原 著

Streptococcus species 6480株の諸性状と 実験ウ蝕抑制効果

Characteristics of *Streptococcus* species 6480
and its inhibitory effect on experimental caries

鶴 水 隆* 清 水 晴 美* 小 此 木 博*
橋 本 喬* 渋 沢 辰 巳* 佐 藤 誠**

Takashi TSURUMIZU *, Harumi SHIMIZU *, Hiroshi OKONOGI *,
Takashi HASHIMOTO *, Tatsumi SHIBUSAWA * and Makoto SATO **

Received March 22, 1989; accepted May 10, 1989

Abstract: After approximately 150 subcultures in the skimmed milk medium, we found a characteristically outstanding variant, designated as *Streptococcus* sp. 6480, from the parent strain *Streptococcus* NC 49, isolated previously from human dental plaque, lacking the ability to produce extra-cellular polysaccharides from sucrose.

Streptococcus sp. 6480 failed to produce acid from mannitol and sorbitol, whereas NC 49 as well as *S. mutans* produced it. The variant cells agglutinated slightly in anti-*S. mutans* serum but strongly in anti-*Streptococcus* sp. ATCC 15910 serum, though NC 49 cells agglutinated positively in anti-*S. mutans* NCTC 10449 serum.

Streptococcus sp. 6480 as well as its parent strain was not cariogenic in hamsters. When applied into the oral cavity of hamsters which were infected with *S. mutans* NCTC 10449, *Streptococcus* sp. 6480 significantly inhibited the induction of dental caries by *S. mutans*.

索引用語: *Streptococcus species* 6480, *Streptococcus mutans*, ウ蝕抑制, 実験ウ蝕

Key words: *Streptococcus species* 6480, *Streptococcus mutans*, Caries inhibition, Experimental caries

緒 言

著者らは、以前に、人の口腔細菌叢を検索中、乳幼児・小児(0~9歳)204名中4名、成人109名中5名より、シ

ョ糖からの不溶性多糖体産生能は低い、糖分解能をはじめその他の諸性状が *Streptococcus mutans* に類似している菌株を分離し、報告した¹⁾。本菌株は、分離当初、菌体凝集反応にて抗 *S. mutans* C 型血清に凝集を示

* 北里研究所

** 徳島大学歯学部予防歯科学教室

* Kitasato Institute

** Department of Preventive Dentistry, The University of Tokushima School of Dentistry (Director: Prof. Ryo NAKAMURA)

し、且つ著者らが *S. mutans* から人工的に誘導した変異株の生化学的性状に似ていたことから²⁾、同菌は *S. mutans* の変異株 (mutational phase) と考えた。

ところが、その後本菌株の継代培養を重ね、その都度、不溶性多糖体産生の特に少いとみられるコロニーを選択し、継代を繰り返したところ、生化学的・血清学的性状が、分離当初の本菌株と部分的に異なる菌株が得られた。またその菌株自身は、ウ蝕原性がほとんど認められず、本菌をウ蝕原性の *S. mutans* とともに実験動物に投与すると、ウ蝕発生の抑制効果が認められたので報告する。

方 法

1. *Streptococcus* sp. 6480 株 (以後 sp. 6480株) の分離

親株として、前報告¹⁾で、49 と命名された株 (以後 NC 49株) を用いた。この菌株を 5 % スキムミルク (雪印) 0.5 % イーストエキス (Difco) 加培地 (以後スキムミルク培地) に 37°C 24 時間継代培養を数回繰り返し、一旦 TYC 寒天平板培地³⁾ (極東製薬) に接種し、Gas Pak System (BBL) により 37°C 48 時間培養後、発育したコロニーを実体顕微鏡下 (×7) で観察した。形態学的に、特に多糖体産生の少いコロニーを選び、さらにスキムミルク培地で継代を繰り返し、約 100 代に及んだ時点での菌株を実験に供した。

