a-g 血清型の *Streptococcus mutans* の産生する 非水溶性および水溶性多糖の生化学的 ならびに形態学的特徴

薬 師 寺 毅

鹿児島大学歯学部予防歯科学教室（指導：井上昌一教授）

〔受付：昭和58年6月5日〕

Biochemical and morphological characteristics of water- insoluble and -soluble polysaccharides produced by *Streptococcus mutans* serotypes *a* through *g*

Tsuyoshi Yakushiji

Department of Preventive Dentistry, Kagoshima
University, Dental School, 1208-1,
Usuki-cho, Kagoshima 890

(Director : Prof. Masakazu Inoue)

〔Accepted for publication : June 5, 1983〕

Key words : extracellular polysaccharides / glucan / fructan / serotypes / *Streptococcus mutans*

Abstract : Biochemical and morphological characteristics of polysaccharides synthesized from sucrose by extracellular enzymes from *Streptococcus mutans* were compared among serotypes *a* through *g*.

Polysaccharides synthesized by the enzymes of serotypes *a*, *d* and *g* formed visible aggregates and firmly adhered to glass surfaces, whereas those of serotypes *b*, *c*, *e* and *f* floated homogeneously and adhered only slightly to glass. The enzymes of serotypes *a*, *d* and *g* produced a large amount of water-insoluble polysaccharides (IP), but most portion of the polysaccharides of serotypes *b*, *c*, *e* and *f* was water soluble (SP). IP consisted of only glucan and SP comprised glucan (a major component) and fructan.

The IP of serotypes *a*, *d* and *g*, as compared with that of serotypes *b*, *c*, *e* and *f*, 1) contained higher proportions of α -1, 3 glucosidic linkage and α -1, 3, 6 branch, 2) showed higher susceptibility to α -1, 3 glucanase (serotype *a* excepted) and lower α -1, 6 glucanase sensitivity, 3) contained a larger amount of high-molecular-weight fractions and possessed higher intrinsic viscosity (serotype *b* excepted), and 4) had lower *S. mutans* cell-agglutination activity. Electron microscopic observation revealed that IP of all serotypes comprised double-stranded fibrils with short fluffy protrusions extending out of its periphery as well as fine single-stranded fibrils. In the IP of serotypes *a*, *d* and *g*, long double-stranded fibrils coalesced with single-stranded fibrils, forming large clumps, while the IP of serotypes *b*, *c*, *e* and *f* contained shorter double-stranded fibrils and formed smaller clumps.

Thus, IP of *S. mutans* can be divided into two major groups containing serotypes *a*, *d* and *g* and types *b*, *c*, *e* and *f*, and further into four subgroups containing type *a*, types *d* and *g*, type *b*, and types *c*, *e* and *f* on the basis of the biochemical and morphological characteristics mentioned above. No similar grouping of serotypes was indicated for SP of *S. mutans* by most chemical and morphological properties examined.

緒 言

現在、*Streptococcus mutans* はう蝕の最も重要な原因菌であると考えられている^{1,2)}。本菌は血清型により *a-g* の7型に分類されている^{3,4)}が（最近、*h* 型の存在が示唆された⁵⁾）、スクロース培地上でのコロニー形態、細胞壁の構成々分、生化学的性状、抗原決定基（免疫学的交叉反応）などによって、*a/d/g* 型、*c/e/f* 型および *b* 型に大別されることが報告されている^{1,6)}。

S. mutans はスクロースから水溶性および非水溶性の多糖（グルカンとフルクタン）を菌体外に産生する。このうち非水溶性グルカンはこの菌の歯面への定着に重要な役割を果し、一方水溶性のグルカンとフルクタンはエネルギー貯蔵庫としての機能をもつものと考えられている^{7,8)}。今日まで、*S. mutans* の産生するグルカンの諸性状については多くの検討がなされ、菌体凝集能⁹⁾、グルカナーゼ感受性¹⁰⁻¹³⁾、粘性や分子量分布^{11,12,14)}、化学構造^{8,15-18)}、超微細形態¹⁹⁻²⁴⁾、などについての報告があるが、*S. mutans* の産生するグルカンの性状を各血清型間において比較した報告はきわめて少ない^{25,26)}。

そこで、本研究では、*a-g* 型の *S. mutans* の菌体外酵素によってスクロースから合成された多糖の諸性状を比較検討し、この菌種の他の多くの性状についていわれているような、血清型間における相違や類似性が認められるかどうかを知ることが目的とした。その結果、*S. mutans* がスクロースより合成する非水溶性多糖（主にグルカン）は、その諸性状により大きく *a/d/g* 型と *b/c/e/f* 型の2群に、前者はさらに *a* 型と *d/g* 型、後者は *b* 型と *c/e/f* 型に類別することができた。このような知見は、*S. mutans* のう蝕原性の発現の機序の解明およびう蝕予防に関する免疫学的アプローチの模索に資するところが大きいと考えられる。

材料と方法

1. 供試菌株

S. mutans の継代保存株の中から *a-g* の血清型に属する代表株19株を用いた（Table 1）。各菌

株は Brain Heart Infusion (BHI ; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md., U. S. A.) 寒天斜面培地を用いて、3ヶ月毎に継代培養し、4°C で保存した。

2. 菌体外酵素の調製と多糖合成活性の測定

菌体外多糖合成酵素は次のようにして得た。すなわち、各菌株を BHI ブロースを用いて、テハー・アナエロ・ボックス（平沢製作所、東京）中において、80%N₂+10%CO₂+10%H₂ 下に37°C で18時間培養した。遠沈（6,000×g, 20分, 4°C）して上清を得、これをろ過（No. 101 ; 東洋科学産業、東京）した。ろ液（450ml）を4M NaOH で pH 7.0 に調整した後、酵素蛋白を50%飽和硫酸で4°C、1夜沈殿させた。遠沈（12,000×g, 60分, 4°C）により回収した沈渣を少量の5mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）に溶解し、同緩衝液に対して4°C で24時間透析した後、透析内液を22.5ml に調整した。得られた酵素標品は用時まで-20°C で凍結保存した。

酵素標品中の多糖（グルカン+フルクタン）合成活性は以下のようにして求めた。すなわち、適当に希釈した酵素標品10μl と、[U-¹⁴C] スクロース（0.01μCi/μl, 4.7mCi/mmol ; New England Nuclear, Boston, Mass., U. S. A.）5μl および0.4M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）5μl とを混合し、37°C で60分反応させた。氷冷して反応を停止させた後、反応液（20μl）を10mm×20mm のろ紙（No. 525 ; 東洋科学産業）にスポットし、ろ紙片をメタノールで3回洗浄後、乾燥し、ろ紙片上に残った放射能を、トルエン：DPO：POPOP = 1 l : 4 g : 0.1 g からなるシンチレーター10ml を用いて、液体シンチレーションカウンター（Tracor Analytic MARK III ; Tracor Northern Inc., Wis., U. S. A.）で測定した。酵素活性の単位は、上記反応条件下で、スクロースから1分間に1μmol のグルコースまたはフルクトースを多糖に転移する酵素量を1単位（U）とした。なお、菌体外酵素標品中の蛋白量は、牛血清アルブミンを標準として Lowry 法²⁷⁾で定量した。各菌株から得た菌体外酵素標品の酵素活性を Table 1 に示した。

3. 多糖のガラス壁付着性

Table 1 Cell-free enzyme preparations from the *S. mutans* strains used

Serotype	Strain	Polysaccharide-synthesizing activity (mU/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (mU/mg)
<i>a</i>	HS6	54.9	1.90	28.9
	HS1	13.0	1.70	7.6
	FIL	27.4	1.77	15.5
<i>d</i>	OMZ176	32.6	2.77	11.8
	P1	32.8	1.38	23.8
<i>g</i>	6715	29.2	3.72	8.0
	K1-R	40.4	1.59	25.4
	OMZ65	56.2	1.71	32.9
	AHT-k	84.1	1.26	66.7
<i>b</i>	FA1	64.7	1.77	36.6
	BHT	45.8	1.75	26.2
<i>c</i>	Ingbritt	92.0	1.23	74.8
	GS5	14.5	2.07	7.0
	OMZ70	18.1	1.95	9.3
	PK1	48.3	1.62	29.8
<i>e</i>	B14	56.2	1.78	31.6
	P4	49.1	1.95	25.2
<i>f</i>	OMZ175	40.2	1.59	25.3
	MT3940	53.0	1.92	27.6

