原 著

i 血清型および *g* 血清型の口腔 *Streptococcus milleri* の糖質抗原の精製と免疫化学的性状

Purification and Immunochemical Properties of Serotype
i and *g* Carbohydrate Antigens of Oral
Streptococcus milleri

小 名 川 良 輔*

Ryosuke KONAGAWA*

Received November 14, 1987; accepted November 25, 1987

Abstract: The type-specific antigens of the serotype *i* and *g* *Streptococcus milleri* were extracted with trichloroacetic acid from purified cell wall preparation of the strains K39K and K1K, respectively, and then purified by DEAE-Sephadex A-25 column followed by Sephadex G-100 column. The serotype *i*-specific antigen was composed of rhamnose, galactose, and glucose in a molar ratio of 1.6 : 6.8 : 1.0, and the serotype *g*-specific antigen consisted of rhamnose, galactose, glucose, and galactosamine in a molar ratio of 1.3 : 3.8 : 1.0 : 2.5. The quantitative precipitin inhibition test with various haptenic sugars showed that galactose and its related carbohydrates were the effective inhibitors of the reaction between type *i* antigen and anti-*i* serum, and galactosamine was the most effective inhibitor of the reaction between type-*g* antigen and anti-*g* serum. The purified serotype *i* specific antigen contained a significant amount of phosphorus, and the serotype *g* specific antigen contained a trace of peptides. The Rantz-Randall extracts from all the 15 strains tested belonging to serotype *i* contained galactose, and those from the 6 serotype *g* strains had galactosamine. The results suggest that galactose and galactosamine are involved in the major immunodeterminants of the serotype *i*-specific antigen and serotype *g* antigen of oral *S. milleri*, respectively.

索引用語: *Streptococcus milleri*, 血清型, 糖質抗原

Key words: *Streptococcus milleri*, Serotype, Carbohydrate antigen

緒 言

Streptococcus milleri という菌種名は, Guthof¹⁾が, 口腔領域の膿瘍から分離される“微小な”集落を形成する非溶血性の一群のレンサ球菌に対して初めて用い

たものである。以来今日まで, *S. milleri* の分類上の定義には少なからず変遷がみられた²⁻⁴⁾が, この一群の菌種についての臨床的な関心は口腔のみならず, 全身の感染症においても徐々に高まりをみている⁵⁻⁷⁾。

S. milleri は, 粘膜や皮膚の一部の常在細菌であ

* 鹿児島大学歯学部予防歯科学教室 (主任: 井上昌一教授)

* Department of Preventive Dentistry, Kagoshima University Dental School (Chief: Prof. Masakazu INOUE)

特別掲載

る^{8,9)}とともに、身体各部の化膿性疾患をもつ患者の血液中や病巣部から高率に検出され、その主要な原因菌の1つに数えあげられている¹⁰⁾。

S. milleri は、口腔の常在細菌の1つでもある。歯の萌出とともに口腔に出現し¹¹⁾、歯肉溝や歯肉縁上プラークを主な生息部位として口腔に常在している¹²⁻¹⁴⁾。また、しばしば歯槽膿瘍や感染根管から分離される^{1,15,16)}ことが知られており、*S. milleri* の1部の菌株は齶蝕誘発能をもつことがラットを用いた実験齶蝕系において証明されている¹⁷⁾。

このように、常在性 *S. milleri* は口腔あるいは全身の感染症に深く関わっていると考えられるが、その分類学上の位置づけや血清学的性状については、まだ不明の部分が多く、このことがこの菌種の感染や伝播の経路を知るうえでの一つの障害となっている。

当教室では、口腔 *S. milleri* に関する一連の研究の手始めとして、成人のデンタルプラークから *S. milleri* を分離し、その生物学および血清学的な性状をもとに、現在のところ少なくとも6つの生物型¹⁴⁾と Lancefield の群特異抗原に依存しない10の血清型¹⁸⁾に分類されることを既に報告した。

本研究では、口腔 *S. milleri* の分類学上の位置づけを明らかにする一助として、先に提案した *a-j* までの10血清型のうち、その主要な部分をなす *i* および *g* 血清型の型特異抗原の免疫化学的性状について検討した。

実験材料と方法

1. 菌株

先に本教室において成人の歯肉縁上および歯肉縁下プラークから分離同定した *S. milleri*¹⁴⁾ のうち、*i* 血清型に属する15菌株および *g* 血清型に属する6菌株を用いた (Table 1)。これらの菌株は、最終濃度が1%になるようにグルコースを添加した brain heart infusion broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) を用いて、テハー・アナエロボックス (AZ-125型、平沢製作所、東京) 中で10% H_2 + 10% CO_2 + 80% N_2 の気相下に、37°C で18時間培養した。培養液を遠沈(6,000×g, 20分, 4°C)して集菌し、得られた菌体を脱イオン水で3回同様にして遠沈洗浄した後、凍結乾燥した。

2. 型特異血清の調製

抗 *i* 型および抗 *g* 型特異血清は家兎(雌性、九動、熊本)を用いて、次のようにして調製した。免疫に先立って、用いた家兎の血清に *S. milleri* K39K 株(*i* 血清型)およびK1K株(*g* 血清型)に対する抗体のないことを両

Table 1 List of strains of the serotype *i* and *g* *Streptococcus milleri*

Serotype <i>i</i>	Serotype <i>g</i>
K39K	K1K
K40K	K5K
K41-1K	K63-1K
K41-2K	K63-2K
K113-1K	K65K
K113-2K	K214-1K
K113-2aK	
K119-1K	
K119-2K	
K122K	
K125K	
K128K	
K129K	
K148aK	
K203K	

