mutans streptococci のビルレンス因子の 発現に及ぼす継代培養の影響

国立予防衛生研究所歯科衛生部 (指導: 古賀敏比古部長)

浅 川 秀 治

昭和63年9月22日受付

Effect of Subculturing on Expression of Various Virulence Factors by Mutans Streptococci

Hideharu Asakawa

Department of Dental Research (Director: Dr. Toshihiko Koga)
The National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan

The fresh isolates of mutans streptococci (two strains of *Streptococcus mutans* serotype *c* and a strain of *Streptococcus sobrinus* serotype *g*) from the human oral cavity were subcultured one hundred times in brain heart infusion broth. Considerable changes were found in the virulence-related factors of mutans streptococci during repeated subculture. The results were summarized as follows.

1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and radioimmunoassay showed that the amount of a cell-surface protein antigen with a molecular weight of 190,000 (PAC) of *S. mutans* serotype *c*, which is considered to be important in the sucrose-independent cellular adherence, exhibited considerable changes after repeated subculture. Moreover, there was a correlation between the cell-surface hydrophobicity and the amount of PAC on the cell surface. On the other hand, the amount of a cell-surface protein antigen with a molecular weight of 210,000 (PAG) of *S. sobrinus* serotype *g* was not influenced during repeated subculture, and the cell-surface hydrophobicity was relatively constant. In addition, changes in the expression of several cell-surface proteins and extracellular proteins other than the protein antigens were noticed after repeated subculture in *S. mutans* and *S. sobrinus*.

2. Changes in the glucan-synthesizing ability, which is known to be important in the sucrose-dependent cellular adherence, was also found after subculture in *S. mutans* and *S. sobrinus*. There was a correlation between the cell-associated 1N NaOH-soluble glucan-synthesizing ability and the *in vitro* sucrose-dependent cellular adherence ability.

3. Almost no change was observed in the abilities for acid production and cell growth.

4. The cariogenicity of *S. mutans* in hamsters was reduced after repeated subculture. It was suggested that the reduced cariogenicity might be ascribed to the changes of the PAC expression and the cell-associated 1N NaOH-soluble glucan-synthesizing ability.

Key words: *Mutans streptococci* / *Subculture* / *Cell-surface protein antigen* / *Hydrophobicity* / *Glucan* / *Cariogenicity*

緒 言

Streptococcus mutans はヒトや動物におけるう蝕の主要な原因菌である¹⁻³⁾。 *S. mutans* の菌体表面は、他のグラム陽性菌と同様に、細胞壁でとり囲まれている。この細胞壁には、多糖抗原が局在し、その免疫学特異性に基き、*a* から *h* までの8つの血清型に分類されている⁴⁻⁶⁾。 *c/e/f* 型菌の特異多糖はグルコースとラムノース、*d/g* 型菌のそれはガラクトースとグルコースより構成されており、それぞれ極めて良く似た生物学的性状及び DNA の塩基組成を有している。

近年、Coykendall (1977)⁷⁾ は DNA 相同性に基き *S. mutans* を *S. cricetus* (*a* 型)、*S. rattus* (*b* 型)、*S. mutans* (*c/e/f* 型)、*S. ferus* (*c* 型の一部)、*S. sobrinus* (*d/g* 型) に再分類することを提唱し、承認されている。さらに、*S. macacae* (*c* 型の一部)⁸⁾、*S. downei* (*h* 型)⁹⁾ が追加されている。これらレンサ球菌は総称して、*mutans streptococci* もしくは *mutans* グループのレンサ球菌と呼ばれている。本研究でも今後、この新分類法に基くものとする。

ヒトでは、*S. mutans c* 型菌の分布が世界的に高く、全分離株の約8割を占める¹⁰⁻¹²⁾。次いで *S. mutans e* 型菌、*S. sobrinus d, g* 型菌が多く、*S. mutans f* 型菌はまれである。また、*S. cricetus*、*S. rattus* は主としてゲッ歯類から、*S. downei* はサルから分離される。

う蝕発生の第一歩は、*mutans streptococci* が歯面に付着し、そこに定着することから始まる。*mutans streptococci* の歯面への付着メカニズムは、スクロース非依存性付着とスクロース依存性付着に大別される。これらの付着過程に関与するいくつかの付着因子が知られている。スクロース非依存性の付着因子として最近注目されているのが、菌体表面に存在する高分子タンパク質抗原^{13, 14)}である。*S. mutans* には分子量約190,000のタンパク質抗原(以下、*c* 型菌の同抗原を PAc と呼ぶ)、また *S. sobrinus* には同様な分子量約210,000のタンパク質抗原(以下、*g* 型菌の同抗原を PAg と呼ぶ)¹⁵⁾があり、両者は共通の抗原部位を有する。これらのタンパク質抗原は *mutans streptococci* の菌体とペリクルの疎水結合に関与していることが示唆されている^{13, 14)}。スクロース依存性の付着因子としては、グルコシルトランスフェラーゼ (GTase) がスクロースより合

成するグルカンがよく知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。*mutans streptococci* は、非水溶性グルカンの合成を介して歯面に強固に結合する^{2, 19)}。この付着はスクロース非依存性の付着に比べ、かなり強いものとされている。

一方、一般に病原細菌は、試験管内で継代培養を繰り返すうちに、その病原性が減弱もしくは欠落することが知られている²⁰⁾。また、これを回復するため動物に戻すことも、よく行われている²⁰⁾。そこで、*mutans streptococci* が継代培養により、その病原性が低下するか否かは、非常に興味深い問題である。本研究において、著者はヒトの *mutans streptococci* 新鮮分離株を長期継代培養し、タンパク質抗原の発現能、グルカン合成能、脱灰に関与する酸産生能、さらにはハムスターのう蝕誘発能などについて、長期継代培養の影響を調べた。

材 料 と 方 法

I. 菌株の分離と継代培養

予研歯科衛生部職員10名の歯面より滅菌綿棒を用いてデンタル・プラークを採取し、10倍希釈のブレイン・ハート・インフュージョン・ブロー (BHI ブロー; Difco Laboratories, Detroit, Mich., U.S.A.) に入れ、超音波処理を行った、滅菌生理食塩水で希釈後、ミティス・サリバリウス寒天 (MS 寒天; Difco) に0.25単位/ml のバシトラシン (P-L Biochemicals Inc., Milwaukee, Wis., U.S.A.)、15%のスクロースを加えた *mutans streptococci* の選択培地²¹⁾に塗布し、37°C、48時間培養した。生じた *mutans streptococci* 様コロニーを拾って、1 ml の BHI ブロー中に浮遊させ、超音波処理後、1白金耳を MS 寒天に塗抹した。この行程を再度繰り返し単一コロニーであることを確認した後、これを初代株として BHI ブローに植え、同時に凍結乾燥保存も行った。

初代菌液0.1 ml を5 ml の BHI ブローに接種し、37°C で2日間培養したものを2代目とした。この継代培養を100代にわたって行った。同時に、10代目毎にコロニー形態のチェックと凍結乾燥保存を行った。なお、100代目を MS 寒天に接種し、生じたコロニーをランダムに200個選び、コロニー形態をいくつかに分類し、その出現頻度を調べた。

II. 糖発酵能

フェノール・レッド・ブローズ・ベース (Difco) に別に滅菌した各種糖を最終濃度が1%となるように加えた。この培地に菌を接種し、37°C, 48時間培養した後、培地の黄変をもって糖発酵を判定した。糖としては D-ソルビトール, D-マンニトール, ラフィノース, イヌリン, メリビオースを用いた。これらの糖の発酵能^{5, 11)}と上述の MS 寒天上のコロニー形態^{22, 23)}から *mutans streptococci* の菌種を同定した。

