Streptococcus mutans の菌体外グルカンの産生と分解 ならびに細胞形態に及ぼすデキストラナーゼの作用

浜 田 茂 幸

大阪大学歯学部 口腔細菌学教室*

水 野 純 大 嶋 隆 増 田 典 男
祖 父 江 鎮 雄

大阪大学歯学部 付属病院小児歯科診療室*

村 山 洋 二

大阪大学歯学部 口腔治療学教室*

〔受付：昭和50年2月17日〕

抄録：デキストラナーゼ AD 17は市販の標準デキストランを基質とした時、著明な加水分解作用を示した。一方、*S. mutans* の産生する菌体外デキストランに対しては、遊離還元糖の定量、および酵素的水解産物の薄層クロマトグラフィーのパターンから判定する限り、その作用域は大きな限定を受けていた。しかしそれにもかかわらず、AD 17の存在によつて各種血清型に属する *S. mutans* の蔗糖加ブロース中での継代培養による人工プラーク形成はいくつかの例外を除いて、著明に抑制された。またいったん形成された人工プラークも AD 17の作用によつて付着を阻止される菌株が多くみられた。さらに走査型電子顕微鏡観察による菌体表面の形態学的研究の結果でも、AD 17を蔗糖加ブロースへ添加することによって粘着性菌体外多糖に基くと考えられる英膜様物質の形成が認められなかった。これらの所見は、*S. mutans* 菌体の自由表面への付着が、デキストラナーゼに感受性のグルコシド結合に依存していることを示唆し、また動物実験における AD 17のウ蝕抑制作用をも説明するものと考えられる。

序 言

Streptococcus mutans がウ蝕原性を発現するにさいして関連を有する特徴的な性状として、粘着性菌体外多糖の産生能が大きな注目を集めている。この多糖はグルカンを主とし、菌株によってはフルクタンを様々の割合で含むことが明かにされている^{1,2)}。菌株、調製方法の差によってこれまでの報告には大きな違いがあるが、グルカンは様々な割合で $\alpha(1\rightarrow6)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ 結合したグルコースのポリマーであることが解明された³⁻⁶⁾。フ

ルクタンは従来 $\beta(2\rightarrow6)$ 結合したレバン様構造と考えられていたが、実は $\beta(2\rightarrow1)$ 結合のフルクトースのポリマーであることが最近強く示唆されている⁶⁾。なかでも菌体外グルカンは *S. mutans* の歯面への付着能を担い、ひいては平滑面ウ蝕の発生に必須の因子と目され、事実このグルカン産生能を減少ないし喪失した突然変異株のウ蝕原性は低下することが動物実験でも確認されている^{7,8)}。

この特性を逆手にとって、グルカンの産生を抑制、ないしは産生されたグルカンを分解すること

Effects of dextranase on the production and degradation of extracellular glucans from *Streptococcus mutans* and morphological changes of *S. mutans* cells by dextranase treatment.

Shigeyuki HAMADA (Department of Oral Microbiology, Osaka University Dental School, Osaka), Junn MIZUNO, Takashi OOSHIMA, Norio MASUDA, Shizuo SOBUE (Pedodontic Clinic, Osaka University Dental School, Osaka) and Yoji MURAYAMA (Department of Oral Medicine, Osaka University Dental School, Osaka)

* 大阪市北区常安町 32 (〒 530)

Jap. J. oral Biol., 17: 142-155, 1975.

によるウ蝕予防の試みがこれまでにいくつか報告されている⁹⁾。前報において我々は *Spicaria violacea* の1株が産生する菌体外デキストラナーゼ [$\alpha(1\rightarrow6)$ グルカナーゼ]の部分精製標品(以下AD 17と略)が、3株の血清学的性状を異にする *S. mutans* によるラット実験ウ蝕を抑制するという結果をえた¹⁰⁾。また Murayama ら¹¹⁾は本標品を持続的に人の口腔に作用させると、対照群と比べてプラークの沈着が統計的に有意の差で減少すると報告した。以下上述の *in vivo* の効果が、*in vitro* 実験でどのように反映されるかを主として化学的、および走査型電子顕微鏡(以下SEMと略)による形態学的方法で検討したものである。

材料と方法

1. 人工プラーク形成抑制作用

S. mutans による試験管内プラーク形成阻止・抑制作用を調べるため、McCabe, Keyes, Howell¹²⁾の方法を応用した Fitzgerald, Spinell, Stoudt¹³⁾の報告を参考にして以下の実験を試みた。即ち5%蔗糖、0.5%酵母エキス(Difco)を含む Trypticase Soy ブロース(BBL)(以下この培地をTSYSと略)を調製し、その4mlを内径10mm、高さ100mmの滅菌試験管に分注して2群にわけた。なお蔗糖溶液は培地とは別に120°C、15分間加熱滅菌後無菌的に加えた。次に1群の分注済試験管にロ過滅菌したAD 17(400 Tsuchiya 単位/ml)の水溶液を0.1ml 加え、一方対照群は無添加のTSYS培地を用いた。対照群については、別の実験で、加熱不活化したAD 17溶液を加えたTSYS培地との間に差違が認められないことを確認した。