菌株の RR 抗原(後述)とのゲル内沈降法で確認した。両菌株の凍結乾燥菌体をそれぞれ 0.5mg/ml の割合で生理食塩水中に懸濁させた後、その 0.5ml を3回、ついで1.0ml を3回、さらに2.0ml を6回、それぞれ隔日に耳外周静脈より注射し免疫した。最後の注射から2日後に予備採血して抗体の産生を確認した後、エチルエーテル麻酔下に頸動脈より全血液を採取し、通法により抗血清を分離した。

次いで、非特異抗体を除くために、得られた抗 K39K 血清および抗 K1K 血清 1ml をそれぞれ K16-1K株(*h* 血清型)あるいは K201K 株(*j* 血清型)の菌体浮遊液(乾燥重量50mg/ml) 1ml と混和し、37°C で1時間、次いで4°C で1夜反応させた¹⁸⁾。遠沈して菌体を除き、型特異抗 *i* 型血清および抗 *g* 型血清を得た。

3. 細胞壁の精製

S. milleri K39K 株と K1K 株の凍結乾燥菌体(それぞれ乾燥重量6.3g と4.7g)を脱イオン水(30ml)に浮遊させ、4°C で18時間静置して湿潤させた。それぞれの菌体浮遊液をガラスビーズ(直径0.17~0.18mm, B. Braun Apparatebau, Melsungen, Germany)とともにセルホモジナイザー(MSK 型, B. Braun Apparatebau)を用いて CO_2 ガス噴射冷却下に機械的に振盪(4,000rpm, 3分, ×4回)して菌体を破壊した。decanation によりガラスビーズから分離した上清液を遠沈(26,000×g, 60分, 4°C)して粗細胞壁標品を得た。次いで、粗細胞壁を40mg トリプシン(1:250, Difco

Lab.) を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液を pH 7.0, 100ml 中で 37°C, 2 時間処理した。遠沈 (26,000×g, 20 分, 4°C) して細胞壁画分を回収し, 脱イオン水で 3 回洗浄後に, 凍結乾燥した。得られた精製細胞壁標品の収量 (乾燥重量) は K39K 株では 1.7g, K1K 株では 1.0g であった。

4. 糖質抗原の調製

精製細胞壁標品からの抗原の抽出は以下のようにして行なった。すなわち, 5% トリクロロ酢酸 (TCA) 50 ml 中で *S. milleri* K39K 株では 1.5g, K1K 株では 0.9g の精製細胞壁標品をそれぞれ 90°C, 15 分あるいは 4°C, 3 時間処理した。遠沈 (20,000×g, 20 分, 4°C) 沈渣をさらに 3 回, 同様にして抽出した。4 回分全ての上清を合体したのち, 2N 水酸化ナトリウムで中和後, 脱イオン水に対して透析した。透析内液をロータリーエバポレーター (50°C) で約 4 倍に濃縮した後, 最終濃度が 80% になるようにアセトンを加え, -20°C で 18 時間静置した。遠沈 (25,000×g, 30 分, 4°C) して沈渣を回収し, 少量の脱イオン水に溶解後, まず脱イオン水, 次いで 0.05M 炭酸アンモニウム溶液に対して透析し, 透析内液の遠沈 (15,000×g, 20 分, 4°C) 上清を粗糖質抗原 (TCA 抽出画分) として, 氷水中に保存した。

全菌細胞からの糖質抗原の抽出は Rantz と Randall の方法¹⁹⁾ によった。凍結乾燥菌体 0.6g を生理食塩水 30 ml 中で 4°C, 18 時間静置して湿潤させた後, 121°C で 20 分間加熱した。遠沈 (1,700×g, 5 分, 4°C) により上清を分離し, 脱イオン水に対して透析した後, 凍結乾燥した (以下, RR 抗原と略記)。

5. 糖質抗原の精製

粗糖質抗原画分 (約 2 ml) を 0.05M 炭酸アンモニウム溶液で平衡化した DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) カラム (直径 1.5cm×45.5cm) にのせ, 同溶液 100ml で非吸着画分を溶出した後, 塩化ナトリウム溶液の濃度勾配 (0~1M; 150ml+150ml) を用いて吸着画分を溶出した。流速は 45ml/時間とし, 1 管 10~12ml の画分を分取した。各々の抗血清と反応する画分を集め, 脱イオン水に対して透析後, ロータリーエバポレーター (50°C) で 5 ml に濃縮し, 脱イオン水で平衡化した Sephadex G-100 (Pharmacia) カラム (直径 1.5cm×45cm) にのせ, 脱イオン水を用いて流速 8 ml/時間でゲルろ過し, 1 管 2.4 ml (K39K 株抗原) あるいは 8 ml (K1K 株抗原) の画分を分取した。抗血清と反応する画分を集めて凍結乾燥

し, 精製抗原標品とした。

6. 化学定量

全糖量はグルコースを標準としてアンスロン法²⁰⁾ で定量した。N-アセチルヘキソサミンの定量は, N-アセチルグルコサミンを標準として Ghuysen らの方法²¹⁾ によって行なった。リンの定量はリン酸水素二カリウムを標準として Lowry らの方法²²⁾ によって行なった。タンパク質は OD_{280nm} での吸収測定, あるいは牛血清アルブミンを標準として Lowry らの方法²³⁾ で定量した。

