

## 特 別 寄 稿

*S. mutans* の生物学  
—特に齲蝕ワクチンについて—\*

加藤 裕久

岩手医科大学歯学部歯科薬理学講座

(主任 : 加藤 裕久 教授)

(受付 : 2000年6月1日)

(受理 : 2000年6月3日)

## I. はじめに

周知のことであるが、齲蝕は、口腔内に生息する細菌により、歯の硬組織が不可逆的に破壊される疾患である。歯の最表層は、エナメル質といわれる硬組織でできている。一般に、齲蝕は、細菌が産生する酸により、このエナメル質が脱灰することで始まるといわれる。無菌状態の実験動物では、齲蝕は発症せず細菌の関与は間違いないと考えられる。

口腔内に生息する細菌群の中で、ミュータンス連鎖球菌は、齲蝕の主たる原因菌とされ、*S. mutans* (c, e, f型), *S. sobrinus* (d, g型), *S. cricetus* (a型), *S. rattus* (b型), *S. downei* (h型) などから成る<sup>1)</sup> (Table 1)。欧米や日本などの先進諸国において、ヒトの齲蝕病巣から、最も多く分離されるのは *S. mutans* であり大半を占めている。なかでも c 型菌は、全分離菌の70~100%を占めるといわれている。次いで、*S. sobrinus* がヒトから見い出される。a型、b型は、主として、ラットやハムスター等げっ歯類から分離されており、また h 型はサル

Table 1. Mutans streptococci

Species	Serotype	Biotype	GC content (%)
<i>S. cricetus</i>	a	III	42-44%
<i>S. rattus</i>	b	II	41-43%
<i>S. mutans</i>	c, e, f	I	36-38%
<i>S. sobrinus</i>	d, g	IV	44-46%
<i>S. downei</i>	h	IV	41-42%

from *Microbiol. Reviews* 44 : 331-384, 1980.

で見い出されている。しかし、エジプトなどでは、a型、b型も多く分離されているという報告がある。これらの連鎖球菌は動物実験により、強い齲蝕誘発能を有することが証明されている。このような状況から、*S. mutans* 菌の特に c 型がヒトの齲蝕にとって最も重要と考えられ、広く研究されている。

II. 単クローン抗体によるミュータンス連鎖球菌の分類<sup>2-4)</sup>

ミュータンス連鎖球菌の分離には、mitis salivarius (MS) 培地が通常用いられる。コロ

\*岩手医科大学歯学会第25回総会 (1999年12月4日) における特別講演

Biological study of *S. mutans*

—especially about vaccine against dental caries—

Hirohisa KATO

Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University 1-3-27, Chuodori, Morioka, 020-8505, Japan

Table 2. Reactivity of Monoclonal Antibody S3-9

Species	Strain	Serotype	% Reactivity	Species	Strain	Serotype	% Reactivity
<i>S. cricetus</i>	HS1	a	3.6 ± 0.7	<i>S. mutans</i>	MT703	e	104.5 ± 3.9
	E49	a	4.8 ± 1.1		SE17	f	3.7 ± 0.3
<i>S. rattus</i>	FA1	b	4.9 ± 0.6		OMZ65	f	4.0 ± 0.1
	BHT	b	3.7 ± 0.9	MT557	f	3.2 ± 0.1	
<i>S. mutans</i>	Ingbritt	c	3.6 ± 0.6	<i>S. sobrinus</i>	OMZ65	g	3.8 ± 0.1
	MT6R	c	3.7 ± 2.6		6715	g	4.7 ± 0.6
<i>S. sobrinus</i>	OMZ176	d	3.8 ± 0.1	<i>S. downei</i>	KIR	g	4.9 ± 2.2
	MT615R	d	3.7 ± 1.5		MF25	h	3.1 ± 0.5
<i>S. mutans</i>	LM7	e	100.0 ± 1.3	BFe12	h	5.8 ± 1.1	
	P4	e	79.0 ± 12.3	M4-49	h	3.0 ± 1.0	

(modified from *Infect. Immun.* 52 : 628-630, 1986)

Table 3. Inhibition of the precipitin reaction between strain LM7 (type e) antigen and antibody S3-9

Inhibitor (1.75 μmol)	% Inhibition
Glucose	52.0 ± 0.6
Rhamnose	0.0
Galactose	0.0
N-acetylglucosamine	30.2 ± 6.7
α-methyl-D-glucopyranoside	7.5 ± 5.4
β-methyl-D-glucopyranoside	100.0 ± 2.3
Melibiose (Gal α1,6, Glc)	0.0
Maltose (Glc α1,4, Glc)	3.5 ± 1.3
Lactose (Gal β1,4, Glc)	1.8 ± 4.6
Cellobiose (Glc β1,4, Glc)	100.0 ± 1.1

The abbreviation used for galactose and glucose are Gal and Glc, respectively.