多糖のガラス壁付着性は、Takehara と Inoue の方法²⁸⁾を参考にして測定した。すなわち、150 mg のスクロースと、1.2, 6, または 30mU の菌体外酵素を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 の 3ml を試験管 (12×105mm) に入れ、水平に対し 30° の角度に傾斜させて、37°C で 16 時間反応させた。その後、反応液を静かに捨て、付着した多糖膜を 3ml の 0.05M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 で注意深く 3 回洗浄した後、減圧乾固して、1M NaOH 3ml に溶解し、これに含まれる全糖量をアントロン法²⁹⁾で測定した。

4. 多糖の合成と分画

0.1M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 の 4ml 中で、200 mg のスクロースと 8mU の酵素標品とを 37°C で 16 時間反応させた。反応液の濁度を OD_{420nm} で測定 (島津ボシユロムスペクトロニック 20; 島津製作所, 京都) した後、遠沈 (20,000×g, 15分, 4°C) により沈渣として非水溶性画分 (IP) を得た。IP は 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 で 3 回遠沈洗浄した後、脱イオン水に懸濁し、軽く超音波処理して均一な

懸濁液とした¹⁴⁾。一方、上清にはエタノールを最終濃度が 70% になるように加え、-20°C で 2 時間放置した後、遠沈して水溶性画分 (SP) を得た¹⁴⁾。SP は 0.05M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 に溶解後、再度 70% エタノール沈殿法により洗浄した後、脱イオン水に対して透析 (24 時間, 4°C) した。

得られた各多糖画分中のグルカンおよびフルクタンの含量は、それぞれグルコースおよびフルクトースを標準として、Halhoul と Kleinberg 法³⁰⁾で分別定量した。

5. 菌体凝集能

S. mutans AHT-k 株の菌体に対する IP および SP の凝集能は次のようにして調べた³¹⁾。この菌株を、BHI 液体培地で 37°C, 18 時間、嫌気的に培養後、遠沈 (6,000×g, 20分, 4°C) により菌体を回収し、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 で 3 回遠沈洗浄後、OD_{550nm}=0.6 (スペクトロニック 20) になるように同緩衝液に懸濁した。IP または SP の 0.5mg/ml 溶液の倍数段階希釈液 0.2ml と、菌液 0.8ml とを混合し、37°C

で18時間反応させた後、明らかな凝集を示す最終希釈倍数を求めた。対照としては、多糖液の代りに脱イオン水を用いた。

6. グルカナーゼ感受性

IP と SP のデキストラナーゼ(α -1, 6 glucan 6-glucanohydrolase ; E. C. 3. 2. 1. 11) および α -1, 3グルカナーゼ (α -1, 3 glucan 3-glucanohydrolase ; E. C. 3. 2. 1. 59) に対する感受性を Dextranase CB (Calbiochem Co., San Diego, Calif., U. S. A.) および *Streptomyces chartreusis* F 2 株より得た精製 α -1, 3 グルカナーゼ標品¹³⁾を用いて調べた。なお、両酵素活性の1単位(U)は、基本反応系^{13, 31)}において、1分間に1 μ molのグルコースに相当する還元基を遊離する酵素量とした。

IP および SP のデキストラナーゼ感受性は以下のようにして調べた。すなわち、0.1M 酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 (防腐の目的で5mM の NaF を添加) の 0.6ml 中で IP または SP の 0.1mg と、0.74mU のデキストラナーゼとを 37°C で反応させた。0, 1, 2, 3 時間後にそれぞれ 60 μ l を抜き取り、加熱 (100°C, 20分) により反応を停止した後、Park と Johnson の方法³²⁾で遊離した還元基量を求めた。 α -1, 3 グルカナーゼ感受性は同じ緩衝液の 1.2ml 中で、0.2mg の IP または SP と、1.57mU の α -1, 3 グルカナーゼとを混合し、37°C で反応させ、経時的 (0, 1, 2, 3 時間) に 120 μ l を抜き取り、加熱 (100°C, 5分) により反応を停止した後、上述のようにして還元基量を求めた。対照として、加熱失活させたそれぞれの酵素を用いて同様に反応させた後還元基量を求め、両反応系の還元基量の差を、真の遊離還元基量とした。なお、5mM NaF の存在は、両酵素活性には影響がなかった。

7. 粘度の測定

IP または SP を、0.5, 1.0, 2.0mg/ml になるように 1M NaOH に溶解し、25°C での相対粘度をオストワルドの粘度計を用いて測定した³¹⁾。得られた還元粘度のグラフから固有粘度を求めた。

8. 限外ろ過による分画

IP または SP を 0.1mg/ml になるように 1M

NaOH に溶解し、ダイアフロー・メンブレン (Amicon Corp., Mass., U. S. A.) PM 10 (分画分子量 10,000), XM 100A (同 100,000), および XM 300 (同 300,000) を用いて室温でろ過した³¹⁾。原液とろ液に含まれる全糖量をアントロン法で定量し、それぞれの値からろ過の阻止率を算出した。

9. メチル化分析

メチル化は主に Hakomori 法³³⁾に従った。凍結乾燥した多糖 2~5mg を、五酸化二リン上で 40°C, 1 夜真空下に乾燥した。脱水ジメチルスルホキシド 1ml を加えて超音波処理し、均一な懸濁液とした後、窒素ガス置換を行ない、次にカルバニオン 0.5ml を滴下して室温で 4 時間攪拌した後、氷冷下にヨウ化メチル 0.5ml を滴下し、室温でさらに 2 時間攪拌した。少量の水を加え、脱イオン水に対して 2 夜透析した後、透析内液を 35°C で減圧乾固した。得られた試料はクロロホルムで回収した後、再度メチル化を行なった。なお、一部の試料については、Lindberg の記載³⁴⁾を参考にして、Haworth 法³⁵⁾でメチル化後、Hakomori 法を適用した。次いで、メチル化多糖に 90%ギ酸 1ml を加え、窒素置換した後、100°C で 6 時間処理した。減圧してギ酸を除去した後、2M トリフルオロ酢酸 0.5ml を加え、窒素置換した後に 100°C で 6 時間加水分解した。ギ酸の場合と同様にして濃縮した後、0.02M NaOH の 1ml 中で 4mg の水素化ホウ素ナトリウムを用いて、室温で 1 夜還元した。Amberlite IR 120 B (H⁺) (半井化学薬品、京都) を加えて反応を停止した後、反応液を回収し、減圧乾固後にメタノールを加えて溶解し、エバポレーターによりホウ酸を除去した (3ml $\times$ 5回)。得られたアルジトールをピリジン 0.5ml に溶解した後、無水酢酸 0.5ml を加え、100°C, 1 時間または、30°C, 1 夜処理し、アルジトール・アセテート誘導体を得た。反応液にトルエンとメタノールを少量加え、減圧濃縮をくり返した後、試料をクロロホルムに溶解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、0.3%の OV-275 と 0.4%の GEXF-1150³⁶⁾を塗布した Unipor HP (80~100 メッシュ ; ガスクロ工業、東京) カラ

ムを装填したガスクロマトグラフ GC-4 CPF (島津製作所, 京都) を用いて, 水素炎イオン化ディテクターにより検出した。流速 50ml/分の窒素をキャリアーガスとして, 1°C/分の割合で 120°C から 180°C までの昇温分析を行なった。標準として, 鹿児島大学農学部農芸化学科の安部淳一博士より分与を受けたサクシノグリカン³⁷⁾とデキストラン T-40 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いた。相対保持時間から各ピークを同定し, Guggenheim の記載¹⁰⁾を参考にして補正係数を求め, 各ピークの面積から定量値を算出した。

10. 電子顕微鏡による形態観察

IP および SP の超微細形態を以下のようにして観察した。IP は 0.5 mg/ml 溶液 1 ml を遠沈 (3,000 rpm, 10分, 室温) してペレットとした。SP はそのままではペレットとならないので, 菌体凝集能を調べた時と同様にして, *S. mutans* AHT-k 株の懸濁液 0.8 ml と SP の 0.5mg/ml 溶液 0.2 ml とを混合し, 37°C で18時間反応させた後, 菌と SP の凝集塊を遠沈してペレットとした。