被験菌としては日本人小児から様々の割合で検出される血清型に属する *S. mutans* を選んだ¹⁴⁾。すなわち *S. mutans* MT 6 R, MT 118 R (以上 Bratthall¹⁵⁾ 血清型 *c* に属する), MT 615 R, OMZ 176 (同 *d* 型), MT 703, LM 7 (同 *e* 型)である。さらに比較対照の目的で HS 6 (*a*), FA 1 (*b*), OMZ 65 (*g*)¹⁶⁾, SE 11 (*f*)¹⁶⁾等の菌株についても検討を加えた。これら各菌株をTSYSブロースに18時間培養し、その0.1mlを上記2群の培地にそれぞれ接種した。ついで直ちに加熱滅菌

したコバルトクローム線(歯科矯正用、0.8 mm ϕ $\times$ 90 mm, 三金工業, 大阪)をつるし、37°Cで静置培養した。この操作を連続5日間新たな培地で繰り返した後、ワイヤ壁に付着した人工プラークをワイヤーごと10%ホルマリン水中で1時間固定し、その付着の程度により-, 土, +, 2+, 3+, 4+の6段階に評価判定した。

2. 人工プラークの除去作用

前項の方法で作製した各菌株の人工プラークを10単位/mlの割合にAD 17を含有する酢酸緩衝液(pH 5.8)中に浸し37°Cで一晩静置した。プラークの状態を観察記録後、同一試験管立に配列した被験プラーク入りの試験管を軽く振動させてプラークのワイヤよりの脱落状態を再び観察記録した。

3. 菌体外多糖の調製

TSYS 培地100mlに一夜培養菌液を1ml 接種し、37°Cで48時間静置培養した。培養菌液は10,000 $\times$ gで30分間、4°Cで遠心後菌体と上清とに分離した。培養上清には2倍量のエタノールを加え、4°Cで1夜放置後生じた沈澱を10,000 $\times$ gで30分間、4°Cで遠心して集めた。この沈澱に50mlの脱イオン水を加え、超音波発生装置で十分懸濁ないし溶解後60°C、30分間静置し、10,000 $\times$ g、60分間遠心した。上清に2倍容のエタノールを加え、これを水溶性菌体外多糖(画分I)とした。沈澱は20mlの0.2N KOHに懸濁攪拌し、さらに60°C、30分間静置し、同様の遠心を行い、上清をアルカリ可溶性菌体外多糖(画分II)、沈澱をアルカリ不溶性菌体外多糖(画分III)とした。各画分は67%エタノールで3回洗滌後凍結乾燥して用時まで保存した。

一方菌体は100mlの生理食塩水で2回洗滌後、20mlの0.2N KOHで60°C、30分間処理し、ついで2N HClの添加により中和した。次で10,000 $\times$ g、60分間遠心して菌体を除き、その上清に2倍容のエタノールを加え1夜4°Cで放置後再び遠心し沈澱を菌体結合性多糖(画分IV)とした。

次にデキストラナーゼAD 17の存在下における *S. mutans* の多糖産生能を調べる目的で、TSYS 培地に最終濃度が10単位/mlになるようにロ過滅菌したAD 17水溶液を無菌的に加え、

非添加の対照群と共に37°C, 48時間培養した。培養後遠心によって培養上清と菌体とに分離し、上清には1.5倍容のエタノールを加え、上述の方法で培養上清多糖画分をえた。また菌体は20mlの0.2N KOHに懸濁後60°C, 30分間処理し、ついで遠心して菌体を集めた。上清を2N HClによって中和後、1.5倍容のエタノールを加え、生じた沈澱(菌体結合性多糖画分)を67%エタノールで3回洗い、凍結乾燥した。各画分の量的比較は一定量の脱イオン水に浮遊後、超音波発生装置(トミー UP 150 P)で3分~15分間処理し、均等な懸濁~水溶液とした後、化学定量によって総ヘキソース量を測定することにより行った。

4. AD 17による菌体外多糖各画分の分解

Murayama ら¹¹⁾の方法に従い多糖画分I~IVのAD 17による加水分解の程度を還元糖の遊離により測定した。反応は0.1M, pH 5.8の酢酸緩衝液中で行い、AD 17を多糖各画分1mgあたり20単位の割合で加え、24時間、37°Cで作用後、遊離還元糖の測定を行った。なお防腐剤として最終濃度0.1%のアジ化ナトリウムを添加した。

5. 化学分析

総ヘキソースはグルコースを標準としてアンスロン法¹⁷⁾により行った。フルクトースの定量は冷アンスロンを用いるHandelの方法¹⁸⁾およびレゾルシノール・塩酸を用いるRoeの方法¹⁹⁾により定量した。蛋白質量は牛血清アルブミンを標準としてLowryら²⁰⁾の方法により測定した。還元糖はグルコースを標準としてParkとJohnsonの方法で定量した²¹⁾。また多糖各画分の構成糖を検討する目的で、各画分を1.5N HClで0.5, 1, 2, 4時間加水分解し、その適当量を0.02M酢酸ナトリウムで懸濁凝固させたKieselgel G (Merck) 薄層、および水で懸濁凝固させたKieselgur G (Merck) 薄層にスポットした。前者はアセトン、水を9:1に含有する溶媒²²⁾で、後者はエチルアセテート、イソプロパノール、水を16:6:3に含む溶媒²³⁾でそれぞれ2回および3回繰り返し室温で展開した。各構成糖はジフェニルアミン・アニリン試薬²⁴⁾を噴霧し、80°Cで10~15分間加熱発色させてスポットを検出した。

