原 著

バクテリオシン産生能および平滑面付着能をもつ

Streptococcus mutans のスクリーニング

小野喜美子* 岸本悦央** 森岡俊夫*

概要: *Streptococcus mutans* の野生株に拮抗し得る齲蝕原性の低い変異株を分離するため、バクテリオシン活性を持ち、壁付着性も高い菌株を研究室保存菌株中より検索した。*S. mutans* の全ての被検菌株が *S. sanguis* および *S. faecalis* の成育を阻害した。中でも、*S. mutans* P2, C67-1, B14 および OMZ 175 は多くの *S. mutans* 株に対してバクテリオシン様活性を示した。その4株の中で、*S. mutans* B14 株は十分なガラス壁付着能を持ち、高い齲蝕原性を持つ *S. mutans* K1-R 株と同じ程度ハムスター口腔内に定着した。

S. mutans B14株は Todd-Hewitt および trypticase soy yeast extract 寒天培地でバクテリオシンを産生するが、brain heart infusion および trypticase soy 寒天培地では産生が認められなかった。液体培養において、寒天、酵母エキスおよびスターチの様な安定化剤は僅かなバクテリオシン産生促進効果しか示さなかった。

S. mutans B14 株が産生するバクテリオシンは熱安定性であり、プロテアーゼには感受性を示すが、DNase, RNase およびカタラーゼには非感受性であった。透析およびゲル濾過の結果は、バクテリオシンの分子量が1,000~3,500の間であること、また、バクテリオシンの分子は相互に或いは培地質と凝集している可能性を示唆した。

索引用語: バクテリオシン, ストレプトコッカス・ミュータンス, 付着, 齲蝕

結 言

ヒトや啮歯類の齲蝕発生に最も重要な役割を果たす菌は *Streptococcus mutans* である¹⁾。この *S. mutans* を歯垢中より何らかの方法で除去できれば齲蝕を抑制することも可能となる。近年、この目的で、壁付着能を保有し、かつ齲蝕原性の低い変異株を分離して、それら変異株が野生株の口腔への定着を阻害すること、或いは野生株と拮抗して駆逐することの可能性について、検討が試みられている²⁻⁵⁾。これまでのところ、このような変異株を事前に口腔内に定着させておくことと野生株の感染が成立するのに必要とする菌量の閾値を上昇させ得ることが動

物実験で明らかにされている^{3,4)}。しかし、野生株との共存下において、歯垢より野生株を駆逐し得るような齲蝕原性が低くかつ定着性の高い変異株は報告されていない。通常、口腔内には *S. mutans* が存在する場合が多いために、歯垢構成細菌である *S. mutans* を口腔内より除くためには、野生株に対する拮抗能を持った変異株を得る必要がある。

ところで、バクテリオシンは、同属・同種の細菌のみ特異的に致死させることが知られているが、*S. mutans* にもバクテリオシンを産生するものが多い¹⁾。様々な要因を含む口腔環境下で、産生されたバクテリオシンが歯垢の構成細菌叢にどのような影響を及ぼしているかにつ

* 九州大学歯学部予防歯科学講座 (主任: 森岡俊夫教授)

** 現在: 岡山大学歯学部予防歯科学講座

* Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Kyushu University (Director: Prof. Toshio MORIOKA)

** Present Address: Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Okayama University.
昭和59年3月2日受付

いては興味を持たれている¹⁾。Rogers らはラット歯垢中においてバクテリオシン産生株が非産生変異株に比べて優勢になり得ること²⁾、またバクテリオシン産生株はこれに感受性をもつ *Actinomyces viscosus* の定着を抑制すること³⁾を示している。Ikeda ら⁴⁾は *S. mutans* C 3603株が産生するバクテリオシンを精製し、その精製バクテリオシンをラットに投与すると部分的ながら齲蝕発生が抑制されることを示した。これらの結果は産生されたバクテリオシンが歯垢生態系に何らかの役割を果たしていることを示唆するものである。

本研究は高齲蝕原性野生株と十分に拮抗し得る低齲蝕原性変異株を分離するための前段階として、*S. mutans* 保存菌株を用いて、バクテリオシン産生能および歯面への付着能を保有する菌株の検索を行なったものである。また、それらの菌株の中で、*S. mutans* B14株の産生したバクテリオシンの性状等についても検討したので併せて報告する。

