

Streptococcus mutans 分離培地の検討

本田 寿子 金子 克

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座* (主任: 金子 克教授)

[受付: 1981年6月2日]

抄録: Streptococcus mutans (以下 S. mutans と略す) の分離を確実にそして迅速にできる培地を得る目的で Linke³⁾ の MSFA 培地の改良を試み, これを成人, 小児の歯垢からの分離に応用し, 次の成績を得た。

1) MSFA 培地では歯垢からの分離培養が困難であったが, tryptone を添加することにより S. mutans のコロニーを他の口腔レンサ球菌の中から明瞭に識別できるようになった。

2) MSFA 培地組成中の窒素源である yeast extract を 5 g/1000ml にし, tryptone 15 g/1000ml を加えた MSFA 変法培地では S. mutans はピンクないし赤色の特徴あるコロニーとして観察された。

3) Gold 培地, MSFA 培地, MSFA 変法培地の 3 培地を使用して, 歯垢から S. mutans の分離を試みたが MSFA 変法培地は, MSFA 培地, Gold 培地に比較して 10~19% 高い分離率を示した。

4) Gold 培地, MSFA 培地, MSFA 変法培地の 3 培地で分離した S. mutans を biotype に分類すると Gold 培地由来分離菌株では C 型のみで, a 型, b 型はみられなかった。MSFA 培地では a 型 5 株 (3%), b 型 1 株 (0.6%) が分離された。また, MSFA 変法培地では, a 型 22 株 (12.2%), b 型 11 株 (6.1%) が分離された。

S. mutans 分離に際し, MSFA 変法培地を用いると型に偏りなく分離でき, S. mutans について疫学的にさらに詳しく検討しうる可能性をみい出した。

結 言

S. mutant はう蝕原性細菌の一つとして知られており, その分離方法が多くの研究者によって検討されてきた。現在のところ, 1946年 Chapman¹⁾ が発表した Mitis Salivarius agar (以下 MS 培地と略す) と 1973年 Gold²⁾ らがそれを改良した Gold 培地が広く使われている。しかし MS 培地, Gold 培地では S. mutans 以外の口腔レンサ球菌も発育し, そのコロニーは S. mutans のコロニーと類似しているために, しばしば両者の識別が困難な場合がある。こうしたことから容易にしかも確実に S. mutans の分離ができる培地が望まれていたが, 1977年 Linke³⁾ は S. mutans の分離培地として MSFA 培地を発表した。この MSFA 培地で

は S. mutans のコロニーはピンクや赤色の特異な色調を示すので他の口腔レンサ球菌からの識別が可能になった。しかしながら, Linke は S. mutans と他の口腔レンサ球菌の標準株についての検討のみで終っており, 臨床材料からの分離については報告していない。我々は MSFA 培地について標準株はもとより臨床材料を用いて検討した結果, この培地を改良して MSFA 変法培地をつくり, さらに Gold 培地, MSFA 培地, MSFA 変法培地を用いて成人歯垢, およびう蝕のある小児の歯垢から S. mutans の分離を試み, 比較検討したので報告する。

材 料 と 方 法

1. 使用菌株: S. mutans E49 (group a),

Investigation on selective media of streptococcus mutans

Hisako HONDA and Masaru KANEKO

(Department of Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020)

*岩手県盛岡市中央通 1 丁目 3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 6 : 98-104, 1981

Fa-1 (group b), GS-5 (group c), 6715 (group d), LM 7 (group e), S. sanguis ATCC 10556, S. salivarius ATCC 9759, S. mitis ATCC 9811, S. mutans 分離保存菌株 MS 1753, MS 1198の計10株。