(modified from *Infect. Immun.* 52 : 628-630, 1986.)

ニ一上での形態等から推定が付き、通常、糖発酵能など生化学的諸性状を調べ、その後抗血清により血清型別が行われ、菌の同定が行われる。a から h まで 8 つの血清型があるのは前述したが、これらの血清型は細胞壁多糖の構造に基づいており、a 型菌の特異多糖は主としてガラクトース、グルコース、b 型菌は主としてラムノース、ガラクトース、c, e, f 型菌はいずれもグルコース、ラムノース、d, g, h 型菌は主としてガラクトース、グルコースより成ると報告されている。また、各種の型特異抗原に対する抗体の中には、試験管内の系で付着抑制を示すものもあり、これら細胞壁多糖は付着と何らかの関わりがあることが知られている。

以前筆者は、単クローン抗体を用いてミュータンス連鎖球菌の分類を試みたことがあるのでその一部をここで紹介する。単クローン抗体 S3-9 が単離されたが、Table 2 に示すように、全菌体を用いたラジオイムノアッセイにより、*S. mutans* の e 型特異的であることがわかった。従来、タイピングには熱抽出多糖抗原（ランツランダル抗原、PBS 中に懸濁し摂氏120度、30分のオートクレーブ抽出した抗原）を用い、ゲル内沈降反応を利用しており、ラジオイムノアッセイに限らず、この旧法を用いても同様の結果が得られる。従来の抗血清では全菌体を用いたラジオイムノアッセイ、もしくは、酵素免疫測定法では、アッセイ法が鋭敏であり、また

全菌体を用いると余分な交叉反応が多く生じ結果的に十分なタイピングが難しいことが知られている。しかし、単クローン抗体では、抗体が均一なため交叉反応などが少なく抽出の必要もなく、簡便、迅速に測定できることが初めてわかった。

次いで単クローン抗体の結合部位の推定をハプテン阻害実験により行ったところ、抗血清を用いた従来のもより、明確な結果が得られることが判明した (Table 3)。e 型の構成糖は、主としてグルコースとラムノースであるが、単糖としては、そのうちグルコースのみが阻害を示した。 $\beta$ メチルグルコピラシドが特に強く阻害することから $\beta$ 結合のグルコースが抗原決定基の一部をなすと考えられた。2糖体では、 $\beta$ 結合のグルコースダイマーのセロピオースが強い阻害を示し、 $\beta$ 結合のグルコースが結合部位と考えられる。多糖抗原を認識する他の単クローン抗体を用い解析した結果、同様に細胞壁多糖の解析に単クローン抗体が有効であることがわかった。抗血清と違い均一であることから、結合部位など反応の解析が明確にできることがわかった。単クローン抗体としては、ここで示した以外にそれぞれ a 型、b 型特異的なもの、*S. mutans* (c, e, f 型) とのみ反応するもの、*S. sobrinus* (d, g 型) とのみ反応するものなどがとれた。

### III. 齲蝕誘発の機構について

前述のように無菌ラットでは、スクロース含有の齲蝕誘発飼料を与えても、齲蝕発生が全くないことが知られている。ミュータンス連鎖球菌が存在しない SPF (specific pathogen free) 動物でも、齲蝕が生じない。しかるにラットやハムスターにミュータンス連鎖球菌を感染させ、適当な齲蝕誘発飼料を与えると数カ月の短期間のうちに齲蝕を誘発することができる。他の連鎖球菌や乳酸桿菌では、通常有意の齲蝕発生はみられない。

ミュータンス連鎖球菌は、スクロースを基質として非水溶性グルカンを産生する。この生成

には、複数のグルコシルトランスフェラーゼが関与していることが知られ、スクロースからグルコース重合体のグルカンを合成する。非水溶性グルカンは極めて強くガラス表面などに付着する性質があり、歯の表面に強固に付着する。他の口腔連鎖球菌もグルカンを産生するが、水溶性であったり、付着能を示さなかったりである。このように菌体が強固に付着し、食物中の糖質を利用して、専ら酸を産生し歯面を脱灰することが、齲蝕の基本的なパスウェイと考えられている。従ってミュータンス連鎖球菌の病原因子としては、第一にグルコシルトランスフェラーゼがあげられるが、後に述べるように筆者らの研究により、最近スクロース非依存性の付着因子 (Ag I/II もしくは PAc) があることがわかってきた。

