Streptococcus mutans の器壁付着性に 関与する菌体外多糖について

- I. 器壁への付着能を異にした画分の不溶性グルカンの構造について
- II. 不溶性グルカンの分画と器壁付着能について
- III. 多糖分解酵素共存下における多糖合成と付着性について

上 出 正 幸

東京医科歯科大学歯学部第二歯科保存学教室

(主任・指導：木下四郎 教授)

国立予防衛生研究所歯科衛生部

(主任・指導：荒谷真平 部長)

(昭和52年12月16日受付)

The Extracellular Polysaccharides Responsible for The Adherence of *Streptococcus mutans* to Glass Surface

- I. The Structure of Insoluble Glucan of Each Fraction having different Adherence Ability to Glass Surface
- II. The Fractionation of Insoluble Glucan and the Adherence Ability of *Streptococcus mutans* to Glass Surface
- III. The Effect of α -1: 6- and α -1: 3-glucanase on The Adherence and Production of Polysaccharides in Cell-Free System

Masayuki KAMIDE

Department of Periodontology, School of Dentistry

Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director: Prof. Shiro KINOSHITA)

Department of Dental Research,

The National Institute of Health

(Chief and Director: Dr. Shimpei ARAYA)

In vitro studies were performed on the extracellular polysaccharides responsible for the adherence of *Strep. mutans* to glass surface.

Following results were obtained:

1. In proportion of α -1:3- and α -1:6-glucosidic linkages, there were no remarkable differences between the adhered and not adhered insoluble glucan produced by *Strep. mutans* strain FIL from sucrose at early stage of cell growth. The adherence ability of insoluble glucan produced at early stage of cell growth does not mainly depend on the proportion of α -1:3- and α -1:6-glucosidic linkages but may depend on other structural changes such as conformation or molecular weight derived from the differences of fields of glucan synthesis.
2. Apparent correlation between the adherence ability of streptococci to glass surface and the insoluble glucan-1 producing ability was observed in the adherence assay system by seven cultured streptococci having different insoluble glucan producing ability. Similar correlation between the amount of adhered insoluble glucan and insoluble glucan-1 producing ability was confirmed in the cell-free adherence assay system by crude enzyme preparation from *Strep. mutans* strain 6715 under various conditions.
3. The amounts of adhered insoluble glucan and insoluble glucan-1 were reduced by addition of α -1:6- or α -1:3-glucanase in cell-free adherence assay system. However, the correlation between the amount of adhered insoluble glucan and insoluble glucan-1 producing ability was also observed in the presence of each glucanase. The insoluble glucan-1 synthesized in the presence of α -1:6-glucanase and the insoluble glucan-1 synthesized in the presence of α -1:3-glucanase seemed to have difference in the adhesive property. Each insoluble glucan-1 was fractionated in same fraction according to the solubility, but the difference in adhesive property of each insoluble glucan-1 synthesized in the presence of α -1:6- or α -1:3-glucanase may be explained by differences of other physicochemical properties or chemical structures.

I. 器壁への付着能を異にした画分の不溶性 グルカンの構造について

1. 緒 言

口腔細菌の一つであるレンサ球菌, *Streptococcus mutans* は蔗糖から菌体外多糖を合成して菌面に付着, 定着し, 菌垢を形成する¹⁻⁵⁾。この菌の菌体外多糖は水不溶性グルカン (Insoluble glucan: IG) と水可溶性グルカン (Soluble glucan: SG) に区別できる^{6,7)}。IG を合成する能力を欠く変異株では菌垢形成および腐蝕発能が低下する事実^{8,9)} などから, IG が口腔疾患の発生に重要な役割を果たしていると考えられている¹⁰⁻¹⁵⁾。ところで, *Streptococcus mutans* の平滑面への付着現象に関する *in vitro* の実験から, 菌体の付着現象には壁面における *de novo* の IG 合成が必要であるとされている^{16,17)}。つまり壁面で生成された IG のみが付着性を示すのであって, 溶液中でつくられた IG を後から壁面に付着させようとしても付着しないとされている^{14,18,19,20)}。

本研究においては先ず, 実際に壁面に確かに付着している IG と付着していない IG を分画し, それらの多糖中のグルコシド結合の比率に差異がみられるかどうかを検討した。

2. 材 料 と 方 法

1) 器壁への付着能を異にした画分の不溶性グルカン (IG) の調製

Strep. mutans FIL(M)株²¹⁾ を 4 ml の Brain Heart Infusion broth (日水製薬 Co., Ltd) で 37°C 18 時間前培養し, その 0.3 ml を蔗糖 5% を含む 12 ml の Heart Infusion broth で静置培養した。培養条件は 37°C, 6, 12, 24 時間で, 培養試験管を水平面から 85° の角度に保った。培養後, 図 I-1 に示した方法で付着能による IG の分画を行った。すなわち付着性の強い ad-1 画分と付着性のやや弱い ad-2 画分, 付着しない non-ad 画分, さらに可溶性グルカン (SG) に分画した。この方法は今井ら²²⁾により考案された系である。培養液を静かに別の試験管に移し, 12 ml の生理的食塩水で洗い, 7,200 g 20分間遠沈した。沈渣を non-ad 画分とした。培養試験管壁に付着している画分はさらに 12 ml の生理的食塩水を加えて 5 秒間, サーモミキサー, モデル TM-100 single unit (THEMONICS Co., LTD) で強く攪拌し, その時はがれてくる画分を ad-2 画分, それでもなお試験管壁に強固に付着している画分を ad-1 画分とした。

ad-1, ad-2, non-ad の各画分は 0.5 N NaOH で 37°C 1 時間, 振盪しながら多糖を抽出し, さらに 4°C にて

図 I-1 付着 assay 法。IG：不溶性グルカン，SG：可溶性グルカン

10,000 g 20 分間遠沈した。沈渣は菌体として生理的食塩水で2 回遠沈洗浄した。アルカリ上清は 6 N 酢酸で中和の後、等量のエタノールを加えて 4°C 18 時間静置し、7,200 g 20 分間遠沈した。その沈渣を IG とした。各画分の IG はそれぞれ脱イオン水で2 回遠沈洗浄した。培養上清は等量のエタノールを加えて 4°C 18 時間静置し、7,200 g 20 分間遠沈した。その沈渣を SG とした。SG は 0.5 N NaOH で溶解し、等量のエタノールを加えて 4°C 18 時間静置し、7,200 g 20 分間遠沈した。沈渣を 45% エタノール溶液で2 回遠沈洗浄して中性であることを確かめ、精製した SG を得た。