2. 材料：健康な成人4名の歯垢(大白歯, 頰側面) 4検体, 本学小児歯科外来を訪れたう蝕患児(1~5才)の歯垢(臼歯, 頰側面) 18検体, 計22検体。

3. 培地：Trypticase soy broth (以下 TS broth と略す), Gold 培地 (MS 培地+15% sucrose +0.2 unit bacitracin/ml), MSFA 培地 (yeast extract 20 g, NaN₂ 0.1 g, CaCO₃ 10 g, basic fuchsin 0.05 g, D-mannit 10 g D-sorbit 10 g, agar 12 g, 精製水 1000ml), MSFA 変法培地 (yeast extract 5 g, tryptone 15 g, NaN₂ 0.1 g, CaCO₃ 10 g, basic fuchsin 0.05 g, D-mannit 20 g, D-sorbit 20 g, agar 12 g, 精製水1000 ml), 糖分解用基礎培地 (beaf extract 1 g, proteose peptone No. 3 10g Nacl 5 g, phenol red 0.018 g, 精製水1000ml), Arginine 培地 (tryptone 5 g, yeast extract 10 g, K₂HPO₄ 2 g, glucose 5 g, arginine 3 g, 精製水1000ml), Esculine 培地 (casein 30g yeast extract 10g, esculine 5 g, ferric ammonium citrate 0.5g, 精製水 1000ml) 希釈液 (M/15 phosphate buffer saline, 以下 PBS と略す)。

4. 培養：すべて Gas Pak 法を用い, 37°C で嫌気性培養を行なった。

5. 生物学的性状検査：コロニーの性状— S. mutans 標準株は TS broth で前培養したものを PBS で10⁻³, 10⁻⁴に希釈し, その0.1ml を Gold 培地, MSFA 培地, MSFA 変法培地に接種した。歯垢は TS broth 2 ml に採取し, vibrater (テーハー製)を用い20秒間混合したものを PBS で10⁻², 10⁻³に希釈して, その0.1ml を各培地に接種し, いづれも48時間培養後, 実体顕微鏡を用い, コロニーを観察した。糖分解性—糖分解用基礎培地に milipore filter

を用い, ろ過滅菌した糖類 (mannit, sorbit, raffinose, melibiose) を1%加えて用い, 前培養液を接種し, 5日間培養後に判定した。

mannit-bacitracin 試験 (Shklair の biotype 同定用)—2 unit bacitracin/ml を加えた mannit 分解用培地に前培養液を接種, 5日間培養後に判定した。Arginine の加水分解性—Arginine 培地に前培養菌を接種し, 48時間培養後, ネスラー試薬0.1ml 滴下して判定した。Esculine 水解試験—Esculine 培地に前培養液を接種し, 7日間培養後に判定した。

実験成績

1. MSFA 培地における S. mutans と他の口腔レンサ球菌のコロニーの性状

S. sanguis, S. salivarius, S. mitis のコロニーは菲薄で色は不透明なかつ色であった。一方, S. mutans のコロニーはもりあがり, 水滴様の光沢を示し, 色はピンクとなり S. sanguis, S. salivarius, S. mitis とは全く異なった性状のコロニーとして観察された(表1)。コロニーのこのような特徴は48時間培養では不充分で, 72時間培養後に明瞭になった。しかし, S. mutans E49 (group a) は時間の経過とともに培地, コロニーともに退色し, 特徴的だっ

表1 MSFA 培地, MSFA 変法培地上での口腔レンサ球菌のコロニーの性状

供試菌	MSFA 培地	MSFA 変法培地
S. mutans	辺縁不規則, たかくもりあがり水滴様光沢あり, 表面はイチゴ様あるいは八重の花びら様不透明, かつ色, ピンク	⇒ 形態は MSFA 培地に同じ, ピンクや赤色
S. sanguis	菲薄, 表面いく分しわ状不透明, かつ色	⇒ MSFA 培地に同じ
S. salivarius	大きめなコロニー, 扁平, 表面はなめらか不透明, かつ色	
S. mitis	菲薄不透明, かつ色	

た色調も消失するため *S. sanguis* との識別が難しくなる。次に *S. mutans* とその他の口腔レンサ球菌を混合培養し、培地上での *S. mutans* のコロニーの識別を試みたところ、培地、コロニーともに退色し易く、*S. mutans* の特徴的だったコロニーの色調も消失した。