試料 (ペレット) を, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.0 の 1 ml 中で, 1.5 % (w/v) のフェロシアン化カリを含む 1 %オスミウム酸を用いて, 4°C で2時間固定した。試料を脱イオン水で3回遠沈洗浄して余剰の固定液を除いた後, 50°C に保温した少量の 5 %ノーブル・アガー (Difco Lab., Detroit, Mich. U. S. A.) に懸濁後, 直ちに遠沈してペレットとした。寒天に包埋したペレットから 0.5~1 mm³ のブロックを作製し, エタノール系列で脱水した後, Luft 法³⁸⁾を参考にしてエポック 812 (長瀬産業, 東京) に包埋重合した。

50~80nm の超薄切片を Porter-Blum MT-2B 型超ミクロトーム (Dupont-Sorvall, Newtown, Conn., U. S. A.) でガラスナイフを用いて作製し, フォルムバル支持膜を張った銅製グリッド (200メッシュ) に載せた。切片を Anisworth らの Alkaline bismuth reagent³⁹⁾で50分染色後, 脱イオン水で十分に洗浄した後, JEM-100B 型電子顕微鏡 (日本電子, 東京) を用いて, 80kV で観察

し, 20,000倍で撮影した。

結 果

1. 菌体外酵素による多糖の合成とガラス壁付着

S. mutans の菌体外酵素とスクロースとを 16 時間反応させて合成された多糖の肉眼的状態を Table 2 に示した。血清型 a/d/g (HS 6 株を除く) の酵素により合成された多糖は大小様々の大きさの凝集塊を形成して沈殿する傾向が強いが, b/c/e/f 型 (PK 1 株を除く) では反応液はほぼ均一に混濁しており, 4°C で1夜静置しても変化はなかった。各血清型の代表例を Fig. 1 に示した。また, 軽く超音波処理して均一とした反応液の濁度も, a/d/g 型では b/c/e/f 型に比べると高

Table 2 Turbidity and aggregation of polysaccharides produced by cell-free enzyme from the *S. mutans* strains

Serotype	Strain	Turbidity ^{a)} (OD _{420nm})	Aggregation ^{b)}
a	HS6	0.33	—
	HS1	0.75	+
	FIL	0.65	+
d	OMZ176	0.70	+
	P1	0.65	+
g	6715	0.65	+
	K1-R	0.80	+
	OMZ65	0.70	+
	AHT-k	0.82	+
b	FA1	0.20	—
	BHT	0.10	—
c	Ingbritt	0.16	—
	GS5	0.16	—
	OMZ70	0.30	—
e	PK1	0.75	+
	B14	0.40	—
	P4	0.38	—
f	OMZ175	0.40	—
	MT3940	0.15	—

a) Cell-free enzyme (8mU) were allowed to react with sucrose (200mg) at 37°C for 16h in 4ml of 0.1M phosphate buffer, pH 6.0.

b) + : Aggregates formation.

— : No aggregate formation. Refer to Fig. 1.

Fig. 1 Macroscopic appearance of polysaccharides produced by cell-free enzyme from serotype a-g *S. mutans* strains

Table 3 Adherence of polysaccharides produced by cell-free enzyme from the *S. mutans* strains

Serotype	Strain	Polysaccharide adherence (mg/ml)		
		Cell-free enzyme (mU/ml)		
		0.4	2.0	10.0
a	HS1	1.80	4.86	5.00
d	OMZ176	2.14	5.11	3.58
g	AHT-k	1.84	5.97	8.18
b	BHT	0.01	0.02	0.05
c	OMZ70	0.01	0.01	0.04
e	B14	0.01	0.04	0.12
f	OMZ175	0.01	0.02	0.07

い値を示した (Table 2)。なお後者のうちでは *elf* 型が *b/c* 型より濁度が高い傾向を示した。

合成多糖の試験管壁への付着能について調べた (Table 3)。*a/d/g* 型では試験管壁への多糖膜の形成が著明に認められ、2 mU/ml の酵素を用いた時にほぼピークに達した。なお 10 mU/ml の酵素量によって形成された多糖膜は表層が非常に弱く付着しており、洗浄時に流失を防ぐのが困難であった。一方、*b/c/elf* 型では、酵素量を増加するにつれて、多糖膜形成量の増加する傾向が認められたが、最大の酵素量を用いた場合にも付着多糖量は極めて僅かであった。

次に IP と SP との合成量の割合およびそれぞれに含まれるグルカンとフルクタンの量比を検討した (Table 4)。*a/d/g* 型 (HS 6 株を除く) では、IP の合成量が SP のそれを上回っていたが、*b/c/elf* 型 (PK 1 株を除く) では逆に IP の合成量が SP より少なかった。ほとんど全ての菌株の IP はグルカンのみから構成されていたが、GS 5 株、P4 株、OMZ 175 株の 3 株のものにはフルクタンが検出された。一方、SP もグルカンが主体ではあったが、全ての菌株の SP にはフルクタンが明らかに検出された。SP 中のグルカンに対するフルクタンの量比は、BHT 株が著明に高い値を示した他は、血清型による大きな差はなかった。しかし、全多糖におけるグルカンに対するフルクタンの量比は、*a/d/g* 型が *b/c/elf* 型に比べて低い傾向が認められた。

なお、HS 6 株の合成多糖の肉眼的性状および IP と SP の合成量の割合は *b/c/elf* 型に近く、PK 1 株では *a/d/g* 型とほぼ同じであった。

このように、*S. mutans* の菌体外酵素がスクロースより合成する多糖は、血清型により大きく 2 群 (*a/d/g* 型と *b/c/elf* 型) に類別できることが示唆されたので、以下、各血清型の代表株の IP と SP について、その諸性状の特徴を調べた。

2. IP と SP の諸性状

Tabl 4 Amount of water-insoluble (IP) and water-soluble (SP) polysaccharides produced by cell-free enzyme from the *S. mutans* strains

Serotype	Strain	IP			SP			IP/SP	Total fructan/ Total glucan
		Glucan (mg/ml)	Fructan (mg/ml)	Fructan/ Glucan	Glucan (mg/ml)	Fructan (mg/ml)	Fructan/ Glucan		
<i>a</i>	HS6	0.71	0	0	1.26	0.14	0.11	0.51	0.07
	HS1	2.24	0	0	0.38	0.08	0.21	4.87	0.05
	FIL	1.60	0	0	0.46	0.11	0.24	2.81	0.03
<i>d</i>	OMZ176	0.93	0	0	0.67	0.12	0.18	1.18	0.08
	P1	1.33	0	0	0.48	0.10	0.21	2.29	0.06
<i>g</i>	6715	0.53	0	0	0.36	0.10	0.28	1.15	0.11
	K1-R	0.88	0	0	0.64	0.14	0.22	1.13	0.09
	OMZ65	1.08	0	0	0.61	0.11	0.18	1.50	0.07
	AHT-k	1.46	0	0	0.32	0.10	0.31	3.48	0.06
<i>b</i>	FA1	0.10	0	0	1.19	0.25	0.21	0.07	0.19
	BHT	0.09	0	0	0.23	0.28	1.22	0.18	0.88
<i>c</i>	Ingbritt	0.13	0	0	0.95	0.23	0.24	0.11	0.21
	GS5	0.01	0.09	9.0	2.01	0.73	0.36	0.04	0.41
	OMZ70	0.35	0	0	0.75	0.27	0.36	0.34	0.25
	PK1	2.38	0	0	0.76	0.12	0.16	2.70	0.04
<i>e</i>	B14	0.82	0	0	3.96	0.31	0.08	0.19	0.06
	P4	0.33	0.06	0.18	3.72	0.54	0.15	0.09	0.15
<i>f</i>	OMZ175	0.77	0.07	0.09	0.89	0.39	0.44	0.66	0.28
	MT3940	0.13	0	0	1.54	0.28	0.18	0.07	0.17

1) グルカナーゼ感受性

全ての血清型の IP はデキストラナーゼによって分解されたが、その感受性は *b/c/e/f* 型が *a/d/g* 型より高かった (Fig. 2)。*a/d/g* 型の IP の感受性はほぼ同じであった。*b/c/e/f* 型でも *e* 型の感受性がやや低い他は、ほぼ同程度であった。このように各血清型の IP はデキストラナーゼ感受性により大きく 2 群 (*a/d/g* 型と *b/c/e/f* 型) に類別できた。

IP の α -1, 3 グルカナーゼ感受性は血清型毎にかなり異なり、*d/g* 型が高く、*b/c/f* 型が同程度でそれに続き、*a/e* 型が同程度で低い傾向を示した (Fig. 3)。このように *d/g* 型が他の 5 型より感受性の高いことが示された。

SP のデキストラナーゼ感受性は、血清型により大きく異なり、*a* 型が最も高く、以下 *e, f, c, b* 型の順に感受性が低くなり、*d/g* 型が同程度で最も低い感受性を示した (Fig. 4)。このように *d/g* 型が他の 5 型より感受性の低いことが示された。

いずれの血清型の SP も α -1, 3 グルカナーゼによって全く分解されなかった (成績省略)。

Fig. 2 Hydrolysis of water-insoluble polysaccharide (IP) by dextranase. IP (10 μ g) was incubated with dextranase (0.07 mU) at 37°C in 60 μ l of 0.1 M acetate buffer, pH 6.0. Symbols: $\circ$, HS1 (*a*); $\bullet$, BHT (*b*); $\blacktriangle$, OMZ70 (*c*); $\triangle$, OMZ176 (*d*); $\blacksquare$, B14 (*e*); $\times$, OMZ175 (*f*); $\square$, AHT-k (*g*).