Ⅲ. 血清型の同定

各菌株の抗原は, Rantz & Randall (1955)²⁴⁾の変法である Hamada ら (1976)²⁵⁾の記載に従って調製した。すなわち、凍結乾燥菌体 20mg を 1ml の生理食塩水に懸濁し、120°C で20分間オートクレーブ後、その遠心上清を RR 抗原として用いた。

mutans streptococci の各血清型の全菌体に対する抗血清は Hamada ら (1978)²⁶⁾の方法に従いウサギに免疫することにより得た。各血清型の同定は1.5%寒天 (Agar Noble; Difco) を用いたゲル内沈降反応によって行った²⁷⁾。

Ⅳ. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

菌体外タンパク質標品は各菌株を BHI 透析外液で 37°C, 16時間培養後、その培養上清を 60% 飽和硫酸で塩析することによって得た。同標品を 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 1% β -メルカプトエタノール, 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) からなる溶液中で 100°C, 5分間加熱処理した。一方、菌体を 8M 尿素からなる溶液中で 4°C, 1時間処理後、1% SDS, 1% β -メルカプトエタノール, 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 中で 100°C, 5分間加熱処理し、遠心して得た上清を菌体抽出標品とした。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は分離用ゲルとして 7.5% ポリアクリルアミド、濃縮用ゲルとしては 3% ポリアクリルアミドを用い Laemmli (1970)²⁸⁾の方法に従って行った。上記のゲルを 20mA で 1時間予備泳動の後、試料を添加し、30mA で泳動した。なお、分子量測定のマーカーとしては、市販のキット (低分子量用電気泳動カリブレーションキット及び高分子量用電気泳動カリブレーションキット; Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J., U.S.A.) を用いた。泳動後、Goldman ら (1978)²⁹⁾の記載に従い、クーマシー・ブリリアント・ブルー R250 (E. Merck AG., Darmstadt, Federal Republic of Germany) によってゲル内のタンパク質バンドを染色した。

Ⅴ. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 終了後のゲルをニトロセルロース膜に重ねて前後からろ紙、スポンジ、プラスチック板でサンドイッチ状に圧接し、60mA で終夜泳動してゲル内のタンパク質バンドをニトロセルロース膜に転写した³⁰⁾。1% ウシ血清アルブミンを加えた 0.5% Tween 20 を含むリン酸塩緩衝食塩水 (PBS Tween) にこのニトロセルロース膜を入れ、1時間振とうしてブロッキングした後、PBS Tween で 5分間洗った。次いで、ウサギ抗 PAc 血清の 1/750 希釈液と 37°C, 1時間反応させた後、脱イオン水で 15分間、PBS Tween で 1時間洗った。さらに、パーオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., U.S.A.) と 37°C, 1時間反応させた後、脱イオン水で洗い、PBS Tween で 20分間の洗浄を 3 回行った。12mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で 1分間洗浄後、基質である 1, 4ジクロロナフトールを添加し振とうした。染色後、25% メタノール, 7.5% 酢酸からなる脱色液で反応を停止し、脱イオン水で洗浄後、暗室で乾燥した。

なお、抗 PAc 血清の調製は次のように行った³¹⁾。*S. mutans* の濃縮培養上清を SDS-PAGE 後、PAc に相当する泳動バンドを切り取り、タンパク質 0.5~1.0 mg に相当する量を集めた。これに 2ml の PBS を加えて細かく潰した。さらに、2ml のフロイント完全アジュバント (Difco) を加えて氷冷しながらエマルジョンを作製し、ウサギに皮下注射した。4週間後に同様に準備した PAc の泳動バンドをフロイント不完全アジュバント (Difco) でエマルジョンとしウサギに追加免疫した。次いで 3週間後に採血して抗血清を得た。

Ⅵ. 多糖合成

各菌株を 10% スクロースを加えた BHI ブローズ中で 37°C, 18時間培養後、遠心して培養上清と菌体とに分画した。培養上清には冷エタノールを最終濃度で 75% になるように加え、-20°C で 2時間静置後、遠心して沈渣を得た。再度同じ操作を行い、得られた沈渣を 1N NaOH に懸濁し、これを水溶性画分 (菌体外多糖) とした³²⁾。菌体は脱イオン水で 2度洗った後、1N NaOH に懸濁して室温で 1時間静置した。遠心後の上清を菌体結合型の 1N NaOH 可溶性画分とし、残った菌体はさらに 1N NaOH で洗い 1N NaOH に懸濁したものを菌体結合型の 1N NaOH 不溶性画分とした³²⁾。なお、各画分の多糖の定量はグルコースとフルクトースを標準としてアンスロン硫酸法³³⁾にて行った。

Ⅶ. スクロース依存性付着

BHI ブロースで終夜培養した菌液 0.1ml を 3 ml の 1%スクロースを加えた BHI ブロースに接種し、37°C で20時間、試験管を水平面に対して約30°傾けて培養後、以下のようにして付着率を調べた。

A. 強固な付着

Koga ら (1986)³⁴⁾の方法に従い、培養後の試験管をボルテックス・ミキサーで2秒間攪はんして第2の試験管に移した (b)。第1の試験管に3 ml の脱イオン水を入れ、手で1回転し、第3の試験管へ移した (c)。再び、第1の試験管に3 ml の脱イオン水を入れた (a)。a, b, c の試験管をそれぞれ超音波処理した後、550 nmでの吸光度を測定し、付着率を算出した。

$$\text{付着率} = \frac{a}{a + b + c} \times 100 (\%)$$

B. 全付着率

Hamada ら (1981)³⁵⁾の方法に従い、第1の試験管をボルテックス・ミキサーを使わずに、手で静かに回転し、第2の試験管へ移した。他は上記と同じく行った。

VII. ラジオイムノアッセイ

培養菌体を550nmでの吸光度が0.6 (細菌数で約 2×10^9 個) となるように調製した菌液を PBS で2倍段階希釈を行った。各濃度の菌液100 μ l と1%ウシ血清アルブミンを含む PBS で1/50希釈したウサギ抗 PAc 血清50 μ l を室温で1時間反応させた。遠心後、PBS で2度洗浄し、1%ウシ血清アルブミンを含む PBS で1/50希釈した¹²⁵I 標識のヤギ抗ウサギ IgG (ICN Radiochemicals, Irvine, Calif., U.S.A.) 50 μ l と室温で1時間反応させた。遠心後、PBS で2度洗い、ガンマカウンターで *S. mutans* 血清型 c のタンパク質抗原 (PAc) 量を測定した。

IX. 菌体疎水性

Rosenberg ら (1980)³⁶⁾の方法に準じて行った。BHI ブロースで培養した菌体を550nmでの吸光度が0.6 となるように PUM 緩衝液 (pH7.1: K₂HPO₄ · 3 H₂O 22.2g, KH₂PO₄ 7.26g, 尿素 1.8g, MgSO₄ · 7 H₂O 0.2g/1 l) に懸濁した。この菌浮遊液 3 ml に n-ヘキサデカン (東京化成工業, 東京) 300 μ l を加えボルテックス・ミキサーで1分間混和し、室温で15分間静置した。アスピレーターで上層のヘキサデカン層を除去し、水層の550nmにおける吸光度を測定し、ヘキサデカンを加える前の吸光度に対する割合 (パーセント) で表した。

$$\text{疎水性} = \frac{\text{原液 OD}_{550} - \text{試験液 OD}_{550}}{\text{原液 OD}_{550}} \times 100 (\%)$$