2. MSFA 培地の改良

MSFA 培地上での *S. mutans* の特徴あるコロニーを保つために、退色の欠点を改良する試みを行なった。表2は Linke の発表した MSFA 培地の組成であるが、ここでは yeast extract が唯一の有機栄養源になっている。これに tryptone 10g/1000ml を加え、MSFA 変法培地として *S. mutans* と他の口腔レンサ球菌を培養した(表1)。MSFA 変法培地上での *S. mutans* のコロニー形態は MSFA 培地と

表2 MSFA 培地 (原法)

Yeast extract	20.0(g)
NaN ₂	0.1
CaCO ₃	10.0
Basic fuchsin	0.05
D-mannit	10.0
D-sorbit	10.0
Agar	12.0
distilled water	1000 (ml)

(pH 7.0)

同様で、コロニーの色はピンクから赤色となった。MSFA 培地で退色した *S. mutans* E49 (group a) の場合にもコロニー形態、色調ともに *S. mutans* の特徴が保たれていた。一方、*S. mutans* と他の口腔レンサ球菌の混合培養でも培地、コロニーの退色はみられず、この結果から tryptone 添加によって MSFA 培地が改

表3 MSFA 変法培地中の Yeast extract, Tryptone 量の検討と *S. mutans* のコロニーの性状

培地	検体	S. mutans E49	S. mutans 6715	Sample A	Sample B	Sample C
原法	Y-20(g) T-0	八重の花びら様にたかくもりあがり、水滴様の光沢 薄いピンクや黄色	たかくもりあがり、水滴様の光沢 薄いピンク	形態は <i>S. mutans</i> 様、培地全体が黄変 不透明、かっ色		
I	Y-20 T-10	形態は原法に同じ ピ ン ク		ピ ン ク	形態は <i>S. mutans</i> 様 薄いピンク	
II	Y-20 T-5	培地、コロニーとも乳白色 識別困難				
III	Y-10 T-10	形態は原法に同じ ピ ン ク		ピ ン ク	形態は <i>S. mutans</i> 様 薄いピンク	
IV	Y-5 T-15	形態は原法に同じ 濃いピンク		形態は <i>S. mutans</i> 様 赤 色		
V	Y-5 T-5	微少なコロニーあるいは発育なし				
VI	Y-0 T-20	識別不可能				

Y : Yeast extract

T : Tryptone

基礎培地	NaN ₂	0.1(g)	D-mannit	20.0	基礎培地に Yeast extract, Tryptone 量を変えて加えた。
	CaCO ₃	10.0	D-sorbit	20.0	
	Basic fuchsin		Agar	12.0	
		0.05	distilled water	1000 (ml)	

良された事が明らかである。次に, tryptone の添加と yeast extract との量的比率について検討した。他の成分 (NaN₂, CaCO₃, basic fuchsin, agar) はそのままの量とし, 糖分解による酸産生量を多くする目的で D-mannit, D-sorbit 10g を 20g に増量した。これを基礎にし, yeast extract と tryptone の量を変えた 6 種類の培地をつくった。この培地に *S. mutans* 標準株と患者歯垢 3 例を培養し, そのコロニーを比較観察した (表 3)。yeast extract, tryptone をそれぞれ 5g/1000ml 含む培地 V でコロニーの発育が非常に悪く, また yeast extract を含まず tryptone のみの培地 VI では菌は発育しなかった。yeast extract 5g, tryptone 15g の培地 IV で最も特異的な色調をもったコロニーが観察されたので, この培地を MSFA 変法培地とした (表 4)。

3. 各分離培地における *S. mutans* の発育

Gold 培地, MSFA 培地, MSFA 変法培地における *S. mutans* の発育は Gold 培地で $4.2 \times 10^8 \sim 2.3 \times 10^9$ c. f. u., MSFA 培地で $6.3 \times 10^8 \sim 3.3 \times 10^9$ c. f. u., MSFA 変法培地で $8.2 \times 10^8 \sim 3.7 \times 10^9$ c. f. u. となり Gold 培地でやや発育が抑制され, MSFA 培地, MSFA 変法培地では良好な発育を示した (表 5)。