中性糖とアミノ糖の定量は Griggs ら²⁴⁾ と Sloneker²⁵⁾ の記載を参考にして行なった。糖質抗原標品 1mg とイノシトール (内部標準) 0.5mg を 3N 塩酸 2ml に溶解し, 窒素ガス置換後, 密封し, 100°C で 4 時間加水分解した。炭酸銀で中和後, 遠沈 (1,700×g, 5 分, 室温) 上清に 5mg 水素化ホウ素ナトリウムを含む 1M 水酸化アンモニウム溶液 1ml を加えて, 4°C で 18 時間還元した。氷酢酸を加えて反応を停止後, メタノールを加えてロータリーエバポレーターで減圧乾固を繰り返す, ホウ酸を除去した。次いで 1.5ml の無水酢酸を添加し, 100°C で 1.5 時間反応させてアルジトールアセテート誘導体を得た。この誘導体は塩化メチレンを溶媒として, まず飽和重曹水で水との混液で振盪処理し, 塩化メチレン相に抽出した。溶媒を窒素ガスで蒸散後サンプルを濃縮して, ガスクロマトグラフィーで分析した。

ガスクロマトグラフィーは 0.2% EGS+0.2% EGA +1.4% silicon XE-60 を塗布したガスクローム P (100~120メッシュ, ガスクロ工業, 東京) を充填したガラスカラム (直径 3mm×200cm) を使い, 水素炎イオン化検出器 (FID) を装填したガスクロマトグラフ (GC-4C 型, 島津製作所, 京都) を用いた。流速 75~80ml/分の窒素をキャリアーガスとして 1°C/分の割合で 150°C から 205°C まで昇温分析を行なった。Injection 温度は 220°C, Detector 温度は 320°C とした。定量値は FID に接続したクロマトパック (C-RIA 型, 島津製作所) を用いて, グリセロール, リビトール, マンノース, ラムノース, ガラクトース, グルコース, グルコサミン, ガラクトサミンそれぞれを 0.1, 0.2, 0.5mg と, 内部標準としてのイノシトール 0.5mg とから得た標準曲線をもとにして算出した。

7. ゲル内沈降反応

免疫拡散法は通法により, 0.1% NaN₃ を添加したリン酸塩緩衝 (0.01M, pH 7.2) 生理食塩水に溶解した 1.0% Noble agar (Difco) 中に行なった。抗原標品 (25μl) と型特異血清 (25μl) とを各円孔 (径 5mm) に

入れ室温にて1夜反応させた。

8. 定量沈降反応とハプテン阻害試験

抗原抗体反応の最適比を知るため、先ず定量沈降反応を行なった。型特異血清 $5\mu\text{l}$ と精製抗原 $0\sim 5\mu\text{g}$ を生理食塩水で全量 $50\mu\text{l}$ に調整後、 37°C で1時間、次いで 4°C で18時間反応させた。遠沈 ($1,700\times\text{g}$, 10分, 4°C) して沈渣として得られた抗体タンパクを、生理食塩水で同様にして3回洗浄したのち、 1M 水酸化ナトリウム溶液に溶解後に Lowry 法²³⁾で定量した。

ハプテン阻害試験は、各ハプテンの 1M 溶液 $20\mu\text{l}$ と型特異血清 $5\mu\text{l}$ を 37°C で1時間反応させた後、定量沈降反応によってあらかじめ知った最適量の精製抗原を加え、全量を生理食塩水で $50\mu\text{l}$ に調整した後、さらに 37°C で1時間、次いで 4°C , 18時間反応させた。遠沈 ($1,700\times\text{g}$, 10分, 4°C) 沈渣に含まれるタンパク量を上述のようにして定量した。ハプテン無添加の反応系を対照として、阻害効果を百分率として表わした。

成 績

1. 型菌株からの特異抗原の精製

S. milleri K39K 株の細胞壁 TCA 抽出物を DEAE-Sephadex A-25カラムで分画したところ、糖を主成分とする2つのピークがえられた (Fig. 1)。第1のピークはカラムに吸着されない画分で、大部分の糖と少量のリンが含まれていたが、抗 *i* 血清とは全く反応しなかった。第2のピークはカラムに吸着後、 0.35M の塩化ナトリウムで溶出される画分 (フラクション17~36) で、リンの含量が相対的に高く、抗 *i* 血清に対して強い反応性を示した。いずれの分画も $\text{OD}_{290\text{nm}}$ での吸収をほとんど示さなかった。フラクション17~36が抗 *i* 型血清に対して反応性を有していたが、強い反応を示したフラクション17~21を合体して、ゲルろ過した。

Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーの結果、糖のピークが1つ得られ、リンのピークもほぼこれに一致して認められた (Fig. 2)。ほとんど全ての画分が抗 *i* 型血清と強く反応したので、フラクション11~42を合体後に、凍結乾燥し、精製 *i* 型抗原として用いた。収量としては、精製細胞壁標品 1.5g から精製抗原 40mg が得られた。

同様にして、*S. milleri* K1K 株の細胞壁 TCA 抽出物についても DEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーによって2つの糖のピークが得られた (Fig. 3)。第1のピーク画分はカラムに吸着しない画分で大部分の糖がこれに含まれており、抗 *g* 型血清と強く反応し

Fig. 1 DEAE-Sephadex A-25 ion-exchange column chromatography of the TCA extracts of *S. milleri* K39K cell walls. Column size: $15\times 455\text{mm}$. Eluents: 0.05M ammonium carbonate (100ml) followed by a linear gradient of increasing NaCl ($0\rightarrow 1\text{M}$; $150\text{ml} + 150\text{ml}$). Elution conditions: $12\text{ml}/\text{tube}/16\text{min.}$ at 4°C .