X. 酸産生

各菌株を1%グルコースを加えた BHI ブロース中で37°C, 48時間、好気及び嫌氣的に培養した。550nmでの吸光度及び pH を測定した後、遠心して培養上清中の乳酸を市販のキット (DIAGNOSTICS L〔+〕 LACTATE; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) を用いて定量した。

XI. う蝕の動物実験

Std: Syrian ハムスター (オス, 57匹) を静岡実験動物農協 (静岡) より生後23日齢の時点で購入し、2日間ペニシリン G (4,000単位/ml 飲料水; Sigma) とテトラサイクリン (4.0mg/g 飼料; Sigma) を与え、口腔常在菌叢を抑制した。ハムスターは4群 (非感染群と感染3群) に分け、1群当たり14~15匹を1ケージ当たり4~5匹ずつ飼育した。

接種菌株は500ml の BHI ブロースで一晩培養し、遠心して得た菌体を5 ml の BHI ブロースに懸濁し接種菌液とした。菌の接種は生後26, 27日齢の2日間にマイクロピペットを用いて左右の頬嚢にそれぞれ0.1ml ずつ (計0.2ml) 行った。同時にこの日より、スクロース56%を含むう蝕誘発性飼料 #2000³⁷⁾ (日本クレア, 東京) で飼育した。また、菌の定着を確実にするため、生後39, 40日齢の2日間に前回と同じ方法で再度、菌の接種を行った。生後74日齢 (菌接種後48日目) でハムスターをエチル・エーテルを用いて屠殺し、上下顎骨を摘出した。ついで、エリスロシンで歯牙を染色後、Regolati & Hotz (1972)³⁸⁾の記載に従ってプラーク指数を求めた。さらに、顎骨を121°C, 2~3分間、オートクレーブした後、軟組織を除去して乾燥させ、Keyes (1944)³⁹⁾の方法によりう蝕スコアを算出した。各群間の有意差を Student の *t*-検定により調べた。

なお、菌の接種前に *mutans streptococci* の感染がないこと、また、接種後の菌の定着の確認と他群からの感染の有無を調べるために、購入時から屠殺直前まで計6回、口腔からスワブを採取し、MS 寒天に植えてコロニーの数と形態をチェックした。

結 果

I. 継代培養によるコロニー形態変化

予研 歯科衛生部職員10名のうち5名から *mutans streptococci* が分離された。分離株の中から7株を純化した。糖発酵能と MS 寒天上のコロニー形態から、5株は *S. mutans*, 2株は *S. sobrinus* であることが明らかになった。これらの菌株の中から5菌株 (*S. mutans* 3株, *S. sobrinus* 2株) を選んで100代の継代

培養を始めた。なお、ゲル内沈降反応で血清型を調べると3株の *S. mutans* はいずれも *c* 型であり、2株の *S. sobrinus* はそれぞれ *d* 型と *g* 型であった。

100代の継代培養を終えた5菌株をMS寒天に植え、生じた各200個のコロニーを観察すると *S. mutans* の1菌株を除いて他は初代株の形態とは異なるコロニーが出現した。そのうちの *S. mutans* 2株を Ac 株, Yc 株, さらに, *S. sobrinus g* 型菌を Ag 株とそれぞれ命名し、以後の解析に用いることにした。

Ac 株はMS寒天上で *S. mutans* に特有なラフ型コロニーを形成するが、100代目は同じコロニー形態の194個とややスムーズ型の小型コロニー6個が出現し、それぞれ代表的な菌株を Ac100R 株と Ac100S 株と名付けた(図1)。Yc 株はムコイド型のやや大きなコロニーを形成するが、100代目では同じ形態の196個とラフ型を呈する4個が出現し、それぞれの代表株を Yc100M 株と Yc100R 株とした(図1)。Ag 株はスムーズな円形

コロニーの周囲に透明な水滴様物質がある *S. sobrinus* に特徴的な形態を示していたが、100代目では同じ形態の49個、周囲の水滴はあるものの内部がややラフ型に変わった102個と、さらに周囲の水滴が消失しラフ型の部分だけが残った49個のコロニーが出現し、それぞれの代表菌株を Ag100P1 株, Ag100P2 株, Ag100R 株と命名した(図2)。

表1に Ac 株, Yc 株, Ag 株とそれぞれの100代継代株の生物学的諸性状を示した。Ac 株と100代目の Ac100R 株, Ac100S 株, 同じく Yc 株と100代目の Yc100M 株, Yc100R 株はソルビトール, マンニトール, ラフィノース, イヌリン, メリビオースのすべての糖を発酵し, *S. mutans* と考えられた。さらに, ゲル内沈降反応でそれらの RR 抗原は抗 *c* 型特異血清と1本の沈降線を形成した(図3)。これらの沈降線は *c* 型菌の標準株である MT 8148株の RR 抗原が形成する沈降線と融合し, Ac 株, Yc 株およびそれらの継代株が血

図1 *S. mutans* 新鮮分離株とその100代継代株のMS寒天上でのコロニー形態。

図2 *S. sobrinus* 新鮮分離株とその100代継代株の MS 寒
天上でのコロニー形態.

表1 *mutans streptococci* 新鮮分離株とその100代継代株の生物学的及び免疫学的性状

菌株	糖 発 酵 能					血清型	分離頻度(%)
	ソルビ トール	マンニ トール	ラフィ ノース	イヌ リン	メリビ オース		
Ac	+	+	+	+	+	c	—
Ac100R	+	+	+	+	+	c	97
Ac100S	+	+	+	+	+	c	3
Yc	+	+	+	+	+	c	—
Yc100M	+	+	+	+	+	c	98
Yc100R	+	+	+	+	+	c	2
Ag	+	+	—	+	—	g	—
Ag100P1	+	+	—	+	—	g	25
Ag100P2	+	+	—	+	—	g	50
Ag100R	+	+	—	+	—	g	25

A. 1: Ac株 RR抗原
 3: Ac100R株 RR抗原
 5: Ac100S株 RR抗原
 2: 4, 6: MT8148株 (c)RR抗原
 中央のウェルには抗 c 型血清

B. 1: Yc株 RR抗原
 3: Yc100M株 RR抗原
 5: Yc100R株 RR抗原
 2: 4, 6: MT8148株 (c)RR抗原
 中央のウェルには抗 c 型血清

C. 1: Ag株 RR抗原
 2: Ag100P1株 RR抗原
 4: Ag100P2株 RR抗原
 6: Ag100R株 RR抗原
 3, 5: 6715株 (g)RR抗原
 中央のウェルには抗 g 型血清

図3 mutans streptococci 新鮮分離株と
 その100代継代株のゲル内沈降反応.