以上のようにして得た各画分の IG および SG は、4 G ガラスフィルターを使ってエタノール、アセトンで脱水し、50℃、約3時間真空乾燥した。それぞれ乾燥して得られたものを粉末にし、さらに No. 300 のメッシュを通過させ試料とした。

2) 多糖の定量

各画分の IG および SG をフェノール硫酸法²³⁾に従って定量し、グルコース量として換算した。

3) 赤外線吸収スペクトルによる多糖の分光分析

ad-1, ad-2, non-ad 各画分の IG, 約 1 mg をそれぞれ 100 mg の KBr と混和して錠剤に成型し, 赤外分光光度計 DS 301 型 (日本分光工業 K.K.) で分析した。

4) 多糖の過ヨウ素酸酸化²⁴⁾

1) より得た各画分の IG, 3.24 mg を 1 ml の脱イオン水に懸濁し, 1 ml の 0.05 M メタ過ヨウ素酸ナトリウムおよび 3 ml の 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 4.0 を加えて 20°C にて7日間, 遮光下で振盪した²⁴⁾。過ヨウ素酸の消費量は 223 nm の吸光度を島津 AQV-50 分光光度計で測定し, 計算式から求めた。過ヨウ素酸酸化によって産生されたギ酸量は, メチルレッドを指示薬とし, 0.001 N の NaOH で中和滴定した。中和点を Beck-

man Expandomatic pH メーターを用いて求めた。

3. 結 果

1) *Strep. mutans* FIL (M) 株の IG 合成

付着初期の IG をうるために *Strep. mutans* FIL(M) 株の細胞増殖と IG 合成の時間経過を HI 培地で調べたのが図 I-2 である。図から、細胞の対数増殖期は 6～12 時間の間にあるのがわかった。これに対して IG 合成は細胞の増殖に伴って始まるが、細胞の増殖が定常状態になった 12 時間以後でもなお続いていることがわかった。ad-1 画分の IG は対数増殖期の初期にあたる 6 時間目のものから得た。以後、各画分とも 6 時間目の多糖を試料として実験に用いた。

2) 付着能を異にした各画分の多糖の収量

Strep. mutans FIL (M) 株を蔗糖 5% を含む 12 ml の HI 培地で 6 時間培養した時得られた ad-1, ad-2, non-ad 各画分の IG 量および SG 量をグルコース量で換算して表 I-1 に示した。すべての IG 量は SG 量とほぼ同程度産生された。すべての IG のうち大部分(83.9

図 I-2 *Strep. mutans* FIL(M) 株の菌体量および IG 量の経時的変化

表 I-1 *Strep. mutans* FIL(M) 株の 6 時間培養後の各画分の多糖量。ad-1, ad-2, non-ad 各画分の IG のすべての IG に対する割合を () 内に百分率で示した。

Insoluble Glucan (μg/ml)				Soluble Glucan (μg/ml)
ad-1	ad-2	non-ad	total	
10.7	7.6	95.4	113.7	126.1
(9.4%)	(6.6%)	(83.9%)		

%) は non-ad 画分であり, ad-1, ad-2 画分はそれぞれ 9.4%, 6.6% であった。

3) 各画分から得られた多糖の赤外線吸収スペクトルによる分光分析

ad-1, ad-2, non-ad の各画分の IG の赤外線吸収スペクトルを図 I-3 に示した。全体的にはすべて同じような多糖の吸収パターンがみられた。糖の指紋領域では type 1 の吸収が 908～912 cm⁻¹ に, type 2a の吸収が 839～843 cm⁻¹ に, type 3 の吸収が 752～759 cm⁻¹ に認められた。また, α-1:3-グルコシド結合の存在を示す 793 cm⁻¹ の吸収もすべての多糖にみられた。従って

図 I-3 表 I-1 の ad-1, ad-2, non-ad 各画分の IG の赤外線吸収スペクトル。矢印(↑)は左からそれぞれ type 1, type 2 a, 793 cm⁻¹, type 3 の吸収を示す。

表 I-2 各画分における IG のグルコシド結合の割合。

Fraction Experiment		Glucosidic linkage(%)		
		α-1:6-	α-1:3-	α-1:4- or α-1:2-
ad-1	1	26.8	59.7	13.5
	2	24.0	71.0	5.0
ad-2	1	25.1	60.7	14.2
	2	35.3	64.7	0.0
non-ad	1	40.2	59.8	0.0
	2	34.5	65.5	0.0

ad-1, ad-2, non-ad 各画分の IG すべてに α -1:3-, α -1:6-グルコシド結合の存在が推察された。

4) 各画分の不溶性グルカンの過ヨウ素酸化化

ad-1, ad-2, non-ad 各画分の IG を 7 日間過ヨウ素酸化化した。2 回の実験結果からグルコシド結合の比率を求めると、表 I-2 のようになった。この値から判断すると、各画分の IG の α -1:3-グルコシド結合にはほとんど差がなく、他の結合についても特に大きな差があるとは思えない。

4. 考 察

Strep. mutans が平滑面に付着するには壁面において新しく合成された IG が必要である^{14,16,17,18,19,20}。このことから、初期の合成された IG の構造を知るために、FIL (M) 株を 2 の 1) のように培養し、それぞれの IG を調製した。ad-1 画分は再現性が高く付着能の指標として評価できる画分である²²。各付着画分の IG の赤外線吸収スペクトルを分析し糖の指紋領域を調べてみると、いずれも同じようなパターンを示しており(図 I-3)すべての IG に α -1:3-, α -1:6-グルコシド結合の存在することが推察された。これは、西沢ら²⁵の観察した IG の赤外線吸収パターンとよく一致した。そこで、各多糖の α -1:3-, α -1:6-グルコシド結合の存在比率を調べるため、それら多糖の過ヨウ素酸化を行った。まず、マンニトールの過ヨウ素酸化を行い、消費過ヨウ素酸量と産生ギ酸量が理論値と一致することを確認してから、non-ad 画分および SG の過ヨウ素酸化を行い消費過ヨウ素酸量、産生ギ酸量の時間経過を調べた。その結果、7 日間の過ヨウ素酸化が適当であると考えられた。そこで、ad-1, ad-2, non-ad 各画分のグルコシド結合の存在比率(表 I-2)についてみると、付着能の違いでグルコシド結合の比率に大きな違いがあるとは考えにくい。それで、もしこれらの多糖構造に違いがあるとすれば、グルコシド結合の比率のようなものよりも、多糖の分子量における差異、あるいは合成される場(field)によって影響を受けた多糖分子の Conformation (立体配座)などの違いがより大きな意味をもつのではないかと思われる。

