌量を位相差顕微鏡下で観察したところ、付着量の 1% 以下であった。

酵素あるいは化学試薬中でスピロヘータ細胞を 37°C, 60 分間の前処理を行い、スピロヘータ菌体のその後の付着にどのような影響を与えるかを検討した結果を Fig. 8 に示す。濃度 500 g/ml のトリプシン、プロテアーゼ K、リパーゼ、リゾチームまた 0.25% のグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、メタ過ヨウ素酸塩は細菌付着量を減少させた。一方、同濃度のメルカプトエタノール処理によって、付着菌量が増加した。

1 mg/ml のコーティング材料または 10 倍希釈した血清で被覆したガラス表面に対する菌体付着量を検討した結果 Fig. 9 を示す。PBS 塗沫標本をコントロールとしたとき、供試したヒトの血清アルブミンおよび卵白アルブミンに対する付着菌量は減少した。Sigma 製品のウシ血清アルブミンでは付着菌量が増加した。ヒト全唾液では、二人については増加、一人については減少した。ヒト血

Fig. 10 Adherence of *T. denticola* ATCC 33520 to the rabbit sera-coated glass coverslips. Forty μ l of diluted preimmune sera (open circles) or the antiserum to the 53-kDa surface protein (closed circles) were mounted on coverslips. A spirochetal suspension was added to each microplate well with D-MEM and a serum-coated coverslip. After 60 min incubation at 37°C. Mean $\pm$ S.D. of triplicates.

清では付着菌量が減少した。一方、胎児ウシ血清、ウシ血清、ウマ血清、Pel-Freez Biologicalsのウサギ血清、コンカナバリンA、VI型コラーゲンでは付着菌量は増加した。一方、Fig. 10に示すごとく、われわれが実験に使用した免疫前ウサギ血清は付着菌量の増加をもたらさなかったが、本菌の被膜に存在する 53 kDa タンパク質に対するウサギ抗血清では、細菌付着量が増加した。

考 察

1. 付着量測定の実験系

T. denticola の付着に関する報告は、付着ないし

吸着の対象とする材料から3種類に大別される。すなわち歯牙表面を予想したハイドロキシapatiteを使用するもの、ガラスを使用するものそして細胞を使用するものである。*T. denticola* の付着実験はハイドロキシapatiteの表面状態が一樣ではなく、光学的に不透明であることからその表面における菌体の存在状態の記載が主な内容となっている²¹⁾。一方、スピロヘータの生細胞への付着を検討した報告は、細胞表面におけるスピロヘータの形態学的特徴を記載したもの^{22,23)}と付着量の評価を行ったもの^{22,24)}がある。付着機序の解明の基本となる付着量を測定する際の問題点の1つは、有核細胞の表面に付着するスピロヘータ数の算定が必ずしも容易でなくその報告は少ない²³⁾。通常のグラム陰性桿菌と異なり、スピロヘータの菌幅は 0.2 μ m 以下でありかつ被膜の難染色性であることからその染色像は不明瞭である。このようなことからスピロヘータの付着量の測定は、放射性同位元素で標識したスピロヘータを使用して行われることがある^{14,24)}。

われわれは、ヒト口腔スピロヘータを供試細菌として、そのガラス表面付着に関する基本的な実験条件を検討した。最初に選択した付着実験系は3つの部分からなっている。すなわち口腔スピロヘータ *T. denticola* ATCC 33520 株と、D-MEM および菌体付着のための固相表面を代表するガラス表面から成立っていた。*T. denticola* は最も容易に分離培養されて偏性嫌気性、運動性、らせん形態を呈するグラム陰性細菌である。本菌はヒト口腔から頻繁に分離培養される菌種であることからその形態学的、生理学的、免疫学的研究が行われている。われわれも、*T. denticola* ATCC 33520株についてその被膜表層に存在する主要抗原タンパク質の研究を行ってきた^{10,11)}。このことから、本実験においてもヒト口腔スピロヘータの代表種として本菌株を供試した。

菌体とガラス表面とを媒介する溶液として D-MEM を使用した理由は、今後スピロヘータの付着対象として細胞を使用することを計画しているからである。*T. denticola* 培養に使用した TYGVS 培地と D-MEM を用いてガラス表面への付着量を静置培養条件で3時間まで比較したところ、前

者は後者の約30%であった。抗生物質であるストレプトマイシンとペニシリンを添加したD-MEMは実験系のスピロヘータの運動を低下せしめたので、上記の2種類の抗生物質を加えないD-MEMを使用した。