2) 粘性と分子量分布

IP の固有粘度は, *g* 型が最も大きく, 以下 *b*, *d*, *a* 型の順に小さくなり, *c/e/f* 型は同程度で最も小さい値を示した (Table 5)。限外ろ過によって IP の分子量分布をみると (Table 5), XM 100A および XM 300 によるろ過阻止率は, *c/e/f* 型では他の 4 血清型に比較して低い傾向を示した。すなわち, XM 300 による阻止率は, *c/e/f* 型において 68% 以下と低い値を示し, とくに *f* 型

では約 50% が阻止されたにすぎなかったが, *a/b/d/g* 型では阻止率が 78% 以上であり, とくに *g* 型ではほとんどが阻止された。このように, IP は固有粘度および分子量分布のいずれにおいても血清型により大きく 2 群 (*a/b/d/g* 型と *c/e/f* 型) に類別された。

SP の固有粘度および限外ろ過による阻止率 (Table 6) は全て IP より低い値を示し, SP の方が IP より低分子画分を多く含むことが示唆された。固有粘度の最も大きいものは *g* 型, 最も

Fig. 3 Hydrolysis of water-insoluble polysaccharide (IP) by α -1, 3 glucanase.

IP (20 μ g) was incubated with α -1, 3 glucanase (0.16 mU) at 37°C in 120 μ l of 0.1 M acetate buffer, pH 6.0. For symbols, see legend to Fig. 2.

Fig. 4 Hydrolysis of water-soluble polysaccharide (SP) by dextranase. SP (10 μ g) was incubated with dextranase (0.07 mU) at 37°C in 60 μ l of 0.1 M acetate buffer, pH 6.0. For symbols, see legend to Fig. 2.

Table 5 Intrinsic viscosity and molecular size distribution of water-insoluble polysaccharides (IP)

Serotype	Strain	Intrinsic viscosity [η] (100cm ³ /g)	Retention rate (%)		
			PM10	XM100A	XM300
<i>a</i>	HS1	1.93	93.4	93.6	77.6
<i>d</i>	OMZ176	2.12	95.8	92.0	85.7
<i>g</i>	AHT-k	3.88	ND*	98.0	96.2
<i>b</i>	BHT	2.33	ND*	97.0	82.1
<i>c</i>	OMZ70	1.42	92.9	89.3	67.6
<i>e</i>	B14	1.38	ND*	77.4	60.2
<i>f</i>	OMZ175	1.42	91.6	86.3	49.4

* ND : not determined.

Table 6 Intrinsic viscosity and molecular size distribution of water-soluble polysaccharides (SP)

Serotype	Strain	Intrinsic viscosity [η](100cm ³ /g)	Retention rate (%)		
			PM10	XM100A	XM300
<i>a</i>	HS1	0.70	59.6	53.9	22.2
<i>d</i>	OMZ176	0.08	16.7	11.8	3.6
<i>g</i>	AHT-k	1.10	ND*	37.3	30.5
<i>b</i>	BHT	0.54	ND*	84.6	66.5
<i>c</i>	OMZ70	0.27	40.7	29.2	22.6
<i>e</i>	B14	0.50	ND*	49.3	34.7
<i>f</i>	OMZ175	0.85	84.5	76.8	49.9

* ND : not determined.

Table 7 *S. mutans* cell-agglutinating activity of water-insoluble (I P) and soluble (S P) polysaccharides

Serotype	Strain	Agglutination titer*	
		I P	S P
<i>a</i>	HS1	≥1024	64
<i>d</i>	OMZ176	64	32
<i>g</i>	AHT-k	128	128
<i>b</i>	BHT	>1024	≥1024
<i>c</i>	OMZ70	>1024	≥1024
<i>e</i>	B14	>1024	≥1024
<i>f</i>	OMZ175	>1024	>1024

* Reciprocal of the highest dilution of IP suspension or SP solution at a 0.5 mg/ml concentration to give an apparent agglutination of *S. mutans* AHT-k (*g*) cells.

小さいものは *d* 型であり, また XM100A および XM300でのろ過阻止率は *b* 型が最も高く, *d* 型が最も低い値を示し, 他の血清型ではそれぞれの中間の値を示した。このように SP の固有粘度および分子量分布は各血清型により IP 以上に差のあることが示された。

3) *S. mutans* 菌体凝集能

IP および SP の *S. mutans* AHT-k 株 (*g* 型) 菌体凝集能 (Table 7) は, *b/c/e/f* 型では非常に高く, 2^{-10} mg/ml でも強い凝集を示したが, *d/g* 型の IP では凝集能が低く, 明瞭な凝集を認め得る最終濃度は $2^{-6} \sim 2^{-7}$ mg/ml であった。また, *a* 型の IP は前者にほぼ匹敵する凝集能を示した。一方, SP の菌体凝集能は, *b/c/e/f* 型で高

く, *a/d/g* 型では一様に弱かった。

4) メチル化分析

結合分析の結果を Table 8 に示した。

全ての血清型において, IP 中のグルカン (IG) の α -1,3 結合含量は SP 中のグルカン (SG) のそれより高く, したがって α -1,6 結合含量は SG の方が高かった。 α -1,3,6 分枝の程度は, *a/d/g* 型では IG と SG とでほぼ同じであったが, *b/c/e/f* 型では, 概して SG の方が高度に分枝していた。

IG の α -1,6 結合含量は, 概して *b/c/e/f* 型の方が *a/d/g* 型より高く, しかも各群の中ではその含量はほぼ同じであった。 α -1,3 結合含量は, 各血清型においてもかなりばらついていたが, α -1,6 結合含量に対する α -1,3 結合含量の比をみると, *a/d/g* 型が *b/c/e/f* 型より高い値を示した。分枝の程度は, *a* 型が最も高く, *d/g/e* 型がそれに続き, *b/c/f* 型では最も低かった。

全ての菌株の SG は主として α -1,6 結合グルコースから構成されていたが, その含量は菌株により異なっていた。また α -1,3 結合含量も菌株によりかなりばらついており, 血清型による一定の傾向は認められなかった。分枝の程度は OMZ176 株を除くその他の菌株では 10~20%の間にあり, ほぼ同程度であった。

以上のように, IG と SG の分枝の程度の差, IG の α -1,6 結合含量, および α -1,6 結合含量に対する α -1,3 結合含量の比により, *S. mutans* の合成するグルカンの化学構造は, *a/d/g* 型と *b/c/e/f* 型とのそれぞれにおいて, 基本的に共

Table 8 Methylation analysis of water-insoluble and soluble glucans produced by cell-free enzyme from the *S. mutans* strains