6. 走査型電子顕微鏡による*S. mutans*の形

態学的観察

被験 *S. mutans* を Trypticase Soy ブロース (TS), および5%蔗糖加 TS ブロース (TSS) および10単位/mlの割合でAD 17を含むTSS培地で24~48時間静置培養し、生食水で1回、水で2回洗滌後、適当量の懸濁液をカバーガラス上に滴下し自然乾燥させた。ついであらかじめ0°Cに冷却した2.5%グルタルアルデヒド溶液(市販25%原液, 和光純薬, と0.2Mリン酸緩衝液, pH 7.0, 水を1:2.5:6.5の割合で混合希釈した)を乾燥標品上に滴下した。数回同溶液を変えながら0°C, 1時間グルタルアルデヒド固定を行った。固定後各100mlの冷生食水および脱イオン水にカバーガラスを順次浸し、スターラーでゆっくりと攪拌しながら洗滌操作を行い、再び自然乾燥させた。次で約100Åの厚さの金蒸着を施した後、SEM (SM 2型, 日本電子)で検鏡・写真撮影を行った。

7. SEMによる人工プラークの形態学的観察

抜去後ただちに生食水に冷却保存した乳前臼歯のうち唇側傾平滑面の健全な歯牙を選び浮石末で清掃後、超音波処理を短時間行って付着物を除いた。次で5mm四方の平滑面を露出する歯牙片を作製し、歯科用ドリルで保持形態を平滑面の反対側に与えてワイヤでつるし、生食水に浸し120°C, 15分間の加熱滅菌を行った。別に前項で述べたTSS培地およびAD 17を10単位/mlの割合で含有するTSS培地を作製し、10mmφ×100mmの試験管に各5mlずつ分注し、1夜培養の被験菌液、0.1mlを加え、ついで滅菌歯牙片を浸し、37°Cで所定の時間培養し、いくつかの実験群については継代培養を行い、歯面上の*S. mutans*純培養よりなる人工プラークの形成、あるいは形成抑制能をみた。上記の処理後、歯牙片を0°Cに冷却した新鮮2.5%グルタルアルデヒド溶液中で3時間固定した。歯牙片はついでリン酸緩衝液(0.05M, pH 7.0)と水で順次洗滌し、デシケーター中で真空乾燥した。乾燥後前項と同様にして金蒸着を施し検鏡・写真撮影を行った。

結 果

1. デキストラナーゼ AD 17の人工プラーク

表 1 デキストラナーゼ AD 17 による *S. mutans* 各血清型の菌株の人工プラーク形成抑制

<i>S. mutans</i> 菌株 血清型)	ワイヤ上の人工プラークの沈着 程度	
	対 照 群 (AD 17 なし)	10, 50単位AD17 /mlブロー
HS 6(a)*	4+	—
FA 1(b)*	2+	—
DB 13(b ⁻)*	2+	—
MT 6 R(c)**	3+	±
MT 118R(c)**	3+	±
OMZ 176(d)**	4+	—
MT 615 R(d)**	4+	—
LM 7(e)§	4+	2+
MT 703 R(e)**	4+	±
SE 11(f)§§	4+	3+
OMZ 175(f)§§	3+	2+

* *b* 抗原を喪失した FA 1 の突然変異株。D. Bratt-hall 博士より分与をうけた
** いずれも 阪大・歯・小児歯科外来患者から分離したもので、普通飼育ラットでウ蝕原性を確認した (未発表)
*, **, §, §§ それぞれ R. J. Fitzgerald, B. Guggenheim, R. J. Gibbons, Perch 博士より分与を受けた

形成抑制およびプラーク除去効果

口過滅菌したデキストラナーゼ AD 17 を培地 1 ml あたり 10 あるいは 50 単位になるように添加した実験群は、2, 3 の例外を除いて、AD 17 を欠く対照群と比して人工プラークの形成が著明に抑制された (表 1)。但し菌株間には人工プラークの色調・付着状態にそれぞれ差があり、AD 17 による付着抑制の様相も異なる (図 1 a, b)。たとえば *S. mutans* OMZ 176 株 (*d* 型) の人工プラークの形成はほとんど完全に抑制されるのに対して、LM 7 株は相当量のプラークが AD 17 存在下でも形成された。表 1 に示した以外の菌株についても、一般的に少数の例外を除いてプラークの新生が強く阻止された。

次に一旦形成された人工プラークが AD 17 の酵素化学的作用によって分解ないしは除去されるかどうかをみるため、5 日間連続継代によってえた人工プラークを 10 単位/ml の AD 17 を含む酢酸緩衝液 (pH 5.8, 0.1 M), および TSYS 培地中に浸し、37°C で 1 夜静置後、翌日各プラーク

図 1-a

図 1-b

図 1 AD 17 による *S. mutans* OMZ176 株 (a), LM 7 株 (b) の人工プラーク形成抑制
Ou: AD 17 非添加の対照群
50 u: AD 17 を 50 単位/ml で含有する試験群

の状態を観察した。肉眼的にみる限りプラークの溶解ないし著明な外観上の変化は認められなかったが、一部プラークの細片がワイヤから脱落沈下しているのが観察された。さらに試験群と対照群とを同一条件下で軽く振動すると、AD 17含有試験群は OMZ 176株, MT615株を除き、付着プラークの大部分がワイヤから脱落した(表2)。