スピロヘータの付着面を提供する材料として円形ガラスを使用した。ガラス表面は生細胞の表面とは異なるが、細菌の付着に関するメカニズムの解明にはしばしば使用されているのは、ガラスは物理的に均一であり化学的には安定であることから実験における滅菌処理、染色処理、固定処理あるいは付着菌数測定を行う場合はきわめて有利であるためと考えられる。

2. 付着に及ぼす影響

スピロヘータ *T. denticola* ATCC 33520 株の付着現象は、種々の条件に影響を受けることが示唆された。付着表面との機械的接触を増加させる菌体の固有運動に左右されることが、異なる温度でのインキュベーションで付着量を比較した実験結果からも推定される。本菌が0°Cから17°C, 27°C, 37°Cと温度上昇に伴って付着量も増加した理由の1つは、菌体の固有運動の増加による付着表面との接触頻度の増加によるものであろう。本菌の細胞表層に存在する付着関与物質が、低温下で不可逆的に変化したとは考えられない。なぜならば、菌体を一定時間だけ低温(0°C)処理した後37°Cでの付着能は無処理の場合と違いが認められなかったからである(Fig. 4)。TYGVS培地で対数増殖後期まで培養された *T. denticola* ATCC 33520株はPRAS液で遠心洗浄とそれに続く菌濃度調整を行った後、新鮮D-MEMを入れてあるマイクロプレートウェル内へ加えられ、好気条件下で振盪回転させた。その後の菌体の屈曲運動は徐々に緩慢となり、固有運動は少なくとも3時間後まで位相差顕微鏡下で確認し得た。上述したようにTYGVS培地におけるスピロヘータの固有運動は6時間後まで確認し得た。同条件下における1時間後のスピロヘータ付着量は、TYGVS培地よりD-MEMの方が3倍以上も大であった。したがって、菌体付着に及ぼす効果はスピロヘータの固有運動よりも培地の影響が大きいことが示唆された。また、実験当初のD-MEMのpH値は

7.0であり、1時間後は8.0、2時間後は8.2、3時間後は8.4、4時間後は8.5、24時間後は8.8であった。スピロヘータの付着量が実験開始後約1時間後に最大となったこと(Fig. 2)から、培地のpH増加が付着菌量に直接影響を与えたとは考えられない。

スピロヘータが物体の表面に付着する際、菌体の一端のみで表面に付着する現象は広く観察されており tip binding と呼ばれている^{15,25,26)}。ウェル内に加えた菌数の増加に伴い付着菌数の増加するわれわれの実験系において、フィブロネクチン(10 µg または 40 µg)被覆ガラス表面へのスピロヘータの付着量を検討した実験では、tip binding による付着菌数の比率は付着菌数の1%以下であった。上記の実験系で、ラミニン(250 µg/ml)被覆表面への *T. denticola* ATCC 33520 株の tip binding 率は9%であった。われわれが供試した同じ菌株の *T. denticola* ATCC 33520 株を使用した Dawson ら¹⁵⁾のフィブロネクチン(1 mg/ml)被覆プラスチック表面への付着実験によれば、tip binding 率は約60%であった。同じ *T. denticola* で血清型の異なる2種類のATCC 35405株では42%、35404株では50%の tip binding 率であったという。Dawson らはPBS中でフィブロネクチン被覆プラスチック表面への菌体の tip binding 実験を行っており、また3%ウシ血清アルブミン液で前処理したフィブロネクチン被覆表面を使用している。われわれは10%胎児ウシ血清加D-MEM中で菌体付着を行わせ、かつアルブミン処理を行っていない。これらの差異が細胞由来の接着性タンパク質であるフィブロネクチンや、ラミニンに対するスピロヘータの tip binding にどのような影響を与えるかについて検討が必要であり、これらについては、今後スピロヘータの細胞付着の実験結果に併せて報告するつもりである。

細菌の前処理実験結果から、*T. denticola* ATCC 33520の表層に存在する付着に関連物質がトリプシン、プロテアーゼA、リパーゼあるいはリゾチーム処理で変化を受け、その結果として菌体付着阻害され減少すると推定された。また、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒドあるいは過ヨウ素酸の細胞固定剤は本菌の付着を阻害した。一方、