また、以後の諸性状検査において、特にことわりのないかぎり、培養は全て Gas Pak System (BBL) にて嫌氣的条件下で行った。

2. 生化学的性状検査

溶血性

5 % 綿羊血液寒天平板培地 (極東製薬) に好氣的ならびに嫌氣的に 37°C 48 時間培養後、室温に 24 時間放置して判定した。

過酸化水素産生能

0.01 % ペンチジン加 5 % 綿羊血液寒天平板培地に 37°C 48 時間培養後、コロニー周辺の培地の黒変を指標に判定した。

菌体外多糖体産生能

5 % ショ糖加 Trypticase Soy broth (BBL) 5 ml に 37°C 48 時間培養後遠心上清に等量のエタノールを加え、生じる白濁の有無で判定した。

糖分解能

CTA 培地 (BBL) に各種糖を 0.5% に加え、3 ml ずつ分注した培地を菌株を穿刺し、37°C 48 時間培養後、

酸の生成を培地の黄変を指標として判定した。アルギニン、エスクリン加水分解能はアルギニン培地およびエスクリンブイヨンに 37°C 7 日間培養後、判定した。

有機酸生能

Glucose 含量が 50mM になるように調製した Trypticase Soy broth を用い佐藤ら⁴⁾の方法に従って測定した。

3. 血清学的性状検査

抗血清の作成

Table 3 に掲げる 20 株 (*S. mutans* NCTC 10449, OMZ 176, B 14, OMZ 175, OMZ 65; *S. sanguis* ATCC 10556, ATCC 10557, ATCC 10558, ST-7, ATCC 15909, ATCC 15914; *S. mitis* 903, 6249, 9811, 9895; *Streptococcus* sp. ATCC 9895, ATCC 1590, ATCC 15910, ATCC 15912, ATCC 15913) に対する家兎免疫血清を作成した。各菌体を TPY 培地 (極東製薬) にて 37°C 18 時間培養し、遠心集菌後生理食塩水で一度洗浄し、同食塩水に浮遊させ、60°C 30 分間加熱し不活性化した。これを同食塩水にて 550nm OD 1.0 になるように調製したものを抗原として、家兎の耳静脈内に、1 日おきに第 1 週は 0.25ml, 第 2 週は 0.5ml, 第 3, 第 4 週は 1 ml ずつ注射し、更に 1 週間後に 2 ml 注射し、1 ~ 2 週間後に試血、力価確認後全採血し、血清を分離した。

得られた抗血清は、後述のゲル内沈降反応を行ない、各 *Streptococcus* 種内菌株間に交叉反応が認められたものは、吸収操作を繰り返し、因子血清を作成した。吸収用菌体は、TPY 培地で 37°C 18 時間培養し、洗浄後凍結乾燥し用いた。吸収は抗血清に乾燥菌体を加え、ミキサーで攪拌後、37°C 1 時間恒温槽に入れ、ついで 4°C で一夜静置した後遠心して吸収血清を得た。

抗原の調整

Rantz and Randall 法⁵⁾及び Kholy らの方法⁶⁾で菌体より抗原を抽出した。Rantz and Randall 法では、sp. 6480 株および *S. mutans* NCTC 10449 株を TPY 培地に 37°C 24 時間培養し、遠心集菌及び水洗後、凍結乾燥した菌体を 20mg/ml の割合に生理食塩水に懸濁し、120°C 20 分間オートクレーブした後の遠心上清を抗原とした。また Kholy らの方法では TPY 培地に 37°C 24 時間培養後の菌体 800mg に生理食塩水 2 ml, 4M 亜硝酸ナトリウム 4 ml および酢酸 0.1ml を加え、室温で 1 時間振盪したのち、12,000rpm にて遠心した上清を pH 7.5 に補正し、一旦凍結乾燥し 10mMPBS を用いて Sephadex G25 によるクロマト分画し、糖抽出抗原を得