Serotype	Strain	O-methyl-D-glucose (mol %)									
		Water-insoluble glucan					Water-soluble glucan				
		2,3,4,6- tetra- ^{a)}	2,4,6- tri- ^{b)}	2,3,4- tri- ^{c)}	2,4- di- ^{d)}	2,4,6-/ 2,3,4-	2,3,4,6- tetra- ^{a)}	2,4,6- tri- ^{b)}	2,3,4- tri- ^{c)}	2,4- di- ^{d)}	2,4,6-/ 2,3,4-
<i>a</i>	HS1	22.8	41.0	14.5	21.7	2.83	25.9 ^{e)}	1.0 ^{e)}	51.0 ^{e)}	22.1 ^{e)}	0.02
	FIL	30.4 ^{e)}	25.7 ^{e)}	23.9 ^{e)}	20.0 ^{e)}	1.06	22.1 ^{e)}	2.3 ^{e)}	60.2 ^{e)}	15.4 ^{e)}	0.04
<i>d</i>	OMZ176	11.6	61.2	15.2	12.0	4.03	13.4	4.1	75.6	6.9	0.05
	P1	20.0	48.0	16.1	15.9	2.98	18.7	17.4	48.2	15.7	0.36
<i>g</i>	AHT-k	15.7	54.6	15.4	14.3	3.55	18.7 ^{e)}	8.7 ^{e)}	57.7 ^{e)}	14.9 ^{e)}	0.15
	6715	11.2	66.2	14.6	8.0	4.53	32.9	14.6	34.1	18.4	0.43
<i>b</i>	BHT	9.9	41.4	39.6	9.1	0.05	17.6	9.7	57.7	15.0	0.17
	FA1	7.8	55.8	34.3	2.1	1.63	20.5 ^{e)}	0.9 ^{e)}	62.6 ^{e)}	16.0 ^{e)}	0.01
<i>c</i>	OMZ70	7.7	56.5	31.0	4.8	1.82	20.2 ^{e)}	3.4 ^{e)}	63.2 ^{e)}	13.2 ^{e)}	0.05
	Ingbritt	12.0	45.9	36.2	5.9	1.27	19.6	5.6	58.3	16.5	0.10
<i>e</i>	B14	10.5	27.2	47.0	15.3	0.58	21.6 ^{e)}	4.8 ^{e)}	57.4 ^{e)}	16.2 ^{e)}	0.08
	P 4	22.2 ^{e)}	25.8 ^{e)}	41.2 ^{e)}	10.8 ^{e)}	0.63	17.1	10.7	54.2	18.0	0.20
<i>f</i>	OMZ175	14.4	35.2	41.2	9.2	0.85	18.5 ^{e)}	16.6 ^{e)}	52.6 ^{e)}	12.3 ^{e)}	0.32
	MT3940	7.2	60.4	26.0	6.4	2.32	22.6	18.6	48.9	9.9	0.38

a) Non-reducing terminal residue. b) α -1, 3-linked residue. c) α -1, 6-linked residue. d) Branched residue. e) Methylation was performed by the procedure of Haworth (35) followed by the method of Hakomori (33)

通する部分の多いことが示された。

5) 超微細形態

透過型電子顕微鏡下に観察すると、全ての血清型の IP は 2 つの基本構成成分から構成されていた。1 つは周囲に短い綿毛様の突出線維をもつ、幅が約 4 nm の原線維が平行した電子密度の高い 2 本鎖であり、他は幅が約 2 nm の電子密度の低い 1 本鎖細線維であった。

d/g 型の IP (Fig. 5Ⅱ と 5Ⅲ) はほぼ同じ形態的特徴を示した。2 本鎖線維は一般に長く、また 1 本鎖細線維は互いに交叉して網目構造を形成していた。両線維成分は、それぞれが独立して観察されることは稀で、複雑にからみ合って大きな凝集塊を形成しており、また 1 本鎖細線維が極めて密に集合して電子密度の高い球状物を形成し、その周囲を 2 本鎖線維が取り囲んでいる構造物が観察された。*a* 型の IP (Fig. 5Ⅰ) は、基本的には *d/g* 型の IP と同様の所見を示したが、*d/g* 型に比べて 2 本鎖線維が短かく、球状構造物の認められる割合が少なかった。

c 型の IP (Fig. 5Ⅴ) を構成する 2 本鎖線維は前 3 血清型のそれと比較すると短かく、しばしば独立して存在するのが観察された。1 本鎖細線維は網目構造をとって 2 本鎖線維の周囲に存在し、両者は小さな凝集塊を形成していた。また、孤立した 1 本鎖細線維が、凝集塊間、2 本鎖線維間および凝集塊と 2 本鎖線維との間を結合している像がしばしば観察された。なお、周囲を 2 本鎖線維に囲まれた電子密度の高い球状構造物は観察されなかった。*e/f* 型の IP も *c* 型と基本的には同様の所見を示したが、*e* 型 (Fig. 5Ⅵ) では *c* 型に比べて 1 本鎖網目構造と 2 本鎖線維とからなる小凝集塊が孤立して存在することは少なく、また *f* 型 (Fig. 5Ⅶ) では、ほとんどすべての線維が互いに緊密に連絡して大きな塊をなしていた。

b 型の IP (Fig. 5Ⅳ) は *a* 型および *c/e/f* 型に近い所見を示したが、周囲を 2 本鎖線維が取り囲む電子密度の高い球状構造物を欠如することで *a* 型と、また 1 本鎖網目構造と 2 本鎖線維とからなる密な小凝集塊の出現頻度が低いことで *c/e/f*

Fig. 5 Electron micrograph of insoluble polysaccharides (IP) produced by cell-free enzyme preparations from serotype a-g *S. mutans* strains

Fig. 6 Electron micrograph of soluble polysaccharides (SP) produced by cell-free enzyme preparations from serotype *a-g* *S. mutans* strains

型と、それぞれ違っていた。

このように IP の超微細形態は一見して、*d/g* 型、*a* 型、*b* 型、*c/elf* 型に類別されたが、概して *a* 型は *d/g* 型に、*b* 型は *c/elf* 型に近い特徴を有していた。

全ての血清型の SP の基本成分は 1 本鎖細線維であると思われた。*a/g* 型の SP (Fig. 6 I と 6 III) では、1 本鎖細線維の大部分は電子密度の高い大型の球状構造を形成し、その周囲から 1 本鎖細線維が放出して時に球状物間を連結していた。また *a* 型の SP に見られる球状物のいくつかは表層下に電子密度の低い一層が存在しており、このような構造は *a* 型に特徴的なものであった。*elf* 型の SP (Fig. 6 VI と 6 VII) は *a/g* 型と基本的には同様の構造物からなっていたが、*a/g* 型に比べて、1 本鎖細線維が網目を形成しているものが主体であった。

b/c 型 (Fig. 6 IV と 6 V) では明瞭な球状構造物はほとんどなく、電子密度の高い、小さい不定形物が多数観察された。*d* 型 (Fig. 6 II) でも、球状物はほとんど観察されず、1 本鎖細線維による網目構造が主体となっていた。

このように SP の超微細形態は、*a/g* 型、*elf* 型、*b/c* 型、*d* 型に一応分類できたが、明瞭な類別性はなかった。

考 察

a-g 血清型に属する全ての *S. mutans* の菌体外酵素が産生した IP はほとんどがグルカンのみから構成されており (*c/elf* 型の各 1 株はフルクタンを含む^{40,41)})、一方、調べた全ての菌株の SP にはフルクタンが検出された (Table 4)。このような構成をもつ産生多糖の一般性状、IP と SP の合成量の比および主に IP の諸性状など、本研究で示した成績の多くは一致して、*a-g* 型の *S. mutans* を *a/d/g* 型と *b/c/elf* 型の 2 群に大別し得ることを示した。

上述のような構成をもつ IP と SP の合成量の比率は、*a/d/g* 型では IP の方が、一方 *b/c/elf* 型では SP の方が高かった (Table 4)。Inoue らは *S. mutans* をスクロース培養して合成された多糖においても同様の成績を報告している⁴²⁾。

α -1, 3 結合グルコース直鎖は本来非水溶性であり⁴³⁾、 α -1, 6 結合直鎖が本来水溶性であることを考えれば、 α -1, 6 結合残基に対する α -1, 3 結合残基の合成量の比が高い *a/d/g* 型の方が、IP の回収量が多いこと (Table 4 と 8) は容易に説明される。

主として *S. mutans* OMZ 176 株の産生する多糖についての詳細な検討の結果から、現在 *S. mutans* の産生する IG は、 α -1, 3 グリコシド結合したグルコース残基の直鎖から α -1, 6 結合した側鎖が分枝した樹状構造を持つこと^{17,41)}、また、SG は α -1, 6 結合グルコース直鎖を主鎖とし、 α -1, 3 結合分枝鎖を持つこと¹⁷⁾ が推測されている。*a-g* 型の *S. mutans* が産生する IP はすべてこのような基本構造をもつと仮定して、メチル化分析の成績 (Table 8) を解釈すると、*a/d/g* 型の IP は *b/c/elf* 型のものに比べて α -1, 3 結合主鎖の反復単位 (長さ) が α -1, 6 結合分枝鎖のそれに比べて長く、かつ α -1, 3, 6 分枝の程度が高いことが推測される。一方、SP では各血清型あるいはその群別において特徴的な傾向は認められず、一部の菌株のものを除き、ほぼ類似の化学構造をしていることが推測される。