### IV. 齲蝕ワクチンについて<sup>5)</sup>

天然痘、黄熱病などでは一度罹患すると、二度かかることはなく、このような疾患の場合は極めて有効なワクチンが期待され、事実これらは、ワクチンで制圧されている。しかし、病原体が明らかになっているものでも、有効なワクチン開発が充分達成されていない場合も多くあり、例えばマラリア、デング出血熱、C 型肝炎、エイズなどがある。エイズでは、病原体であるウィルスの変異が大きな問題となっているのは周知の通りである。また一度罹患すると、二度かかることはない天然痘と比べ、赤痢やマラリアでは、繰り返し何度も感染し、発病する。このような場合ワクチンをどのように考えて開発するか難しいところがあると思われる。

ミュータンス連鎖球菌は常在菌であり、また、口腔内という環境に存在するという特殊性があり、通常のワクチンと異なる状況が存在する。一方で致死性の疾患でなく、そのためワクチンとしても、通常以上に安全性の確認が必要と考えられる。

齲蝕ワクチンとしては、予備的なレポートであるが、1969年 Bowen がサルを用い全菌体を用いたワクチンにより、齲蝕予防が可能である

ことを報告している。次いでレーナーらにより詳細な報告がなされた。その後ミュータンス連鎖球菌の全菌体をワクチン用抗原とした動物実験の成功例が多く報告されている。一方、全菌体を用いた免疫では、人の心筋と交叉反応する危険性が指摘され、これを機会に菌体の一部を免疫源とするコンポーネントワクチンの開発が盛んになった。成功例としては、菌体表層蛋白質抗原 (Ag I/II もしくは PAC) やグルコシルトランスフェラーゼなどがあげられる。

また実験動物を用いて受動免疫による齲蝕予防の試みがなされている。*S. mutans* 全菌体を母親ラットに免疫すると、ミルク、血清中に IgG を主体とする抗体が分泌され、その母親ラットの母乳で育てると対照群に比べて齲蝕発生率が低下すること、またサルを用いた実験で血清から抗体を精製して、別のサルに静注してやると、やはり齲蝕の発生を抑制できたことが報告されている。

一方ヒトにおいても、齲蝕抑制の可能性が実験的に示されている。死菌体の経口投与で、*S. mutans* の定着抑制、またグルコシルトランスフェラーゼの経口投与でも菌の定着抑制があることが報告されている。齲蝕抑制に関しても報告があり、小児245名を対象にした実験で、死菌を経口投与することで、DMFSが42%減少することが知られている。

PACを免疫原として、単クローン抗体 (MAb) をとり、同抗体を用いて、受動免疫を行うやり方が、近年、レーナーら英国のグループによってなされ注目されている<sup>6,7)</sup>。彼等は菌体表層蛋白質抗原 PAC に対するマウス MAb を作製し、サル、ヒトを対象に受動免疫原として用いた。十分な口腔内清掃をした後、唾液で希釈されないように、歯形に合わせて作製したシリコンラバー製の装置に抗体液を入れ、歯肉上に5分間押しあてて抗体を塗布する。結果としてレーナーらは、単クローン抗体によるこのような処理がサルの齲蝕を著しく抑制し、ヒトの口腔内における *S. mutans* 菌数も顕著に抑制できることを報告している。サルの