Fig. 2 Sephadex G-100 gel filtration of the K39K (serotype *i*) antigen fraction obtained on the DEAE-Sephadex A-25 column. Column size: $15\times 450\text{mm}$. Eluent: deionized water. Elution conditions: $2.4\text{ml}/18\text{min.}$ at 4°C .

た。第2のピークはカラムに吸着後 0.2M の塩化ナトリウムで溶出される糖とリンを含む画分であったが、抗血清との反応性を欠いていた。なお、リンの大部分は $0.3\sim 1\text{M}$ の塩化ナトリウムで溶出された。

抗 *g* 型血清と反応するフラクション3~6を合体して Sephadex G-100カラムを用いてゲルろ過をすると (Fig. 4)、糖を主体とし少量のタンパク質を含む1つ

Fig. 3 DEAE-Sephadex A-25 ion-exchange column chromatography of the TCA extracts of *S. milleri* K1K cell walls
Column size : 15×455mm
Eluents : 0.05M ammonium carbonate (100ml) followed by a linear gradient of increasing NaCl (0 → 1 M ; 150ml+150ml)
Elution conditions ; 10ml/tube/13min. at 4 °C

のピークが得られ、この画分は抗 *g* 型血清と強く反応した。リンは何れのフラクションにも検出されなかった。抗 *g* 型血清に反応性を示す画分（フラクション 4～8）を集めて凍結乾燥し、精製 *g* 型抗原とした。精製細胞壁標品 0.9g から出発して得られた精製 *g* 型抗原の収量は 14mg であった。

2 型特異抗原の化学組成

S. milleri K39K 株の RR 抗原、細胞壁 TCA 抽出

Fig. 4 Sephadex G-100 gel filtration of the K1K (serotype *g*) antigen fraction obtained on the DEAE-Sephadex A-25 column
Column size : 15×450mm
Eluent : deionized water
Elution conditions : 8.0ml/tube/60min. at 4 °C

抗原および精製抗原と *i* 型特異血清との間に生じるゲル内沈降線は、いずれも完全に融合した (Fig. 5a)。 *S. milleri* K1K 株からえた各抗原標品と抗 *g* 型特異血清との間にも同様の反応が認められた (Fig. 5b)。このことから、いずれの菌株も RR 抗原と TCA 抽出抗原とは同一の抗原決定基を含んでおり、TCA 抽出抗原を出発材料としてえた精製型特異抗原にも同一の抗原決定基が保有されていることが知られた。

(a) : K39K antigen vs. anti-*i* serum
(b) : K1K antigen vs. anti-*g* serum
Abbreviations: A : type-specific antisera, R : Rantz-Randall extracts of whole cells, T : TCA extracts of purified cell walls, P : purified type-specific antigens

Fig. 5 Immunodiffusion in agar gel

Table 2 Chemical composition of the cell wall preparations of *Streptococcus milleri* K39K and K1K and the purified serotype *i* and *g* antigens

Components	$\mu\text{g}/\text{mg}$ sample (molar ratio to glucose)			
	Strain K39K		Strain K1K	
	Purified cell walls	Serotype <i>i</i> antigen	Purified cell walls	Serotype <i>g</i> antigen
Glycerol	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Rhamnose	443 (6.23)	150 (1.58)	390 (2.68)	141 (1.28)
Ribitol	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Galactose	165 (2.36)	633 (6.77)	57 (0.40)	405 (3.75)
Glucose	70 (1.00)	93 (1.00)	144 (1.00)	108 (1.00)
Glucosamine*	75 (1.08)	0 (0.00)	133 (0.91)	0 (0.00)
Galactosamine*	0 (0.00)	0 (0.00)	6 (0.04)	270 (2.52)
Protein**	174 (7.08)	0 (0.00)	178 (3.54)	13 (0.35)
Phosphorus	11 (0.90)	33 (2.04)	5 (0.04)	0 (0.00)

* No N-acetyl hexosamine was detected

** Parentheses indicate the molar ratio as glycine

K39K 株および K1K 株由来の精製細胞壁標品と精製型特異抗原の化学組成を Table 2 にまとめて示した。

精製 K39K 株細胞壁標品の糖含量はラムノースが最も多く、次いでガラクトース、グルコサミン、グルコースの順であった。この菌株の RR 抽出物も、ラムノース、ガラクトース、グルコース、グルコサミンを含み、そのモル比は4.3 : 1.2 : 1.0 : 0.8であった (Table 5 参照)。いずれの標品にもリンが検出されたが、グリセロール、リビトール (RR 抽出物には対グルコースモル比 = 4.3 で存在)、ガラクトサミンは全く検出されなかった。一方、精製 *i* 型抗原は、ガラクトース、ラムノース、グルコースおよびリンのみから構成されており、そのモル比は 6.8 : 1.6 : 1.0 : 2.0 であった。この精製抗原標品からは、精製細胞壁標品で検出されたグルコサミンとタンパク質は、全く検出されなかった。なお、ここで用いた *i* 型特異血清は、タイコ酸の 1 標品 (*S. mutans* 6715-DP 株由来) との反応性を欠くことがゲル内沈降法で確かめられた (省略)。

