

## Streptococcus mutans の Streptomycin 耐性株に 関する研究

平田 佳子   本田 寿子   田近 志保子  
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：1980年6月2日〕

抄録： *S. mutans* の SM耐性化に伴う諸性状の変化の有無を調べる目的で *S. mutans* の標準株5株と分離保存株10株の SM耐性 (SM600-1000 $\mu$ g/ml) 株をつくり、生物学的ならびに血清学的性状、ガラス壁付着能および産生するグルカンの性状を感受性株と比較した。SM耐性化によるコロニー形態、糖分解性、arginine 水解性、acetoin 産生性、溶血性、発育阻止活性および抗原性の変化は標準株においては全く認められなかったが、分離保存株においてコロニーからの粘液性物質の流出増加、arginine 水解性の消失が観察された。う蝕との関り合いが深いとされているガラス壁付着能、不溶性グルカン産生能についてみると、*S. mutans* GS5株はSM耐性化によりガラス壁付着率および不溶性グルカン(ad-1分画中のIG-1)の産生量が増加した。ガラス壁付着能の低い *S. mutans* Fa-1株のSM耐性株43株を分離し、これらのガラス壁付着率を調べたところ60%以上の高い付着率を示す菌株が7株存在した。

口腔外科の入院患者歯垢から分離した *S. mutans* の新鮮分離株141株中85株が50 $\mu$ g/ml SM含有平板培地で発育し、発育を阻止された菌株よりも高いガラス壁付着率を示した。

### 緒 言

*Streptococcus mutans* (以下 *S. mutans* と略す) は sucrose から不溶性グルカンを合成し、歯面に容易に付着し、しかもラット、ハムスター、サルなどにう蝕を作ることなどからその原因菌として注目されている<sup>1)</sup>。*S. mutans* の streptomycin (以下 SMと略す) 耐性株は in vitro で簡単に作り出せることからう蝕誘発実験のマーカーとして広く使われている<sup>2)</sup>。しかし SM耐性化に伴う細菌の変異については、従来ほとんど考慮されていない。今回、著者らは *S. mutans* の in vitro での SM耐性化を試みたところ *S. mutans* GS5株の耐性株が

ガラス壁付着 (以下壁付着と略す) 性の増強と不溶性グルカン産生量を増加することを認めた。また臨床材料から分離した SM耐性株が感受性株よりも高い壁付着率を示すことを認めたので報告する。

### 実験材料および方法

1. 使用菌株：標準株 [*S. mutans* E49 (group a), Fa-1 (group b), GS5 (group c), 6715 (group d), LM7 (group e), *S. sanguis* I ATCC 10556, *S. sanguis* II ATCC 10557, *S. salivarius* I ATCC 9759, *S. mitis* ATCC 9811 *S. MG* ATCC 9895], 分離株 [う蝕部位歯垢から分離

Studies on streptomycin-resistant strains of *Streptococcus mutans*.

Yoshiko HIRATA, Hisako HONDA, Shihoko TAJIKA and Masaru KANEKO

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

\*岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 5 : 102-110, 1980

(1975年)した *S. mutans* 保存株10株と本学歯学部第1口腔外科入院患者16名の歯垢から Gold 培地を用いて分離した *S. mutans* 141株]の計161株。

2. 培地: Mitis-salivarius agar (Difco) (以下MS培地と略す), Gold 培地 [MS培地+15% sucrose+0.2 unit/ml Bacitracin], Trypticase soy broth (BBL) (以下TS brothと略す), TS寒天培地 (TS broth+1.5% agar), Brain heart infusion broth (BBL) (以下BHI brothと略す), 2% sucrose含有BHI broth<sup>9)</sup>, Trypticase yeast cysteine agar (以下TYC培地と略す) [trypticase 15 g, yeast extract 5 g, L-cysteine 0.2 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 g, NaCl 1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2 g, NaHCO<sub>3</sub> 2 g, CH<sub>3</sub>COONa · 3H<sub>2</sub>O 20 g, sucrose 50 g, 精製水1000ml], 糖分解用基礎培地 [tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, brome cresol purpul 0.025 g, 精製水1000 ml], Arginine 培地 [tryptone 5 g, yeast extract 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, glucose 0.5 g, arginine 3 g, 精製水1000ml], ブドウ糖リン酸ペプトン水 [pepton 7 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g, glucose 5 g, 精製水1000ml], 血液寒天培地 [10%ひつじ血球加BHI寒天培地]。

3. 培養: 前培養はすべてTS broth中に20時間培養を行った。*S. mutans*の嫌気性培養には, Gas pak (BBL)法を用いた。

4. 菌の発育量: 培養液の濁度を積分球式光電光度法(550nm)(島津デジタルダブルビーム分光々度計, UV210A積分球反射附属装置付)を用いて測定した。値はすべて各系列10ml, 3本ずつの平均をとった。

5. SM耐性株の作製: In vitroでのSM耐性株を得るために供試菌株をTS broth 200 mlに20時間培養し, この培養液の遠心(5500 g, 10min.)沈渣をリン酸緩衝液2 mlに浮遊させ濃縮菌液を得た。次いでこの0.2mlずつを, SM 600, 800, 1000 μg/ml含有MS培地に塗抹し, 48時間培養後コロニー形成が認められ