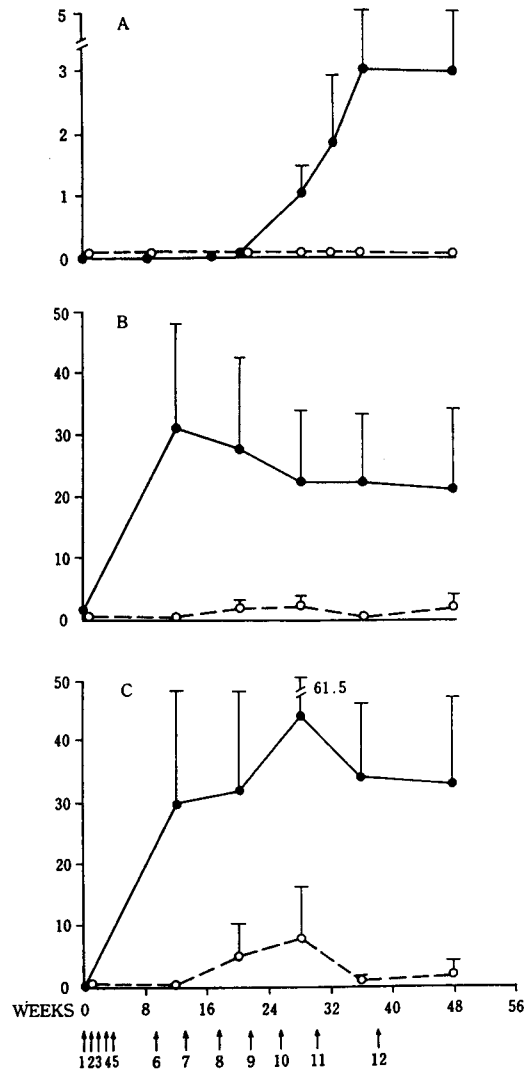


Fig. 1. Effect of local passive immunization with MAb on the caries score (A) and the proportion (as the percentage) of *S. mutans* in fissures (B) and smooth surfaces (C) of teeth in five control animals (●) and four immunized animals (○). (modified from *Infect. Immun.* 50 : 796-799, 1985.)

口腔内に単クローン抗体を12回にわたり前述のように歯面に塗布し、実験開始より56週間齲蝕の発生を観察した結果、顕著な抑制を報告している。同時にサル口腔内の *S. mutans* 菌の菌数の減少も確認している (Fig. 1)。同じ単クローン抗体を用いてヒトには、わずか3回歯面

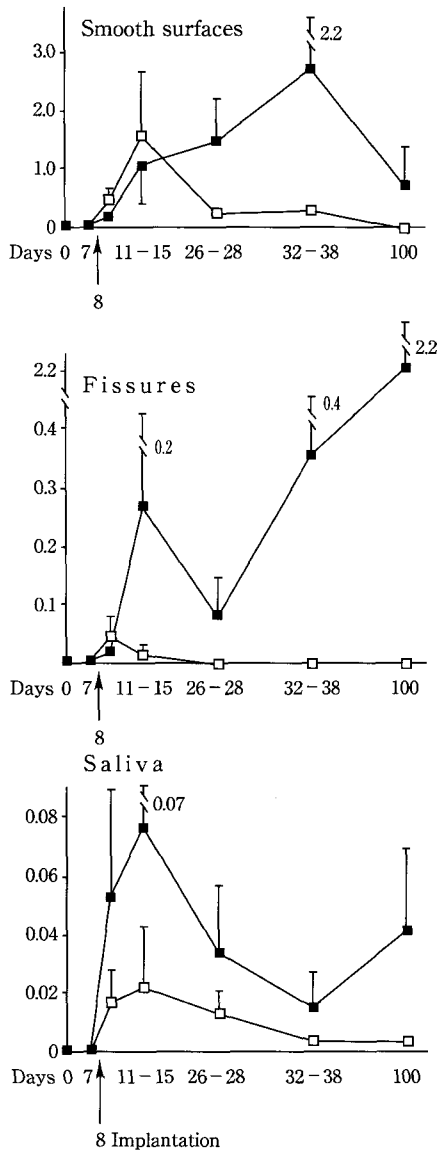


Fig. 2. Proportion of implanted streptomycin-resistant *S. mutans* in smooth surface and fissure plaque and saliva. MAb to Ag I/II was applied to the teeth of four subjects (□), and saline was given to four other subjects (■). (modified from *Infect. Immun.* 55: 1274-1278, 1987.)

に塗布した後、実験開始の8日後 *S. mutans* 菌 K2 株 (c 型) を接種し、その後ヒト口腔内で同菌の菌数が顕著に減少することを見出している (Fig. 2)。

*S. mutans* 全菌で免疫した時、宿主の心筋に

対して交叉反応をする可能性があることは、前述したが、この菌体表層蛋白質抗原を用いた場合も、その抗血清がヒト心筋組織と反応することがわかり、この抗原を直接能動免疫のワクチン原として用いる場合、抗心筋抗体が産生され、副作用が起こる心配も指摘されていた。しかしここで用いられた局所の受身免疫では、このような副作用はないと思われる。同抗原は菌体を効率よく排除する免疫原となることからワクチン原として注目され広く研究されている。心筋との交叉反応を避けるための工夫としてはこのような受動免疫だけでなく、最近では同抗原のごく一部を使ったペプチドワクチンの開発も試みられている。