材料ならびに方法

供試菌：当教室保存菌株より *S. mutans* については HS-6, FA-1, BHT, GS-5, Ingbritt, P2, C67-1, OMZ 176, LM7, P4, B14, OMZ 175, MT 3940, OMZ 65, K1-R, AHT, 6715 の合計17株を、また、*Streptococcus sanguis* については、OMZ9, ATCC 10556, ATCC 10558の合計3株を用いた。さらに、*Streptococcus faecalis* ODU 株も供試した。

培地：バクテリオシン活性検出用培地としては、Todd-Hewitt プロス (Difco Laboratories, Detroit) に寒天を添加したもの（以下、TH 寒天と略す）を使用した。また、バクテリオシン産生に対する培地の影響をみるために、trypticase soy プロス (BBL, Cockeysville) に寒天を添加したもの（以下、TS 寒天と略す）、0.5% 酵母エキス (Difco) を含む trypticase soy プロスに寒天を添加したもの（以下、TSY 寒天と略す）、brain heart infusion プロス (BBL) に寒天を添加したもの（以下、BHI 寒天と略す）をそれぞれ使用した。使用菌株の保存には、*S. mutans* BHT, *S. mutans* OMZ 175および *S. faecalis* ODU 3株については TS 斜面寒天培地を、その他の菌株はすべて BHI 斜面寒天培地を用い、培養後 4°C で保存した。継代培養は1カ月毎に行なった。

バクテリオシン産生菌のスクリーニング：バクテリオシン産生は Fredericq の方法⁵⁾に準拠して調べた。1.5 %寒天平板25ml に、BHI プロスで一夜培養した菌を

穿刺し、37°C で48時間、90% N₂, 5% CO₂, 5% H₂ 混合ガスを導入した嫌気培養装置（平沢製作所、東京）内で静置培養を行なった後、あらかじめ24時間培養した指示菌0.15ml を0.6%軟寒天 4 ml とともに重層し、さらに、24時間培養を行なった。その結果、穿刺菌の周囲に生じた阻止帯の直径を計測し、それをバクテリオシン活性とした。

穿刺菌の周囲に生じた阻止帯がバクテリオシンによるものであることを確かめるために、終末濃度 1 ~ 2 mg/ml のプロテアーゼ (pronase P, 750,000コロジン単位/g, 科研化学、東京) を軟寒天に添加して活性の消失を調べた。プロテアーゼ処理により阻止帯の形成が消失したもののみをバクテリオシン産生株とした。

ガラス壁付着能および多糖合成能：5%シュークロース含有 BHI プロス10ml が入った試験管に前培養した菌液0.1ml を接種し、ほぼ垂直ないしは15度に傾斜させ、37°C で48時間嫌気的に静置培養を行ない、試験管壁への付着状況を観察し、多量の付着のあるものを(++)、少量付着ありを(+)、付着なしを(-)とし、この基準により判定を行なった。次に、ガラス壁に付着した多糖をガラス棒で十分に剝離回収し、さらに壁面を 3 ml の蒸留水で洗浄して集めた液を11,000×g で15分間遠沈した。特記しない限り、以下の遠沈はすべてこの条件で行なった。得られた不溶性グルカン画分である沈査を一回洗浄後、2 ml の蒸留水を加え超音波処理により十分に拡散させた。他方、得られた上清に最終濃度50%となるように100%エタノールを加え、4°C で一夜静置後遠沈後エタノールで一回洗浄し、得られた水溶性画分を 2 ml の蒸留水に懸濁した。これらを適当に希釈した後、アントロン硫酸法¹⁰⁾で定量した。

ハムスター口腔内への定着能：*S. mutans* B14 株より、バクテリオシン産生能およびガラス壁付着能に変化のないストレプトマイシン耐性 (1 mg/ml) 自然突然変異株 (B14-R2) を分離し、実験に供した。

離乳後の雄性ゴールデン・ハムスターを5あるいは6匹ずつ3群に分け、第一群に *S. mutans* B14-R2 株、第二群に *S. mutans* K1-R 株の一夜培養液の0.2ml を頰嚢中に各々2回接種し、第三群はコントロールとして菌を接種しなかった。実験期間を通じて、齲蝕誘発性飼料 diet 2000 (Keyes and Jordan, 1964)¹¹⁾ と脱イオン水を自由に与え、54日間飼育した。接種菌の定着の有無は9、16および43日目に、各群任意の3匹の動物について、滅菌小綿棒で上顎右側臼歯の頰面から歯垢を採取し、滅菌生理食塩水中に投入し、1分間攪拌した。適当