たSM最高濃度含有平板培地から釣菌し, 再び同濃度のMS培地上で再分離しSM耐性株とした。

6. 発育阻止活性: *S. mutans*の他の緑色レンサ球菌に対する発育阻止作用を調べるために, あらかじめ *S. mutans*をTS寒天培地に2日間穿刺培養しておき, 次いで0.8%の寒天を含む4 mlのTS brothと0.5 mlの緑色レンサ球菌を混合し, 平板培地上に重層した。一夜培養後, 穿刺菌の周囲に生じた阻止帯を計測し, 活性の有無を判定した。<sup>9)</sup>

7. 生物学的性状検査: コロニーの形態—SM感受性株と耐性株のコロニーの性状を比較するためにMS培地, TYC培地および各々のSM添加平板培地上に供試菌株を画線塗抹し, 48時間嫌気性培養後さらに48時間好氣的に培養した後実体顕微鏡で観察した。糖分解性—糖分解用基礎培地に milipore filter で滅菌した糖類(mannitol, sorbitol, raffinose, melibiose, salicin, saccharose, inulin, trehalose arabinose, xylose, serobiose, esculin)を1%になるように加えて用いた。前培養液を接種し5日間培養後判定した。Arginineの加水分解—Arginine培地に前培養液を接種し48時間培養後, ネスラー試薬1滴を加えて判定した。Acetoin産生性—ブドウ糖リン酸ペプトン水2 mlに前培養液を接種し48時間培養後5% αナフトール・アルコール溶液1.2 mlと40% KOH水溶液0.4 mlを加えて良く混合し20分後に判定した。溶血性試験—前培養液を血液寒天培地に画線塗抹し48時間培養後, コロニー周辺の溶血状態を観察した。

8. 血清学的性状検査: 抗原の作り方—Rantz and Randall法<sup>6)</sup>に従った。抗血清の作り方—TS broth 40 mlに20時間培養した菌体を生理食塩水で2回洗浄後, 同量の生理食塩水に浮遊させ60℃30分間加熱した後, 免疫原とした。免疫方法—家兎耳静脈内に週のはじめ3日間連続投与を4週間行った。1週目は0.5 mlずつ, 2週目からは1 mlずつ投与し, 最終投与日から7日目に試験採血し, 抗体価の上昇を確

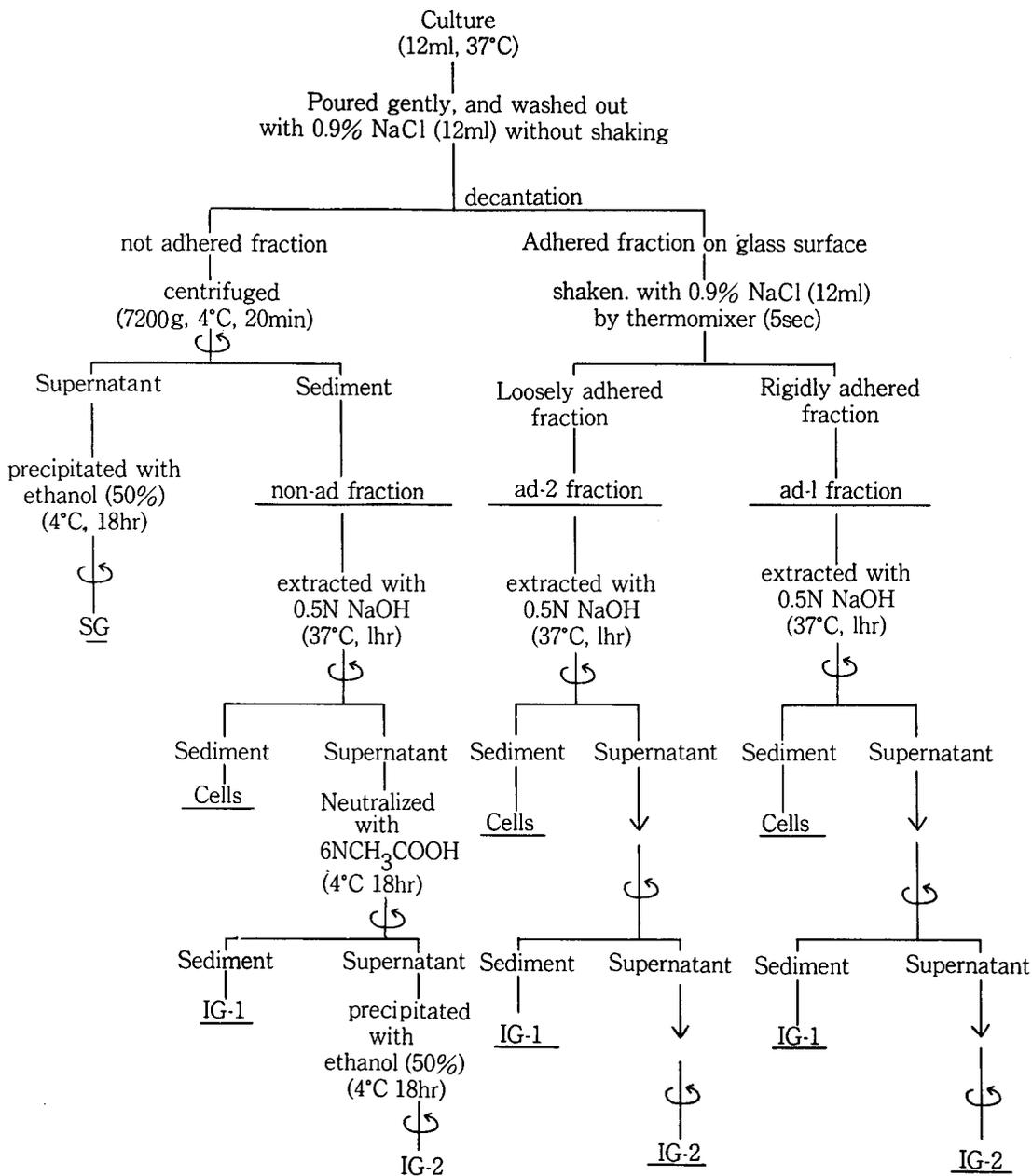


Fig. 1 Preparation procedure of insoluble glucan (IG) and soluble glucan (SG). (Kamide)<sup>10)</sup>