#### V. 菌体表層蛋白質 PAc の解析<sup>5)</sup>

筆者らは、ワクチン開発並びに前述の蛋白質抗原 PAc の更なる解析のため、同抗原の遺伝子クローニングを試みた。筆者らのグループによって *S. mutans* MT8148 株 (c 型) を用い、PAc をコードとする遺伝子の全塩基配列が初めて決定され、そのアミノ酸配列から PAc 分子の推定構造が考えられた (Fig. 3)。

PAc は、4695 塩基対からなり、これは 1565 個のアミノ酸残基からなる分子量 17 万 773 のポリペプチドに対応する。アミノ末端側の 38 個のアミノ酸残基はシグナルペプチド領域と考えられている。カルボキシル末端はこの蛋白質を細胞表面にとどめておくための領域と考えられ、細胞壁貫通領域 (残基番号 1490~1539)、細胞膜貫通領域 (残基番号 1540~1560) 及び極性尾部 (残基番号 1561~1565) と推定される。PAc には 2 箇所繰り返し構造を示す部位があり、それぞれ、N 末に近い方を A リピード、C 末に近い方を P リピードとよぶ。A リピードは約 250 個のアミノ酸からなり、アラニンが全体の 32% を占めている。またこの領域を含むかなり広範囲の部分はコンピューター解析により、 $\alpha$ -ヘリックス構造をとっていると推定される。その場合、この部分は直線的な単純な構造をしているのではないかと考えられる。一方、P リピー

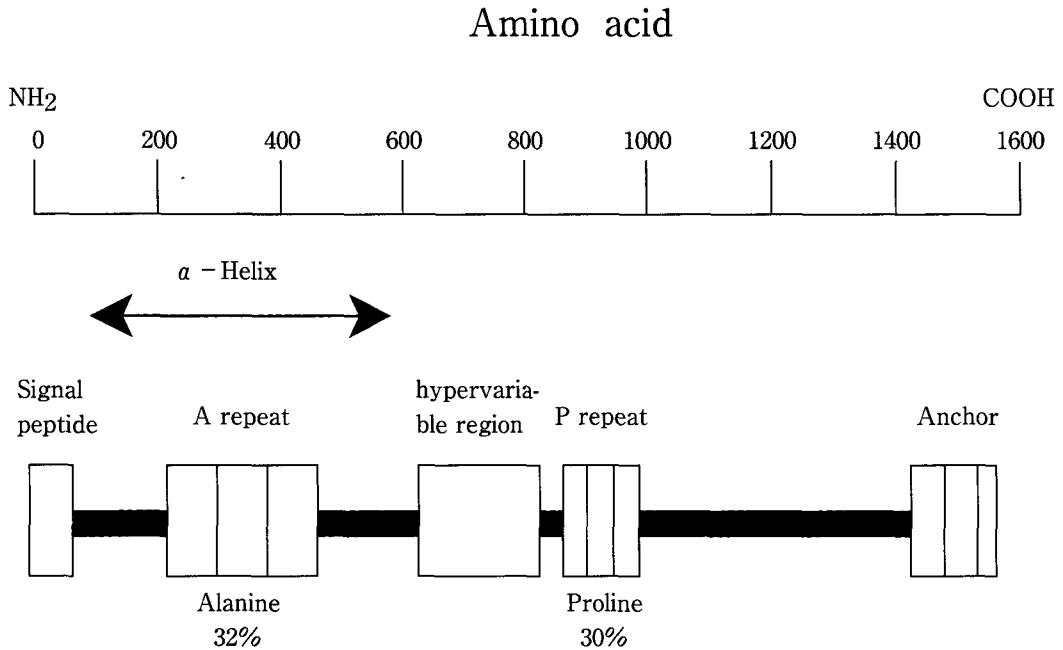


Fig. 3. Putative structure of PAC.