清型 *c* であることが確認された。Ag 株とその100代目の Ag100P1 株, Ag100P2 株, Ag100R 株はラフィノースとメリビオースを発酵できない *S. sobrinus* の特徴を示した (図1)。次いで, ゲル内沈降反応より, 各株の RR 抗原が抗 *g* 型特異血清に対して *S. sobrinus* 6715株 (*g* 型) の RR 抗原と融合する1本の沈降線を形成したため, Ag 株とその継代株が血清型 *g* であることが証明された (図3)。以上の結果から, コロニー形態の変化はあっても各100代継代株がそれぞれの初代株由来であることが確認された。

II. 培養上清と菌体抽出物の SDS 電気泳動パターン

前述のように *mutans streptococci* を継代培養することによって *S. mutans*, *S. sobrinus* 共に MS 寒天上でコロニー形態に変化が生じることがわかった。このようなコロニー形態の変化が起きることは, 継代培養によって菌の種々の因子, 特に菌体表層上の物質に何らかの変化が生じた可能性が考えられる。そこで, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用いて, これらの菌株の産生する菌体外および菌体結合タンパク質を解析した。

A. 菌体外タンパク質

各菌株の培養上清中のタンパク質の SDS-PAGE パ

ターンを図4に示す。*c* 型 *S. mutans* である Ac, Ac100R, Ac100S 株の培養上清中のタンパク質の SDS-PAGE パターンを比較したところ, 分子量190,000のタンパク質 (Pac) の量に違いがあることがわかった。Ac100R 株は Ac 株に比べ, 僅かであるが Pac 量の低下がみられ, また Ac100S 株においては Pac のバンドがほぼ消失していた。その他のものとしては, 分子量160,000~180,000にある複数バンド, また分子量94,000のタンパク質の量に変動が認められた。他のバンドに関しては, 3株に大きな変化はなかった。

同じ *c* 型 *S. mutans* である Yc, Yc100M, Yc100R 株の比較をすると, Ac 株と違った結果が得られた。Yc 株はムコイド型のコロニーを示す株であるが, 同じムコイド型の Yc100M 株では Pac 量の減少が観察され, Yc100R 株では逆に Pac 量の増加が認められた。その他のタンパク質に関しては, Ac 株と同様に分子量160,000~180,000にある複数のバンド, または分子量94,000のタンパク質の量に大きな変動が認められた。他のタンパク質の産生については, 菌株間ではほとんど差は認められなかった。

一方, *g* 型 *S. sobrinus* である Ag, Ag100P1, Ag100P2, Ag100R 株については, 分子量210,000のタ

図4 *mutans streptococci* 新鮮分離株とその100代継代株の培養上清中のタンパク質の SDS-PAGE パターン。

ンパク質 (PAg) の産生量の変化はあまり認められず、前述の *S. mutans* c 型菌に比べ産生量が安定しているように思われた。また、Ag 株においても分子量160,000～180,000の複数バンドに変化が認められた。

B. 菌体結合タンパク質

新鮮分離株と継代株の全菌体を 8 M 尿素, 1 % SDS および 1 % β -メルカプトエタノールで処理して、菌体結合タンパク質を抽出後、SDS-PAGE パターンを比較した (図5)。*S. mutans* Ac 株と比較して、Ac 株の継代株である Ac100R 株と Ac100S 株の菌体結合 PAc 量は著しく低下していた。この結果は、培養上清において認められた PAc 量の変化と同じであった。

S. mutans Yc, Yc100M, Yc100R 株を比較すると、培養上清と同様に、PAc 量の低下が Yc100M 株に、逆に PAc 量の増加が Yc100R 株に認められた。これら *S. mutans* においては、培養上清に認められた分子量 160,000～180,000の複数バンドや分子量94,000のバンドに加えて、それ以外のいくつかのバンドについても量的な変化が認められた。

S. sobrinus Ag 株および Ag 株由来の3株においては PAg 量にあまり著しい変化は認められなかったが、Ag100P2 株においてはやや減少していた。また菌体結合型のタンパク質に関しては、いくつかのバンドに

おいて変化が見られた。

C. ウェスタンブロッティング法による分析

各菌株の培養上清中と菌体結合 PAc 量をウェスタンブロッティング法で分析したものを、図6と図7にそれぞれ示した。本分析においても、タンパク質染色パターンにおいてみられたことと同様の傾向が観察された。クーマッシー・ブリリアント・ブルーによるタンパク質染色では、Ac100S 株と Yc100M 株の PAc のバンドは不明瞭であったが、培養上清、菌体結合のものもこの方法により染色された。これらの結果から、Ac100S 株と Yc100M 株においては PAc の発現能が継代培養により完全に欠失したのではなく、量的に減少したものであることが明らかになった。

Ⅲ. 多糖合成とスクロース依存性付着

mutans streptococci のう蝕誘発の重要な病原因子である多糖合成能とスクロース依存性付着能が、*mutans streptococci* を長期継代培養することによって、どのような影響を受けるのか調べてみた。

A. 多糖合成

表2に各菌株の多糖合成能を示した。*S. mutans* Ac, Ac100R, Ac100S 株を比較すると、Ac 株に対して100代継代株の Ac100R 株と Ac100S 株では菌体外グルカンと菌体結合型 1 N NaOH 可溶性グルカンの産生量が

図5 *mutans streptococci* 新鮮分離株とその100代継代株の菌体結合タンパク質の SDS-PAGE パターン。

図6 *mutans streptococci* 新鮮分離株とその100代継代株の培養上清中のタンパク質のウエスタンブロッティングパターン。

図7 *mutans streptococci* 新鮮分離株とその100代継代株の菌体結合タンパク質のウエスタンブロッティングパターン。

表2 スクロース培地で培養した *mutans streptococci* 新鮮分離株とその100代継代株の多糖合成

菌株	多 糖 合 成 量 (mg/ml)					
	菌体外, 水溶性		菌体結合, 1 N NaOH 可溶性		菌体結合, 1 N NaOH 不溶性	
	グルカン	フルクタン	グルカン	フルクタン	グルカン	フルクタン
Ac	2.05	0.07	0.47	<0.01	0.05	<0.01
Ac100R	0.73	<0.01	0.15	<0.01	0.05	<0.01
Ac100S	1.82	0.17	0.08	<0.01	0.05	<0.01
Yc	2.10	0.37	0.38	0.03	0.09	<0.01
Yc100M	1.78	0.83	0.61	0.27	0.06	<0.01
Yc100R	0.25	<0.01	0.42	<0.01	0.04	<0.01
Ag	0.13	<0.01	0.18	<0.01	0.02	<0.01
Ag100P1	0.28	<0.01	0.45	<0.01	0.03	<0.01
Ag100P2	2.57	<0.01	0.47	<0.01	0.02	<0.01
Ag100R	0.25	<0.01	0.57	<0.01	0.02	<0.01

減少した。特に, Ac100S 株の菌体結合同型 1 N NaOH 可溶性グルカンの産生量が著しく減少した。

S. mutans Yc, Yc100M, Yc100R 株においては, 菌体結合同型 1 N NaOH 不溶性グルカンの産生量に若干の変動が見られた程度であったが, 菌体外の水溶性グルカンについては Yc100R 株で著しい減少が見られた。ムコイド型コロニーを形成する *S. mutans* Yc 株と Yc100M 株ではフルクタンの産生量が特異的に高く, 特に菌体外フルクタンの産生量が顕著であった。これに対して, ラフ型コロニーを形成する *S. mutans* Yc100R 株ではフルクタンはほとんど産生されなかった。これらの結果は, *S. mutans* のムコイド型のコロニー形成に菌体外フルクタンの産生が関与することを示唆している。

一方, *S. sobrinus* Ag 株では, 100代継代培養するうちにコロニー形態にかかわらず, 継代株 3 株共に菌体外および菌体結合同型 1 N NaOH 可溶性グルカンの産生量が増加した。なお, Ag100P2 株では菌体外グルカンの産生量が著しく増加していた。