認の上全採血を行った。血清学的検査はゲル内沈降反応 (Ouchterlony 法)<sup>7)</sup> で観察し、抗原価の測定は沈降反応 (重層法)<sup>7)</sup> で行った。

9. 薬剤感受性試験：供試菌株の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定は化学療法学会標準法 (改訂法)<sup>8)</sup> に従った。また一部の抗生物質に対する感受性試験にはディスク法を用いた。

10. 壁付着率の測定： 2% sucrose 含有 BHI broth (sucrose は milipore filter を用いてろ過滅菌) 10ml を入れた中試験管に前培養液 0.2ml を接種し 48 時間培養後、培養液の濁度を測定した (I)。次で培養液を捨てた後の試験管壁を精製水で 2 度洗浄後、超音波洗浄装置を用いて管壁に付着した菌体を精製水 10ml 中

に完全に遊離させ、この浮遊液の濁度を測定し(Ⅱ)、壁付着率を算出した。壁付着率(%) =  $\frac{(I)}{(I)+(II)} \times 100$

11. 不溶性グルカン(insoluble glucan = I G) および可溶性グルカン(soluble glucan = S G) の定量: 2% sucrose 含有 B H I broth 12 ml 中に前培養液 0.3 ml を接種し 24 時間培養後、その培養液を上出<sup>10)</sup>の方法 (Fig. 1) に従って分画し管壁への付着能を異にしたグルカンの調整を行った。各分画のグルカンはフェノール硫酸法<sup>11)</sup>に従って定量し、glucose 量として換算した。菌体量は、調整した菌体を 12 ml の生理食塩水に浮遊させ、その濁度を測定した。

12. 患者歯垢からの耐性菌の分離: 本学第 1 口腔外科入院患者 16 名の歯垢を Gold 培地に培養し Shklair の分類<sup>12)</sup>に従って 141 株の *S. mutans* を分離した。これらの菌株の各種抗生物質に対する感受性試験は寒天平板希釈法<sup>9)</sup> およびディスク法<sup>7)</sup>を用いて行い耐性菌を検索した。

### 実験成績

#### 1. SM耐性株について

SM耐性株の作製にあたり供試菌株 [*S. mutans* の標準株 5 株 (E 49, Fa-1, G S 5, 6715, LM 7) とう蝕部位歯垢から分離した *S. mutans* の保存株 10 株 (4, 1303, 1318, 1324, 1326, 1369, 1438, 1702, 1753, 1806)] に対する SM の MIC を求めた (Table 1)。標準株、分離保存株ともほとんどが 25-50 μg/ml) の値を示し、分離保存株中 1326 株 1 株だけが 100 μg/ml であった。なお、これらの菌株に対する TC の MIC を調べてみると全菌株が 0.78-1.56 μg/ml の範囲にあった。他の抗生物質 (CEX, CER, PC, CBPC, SBPC, JM, LM, OM, EM, CM) に対する感受性をディスク法で調べたところ、どの抗生物質に対しても強い感受性を示した。また菌株の濃縮液を SM 600, 800, 1000 μg/ml 含有 MS 培地に塗抹し培養したところ標準株では 5 株全部が、分離保存株では 2 株 (1326, 1438) を除いた 8 株

Table. 1 Minimum inhibitory concentration of SM against *S. mutans* and concentration of SM used for developing SM-resistant strain.

Test strains	MIC (μg/ml)	Concentration of SM used for developing SM-resistant strain (μg/ml)
Reference strains		
<i>S. mutans</i> E 49	50	1000
Fa-1	50	1000
GS 5	25	1000
6715	50	1000
LM 7	50	1000
Isolated strains		
<i>S. mutans</i> 4	25	1000
1303	50	1000
1318	50	1000
1324	50	1000
1326	100	600
1369	50	1000
1438	25	800
1702	25	1000
1753	50	1000
1806	25	1000

が SM 1000 μg/ml 含有 MS 培地上にコロニーの発育を認め SM 耐性株を得た。また 1326, 1438 株もそれぞれ SM 600, 800 μg/ml で耐性株を得た。

#### 2. SM耐性株の発育

標準株と分離保存株の SM 感受性株と耐性株の B H I broth 中での発育を比べてみると感受性株、耐性株とも同じような発育曲線を示し、耐性化による差は見られなかった。ただ標準株 *S. mutans* E 49 の耐性株が感受性株に比べ一時期、発育速度に遅れがみられたが 24 時間後の発育は感受性株と同程度であった (Fig. 2)。