4. Gold 培地, MSFA 培地, MSFA 変法培地による臨床材料からの *S. mutans* の分離

表 4 MSFA 変法培地

Yeast extract	5.0 (g)
Tryptone	15.0
NaN ₂	0.1
CaCO ₃	10.0
Basic fuchsin	0.05
D-mannit	20.0
D-sorbit	20.0
Agar	12.0
distilled water	1000 (ml)

(pH 7.0)

分離の確実さを比較するために Gold 培地, MSFA 培地, MSFA 変法培地に同一の歯垢を培養し, それぞれの培地に発育したコロニーの中で形態, 色調から *S. mutans* と識別し得るコロニー 10ヶを釣菌し, 生化学的性状による同定を行なった⁴⁾。この識別と同定の一致率をみると (表 6), Gold 培地では 81%, MSFA 培地では 90%, MSFA 変法培地では 100% の一致率であった。次にこの 3 種類の培地で分離した 487 菌株を Shklair⁵⁾ の分類に基づいて biotype に型別してみると (表 7), Gold 培地で分離した 145 株は d 型 2 株 (1.4%) のほかはすべて c 型 143 株 (98.6%) で a 型, b 型, e 型は分離されなかった。MSFA 培地では 162 株中, a 型 5 株 (3.0%), b 型 1 株 (0.6%), c 型 56 株 (96.3%) であった。MSFA 変法培地で分離された 180 株では a 型 22 株 (12.2%), b 型 11 株 (6.1%),

表 5 各分離培地における *S. mutans* の発育

供試菌株	分離培地	Gold 培地	MSFA 培地	
			原 法	変 法
標準株	E49 (a)	2.3×10^9 c. f. u. ※	3.3×10^9 c. f. u.	3.7×10^9 c. f. u.
	Fa-1 (b)	1.2×10^9	2.0×10^9	2.0×10^9
	GS-5 (c)	4.2×10^8	6.3×10^8	8.2×10^8
	6715 (d)	6.3×10^8	7.7×10^8	8.7×10^8
	LM 7 (e)	9.0×10^8	1.4×10^9	2.2×10^9
分離株	MS 1753	7.4×10^8	1.2×10^9	1.0×10^9
	MS 1198	4.3×10^8	6.7×10^8	1.3×10^9
		$4.2 \times 10^8 \sim 2.3 \times 10^9$	$6.3 \times 10^8 \sim 3.3 \times 10^9$	$8.2 \times 10^8 \sim 3.7 \times 10^9$

※ c. f. u. : colony forming unit/ml
() : 菌型

表6 各分離培地における *S. mutans* の分離率

分離培地 材料 (歯垢)	Gold 培地	MSFA 培地	
		原 法	変 法
1	※ 10/ 10(100%)	10/ 10(100%)	10/ 10(100%)
2	7/ 10(70)	10/ 10(100)	10/ 10(100)
3	6/ 9(67)	7/ 10(70)	10/ 10(100)
4	7/ 10(70)	9/ 10(90)	10/ 10(100)
5	8/ 10(80)	9/ 10(90)	10/ 10(100)
6	8/ 10(80)	9/ 10(90)	10/ 10(100)
7	10/ 10(100)	10/ 10(100)	10/ 10(100)
8	7/ 10(70)	10/ 10(100)	10/ 10(100)
9	10/ 10(100)	9/ 10(90)	10/ 10(100)
10	10/ 10(100)	10/ 10(100)	10/ 10(100)
11	7/ 10(70)	7/ 10(70)	10/ 10(100)
12	7/ 10(70)	8/ 10(80)	10/ 10(100)
13	8/ 10(80)	9/ 10(90)	10/ 10(100)
14	9/ 10(90)	8/ 10(80)	10/ 10(100)
15	9/ 10(90)	9/ 10(90)	10/ 10(100)
16	7/ 10(70)	8/ 10(80)	10/ 10(100)
17	8/ 10(80)	10/ 10(100)	10/ 10(100)
18	7/ 10(70)	9/ 10(90)	10/ 10(100)
計	145/179(81)	162/180(90)	180/180(100)