II. 不溶性グルカンの分画と器壁付着能について

1. 結 言

前節 I で *Strep. mutans* の器壁への付着に関与している不溶性グルカン (IG) の構造を調べたところ、付着している画分と付着していない画分の IG のグルコシド結合の比率には大きな違いがみられなかった。ところで IG は、分画法によって、より不溶性の強い画分と、適当な方法で可溶化できる画分に分けられる。前者は IG-1, 後者は IG-2 と呼ばれている²⁵。一方、レンサ球菌の器壁への付着能力はそれらの IG 産生能力と相関のあることが報告されている²²。

そこで今回、*Strep. mutans* の菌体外多糖のうち IG をさらに溶解度の異なる 2 つの画分、IG-1, IG-2 に分画し、それらと付着現象との関わり合いを菌増殖系(菌を培養した時の菌体の付着)および無細胞系(酵素で合成された多糖の付着)で検討した。

2. 材 料 と 方 法

A. 菌増殖系 (cell growing system) での付着

1) 使用菌株

蔗糖からの多糖合成能を異にする 6 株の *Strep. mutans* (OMZ 176 株, 6715 株, FIL (M) 株, FIL (R) 株, LM 7 (M) 株, LM 7(R) 株)と *Strep. sanguis* ATCC 10558 株を使った。OMZ 176 株は本学歯学部野口俊英博士より、6715 株はライオン歯科衛生研究所二上捷之氏より、FIL (M), FIL (R) 株は東北大学歯学部山田 正博士より、また、他の株はすべて東北大学歯学部樋口允子博士よりそれぞれ供与された。*Strep. mutans* の (M), (R) はそれぞれ Mucoid 型と Rough 型のことで、Rough 型は Mucoid 型を親株として分離され、MS 寒天培地上でコロニー周囲に粘性性物質を作らない菌株である²¹。

2) 付着能 assay 法

1) に述べた 6 株の *Strep. mutans* と 1 株の *Strep. sanguis* をそれぞれ前節 I に述べたと同様な方法で培養した。培養時間は 18 時間とした。培養は各菌株ともそれぞれ 2 本ずつ行った。

培養後、I の 2 の 1) で述べた方法に従って ad-1, ad-2, non-ad を分画した。ad-1, ad-2, non-ad の各

画分は 0.5 N NaOH で 37°C 1 時間、振盪しながら多糖を抽出し、4°C にて 10,000 g 20 分間遠沈した。沈渣は菌体として生理的食塩水で 2 回遠沈洗浄した。アルカリ上清は 6 N 酢酸で中和の後、4°C 18 時間静置し、それを 7,200 g 20 分間遠沈した。その沈渣を IG-1 (Insoluble glucan-1)²⁵⁾ とした。上清はさらに等量のエタノールを加えて 4°C 18 時間静置し、7,200 g 20 分間遠沈した。その沈渣を IG-2 (Insoluble glucan-2)²⁵⁾ とした。各画分の IG-1, IG-2 はそれぞれ脱イオン水、45%エタノール溶液で 2 回遠沈洗浄したのち、糖の定量を行った。

培養上清には等量のエタノールを加えて 4°C 18 時間静置の後、7,200 g 20 分間遠沈し、沈渣を SG とした。上清はさらに等量のエタノールを加えて 4°C 18 時間静置した後、7,200 g 20 分間遠沈した。その沈渣をオリゴ糖とした。SG は 0.5 N NaOH で溶解の後、等量のエタノールを加えて 4°C で 18 時間静置し、7,200 g 20 分間遠沈した。沈渣は 45% エタノール溶液で 2 回遠沈洗浄し、中性であることを確かめてから糖の定量を行った。オリゴ糖は 75%エタノール溶液で 2 回遠沈洗浄し、糖の定量を行った。

3) 糖および菌体の定量

各画分の糖量をフェノール硫酸法²³⁾に従って定量し、グルコース量として換算した。各画分の菌体量は 12 ml の生理的食塩水を加えて均一に攪拌、懸濁した後、濁度を 500 nm で比色定量し、これを予め作っておいた濁度とタンパク量の検量線からタンパク量に換算した。この検量線は一定の濁度の菌体を超音波処理 (50 W, 30 分, KUBOTA Insonator model 200M) した後、Lowry 法²⁶⁾に従ってアルブミン相当量のタンパク量として換算して作った。

B. 無細胞系 (cell-free system) での付着

1) 粗酵素の調製

Strep. mutans 6715 株を 1 l の Brain Heart Infusion broth で 37°C 18 時間培養し、その培養上清を 4°C 18 時間、60%飽和硫酸で塩析した。塩析後、7,200 g 20 分間遠沈し、沈渣を 50 ml のリン酸緩衝液 pH 6.8 に溶解、0.005 M の同じ緩衝液 4 l で一昼夜透析した。得られた粗酵素は再び遠沈して上清を凍結保存した。

2) 無細胞系での反応条件

反応混液 (4 ml) は *Strep. mutans* 6715 株の粗酵素液 0.5 ml、窒化ナトリウム 0.1% を含む 0.2 M の蔗糖溶液 1 ml、緩衝液 1 ml および脱イオン水 1.5 ml とした。反応は 37°C で試験管を水平面から 30° の角度

に静置して行った。緩衝液は 0.2 M のリン酸緩衝液 pH 6.8 あるいは 0.2 M の酢酸緩衝液 pH 5.5 を用いた。反応時間は 6, 18, 24 時間とした。これは Mukasa らの方法^{16,17)}を改良したもので、酵素で合成された多糖の付着を観察した。

3) 付着能 assay に用いた多糖の調製

無細胞系での多糖調製方法は A に準じた。ただ、ad-1, ad-2 の分画は 4 ml の脱イオン水で行った。また、菌増殖系の場合と異なり菌体が含まれていないので、ad-1, ad-2, non-ad の各画分の多糖をアルカリ溶解した後、遠沈操作せず、直ちに中和した。2) と同条件の反応を 2 回行い、それぞれから IG-1, IG-2 を求めた。