表2 AD 17による *S. mutans* 人工プラークの除去効果

<i>S. mutans</i> 菌株 (血清型)	ワイヤ上の人工プラークの残存程度		
	対 照 群 (AD 17 なし)	酢酸緩衝液 (pH 5.8, 0.1 M) 10, 50単位 AD17/ml	TSS 培地中 10, 50単位 AD 17/ml
MT 6 R(c)	3+	—	±
MT 118 R(c)	3+	+	+
OMZ 176(d)	4+	4+	4+
MT 615(d)	4+	2+	3+
LM 7(e)	4+	—	±
MT 703(e)	4+	±	±

2. *S. mutans* の多糖産生におよぼす AD 17 の影響

TSS 培地および5%蔗糖加 Todd Hewitt (THS) 培地を使い AD 17含有下での多糖産生の状態を検討した。被験菌として *S. mutans* MT 6 R, OMZ 176株を用いたが、TSS, THS 培地中ではガラス表面に付着し、培地の上層部は比較的透明であった。一方 AD 17を加えた TSS, THS では上記のような付着傾向は全く認められず、培養全体が白濁した。表3に示されているように、MT 6 R, OMZ 176 株共に培養上清中の多糖体の産生量は AD 17添加群では大巾に減少していることが明かにされた。しかし培養沈渣の菌体結合性多糖は両者の間に特に差は認められなかった。比較対照の目的で *Streptococcus salivarius* HHT, SS 2 株について同様の実験を試みたが、これらの菌株の産生する多糖は主としてフルクタンであり、*S. mutans* におけるような影響は認められなかった(表4)。

3. 分離した多糖画分の化学分析と AD 17 による分解

被験菌株として *S. mutans* MT 6 R, MT118 R, OMZ 176, LM 7 株を選んだ。各菌株の多糖

表3 *S. mutans* の多糖産生におよぼす AD 17 の影響

	菌 株	培 地	多糖産生量 ($\mu\text{g/ml}$ 培養)	
			対照群	10単位 AD17/ml 培養
培養上清中の多糖	MT 6 R	TSS	1750	500
		THS	1350	450
	OMZ 176	TSS	600	380
		THS	380	250
菌体結合性多糖	MT 6 R	TSS	9.5	7.5
		THS	21.8	19.5
	OMZ 176	TSS	9.5	N.D.
		THS	5.5	4.8

表4 *S. salivarius* の多糖産生におよぼす AD 17 の影響

菌株	処 理	培養上清中の多糖 ($\mu\text{g/ml}$)		菌体結合性多糖 ($\mu\text{g/ml}$)
		総ヘキソース	うちフルクトース (%)	総ヘキソース値
HHT	対照群(AD17 なし)	8.0	7.4 (93%)	2.4
	AD 17(10 単位/ml)	8.0	7.6 (95%)	1.5
SS2	対照群(AD17 なし)	2.5	2.8(112%)	1.8
	AD 17(10 単位/ml)	2.4	2.2 (92%)	1.4

画分 I ~ IV のそれぞれの塩酸水解物を薄層クロマトグラフィーで展開し、それら多糖画分が主としてグルコースより構成されており、菌株によってはフルクトースをかなり含有するものがあることを定性的に確めた(図2)。

次に各画分について総ヘキソース、フルクトースおよび蛋白質量を測定し、重量%で表した結果が表5に示されている。多糖の構成糖がグルコースとフルクトースであるので、グルコース量は総ヘキソース値とフルクトース値の差で示した。この中で LM 7 株の画分 IV および MT 118 株の画分 II のフルクトース含有量が比較的高い。他はグルコースがその構成糖の 70~100% をしめた。OMZ 176 株の画分からはフルクトースは全く検出されなかった。

AD 17 による多糖各画分の加水分解の程度が表6に示されている。陽性対照として分子量を異にする(200万及び7万)2種の市販デキストランの分解も同時に行った。これらはいずれも24時間の AD 17 作用後には全多糖中の約50%が遊離還元糖

図 2 *S. mutans* 多糖画分の構成糖を示す薄層クロマトグラム。被験菌株・多糖画分・塩酸(1.5N)水解の時間は図中に示されている。構成糖は主としてグルコースで、菌株と画分によってはフルクトースを含有するものがあることを示す。

菌株と画分		mg/mg 多糖			
		総ヘキソース	グルコース	フルクトース	蛋白質
MT 6 R	I	0.84	0.81	0.03	0.07
	II	0.99	0.96	0.03	0.02
	III	1.10	1.09	0.01	0.01
	IV	0.63	0.63	0	0.12
MT 118 R	I	0.95	0.90	0.05	0.07
	II	0.95	0.79	0.16	0.05
	III	1.06	1.06	0	0.01
	IV	0.66	0.64	0.02	0.12
OMZ 176	I	0.78	0.78	0	0.09
	II	0.84	0.84	0	0.06
	III	1.01	1.01	0	0.01
	IV	0.85	0.85	0	0.06
LM 7	I	0.89	0.86	0.03	0.05
	II	1.00	1.00	0	0.01
	III	0.99	0.99	0	0.01
	IV	0.85	0.60	0.25	0.05

として検出された。この水解物を薄層クロマトグラフィーで展開すると、反応前には原点にとどまっていた多糖はほとんどすべてグルコースとオリゴ糖(多分イソマルトリオース)の位置に移動し、さらに比較的少量のイソマルトースが検出された。ところが *S. mutans* MT 6 R, および OMZ 176株の画分 I ~ IVの水解物を同時に展開すると、OMZ 176, 画分IVを除いてイソマルトースに相当