た。

ゲル内沈降反応

上記の両抗原及び血清を用いて1%アガロース加0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.3 によるゲル内沈降反応を行なった。反応後、沈降線の明確度を観察し、沈降線が全く現われない場合を－, 不明瞭な場合を±, 認められる場合を+, 鮮明な場合を++とする4段階で評価した。

4. 実験ウ蝕誘発能試験

まず、マルトース, マルチトール, ショ糖脂脂肪酸エステル, ビタミンパウダー, 香料等を含む1個2gの錠剤を作成し、錠剤中に sp 6480株を 10^2 , 10^4 , 10^6 /錠の菌数を含む試料を調整した。なお試料の調整はライオン株式会社食品開発研究室にて行なわれた。

生後21日齢のゴールデンハムスター（北里研究所コロブドコロニー）を Table 4 に示すように各群10匹ずつ6群に分け、最初の2日間、硫酸ストレプトマイシン, 硫酸カナマイシンを各100 μ g/ml 含む飲料水を与えて、口腔内細菌叢を抑制した。次いで、1群及び6群を除く各群のハムスターに *S. mutans* NCTC 10449 株の Todd Hewitt broth (BBL) 37°C 18時間培養菌体を生理食塩水に 10^6 /ml になるように浮遊させた菌液を、0.2 ml ずつ3日間連続に口腔内投与した。その後6群を除く各群ごとに、Table 4 に示すように sp 6480株を各菌数含む錠剤を1日に1個/匹ずつ40日間連続して与えた。すなわち1群および2群には、 10^6 /錠を、3群には 10^4 /錠を、4群には 10^2 /錠を、5群には菌を含まない錠剤を投与した。投与方法は、各錠剤を1匹に1個ずつ12時間与え、その後 Diet 2000⁷⁾を12時間自由に摂取させる方法を繰り返した。飲料水は、実験期間中滅菌脱イオン水を自由に摂取させた。飼育は、アルミニウム製ラットケージ MR-1 (26×38×20cm) にハムスターを5匹ずつ入れ、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $40 \pm 10\%$, 換気30回/時間の条件下で行なった。

試験終了時に各ハムスターを炭酸ガス下で殺し、上下顎を剔出後、白歯を Red Cote (Butler) で染色し、武井の方法⁸⁾に準じて plaque score を算定した。その後、Keyes の方法⁹⁾に従ってウ蝕の観察を行ない、caries score を算定した。

結 果

1. 生化学的性状

sp. 6480 株の生化学的性状は Table 1 に示した如く、菌体外多糖体産生は陰性で、Salicin, raffinose, cerobiose および inulin は分解するが、mannitol, sorbitol お

Table 1 Biochemical characteristics of *Streptococcus* sp. 6480 and its parent strain NC 49

	sp. 6480	NC 49*
Hemolysis	γ	NT
Production of		
H ₂ O ₂	—	NT
Glucan	—	—
Fermentation of		
Salicin	+	+
Mannitol	— $\sim$ ±	+
Sorbitol	— $\sim$ ±	+
Melibiose	— $\sim$ ±	+
Reffinose	+	+
Cerobiose	+	+
Inulin	+	NT
Hydrolysis of		
Arginine	—	—
Esculin	—	—

* Reported results quoted from Reference¹⁾.
NT: not tested.

Table 2 Acid fermentation products of *S. mutans* NCTC 10449 and *Streptococcus* sp. 6480

	<i>S. mutans</i> NCTC 10449	sp. 6480
Lactic acid	2.72mM	2.16mM
Acetic acid	0.18	ND
Formic acid	ND	ND

ND: not detectable.