S. mutans が産生する多糖の形態学的特徴に関する報告は意外に少ない^{19-22,44)}。著者らはこれまで *S. mutans* AHT-k 株が産生するグルカンの形態を電子顕微鏡下に調べ^{23,24)}、この株の産生するグルカンは基本的に 2 種類の線維成分からなることを報告した。1 つは周囲にデキストラナーゼ感受性の短かい突出線維をもつ、1 本の幅が約 4 nm の電子密度の高い原線維からなる、互いに平行した 2 本鎖線維 (全幅約 12 nm) の形態を示すものであり、他はデキストラナーゼ感受性で、しばしば網目構造を形成する電子密度の低い幅約 2 nm の 1 本鎖細線維である。本研究において示したように、*a-g* の全ての血清型の *S. mutans* が産生する IP は、この 2 本鎖線維および 1 本鎖細線維を基本構成成分としていることが明らかとなった (Fig. 5)。しかし、両構成成分の長さ、出現頻度、あるいは存在様式などによって、*a/d/g* 型と *b/c/elf* 型とではそれぞれに特徴的な電顕像を示した。

$a/d/g$ 型の IP は、基本的には 2 本鎖線維と 1 本鎖細線維およびその細かい網目構造物とが複雑にからみ合っただけ大きな凝集塊を形成していたが、とくに電子密度の高い球状物の周囲を 2 本鎖線維が取りまいていてという特徴ある像が観察された。この球状物は Guggenheim と Schroeder¹⁹⁾ が *S. mutans* OMZ 176 株のスクロース培養菌体の周囲に観察した “Electron dense, globular, rather homogeneous material” と本質的に同一のものと思われるが、デキストラナーゼを作用させると、減少あるいは消失する^{19, 24)} ことから、1 本鎖細線維が極めて密に集合したものと考えられる。さて、このような電顕像において、 a 型の IP は d/g 型に比べて 2 本鎖が若干短かく、凝集塊も粗で、球状物の出現頻度が低い傾向にあった。このことは $a/d/g$ 型の中で、 a 型の IP が低分子画分を最も多く含んでいた (Table 5) こと、および *S. mutans* 菌体に対する凝集能が最も高かったこと (Table 7) とよく一致する。

S. mutans が産生する IG は、その凝集塊の周辺に存在する 1 本鎖細線維あるいは 2 本鎖線維の突出線維 (ともにデキストラナーゼ感受性) を介して同菌体に結合する^{23, 24)}。したがって IG の 2 本鎖線維は、凝集活性をもつ範囲で短かいほどまた IG の凝集塊が小さいほど凝集能は高くなる。 $a/d/g$ 型の IP に含まれる α -1, 6 結合含量はほぼ同じである (Table 8) ことから、*S. mutans* 菌体と結合し得る線維の量は、 $a/d/g$ 型ではほぼ同程度と考えられる。このように考えれば、 a 型の IP の *S. mutans* 菌体凝集能が d/g 型より高いことが説明できよう。 a 型と d/g 型の IP の形態的な特徴の違いが、このことを支持している。

一方、 $b/c/elf$ 型の IP (Fig. 5 IV-5 VII) はデキストラナーゼ感受性の 1 本鎖細線維とその網目構造物を多量に含む。このことは、この血清型の IP のデキストラナーゼ感受性 (Fig. 2) および α -1, 6 結合含量 (Table 8) が高いこととよく一致している。さらに、 $b/c/elf$ 型の IP では、周囲を 2 本鎖線維が取り囲む電子密度の高い球状構造物は全く観察されず、2 本鎖線維が短かく、またこれと 1 本鎖細線維の網目構造物からなる凝集塊が小さくかつ孤立して存在しており、 $a/d/g$ 型

のような大きな凝集塊を形成している像は認められなかった。このことは c/elf 型の IP は $a/d/g$ 型に比べて低分子画分を多く含むという結果 (Table 5) とよく一致している。

以上に述べた IP の諸性状の相違の結果として、合成された多糖 (Table 2 と Fig. 1) は、 $a/d/g$ 型では明瞭な凝集塊を形成して沈殿したのに対し、 $b/c/elf$ 型では塊が形成されず、均一な懸濁液となるのであろう。異なる 2 種類の基本線維成分の長さ、含量、からみ合いの差が、肉眼的な凝集塊の形成の有無に関係しているものと思われる。

Trautner ら²⁶⁾ は、 α -e の 5 血清型の標準株と新鮮分離株をスクロース培養して得たグルカンのメチル化分析を行ない、 α -e の菌株の非水溶性画分 (彼らのいう AS-I) と水溶性画分 (WS-II) には α -1, 4 結合残基を検出し得なかったこと、また両画分とも α -1, 6 結合含量および α -1, 3, 6 分枝の含量の差によって a/d 型と $b/c/e$ 型の 2 群に分類し得ることを報告している。本研究でも、菌体外酵素とスクロースとを反応させて得た全ての試料に α -1, 4 結合は検出されなかった。また、IP は α -1, 3 : α -1, 6 結合含量比の違いによって、 $a/d/g$ 型と $b/c/elf$ 型に分類できたが、 $a/d/g$ 型と e 型では $b/c/f$ 型より分枝含量が高いという成績が得られた。なお、これまでにも、今回用いた菌株のうち、OMZ 176 株^{11, 15, 17, 26)}、6715 株¹⁸⁾、Ingbritt 株^{17, 40)}、HS1 株²⁶⁾、BHT 株²⁶⁾、FA1 株²⁶⁾、OMZ 70 株²⁶⁾ の IP についてメチル化分析の成績が報告されているが、OMZ 176 株¹¹⁾ と 6715 株¹⁸⁾ を除いて、ほぼ同じ分析値が報告されている。また、本研究の結果では、 α -g 血清型の SP には Trautner ら²⁶⁾ がいうような α -1, 6 結合含量および分枝含量による血清型の類別性は認められなかった。これらの不一致は多分、多糖の合成および分画の方法が異なるためであろう。

このような血清型群における IP の化学構造上の特徴はグルカナーゼ感受性の成績からも支持される。Newbrun は、部分精製したグルコシルトランスフェラーゼを用いてスクロースから合成したグルカン (用いられた分画方法から IG と思われる) のデキストラナーゼ感受性は、血清型に依存すると報告している²⁵⁾。 $a/d/g$ 型の IP は

b/c/elf 型に比べて α -1, 6 結合含量が少なく (Table 8), デキストラナーゼ感受性が低いこと (Fig. 2) とよく一致している。また, IP の α -1, 3 グルカナーゼ感受性は *d/g* 型が高く *a* 型が最も低かった (Fig. 3)。構造分子中に α -1, 3, 6 分枝が多く含まれているほど, endo- α -1, 3 グルカナーゼは作用し難い。*a* 型の IP は最も高度に分枝しており (Table 8), このことが α -1, 3 グルカナーゼ感受性を低くしている原因と考えられる。同様に *elf* 型の IP は α -1, 3 結合含量が *a* 型より低いにもかかわらず, α -1, 3 グルカナーゼ感受性が高いのは, 分枝の程度の差によって説明されよう。

S. mutans の歯面への定着に重要な役割を果たしている粘着性グルカンの水不溶性には α -1, 3 結合残基が, また粘着性の発現には α -1, 6 結合残基が関与していると考えられている^{15,31)}。Table 3 に示すように, α -1, 6 結合残基に対する α -1, 3 結合残基の比が大きい *a/d/g* 型は管壁付着能を有すが, その比が小さい *b/c/elf* 型の管壁付着能は非常に弱かった。このことから, 両結合含量の比が IP の粘着性に重要であることがわかる。さらに, *a/d/g* 型では *b/c/elf* 型に比べてこのような粘着性に富む IP を大量に合成する (Table 4)。その結果として, *a/d/g* 型の合成する多糖のガラス壁付着量は *b/c/elf* 型のものに比べて極端に多いこと (Table 3) が説明できよう。