		遊離還元糖 (グルコースとして) μg/mg 多糖
デキストラン T2000(Pharmacia)		563
デキストラン (半井)		537
イソマルトース		3
MT 6 R	画分 I	360
	II	349
	III	305
	IV	196
OMZ 176	画分 I	257
	II	206
	III	228
	IV	351
MT 118	IV	211
LM 7	IV	149

する位置にスポットはほとんど検出されず、グルコースとイソマルトリオース以上のオリゴ糖としてテーリングした状態で観察された(図3)。OMZ 176株画分IVは対照として用いた標準デキストランのそれと類似のパターンを呈し、これは後述のAD 17に対する比較的良好な感受性と一致する所見である。またイソマルトースは24時間作用後においても全く分解を受けなかった。

MT 6 R の各画分は OMZ 176 の各画分に比べて概して AD 17 の作用に感受性を示したが、画分IVについては逆の関係にあった。MT 118, LM 7 株についても同様な関係が認められた(表には

図3 *S. mutans* 多糖画分の AD 17による酵素的水解産物の薄層クロマトグラフィー。1～4はそれぞれ順に MT 6 R 株画分 I～IV；6～9は OMZ 176 株画分 I～IV；10, 11 はそれぞれ分子量 7 万と 200 万の標準デキストランの加水分解産物；5, 12 はマーカーとしておいたグルコース（上）とイソマルトース（下）のスポットを示す。

後 2 者については画分 IV のみ示した)。但しいずれの場合においても還元糖の遊離は 15～36%であり、標準デキストランの約 55% に比して著しく AD 17 の作用に抵抗した。

4. AD 17 処理による *S. mutans* 菌体の形態学的変化

5% 蔗糖を含有する TSS 培地で 1 夜培養した *S. mutans* OMZ 176 菌体は図 4 に示されるように無定形の粘着性物質で被われ、スライドガラス上に固着する像を呈した。ところが TSS 培地に 10 単位/ml の割合で AD 17 を無菌的に添加して培養した同じ菌株は図 5 のように連鎖を構成する個々の菌体外形が明瞭に観察された。これは 0.2% グルコースしか含まぬ TS 培地での培養菌体についてみられるもの (図 6) と本質的に同一である。OMZ 176 株についてみられるこの関係は、程度の差はあれ、MT 6 R, MT 703 R 株, MT 615 R 株等においても観察された (図 7～12)。即ち図 7, 9, 11 は TSS 培地中でのそれぞれの菌体像を示し、一方図 8, 10, 12 は AD 17 を含有する TSS 培地で培養した時のそれぞれの菌株の形態を示す。AD 17 添加群は無定形の莢膜様粘着性物質は観察されなかった。

5. *S. mutans* による人工プラークにおよぼす

AD 17 の影響——SEM 観察

物理的に清掃した抜去歯牙片をワイヤでつるし、OMZ 176 株を接種後 TSS 培地中で連続 3 日間継代培養して生じた人工プラークの SEM 像が図 13, 14 に示されている。微小コロニーを歯面上につくりながら、立体的にも生育をつづけてプラークを形成していく過程が観察できる。この TSS 培地に AD 17 を 10 単位/ml の割合で添加するとこのような人工プラークの形成は著明に抑制され、図 15 のように未熟な状態でとどまっているか、あるいは部位によっては菌の付着がほとんどみられなかった (図 16)。

MT 6 R 株においても同様な現象が観察された。ただし微小コロニーの生育のパターンは OMZ 176 株のそれが立体的であるのに対して、MT 6 R 株は平面的であった (図 17)。AD 17 による人工プラークの抑制は著明であった (図 18)。またいったん図 16 のような人工プラークが形成された歯牙片を AD 17 酵素溶液中に浸し、37°C, 1 時間作用後の一例を示したものが図 19 である。かなりの菌が歯面に付着残存しているが陽性対照群に比べればその差は明らかである。

次に純培養菌の代りに外来初診小児から採取した活動性口蝕病巣よりのプラークを滅菌生食水で

図 4

図 7

図 5

図 8

図 6

図 4~6 *S. mutans* OMZ 176 菌体の SEM 像.
TSS 培養 (図 4), AD 17 含有 TSS 培養 (図 5),
及び TS 培養 (図 6).

図 7~8 *S. mutans* MT 6 R 菌体の TSS 培養
(図 7), 及び AD 含有 TSS 培養 (図 8) での
SEM 像.

図 9

図 10

図 11

図 12

図 13

図 14

図 9～10 *S. mutans* MT 703 R 菌体の TSS 培養 (図9) 及び AD 17含有 TSS 培養 (図10) での SEM 像.

図 11～12 *S. mutans* MT 615 R 菌体の TSS 培養 (図11) 及び AD 17含有 TSS 培養 (図12) での SEM 像.

図 13～14 *S. mutans* OMZ 176株による歯面上での人工プラーク.

図 15

図 17

図 16

図 18

図 15~16 OMZ 176 株人工プラークの AD 17 による抑制効果, 部位により残存プラーク量に差がある.

図 17~19 MT 6 R 株による人工プラーク (図17) と AD 17による抑制 (図18)~除去 (図19) 効果.

図 20 患者プラークを TSS 培地に接種したときの抜去歯面上での初期付着細菌.