この系における付着量は、Mukasa らの方法^{16,17)}と異なり熱処理菌体が含まれていないから、ad-1 画分のすべての IG 量で評価される。

4) 糖の定量

3) から得られた各画分の糖量はフェノール硫酸法²³⁾で定量し、グルコース量に換算した。

3. 結 果

A. 菌増殖系における streptococci の器壁への付着

培養した 6 株の *Strep. mutans* と 1 株の *Strep. sanguis* から得られた菌体量およびそれらの産生した糖量の平均値を表 II-1 に示した。この結果、産生されたすべての IG-1 量、IG-2 量、SG 量は菌株によって違いのあることがわかった。また、強固に器壁についた ad-1 画分の組成をみると、菌体量が多いものはその IG-1 の量も多い。さらに図 II-1 から、ad-1 画分中の菌体量と IG-1 量は明らかに相関がみられた ($r=0.922$, $p<0.01$)。また図 II-2 に示すように付着している ad-1 画分の菌体量と菌が産生したすべての IG-1 量は正の相関を示した ($r=0.719$, $p<0.01$)。さらに図 II-3 に示すように ad-1 画分中の菌体量とこれら菌株の菌体量当りの産生 IG-1 量 (IG-1 産生能) は正の相関を示した ($r=0.673$, $p<0.01$) ところが、ad-1 画分中の菌体量と IG-2 産生能との相関をみると、図 II-4 のように相関はみられなかった。また、ad-1 画分中の菌体量と SG 量、SG 産生能との間にも相関はみられなかった。つまり、菌の付着能力は IG のうち、特に、IG-1 の産生量および産生能と強い関係のあることが示された。

表 II-1 7株のレンサ球菌の各画分の菌体量、IG-1 量、IG-2 量および SG 量。数値は各菌株 2 本の平均値。

Strain	Cells (μg as protein/ml)				Insoluble Glucans (μg as glucose/ml)								SG ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
					ad-1		ad-2		non-ad		total		
	ad-1	ad-2	non-ad	total	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2	
<i>Strep. mutans</i>													
OMZ 176	16.2	45.7	31.0	92.9	151.1	26.7	570.8	24.5	1278.8	27.2	2000.7	78.4	701.3
6715	8.5	35.1	57.7	101.3	132.5	13.5	787.5	18.0	2017.5	38.7	2937.5	70.2	665.0
FIL (M)	8.3	12.0	55.8	76.1	57.3	19.3	81.4	24.3	1297.5	153.9	1436.2	197.5	1423.8
LM 7 (M)	3.4	4.6	61.0	69.0	37.5	20.7	40.4	21.4	1661.3	86.1	1739.2	128.2	1093.8
FIL (R)	2.0	7.7	113.2	122.9	16.8	17.7	22.5	49.2	682.5	312.3	721.8	379.2	1121.3
LM 7 (R)	0.3	1.6	118.2	120.1	4.9	10.7	6.2	14.1	122.5	304.4	133.6	329.2	1393.8
<i>Strep. sanguis</i>													
ATCC 10558	0.03	0.7	92.0	92.7	6.7	18.6	8.3	20.2	20.9	36.6	35.9	75.2	4661.3

図 II-1 各菌株の付着 (ad-1) 菌体量と付着画分 (ad-1) 中の IG-1 量の関係。

図 II-2 各菌株の付着菌体量と IG-1 産生量の関係。

B. 無細胞系における不溶性グルカンの付着

Strep. mutans 6715 株の粗酵素系に蔗糖を加えた時、合成された多糖を付着能に従って分画し、それぞれを IG-1、IG-2 に分けて定量した平均値が表 II-2 である。これから各時間の多糖量を図示すると、図 II-5(pH5.5),

図 II-3 各菌株の付着菌体量と菌体当りの IG-1 産生量 (IG-1 産生能) の関係。

図 II-4 各菌株の付着菌体量と IG-2 産生能の関係。

図 II-6 (pH 6.8) のようになり、それぞれのすべての IG-1 量、SG 量は反応時間と共に増加していることがわかった。また、pH 5.5 では SG 合成活性は IG-1 の合成活性とほぼ同程度であった。一方、pH 6.8 では IG-1 の合成活性が高く、SG の合成活性ははるかに低かつ

表 II-2 pH 5.5 および pH 6.8 において *Strep. mutans* 6715 株の粗酵素によって合成された SG 量, オリゴ糖量および各画分の IG-1 量と IG-2 量。数値はそれぞれ 2 本の平均値。

Incubation condition		Insoluble Glucans (μg as glucose/ml)								SG ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Oligo- saccharides ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
		ad-1		ad-2		non-ad		total			
pH	Time (hr)	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2		
6.8	6	31.1	12.8	269.3	56.0	129.2	18.1	429.6	86.9	79.8	34.0
6.8	18	320.0	14.1	616.0	89.2	22.2	24.2	958.2	127.5	156.6	71.7
6.8	24	646.8	177.3	350.0	62.9	18.6	27.7	1015.4	267.9	216.0	88.6
5.5	6	13.5	18.0	74.9	40.7	145.2	81.9	233.6	140.6	331.4	20.1
5.5	18	83.9	41.6	288.4	84.9	126.1	69.0	498.4	195.5	689.8	10.4
5.5	24	198.3	55.3	420.8	62.5	63.9	52.2	683.0	170.0	715.0	37.3

図 II-5 pH 5.5 における各種合成多糖量の経時的変化。各点は表 II-2 に基づきプロットした。

- (a) ○—○ ad-1 画分中の IG-1 量
●—● ad-1 画分と ad-2 画分の合計 IG-1 量
▲—▲ すべての IG-1 量
- (b) ▽…▽ SG 量
○—○ ad-1 画分中の IG-2 量
●—● ad-1 画分と ad-2 画分の合計 IG-2 量
▲—▲ すべての IG-2 量

図 II-6 pH 6.8 における各種合成多糖量の経時的変化。各点は表 II-2 に基づきプロットした。

- (a) ○—○ ad-1 画分中の IG-1 量
 ●—● ad-1 画分と ad-2 画分の合計 IG-1 量
 ▲—▲ すべての IG-1 量
- (b) ▽…▽ SG 量
 ○—○ ad-1 画分中の IG-2 量
 ●—● ad-1 画分と ad-2 画分の IG-2 量
 ▲—▲ すべての IG-2 量

図 II-7 付着画分 (ad-1) における付着量 (ad-1 画分の IG 量) と IG-1 量の関係。数字は反応時間を示す。

た。IG-2 は pH 5.5, pH 6.8 共に小さな値を示し、反応時間が増加してもその量は他の多糖ほど増加していなかった。また、強固な付着画分である ad-1 画分の IG-1 量は pH 5.5 でも pH 6.8 でも時間と共にその増加の割合が次第に高くなっているのが特徴であった。

