Streptococcus mutans JC 2 の形態検索

西 原 圓一朗

国立予防衛生研究所歯科衛生部

(昭和57年12月16日受付)

Morphological Survey of *Strep mutans* JC 2

En-ichiro NISHIHARA

Department of Dental Research, National Institute of Health,
Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan

Microorganisms present in the lesions of human oral cavity show varying kinds of morphological characteristics. The present survey was made in an attempt to find out a clue for the differentiation of bacterial life cycles based on these morphological characteristics.

Employing *Strep mutans* JC 2, which is one of the microorganisms prevalent in the human oral cavity, its morphological changes were observed under the following 3 different consecutive conditions. As the result of optical density determination and translucent electronmicroscopic observation, characteristic morphological changes were observed as shown in the following :

1) In BHI broth, when the optical density showed

Key words: Morphological survey, *Strep. mutans* JC 2, Optical density, Translucent electronmicroscop, Sterile water

要旨: ヒト口腔病巣内で、様々な形態を示している細菌像のライフサイクルを識別する1つの手がかりとして、次の検索を試みた。すなわち、ヒト口腔細菌のひとつである *Strep. mutans* JC 2 を、下記の連続した状況下で、吸光度測定と透過電顕観察を行い、次の事を確認した。

1. BHI 培地中の場合・吸光度が増殖期の時に、細胞壁外方に小楕円形状の突起をもつ菌が認められる。また、静止期の略中央時、すでに崩壊傾向をもつ多数の菌が認められる。

2. BHI 後、滅菌水に投入した場合・増殖期の菌を滅菌水に投入すると、直ちに増殖能を停止し、崩壊傾向の形態を示す。

3. 滅菌水に入れた後、再び BHI 培地に入れた場合・増殖能を停止した菌は、吸光度が死滅期を示していなければ、再び培地に入れる事により、増殖の形態をとる。

索引用語: 形態検索, ストレプトコッカスミュータンス JC 2, 吸光度, 透過電顕, 滅菌水

the bacterial growth of logarithmic phase, the microorganisms were found to have blebs on the surface of bacterial cell walls, while at the time in the middle of the bacterial growth of stationary phase, numerous microorganisms already showed a tendency to autolysis.

2) When suspended in sterile water after cultivation in BHI broth, the bacterial cells in logarithmic phase immediately discontinued the growth and showed a tendency to autolysis.

3) When restored to BHI broth after suspending in sterile water, the bacterial cells once discontinued to grow began to proliferate if their optical density was not showing decreasing phase.

はじめに

ヒト口腔内で、細菌感染病巣における疾病状況を明確に知るためには、病巣中で様々な像をしている細菌¹⁻⁶⁾の中から、主因と目指される菌体のライフ・サイクルを形態的に識別する事が望ましい。しかし、単離した口腔細菌の経時的な形態変化を観察した例すら見あたらない様である。そこでこの報告は、ヒト口腔細菌のひとつである *Strep mutans* JC 2 を使い、一定培地中での経時的变化と、一度自己分解傾向におちいった菌が、再び増殖能を回復して行く経過を、透過電顕で検索する事を試みたものである。

材料と方法

Brain Heart Infusion 液体培地 (BHI・日水製薬) に *Strep mutans* JC 2 (東北大・口腔生化より分与) を接種し、その培地濁度の吸光度測定 (日立-EPO-B 型光電比色計) を行った。これにもとづき、発育曲線 (図 1) を描き、各移行期 (増殖期、静止期、死滅期、その他) から任意に一点を選び、透過電顕 (HS-8) 観察に供した。

(1) 吸光度測定 下記の 3 つの目的を選定し、測定を行った。すなわち、1. 菌の生活活性の推移を知るための経時変化 (第 1 群)。2. 菌の変性死滅を促進した場合

(第 2 群)。3. 一度自己分解傾向におちいった菌の活性回復を知る場合 (第 3 群)。である。各測定値は 5 本の小試験管で行った平均値であり、原点修正用には培地のみの小試験管を測定した。方法および状況 (図 1) は次の通りである。