概して, *a/d/g* 型の IP と SP はいずれも *b/c/elf* 型のそれらよりも, *S. mutans* 菌体に対する凝集能が低い (*a* 型の IP は例外; Table 7)。*a/d/g* 型の IP の α -1, 3, 6 分枝の程度は *b/c/elf* 型のものに比べて大きいこと, また *a-g* 型の SP の分枝の程度はほぼ同じであること (Table 8) から, IP と SP の分枝の程度はそれぞれの菌体凝集能には直接に関係のないことが知られる。両血清型群間の違いは, これ以外の因子, たとえば, IP ではそれが形成する分子凝集塊の大きさなどによるのであろう。このように, 種々の血清型の IP と SP の菌体凝集能が血清型を異にする菌株で異なっているということは, *S. mutans* の生態学, とくに歯面への定着性, ひいてはプラーク形成の機作を考える上で大変興味深い。

最初に述べたように, *S. mutans* は, そのスクロース寒天培地上でのコロニー形態, 多くの生化学的性状, 抗原決定基(免疫学的交叉反応)などによって, *a/d/g* 型, *c/elf* 型, *b* 型の血清型群に分類し得ることが知られている^{1,6)}。これらの多くの性状と同様に, 本研究の成績から, *S. mutans* の菌体外酵素がスクロースから合成した多糖, ことに IP (ほとんどがグルカン) の諸性状の特徴によって, 各血清型の *S. mutans* を大きく 2 群, *a/d/g* 型と *b/c/elf* 型に, 前者はさらに *a* 型と *d/g* 型, 後者は *b* 型と *c/elf* 型に分類し得ることが示された。*e* 型のグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) に対する抗血清が *c/elf* 型の GTF の活性を完全に阻害し⁴⁵⁾, また *a* 型の GTF の抗血清が *a/d/g* 型の GTF の活性を阻害する⁴⁶⁾ という報告, あるいは菌体外 GTF の電気泳動パターンも *a/d/g* 型と *b/c/elf* 型とで明らかに異なっている成績 (未発表) も, 今回の結果を強く支持する。このように, *S. mutans* の血清型を *S. mutans* のう蝕原性の発現に重要な役割を担っている非水溶性グルカンの性状によって 2 群に大別し得たということは, この菌種のう蝕原性の発現機序の解明および免疫学的なう蝕予防の検討に資するところが大きいと思われる。

ところで, Shibata らは, *a-g* 血清型の *S. mutans* 株のハムスターに対するう蝕原性は菌株の差によるところが大きく, 血清型による明瞭な類別性はなかったと報告している⁴⁷⁾。同時に調べられた各菌株の重要な *in vitro* 性状のいくつか (“wire plaque” の形成量など) は必ずしも *in vivo* におけるプラーク形成量やう蝕原性と一致していない。多因子性疾患であるといわれるう蝕の発病のメカニズムは, これに関わる種々の因子, 例えば, 唾液中の凝集因子や抗菌因子, 口腔常在菌叢, エナメル質表層の性状などを系統的に整理し, それらのかかわりを有機的に考察して初めて解明されるものであろう。このような観点から, う蝕の発病に関して最も重要な因子の 1 つである *S. mutans* の非水溶性グルカンの性状を血清型によって明確に整理し得た本研究の成績は, 非水溶性グルカンと他のう蝕原性因子との有機的な関連を考察するうえで大きな意義をもつと考えられる。

結 論

a-g の血清型に属する *S. mutans* の菌体外酵素がスクロースより合成した多糖の生化学的および形態学的な諸性状を比較、検討し、次の結果を得た。

- 1) *a/d/g* 型の多糖は明瞭な凝集塊を形成しガラス壁に大量に固着したが、*b/c/e/f* 型の多糖は均一に混濁し、ガラス壁への固着量は少なかった。
- 2) *a/d/g* 型では非水溶性多糖 (IP) を、また *b/c/e/f* 型では水溶性多糖 (SP) を主に合成した。
- 3) IP の α -1,3/ α -1,6 結合含量比は *a/d/g* 型の方が *b/c/e/f* 型より高かった。
- 4) *a/d/g* 型の IP と SP はほぼ同程度の分枝をもつが、*b/c/e/f* 型では IP より SP の方が高度に分枝していた。
- 5) IP のデキストラナーゼ感受性は *a/d/g* 型より *b/c/e/f* 型の方が高かった。
- 6) IP の α -1,3 グルカナーゼ感受性は、*d/g* 型が高く *a* 型が最も低かった。
- 7) *a/d/g* 型と *b* 型の IP は *c/e/f* 型に比べて高分子画分を多く含み、固有粘度も高かった。

抄録：*a-g* の血清型に属する *Streptococcus mutans* の 19 株の菌体外酵素がスクロースより合成した多糖の形態学的および生化学的な諸性状を比較、検討した。

a/d/g 型の菌体外酵素が合成した多糖は凝集塊を形成して沈殿し、大量にガラス壁に固着する性質を有していたが、*b/c/e/f* 型の酵素によって合成された多糖は均一に浮遊して、ごく少量しか壁に付着しなかった。*a/d/g* 型では主として非水溶性画分 (IP) を、一方 *b/c/e/f* 型では水溶性画分 (SP) を合成した。*c/e/f* 型の各 1 株を除く他の菌株の IP にはフルクタンが検出されなかったが、全ての菌株の SP は有意の量のフルクタンを含んでいた。全多糖中におけるグルカン量に対するフルクタン量の比は、*a/d/g* 型の方が、*b/c/e/f* 型より低い傾向にあった。

全血清型を通じて IP (主にグルカン) の α -1,3 グルコシド結合含量は SP のそれより高く、 α -1,6 結合含量は SP の方が高かった。*a/d/g* 型の IP と SP とはほぼ同程度の分枝をもつが、*b/c/e/f* 型では IP より SP の方が高度に分枝していた。

a/d/g 型の IP は *b/c/e/f* 型の IP に比べて、1) α -1,3 結合含量が高く (α -1,3/ α -1,6 結合含量比が大)、かつ α -1,3,6 分枝の割合が高く、2) したがって α -1,3 グルカナーゼ感受性は高く (*a* 型を除く)、デキストラナーゼ感受性は低く、4) また、多量の高分子画分を含み、固有粘度も高かった (*b* 型を除く) が、4) *S. mutans* 菌体に対する凝集能 (*a* 型を除く) は弱かった。

a/d/g 型の IP は周囲に突出線維を有する 2 本鎖線維と、細い 1 本鎖細線維が単独あるいは互いにかみ合って網目あるいは球状構造を示し、大きな凝集塊を形成していた。*b/c/e/f* 型の IP では *a/d/g* 型より 2 本鎖線維が短かく、1 本鎖細線維とからみ合って生じた凝集塊も小さく、また *a/d/g* 型に認められた球状構造物は全く観察されなかった。

このように *S. mutans* がスクロースより合成する IP (主にグルカン) は、その諸性状によって大きく

8) *S. mutans* 菌体凝集能は、IP では *d/g* 型が、SP では *a/d/g* 型がそれぞれ他の血清型に比べて低かった。

9) *a/d/g* 型の IP は 2 本鎖線維と 1 本鎖細線維とが複雑にかみ合って大きな凝集塊を形成していたが、*b/c/e/f* 型では 2 本鎖線維が短かく、凝集塊も小さかった。

10) 各血清型の SP は、その諸性状によって統一的なまとまりを示す類別をすることができなかった。

以上のことから、*S. mutans* の菌体外酵素がスクロースより合成した多糖は、主に IP の諸性状により大きく *a/d/g* 型と *b/c/e/f* 型の 2 群に、前者はさらに *a* 型と *d/g* 型に、後者はさらに *b* 型と *c/e/f* 型に類別し得ることが明らかになった。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究を終始御指導下さいました井上昌一教授ならびに古賀敏比古助教授（現国立予防衛生研究所歯科衛生部室長）に深謝の意を表します。併せて、メチル化法を御指導下さいました鹿児島大学農学部安部淳一博士および透過型電子顕微鏡を使用させて頂きました、鹿児島大学医学部共同利用研究室に対し、深謝いたします。

a/d/g 型と *b/c/e/f* 型の 2 群に前者はさらに *a* 型と *d/g* 型, 後者は *b* 型と *c/e/f* 型に類別することができた。

一方, SP の諸性状は, あるいは各血清型を通じて変動がなく (α -1,3 グルカナーゼ感受性, メチル化分析, 形態学的特徴), あるいは変動が大きく (α -1,6 グルカナーゼ感受性, 固有粘度, 分子量分布), また一部の血清型間で共通性を示すもの (*S. mutans* 菌体凝集能) もあったが, 性状の多くを通じて統一的なまとまりを示す類別はできなかった。