図 21 図20の系に AD 17を加えると菌の歯面への付着は抑制された.

図 19

図 20

図 21

十分攪拌後、その0.1mlを各10mlのTSS培地およびAD 17加TSS培地(10単位/ml)に接種し、歯牙片を浸し、2日間培養後の歯面をSEMで観察した像が図20, 21に示されている。AD 17存在下においても、わずかに連鎖球菌の付着が認められたが、対照群に比べれば付着の程度に著明な差があった。SEM観察に先立って歯面から人工プラークを一部採取し、その細菌学的同定を行ったところこれらはほとんどすべて*S. mutans*と同定された。

考 察

前報でも報告したように、我々はAD 17がラット¹⁰⁾およびハムスター²⁵⁾の*S. mutans*による

実験ウ蝕を統計的有意差をもって抑制することを明かにした。しかしながらこのAD 17は他の菌種の産生するデキストラナーゼ^{26,27,28)}と同様に、*S. mutans*によって生成される菌体外グルカンに対しては極めて部分的な加水分解作用しか発揮しないことが示された。このことはAD 17のグルカン水解物を薄層クロマトグラフィーで展開したときのパターンからも明かである。すなわちグルカンはAD 17の作用により一部はグルコースにまで分解を受けるものの、残りの大部分はイソマルトリオース以上の鎖長を有し、AD 17の作用時を延長してもそれ以上分解されることはない。このさいAD 17の活性が残存していることは、これらの反応系にデキストラン T 2000 (Pharmacia) を添加すると再び著明な還元糖の遊離が認められる点からも明かである。これは*S. mutans*のグルカンが、従来デキストランといわれてきた単純な $\alpha(1\rightarrow6)$ グルコシド結合を主要構成単位とするものではなく、それ以外にも $\alpha(1\rightarrow3)$ 、 $\alpha(1\rightarrow4)$ 、 $\alpha(1\rightarrow2)$ 等の結合、なかでも $\alpha(1\rightarrow3)$ 結合を多くもつ分岐構造を有するためと考えられる。この分岐構造については、化学的手法によって、OMZ 176株を含む2, 3の菌株ですでに確められている³⁻⁶⁾。また図3に示されているように、同一酵素を同一条件下で使用したとき基質によって最終産物に差がみられることは、それら基質間の化学構造上の差違を示唆するものでもある。AD 17の作用によっては、2種の標準デキストランを含めて、イソマルトースの遊離が極めて少なく、デキストラナーゼの種類によって多糖の水解産物に特徴的なちがいがみられる²⁹⁻³¹⁾。しかし化学構造上の特殊性と、*S. mutans*のグルカンに特徴的な粘着性あるいは非水溶性といった生物学的な特性との関係については、今なお十分な説明ができない¹⁾。

このようにAD 17は分離した*S. mutans*の菌体外多糖画分に対しては著明な分解作用を示さないにもかかわらず、蔗糖加培地での継代による人工プラークの形成を一般的に非常に強く阻止すること、SEM観察により同じく蔗糖加培地中での粘着性菌体外多糖の産生が抑制されることが、本研究により明かにされた。このことは*S. mutans*

の特殊性を荷うグルカン合成の過程で AD 17 に感受性の基質, すなわち α (1 $\rightarrow$ 6) グルコシド結合をもつグルコースの構築単位が主要な役割を果すことを示唆するものといえる。

Walker²⁷⁾は *Penicillium funiculosum* のデキストラナーゼの存在下での OMZ 176 株の多糖産生量が半減することを示し, かつグルカン産生の初期の過程での産物はデキストラナーゼにより容易に分解されてオリゴ糖になり, 結果としてこれが高分子の分岐した不溶性多糖生合成を阻止する方向に働くのであろうと結論している²⁷⁾。この説明は我々が示した上述の現象ともよく一致する。

一方, Mukasa と Slade³²⁾は *S. mutans* の加熱菌体をデキストラナーゼで処理すると, その後粗デキストラン合成酵素および蔗糖を加えてもガラス面への付着が著しく抑制されると報告した。これはデキストラナーゼにより菌体表面に微量ながら存在すると考えられるグルカンが除かれるため, デキストラン合成酵素に対する受容体が消失~激減することによるものと考えられる。菌体表面のグルカンに対するデキストラナーゼの作用はガラス表面への *S. mutans* の付着にさいして阻止的に作動するのみならず, 試験管内人工プラークの形成にさいしても, あるいはもっと単純な蔗糖加培地中での莢膜様粘性グルカンの生合成についても同様に阻止作用を示すものと推測できる。

最近の Johnson, Bozzola, Schechmeister³³⁾の論文によれば, *S. mutans* GS 5 株についてガラス面への付着性を喪失した突然変異株の蔗糖加ブロス培養菌体は, SEM 観察の結果, 親株が凝集体~マイクロコロニーを形成するのに対し, 突然変異株ではそのような構築物は観察されなかったという。我々が蔗糖添加ブロスにデキストラナーゼ AD 17 を無菌的に加えて培養した菌体の SEM 像は, 彼らの突然変異株のそれと類似している。このことは AD 17 が野生型の *S. mutans* 細胞に作用して, 菌体表面のグルカン受容体を破壊し, そのため付着性を欠く上述の Johnson ら³³⁾の突然