第 1 群：培地が 1/2 容量入った小試験管に、菌接種後、ゴム栓をした。この試験管を 37°C に保って、8 時間経過する間は 1 乃至 2 時間毎に測定、以後 24 時間経過迄は 8 時間毎、24 時間以後は 24 または 48 時間毎に測定し、全体では 384 時間にわたり測定した。菌は培養 4 時間以後、7 時間までは急速に増量するが、以後静止し、48 時間以後徐々に自己分解する。第 2 群：培地で 6 時間、菌を培養後、遠沈 (3,000 r/min) 集菌して培地を捨て、捨てた培地と同量の滅菌脱イオン水を加えて 37°C に保ち、第 1 群と同様に測定を行った。滅菌水中では静止期間が短かく、測定が殆んど不可能で、18 時間後には急速に変性死滅に入る。第 3 群：第 2 群で菌を滅菌水に入れて 18 時間後および 354 時間後に、遠沈集菌して上清の滅菌水を同量の BHI 培地と入れかえ、37°C に保ち、菌の再培養をはかり、各々の吸光度測定を継続した。滅菌水 18 時間例の菌は再度急速な増殖を営むが、354 時間例の菌には殆んど変化が見られない。

(2) 透過電顕観察 吸光度測定の結果にもとづき、次の各時点の試料を透過電顕で観察した (図 1★)。

第 1 群：6 時間 (増殖期)、24 時間 (静止期)、360 時間 (死滅期) 培養の試料。第 2 群：6 時間培養した菌

図 1 *Strep mutans* JC 2 の吸光度曲線

図 2 BHI 6 時間例

Bar : 0.71 μ , 右上 0.24 μ

図 3 BHI 24 時間例

Bar : 0.34 μ , 右上 0.28 μ

を、37°C の滅菌水に浸漬し、18 時間後および 354 時間後の試料（変性期と死滅期）。第 3 群：第 2 群の 2 つの菌をそれぞれ再び 37°C の BHI 培地で 24 時間培養した試料（増殖期と死滅期）。方法：各群とも 3,000 r/min で遠沈集菌し、pH 7.4 の 0.1M 磷酸緩衝液と 6% デキストラン糖注射液を加えた 2% グルタル・アルデヒドで 1 時間固定、その後、pH 7.4 の 0.2M S-Collidin 緩衝液と 6% デキストラン糖注射液を加えた 1% オスミウム酸で 1 時間、後固定し、アセトン脱水後、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作製した。切片は酢酸ウラニール、次いで鉛で染色し、鏡検した。

結 果

第 1 群：BHI 培養中の経時変化

1-1. 6 時間例 細胞壁は一般に平滑であるが、菌体分裂の程度如何にかかわらず、2% 位の割合で外方に 1 乃至 2 個の小楕円状の突起を認めた。細胞質膜は平滑であり、菌体を略 2 分する隔壁を作っているものが多数見られる。メゾゾームは渦巻状、鎖状、波状などの形態をとる。1 つの菌体で隔壁形成部と、形成部以外のところに同時にメゾゾームを認めるものもかなり存在する。原形質の変調は認められない。菌体間部分は殆んど空虚であ

り、少量の電子密度の低い絮状の物質を散在させるにすぎない。（図 2）。

1-2. 24 時間例 6 時間例にくらべ細胞壁は不明瞭となり、かつ部分的に消失している。また、細胞壁の突出も観察困難となる。細胞質膜は大小の皺壁を現わし、細胞壁消失部で皺壁が小隆起状に突出しているものが認められる。時には、細胞壁と共に細胞質膜が消失し、原形質が外部に露出していることがある。隔壁形成を認めるものは少なく、隔壁形成があるものでもメゾゾームは殆んど見出されない。少数例の菌体内部は、原形質の消失後、変形した細胞質膜のみとなっている。（図 3）。

1-3. 360 時間例 細胞壁は大部分消失し、菌体外形は残存した細胞質膜のみで限られていたり、細胞壁と細胞質膜の両方が消失し原形質の露出している例が多くみられる。原形質は破壊されて粒状になり、電子密度を低下し、しばしば細胞質直下の各所に集団を作って集まり、菌体中央部に不規則な明るい部分がみられる。一方、細胞質膜のみが残存しているものも認められる。菌体間には菌体より排出された原形質崩壊片が粒状をなして分布し、時には規則的格子配列をなしているのを見出す。（図 4）。