そこで、以上のデータを用いて、付着量 (ad-1 画分の IG) と ad-1 画分中の IG-1 量との関係を図 II-7 に示した。図で明らかなように両者には強い相関がみられた ($r=0.979$, $p<0.01$)。さらに、ad-1 画分の IG 量と反応中に合成されたすべての IG-1 量との関係は図 II-8 のように正の相関を示した ($r=0.790$, $p<0.01$)。ad-1 画分中の IG 量とすべての IG-2 量および SG 量との相関はなかった。

図 II-8 付着量と合成されたすべての IG-1 量の関係。数字は反応時間を示す。

4. 考 察

蔗糖からの多糖産生能力が異なる7種の菌を用い、それら菌株の器壁への付着能力を調べると、菌の付着量はそこに付着している IG-1 量に比例していることが明らかになった。そして菌の付着能力は、菌の IG-1 産生能力に比例し、IG-2 や SG の産生能力とは無関係であることが示唆された。

菌の培養時には、菌の増殖に伴ういろいろな要素が加わるので付着現象自身の解析には適当ではない。そこで、菌体を除いた酵素だけの単純な系で実験を行った。多くの *Strep. mutans* から得た酵素液では器壁に付着する多糖を合成させることはむずかしいが 6715 株では培養液からの粗酵素だけで蔗糖から器壁に付着する多糖をつくることができる。この酵素は、他の菌のそれとはいくらか性質が異っているであろうと思われる。表 II-1 にみられるように、この菌の ad-1 画分中では ad-2 に比べて IG-1 の含量が、他の菌株の IG-1 の含量に比べて圧倒的に高く、無細胞系の酵素においても IG-1 量が多いことが認められる(表 II-2)。しかし、6715 株の菌がつくる IG-1 のグルコシド結合では、 α -1:3-, α -1:6-結合の割合がほぼ 65%, 30% と、他の菌のつくるとくらべて²⁵⁾特に著明な差はなかった。ただ、その赤外線吸収のパターンが他菌の IG とくらべるとややなだらかなので、6715 株の IG の分子量は他菌のそれより比較的大きいのかかもしれないと思われる。

この実験系で特に興味のあるのは、図 II-5a, 図 II-6a にみられるように、ad-1 画分中の IG-1 はある時間的な lag (潜伏期) を経て合成されるらしいことである。このような現象は、菌増殖系における実験では捕えるこ

とのできないものであろう。またこのような無細胞系で、pH の変化によって合成される多糖の分画比が変動するという事実は、口腔内での歯垢形成と深い関係があるように思われる。また、単純な無細胞系においても菌培養系におけると同様に、IG-1 合成能力と多糖の付着能力との間に強い相関が示された。

III. 多糖分解酵素共存下における多糖合成と付着性について

1. 緒 言

前節 II では *Strep. mutans* の合成する水不溶性グルカン (IG) のうち、より溶解性の低い IG-1²⁵⁾ の産生能力が菌体の付着現象と相関していることが明らかになった。また、無細胞系の場合でも IG-1 が付着現象と強く関係していることが示唆された。そこで *Strep. mutans* の平滑面への付着機序を考える手段の一つとして次のような実験を行った。すなわち、II で用いた無細胞系に、streptococci の IG 合成を阻害すると考えられている α -1:6-glucanase (デキストラナーゼ) と、主に IG-1 をよく分解する α -1:3-glucanase を加えた場合、多糖の合成量や付着性にどのように影響するかを検討した。

2. 材料と方法

1) 多糖分解酵素の調製法

α -1:6-glucanase (デキストラナーゼ)

Arthrobacter 由来の市販デキストラナーゼ(NAGASE Co., Ltd) 10 g を 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 4.8, 50 ml に懸濁攪拌した。遠沈して沈渣を除いた後、上清を 0.005 M 酢酸緩衝液 4 l に対し 4°C にて一昼夜透析した。それを再び遠沈して沈渣を除き酵素液とした。

α -1:3-glucanase

東北大学農学部今井孝平氏²⁷⁾より供与された *Streptomyces* sp. KI-8 株由来の精製された粉末状 α -1:3-glucanase 2.18 mg を 5 ml の 0.01 M 酢酸緩衝液 pH 5.4 に溶解した。遠沈して沈渣を除いたあと上清を酵素液とした。

2) 多糖分解酵素の活性および基質特異性の測定

Strep. mutans 6715 株の合成した SG, IG-1, modified IG-1 および市販デキストラン (分子量 60,000~90,000 第一化学薬品 K.K.) の各々 4 mg を脱イオン水 0.9 ml に混和し、さらに pH 5.5 の 0.1 M 酢酸緩

衝液 2.0 ml, 酵素液 0.1 ml, 0.1%窒化ナトリウム水溶液 1.0 ml を加えた。このような反応混液を 37°C で, α -1:6-glucanase を加えた場合は 0, 15, 30, 60 分間, α -1:3-glucanase を加えた場合は 0, 1, 2, 4, 8, 18 時間反応させた。その時生じた還元糖量を Somogyi-Nelson 法により, 波長 660 nm の吸光度で比色定量した。糖量を標準曲線からグルコース量として換算した。残りの反応混液をさらに計 24 時間反応させ, その分解生成物を東洋口紙 No. 51A にスポットし, ペーパークロマトグラフィーを下降法で行った。展開溶媒は n-ブタノール, ピリジン, 水 (6:4:3, v/v) を用い, 室温にて 20 時間展開した。発色には硝酸銀・アルカリ法を用いた。modified IG-1 は, *Strep. mutans* 6715 株の IG-1 を室温にて 7 日間過ヨウ素酸酸化した後, 水素化ホウ素ナトリウムで還元し, 6 N 酢酸で中和, 18 時間流水中で透析して得た, 水不溶性グルカンであり, α -1:3-グルコシド結合のみからなっている。