Table 4. Biological Roles of PAC

Strains	Cell bound PAC	Hydrophobicity (%)	agglutination by saliva	Adhered cell No. (x10 <sup>6</sup> )
MT8148	+	27.2±2.1	+	3.58±0.69
PACem-2	-	1.2±1.0	-	0.91±0.08
PACem-3	-	3.3±0.7	-	0.85±0.11
GS-5	-	1.2±0.7	-	1.49±0.17
TK15	+	46.1±2.2	+	6.44±1.31
TK18	+	32.2±3.1	+	6.42±1.08

トはプロリンが全アミノ酸の30%を占めている。

さらに同蛋白質の機能解析をするため、遺伝子操作の技術を用い、当該蛋白質の欠失変異株の作製を試みた。クローン化した *pac* 遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入したものを *S. mutans* MT8148株に形質転換法で挿入し、親株染色体上の *pac* 遺伝子との間で相同組み換えを起こさせることにより、*pac* 変異体 PACem 2株および PACem 3株の2株が作製できた。また *S. mutans* GS5株は同菌種の標準株の一つであるが、PACを合成するもの同

modified from *Infect. Immun.* 58 : 289-296, 1990.

蛋白質を細胞壁に保持結合しにくく、菌体外に遊離する菌株である。後の解析により、PAC分子のC末を欠損していることが判明している。

これら菌株について、ヒト唾液による菌体凝集能、菌体疎水性、特に、全菌体の唾液被覆ハイドロキシアパタイトへの吸着能などについて調べてみた (Table 4)。その結果親株 MT8148株に比べ、同蛋白質を欠失した変異株は2株とも唾液被覆ハイドロキシアパタイトへの吸着能が顕著に低下していた。PACを細胞壁に保持、結合しにくいGS5株でも同様に唾液被覆ハイドロキシアパタイトへの吸着能が低下してい

た。TK15株、TK18株はGS 5株に pac 遺伝子を導入して、細胞壁結合型の PAc を産生できるようにした株であるが、この2株では唾液被覆ハイドロキシapatiteへの吸着能は回復した。吸着能と平行して、菌体疎水性も変化した。また、細胞壁結合型の PAc を産生できない欠失株はすべて、唾液によって菌体が凝集しなくなった。PAc は、ペリクル中の唾液成分との疎水結合を介した歯面への吸着に関与していると推察される。

筆者はその後、別の分野に移ったため、この分野の研究を中断したが、この種の研究はいろいろなグループにより深められ多くの結果が出されている。結果を総合していうと、A リピートを含む広い領域は、唾液と相互作用する活性があること、P リピートを含む領域には唾液と相互作用する活性、唾液被覆ハイドロキシapatiteへの吸着能を有することが示唆されている。このように反復配列を持つ2つの領域は、生物活性と関連する部位かもしれない。

PAc 様蛋白質は、抗血清による交叉反応などから、ミュータンス連鎖球菌のうち b 型を除くすべての菌種に見出されている。また他の口腔連鎖球菌、例えば *S. gordonii* では、SSP 5 とよばれる類似の蛋白質があるほか、*S. intermedius*、*S. oralis* にも存在するといわれる。

## VI. その後の解析<sup>8)</sup>

再び PAc の解析をする機会があり、筆者らのグループは2、3の知見を得たので、ごく最近の結果として紹介する。まず、唾液中のどのような成分と PAc が結合しているかということではいろいろ試みた結果、唾液中のリゾチムと結合することがわかった。アグルチニンと結合することが他のグループにより報告されており、PAc と結合する唾液成分は単独でないと考えられる。

また泉福らの報告によると、PAc 残基 N 末から数えて365-377 (A リピート中に存在、Fig. 4 b) のペプチドを抗原として作製された抗体は唾液と PAc の結合を阻害し、かつこの

ペプチドが阻害抗体を産生する最小ペプチドであることがわかった。

この抗体の阻害様式をさらに解析するため、10個の単クローン抗体を作製した。ペプチドの配列は TYEAALKQYEADL で13残基でこの中に T 細胞エピトープを有しているが、この N 末から、1残基ずつバリンもしくはグリシンで置換したペプチドを数多く合成し、これらのペプチドを用い、単クローン抗体による抗原抗体反応を阻害してみた。阻害パターンはほとんど同じで抗原決定基は、同ペプチドの2つの Y と少し弱いが、中央の L であることがわかった。Fig. 4 は、A リピートであるが、この領域は主に3つの長い繰り返し配列からなる。また各繰り返し配列中に、下線で示したように、2つの短い繰り返し配列がある。このような繰り返し配列のため、365-377のペプチドと類似した配列が計10箇所あることがわかった (Fig. 4, 網かけ部分)。10個の類似配列のすべてで、2つの Y と1つの L が保存されており、これら10個のペプチドと各単クローン抗体との交叉反応を調べると、抗体の何割かは、これら類似配列とかなり強い交叉反応を示した。以上から、この阻害抗体は、A リピート中に散らばる何個かの類似配列と結合し唾液と PAc の結合を阻害するのではないかと考えられる。またこの領域は  $\alpha$  ラセンをなすと思われる領域で、 $\alpha$  ラセンモデルに従いアミノ酸残基を配置すると、2つの Y と1つの L が  $\alpha$  ラセンの片側に集まり近接した位置に配置されることがわかり、推測であるが、 $\alpha$  ラセン構造を支持するデータとなった。