図 4 BHI 360 時間例
Bar : 0.44 μ , 右上 0.38 μ

図 6 BHI 6 時間後, 滅菌水 354 時間例
Bar : 0.48 μ

第 2 群 : BHI 培地 6 間培養菌の滅菌水中における経時変化

2-1. 18 時間後の例 細胞壁は不明瞭で, 細胞質膜は多数の小皺壁を示す。隔壁形成の顕著なものは少ないが, 同一菌体中にメソゾームが形成中のものと崩壊中の

図 5 BHI 6 時間後, 滅菌水 18 時間例
Bar : 左 0.26 μ , 右 0.32 μ

ものとを, 同時に含んでいる菌体も見られる。菌体内部は電子密度を減じ, 疎な構造に変化しているものが多い。変化のはげしい菌体は, フィラメント状物質を菌体外に伸び出している。菌体間には, 上記のフィラメント様物のほか, 電子密度の高い塵状物を見出すものがある。(図 5)。

2-2. 354 時間後の例 細胞壁は殆んど失われ, 細胞質膜とメソゾームも共に不明瞭なものが多い。隔壁形成部分は明らかではないが, 分裂の途中から直ちに崩壊の方向に入ったことを思わせる所見に接することもある。原形質は粒状に破壊されて不規則な集塊を作り, 一部では, 原形質の消失により殆んど細胞質膜のみとなっているものも認められる。菌体間には, 崩壊した原形質に由来すると思われるフィラメント様, 粒状ないし様々の塵状物が多数存在する。(図 6)。

第 3 群 : 滅菌水に入れた菌を BHI 培地で 24 時間再培養したもの

3-1. 滅菌水 18 時間例 細胞壁および細胞質膜が平滑で比較的明瞭な菌と, それらが不明瞭で原形質の崩壊をともなっている菌が混在している。前者では, 原形質が全体に疎となり, 網模様を呈している。分裂中の菌は所々に認められるが, メソゾームは概して不明である。菌体間には相当量の原形質崩壊片が分散し, 各所でこれらが規則的格子様配列をとっているのが注目される。(図 7)。

3-2. 滅菌水 354 時間例 いちじるしく破壊された菌体のほか, 比較的崩壊の少ない菌体も見られる。しか

図 7 BHI 6 時間後、滅菌水 18 時間例を更に BHI 24 時間培養した例
Bar : 0.26 μ

図 8 BHI 6 時間後、滅菌水 354 時間例を更に BHI 24 時間培養した例
Bar : 0.40 μ

表 1 *Strep mutans* JC 2 の透過電顕所見

部 位	群	経 過 時 間				
		6	24	48	360	384
菌 体	細胞壁	1	+	±~=-		-~=-
		2		±~-		-~=-
		3			卅~±	±~-
	細胞質膜	1	+	+~-		+~-
		2		+~-		+~-
		3			+~±	+~-
	隔壁形成	1	卅	±		-
		2		±		-
		3			+~±	±
菌 体 間	メゾゾーム	1	卅	-		-
		2		+~-		-
		3			±~-	±~-
	原形質	1	+	+~-		-~=-
		2		+~-		-~=-
		3			+~-	+~=-
	菌体間介在物	1	±	+~±		卅
		2		卅~+		卅
		3			卅~卅	卅
記号	= - ± + 卅 卅					
程度	高度消失 消失 不明瞭 中等度 明瞭 顕著					

1 (群) : BHI 培地
2 : BHI 6 時間後滅菌水
3 : 滅菌水後再び BHI 24 時間

し、崩壊の少ないものでも、細胞壁および細胞質膜は不明のものが多い。菌体内部の崩壊の程度の著しいものでは、原形質が網様に変化し、殆んどその原型を止めていない。菌体間には、菌体の崩壊産物と思われる小胞状、および顆粒状物が散在している。(図 8)。

以上の結果を総括すると表 1 の様になる。

考 案

BHI 培養例について 6 時間例の像中、全菌体の 2 % 程度に細胞壁より外方に、1 乃至 2 個の小楕円状の突起を認めた。これと同じ様な形をしたものは、in vivo では、歯苔形成 2 乃至 3 日目の球菌細胞壁上ならびに菌体間部分に多数の小胞として¹⁾、また in vitro では、*Strep mutans* 以外の菌にも⁷⁻¹²⁾ 各々認められている。この様な突起が多数認められるのは、培地温度の上昇^{11, 12)} や、