3) 多糖分解酵素を加えた時の付着の観察

実験は前節 II の 2, B, 2), 3) に準じた。ただ, 多糖分解酵素の至適 pH は, α -1:3-glucanase の場合 pH 5.4 であり, α -1:6-glucanase の場合も pH 5.0 付近であるから, ここでは pH 5.5 の無細胞系を用いることとし, また, 前節の図 II-6 から, 反応 18 時間までは IG-1 も SG もほぼ直線的に増加しているのので, ここでも反応時間を 18 時間とした。反応混液は脱イオン水 1.5 ml のかわりに種々の活性単位多糖分解酵素液 0.1 ml, 脱イオン水を 1.4 ml とした。なお予め, この付着 assay 系に用いた *Strep. mutans* 6715 株の粗酵素にデキストラナーゼが含まれているかどうかを確認するため, 市販デキストランに粗酵素を 24 時間作用させた。この結果, 還元糖は遊離してこなかったのので, この粗酵素には intrinsic なデキストラナーゼは含まれていないことを確認した。

4) 付着能 assay 法および多糖の定量

II の B, 2), 3) と同じ方法で多糖を調製し, フェノール硫酸法²³⁾に従って定量し, グルコース量として換算した。

3. 結 果

1) 多糖分解酵素の基質特異性と作用様式

多糖分解酵素の活性を調べた結果, α -1:6-glucanase の 1 ml 当りの酵素量は 89.2 U, α -1:3-glucanase は 3.47 U であった。 α -1:6-glucanase および α -1:3-

glucanase の 1 unit は, それぞれ市販デキストラン, modified IG-1 を基質にして 37°C 1 分間に 1 μ g のグルコース相当量の還元糖を遊離させる酵素量とした。さらに, 分解生成物をペーパークロマトグラフィーで調べた結果, α -1:6-glucanase は市販デキストラン, SG, IG-1 を不規則に分解してグルコースとオリゴ糖を生成し, modified IG-1 をほとんど分解しなかった。 α -1:3-glucanase は市販デキストランを分解しなかったが SG, IG-1 をグルコースとニゲロースに分解した。しかし, SG は IG-1, modified IG-1 に比べてやや分解しにくいようだった。以上より, ここで用いた α -1:6-glucanase, α -1:3-glucanase はそれぞれ α -1:6-グルコシド結合, α -1:3-グルコシド結合のみに, endo-wise に作用することが明らかとなった。

2) 多糖分解酵素共存下における多糖合成と付着性

多糖分解酵素を無細胞系に加えて反応の後, 多糖を付着能に応じて分画し, それぞれの IG-1 量, IG-2 量を定量した結果が表 III-1 である。この結果, 合成されたすべての IG 量, すべての IG-1 量は両分解酵素の濃度に従って減少しており, それに対応して強固な付着画分である ad-1 画分も減少していた (図 III-1, 図 III-2)。また, デキストラナーゼ共存下の SG 量はコントロールに比べて 0.280 U/ml の濃度までやや増加するが, それより濃い濃度では, 濃度の増加に従い減少していた。また, オリゴ糖は 1.115 U/ml まで濃度に従って増加していた。すべての糖量としては酵素濃度に従って減少していることがわかった (図 III-1)。 α -1:3-glucanase 共存下でも, すべての IG 量, すべての IG-1 量はともに酵素濃度に従って減少した。これに伴って ad-1 画分の IG 量 (付着量) も減少していた。これに反して SG 量は酵素濃度に従って増加した。オリゴ糖は常にごくわずかしかな存在しなかったが, すべての糖量はいずれの酵素濃度においてもほぼ一定値を示した (図 III-2)。

付着量 (ad-1 画分の IG 量) とすべての IG 合成量との関係を調べると, 図 III-3 のように両者の相関がみられた。相関係数は $r=0.870$ (デキストラナーゼ, $p<0.01$), $r=0.986$ (α -1:3-glucanase, $p<0.01$) であった。さらに付着量とすべての IG-1 量の関係を図示すると図 III-4 のようになり, デキストラナーゼおよび α -1:3-glucanase 共存下で共に相関がみられた。相関係数は $r=0.945$ (デキストラナーゼ, $p<0.01$), $r=0.989$ (α -1:3-glucanase, $p<0.01$) であった。また, 図からもわかるように, デキストラナーゼ共存下と α -1:3-glucanase 共存下では, その回帰直線の傾きに明らかな違

表 Ⅲ-1 α -1:6-glucanase あるいは α -1:3-glucanase の共存により合成された SG 量, オリゴ糖量および各画分の IG-1 量と IG-2 量。数値はそれぞれ2本の平均値。

Glucanase (U/ml)	Insoluble Glucans ($\mu\text{g/ml}$)								SG ($\mu\text{g/ml}$)	Oligo- saccharides ($\mu\text{g/ml}$)
	ad-1		ad-2		non-ad		total			
	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2		
Control	83.9	46.1	288.4	84.9	126.1	69.0	498.4	195.5	689.8	10.4
Dextranase										
0.056	41.3	43.8	206.3	179.4	157.5	80.3	405.1	303.5	810.0	9.3
0.280	17.8	36.8	138.3	263.9	156.0	53.5	312.1	354.2	777.5	41.6
0.558	4.3	20.9	68.0	134.4	127.3	111.0	199.6	266.3	368.1	111.3
1.115	3.8	9.9	6.3	10.9	85.5	78.1	95.6	98.9	28.8	281.9
2.230	7.3	7.8	1.8	3.0	138.8	6.5	147.9	17.3	13.1	153.1
α -1:3-glucanase										
0.011	11.0	10.2	154.0	5.2	245.0	56.7	410.0	72.1	977.5	2.9
0.022	7.8	9.0	73.8	5.2	240.3	52.0	321.9	66.2	1070.0	3.0
0.044	4.0	7.2	21.0	3.7	128.0	57.5	153.0	68.4	1245.0	3.6
0.087	2.8	6.1	0.8	3.7	64.0	39.9	67.6	49.7	1147.5	2.5

図 Ⅲ-1 各濃度の α -1:6-glucanase 共存下で合成された各種糖量。それぞれの糖量を表 Ⅲ-1 に基づいてプロットした。

図 Ⅲ-2 各濃度の α -1:3-glucanase 共存下で合成された各種糖量。それぞれの糖量を表 Ⅲ-1 に基づいてプロットした。

いがみられた (図 Ⅲ-4)。

4. 考 察

Strep. mutans の平滑面への付着現象には IG-1 が強い関りをもっていることが前節Ⅱで示唆された。そこで付着現象を考える手段の一つとして streptococci の多

糖合成阻害因子として知られているデキストラナーゼと IG-1 分解活性をもつ α -1:3-glucanase を無細胞系に加えた場合、IG-1 合成および付着にどのように影響するか検討した。