に希釈した後、その0.1ml を1 mg/ml ストレプトマイシン含有 Mitis-salivarius 寒天平板 (Difco, MS⁺ plate), Mitis-salivarius 寒天平板 (MS⁻ plate) に播種し、嫌気条件下にて2日間培養後、コロニー数を算定した。MS⁺ plate 上の菌数を接種株の菌数とし、MS⁻ plate 上の菌数を全連鎖球菌数として、全連鎖球菌数に対する接種菌株の占める比率を求めた。また、実験最終日 (54日目) には動物をエーテル麻酔下で屠殺後、下顎右側臼歯部を剔出し、生理食塩水中に投入して30秒間超音波処理を行なった。得られた歯垢懸濁液は同様に MS⁻ plate, MS⁺ plate に播種し、全連鎖球菌数に対する接種菌株の占める比率を求めた。

液体培地でのバクテリオシン産生：穿刺培養法で最も強い活性を得た TH プロスに0.1%寒天、0.7%スターチ或いは4%酵母エキスを添加したもの、および無添加の4種類についてバクテリオシン産生を調べた。各々2 l の培地に一夜培養液 40 ml を加え嫌氣的に 37°C、48時

間培養後18,000×g、15分間遠心した。上清の一部を採り、残りは60%硫酸飽和で塩析し、4°C に1時間静置後18,000×g、20分間遠心し沈渣を得た。100倍濃縮液となるよう0.05M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) を加え懸濁液とした。活性測定法としては、punch hole 法¹²⁻¹³⁾と滴下法⁹⁾を併用した。すなわち、寒天平板表面に一夜培養した指示菌 *S. sanguis* OMZ9 を軟寒天によって均等に拡げ乾燥させた後、前者については直径6 mm の穴を開け、その中に上清或いは100倍濃縮液50 μ l を注入し、後者については試料20 μ l を軟寒天上に滴下し、さらに18時間培養後阻止帯の有無を判定した。阻止帯がバクテリオシン以外のものによる可能性を調べるために試料を pronase (2 mg/ml) で37°C、30分間反応させた後、100°C、10分間加熱して pronase を失活させ、同様に活性測定を行なった。

S. mutans B14株の産生するバクテリオシンの性状：性状は Kelstrup と Gibbons の方法¹⁴⁾に準拠した。まず

Table 1 Bacteriocinogenicity and adhesive ability of *Streptococcus mutans*

Producer	Inhibition zone (mm)																					Adher-
strain*	Indicator strain*																					ence**
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	X					ND	ND***				ND						ND					+
2		X				ND	ND		8	13	ND	12	25				ND	25	25	9	30	+
3			X			ND	ND				ND			3			ND	20	20	24	23	—
4				X		ND	ND		5	18	ND	15	25				ND	28	28	14	30	—
5		5			X	ND	ND				ND						ND	15	15	15	3	+
6	6	4	5			X	4	3	3	6	5	4	3	4	4		4	13	7	8	7	+
7	6	12	5		6	3	X	10	6	4	6	5	10				10	27	20	33	15	+
8		5				ND	ND	X			ND						ND	5	5	3	3	+
9		9				ND	ND		X		ND		10				ND	13	5	3	5	+
10		7	3	12	8	ND	ND			X	ND		7				ND		3	10	3	+
11	12	18	13	7	12	16	10	12	4	8	X	11	14	12	12	14	9	24	20	22	20	+
12	15	21	21	22	22	13	6	13	5	3		X	8	10	8	13	9	25	20	20	22	—
13		7	10			ND	ND				ND	2	X				ND		3		3	+
14						ND	ND				ND			X			ND				5	†
15						ND	ND				ND				X		ND				5	†
16						ND	ND				ND					X	ND	5	5	3		†
17						ND	ND				ND						X	4	5	3		†

* Numbers in the table indicate the following strains: *S. mutans* HS-6 (1), FA-1 (2), BHT (3), GS-5 (4), IB (5), P2 (6), C67-1 (7), OMZ176 (8), LM7 (9), P4 (10), B14 (11), OMZ175 (12), MT 3940 (13), OMZ 65 (14), K1-R (15), AHT (16), 6715 (17), *S. sanguis* OMZ9 (18), ATCC10556 (19), ATCC10558 (20), and *S. faecalis* ODU (21).