抗生物質投与⁹⁾ などの場合である。しかし、この突起の出現は、温度上昇などによる菌体崩壊の表われではなく¹²⁻¹⁵⁾、今回の実験でも増殖期のみに認められたにすぎない。一方、この突起は、 Mg^{2+} の投与¹²⁾ や低温^{11, 12)} では認めにくいと云われている。また、その派生表現も outer membrane のもの^{1, 7, 11, 12)}、細胞壁の outer layer のもの^{8, 15)}、菌体の outer surface のもの^{9, 10)} とまちまちである。今回の実験で見られたものは、membrane 様の組織構造^{1, 12, 15)} は認められず、また、この突起は比較的低温ではあるが、通常の割合で出現した細胞壁での代謝異常のひとつと思われる。

24 時間培養例で見られた細胞質膜の皺壁化は、細胞質膜内の成分の欠乏¹⁶⁾ により起った為と思われる。そして、局所的に外周が不規則な波形を示している一方、原形質の外露露出を認める所もある事から、この皺壁化は、菌体崩壊の前駆をなしているものと考えられる。吸光度測定では、静止期の略中央であるが、菌体はすでに崩壊傾向にあるものが多い。

360 時間例でみられた菌体間の規則的格子配列像は、BHI 6 時間後滅菌水に 18 時間入れ、そのあと再び BHI 24 時間培養した例においても認められる。この様な形をしたものは、菌体内¹⁷⁾ のみならず、菌体表面^{18, 19)} にも多く認められるので、これらが菌の崩壊により、菌体より流出したものが、もととなっているのではないかと思われる。

滅菌水に投入した例について この場合には、吸光度測定で静止期を殆んど認めず、大多数のものがそれ迄の増殖性変化を、その儘の状態で停止し、直ちに崩壊性の変化に移行した事を示しているものと思われる。この事は次の事から明らかと思われる。すなわち、滅菌水 18 時間例でメソゾームが一部で残存しながら、同時に他の部分で崩壊性の変化を示すものが見られた事や、滅菌水 354 時間例で隔壁形成の分裂途中から、崩壊の方向に入ったことを思わせる所見をみた事などからである。また、この様な傾向は、水で洗浄後かきとった猿の歯苔に於ても²⁰⁾ 認められている。

BHI 6 時間培養した菌を、滅菌水に入れた後、再び BHI で培養した例について

滅菌水 18 時間例では、形態的にはかなり崩壊が進んでいるが、増殖能を有する菌の残存が、吸光度ならびに電顕像の両方から認められた。一方、滅菌水 354 時間例では更に崩壊がひどく、吸光度は完全に死滅期を示し、増殖能の回復は不可能である。また、電顕像にも増殖能のある様な菌体は見あたらなかった。しかし、滅菌水

354 時間後 2 時間にわたり吸光度の増加が認められた。この理由は、今回の電顕像からは分らなかった。

結 論

ヒト口腔病巣内の細菌は、種々様々な形態像を示している。これらの像から、菌のライフサイクルを識別する手がかりのひとつとして、この検索を試みた。すなわち、ヒト口腔細菌のひとつである *Strep mutans* JC 2 は、下記の連続した 3 つの状況下で、どの様に変化するかを観察した。そして、吸光度測定と透過電顕観察の双方から次の特色が得られた。