これまでにレンサ球菌の菌体、あるいは多糖合成酵素 (グルコシルトランスフェラーゼ: GTF) による多糖合成を endo 型デキストラナーゼが阻害することが報告さ

図 III-3 α -1:6-glucanase (○), α -1:3-glucanase (●) 共存下の付着画分 (ad-1) 中の IG 量とすべての IG 量の関係。

図 III-4 α -1:6-glucanase (○), α -1:3-glucanase (●) 共存下の付着 IG 量とすべての IG-1 量の関係。点線はそれぞれの回帰直線を示す。

れている^{6,30)}。著者らも本実験で用いたのと同じ endo 型デキストラナーゼが *Strep. mutans* PK 1 株の IG と SG の合成を阻害することを観察している³¹⁾。また、種々のデキストラナーゼは *Strep. mutans* 6715 株の cell-bound GTF による不溶性グルカンの合成を阻害し、従ってガラス壁への菌体の付着を減少するという報告³²⁾がある。

本実験に用いたデキストラナーゼと α -1:3-glucanase は、それぞれ α -1:6-グルコシド結合、 α -1:3-グルコシド結合を endo-wise に分解する。反応産物として、デキストラナーゼを加えた時はグルコースとマルトース系オリゴ糖を産生する。また、 α -1:3-glucanase を加えた時は今井氏の報告²⁷⁾の通り、グルコースとニゲロースを産生する。従ってこれらの分解酵素の共存する付着 assay 系では、合成途上の SG ないし IG が分解されてオリゴ糖を産生する。そのオリゴ糖が GTF のアクセプターとなる結果、IG-1 合成ひいては付着が阻害されると思われる。事実、両分解酵素の濃度に従ってすべての IG-1 の合成が抑制されており、それに伴って付着量も減少している (表 III-1, 図 III-1, 図 III-2)。

デキストラナーゼ共存下ですべての IG-2 量は低濃度で対照よりやや増加しているが、全体としては酵素濃度に従って減少している。 α -1:3-glucanase の共存下では各酵素濃度において対照より低く、酵素濃度に従って変化しているとは思えない。この現象は各付着画分の IG-2 量でも共通にみられる。従って α -1:3-glucanase は IG-2 に影響を及ぼしにくいようである。

SG 量は、低濃度のデキストラナーゼ共存下でやや増加しており、Koga ら³³⁾の事実と一致しているが酵素濃度が濃くなるに従って急激に減少している。これに反し、 α -1:3-glucanase 共存下では、逆に酵素濃度が濃くなるに従って増加している。この現象はそれぞれの分解酵素共存下で、各多糖画分に見られる最も顕著な差である。

オリゴ糖はデキストラナーゼ共存下でほぼ酵素濃度が濃くなるに従って増加するの、 α -1:3-glucanase 共存下ではほとんど差がない。

以上より次のような推察ができる。つまり、デキストラナーゼは主に合成途上の SG を分解してオリゴ糖を産生する。そのオリゴ糖は IG-1 や IG-2 を合成する GTF のアクセプターとなり、その結果、IG-1, IG-2 の合成を阻害する。一方、Ebisu ら³⁴⁾の言うように、不溶性グルカンの back bone が α -1:3-結合の直鎖であり、 α -1:6-結合が側鎖であるとしたら α -1:3-glucanase は主に合成途上の IG-1 の α -1:3-グルコシド結合に作用して IG-1 を分解し、SG 画分として分画されるような多糖を多く産生する。IG-1 が分解されてできた多糖と SG は、 α -1:3-glucanase によっては分解されにくく、オリゴ糖は増加しない。

このような推察が妥当かどうか今のところ断言できない。しかし、オリゴ糖まで含めたすべての糖量が、 α -1:

3-glucanase 共存下の場合、各酵素濃度においてほぼ一定になる事実(図Ⅲ-2)から、IG-1 画分が分解されて、その結果、分解された多糖が SG 画分に移行する可能性は大きいと思われる。

デキストラナーゼ共存下でそれぞれの酵素濃度においてすべての糖量が一定にならずに酵素濃度に従って減少しているのは、75% エタノールでも沈澱しないような、より低分子量の産物が増えていることに起因していると思われるがその証拠はない。これらのことを明らかにするには、各多糖画分と低分子分解産物のより詳細な分析が必要と思われる。

デキストラナーゼおよび α -1:3-glucanase 共存下ではすべての IG-1 量が加えた酵素濃度に従って減少しており、それに伴って付着量である ad-1 画分の IG 量も減少している。また図 Ⅲ-4 から明らかなように、デキストラナーゼ共存下でも、 α -1:3-glucanase 共存下でも付着量とすべての IG-1 量との相関性が認められる。このことから多糖分解酵素共存下でも付着現象には IG-1 が強く関り合っていることがわかる。しかし、デキストラナーゼ共存下と α -1:3-glucanase 共存下では、それぞれの回帰直線の傾きが異なることから、分解酵素が共存することで合成された IG-1 の構造がかなり変化していると思われる。つまり、本研究で用いた多糖分画法に従うとそれぞれの多糖分解酵素共存下で合成された IG-1 が同じ溶解性をもった画分になるが、単に溶解性という観点だけでは、IG-1 の付着性を説明できないことを示している。従って IG-1 のより詳細な化学構造、物理的性状を調べる必要があると思われる。

以上のように、多糖合成を阻害または修飾するような酵素が共存すると多糖合成の様相が一変し、付着現象も大幅に変化する。しかし、より有効な阻害因子(例えば作用様式のはっきり定った *exo* 型分解酵素など)を使うことにより、付着に必須の IG-1 の構造が明らかにされるものと思われる。

5. 総 ま と め

Strep. mutans の器壁付着性に関与する菌体外多糖について本研究の成果をまとめると次のようになる。

1) *Strep. mutans* を蔗糖存在下で培養した時の付着初期の付着画分、非不着画分の IG (不溶性グルカン) は、その α -1:6-および α -1:3-などのグルコシド結合の比率に顕著な差はみられない。この培養初期に合成された IG が器壁に付着できるか否かは、主にグルコシド

結合の比率に依るのではなく、恐らく多糖が合成される場の違いによる IG のコンフォメーションや分子量などの変化に依るのであろう。

2) IG 産生能力の異なる 7 種類の菌を用いて調べた結果、IG-1 の産生能力の高い菌株では付着能力が高いことがわかった。この事は 6715 株の無細胞系(酵素で合成された多糖の付着)において種々の条件下でも認められた。