変異株と同様に, 蔗糖存在下においても分解をまぬがれたグルカンは菌体表面への付着性を発揮しえない状態へおかれるものと考えられる。透過型電子顕微鏡観察による同様な研究は Nalbandian ら³⁴⁾によっても報告されている。彼らは蔗糖およびグルカナーゼの存在に影響されないケバ様の外層構築物 (fuzzy coat) と, 蔗糖加培養時のみ観察される線維状~球状の構造物の存在を認めた。後者はグルカナーゼを作用させると破壊されて消失し, このことも我々が SEM でみた結果とよく一致する所見といえる。

我々の研究とほぼ並行して Hoffman, Tow, Cole³⁵⁾は抜去歯のエナメル質平滑面上での市販デキストラナーゼの *S. mutans* 6715 株の付着抑制効果を報告した。その中で彼らは *S. mutans* のマイクロコロニーをデキストラナーゼで除去し, SEM 観察を行うと, *S. mutans* の付着していた部位は, おそらくその産生する酸によって蜂窩状の脱灰が生じたと記載している。彼らの実験では歯牙片のインキュベーション時間が 138 時間とかなり長時間であるためそのような著明な形態学的変化を伴ったものと思われるが, 我々の場合にはそのような例は経験されなかった。また Hoffman ら³⁵⁾の報告では SEM 観察のみの報告で, *in vitro* における菌体外多糖への同デキストラナーゼの作用や, 動物での *in vivo* 作用との関係については一切触れられていない。

以上デキストラナーゼのウ蝕抑制効果の発現機序について, 化学的・形態学的側面から若干の検討を行った。*S. mutans* の産生するグルカンの生物学的特性の解明と, さらには化学構造上の関係を追究するためには, 既にいくつか報告されているような α (1 $\rightarrow$ 3) グルカナーゼ³⁶⁻³⁸⁾をはじめとする他の特異性をもった酵素を利用した同様の研究が必要と考えられる。

実験を行うにさいして, 有益な助言と便宜をいただいた小谷尚三教授に深謝する。また走査型電子顕微鏡による観察は, 武田広之氏 (シオノギ製薬 K.K. 大阪) の援助をうけて行つた。記して謝意を表する。

Summary: A dextranase(AD17) produced by a strain of *Spicaria violacea* degraded commercially available dextrans to liberate glucose and various oligosaccharides including isomaltose.

On the other hand, AD17 hydrolyzed the extracellular glucans of some strains of *Streptococcus mutans* to a limited degree. Only 15 to 36 percent of the total polysaccharides were consumed by AD17 with little release of isomaltose. AD17, however, inhibited the formation of artificial dental plaques which developed in sucrose-containing broth by serial transfer of *S. mutans*. Changes in cell morphology due to AD17 treatment were revealed by scanning electron micrography. *S. mutans* cells grown in sucrose-containing broth were coated with sticky capsular materials, whereas cells grown in sucrose in the presence of AD17 or glucose-containing broth did not show such gel-like structure.

These differences indicate the importance of glycosidic linkages which are susceptible to AD17 in the adherence of *S. mutans* cells to free surface.

文 献

- 1) 浜田茂幸, 小谷尚三: 齲蝕と細菌(上)(下). 歯界展望, 41 : 56-62, 227-234, 1973.
- 2) GIBBONS, R. J. and NYGAARD, M.: Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. *Arch. Oral Biol.*, 13 : 1249-1262, 1968.
- 3) LEWICKI, W. J., LONG, L. W. and EDWARDS, J. R.: Determination of the structure of a broth dextran produced by a cariogenic streptococci. *Carbohydr. Res.*, 17 : 175-182, 1971.
- 4) GUGGENHEIM, B.: Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. *Helv. Odont. Acta*, 14 : 89-108, 1970.
- 5) CESKA, M., GRANATH, K., NORRMAN, B. and GUGGENHEIM, B.: Structural and enzymatic studies on glucans synthesized with glucosyltransferases of some strains of oral streptococci. *Acta Chem. Scand.*, 26 : 2223-2230, 1972.
- 6) BAIRD, J. K., LONGYEAR, V. M. C. and ELLWOOD, D. C.: Water insoluble and soluble glucans produced by extracellular glucosyltransferases from *Streptococcus mutans*. *Microbios*, 8 : 143-150, 1973.
- 7) DE STOPPELAAR, J. D., KÖNIG, K. G., PLASSCHAERT, A. J. M. and VAN DER HOEVEN, J. S.: Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, 15 : 971-975, 1971.
- 8) TANZER, J. M., FREEDMAN, M. L., FITZGERALD, R. J. and LARSON, R. H.: Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 10 : 197-203, 1974.
- 9) 浜田茂幸: 細菌学からみたウ蝕予防 日本歯科評論, 378 : 32-39, 1974.
- 10) 大嶋隆, 増田典男, 水野純, 祖父江鎮雄, 長谷川清, 浜田茂幸: *Spicaria violacea* IFO 6120 株に由来するデキストラナーゼによるラット実験ウ蝕抑制効果. 歯基礎誌, 17 : 127-141, 1975.
- 11) MURAYAMA, Y., WADA, H., HAYASHI, UCHIDA, T., YOKOMIZO, I. and HAMADA, S.: Effects of dextranase from *Spicaria violacea* (IFO 6120) on the polysaccharides produced by oral streptococci and on human dental plaque. *J. Dent. Res.*, 52 : 658-667, 1973.
- 12) MCCABE, R. M., KEYES, P. H. and HOWELL, A.: An in vitro method for assessing the plaque forming ability of oral bacteria. *Arch. Oral Biol.*, 12 : 1653-1656, 1967.
- 13) FITZGERALD, R. J., SPINELL, D. M. and STOUT, T. H.: Enzymatic removal of artificial plaques. *Arch. Oral Biol.*, 13 : 125-128, 1968.
- 14) 増田典男, 大嶋隆, 浜田茂幸, 小谷尚三: *Streptococcus mutans* の患者からの分離同定と, 蛍光抗体法による血清学的分類及び分離株のウ蝕原性. 日誌, 29 : 128, 1974.
- 15) BRATHALL, D.: Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol. Revy*, 21 : 143-152, 1970.
- 16) PERCH, B., KJEMS, E. and RAVN, T.: Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B.*, 82 : 357-370, 1974.
- 17) SCOTT, T. A., Jr. and MELVIN, E. H.: Determination of dextran with anthrone. *Analyt. Chem.* 25 : 1656-1661, 1953.
- 18) HANDEL, E. VAN.: Determination of fructo-