** Adherence on a smooth glass surface was evaluated according to the following standard: a large deposit (+), a small deposit (+), no deposit (-).

*** Not determined.

S. mutans B14 株を TH 寒天平板上に穿刺し48時間培養した。菌が生育した部位の上に1%酵素液 (pronase P, DNase, RNase および catalase) を滴下し乾燥させた後、指示菌含有軟寒天を重層し、さらに24時間培養後、阻止帯の有無を判定した。また穿刺培養した basal agar 上にスペクトロポア透析膜 (分画分子量3,500あるいは1,000, Spectrum Medical Industries, Los Angeles, Calif.) を置き、その上から指示菌を含む軟寒天を重層し、24時間培養後阻止帯の有無を判定した。更にバクテリオシンの熱に対する安定性を調べるために100倍濃縮液を37°C, 60°C および100°C でそれぞれ10, 20および30分間加熱した。また121°C, 15分オートクレーブをも行なった。得られた試料を punch hole 法および滴下法により活性を測定した。

結 果

バクテリオシン産生能および壁付着能：本実験に供した *S. mutans* は殆どどの株が *S. sanguis* および *S. faecalis* に対してバクテリオシン様活性を示した。一方、*S. mutans* 株に対して活性を示す株は限定され、P2, C67-1, B14, OMZ175 は多数の菌に対して作用を示したが、FA-1, BHT, GS-5, IB, OMZ176, LM7, P4, MT3940は数種の菌にのみ作用した。HS-6, OMZ 65, KI-R, AHT, 6715は *S. mutans* に対してはバクテリオシン活性を示さなかった (Table 1)。ガラス壁付着能に関しては BHT, GS-5, OMZ175に付着能が認められなかった。

S. mutans B14 株のバクテリオシン産生に及ぼす培地の影響：先の結果に基づいて、壁付着能を持ちかつ広範囲の *S. mutans* 株 (特に高い耐酸原性を示す KI-R, AHT) にバクテリオシン活性を示す株として B14 株が選定され、そのバクテリオシン産生に及ぼす培地の影響を検討した。Table 2に示すように TH 寒天培地で最も高い活性を示し、次いで TSY 寒天培地で活性を示したが、TS, BHI の各寒天培地では活性が認められなかった。従って、以下の液体培養および活性測定には TH 培地を用いた。

S. mutans B14 株の多糖合成能およびハムスター歯垢中への定着能：B14 株の不溶性多糖の合成量は AHT 株や KI-R 株と同水準であったが、総多糖合成量に占める不溶性多糖の比率は両株よりも劣っていた (Table 3)。一方、B14 株がハムスター口腔中に接種された場合の定着能は KI-R 株とほぼ同じであった (Table 4)。

S. mutans B14 株の培養液中でのバクテリオシン産

Table 2 Effect of culture medium on the production of bacteriocin by *S. mutans* B14

Indicator strain	Inhibition zone (mm)			
	TH	TSY	TS	BHI
<i>S. mutans</i>				
HS-6 (a)*	30 S**	24 S	—	—
BHT (b)	40 S	26 S	—	—
IB (c)	37 S	29 S	—	—
OMZ176 (d)	24 S	23 S	—	—
LM7 (e)	10 H***	5 H	—	—
MT3940 (f)	7 H	15 H	—	—
KI-R (g)	12 H	12 S	—	—
<i>S. sanguis</i>				
OMZ9	50 S	35 S	—	—
<i>S. faecalis</i>				
ODU	40 S	32 S	—	—

* Sero type (see reference 5.)