## VII. TGF $\beta$ に関する研究<sup>9,10)</sup>

前項までは、齶蝕に関する研究とその分野のレビューであるが、それとは別に、TGF $\beta$  関連の仕事があるので簡略に紹介する。TGF $\beta$  は現在、様々な活性を有するサイトカインということがわかり、個体発生の際、形態形成に関わったり、また、生体では、骨質中にも多く含まれ、骨形成に関わることが示唆されている。一

## (A) The sequence of the A region of the PAC molecule

pre (194-218) ANAASKTAYEAKLAQYQADLAADVQK  
 A1 (219-300) TNAANQAAAYQKALAAAYQAELEKRVQEAANAAKAAAYDTAVAANNAKNTETIAAANEEIRKRNATAKAFYETKLAQYQAELEKRVQE  
 A2 (301-382) ANAANEADYQAKLTAYQTELEARVOKANADAKATYEAAVAANNAKNAALTAENTAIKQRNENAKATYEAALKOYEADLAADVQK  
 A3 (383-464) ANAANEADYQAKLTAYQTELEARVOKANADAKAAYEAAVAANNAANAALTAENTAIKQRNADAKADYEAKLAKYQADLAKYQK  
 Post(465-480) ---DLADYVPVKLKAYEDEQ

## (B) Sequences homologous to that of unit peptide, PAC (365-377)

Sequence	Amino acid position	Homology(%)
AYEAKLAQYQADL	(pre:201-213)	69.2
AYQKALAAAYQAELE	(A1:226-238)	46.1
EYETKLAQYQAELE	(A1:283-295)	53.8
DYQAKLTAYQTELE	(A2:308-320)	38.5
TYEAALKOYEADL	(A2:365-377)	100
DYQAKLTAYQTELE	(A3:390-402)	38.5
DYEAKLAKYQADL	(A3:447-459)	61.5
KYQADLAKYQKDL	(454-466)	46.1
KYQKDLADYVPVKL	(461-473)	30.7
DYVPVKLKAYEDEQ	(post:468-480)	38.5

Fig. 4. A region of PAC. (A) The amino acid sequence of the A region of PAC. A 1-3 denote the long repeating sequences in the A region. Both 'pre' and 'post' mean the incomplete repeating sequence around A 1-3. Underlined sequences represent the short repeating sequences found in the long repeating sequences. The shaded area indicates the sequences homologous to that of unit peptide (PAC, 365-377) or unit peptide itself. The numbers in parentheses indicate the amino acid position in PAC. (B) Sequences homologous to that of unit peptide in the A region. Two tyrosine residues in unit peptide were identified as core B cell epitopes of the antisera raised by unit peptide. Corresponding tyrosine residues are shaded in the homologous sequences. Each sequence is composed of two short repeats. (modified from *Oral Microbiol. Immunol.* 14 : 213-219, 1999.)

Table 5. Biological Roles of PAC

Cell	Treatment	doubling time (hr)	Saturation density (10 <sup>4</sup> cells / well)
A549	None	19.2	68.1
	MP2	19.8	49.8
	TGFβ1	31.7	31.5
	BMP2+TGFβ1	32.4	29.8
CHO-K1	None	15.3	64.2
	8-bromo-cAMP	19.8	39.8

Population doubling times of cells were calculated over a 48 h period corresponding to the logarithmic phase of growth. (modified from *Oncology reports* 5 : 1137-1140, 1980.)