B. スクロース依存性菌体付着

新鮮分離株と継代培養株の増殖菌体によるスクロース依存性付着能を調べた。表3に示したように, 菌体結合同型 1 N NaOH 可溶性グルカンの産生量が低下した Ac100R 株と Ac100S 株の付着能も Ac 株に比べてかなり低下していた。ムコイド型の *S. mutans* Yc 株と Yc100M 株では, 特に差は認められなかったが, ラフ型コロニーを形成する Yc100R 株ではやや付着率が減少していた(表3)。*S. sobrinus* Ag 株は *S. sobrinus* としては例外的に低い付着率を示したが, 100代継代株

表3 スクロース培地で培養した *mutans streptococci* 新鮮分離株とその100代継代株のガラス試験管壁への付着率

菌株	付 着 率 (%)	
	強固な付着	全 付 着
Ac	78.4	80.0
Ac100R	56.1	62.4
Ac100S	57.0	60.5
Yc	85.4	86.7
Yc100M	89.6	91.8
Yc100R	63.8	72.7
Ag	39.9	57.7
Ag100P1	97.5	98.1
Ag100P2	95.9	97.6
Ag100R	96.8	98.4

3 株はグルカン合成能の昂進と共に Ag 株に比べてはるかに高い付着率を示した(表3)。

次に, *S. mutans* Ac 株と Yc 株について, 初代から20代毎のスクロース依存性菌体付着能を調べた(図8)。Yc 株では, 初代から100代までほとんど付着能に変化は認められなかったが, Ac 株では60代から80代の間で著しい付着能の低下が認められた。

IV. 菌体結合 PAc 量と菌体疎水性

まず, 菌体結合 PAc 量を測定するためにラジオイムノアッセイの実験条件を確立する予備実験を行った。すなわち, さまざまな菌数 ($6.25 \times 10^7 \sim 2 \times 10^9$) の Ac, Ac100R および Ac100S 株菌体をウサギ抗 PAc 血清

図8 継代培養によるスクロース依存性付着能の変化。

S. mutans 新鮮分離株と20代毎の継代培養株を1%スクロース加 BHI ブロースで培養後、ガラス試験管壁への全付着率を測定した。

○: Ac株, ●: Yc株

50 μ lと反応させた後、 125 I 標識抗ウサギ IgG 血清50 μ lと反応させた。その結果、いずれの菌株においても、抗 PAc 血清の結合量は用いた菌量に比例していた (図9)。

図9 各菌株の菌体結合 PAc 量。

S. mutans 新鮮分離株とその100代継代培養株の各菌量に対する菌体結合 PAc 量をラジオイムノアッセイで調べた。

○: Ac株, □: Ac100R株, △: Ac100S株

そこで、以後のラジオイムノアッセイでは 5×10^8 個の菌を用いた。

次いで、*S. mutans* Ac 株と Yc 株の菌体結合 PAc 量が、初代から20代毎に100代までどう変化するかを調べた。Yc 株では40代から60代の間で若干の増加を認めた程度であったが、Ac 株では前述のスクロース依存性付着能の結果と同様に、60代から80代の間で著しい菌体結合 PAc 量の減少が認められた (図10)。

図10 継代培養による菌体結合 PAc 量の変化。

S. mutans 新鮮分離株に20代毎の継代培養株の PAc 量をラジオイムノアッセイで測定した。用いた菌数は 5×10^8 。

○: Ac株, ●: Yc株

さらに、菌体の疎水性が継代培養によってどう変化するか、また菌体疎水性が菌体結合 PAc 量との間に相関はあるか検討した。*S. mutans* Ac 株と Yc 株の初代から20代毎に100代までの菌体の疎水性を PAc 量の定量と同時に調べた。Yc 株では多少の変動はあるものの、継代培養による菌体疎水性の変化はほとんど認められなかった (図11)。一方、Ac 株では PAc 量の変化と同様に、菌体疎水性も60代から80代の間で著しい低下が認められた (図11)。

次に、*S. mutans* Ac 株、Yc 株、*S. sobrinus* Ag 株とそれぞれの100代継代株の菌体疎水性と菌体結合

図11 継代培養による菌体疎水性の変化。
S. mutans 新鮮分離株と20代毎の継代培養株の菌体疎水性をヘキサデカン法で測定した。
 ○：Ac株，●：Yc株

PAc量を調べた。Ac100S株では菌体疎水性と菌体結合PAc量がAc株と比べて激減していた(表4)。またAc100R株の菌体疎水性と菌体結合PAc量はAc株とAc100S株の中間に位置していた。Yc100R株はYc株とYc100M株に比べて菌体疎水性、菌体結合PAc量共にやや増加していた。*S. sobrinus* Ag株とその100代継代株については、疎水性についてのみ調べた

表4 *mutans streptococci* 新鮮分離株とその100代継代株の菌体疎水性と菌体結合PAc量

菌株	菌体疎水性(%)	菌体結合PAc量*(cpm)
Ac	26.9	6771
Ac100R	14.1	4775
Ac100S	1.3	2505
Yc	16.9	8293
Yc100M	14.8	8273
Yc100R	39.2	9555
Ag	30.8	ND**
Ag100P1	35.8	ND
Ag100P2	36.9	ND
Ag100R	40.1	ND

* 用いた菌数は 5×10^8 。

** 測定しなかった。

が、100代継代株はいずれも初代株より高い値を示した(表4)。

加えて、同じコロニー形態を示す菌株間での菌体疎水性と菌体結合PAc量のバラツキについて調べた。Ac株の一夜培養液とその100代継代培養液をMS寒天培地に塗布し、培養後、生じたコロニーをAc株から12個、100代継代株ではAc100R株タイプとAc100Sタイプをそれぞれ12個ずつ選び、それぞれの菌体疎水性と菌体結合PAc量を測定した。これらの数値をグラフ上にプロットしたのが図12である。Ac株、Ac100R株タイプ、Ac100S株タイプの菌体疎水性と菌体結合PAc量はそれぞれのコロニータイプ内で類似しており、両者の値には相関係数 $r=0.824$ ($p<0.0014$) という強い相関性があった。

図12 菌体疎水性とPAc量の関係。

S. mutans 新鮮分離株の一夜培養液とその100代継代培養液をMS寒天平板上にまき、Ac株から12個のコロニー、100代継代培養株の中でAc100R株タイプとAc100S株タイプのコロニーをそれぞれ12個ずつランダムに選び、それらの菌体疎水性と菌体結合PAc量を調べた。

○：Ac株，□：Ac100R株タイプ，
 △：Ac100S株タイプ

V. 酸産生

各菌株の酸産生能と増殖度について調べた。その結果、これらの性状については各新鮮分離株とその100代継代培養株の間で差は認められなかった(表5)。

表5 mutans streptococci 新鮮分離株とその100代継代株の増殖度と酸産生能

菌株	増殖度 [吸光度(550nm)]		最終 pH		乳酸産生量(μmol/ml)	
	好気	嫌気	好気	嫌気	好気	嫌気
Ac	1.12	1.12	4.01	4.02	54.12	55.44
Ac100R	1.17	1.13	4.01	4.02	56.49	53.99
Ac100S	1.09	1.12	4.09	4.12	49.12	46.88
Yc	1.18	1.14	3.99	4.01	57.28	55.57
Yc100M	1.20	1.15	4.03	4.03	52.54	52.94
Yc100R	0.98	0.98	4.12	4.11	49.65	50.70
Ag	1.12	1.11	3.99	3.98	56.87	58.99
Ag100P1	0.99	0.96	4.11	4.12	47.41	50.83
Ag100P2	1.09	1.03	4.09	4.08	49.51	54.39
Ag100R	1.04	1.00	4.10	4.09	52.80	56.36

Ⅵ. ハムスターう蝕誘発能

今まで述べてきたように, *S. mutans* 新鮮分離株を継代培養するうちに, 多糖合成能, スクロース依存性付着能, PAc 産生量, 菌体疎水性等の病原因子に変化が認められた. これら病原因子の変化が *in vivo* でのう蝕誘発能にどのように反映するかを調べるために, Ac, Ac100R, Ac100S 株の3株とハムスターを使って, う蝕誘発実験を行った.