#### 3. SM耐性株の諸性状

1) コロニー性状: *S. mutans* の標準株 5 株と分離保存株 10 株の SM 感受性株と耐性株のコロニー形態を MS 培地と T Y C 培地上で比較した。MS 培地 48 時間培養平板上で全ての標準株と 8 株の分離保存株のコロニーは、力石<sup>13)</sup>らの M, m type を示し、SM 感受性株と耐性株

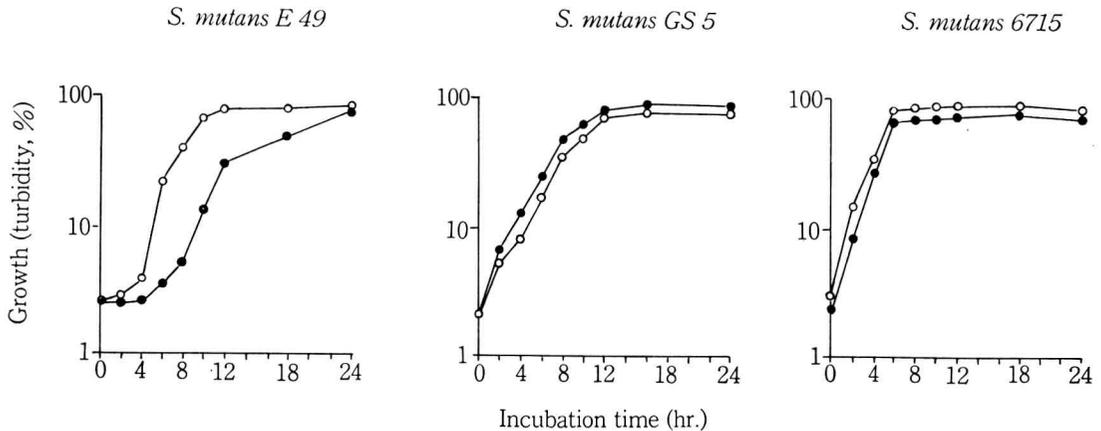


Fig. 2 Growth curve of SM-resistant strains of *S. mutans*

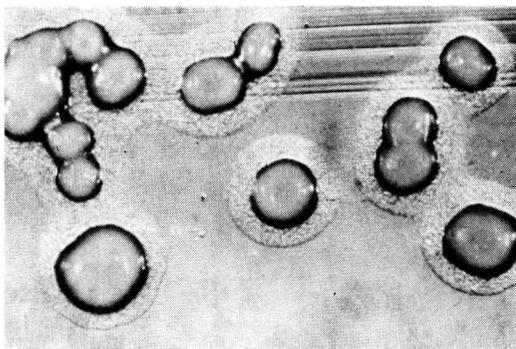
○—○— SM-susceptible strain  
●—●— SM-resistant strain

との間に形態上の差はみられなかった。また耐性株の培地中の SM の有無による形態上の変化も認められなかった。しかし分離保存株 1318, 1438 株の耐性株が TYC 培地上で粘液性物質の流出が著しく, SM 耐性化による粘液性物質の増加が認められた (Fig. 3 a, b)。

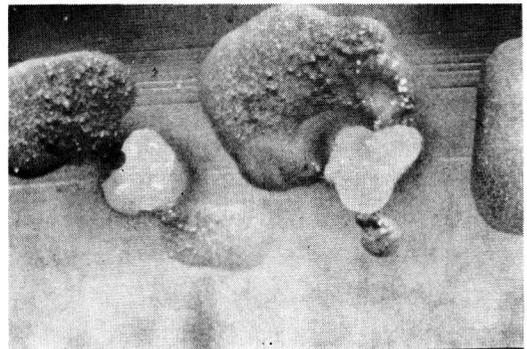
2) 生化学的性状など: *S. mutans* の標準株 5 株と分離保存株 10 株の SM 感受性株と耐性株について糖類 (mannitol, sorbitol, raffinose, melibiose, salicin, saccharose, inulin, trehalose, arabinose, xylose, sero-biose, esculin) の分解性, arginine 水解性, acetoin 産生性を調べた。供試菌株 15 株の SM 感受性株と耐性株のうち上記性状に変化がみられたのは分離保存株の 1753 株ただ 1 株だけであ

った。この株は SM 耐性化により arginine 水解性が消失した。また, 10% ひつじ血球加 BH I 寒天培地上で 48 時間培養後, 各株について溶血性を調べたが, SM 耐性化による溶血性の変化はいずれの株においても認められなかった。

3) 発育阻止活性: *S. mutans* の標準株 5 株とこれらの SM 耐性株を被検菌とし, 緑色レンサ球菌 (*S. sanguis* I ATCC 10556, *S. sanguis* II ATCC 10557, *S. salivarius* I ATCC 9759, *S. mitis* ATCC 9811, *S. MG* ATCC 9895) に対する発育阻止活性の有無を調べた。その結果 *S. mutans* E 49, Fa-1, GS 5 株に発育阻止活性が認められた。すなわち, *S. mutans* E 49, Fa-1 株は *S. salivarius* I ATCC 9759 株を, *S. mutans* GS 5 株は



a : SM-susceptible strains of *S. mutans* 1318



b : SM-resistant strains of *S. mutans* 1318

Fig. 3 Colonial morphology of SM-resistant strains on TYC agar

Table 2 Inhibitory activity of SM-resistant strains of *S. mutans*

Test strains	Indicator strains					
	<i>S. sanguis</i> I ATCC 10556	<i>S. sanguis</i> II ATCC 10557	<i>S. salivarius</i> I ATCC 9759	<i>S. mitis</i> ATCC 9811	<i>S. MG</i> ATCC 9895	
<i>S. mutans</i> E 49	S	0	0	++	0	0
	R	0	0	++	0	0
Fa-1	S	0	0	++	0	0
	R	0	0	++	0	0
GS 5	S	0	0	+++	+++	0
	R	0	0	+++	+++	0
6715	S	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
LM 7	S	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0