よび melibiose, esculin の分解能は微弱か陰性であった。arginie 加水分解能は陰性を示した。これを NC 49 株の性状と比較すると、NC 49株では mannitol, sorbitol, melibiose の分解がいずれも陽性を示したのに対し、sp. 6480 株では、これら3種の糖分解が陰性を示し両株の違いが認められた。sp. 6480 株と *S. mutans* NCTC 10449 株をそれぞれ50mM glucose 加 Trypticase Soy broth にて、37°C 24時間培養を行い、上清中に産生される有機酸量をガスクロマトグラフィーで計測したところ、Table 2 に示した如く対照とした *S. mutans* は乳酸、酢酸を産生したが、sp. 6480 株は乳酸のみを産生した。しかし、乳酸産生能には、両株で大きな違いは認められなかった。

2. 血清学的性状

Table 3 Serological reactions between antigen extracts of *S. mutans* or *Streptococcus* sp. 6480 and antisera against various streptococci.

Antisera	Antigens	
	<i>S. mutans</i> NCTC 10449	sp. 6480
<i>S. mutans</i> NCTC 10449	+	±
OMZ 176	—	—
B 14	—	—
OMZ 175	—	—
OMZ 65	—	—
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556	—	—
ATCC 10557	—	—
ATCC 10558	—	—
ST-7	—	—
ATCC 15909	—	—
ATCC 15914	++	—
<i>S. mitis</i> 903	—	—
6249	—	—
9811	++	—
9895	—	—
<i>Streptococcus</i> sp. ATCC 9895	—	—
ATCC 1590	—	—
ATCC 15910	+	++
ATCC 15912	—	—
ATCC 15913	—	—

* Intensity of spur formation ranged from —, no spur formation, to, ++, the clearest spur formation.

S. mutans NCTC 10449 及び sp. 6480 両株よりの抽出抗原と *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis* 及び *S. sp.* に対する各因子血清とのゲル内沈降反応の結果, Table 3 に示すごとく両菌株の血清学的性状は異なり, sp. 6480 株は *S. sp.* ATCC 15910 に対する因子血清と強く反応し *S. mutans* NCTC 10449 に対する因子血清との反応は微弱であった。また, ゲル内沈降反応のパターンは Rantz and Randall 法による抽出抗原も Kholylar の方法による糖抽出抗原を用いても同様であり, 抽出法による違いは認められなかった。

3. ウ蝕誘発能

sp. 6480 株を 10^6 / 錠含む試料のみ与えた 1 群では, Table 4 に示す如く plaque score 及び caries score の平均値がそれぞれ, 3.5, 0.6 であり, 対照群である 6 群の両 score 4.3, 0.6 と全く差は認められなかった。

S. mutans を口腔内に投与し, 続いて, sp. 6480 株をそれぞれ 10^6 , 10^4 , 10^2 , 0 / 錠, 含む錠剤を与えた 2, 3, 4, 5 群においては, 4, 5 群に比して, 2, 3 群

で有意に低い plaque score を示した ($p < 0.01$)。caries score は plaque score と同様に sp. 6480 株を多く含む試料を与えた群ほど, すなわち 5, 4, 3, 2 群の順に低い値を示した。特に, sp. 6480 株を全く含まない錠剤を与えた 5 群では, caries score が 39.1 と高く, sp. 6480 株を含む試料を与えた 2, 3, 4 群の caries score は 2.6, 7.5, 13.0 といずれも 5 群に比べて有意に低い値を示した ($p < 0.01$)。

考 察

S. mutans は, 人工培地で継代培養中に, コロニー形態などの性状が変化しやすいことはよく知られている¹⁰⁾。また, 各種の変異誘導物質を用いて, *S. mutans* のもつさまざまな形質を人為的に変異させ, *S. mutans* の病原性に関する因子の解明が試みられてきた^{11, 12)}。この中で, 最も多くの研究者によって分離され, 研究されているものは, グルコシルトランスフェラーゼ (G-Tase) 欠損変異株である。著者らも, *S. mutans* にナ

Table 4 Effect of inoculation of increased numbers of *Streptococcus* sp. 6480 on experimental caries

Group	No. of hamsters	Infection with Inoculated		Mean Plaque score	Mean Caries score
		<i>S. mutans</i> NCTC 10449	numbers of sp. 6480		
1	10	—	10 ⁶ *	3.5	0.6
2	10	+	10 ⁶	6.4	2.6
3	10	+	10 ⁴	14.1	7.5
4	10	+	10 ²	32.8	13.0
5	10	+	—	22.9	39.1
6	10	—	—	4.3	0.6

* Numbers of sp. 6480 in a tablet. A hamster of each group had one tablet per day.