K1K 株の精製細胞壁標品には、タンパク質に加えて、ラムノース、グルコース、グルコサミン、ガラクトースが含まれていたほか、少量ではあるがガラクトサミンが存在していた。事実、この菌株の RR 抗原は、ラムノース、ガラクトース、グルコース、グルコサミン、ガラクトサミンを、モル比にして2.8 : 3.4 : 1.0 : 0.2 : 2.4の割合で含んでいた (Table 5 参照)。精製 *g* 型抗原は、ガラクトース、ガラクトサミン、ラムノース、グル

Fig. 6 Quantitative precipitin reaction between purified type antigens and type-specific antisera

○ : type *i* antigen (0 ~ 5 μg) vs. anti-*i* serum (5 μl)

● : type *g* antigen (0 ~ 5 μg) vs. anti-*g* serum (5 μl)

コースからなり、そのモル比は3.8 : 2.5 : 1.3 : 1.0であった。N-アセチルヘキソサミンの存在は全く認められなかった。この他、痕跡量のタンパク質 (ペプチド) を含んでいたが、グリセロール、リビトール、リンは全く検出されなかった。

Table 3 Hapten inhibition of the precipitin reaction between purified serotype *i* antigen and anti-*i* specific serum

Haptens	Inhibition (%)
Lactose	100
Galactosamine	96.1
β -Methylgalactoside	85.5
Galactose	82.9
α -Methylgalactoside	71.1
Melibiose	69.7
β -Methylglucoside	59.2
Rhamnose	56.6
N-acetylgalactosamine	55.3
α -Methylglucoside	40.8
Glucose	36.8
Isomaltose	36.8
N-acetylglucosamine	30.3
N-acetylmannosamine	27.6
Maltose	26.3
Glucosamine	23.7

Table 4 Hapten inhibition of the precipitin reaction between purified serotype *g* antigen and anti-*g* specific serum

Haptens	Inhibition (%)
Galactosamine	92.6
α -Methylgalactoside	81.4
Rhamnose	77.0
Galactose	69.9
Lactose	67.1
Glucosamine	63.6
N-acetylgalactosamine	56.2
N-acetylglucosamine	43.0
Melibiose	40.3
β -Methylgalactoside	38.4
Maltose	28.8
N-acetylmannosamine	24.7
Isomaltose	24.6
Glucose	22.7
α -Methylglucoside	13.7
β -Methylglucoside	0

3. ハプテン阻害試験

定量沈降反応の結果 (Fig. 6), 抗 *i* 型血清 5 μ l に対して 0.75 μ g の *i* 型抗原が, また, 抗 *g* 型血清 5 μ l に対しては 2.0 μ g の *g* 型抗原が最大量の抗体を沈殿させた。(沈

Table 5 Molar ratio of sugars and phosphate contents in the Rantz-Randall extracts from whole cells of the serotype *i* and *g* *S. milleri* strains

Components	Mean molar ratio to glucose (range)	
	Serotype <i>i</i> strains (n=15)	Serotype <i>g</i> strains (n=6)
Glycerol	0.00	0.00
Rhamnose	3.97(1.21~ 8.58)	4.32(2.60~ 8.64)
Ribitol	4.28(0.29~22.14)	3.13(0.43~12.08)
Galactose	0.91(0.91~ 1.95)	3.53(2.68~ 4.34)
Glucose	1.00	1.00
Glucosamine	0.93(0.32~ 2.38)	0.63(0.00~ 1.15)
Galactosamine	0.00	2.50(1.90~ 2.99)
Phosphorus	1.60(0.73~ 3.16)	2.73(1.05~ 5.71)

殿抗体量はそれぞれ 63 μ g および 67 μ g)。

この最適比における定量沈降反応のハプテンによる阻害効果を調べた。Table 3 に示すように, *i* 型抗原と抗 *i* 型血清との免疫反応は, ラクトースにより完全に阻害されたほか, 阻害の大きいハプテンは全てガラクトースあるいはこれと類縁の糖であった。グルコースおよびグルコースを含むハプテンの阻害率は大きくなかった。一方, 精製 *g* 型抗原と血清との定量沈降反応のハプテン阻害率 (Table 4) は, ガラクトサミンが最も大きく, この他 α -メチルガラクトシド, ラムノースなども高い阻害率を示した。

4. *i* 血清型および *g* 血清型の菌株の RR 抽出抗原の化学分析

i 血清および *g* 血清型に属する全ての菌株の RR 抗原抽出物の糖組成を比較した (Table 5)。*i* 血清型菌 15 株の RR 抗原には全てラムノース, ガラクトース, グルコースが検出され, その平均モル比は 4.0 : 0.9 : 1.0 であった。一方, *g* 血清型菌 6 株の RR 抗原では, ラムノース, ガラクトース, グルコース, ガラクトサミンが検出され, その平均モル比は 4.3 : 3.5 : 1.0 : 2.5 であることが示された。

この他, *i* 血清型および *g* 血清型のほとんど全ての菌株の RR 抽出物にはグルコサミン (対グルコース平均モル比はそれぞれ 0.9 と 0.6) が含まれていたが, *i* 血清型菌についてはガラクトサミンは全く検出されなかった。また, 全ての菌株の RR 抽出物には, グリセロールは検出されなかったが, 常にリビトールとリンの存在が認められた (対グルコース平均モル比は *i* 血清型菌で