## Inhibitory activity

0 : on zone of inhibition

+ : zone of inhibition &lt; 2 mm

++ : zone of inhibition 2-5 mm

+++ : zone of inhibition &gt; 5 mm

S : SM-susceptible strain

R : SM-resistant strain

*S. salivarius* I ATCC 9759 株と *S. mitis* ATCC 9811 株の発育を阻止した。*S. mutans* E49, Fa-1, GS5 被検菌のSM耐性株においても同様の活性が認められ、その強さも各々のSM感受性株のそれと差はなかった (Table 2)。

4) 血清学的性状 : SM感受性株と耐性株の血清学的性状の相違の有無を調べる目的でゲル内沈降反応を行い、重層法で抗原価を測定した。*S. mutans* の標準株 E49, Fa-1, GS5, 6715, LM7 株は各々の抗血清と、分離保存株では Shklair の分類による型別に従って対応する抗血清との反応を試みた。標準株、分離保存株ともにSM耐性化により生化学的性状に変化が認められなかったものは、抗原性にも変化は認められなかった。また、その抗原価もSM感受性株、耐性株ともに同程度の力価を示していた。SM耐性化により生物学的性状が変化し Shklair の分類による型別が b type から c type に変わった *S. mutans* 1753株はSM感受性株、耐性株ともに c type (*S. mutans* GS5 株) の抗血清に強く反応し抗原価もそれぞれ32, 64倍を示した (Table 3)。またこの

株のSM感受性株の b type (*S. mutans* Fa-1 株) 抗血清に対する反応はゲル内沈降反応ではみられなかった。

## 4. SM耐性株の壁付着能と不溶性グルカン産生能

標準株、分離保存株各々のSM感受性株と耐性株から10株ずつ鈎菌しこれらの株を供試菌株としてその壁付着率を比べてみた。Fig. 4 は各株10株ずつの平均値を示したものであるが、*S. mutans* E49, Fa-1, 6715, LM7 株および分離保存株のほとんどはSM耐性化により壁付着率に多少の増減はみられたもののいずれも差のないものであった。しかし *S. mutans* GS5 株はSM感受性株が24%の壁付着率を有したのに比べ、耐性株では58%の壁付着率を示した。また分離保存株1318株でもSM耐性化により壁付着率の増加が認められた (Fig. 4)。そこでSM耐性化による壁付着率の上昇分布状態をみるために *S. mutans* Fa-1 株のSM耐性株を43株分離しその壁付着率をみた。Fig. 5 に示すように43株中35株までが感受性株と同程度の30%以下の壁付着率を示したが、60%以上

Table. 3 Serological properties (Precipitinogen titer)

Test strains	<i>S. mutans</i>						
	E 49	Fa-1	GS 5	6715	LM 7	1753	1806
Anti-sera	E 49	Fa-1	GS 5	6715	LM 7	GS 5	6715
Strains	1 : 8	1 : 2	1 : 4	1 : 4	1 : 8	1 : 4	1 : 4
Susceptible strain	32	8	32	256	64	32	512
Resistant strain	32	8	64	256	64	64	512

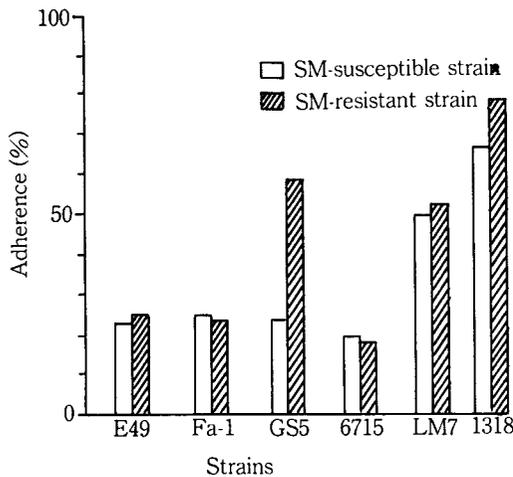


Fig. 4 Adherent ability of SM-resistant strains to glass surface.

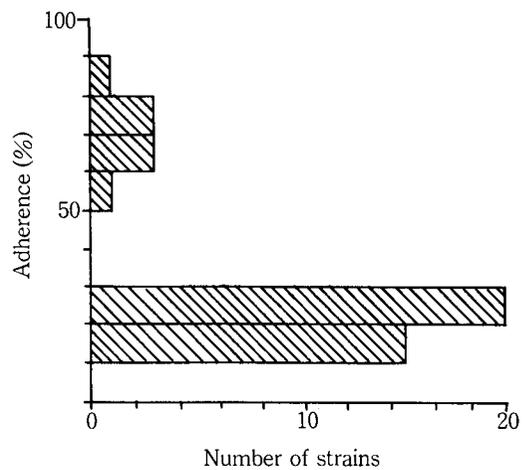


Fig. 5 Adherent ability and number of SM-resistant strains of *S. mutans* Fa-1.