** Inhibition zone with sharp edges.

*** Inhibition zone with hazy edges.

Table 3 Glucan synthesis of *S. mutans* B14

Strain	Synthesis of glucan (mg of glucose/ml of culture)			
	WSG*1	WIG*2	WSG + WIG	WIG / WSG + WIG
<i>S. mutans</i>				
B14	15.61	6.34	21.95	28.9%
AHT	2.68	4.63	7.31	63.3%
KI-R	3.29	5.00	8.29	60.3%

*1 Water-soluble glucan

*2 Water-insoluble glucan

生に対する添加物の影響：寒天、スターチ、酵母エキスの3種の添加物を TH プロスに加えても培養上清はバクテリオシン活性を示し得なかった。60%硫酸飽和により塩析し、100倍濃縮液とした粗バクテリオシン溶液で活性が認められるようになった。100倍、50倍、25倍濃縮液で活性を調べたところ50倍迄は活性が認められた。3種の添加物のうち寒天および酵母エキスが若干のバクテリオシン産生の促進効果を示した (Table 5)。

S. mutans B14 株の産生するバクテリオシンの性状：*S. mutans* B14 株の培養上清より得た濃縮液中のバクテリオシン活性は DNase, RNase および catalase 処理によって影響を受けなかったが、pronase 処理によって活性が消失した。pronase による活性消失は穿刺菌上

Table 4 Establishment of *S. mutans* B14 on the tooth surface of hamsters

Inoculated strain	No. of animals	Body weight gain (g/animal)	Recovery of inoculated strain (%) [*]				
			days				
			0	9	16	43	54
None	6	56.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
B14-R2	5	59.8	0.0	4.4	62.5	83.7	75.4
K1-R	5	64.6	0.0	11.4	30.0	76.8	80.0

^{*} Recovery of inoculated strain (%)

$$= \left(\frac{\text{No. of colony on MS}^+ \text{ agar plate}}{\text{No. of colony on MS}^- \text{ agar plate}} \right) \times 100$$

Table 5 Effect of stabilizing agents on bacteriocin production of *S. mutans* B14 in Todd-Hewitt broth

Stabilizing agent	Concentration of supernate [*]	Bacteriocin activity (φ, mm)	
		—	Pronase (2mg/ml)
None	×1	—	—
	×100	11H ^{**}	—
0.1% agar	×1	—	—
	×100	12S	—
0.7% starch	×1	—	—
	×100	11H	—
4% yeast extract	×1	—	—
	×100	12S	—

^{*} Bacteriocin in culture supernate was concentrated 100 fold with 60% ammonium sulfate saturation.

^{**} H : Inhibition zone with hazy edges

S : Inhibition zone with sharp edges

に本酵素を滴下するのみならず、軟寒天に本酵素を含有させる方法および本酵素と培養上清試料とを反応させた後滴下する方法でも同様であった (Table 6)。次に、分画分子量3,500の膜を穿刺菌の生育した basal agar 上に置いた時は、置かない場合に比して、若干弱くはなっているが、阻止円が形成された。一方、分画分子量1,000の膜を置いた時は、阻止円は形成されず、このバクテリオシンの分子量は1,000から3,500の間であろうと推定された。次に熱に対する安定性を調べたところ121°C に対しても耐性があることが示された。

考 察

S. mutans 保存菌株の中より、ガラス壁付着能を持ち、かつ、バクテリオシン産生能を有する低齲蝕原性変

Table 6 Some properties of bacteriocin produced by *S. mutans* B14

Treatment	Activity
Heating at	
60°C : 30min	Stable
100°C : 30min	Stable
121°C : 15min	Stable
Enzyme	
Pronase P	Sensitive
DNase	Resistant
RNase	Resistant
Catalase	Resistant
Dialysis membrane [*]	
MW-CO 3,500	Permeable
MW-CO 1,000	Non-permeable

^{*} Spectropore type 6, Spectrum Medical Industries, Los Angeles, Calif.

異株を分離するのに適した親株として B14 株が見い出された。この菌は総合成多糖中に占める不溶性多糖の比率こそ低い、ハムスター歯面上において、AHT 株や K1-R 株などと同程度の定着能を保有していた。また、この株は、ハムスターで強い齲蝕原性を常に示す AHT 株や K1-R 株を含む *S. mutans* に広い抗菌活性を持つバクテリオシンを産生するため、歯垢中において齲蝕原性の高い野生株を排除し得るような低齲蝕原性変異株の分離に有利であると考えられた。

次に B14 株のバクテリオシン産生に影響を与える諸因子を検討した。固形培地でのバクテリオシン産生は使用培地によって大きく影響を受け、TH 培地及び酵母エキスに含まれる成分はバクテリオシン産生に必要であることが示された。また液体培地中での産生能が弱く安定化剤を用いても強いバクテリオシン活性は得られなかつ