文 献

- Hamada, S. and Slade, H. D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. **44** : 331-384, 1980.
- Gibbons, R. J. and van Houte, J.: Dental caries. Ann. Rev. Med. **26** : 121-136, 1975.
- Bratthall, D.: Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. Odontol. Revy. **21** : 143-152, 1970.
- Perch, B., Kjems, E. and Ravn, T.: Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. Acta Pathol. Microbiol. Scand. **82** : 357-370, 1974.
- Beighton, D., Russel, R. R. B. and Hayday, H.: The isolation and characterization of *Streptococcus mutans* serotype *h* from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). J. Gen. Microbiol. **24** : 271-279, 1981.
- McGhee, J. R. and Michalek, S. M.: Immunology of dental caries: microbial aspects and local immunity. Ann. Rev. Microbiol. **35** : 595-638, 1981.
- Gibbons, R. J.: Formation and significance of bacterial polysaccharides in caries etiology. Caries Res. **2** : 164-171, 1968.
- Hamada, S. and Slade, H. D.: Mechanisms of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces *in vitro*. In Bacterial Adherence. E. H. Beachy (ed.), p. 106-135, Chapman and Hall, London, 1980.
- Gibbons, R. J. and Fitzgerald, R. J.: Dextran-induced agglutination of *Streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plaque. J. Bacteriol. **98** : 341-346, 1969.
- Guggenheim, B.: Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. Helv. Odontol. Acta **14** : 89-108, 1970.
- Ceska, M., Granath, K., Norman, 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.
- Newbrun, E. and Scharma, M.: Further studies on extracellular glucans synthesized by glucosyltransferases of oral streptococci. Caries Res. **10** : 255-272, 1976.
- Takehara, T., Inoue, M., Morioka, T. and Yokogawa, K.: Purification and properties of endo- α -1, 3-glucanase from a *Streptomyces chartreusis* strain. J. Bacteriol. **145** : 729-735, 1981.
- Inoue, M. and Koga, T.: Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. **25** : 922-931, 1979.
- Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K. and Kotani, S.: The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase. Carbohydr. Res. **38** : 374-381, 1974.
- Nishizawa, T., Imai, S. and Araya, S.: Methylation analysis of extracellular glucans produced by *Streptococcus mutans* strain JC2. Archs. Oral Biol. **22** : 281-285, 1977.
- Hare, M. D., Svensson, S. and Walker, G. J.: Characterization of the extracellular, water-insoluble α -D-glucans of oral streptococci by methylation analysis, and by enzymic synthesis and degradation. Carbohydr. Res. **66** : 245-264, 1978.
- Freedman, M., Birkhed, D. and Granath, K.: Analysis of glucans from cariogenic and mutant *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. **21** : 17-27, 1978.
- Guggenheim, B. and Schroeder, H. E.: Biochemical and morphological aspect of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. Helv. Odont. Acta **11** : 131-152, 1967.
- Newbrun, E., Lacy, R. and Christie, T. M.: The morphology and size of the extracellular polysaccharides from oral streptococci. Archs. Oral Biol. **16** : 863-872, 1971.
- Johnson, M. C., Bozzola, J. J. and Shechmeister, L. L.: Morphological study of *Streptococcus mutans* and two extracellular polysaccharide mutants. J. Bacteriol. **118** : 304-311,

- 1974.
- 22) Newman, H. N., Donoghue, H. D. and Britton, A. B. : Effect of glucose and sucrose on the survival in batch culture of *Streptococcus mutans* C67-1 and a non cariogenic mutant C67-25 : morphological studies. *Microbios.* **15** : 113-125, 1976.
- 23) Yakushiji, T. and Inoue, M. : Ultrastructure of glucans produced by cell-bound glucosyltransferase of the oral bacterium *Streptococcus mutans* AHT. *Archs. Oral Biol.* **25** : 297-303, 1980.
- 24) Yakushiji, T., Koga, T. and Inoue, M. : Morphology of water-insoluble and -soluble glucans of the dental plaque organism *Streptococcus mutans* AHT and their interaction with the cell surface envelope. *Archs. Oral Biol.* **26** : 931-937, 1981.
- 25) Newbrun, E. : Extracellular polysaccharides synthesized by glucosyltransferases of oral streptococci. *Caries Res.* **6** : 132-147, 1972.
- 26) Trautner, K., Birkhed, D. and Svensson, S. : Structure of extracellular glucans synthesized by *Streptococcus mutans* of serotypes *a-e* *in vitro*. *Caries Res.* **16** : 81-89, 1982.
- 27) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951.
- 28) Takehara, T. and Inoue, M. : Inhibitory effects of endo- α -1, 3-glucanase on glucan film formation and glucan synthesis by the glucosyltransferase of the oral bacterium *Streptococcus mutans*. *Archs. oral Biol.* **26** : 217-222, 1981.
- 29) Trevelyan, W. E. and Harrison, J. S. : Studies on yeast metabolism. *Biochem. J.* **63** : 23-33, 1956.
- 30) Halhoul, M. N. and Kleinberg, I. : Differential determination of glucose and fructose, and glucose and fructose-yielding substances with anthrone. *Anal. Biochem.* **50** : 337-343, 1972.
- 31) Koga, T. and Inoue, M. : Effects of dextranases on cell adherence, glucan-film formation and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Archs. Oral Biol.* **24** : 191-198, 1979.
- 32) Park, J. T. and Johnson, M. J. : A submicro determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **181** : 149-151, 1949.
- 33) Hakomori, S. : A rapid permethylation of glucolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.* **55** : 205-208, 1964.
- 34) Lindberg, B. : Methylation analysis of polysaccharides. In : *Methods in Enzymol.* **28** : 178-195, 1972.
- 35) Haworth, W. N. : A new method of preparing alkylated sugars. *J. Chem. Soc.* **107** : 8-16, 1915.
- 36) Darvill, A. G., Roberts, D. P. and Hall, M. A. : Improved gas-liquid chromatographic separation of methylated acetylated alditols. *J. Chromatogr.* **115** : 319-324, 1975.
- 37) Hisamatsu, M., Abe, J., Amemura, A. and Harada, T. : Structural elucidation on succynoglycan and related polysaccharides from *Agrobacterium* and *Rhizobium* by fragmentation with two special β -D-glucanases and methylation analysis. *Agric. Biol. Chem.* **44** : 1049-1055, 1980.
- 38) Luft, J. : Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9** : 409-414, 1961.
- 39) Ainsworth, S. K., Ito, S. and Karnovsky, M. J. : Alkaline bismuth reagent for high resolution ultrastructural demonstration of periodate-reactive sites. *J. Histochem. Cytochem.* **20** : 995-1005, 1972.
- 40) Baird, J., Longyear, V. and Ellwood, R. : Water insoluble and soluble glucans produced by extracellular glucosyltransferases from *Streptococcus mutans*. *Microbios* **8** : 143-150, 1973.
- 41) Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S. and Misaki, A. : Structural differences in fructans elaborated by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. *J. Biochem.* **78** : 879-887, 1975.
- 42) Inoue, M., Shibata, H. and Morioka, T. : Serotype specificity for some biochemical characteristics of *Streptococcus mutans*. *Microbios* **33** : 7-14, 1982.
- 43) Bacon, J. S. D., Jones, B., Farmer, V. C. and Webley, D. M. : The occurrence of α (1, 3) glucan in *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces*, and *Polyporus* species and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. *Biochem. Biophys. Acta* **158** : 313-315, 1968.
- 44) Nalbandian, J., Freedman, M. 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.
- 45) Hamada, S., Tai, S. and Slade, H. D. : Serotype-dependent inhibition of glucan synthesis and cell adherence of *Streptococcus mutans* by antibody against glucosyltransferase of serotype *e* *S. mutans*. *Microbiol. Immunol.*

- 23 : 61-70, 1979.
- 46) Fukui, K., Fukui, Y. and Moriyama, T. :
Some immunochemical properties of dextran-
sucrase and invertase from *Streptococcus mu-*
tans. Infect. Immun. 10 : 985-990, 1974.
- 47) Shibata, H., Nara, Y., Morioka, T. and Ino-
ue, M. : Cariogenicity and some properties
of laboratory *Streptococcus mutans* strains.
J. Dent. Health. 32 : 17-23, 1982.