はそれぞれ4.3と1.6, *g* 血清型菌では3.1と2.7)。

考 察

我々は、口腔から分離した *S. milleri* をこれまでのところ *a*~*j* までの10血清型と未分類の1群に分類している¹⁸⁾。そのうち、*b* 血清型菌の型特異精製抗原は、ラムノースとグルコースがほぼ1.7:1.0 (モル比) の糖組成をもち、その抗原決定基はラムノースであることを既に示唆した²⁶⁾。本研究では、*i* 血清型と *g* 血清型の標準型株である K39K 株および K1K 株を用いて、両菌株の精製細胞壁の TCA 抽出物からカラムクロマトグラフィーによって精製したそれぞれの型特異抗原の化学的性状について調べた。

その結果、*i* 血清型精製抗原はラムノース、ガラクトース、グルコースおよびリンを1.6:6.8:1.0:2.0の割合で含む (Table 2) こと、および、この型特異抗原と *i* 型特異血清との間の定量沈降反応によるハプテン阻害実験において、ガラクトースあるいはこの糖残基を含む少糖類が強い阻害を示した (Table 3) ことから、*i* 型特異抗原の型特異性にはガラクトース残基の密接な関与が示唆される。さらにラクトースがほぼ完全な定量沈降反応阻害活性を示したこと、および β -メチルガラクトシドは α -メチルガラクトシドよりも高い阻害活性を示したこと (Table 3) を考えると、*i* 型抗原の抗原決定基は β -galactosyl-glucose 構造をもつと推定される。

なお、*i* 型抗原の構成糖ではないガラクトサミンが極めて高い定量沈降反応阻害活性を示した (Table 3) が、ヘキソサミンが時にこうした非特異的阻害を示すことは、*S. sanguis* の *b* 型抗原²⁷⁾ あるいは *L. plantarum* 由来のタイコ酸²⁸⁾ とそれらの特異抗血清との間の沈降反応試験などにおいて経験されているところである。また、*i* 型特異抗原には、有意の量のリン (グルコース残基に対して2モルに達する) が含まれていた (Table 2) が、グリセロールとリビトールは検出されなかったこと、および本研究で用いた *i* 型特異血清は、タイコ酸の1標品 (*S. mutans* 6715-DP 株由来) とは反応しなかったことから、*i* 型特異抗原の抗原決定基にはタイコ酸は関与していないと考えられる。ここで、リンがどのようなかたちで存在しているのかは現在のところ不明である。

一方、*g* 血清型精製抗原はラムノース、ガラクトース、グルコース、ガラクトサミンを1.3:3.8:1.0:2.5の割合で含む (Table 2) こと、ハプテン阻害実験においてガラクトサミンが最も高い阻害率を示した (Table 4) ことから、*g* 血清型抗原決定基にはガラクトサミンの

密接な関与が考えられる。なお、ラムノースとガラクトースも強い阻害率を示したように、これらの糖残基も重要な役割を果たしている (例えば第二の抗原決定基の存在の可能性も考えられる) と想像されるが、少なくとも *g* 型抗原決定基の末端残基はガラクトサミンであろうと想像される。

標準型菌株からえた精製型特異抗原の化学分析結果を通して、以上に推定した *i* 血清型および *g* 血清型の型特異抗原決定基についての結論は、両血清型に属する全ての菌株の RR 抗原抽出物の糖組成分析の結果 (Table 5) から支持される。*i* 血清型菌15株の RR 抗原は、①精製 *i* 型抗原を構成する3種類の糖成分を含んでおり、②グルコース残基に対するガラクトース残基のモル比は全ての菌株でほぼ一致し、③さらに、ゲル内沈降反応において、本研究で分析した *i* 型精製抗原とともに、*i* 型特異抗血清に対して融合する沈降線を生じる (Fig. 5a 参照)。同様に、*g* 血清型菌の6株についても、①全ての菌株の RR 抗原の糖の構成比は精製型特異抗原を構成する4種の糖成分を含めてよく一致しており、また② *g* 型特異血清に対して全く同一の反応を示す (Fig. 5b 参照) ことが示された。

これまで、*S. milleri* の1部の菌株には、Lancefield の A, C, F, G 群特異抗原、およびこれらとは別に5種類の型特異糖質抗原 (Ottens の I~V 型) が存在することが指摘されている^{2,29)}。既に報告したように¹⁸⁾、本研究において明らかになった *i* および *g* 血清型の型特異抗原を含めて、*a*~*j* 血清型の型特異抗原はいずれも Lancefield の群特異抗原からは独立したものである。残る疑問は、今回調べた2つの血清型の型特異抗原と、これと共通の糖成分からなることが知られている Ottens の型特異抗原との異同である。*i* 血清型特異抗原は、その糖成分構成のうえからみると、Ottens の III 型抗原³⁰⁾ と完全に一致するが、定量沈降反応におけるハプテン阻害実験の結果から III 型抗原の抗原決定基は β -glucoside である^{30,31)} とされていることを考えると、ガラクトースが抗原決定基と推定される *i* 血清型特異抗原 (Table 3) とは別のものであろうと思われる。もう一つの可能性は Ottens IV 型抗原^{31,32)} との異同である。この型抗原はラムノース、ガラクトース、グルコース、N-アセチルグルコサミン (モル比は4:4:4:1) からなり、抗原決定基部分の糖類構造は、 β -galactosyl-glucosyl-galactose (または -rhamnose) である³²⁾ と推定されている。一方、先に考察したように、*i* 型特異抗原の抗原決定基末端は、 β -galactosyl-glucose である可能性が高い。このよ