ハムスター口腔内から回収された *S. mutans* 数は3菌株の間では差はなかった(表6). さらに, プラーク指数にも3菌株間で差はなかった. う蝕スコアは, Ac株感染群, Ac100R株感染群, Ac100S株感染群, 非感染群の順に低下し, それぞれの群間にはすべて有意差が認められた($P < 0.01$, 表6). なお, 各菌株を動物から回収する際, MS寒天上でコロニー形態についても調べたが, 実験終了まで特に変化は認められなかった.

表6 *S. mutans* 新鮮分離株(血清型c)とその100代継代株によるハムスターう蝕誘発能

菌株	匹数	<i>S. mutans</i> の回収; log (菌数) (平均 ± SD)	う蝕スコア (平均 ± SD)
非感染	15	0	1.78 ± 0.95
Ac	14	8.46 ± 0.21	*—23.93 ± 12.01—*
Ac100R	14	8.74 ± 0.28	*—12.36 ± 4.25—*
Ac100S	14	8.12 ± 0.40	*—5.80 ± 2.47—*

* 危険率1%で有意差あり.

考 察

mutans streptococci 新鮮分離株を試験管内で継代培養を繰り返すうちに, その性状に様々な変化が現れるといういくつかの報告がある^{13, 14, 40-43, 45, 49}. 本実験においても, 数株の mutans streptococci 新鮮分離株を BHI ブロースで100代継代培養することによって, 明らかに各々の初代株とは MS 寒天上の形態を異にするコロニーが出現した(図1, 2). これらの100代継代培養株では, タンパク質抗原の発現やグルカン合成能等

う蝕原性とかかわりがあると考えられるいくつかの性状が変化していた. 加えて, ハムスターう蝕誘発能にも違いが認められた.

継代培養に関しては, まず, Ørstavikら(1982)⁴⁰⁾が, *S. mutans* 新鮮分離株をトリプティケース・ソーイ・ブロースで60代にわたって継代培養し, 早くも2代目にしてスクロース非依存性の付着能が大幅に低下したと報告している. 一方, Olssonら(1982)⁴¹⁾は, *S. mutans* Ingbritt 株(血清型c)を血液寒天上で継代培養すると Ingbritt 株の新鮮凍結乾燥保存株に比べて菌体の疎

水性が有意に減少することを見いだした。Westergren ら (1983)⁴²⁾はこの2つの報告から、菌体疎水性と菌の付着の間には何らかの関係が存在すると考え、*S. mutans* 血清型 *c* の新鮮分離株を血液寒天上で36代継代培養した後、菌体疎水性とハイドロキシアパタイトへの菌の付着能を調べた。その結果、36代継代培養株では両者とも減少した。さらに、Gibbons ら (1983)⁴³⁾も高い菌体疎水性を示す口腔細菌は、より効率良く唾液被覆ハイドロキシアパタイトへ付着したと報告している。以上の報告は、菌体の疎水性が *S. mutans* のスクロース非依存性付着に重要であり、継代培養によりこの菌体疎水性が減少し、ひいてはスクロース非依存性の菌体付着能が低下することも示唆している。

本研究においても、血清型 *c* *S. mutans* Ac 株を継代培養すると、継代60代目あたりから菌体疎水性が急激に低下した (図8)。しかし、同じ *c* 型菌である Yc 株においては、菌体疎水性はほとんど継代によって変わらず、100代目に出現したコロニーの中には逆に菌体疎水性が増加したものが出現した (図8, 表4)。これらの結果は、*S. mutans* の継代培養による菌体疎水性の変化は、その低下という一方向だけではないことを示唆している。

McBride ら (1984)¹³⁾は菌体の疎水性と高分子タンパク質抗原の関係に注目し、菌体疎水性の低下した *S. mutans* 血清型 *c* の36代継代培養株の培養上清中と菌体結合タンパク質について初代株と SDS-PAGE で比較した。それによると、菌体結合のタンパク質には本研究によって分離された Ac100S 株と同様に、分子量190,000の高分子タンパク質抗原 (PAC) が完全に消失しているか、あるいは存在してもごく少量であった。また彼らによると、培養上清中の PAC に関しては36代継代培養株も初代株と同じ程度に存在していたという。しかし、本実験において継代培養により菌体疎水性の低下した *S. mutans* Ac100S 株の場合、PAC は培養上清中と菌体表層上のいずれにおいてもほとんど産生されておらず、彼らの結果とは明らかに異なっていた。

Moro ら (1983)⁴⁴⁾は、イムノペルオキシダーゼ法を用いて PAC の局在を電顕で観察したところ、PAC は *S. mutans* 菌体の細胞表層にほぼ均一に分布していることを明らかにした。さらに、McBride ら¹³⁾は菌体疎水性の低下した継代培養株では菌体疎水性に関与する PAC を細胞壁に結合しておく能力が低下したと考えた。一方、R.R.B. Russell ら (1986)⁴⁵⁾は、McBride らが用いた菌株と同じものをロケット免疫電気泳動とドッ

トイムノブロッティングで調べ、継代培養株ではリポテイコ酸 (LTA) と3つの細胞壁関連タンパク質抗原 (antigen A, B, C) が細胞壁から培養上清中に遊離していると報告し、継代培養株では PAC 以外にも変異が生じていることを明らかにした。このことは、菌体の疎水性には、PAC のみではなく、LTA を含めた様々な菌体表層物質が関与することを示唆している。なお、分子量190,000のタンパク質 (PAC) は、M. Russell ら (1980)⁴⁶⁾の分子量185,000のタンパク質抗原 (antigen I/II) および R.R.B. Russell (1979)⁴⁷⁾の分子量190,000のタンパク質抗原 (antigen B) と同じものである⁴⁸⁾。

一方、今回分離した *S. sobrinus* Ag 株の菌体疎水性は継代培養によってやや上昇した (表4)。Westergren ら (1983)⁴²⁾も、*S. mutans* と同時に *S. sobrinus* の新鮮分離株についても血液寒天上で36代継代培養し、菌体疎水性とスクロース非依存性の付着能の変化を調べている。その結果、本研究の結果と同様に *S. sobrinus* では両者共に継代培養による変化は少なく、中にはやや上昇を認めた菌株もあった。また、Rundegren ら (1987)⁴⁹⁾も *S. sobrinus* の継代培養後の菌体疎水性を調べたが、特に変化は認められなかったと述べている。従って、菌体疎水性や菌体表層タンパク質抗原については、*S. sobrinus* の場合、*S. mutans* と比べて継代培養による影響を受けにくく、その性状は安定しているように思われた。