※ *S. mutans* と同定されたコロニー数
釣菌したコロニー数

表7 歯垢から分離された *S. mutans* 487株の菌型 (Shklair の分類による)

菌 型	培 地 Gold 培地	MSFA 培地	
		原 法	変 法
a	0	5 (3.0)	22 (12.2)
b	0	1 (0.6)	11 (6.1)
c	143 (98.6%)	156 (96.3)	144 (80.0)
d	2 (1.4)	0	3 (1.7)
e	0	0	0
合 計	145	162	180

d型3株 (1.7%), c型144株 (80.0%) で e型は分離されなかった。

考 察

現在, *S. mutans* の分離には Gold 培地が多く用いられているが, Gold 培地上では *S.*

mutans は青色で sucrose 存在下で辺縁が波動的で凸状にもりあがるコロニーとして観察される。しかし *S. sanguis* も sucrose を分解して多糖体をつくるため, *S. mutans* と同様に凸状にもりあがりのあるコロニーを形成する場合があります, 両者の識別が不可能な事がある。

Linke は口腔レンサ球菌の中で *S. mutans* のみが有する mannit, sorbit 分解性に着目し, これによって産生される酸を fuchsin で定性する機序をとり入れた MSFA 培地を考案した。この培地上での *S. mutans* はピンクの特徴的な色調をもつコロニーとして観察され, 他の口腔レンサ球菌からの識別が可能になる事を示した。しかしながら, Linke は *S. mutans* とその他の口腔レンサ球菌の標準株について述べてはいるが, 臨床材料からの分離についてはふれていない。我々は臨床材料からの分離を試みたが Linke の MSFA 培地に歯垢を培養した場合, コロニーの特徴的な色調の消失がみられた。Linke の MSFA 培地の組成をみると有機的栄養源は yeast extract のみである。我々はこれに有機的栄養源として tryptone の添加を試みたところコロニーの特徴的な色調の消失を防ぐことができた。また, その量的検討から MSFA 培地中の yeast extract 20g/1000 ml を 5 g に減量し, mannit, sorbit 量をそれぞれ 10g/1000ml から 20 g に増量するとともに, あらたに tryptone 5g/1000ml を加えた培地を作成して培養を試みた。その結果, 臨床材料(歯垢)からの分離培養にも充分応用できる成績を得たのでこれを MSFA 変法培地とした。

また, Linke は MSFA 培地上で *S. mutans* の分離培養の判定を 1 週間後に行なっているが MSFA 変法培地では培養後 48 時間から 72 時間でピンクや赤色の特徴あるコロニーが観察されるので *S. mutans* の分離が迅速にできる利点がある。

現在, *S. mutans* に関する疫学的研究の報告の多くは c 型が他の型に比し, 優位を占めており, a 型, b 型は非常に低い分離率であるか⁹⁾, 全く検出されないという報告もある^{7,8)}。これ

らの報告の多くは MS 培地,あるいは Gold 培地を使用しており,とくに Gold 培地においては a 型, b 型の発育が抑制されるという報告もある^{10,11,12)}。このように a 型, b 型分離の報告が少ない理由の一つには使用する分離培地自体に問題があるのではないかと考えられる。

S. mutans の分離に際し,容易に S. mutans のコロニーを識別でき,また型に偏りなく分離できる培地を用いることにより S. mutans の疫学的な検討がさらに詳しくできるのではないかと考える。

結 論

確実にそして迅速に S. mutans を分離できる培地を得る目的で Linke の MSFA 培地の検討をし,これを改良した MSFA 変法培地を作製した。この MSFA 変法培地で歯垢からの S. mutans 分離を試み,次の成績を得た。

1. MSFA 培地で歯垢を培養すると菌の発育とともに培地,コロニーが退色し, S. mutans と他の菌を識別する事は困難であった。一方

MSFA 変法培地で歯垢を培養すると退色せず, S. mutans のコロニーはピンクから赤色と一層特徴的なものとなり, S. mutans の分離が容易であった。