うに、*i* 型特異抗原は、Ottens IV型抗原とかなり類似しており、両者は全く同じものである可能性も残されている。

これに対して、これまでに推定されている各型特異抗原の抗原決定基の糖残基³¹⁾と対比してみるかぎり、*g* 型特異抗原はおそらくの Ottens 型抗原とも異なるものであろうと考えられる。唯一の僅かな可能性は Ottens II型抗原^{31,32)}との類似性である。現在、II型抗原の糖鎖は、 β -N-acetyl-galactosaminyl-galactosyl-rhamnosyl-glucosyl-glucose である³²⁾と推定されているが、決定基末端に位置する N-アセチルガラクトサミンとともにガラクトースやガラクトサミンによっても定量沈降反応の顕著な阻害がみられることが報告されている^{31,32)}。しかし、先にも述べたように (Table 4), *g* 型抗原の抗原決定基末端はガラクトサミンであると推定されることから、*g* 型抗原はII型抗原とは異なる新しい型抗原であると思われる。

Fig. 1 と 3 に示すように、K39K (*i* 型) 株と K1K (*g* 型) 株の細胞壁 TCA 抽出物の DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーによって、抗 *i* あるいは抗 *g* 血清とは反応しない、糖および／あるいはリンを含むいくつかのピーク画分がえられた。これらの画分にも免疫学的な活性物質が含まれている可能性が残されている。今後の検討課題であるが、本研究で用いた両菌株は Lancefield の A~G 群特異抗原を持たないことから、それ以外の群特異抗原 (L 抗原)³⁴⁾あるいは群類似抗原 (Z 抗原)³²⁾や未知の抗原物質、さらには種々の菌体表層活性物質が隠されているかも知れない。そのような物質の 1 つとして最も可能性の高いのはタイコ酸である。これまでに調べた *a~j* 血清型の全ての菌株の RR 抗原にはリンが検出されている (一部は未発表)。 *S. milleri* におけるタイコ酸の分布についての知見は今後の興味ある課題の 1 つとなろう。

我々の先の実験成績においてもそうであったように、*S. milleri* は一般に非溶血性である¹⁴⁾。溶血性レンサ球菌には20にも及ぶ Lancefield 血清群に加えて、これとは独立するいくつかの血清型の存在が知られているが、非溶血性レンサ球菌には、既知の群あるいは型特異抗原を持たない数多くの菌株が存在することが知られている^{3,29)}。主として溶血性レンサ球菌についてのこれまでの研究成績にみられるように、既知の群特異抗原あるいは型特異抗原など、レンサ球菌の糖質抗原は、一般に限られた数種類の単糖、アミノ糖、アセチルアミノ糖から構成されている³⁵⁾。本研究で調べた2つの血清型を含め

て、我々が先に提示した *a~j* 血清型 *S. milleri* の型特異糖質抗原の糖組成もその範疇を越えるものではなかった (一部未発表)。このように、レンサ球菌にみられる多様な血清型特異性を支える化学的基盤はその構成要素からみると意外に単純である。同時に例えば、*S. salivarius* の一部と *S. MG-intermedius*³⁴⁾、あるいは *S. mutans* の *e* 血清型と他の菌種の E 群とは共通の抗原をもつことが知られているように³⁶⁾ 既知の群特異抗原や型特異抗原はレンサ球菌の菌種の枠を越えて広く分布している。したがって、先に我々が示した10に及ぶ *S. milleri* の血清型特異抗原の他の菌種における分布についての検討は、今後 *S. milleri* の分類学上の位置づけを確立するうえにおいて必要であろう。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇切なご指導とご校閲を賜りました、井上昌一教授、薬師寺毅講師に謹んで感謝の意を捧げます。また本研究に際し、ご援助、ご協力をいただきました予防歯科学講座の諸先生方に心からお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Guthof, O.: Ueber pathogene "vergrüne Streptokokken" Streptokokken-Befunde bei dentogenen Abszessen und Infiltraten im Bereich der Mundhöhle, Zentrabl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I, Orig., 166; 553, 1956.
- 2) Colman, G. and Williams, R. E. O.: Taxonomy of some human viridans streptococci, In: Streptococci and Streptococcal Diseases (ed. Wannamaker, L. W. and Matsen, J. M.). Chap. 17, Academic Press, London, 1972, p.281.
- 3) Facklam, R. R.: Physiological differentiation of viridans streptococci, J. Clin. Microbiol., 5; 184, 1977.
- 4) Coykendall, A. L., Wesbecher, P. M. and Gustafson, K. B.: "*Streptococcus milleri*," *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus intermedius* are later synonyms of *Streptococcus anginosus*, Int. J. Syst. Bacteriol., 37; 222, 1987.
- 5) Ball, L. C. and Parker, M. T.: The cultural and biochemical characters of *Streptococcus milleri* strains isolated from human sources, J. Hyg. Camb., 82; 63, 1979.
- 6) Shlaes, D. M., Lerner, P. I., Wolinsky, E. and Gopalakrishna K. V.: Infection due to Lancefield group F and related streptococci