た。これまでの一連の報告においても、液体培地中でのバクテリオシン産生は少ないことが知られており¹⁾、バクテリオシンの産生には、コロニー形成等のように細胞密度の高いことが必要条件なのかも知れない。

なお、B14 株の産生するバクテリオシンの性状を調べるために、ゲル濾過、アフィニティクロマト等により精製を試みたが、成功しえなかった。一つの原因としては、60%硫酸飽和で濃縮した粗精製バクテリオシンは非常に粘性が高く、ゲル濾過による溶出パターンや SDS ディスク電気泳動による分析結果などから培地成分の多量の混入が推測された。ポアー・サイズ10,000の透析膜で透析も試みたが内液にとどまる活性の方が高く、外液は濃縮操作をした場合のみ活性が認められた。これらの結果から、菌体外バクテリオシンは凝集、あるいは、培地成分と密接に結合している可能性が考えられ、また *Staphylococcin* でみられるように菌体膜片に低分子の活性分子が結合しているのかもしれない¹⁵⁾。B14 株が産生するバクテリオシンは、3,500の透析膜および1,000の透析膜の結果から、最小単位は Ikeda ら⁸⁾の報告した分子量4,800に近い3,500程度の分子量を持っており、福島¹⁶⁾の 973×10^3 や、今西¹⁷⁾の 2,000,000 とは著しく異なっていた。熱安定性、酵素感受性については今西¹⁷⁾、池田⁸⁾の報告および天児¹⁵⁾のバクテリオシン分類による低分子量バクテリオシンの性状にほぼ一致していた。

バクテリオシンの中で最も解明が進んでいるコリシンは、菌株によって種々性状の異なるものが産生されることが知られており¹⁸⁾、*S. mutans* の産生するバクテリオシンにも種々のものが存在するであろうということが Table 1 の抗菌スペクトルの結果からも推測される。*S. mutans* の産生するバクテリオシンの作用機序を詳しく検討する上からも精製されたバクテリオシンを得ることが必要であると考えられる。そこで我々は、培養上清からの濃縮でなく、多くの菌が活性を示し得る寒天平板より直接に抽出する方法を試み、液体培養よりも培地成分の混入が少なく、かつ活性の高い試料が得られることが明らかとなり、現在その抽出条件をさらに検討中である(未発表)。この方法は、これまで stab 法では活性が認められても培養上清からは活性が得にくい株のバクテリオシン精製に貢献し得ると考えられる。

バクテリオシンの作用機序の検討は菌垢生態系での働きとともに、齲蝕予防の面からも興味ある課題である。

結 論

- 1) *S. mutans* の保存株17株を調べ、バクテリオシン

活性が強く、ガラス壁付着能を持つ株として *S. mutans* B14 株が見い出された。

- 2) *S. mutans* B14 株のバクテリオシン産生は TH および TSY 寒天平板で認められ、BHI, TS 寒天平板では認められなかった。

- 3) *S. mutans* B14 株の不溶性多糖合成量は K1-R 株や AHT 株と等しいが、総多糖合成量に占めるその比率は低かった。

- 4) *S. mutans* B14 株は、*S. mutans* K1-R 株とほぼ同程度のハムスター歯面上への定着能を保有していた。

- 5) *S. mutans* B14 株の液体培地中でのバクテリオシン産生に影響する安定化剤は寒天および酵母エキスであったが、その影響は僅少であった。

- 6) *S. mutans* B14 株のバクテリオシンは熱に安定で、プロテアーゼには感受性をもち、分子量は3,500から1,000の間と推定された。

謝 辞

本論文の図表作製に御協力頂いた早川都香嬢に感謝致します。

文 献

- 1) Hamada, S. and Slade, H. D.: Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev., 44; 331-384, 1980.
- 2) Mao, M. W. H. and Rosen, S.: Cariogenicity of mutants of *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res., 59; 1620-1626, 1980.
- 3) Johnson, K. P. and Hillman, J. D.: Competitive properties of lactate dehydrogenase mutants of the oral bacterium *Streptococcus mutans* in the rat. Archs. oral Biol., 27; 513-516, 1982.
- 4) Tanzer, J. M., Fisher, J. and Freedman, M. L.: Preemption of *Streptococcus mutans* 10449S colonization by its mutant 805. Infect. Immun., 35; 138-142, 1982.
- 5) 岸本悦央: *Streptococcus mutans* K1-R 株の低齲蝕原性変異株を用いての齲蝕原性因子に関する研究. 福岡医学雑誌, 74; 710-723, 1983.
- 6) Rogers, A. H., van der Hoeven, J. S. and Mikx, F. H. M.: Inhibition of *Actionomyces viscosus* by bacteriocin-producing strains of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of gnotobiotic rats. Archs. oral Biol., 23; 477-483, 1978.
- 7) Rogers, A. H., van der Hoeven, J. S. and Mikx, F. H. M.: Effect of bacteriocin production by *Streptococcus mutans* on the