2. Gold 培地, MSFA 培地, MSFA 変法培地の各培地で歯垢からの S. mutans の分離を試みたが, MSFA 変法培地では Gold 培地, MSFA 培地に比較して10~19%高い分離率を示した。

3. Gold 培地, MSFA 培地, MSFA 変法培地で分離した S. mutans を biotype に分類すると Gold 培地由来分離菌株には a 型, b 型がみられず, MSFA 変法培地では a 型12.2%, b 型6.1%分離された。

以上の成績から MSFA 変法培地は S. mutans を確実にしかも型に偏りなく分離できるものと考えられる。

稿を終るに当り,材料採取に御協力いただきました本学小児歯科学講座 甘利英一教授に感謝致します。

Abstract : In order to obtain a medium which makes isolation of *S. mutans* easy and secure, Linke's MSFA medium was modified. The following results were obtained using the modified Linke's MSFA medium for isolation of *S. mutans* from dental plaque of children.

1. It found to be difficult to isolate *S. mutans* from dental plaques with Linke's MSFA medium. However, it made possible to differentiate colonies of *S. mutans* distinctly from other oral streptococci by combining with tryptone.

2. Specified pigmental colonies of *S. mutans* were formed on our medium which contains yeast extract and tryptone in concentration of 5 g and 15g/1000ml respectively.

3. Isolation rate of *S. mutans* in the modified MSFA medium was 10% and 19% higher than those obtained on the original MSFA or Gold's medium respectively.

4. Type c was only type detect on Gold's medium, whereas among the isolates from MSFA and modified MSFA media, a-type was 12.2% and b-type was 6.1%.

Since the modified MSFA discriminated each type without any bias, a more accurate epidemiological investigation of *S. mutans* can be carried out by using this method.

文 献

- 1) Chapman, G. H. : The isolation and testing of fecal streptococci. *Am. J. Digest. Dis.* 13. 105-107, 1946.
- 2) Gold, O. G., Jordan, H. V. and Van Houte J. : A Selective medium for streptococcus mutans. *Arch. Oral. Biol.* 18 : 1357-1364,

1973.

- 3) Linke, H. A. B. : New medium for the isolation from other oral streptococcus mutans and its differentiation from other oral streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 5 : 604-609, 1977.
- 4) Hardie, J.M. and Bowden, G.H. : Physiological classification of oral viridans streptococci.

- J. Dent. Res. 55 : A166-A176, 1976.
- 5) Shklair, I. L. and Keene, J. H. : A biochemical scheme for the separation of the five varieties of streptococcus mutans. *Arch. Oral Biol.* 9 : 1079-1081, 1974.
 - 6) 五十嵐清治 : フッ化ジアミン銀の細菌学的研究. *小児歯科学雑誌*, 16 : 1-18, 1978.
 - 7) 広木彦吉ほか : 日本における streptococcus mutans の菌型. *歯界展望*, 45 : 960-962, 1975.
 - 8) Shklair, I. L. : Biochemical characterization and distribution of streptococcus mutans. *Microbiol Aspect of Dental Caries*. 1 : 201-210, 1976.
 - 9) Hamada, S., Masuda, N., and Oōshima, T. : Epidemiological survey of streptococcus mutans among Japanese children. *Jpn. J. Microbiol.* 20 : 33-44, 1976.
 - 10) Little, W. A., Korts, D. C., Thomson, L. A. : Comparative recovery of streptococcus mutans on the isolation media. *J. Clin. Microbiol.* 5 : 578-583, 1977.
 - 11) Emilson, C. G. and Bratholl, D. : Growth of streptococcus mutans various selective media. *J. Clin. Microbiol.* 4 : 95-98, 1976.
 - 12) Syaah, R. H. : Inhibition of streptococcus mutans strains by different mitis-salivarius agar preparation. *J. Clin. Microbiol.* 3 : 378-380, 1976.