の壁付着率を示した株が7株分離された。次に *S. mutans* GS 5, 1318株を供試菌株として、これらが産生する不溶性グルカンを壁付着能の相違により次の3つの分画、すなわち、ad-1分画—ミキサー[サーモミキサー、モデルTM 100 single unit (Themonics Co., LTD)]使用後もなおかつ強固に付着しているもの、ad-2分画—ミキサー使用で落ちるもの、non-ad分画—培養液中に存在するものに分けた。さらに各分画を不溶性の強い分画 (IG-1) と可溶化できる分画 (IG-2) に調製して IG の定量を行った (Table 4)。*S. mutans* GS 5 SM耐性株の菌体 1 mg の産生する IG 総量は 36.89mg, また感受性株では 31.34mg であり差はみられなかった。しかし強固な付着能力をもちう蝕発生に強い関わりを持つと思われる ad-1 分画中の IG-1 量を比較すると SM感受性株では 0.29mg, 耐性株では 4.62mg を産生しており、このグルカン産生量は SM耐

性化により16倍もの増量が認められた。*S. mutans* 1318株の SM耐性株は TYC 培地上でコロニーからの粘性性物質の増加を示し、同時に壁付着能も増加した株であるが、ad-1 分画中の IG-1 量を比較すると SM感受性株で 1.58mg, 耐性株で 1.63mg あり差は認められなかった。*S. mutans* GS 5, 1318株の可溶性グルカン量は SM耐性化により両株とも減少していた。

5. 臨床材料からの耐性株の検索

In vivo から分離された耐性株の壁付着能、不溶性グルカン産生能を調べる目的で本学口腔外科入院患者16名の歯垢から141株の *S. mutans* を分離し、これらの菌株から耐性株の検索を試みた。SM, CBPC, SBPC, CEZ は寒天平板希釈法で、JM, CER, CEXはディスク法で感受性試験を行ったところ 141株中85株が SM50 μg/ml含有平板培地上で発育した。これらの株は SM100μg/ml含有平板培地上には発育せず、

Table. 4 Amounts of polysaccharides produced by SM-resistant strains of *S. mutans*

Strains	Insoluble glucan (mg/mg cells)						Total IG	Soluble glucan (mg/mg clls)
	ad-1		ad-2		non-ad			
	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2	IG-1	IG-2		
<i>S. mutans</i>								
GS 5 S	0.29	2.64	0.33	2.33	11.07	14.68	31.34	380.10
R	4.62	1.68	0.61	1.03	0.96	27.95	36.89	78.88
1318 S	1.58	2.76	5.09	4.13	15.61	8.51	37.69	71.05
R	1.63	1.28	8.53	1.14	11.01	5.32	28.92	32.11

S : SM-susceptible strain

R : SM-resistant strain

また他の抗生物質に対しても高い感受性を示した。残りの56株はSMはじめ使用した全ての抗生物質に高い感受性を示した。SM50 $\mu$ g/mlに耐性を示した株と感受性株について壁付着率を比較したところ、SM50 $\mu$ g/mlに耐性を示した85株は全て30—40%程度の壁付着率を示したのに比べ、感受性を示した56株はみな一様に9—20%程度の低い壁付着率を示した。

### 考 察

*S. mutans* のSM耐性化に伴う諸性状の変化の有無を調べる目的で、*S. mutans* の標準株E49, Fa-1, GS5, 6715, LM7株とう蝕部位から分離した保存株10株を *in vitro* でSM600—1000 $\mu$ g/ml 濃度まで耐性化し、このSM耐性株と感受性株について生物学的、血清学的性状、壁付着能および産生するグルカンの性状を調べた。供試菌株のSMに対するMICは標準株、分離株共にほとんどが25—50 $\mu$ g/mlの範囲にあった。これらの菌株に対するTCのMICは0.78—1.56 $\mu$ g/mlであり、緑色レンサ球菌がSMにやや耐性の傾向を示す<sup>14)</sup>と同様に今回供試した *S. mutans* もまたSMにやや耐性の傾向を示した。竹下<sup>15)</sup>は各種抗生物質に対する *S. mutans* の最大発育許容濃度を測定しSMでは5—20 $\mu$ g/ml, TCでは0.32 $\mu$ g/mlであったと報告している。また中谷<sup>16)</sup>はSMで7—100 $\mu$ g/ml と菌株によって異なることを報告しているが、われわれの実験でも供試菌株に対するSMのMICが1株を除いてすべて25—50

$\mu$ g/mlを示し *S. mutans* のSM耐性株の検索にはSM50 $\mu$ g/ml 付近で識別するのが適当と思われる。本実験に用いたSM耐性株は耐性レベルを徐々に上昇させたのではなく高濃度のSM含有平板培地上に多数の感受性株を塗抹培養して得られたもので渡辺<sup>17)</sup>のいう、いわゆる不関性株である。このような菌株はSMの有無に関係なく発育旺盛であり、今回供試された耐性株でも *S. mutans* E49株が一時期、増殖速度に遅れがみられた以外は感受性株と同程度の発育を示した。SM耐性化に伴うコロニーの形態、生化学的ならびに血清学的性状の変化は供試した標準株では全く認められなかったが、分離保存株でコロニーからの粘液性物質の流出増加(1318, 1438株)、arginine 水解性の消失(1753株)が認められた。1753株のSM感受性株はarginine を水解し、Shklair の分類でb type に属するものであるが、血清学的にはb type であるFa-1株の抗血清とは反応せずSM耐性株と同じようにc type であるGS5株の抗血清と強い反応を示した。このように生物学的性状による型別と血清学的性状が一致しない菌株が分離株において時々見受けられ今後検討したい点である。Yoshioka<sup>18)</sup>らはA群レンサ球菌をPC, TC, SM耐性化すると群抗原、型抗原の消失があることを報告しているが、今回の実験ではSM耐性化に伴う抗原性の変化は認められなかった。コロニーの形態変異と不溶性グルカン産生量とについて、Higuchi<sup>19)</sup>, Freedman<sup>20)</sup>, 日高<sup>21)</sup>は両者が相関