- (*S. milleri*, *S. anginosus*), *Medicine*, **60** ; 197, 1981.
- 7) Kambel, A. M. : Isolation of *Streptococcus milleri* from clinical specimens, *J. Infect.*, **14** ; 217, 1987.
 - 8) Poole, P. M. and Wilson, G. : Occurrence and cultural features of *Streptococcus milleri* in various body sites, *J. Clin. Pathol.*, **32** ; 764, 1979.
 - 9) Wort, A. J. : Observation on group-F streptococci from human sources, *J. Med. Microbiol.*, **8** ; 455, 1975.
 - 10) Parker, M. T. and Ball, L. C. : Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man, *J. Med. Microbiol.*, **9** ; 275, 1976.
 - 11) Edwardsson, S. and Mejäre, B. : *Streptococcus milleri* (Guthof) and *Streptococcus mutans* in the mouths of infants before and after tooth eruption, *Archs. Oral Biol.*, **23** ; 811, 1978.
 - 12) Mejäre, B. and Edwardsson, S. : *Streptococcus milleri* (Guthof) ; an indigenous organism of the human oral cavity, *Archs. Oral Biol.* **20** ; 757, 1975.
 - 13) Bowden, G. H., Hardie, J. M. and Slack, G. L. : Microbial variations in approximal dental plaque, *Caries Res.*, **9** ; 253, 1975.
 - 14) Yakushiji, T., Katsuki, M., Mizuno, J. and Inoue, M. : Isolation and physiological characterization of *Streptococcus milleri* strains from human dental plaque, *J. Med. Microbiol.*, (submitted for publication), 1987.
 - 15) Mejäre, B. : On the facultative anaerobic streptococci in infected dental root canals in man, *Odont. Rev.*, **26** ; 33, 1975.
 - 16) Bannatyne, R. M. and Randall, C. : Ecology of 350 isolates of group F streptococcus, *Am. J. Clin. Pathol.*, **67** ; 184, 1977.
 - 17) Drucker, D. B. and Green, R. M. : The relative cariogenicities of *Streptococcus milleri* and other viridans group streptococci in gnotobiotic hooded rats, *Archs. Oral Biol.*, **23** ; 183, 1978.
 - 18) Yakushiji, T., Konagawa, R., Oda, M. and Inoue, M. : Serological variations of oral *Streptococcus milleri*, *J. Med. Microbiol.*, (submitted for publication), 1987.
 - 19) Rantz, L. A. and Randall, E. : Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping, *Stanford Med. Bull.*, **13** ; 290, 1955.
 - 20) Trevelyan, W. E. and Harrison J. S. : Studies on yeast metabolism, *Biochem. J.*, **63** ; 23, 1956.
 - 21) Ghuysen, J.-M., Tipper, D. J. and Strominger, J. L. : Enzymes that degrade bacterial cell walls, *Methods in Enzymology*, Vol. VIII, (ed. Neufeld, E. F. and Ginsburg, V.), Academic Press, New York, 1966, p. 685.
 - 22) Lowry, O. H., Roberts, N. R., Leiner, K. Y., Wu, M.-L. and Farr, A. L. : The quantitative histochemistry of brain, *J. Biol. Chem.*, **27** ; 1, 1954.
 - 23) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193** ; 265, 1951.
 - 24) Griggs, L. J., Post, A., White, E. R., Finkelstein, J. A., Moeckel, W. E., Holden, K. G., Zarembo, J. E. and Weisbach, J. A. : Identification and quantitation of alditol acetates of neutral and amino sugars from mucins by automated gas-liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, **43** ; 369, 1971.
 - 25) Sloneker, J. H. : Gas-liquid chromatography of alditol acetates, *In* : *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. VI, (ed. Whistler, R. L. and BeMiller, J. N.), Academic Press, London, 1972, p.20.
 - 26) 薬師寺毅, 水野 純, 井上昌一, 古賀敏比古, 浜田茂幸 : *Streptococcus milleri* NCTC 10708 株の糖質抗原の精製と性状, 歯基礎誌, **25** ; 225, 1983.
 - 27) Appelbaum, B. and Rosan, B. : Antigens of *Streptococcus sanguis*: purification and characterization of the b antigen, *Infect. Immun.*, **21** ; 896, 1978.
 - 28) Knox, K. W. and Wicken, A. J. : Non-specific inhibition of the precipitin reaction between teichoic acids and antisera, *Immunochem.*, **10** ; 93, 1973.
 - 29) Ottens, H. and Winkler, K. C. : Indifferent and haemolytic streptococci possessing group-antigen F, *J. Gen. Microbiol.*, **28** ; 181, 1962.
 - 30) Willers, J. M. N., Michel, M. F. and Huys in 't Veld, J. H. J. and Alderkamp, G. H. J. : The type antigen III of group F streptococci, Separation of group and type antigens and partial characterization of type III antigen, *Antonie van Leeuwenhoek*, **39** ; 369, 1973.
 - 31) Willers, J. M. N., Michel, M. F., Sysma, M. J. and Winkler, K. C. : Chemical analysis and inhibition reactions of the group and type antigens of group F streptococci, *J. Gen. Microbiol.*, **36** ; 95, 1964.
 - 32) Willers, J. M. N., Michel, M. F. and Bennis, R. : Immunochemical studies of type IV

- and two group-like (Z) carbohydrate antigens of minute streptococci, *Antonie van Leeuwenhoek*, **39** ; 609, 1973.
- 33) Michel, M. F., Vonno, J. V. and Krause, R. M. : Studies on the chemical structure and the antigenic determinant of type II antigen of group F streptococci, *J. Immunol.*, **102** ; 215, 1969.
- 34) Willers, J. M. N., Ottens, H. and Michel, M. F. : Immunochemical relationship between *Streptococcus* MG, FIII and *Streptococcus salivarius*, *J. Gen. Microbiol.*, **37** ; 425, 1964.
- 35) 鳥居光雄, 檜山 登 : 生化学実験講座 4, 糖質の化学—上, (日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, 1976, 211頁.
- 36) Hamada, S. and Slade, H. D. : Purification and immunochemical characterization of type *e* polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*, *Infect. Immun.*, **14** ; 68, 1976.