1. BHI 培地中の (状況下の) 場合

吸光度が増殖期の時に、細胞壁外方に小楕円形状の突起をもつ菌が認められる。また、静止期の略中央時、すでに崩壊傾向をもつ多数の菌が認められる。

2. BHI 培地後、滅菌水に投入した場合

増殖期の菌を滅菌水に投入すると、直ちに増殖能を停止し、崩壊傾向の形態を示す。

3. 滅菌水に入れた後、再び BHI 培地に入れた場合

増殖能を停止した菌は、吸光度が死滅期を示していなければ、再び培地に入れる事により、増殖の形態をとる。

御助言頂いた東京歯科大学第 1 病理田熊教授に感謝致します。

文 献

- 1) Frank, R.M. and Houver, G.: An Ultrastructural Study of Human Supragingival Dental Plaque Formation. in Dental Plaque, Ed. W.D. McHugh, E & S Livingstone, Edinburgh, 1970, 85-108.
- 2) Rateitschak-Plüss, E.M., Scherle, W. and Schroeder, H.E.: Die Wurzeloberfläche bei progressiver Parodontitis. Schweiz. Mschr. Zahnheilk., 91: 538-549, 1981.
- 3) 西原圓一朗, 田熊庄三郎: 歯苔ならびにほうろう質齲蝕歯巣の電子顕微鏡観察・う蝕総合研究班会議々事録, 2: 14, 1972.
- 4) Lilja, J., Nordenvall, K.-J. and Brännström, M.: Dentin sensitivity, odontoblasts and nerves under desiccated oi infected experimental cavities A clinical, light microscopic and

- ultrastructural investigation. *Swed. Dent. J.*, 6 : 93-103, 1982.
- 5) Frank, R.M. : Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. *J. Periodontal. Res.*, 15 : 563-573, 1980.
 - 6) Saglie, R., Newman, M.G., Carranza, F.A. Jr. and Pattison, G.L. : Bacterial Invasion of Gingiva in Advanced Periodontitis in Humans. *J. Periodontol.*, 53 (4) : 217-222, 1982.
 - 7) Burdett, I.D.J. and Murray, R.G.E. : Electron Microscope Study of Septum Formation in *Escherichia coli* Strains B and B/r During Synchronous Growth. *J. Bacteriol.*, 19 (3) : 1039-1056, 1974.
 - 8) Koike, M., Iida, K. and Matsuo, T. : Electron Microscopic Studies on Mode of Action of Polymyxin. *J. Bacteriol.*, 97(1) : 448-452, 1969.
 - 9) Lai, C-H., Listgarten, M.A. and Hammond, B. F. : Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal. Res.*, 16 : 379-389, 1981.
 - 10) Lai, C-H. and Listgarten, M.A. : Immunological labeling of oral bacteria after demineralization An ultrastructural study. *J. Periodontal. Res.*, 16 : 266-274, 1981.
 - 11) Fung, J.C., MacAlister, T.J., Weigand, R.A. and Rothfield, L.I. : Morphogenesis of the Bacterial Division Septum : Identification of Potential Sites of Division in lky D Mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 143 (2) : 1019-1024, 1980.
 - 12) Katsui, N., Tsuchido, T., Hiramatsu, R., Fujikawa, S., Takano, M. and Shibasaki, I. : Heat-Induced Blebbing and Vasiculation of the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 151 (3) : 1523-1531, 1982.
 - 13) Schie, P. and Ehrenspeck, S. : Large Surface Blebs on *Escherichia coli* Heated to Inactivating Temperatures. *J. Bacteriol.*, 114 (2) : 814-818, 1973.
 - 14) Hitchener, B. and Egan, A.F. : Outer-membrane damage in sublethally heated *Escherichia coli* K-12. *Can. J. Microbiol.*, 23 : 311-318, 1977.
 - 15) de Petris, S. : Ultrastructure of the cell wall of *Escherichia coli* and chemical nature of its constituent layers. *J. Ultrastruct. Res.*, 19 : 45-83, 1967.
 - 16) Lounatmaa, K. : Ultrastructure of the Outer Membrane of *Salmonella typhimurium* Bacteriocin-Resistant Mutants Deficient in the 33 K Protein. *J. Bacteriol.*, 139 (2) : 646-651, 1979.
 - 17) Bradley, D.E. : Small Arrays of Electron-Dense Cylinders in *Escherichia coli* Cells. *J. Bacteriol.*, 139 (3) : 1049-1053, 1979.
 - 18) Stewart, M. and Beveridge, T.J. : Structure of the Regular Surface Layer of *Sporosarcina ureae*. *J. Bacteriol.*, 142 (3) : 302-309, 1980.
 - 19) Stewart, M. and Marray, R.G.E. : Structure of the Regular Surface Layer of *Aquaspirillum serpens* MW 5. *J. Bacteriol.*, 150 (1) : 348-357, 1982.
 - 20) Brady, J.M., Gray, W.A. and Bhaskas, S.N. : Electron Microscopic Study of the Effect of Water Jet Lavage Devices on Dental Plaque. *J. Dent. Res.*, 52 (6) : 1310-1313, 1973.