メルカプトエタノールによる菌体付着の促進作用は興味深い。タンパク質分子中の SS 結合を解離し、SH 基とする作用を有すると考えられている。本試薬は、被膜表層のタンパク質にも同様な変化を起こすと推定しえるが、そのことがなぜ菌体の付着増加に寄与するかについては説明し得ない。

カバーガラス表面に塗布した試薬に対するスピロヘータの付着を検討した実験結果では、卵白あるいはヒト血清アルブミンでは付着を阻害し、ウシ血清アルブミンは付着を促進した。コラーゲンおよびコンカナバリン A に対しても本菌の付着を促進した。菌体の付着に及ぼす効果について、ヒトの全唾液および血清では個体差が認められた。動物血清は、全体として菌体付着を促進したが、動物種や販売元の違いによりその付着促進の程度は異なる傾向を示した。

われわれが *T. denticola* ATCC 33520 の表層タンパク質 53 kDa タンパク質に対する抗血清は、免疫前血清のそれと比較して明らかに本菌の付着に有利に作用した。53 kDa タンパク質が被膜の外表層に分散して存在することがすでに免疫電顕法で知られているので¹¹⁾、同タンパク質抗原と抗体との反応により菌体付着が促進されたと考えら

れる。この抗 53 kDa タンパク質血清による菌体付着促進効果は、同タンパク質が本菌の表面付着に関与していることを示唆する。

結 論

ヒト口腔スピロヘータ *Treponema denticola* ATCC 33520 株の ガラス表面への付着に適する基本的条件を検討した。

1. ガラス表面への付着は、37°C を最適温度とし、菌体を加熱、トリプシン、プロテアーゼ K、リパーゼ、リゾチーム、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒドあるいはメタ過ヨウ素酸塩で前処理することにより減少した。

2. 本菌のメルカプトエタノール前処理で付着量が増加した。また、本菌はフィブロネクチン、ラミニン、VI 型コラーゲン、動物血清あるいは被膜表層タンパク質に対する特異抗血清に対して強い付着能を示した。

本研究の一部は、平成 2 年度宮田研究奨励金 (A) および平成 3 年度東海乳酸研究費により行われた。本要旨は、1991 年 10 月第 33 回歯科基礎医学会総会 (鹿児島大学) で発表した。

抄録：好気条件下、D-MEM と円形ガラスからなる付着実験系においてヒト口腔スピロヘータ *Treponema denticola* ATCC 33520 株の最大付着に要する時間は 1 時間後で、至適温度は 37°C であった。加熱菌体やトリプシン、プロテアーゼ K、リパーゼ、リゾチーム、グルタルアルデヒドあるいはホルムアルデヒドで前処理した菌体の付着量は減少した。フィブロネクチンに付着したスピロヘータを位相差顕微鏡あるいは走査型電子顕微鏡で観察すると菌端での付着は付着菌数の約 1% であった。フィブロネクチン、ラミニン、コンカナバリン A、VI 型コラーゲン、動物血清あるいは本菌の被膜表層タンパク質抗原 (分子サイズ 53 kilodaltons) に対する家兎抗血清で被覆したガラス表面への菌体付着量は増加した。*T. denticola* の付着に関する *in vitro* 実験結果から、本菌の付着が被膜の表層物質およびそれらの状態を修飾する大きな物質により影響を受けることが示唆された。

文 献

- 1) Helderma, W.H.P. : Microbial etiology of periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 8 : 261-281, 1981.
- 2) Wilton, J.M.A., Johnson, N.W., Curtis, M.A., Gollett, I.R., Carman, R.J., Bampton, J.L.M., Griffiths, G.S. and Sterne, J.A.C. : Specific antibody responses to subgingival plaque bacterial as aids to the diagnosis and prognosis of destructive periodontitis. J. Clin. Periodontol. 18 : 1-15, 1991.
- 3) Socarransky, S.S. and Haffajee, A.D. : Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases : a critical assessment. J. Periodont. Res. 26 : 195-212, 1991.
- 4) Weinberg, A and Holt, S.C. : Interaction of *Treponema denticola* TD-4, GM-1, and MS 25 with human gingival fibroblasts. Infect. Immun. 58 : 1720-1729, 1990.
- 5) Listgarten, M.A. : Structure of the microbial flora associated with periodontal health and