- plaque of gnotobiotic rats. Infect. Immun., 23 ; 571-576, 1979.
- 8) Ikeda, T., Iwanami, T., Hirasawa, M., Watanabe, C., McGhee, J. R. and Shiota, T. : Purification and certain properties of a bacteriocin from *Streptococcus mutans*. Infect. Immun., 35 ; 861-868, 1982.
 - 9) Fredericq, P. : Colicins. Annu. Rev. Microbiol., 11 ; 7-22, 1959.
 - 10) 阿部喜美子, 瀬野信子 : 糖質実験法 (蛋白質, 核酸, 酵素, 別冊), 共立出版, P13, 1968.
 - 11) Keyes, P. H. and Jordan, H. V. : Periodontal lesions in the syrian hamster, III. Findings related to an infectious and transmissible component. Archs. oral Biol., 9 ; 377-400, 1964.
 - 12) Mayr-Harting, A. : The adsorption of colicine. J. Path. Bact. 87 ; 255-266, 1964.
 - 13) Yamamoto, T., S. Imai, T. Nisizawa and S. Araya. : Production of, and susceptibility to bacteriocin-like substances in oral streptococci. Archs. oral Biol., 20 ; 389-391, 1975.
 - 14) Kelstrup, J. and R. J. Gibbons. : Bacteriocins from human and rodent streptococci. Archs. oral Biol., 14 ; 251-258, 1969.
 - 15) 天児和暢, 安仲加公子 : バクテリオシンの形態学. 蛋白質, 核酸, 酵素 (バクテリオシン), 24 ; 719-726, 1979.
 - 16) 福島久典, 福島早衛子, 福原裕子, 梅本俊夫, 谷 明, 尾上孝利, 小中島論一, 佐川寛典 : *Streptococcus mutans* Rm-10の産生する Bacteriocin の精製と性状, 歯基礎誌, 23 (Suppl.) ; 332, 1981.
 - 17) 今西秀明 : *Streptococcus mutans* が菌体外に産生するバクテリオシン (mutancin) の性状およびデンタルブラークの細菌叢に対する作用. 阪大歯学雑誌, 27 ; 89-106, 1982.
 - 18) 松橋通生, 高垣洋太郎 : コリシン, 基礎生化学実験法 2. p. 304, 1974.

Abstract : Bacteriocinogenicity and adhesive ability in *Streptococcus mutans*. Kimiko ONO*, Etsuo KISHIMOTO** and Toshio MORIOKA*. The bacteriocinogenic and highly adhesive strains were screened in laboratory stock strains of *Streptococcus mutans* for isolation of low-cariogenicity mutants which could act against wild strains of *S. mutans*. All tested strains of *S. mutans* inhibited the growth of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*. In particular, *S. mutans* P2, C67-1, B14, and OMZ 175 showed bacteriocin activity against many tested strains of *S. mutans*. Of these four strains, *S. mutans* B14 could adhere to the smooth surface of glass and establish itself in the oral cavity of hamsters to the same degree as a highly cariogenic strain *S. mutans* K1-R.

S. mutans B14 produced bacteriocin on Todd-Hewitt and trypticase soy-yeast extract agar plate, but not on brain heart infusion or trypticase soy agar plate. In broth culture, stabilizing agents like agar, yeast extract, and starch had only a slight effect on the production of bacteriocin.

The bacteriocin produced by *S. mutans* B14 was heatstable and sensitive to protease, but insensitive to DNase, RNase, and catalase. The molecular weight of the bacteriocin was estimated at 1,000-3,500 by dialysis. It was assumed that molecules of bacteriocin aggregated with each other or with the materials of the culture medium because of the dialysis and gel filtration.

Key words : Bacteriocin, *Streptococcus mutans*, Adhesion, Caries.