方, 上皮系の細胞に対し強い増殖阻害作用を持ち (Table 5), この作用は癌化とも関わりを持つことが示唆されている。この増殖阻害機構が不明であると一時話題になったことがあり筆者らも解析した。

TGFβはヒト由来肺癌細胞 A549に作用させると, 強い増殖阻害作用を示すが, 同時に細胞が細長くなり線維芽細胞状となり扁平化するこ

とが観察された。cAMP 誘導体を CHOKI 細胞等に作用させると同様の現象がみられ, 同時に癌細胞特有の表現形質が低下し, 正常細胞に近い状態となることが観察され, 再分化とか, リバーストランスフォーメーションとか呼ばれている。TGFβも類似のことがあるのではないかと考え調べた。Table 5では, TGFβによる増殖阻害の様子を細胞数倍加時間で比較して表し



**Table 6.** Effects of the members of TGF $\beta$  super family on the anchorage independent cell growth

Treatment	Number of colony	Inhibition (%)
None	1012	0
Activin A	561	44.6
BMP2	154	84.8
TGF $\beta$ 1	30.5	97.0
TGF $\beta$ 1+BMP2	7.5	99.3

(modified from *Oncology reports* 5 : 1137-1140, 1980.)

た。CHOKI 細胞に対する cAMP 誘導体の増殖阻害効果も比較のために合わせ示した。

Table 6 は軟寒天培地上での生育状況であるが、癌細胞は軟寒天培地上で生育するのに比し、正常細胞は生育しない。TGF $\beta$  を作用させるとコロニー形成は大きく阻害され、同じ TGF $\beta$  スーパーファミリーに属す BMP (骨形成因子) でも弱いながら阻害がみられた。TGF $\beta$  と BMP を同時に加えると一番強い阻害作用が観察できた。

ストレスファイバーはアクチンの重合体で、マイクロフィラメントとも呼ばれ、細胞の運動性や形態形成と関係があると考えられている。癌細胞では、ストレスファイバーは、あまり認められず、一方、培養正常細胞では、よく発達していることが報告されている。A549細胞に TGF $\beta$  を処理することでストレスファイバーの増強がみられ、この点でも正常培養細胞の状態に近いことが観察された。BMP と TGF $\beta$  を共存させるとさらなるストレスファイバーの増強が観察され (Table 7)、軟寒天培地上でコロニー形成を阻害する程度とストレスファイバー形成の程度がよく相関していた。

その他、細胞の形態形成などに関与するといわれる膜タンパク質のトロポミオシンの発現をウェスタンブロット法で観察したが、ここでも TGF $\beta$  処理により正常細胞で認められるアイソタイプの発現パターンに近づくことがわかった。結論として、TGF $\beta$  により、再分化と類似の現象が起り、その結果として、細胞増殖が

**Table 7.** Effects of cytokines on the development of stress fiber

Treatment	growth inhibition	stress fiber
None	control	-
activin A	-	-
BMP2	+	+
TGF $\beta$ 1	++	++
BMP2+TGF $\beta$ 1	+++	+++

阻害されていると考えられた。

## 文 献

- 1) Hamada, S., and Slade, H.D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44 : 331-384, 1980.
- 2) Kato, H., Ota, F., Fukui, K., and Yagawa, K.: Monoclonal antibody to *Streptococcus mutans* type e cell wall polysaccharide antigen. *Infect. Immun.* 52 : 628-630, 1986.
- 3) Ota, F., Kato, H., and Fukui, K.: Immunological study of cross-reactive polysaccharide antigens (types a, d, and h) of oral *Streptococcus* spp. with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 55 : 266-268, 1987.
- 4) 加藤裕久, 太田房雄, 長宗秀明, 福井公明: 単クローン抗体を用いた *Streptococcus mutans* の研究. *微生物*, 4:252-259, 1988.
- 5) 武笠英彦監修, 今井奨, 西沢俊樹, 花田信弘, 福島和雄編: う蝕細菌の分子生物学, 研究の成果と展望, クインテッセンス社, 1997.
- 6) Lehner, T., Caldwell J., and 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.
- 7) Ma, J. K. -C., Smith, R., and Lehner, T.: Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 55 : 1274-1278, 1987.
- 8) Kato, H., Takeuchi, H., Oishi, Y., Senpuku, H., Hanada, N., and Nisizawa, T.: The immunogenicity of various peptide antigens inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 14 : 213-219, 1999.
- 9) Tada, A., Kato, H., Takenaga, K., and Hasegawa, S.: Transforming growth factor b 1 increases the expression of high-molecular weight

tropomyosin isoforms and vinculin and suppresses the transformed phenotypes in human lung carcinoma cells. *Cancer letter* 121 : 31-37, 1997.

- 10) Tada, A., Kato, H., Nishihara, T., and Hasegawa, S. : Bone morphogenetic protein 2 suppresses the transformed phenotype and restores actin microfilaments of human lung carcinoma A549 cells. *Oncology Reports* 5 : 1137-1140, 1998.