- disease in man. A light and electron microscopical study. J. Periodontol. **57** : 1-18, 1976.
- 6) Listgarten, M.A., Mayo, H.E. and Tremblay, R. : Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man : A light and electron microscopic study. J. Periodontol. **46** : 10-26, 1975.
- 7) Lones, S.J. : The tooth surface in periodontal disease. Dent. Pract. **22** : 462-473, 1972.
- 8) Frank, R.M. : Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. J. Periodont. Res. **15** : 563-573, 1980.
- 9) Umemoto, T., Zambon, J.J., Genco, R.J. and Namikawa, I. : Major antigens of human oral spirochetes associated with periodontal disease. Adv. Dent. Res. **2** : 292-296, 1988.
- 10) 梅本利彦, 中村義則, 谷 英樹, 並河 勇 : 口腔スピロヘータ *Treponema denticola* の被膜の微細構造, 特に主要抗原との関連. 歯基礎誌 **33** : 155-165, 1991.
- 11) Umemoto, T., Namikawa, I., Suido, H. and Asai, S. : A major antigen on the outer envelope of a human oral spirochete, *Treponema denticola*. Infect. Immunol. **56** : 2470-2474, 1989.
- 12) Yotis, W.M., Sharma, V.K., Gopalidum, C., Chegini, S., McNulty, J., Hoerman, K., Keene, J. Jr. and Simonson, L.G. : Biochemical properties of the outer membrane of *Treponema denticola*. J. Clin. Microbiol. **29** : 1397-1406, 1991.
- 13) Swanitt, M.A., Radolf, J.D. and Norgaud, M.V. : The 34-kilodalton membrane immunogens of *Treponema pallidum* in a lipoprotein. Infect. Immun. **58** : 384-392, 1991.
- 14) Thomas, D.D., Baseman, J.B. and Alderete, J.F. : Fibronectin mediates *Treponema pallidum* cytoadherence through recognition of fibronectin cell-binding domain. J. Exp. Med. **161** : 514-525, 1985.
- 15) Dawson, J.R. and Ellen, R.P. : Tip-oriented adherence of *Treponema denticola* to fibronectin. Infect. Immun. **58** : 3924-3928, 1990.
- 16) Fitzgerald, T.J. and Repesh, L.A. : Interactions of fibronectin with *Treponema pallidum*. Genitourin. Med. **61** : 147-155, 1985.
- 17) Thomas, D.D., Baseman, J.B. and Alderete, J.F. : Fibronectin tetrapeptide is target for syphilis spirochete cytoadherence. J. Exp. Med. **162** : 1715-1719, 1985.
- 18) Fitzgerald, T.J., Repesh, L.A., Blanco, D.R. and Miller, J.N. : Attachment of *Treponema pallidum* to fibronectin, laminin, collagen IV, and collagen I, and blockage of attachment by immune rabbit IgG. Br. J. Vener. Dis. **60** : 357-363, 1984.
- 19) Alderete, J.F., Freeman-Shade, L. and Baseman, J.B. : Immunodiagnostic test for detection of serum antibody to *Treponema pallidum* (syphilis) : fibronectin as a capture vehicle for treponemal adhesins. J. Immunol. Methods. **84** : 365-373, 1985.
- 20) Haapasalo, M., Singh, U., McBride, B.C. and Uitto, V.-J. : Sulfhydryl-dependent attachment of *Treponema denticola* to laminin and other proteins. Infect. Immun. **59** : 4230-4237, 1991.
- 21) Cimasoni, G. and McBride, B.C. : Adherence of *Treponema denticola* to modified hydroxyapatite. J. Dent. Res. **66** : 1727-1729, 1987.
- 22) Reijntjens, F.M., Mikz, F.H.M., Wolters-Lutgerhorst, J.M.L. : Adherence of oral treponemes and their effect on morphological damage and detachment of epithelial cells *in vitro*. Infect. Immun. **51** : 642-647, 1986.
- 23) Olsen, I. : Attachment of *Treponema denticola* to cultured human epithelial cells. Scand. J. Dent. Res. **92** : 55-63, 1984.
- 24) Thomas, D.D. and Higbie, L.M. : *In vitro* association of leptospirae with host cells. Infect. Immun. **58** : 581-585, 1990.
- 25) Hayes, N.S., Muse, K.E., Collier, A.M. and Baseman, J.B. : Parasitism by virulent *Treponema pallidum* of host cell surfaces. Infect. Immun. **17** : 174-186, 1977.
- 26) Vinh, T., Faine, S. and Adler, B. : Adhesion of leptospirae to mouse fibroblasts (L 929) and its enhancement by specific antibody. J. Med. Microbiol. **18** : 73-85, 1984.