することを報告しているが、日高は同じ報告の中で相反する性状を示す菌株も分離している。*S. mutans* の壁付着性、不溶性グルカン産生能と *cariogenicity* との関係については De Stoppelaar ら<sup>22)</sup>が *mutagenic agent* で処理して得た変異株が壁付着能を減少し、SPFハムスターに対する *cariogenicity* が低下したことを、Tanzer ら<sup>23)</sup>、Johnson ら<sup>24)</sup>もそれぞれ *S. mutans* 6715-13株、GS 5株の変異株を用いて壁付着性あるいは不溶性グルカン産生能と *cariogenicity* が相関することを報告している。今回供試した菌株の中で *S. mutans* GS 5のSM耐性株はMS, TYC培地いずれの平板培地上でも耐性化によるコロニー形態の変異は認められなかったが、壁付着率の増加を認め、また、上出<sup>10)</sup>によって壁付着能力に強い関係があるといわれている *ad-1* 分画の *IG-1* 産生量がSM感受性株に比べ著しく増加していたことは興味深いところである。また *S. mutans* Fa-1株のSM耐性株43株の壁付着率を調べたところ耐性化により壁付着率の上昇した株が7株(16%)も認められた。*S. mutans* 1318株はSM耐性化によりコロニーからの粘液性物質が著しく増加し、また壁付着率も増加したが *ad-1* 分画中の *IG-1* 産生量の増加は見られなかった。同様に *S. mutans* 1438株のSM耐性株もコロニーからの粘液性物質の増加を認めた株であるが、この株はコロニーの形態変異のみで壁付着性や *ad-1* 分画中の *IG-1* 産生量の増加はみられなかった。今回の実験でSM耐性化に伴うコロニー形態の変化と壁付着性ならびに不溶性グルカン産生能との関係は菌株によって違った結果を示したが標準株として広く使用されている *S. mutans* Fa-1株のSM耐性株に壁付着率の増加した株が認められ、*S. mutans* GS 5株のSM耐性株では壁付着率の増加と *IG-1* 産生量の増加が認められたことから、う蝕誘発実験でSM耐性株をマーカーとして使う際には十分配慮しなければならない問題と思われる。

*In vivo* からの耐性株の検索のためにSM

50, 100, 200 $\mu$ g/ml 含有平板培地を用い入院患者から分離した141株の *S. mutans* の感受性を調べたところ、85株がSM50 $\mu$ g/ml 含有平板培地上に発育し他の56株は発育を阻止された。前者の85株はSM100 $\mu$ g/ml 含有平板培地に発育しなかったが付着率は後者の56株よりも高いことなどからこの85株はSM耐性を獲得した株であろうと思われる。薬剤耐性獲得因子がプラスミドであることはすでに知られていることである<sup>14)</sup>が、最近う蝕の発生に関与する不溶性グルカンの合成もプラスミドと関係している可能性を示唆する報告<sup>25)</sup>がある。本実験でSM耐性化と不溶性グルカン産生能との関係を示唆する現象を捕えることが出来たことは、耐性化に関与するプラスミドと不溶性グルカン産生能に関与するプラスミドとの関連性が考えられ、今後さらに詳細な研究が必要と思われる。

## 結 論

*S. mutans* の標準株、分離保存株のSM耐性株を得、その生物学的ならびに血清学的性状を比較した。

1. 標準株のSM耐性化による生物学的性状(コロニー形態、糖類分解性、*arginine* 水溶性、*acetoin* 産生性、溶血性、発育阻止活性)および血清学的性状には変化は認められなかった。分離保存株のSM耐性株の中にはコロニーからの粘液性物質が増加した株が認められた。

2. *S. mutans* GS 5株のSM耐性株では壁付着や *ad-1* 分画中の *IG-1* 産生量が増加した。

3. 壁付着能の低いFa-1株のSM耐性株中には壁付着率が著しく増加した株が16%存在した。

4. 臨床材料から分離した *S. mutans* 141株中SM50 $\mu$ g/ml 含有平板培地に発育した83株は、発育を阻止された56株に比べ壁付着率が高かった。

以上の結果から *S. mutans* にはSM耐性化に伴い壁付着率の増加、不溶性グルカン産生量の増加する株があることがわかった。

稿を終るに当り患者材料を提供して下さった  
本学歯学部第1口腔外科学講座、藤岡幸雄教  
授、工藤啓吾助教授、他教室員各位に深謝致し

ます。

(本論文の要旨は昭和53年9月23日第20回歯  
科基礎医学会総会において発表した。)

**Abstract :** The purpose of this study is to compare SM-susceptible of strains of *S. mutans* with SM-resistant ones as to biological and serological properties, particularly adherent ability to glass surface and production capacity of insoluble glucan. As reference strains five *S. mutans* (E49, Fa-1, GS5, 6715 and LM7) were used and 10 strains isolated from dental plaque of carious patients were used as wild strains.