$p < 0.01$.

イトロジェンマスタード処理によって、GTase 活性が低く、したがってショ糖からの不溶性多糖体産生能は低下したが、生化学的諸性状や血清学的性状は親株と同様の変異株を分離した²⁾。したがって著者らは、GTase 活性が低く、不溶性多糖体産生能は低下しているが、菌体凝集試験にて抗 *S. mutans* 血清に凝集を示す *Streptococcus* 属の菌を人の口腔内より分離した当初はこの菌株は *S. mutans* の変異株の一種と考えた。

ところが、その中の NC 49株について、スキムミルク培地での馴化培養と、TYC 寒天平板培地上で不溶性多糖体産生の少いコロニーの選択操作を 150 代に渡って繰り返して、純化したところ、1 部の生化学的性状や血清学的性状が親株の NC 49株と異なる性状を示すようになった。

すなわち、糖分解能においては、NC 49株が分解をした糖のうち、mannitol, sorbitol, melibiose の分解能が微弱あるいは陰性に変化し、特に *S. mutans* 同定¹²⁾の鍵性状である mannitol, sorbitol 分解能が陰性化した。血清学的性状については、今回新たに American Type Culture Collection (ATCC) より入手した各口腔 *Streptococcus* 属各菌株に対する家兔免疫血清を作成し、比較検討した。分離当初 NC 49株は、生菌を抗原として菌体凝集試験を行なったが、今回は *Streptococci* の血清学的分類に頻用される Rantz and Randall 法⁵⁾及び Kholy らの方法⁶⁾により菌体より糖抗原を抽出し、得られた血清との間で、ゲル内沈降反応を実施した。その結果、得られた菌株は、抗 *S. mutans* NCTC 10449 (serotype c) 血清とは、沈降線をほとんど形成せず、抗 *S. sp. 15910* 血清に強い反応を示し、*S. mutans* NCTC

10449株とは、かなり違った性状を示した (Table 4)。

口腔内細菌においては、多くの菌種が、継代培養中に自然の変異を起こすことが報告されており¹⁴⁻¹⁷⁾、今回得られた菌株も NC 49株の変異株と考えられるものの、上述の糖分解能や血清学的性状から、もはや *S. mutans* とは同定し難い理由によって、*Streptococcus* sp. 6480 株と命名した。

ところで、著者らが *S. mutans* より得た GTase 活性の低下した誘発変異株 (mutational phase III) は、それ自身実験ウ蝕誘発能を欠き、さらにウ蝕誘発性の *S. mutans* と同時に投与すると、ウ蝕誘発が阻害されたことから、今回得られた sp. 6480株についても、ハムスターに対する実験ウ蝕誘発能について検討を加えた。なお、本研究においては、ハムスターへの sp. 6480株の投与には、同菌の一定菌数を含む錠剤を作成して用いた。その結果 sp. 6480 株を投与した群 (1 群) の caries score は、対照群 (6 群) のそれと全く差が認められず、sp. 6480株自身にウ蝕誘発能のないことが確認された。また *S. mutans* をあらかじめ投与したハムスターに、sp. 6480株を投与したところ、同菌を 10², 10⁴ および 10⁶/錠含む錠剤を投与した 4, 3, 2 群では、含有菌数の多い錠剤を投与した群ほど caries score が低い結果が得られた。また plaque score も、10²/錠を与えた 4 群で、やや高い値を示したが、他の 3, 2 群では低い値を示した。以上のことから、sp. 6480株を 10⁴ 及び 10⁶/錠を含む錠剤を投与することにより、plaque 付着と *S. mutans* による実験ウ蝕誘発に対して強い抑制効果を示すことが確認された。

sp. 6480 株と *S. mutans* との相互作用については、

両菌株の同調培養において、*S. mutans* の増殖が極度に低下することや、sp. 6480株が *S. mutans* をはじめ口腔 *Streptococcus* 属の作る多糖体に、よく付着増殖することなどを観察している（未発表）が、sp. 6480株による、*S. mutans* 起因のウ蝕誘発の抑制のメカニズムについては、今後、詳細に検討を加える必要があると考えている。