以上述べたように、PAC, PAg 量、菌体疎水性に関しての報告は多いが、他の病原因子について継代培養の影響を調べた報告はあまり見られない。Gibbons ら (1980)⁵⁰⁾は、*S. mutans* 血清型 *c* の新鮮分離株を無菌ラットの口腔内へ接種後、経時的に菌を回収して分離菌株の抗原性、菌体内多糖産生能、MS 寒天上でのコロニー形態、スクロース依存性付着能、スクロース存在下での凝集能等について調べている。それによると、菌の接種後4週までは分離株の大部分が野性株と同じであったが、12週以降になると分離した菌株の約50%以上に何らかの性状変化が現れたと述べている。彼らは、これらの変異株の出現率は、接種した *S. mutans* に対する唾液および血清中の IgA 抗体価と相関しており、IgA が変異の出現を促進しているという可能性を示唆している。すなわち、*S. mutans* に対する IgA 抗体がこれと反応する *S. mutans* を排除し、結果的に変異株の割合を増加させていると考えている。

これに対して、今回示したように試験管内における継

代培養により, *S. mutans*, *S. sobrinus* は共に, スクロース非依存性の付着に關与する菌体疎水性だけではなく, スクロース依存性に關与する多糖合成能も継代培養によって大きく変化することがわかった (表 2). すなわち, 血清型 *c* の *S. mutans* (Ac 株と Yc 株) および血清型 *g* の *S. sobrinus* のいずれにおいても, グルカンとフルクタンの合成能が継代培養により変化しており, その変化は一方向性ではなかった. なお, 菌体結合 1 N NaOH 可溶性グルカン合成能とスクロース依存性の付着能は良く相関しており, このタイプのグルカンが *mutans streptococci* のスクロース依存性付着に重要であることが示唆された (表 2, 3)^{51, 52)}.

Svanberg ら (1984)⁵³⁾ は, *S. mutans* の初代株と 36 代継代株をヒト口腔に植えてその定着を調べたところ, 初代株が有意に多数, 定着したと報告している. 一方, 本研究において, ハムスター口腔内への Ac 株, Ac100R 株および Ac100S 株の定着性を観察したところ, 屠殺直前ではほとんど同じ程度であった (表 6). 今回の実験は, 各菌株を口腔内に接種し, 長期間スクロース含有飼料で飼育した後で, プラークの一部を綿棒を用いて採取したため, *S. mutans* の定着性を判断するには不適当であるものと思われる. しかし, 各菌株のハムスターう蝕誘発能を比較してみると, Ac 株 > Ac100R 株 > Ac100S 株の順であった. Ac100R 株と Ac100S 株においては, 新鮮分離株である Ac 株と比べて, 菌体疎水性や菌体結合 1 N NaOH 可溶性グルカン合成能が低下していた. このため, スクロース非依存性とスクロース依存性の菌体付着能が低下し, う蝕原性が減少した可能性が考えられる.

Ikedo ら (1980)⁵⁴⁾ と Hirasawa ら (1980)⁵⁵⁾ は, *S. sobrinus* 6715 株 (血清型 *g*) の変異株を無菌ラットに接種したところ, 逆変異を起こして野性株の性状に戻る菌株が出現することを報告した. 今回の動物実験では, 各菌株の接種後 48 日目に屠殺するまで, MS 寒天上でのコロニー形態については特に変異は認められなかった. これらの相違は無菌動物と普通飼育動物の違いによるのかもしれない. しかしながら, Ac 株と Ac100R 株, Yc 株と Yc100M 株, Ag 株と Ag100P1 株のように, MS 寒天上でのコロニー形態がほとんど同じに見えても, 異なる性状を有していた例もあるので, 変異を確認するには分離株の諸性状をさらに詳しく調べる必要がある.

結 論

mutans streptococci ヒト新鮮分離株 (*S. mutans* 2 株, *S. sobrinus* 1 株) を液体培地で 100 代にわたって継代培養した. 初代株とそれぞれの 100 代継代培養株のう蝕原性因子について検索し, 下記のような結果を得た.

1. *S. mutans* のスクロース非依存性の付着因子とみなされている分子量 190,000 の PAc 産生量が継代培養により変化することがわかった. PAc 量が減少する株が多いが, 増加する株もみられ, この PAc 量と菌体疎水性の間に相関が認められた. *S. sobrinus* においては, 分子量 210,000 の PAg 量の変化は比較的少なく, 菌体疎水性の変化も少なかった. また *S. mutans*, *S. sobrinus* 共に継代培養により高分子タンパク質抗原以外の細胞表層タンパク質の産生量にもかなりの変化が認められた.

2. スクロース依存性の付着因子であるグルカンの合成能に關しては, 継代培養により *S. mutans*, *S. sobrinus* 共に変化しやすいことがわかった. この変化は菌体結合型 1 N NaOH 可溶性グルカン, 菌体外水溶性グルカン共にみられた. さらに, 菌体結合型 1 N NaOH 可溶性グルカンの産生量と *in vitro* におけるスクロース依存性付着能は相関していた.

3. 酸産生能, 菌の増殖能に大きな変化は認められなかった.

4. ハムスターを用い, *S. mutans* のう蝕誘発の変化を観察したが, ここでも継代培養による変化が認められた. ここで調べた *S. mutans* Ac 株の場合, 継代培養によってう蝕原性が低下したが, これは PAc 産生能, グルカン合成能, スクロース依存性付着能などの複数のう蝕原性因子の変化で説明されると思われる.

稿を終えるに臨み, 本論文に対して懇切丁寧な御指導と御校閲を頂きました国立予防衛生研究所歯科衛生部古賀敏比古部長及び加藤裕久室長に心から感謝の意を表します. さらに, 終始温かい御指導と御助言を賜った大阪大学歯学部口腔細菌学教室浜田茂幸教授及び九州歯科大学口腔衛生学講座竹原直道教授に深く感謝致します. 加えて, さまざまな御協力を頂いた歯科衛生部諸先生方に厚く御礼申し上げます.

引用文献

- 1) Krasse, B. : The effect of the diet on the implantation of caries-inducing streptococci in hamsters. *Arch. Oral Biol.* **10** : 215—221, 1965.
- 2) Gibbons, R.J. and Banghart, S.B. : Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Arch. Oral Biol.* **12** : 11—24, 1967.
- 3) Edwardsson, S. : Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **13** : 637—646, 1968.
- 4) Bratthall, D. : Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol. Revy.* **21** : 143—152, 1970.
- 5) 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.
- 6) Beighton, D., Russell, 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.* **124** : 271—279, 1981.
- 7) Coykendall, A.L. : Proposal to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status, based on their molecular composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27** : 26—30, 1977.
- 8) Beighton, D., Hayday, H., Russell, R.R.B. and Whiley, R.A. : *Streptococcus macacae* sp. nov. from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34** : 332—335, 1984.
- 9) Whiley, R.A., Russell, R.R.B., Hardie, J.M. and Beighton, D. : *Streptococcus downei* sp. nov. for strains previously described as *Streptococcus mutans* serotype *h*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38** : 25—29, 1988.
- 10) Masuda, N., Tsutsumi, N., Sobue, S. and Hamada, S. : Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J. Clin. Microbiol.* **10** : 497—502, 1979.
- 11) Hamada, S. and Slade, H.D. : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* **44** : 331—384, 1980.
- 12) Loesche, W.J. : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* **50** : 353—380, 1986.
- 13) McBride, B.C., Song, M., Krasse, B. and Olsson, J. : Biochemical and immunological differences between hydrophobic and hydrophilic strains of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **44** : 68—75, 1984.
- 14) McBride, B.C., Morris, E.J. and Ganeshkumar, N. : Relationship of streptococcal cell surface proteins to hydrophobicity and adherence. In : *Molecular basis of oral microbial adhesion* (ed. by Mergenhagen, S.E. and Rosan, B.). American Society for Microbiology, Washington D.C., 1985, 85—93.
- 15) Okahashi, N., Koga, T. and Hamada, S. : Purification and immunochemical properties of a protein antigen from serotype *g* *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Immun.* **30** : 35—47, 1986.
- 16) Hanada, N., Takehara, T. and Saeki, E. : Purification and characterization of a third glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* serotype *g*. *J. Gen. Microbiol.* **133** : 1351—1358, 1987.
- 17) Hanada, N. and Takehara, T. : Comparison of different water-soluble glucan synthases from

Streptococcus mutans serotype *g*. *Microbios*. **50**:147—152, 1987.