Results were as follows :

1. In both reference and wild strains colonial morphology and biological and serological properties of SM-resistant strains were similar to those of SM-susceptible strains.
2. SM-resistant strains of *S. mutans* GS 5 had higher adherent ability to glass surface and produced a large amount of insoluble glucan-1 in adherent-1 fractions than SM-susceptible strains.
3. Seven of 43 SM-resistant strains selected from *S. mutans* Fa-1 had higher adherent ability to glass surface than SM-susceptible ones.
4. Eighty-five of 141 strains of *S. mutans* isolated from dental plaque of patients of Oral Surgery Department developed colonies on Mitis-Salivarius agar plate containing SM 50  $\mu$ g/ml. Adherent ability to glass surface of those strains was higher than that of SM-susceptible strains.

## 文 献

- 1) 浜田茂幸, 小谷尚三: 齲蝕と細菌(上)(下), 歯界展望, 41: 56-62, 227-234, 1973.
- 2) Zinner, D. D. and Jablon, J. M.: Human streptococcal strains in experimental caries, In Harris, R. S. (ed.) Art and Science of Dental Caries Research, Academic Press, New York, P87-109, 1968.
- 3) Gold, G. O., Jordan, H. V., and Van Houte, J.: A selective medium for streptococcus mutans. *Arch. Oral Biol.*, 18: 1357-1364, 1973.
- 4) Balekjan, A. Y., Cole, J. S. III, and Guidry, M. S.: Plaque formation by streptococcus mutans: An in vitro method for quantitative determination. *J. Dent. Res.*, 56: 696, 1977.
- 5) Shigeyuki Hamada and Takashi Oosima: Production and properties of bacteriocins (mutacins) from streptococcus mutans. *Archs. Oral Biol.*, 20: 641-648, 1975.
- 6) Rantz, L. A., and Randall, E.: Use of autoclave extracts of hemolytic streptococci for serological grouping. *Stanford M. Bull.*, 13: 290-291, 1955.
- 7) 医科学研究所学友会編: 細菌学実習提要, 丸善, 東京, 245-253, 370-377ページ, 1976.
- 8) 化学療法学会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法(1974年改訂), *Chemotherapy*, 23: 1-2, 1975.
- 9) Kuramitsu, H., and Ingersoll, L.: Molecular basis for the different sucrose-dependent adherence properties of streptococcus mutans and streptococcus sanguis. *Infect. Immun.*, 17: 330-337, 1977.
- 10) 上出正幸: Streptococcus mutans の器壁附着性に関与する菌体外多糖について, 日歯周誌, 20: 15-30, 1978.
- 11) 阿部喜美子, 瀬野信子: 別冊蛋白質核酵素15. 生物化学実験法Ⅱ, 糖質実験法, 共立出版, 1968.
- 12) Shklair, I. L., and Keene, H. J.: A biochemical scheme for the separation of the five varieties of streptococcus mutans. *Archs. Oral Biol.*, 19: 1079-1081, 1974.
- 13) 力石秀実, 白井千雄, 加畑みち子, 熊谷勝男: Streptococcus mutans における M, m, N 変異, 歯基礎誌, 16: 105-114, 1974.
- 14) 三橋進: 薬剤と耐性菌(第2版), 南江堂, 東京, 63-73ページ, 1968.
- 15) 竹下志郎: Streptococcus mutans の集落形成に関する研究, 歯科医学, 41: 593-612, 1978.
- 16) 中谷源: 齲蝕原性レンサ球菌のストレプトマイシン耐性獲得に関する研究, 歯科医学, 41: 1-20, 1978.
- 17) 渡辺力: ストレプトマイシン耐性の上昇及び下降の機序, 第2報, 変異型式の分析的考察, 日歯周誌, 10: 231-237, 1955.
- 18) Yoshioka, M., and Kunii, T.: Antibiotic resistant group A streptococci, I. Acquired

- in vitro resistance to Penicillin, Mitomycin C, Tetracycline and Streptomycin. *Japan, J. Microbiol.*, 9 : 87-99, 1965.
- 19) Higuchi, M., Endo, K., Hoshino, E. and Araya, S. : Preferential induction of rough variants in streptococcus mutans by ethidium bromide. *J. Dent. Res.*, 52 : 1070-1075, 1973.
- 20) 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.
- 21) 日高三郎, 豊田雅子, 松下義雄 : Streptococcus mutans FIL からのコロニー形態変異株の分離とその生物学的性状について, 福歯大雑誌, 4 : 209-218, 1977.
- 22) De Stoppelaar, J. D., Van Houte, J. and De Moor, C. E. : The presence of dextran-forming bacteria, resembling streptococcus bovis and streptococcus sanguis in human dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, 12 : 1199-1201, 1969.
- 23) 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 : 197-203, 1974.
- 24) Johnson, M. C., Bozola, J. J., Shechemister, I. L., and Shklair, I. L. : Biochemical study of the relationship of extracellular glucan to adherence and cariogenicity in streptococcus mutans and an extracellular polysaccharide mutant. *J. Bacteriol.* 129 : 351-357, 1977.
- 25) 小川俊夫, 石川悦子, 玉置敬一, 片山有夫 : 壁付着性を有するミュータンス連鎖球菌のプラスミドと菌体タンパク, 日細菌誌, 35 : 101, 1980.