文 献

- 1) 佐藤 誠, 尾崎文子, 本間敏道, 岡田昭五郎, 鶴水 隆: 人歯垢中の *Streptococcus mutans* (mutational phase III) 様菌の分離に関する研究. 口腔衛生会誌, 32; 504, 1983.
- 2) Tsurumizu, T., Sato, M. and Ozaki, F.: A study of mutational phase of *Streptococcus mutans*: Isolation and properties of mutational phases of *Str. mutans*, 口腔衛生会誌, 32; 378, 1982.
- 3) De Stoppelaar, J. D., van Houte, J. and de Moor, C. E.: The presence of dextran-forming bacteria, resembling *Streptococcus bovis* and *Streptococcus sanguis*, in human dental plaque, Archs oral Biol., 12; 1199, 1967.
- 4) 佐藤 誠, 尾崎文子, 鶴水 隆: *Streptococcus mutans* NCTC 10449変異株(mutational phase III株)の歯質利用性とグルコース代謝, 口腔衛生会誌, 33; 48, 1983.
- 5) Rantz, L. A. and Randall, E.: Use of auto-claved extract of hemolytic *Streptococci* for serological grouping, Stanford Medical Bull., 13; 290, 1955.
- 6) Kholy, A. E., Wannmarker, L. W. and Krause, R. M.: Simplified extraction procedure for serological grouping of beta-hemolytic *Streptococci*, Applied Microbiol., 28; 836, 1974.
- 7) 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, 1964.
- 8) 武井啓一: ラットの早期出歯歯牙の齲蝕感受性に関する研究, 口腔衛生会誌, 32; 524, 1983.
- 9) Keyes, P. H.: A method of recording and scoring gross carious lesions in the molar teeth of syrian hamster, J. Dent. Res., 23; 439, 1944.
- 10) Edwardsson, S.: The caries-inducing property of variants of *Streptococcus mutans*, Odont. Revy, 21; 153, 1970.
- 11) 古賀敏比古, 井上昌一, 浜田茂幸: *Streptococcus mutans* の突然変異 I. 主要ビルレンス因子を欠落した変異株, 歯界展望, 61; 463, 1983.
- 12) 古賀敏比古, 井上昌一, 浜田茂幸: *Streptococcus mutans* の突然変異 II. 齲蝕誘発修飾因子の変異株, 歯界展望, 61; 673, 1983.
- 13) 増田典男: *Streptococcus mutans* の分離と型別, う蝕と歯周病—研究の進歩—第1巻, 浜田茂幸編集, 日本歯科評論社, 東京, 初版, 1982, 14頁.
- 14) Hammond, B. F., Steel, C. F. and Peindl, K. S.: Antigens and surface components associated with virulence of *Actinomyces viscosus*, J. Dent. Res., 55; A19, 1976.
- 15) Tam, Y. -C. and Chan, E. C. S.: Phase variation of hyaluronidaseproducing *Peptostreptococci* associated with periodontal disease, J. Dent. Res., 62; 1009, 1983.
- 16) Mckee, A. S., McDermid, A. S., Wait, R., Baskerville, A. and Marsh, P. D.: Isolation of colonial variants of *Bacteroides gingivalis* W50 with a reduced virulence, J. Med. Microbiol., 27; 59, 1988.
- 17) Rosan, B., Slots, J., Lamont, R. J., Listgarten, M. A. and Nelson, G. M.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fimbriae, Oral Microbiol. Immunol., 3; 58, 1988.