- 18) Hanada, N. and Takehara, T. : (1 → 3) - α -D-Glucan synthase from *Streptococcus mutans* AHT (serotype *g*) does not synthesise glucan without primer. *Carbohydr. Res.* **168**:120—124, 1987.
- 19) 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.
- 20) Maurelli, A.T., Blackmon, B. and Curtiss, R. III. : Loss of pigmentation in *Shigella flexneri* 2a is correlated with loss of virulence and virulence-associated plasmid. *Infect. Immun.* **43**:397—401, 1984.
- 21) Gold, O.G., Jordan, H.V. and Van Houte, J. : A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **18**:1357—1364, 1973.
- 22) Hamada, S., Masuda, N. and Shimamoto, T. : Some biological properties of *Streptococcus mutans* isolated from human mouths with reference to the correlation with serotypes. *Arch. Oral Biol.* **24**:627—631, 1979.
- 23) Okahashi, N., Asakawa, H., Koga, T., Masuda, N. and Hamada, S. : Clinical isolates of *Streptococcus mutans* serotype *c* with altered colony morphology due to fructan synthesis. *Infect. Immun.* **44**:617—622, 1984.
- 24) Rantz, L.A. and Randall, E. : Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping. *Stanford Med. Bull.* **13**:290—291, 1955.
- 25) Hamada, S., Tai, S. and Slade, H.D. : Selective adsorption of heterophile polyglycerophosphate antigen from antigen extracts of *Streptococcus mutans* and other gram-positive bacteria. *Infect. Immun.* **14**:903—910, 1976.
- 26) Hamada, S., Masuda, N. and Kotani, S. : Demonstration of serotype *d* and *g* specificities of *Streptococcus mutans* by immunodiffusion. *Arch. Oral Biol.* **23**:495—499, 1978.
- 27) Hamada, S. and Slade, H.D. : Purification and immunochemical characterization of type *e* polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **14**:68—76, 1976.
- 28) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. **227**:680—685, 1970.
- 29) Goldman, R.C. and Tipper, D.J. : *Bacillus subtilis* spore coats :Complexity and purification of a unique polypeptide component. *J. Bacteriol.* **135**:1091—1106, 1978.
- 30) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets :Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350—4354, 1979.
- 31) 栗林景容・坂口志文・原田孝之 : 抗体作製例. 実験生物学講座14 (村松 繁・他編). 丸善, 1985, 東京, 29—43.
- 32) Freedman, M.L. and Tanzer, J.M. : Dissociation of plaque formation from glucan-induced agglutination in mutants of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **10**:189—196, 1974.
- 33) Van Handel E. : Determination of fructose and fructose-yielding carbohydrates with cold anthrone. *Anal. Biochem.* **19**:193—194, 1967.
- 34) Koga, T., Okahashi, N., Asakawa, H. and Hamada, S. : Adherence of *Streptococcus mutans* to tooth surfaces. In : *Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans* (ed. by Hamada, S. et al.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York and Oxford, 1986, 111—120.

- 35) Hamada, S., Torii, M., Kotani, S. and Tsuchitani, Y. : Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interaction of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Infect. Immun.* **32** : 364—372, 1981.
- 36) Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. : Adherence of bacteria to hydrocarbons : A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9** : 29—33, 1980.
- 37) Keyes, P.H. and Jordan, H.V. : Periodontal lesions in the Syrian hamster-III. Findings related to an infectious and transmissible component. *Arch. Oral Biol.* **9** : 377—400, 1964.
- 38) Regolati, B. and Hotz, P. : Cariostatic effect of glycerophosphate. *Helv. Odontol. Acta* **16** : 13—18, 1972.
- 39) Keyes, P.H. : A method of recording and scoring gross carious lesions in the molar teeth of Syrian hamsters. *J. Dent. Res.* **23** : 439—444, 1944.
- 40) Ørstavik, J. and Ørstavik, D. : Influence of *in vitro* propagation on the adhesive qualities of *Streptococcus mutans* isolated from saliva. *Acta Odontol. Scand.* **40** : 57—63, 1982.
- 41) Olsson, J. and Westergren, G. : Hydrophobic surface properties of oral streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **15** : 319—323, 1982.
- 42) Westergren, G. and Olsson, J. : Hydrophobicity and adherence of oral streptococci after repeated subculture in vitro. *Infect. Immun.* **40** : 432—435, 1983.
- 43) Gibbons, R.J. and Etherden, I. : Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect. Immun.* **41** : 1190—1196, 1983.
- 44) Moro, I. and Russell, M.W. : Ultrastructural localization of protein antigens I/II and III in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **41** : 410—413, 1983.
- 45) Russell, R.R.B. and Smith, K. : Effect of subculturing on location of *Streptococcus mutans* antigens. *FEMS Microbiol. Lett.* **35** : 319—323, 1986.
- 46) Russell, M.W., Bergmeier, L.A., Zanders, E.D. and Lehner, T. : Protein antigens of *Streptococcus mutans* : Purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component. *Infect. Immun.* **28** : 486—493, 1980.
- 47) Russell, R.R.B. : Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **114** : 109—115, 1979.
- 48) Forester, H., Hunter, N. and Knox, K.W. : Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **129** : 2779—2788, 1983.
- 49) Rundegren, J. and Olsson, J. : Interactions between salivary agglutinins and strains of *Streptococcus mutans* with varying degrees of surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **40** : 141—146, 1987.
- 50) Gibbons, R.J. and Qureshi, J.V. : Virulence-related physiological changes and antigenic variation in populations of *Streptococcus mutans* colonizing gnotobiotic rats. *Infect. Immun.* **29** : 1082—1091, 1980.
- 51) Koga, T., Asakawa, H., Okahashi, H. and Hamada, S. : Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity of serotype c *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **132** : 2873—2883, 1986.
- 52) Koga, T. and Inoue, M. : Cellular adherence, glucosyltransferase adsorption, and glucan synthesis of *Streptococcus mutans* AHT mutants. *Infect. Immun.* **19** : 402—410, 1978.
- 53) Svanberg, M., Westergren, G. and Olsson, J. : Oral implantation in humans of *Streptococcus*

- mutans* strains with different degrees of hydrophobicity. *Infect. Immun.* **43** : 817—821, 1984.
- 54) Ikeda, T., Otake, S., Hirasawa, M., Williams, K., Kiyono, H., McGhee, J.R. and Shiota, T. : Virulence of *Streptococcus mutans* : Revertants of mutant C4. *Infect. Immun.* **27** : 25—31, 1980.
- 55) Hirasawa, M., Kiyono, H., Babb, J.L., Shiota, T., Michalek, S.M. and McGhee, J.R. : Virulence of *Streptococcus mutans* : In vivo reversion of a low-virulence mutant results in partial displacement and pathogenesis. *Infect. Immun.* **27** : 1003—1011, 1980.