- tose and fructose yielding carbohydrates with cold anthrone. *Arch. Biochem.*, **19** : 193-194, 1967.
- 19) ROE, J. H. : A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *J. Biol. Chem.*, **107** : 15-22, 1934.
- 20) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275, 1951.
- 21) PARK, J. T. and JOHNSON, M. J. : A sub-microdetermination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **181** : 149-151, 1949.
- 22) PIFFERI, P. G. : Improved thin layer chromatographic separation of hexoses and pentoses using Kieselgel G. *Analyt. Chem.*, **37** : 925, 1965.
- 23) BANCHER, E., SCHERZ, H. and KAINDL, K. : Thin-layer chromatography of carbohydrates II. *Mikrochim. Ichnoanal. Acta*, 1043-1051, 1964.
- 24) BAILEY, R. W. and BOURNE, E. J. : Colour reactions given by sugars and diphenylamine-aniline spray reagents on paper chromatograms. *J. Chromat.*, **4** : 206-213, 1960.
- 25) OOSHIMA, T., MASUDA, N., SOBUE, S. and HAMADA, S. : Unpublished data.
- 26) Newbrun, E. : Extracellular polysaccharides synthesized by glucosyltransferases of oral streptococci. Composition and susceptibility to hydrolysis. *Caries Res.*, **6** : 132-147, 1972.
- 27) WALKER, G. J. : Some properties of a dextran-glucosidase isolated from oral streptococci and its use in studies on dextran synthesis. *J. Dent. Res.*, **51** : 409-414, 1972.
- 28) WALKER, G. J. and PULKOWNIK, A. : Degradation of dextrans by an α -1,6-glucan glucanohydrolase from *Streptococcus mitis*. *Carbohydrate Res.*, **29** : 1-14, 1973.
- 29) HIRAOKA, N., TSUJI, H., FUKUMOTO, J., YAMAMOTO, T. and TSURU, D. : Studies on mold dextranases. Some physicochemical properties and substrate specificity of dextranases obtained from *Aspergillus carneus* and *Penicillium luteum*. *Internat. J. Peptide Protein Res.*, **5** : 161-169, 1973.
- 30) SAWAI, T., TORIYAMA, K. and YANO, K. : A bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextrans. *J. Biochem.*, **75** : 105-112, 1974.
- 31) MINAH, G. E., LOESCHE, W. J. and DZIEWIATKOWSKI, D. D. : The *in-vitro* effect of fungal dextranase on human dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, **17** : 35-42, 1972.
- 32) MUKASA, H. and SLADE, H. D. : Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surface. II. Nature of the binding site and the adsorption of dextran-levan synthetase enzymes on the cell-wall surface of the streptococcus. *Infect. Immun.*, **9** : 419-429, 1974.
- 33) JOHNSON, M. C., BOZZOLA, J. J. and SCHMEISTER, I. L. : Morphological study of *Streptococcus mutans* and two extracellular polysaccharide mutants. *J. Bacteriol.*, **118** : 304-311, 1974.
- 34) NALBANDIAN, J., FREEDMAN, N. L., TANZER, J. M. and LOVELACE, S. M. : Ultrastructure of mutants of *Streptococcus mutans* with reference to agglutination, adhesion, and extracellular polysaccharide. *Infect. Immun.*, **10** : 1170-1179, 1974.
- 35) HOFFMAN, S., TOW, H. D. and COLE, J. S. : Scanning electron microscope studies of dextranase-treated streptococci. *J. Dent. Res.*, **52** : 551-557, 1973.
- 36) HASEGAWA, S. and NORDIN, J. H. : Enzymes that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. I. Purification and properties of an endo- α -D-(1-3)-glucanase from *Trichoderma viride*. *J. Biol. Chem.*, **244** : 5460-5470, 1969.
- 37) REESE, E. T., MAGUIRE, A. and PARRISH, F. W. : α -1,3-glucanases of fungi and their relationship to mycodextranase. *Proc. IV IFS : Ferment. Technol. Today*, 735-742, 1972.
- 38) KELSTRUP, J., FUNDER-NIELSEN, T. D. and MØLLER, E. N. : Enzymatic reduction of the colonization of *Streptococcus mutans* in human dental plaque. *Acta Odont. Scand.*, **31** : 249-253, 1973.