3) 無細胞系に IG 合成阻害因子である α -1:6-glucanase (デキストラナーゼ) と α -1:3-glucanase を加えても付着量と IG-1 の合成量の間には相関がみられる。しかし、 α -1:6-glucanase 共存下で合成された IG-1 と α -1:3-glucanase 共存下でつくられた IG-1 の付着能力に差がみられた。これは、それぞれの分解酵素の共存下でつくられた IG-1 は水に対する溶解性は同じであるが、その他の物理化学的性状、化学構造などに差があるためのように思われる。

謝 辞

稿を終るにのぞみ、御懇篤な御指導御校閲をいただきました木下四郎教授に謹んで感謝の意を表します。また懇切丁寧な御指導御教授をいただきました荒谷真平部長に心から御礼申し上げます。さらに本実験に関し終始御指導御鞭撻と御討論をいただきました国立予防衛生研究所歯科衛生部今井獎技官に衷心より感謝の意を表します。また同部の諸先生方および本教室の末田武助教授をはじめとする第 2 歯科保存学教室員各位の御協力に御礼申し上げます。

さらに、 α -1:3-glucanase を御供与下さいました東北大学農学部松田和雄教授、今井孝平氏および *Strep. mutans* 6715 株についての御助言をいただいたライオン歯科衛生研究所の二上捷之氏に御礼申し上げます。また、赤外線吸収スペクトルの分光分析に御協力をいただいた国立予防衛生研究所技術部森林敦子技官に御礼申し上げます。

(本論文の要旨の一部は第 20 回秋期日本歯周病学会において報告した。)

本研究費の一部は文部省科学研究費および Colgate Palmolive Co., New York の援助を受けた。

文 献

- 1) Krasse, B.: The effect of the diet on the implantation of caries-inducing streptococci

- in hamsters. Arch. oral Biol. 10 : 215, 1965.
- 2) Krasse, B. : The effect of caries-inducing streptococci in hamsters fed diets with sucrose or glucose. Arch. oral Biol. 10 : 223, 1965.
 - 3) Krasse, B., Edwardsson, S., Svensson, I. and Trell, L. : Implantation of caries-inducing streptococci in the human oral cavity. Arch. oral Biol. 12 : 231, 1967.
 - 4) van Houte, J., Upeslakis, V.N., Jordan, H.V., Skobe, Z. and Green, D.B. : Role of sucrose in colonization of *Streptococcus mutans* in conventional sprague-dawley rats. J. dent. Res. 55 : 202, 1976.
 - 5) Gibbons, R.J. and van Houte, J. : On the formation of dental plaques. J. Periodontol. 44 : 347, 1973.
 - 6) Guggenheim, B. and Schroeder, H.E. : Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. Helv. odont. Acta. 11 : 131, 1967.
 - 7) 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, 1968.
 - 8) 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. 16 : 971, 1971.
 - 9) 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, 1974.
 - 10) 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, 1967.
 - 11) Guggenheim, B. and Newbrun, E. : Extracellular glucosyltransferase activity of an HS strain of *Streptococcus mutans*. Helv. odont. Acta. 13 : 84, 1969.
 - 12) 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, 1969.
 - 13) Newbrun, E. : Extracellular polysaccharide synthesized by glucosyltransferases of oral streptococci. Caries Res. 6 : 132, 1972.
 - 14) Gibbons, R.J. and van Houte, J. : Bacterial adherence in oral microbial ecology. A. Rev. Microbiol. 29 : 19, 1975.
 - 15) Newbrun, E., Finzen, F. and Sharma, M. : Inhibition of adherence of *Streptococcus mutans* to glass surfaces. Caries Res. 11 : 153, 1977.
 - 16) Mukasa, H. and Slade, H.D. : Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. I. Roles of insoluble dextran-levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. Infect. Immun. 8 : 555, 1973.
 - 17) Mukasa, H. and Slade, H.D. : Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. 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, 1974.
 - 18) Clark, W., Gibbons, R.J. and Skobe, Z. : Studies of the attachment of *Streptococcus mutans* to apatite surfaces. Meet. IADR, 52nd. 749 (Abstr.) : 242, 1974.
 - 19) van Houte, J. and Upeslakis, V.N. : Role of sucrose in the colonization of *S. mutans* on teeth in the rat. Meet. IADR, 52nd. 751 (Abstr.) : 242, 1974.
 - 20) van Houte, J. and Upeslakis, V.N. : Studies of the mechanism of sucrose-associated colonization of *Streptococcus mutans* on teeth of conventional rats. J. dent. Res. 55 : 216, 1976.
 - 21) Higuchi, M., Endo, K., Hoshino, E. and Araya, S. : Preferential induction of rough variants in *Streptococcus mutans* by ethidium bromide. J. dent. Res. 52 : 1070, 1973.
 - 22) 今井 奨, 西沢俊樹, 荒谷真平 : *Streptococcus mutans* の滑面への付着性, 歯基礎誌 17 : 481,

- 1975.
- 23) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28 : 350, 1956.
 - 24) 藤林園子 : 過ヨウ素酸酸化, 生物化学実験法 XI, 糖質実験法, 138 頁, 共立出版, 東京, 1968.
 - 25) Nisizawa, T., Imai, S., Akada, H., Hinoide, M. and Araya, S. : Extracellular glucans produced by oral streptococci. *Arch. oral Biol.* 21 : 207, 1976.
 - 26) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193 : 265, 1951.
 - 27) Imai, K., Kobayashi, M. and Matsuda, K. : Properties of an α -1, 3-glucanase from *Streptomyces* sp. KI-8. : *Agric. Biol. Chem.* 41 : 1889, 1977.
 - 28) Nelson, N. : A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem.* 153 : 375, 1944.
 - 29) Somogyi, M. : Notes on sugar determination. *J. biol. Chem.* 195 : 19, 1952.
 - 30) 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, 1972.
 - 31) 上出正幸, 竹内精司, 野口俊英, 今井 奨, 西沢俊樹 : *Streptococcus mutans* strain PK 1 の菌体外多糖合成に及ぼす dextranase の影響. *口病誌*, 42 : 252, 1975.
 - 32) Schachtele, C.F., Staat, R.H. and Harlander, S.K. : Dextranases from oral bacteria : Inhibition of water-insoluble glucan production and adherence to smooth surfaces by *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 12 : 309, 1975.
 - 33) Koga, T. and Inoue, M. : Glucan production in the presence of dextranase. 第 25 回 IADR 日本部会 48 (Abstr.), 1977.
 - 34) 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, 1974.