

Streptococcus mutans の変異相

鶴水 隆

Mutational Phases of *Streptococcus Mutans*

Takashi TSURUMIZU

Summary

Mutants were isolated from various strains of *Streptococcus mutans* (HS-1, FA-1, 10449, OMZ 176, P4, OMZ 175, KIR and RC-20) by mutagen-induced mutation. The shapes of each colony, adhesive ability shown by plaque-forming ability, and biological nature of the mutants were studied.

The following results were obtained from this experiment. On the basis of the nature of each colony in TYC agar plate cultures, it was determined that there were three mutational phases (phase I, phase II, and phase III) although there was a slight difference between the colonies of each mutant.

In the phase I, a great amount of insoluble dextran-like-polysaccharides were produced, and firm and adhesive plaques were formed. In the phase II, soluble dextran-like-polysaccharides were produced, and mutation was observed continuously. The plaque-forming ability was unstable. In the phase III, no adhesion was observed in plaques because no dextran-like-polysaccharides were produced or because there was a decrease in the production of dextran-like-polysaccharides. When the phase I and the phase III coexisted proliferation of mutants and producibility of firm plaques in the phase I were inhibited extremely by mutants in the phase III.

In these cases, a difference of proliferation of mutants between the phase I and the phase II was observed. That is, some factors which reflect the rate of group changes may play a role in the difference in the proliferation ratio, especially under the limited conditions, such as the use of a broth culture between the phase I and phase III. The difference of the adaptation, proliferation, and viability of mutants between the phase I and the phase III may be considered as these factors.

Mutation between each phase, namely between the phase I and the phase II and the phase II and phase I, may occur naturally in some strains. But a higher mutation rate was observed when a mutagen was used. Mutation between the phase I and the phase III occurred only when a mutagen was used. Mutation between the phase III and the phase I and between the phase III and the phase II was not observed.

I 緒言

齲蝕 (dental caries) の病因探究は古くから行われてきた。*Str. mutans* を用いた無菌動物による研究結果から、齲蝕の主要な病原菌であることが明らかになった。その後の研究の進展により、齲蝕は感染症とみなされている。感染発現の第一のステップとして重要視されてい

るのは、本菌の歯牙面への付着と、それに続いて plaque の形成である。

Str. mutans の特徴的な性状として、sucrose から極めて粘着性に富む glucan (dextran-like-polysaccharides など) を合成する^{6,8-9,12)}。この合成酵素、その存在様式、作用の多様性^{10,13)}および合成される glucan などの生化学、理化学的性状も明らかにされつつある。

感染性疾患の病因の解明に種々の突然変異株を用いることは、微生物遺伝学の分野では、極めて一般的な研究方法として行われている。これらの方法の応用により *Str.*

mutans の glucan 合成の機序あるいは、その遺伝学的支配機構の解明, plaque 形成 (付着様態) と齶蝕誘発原性因子の決定に有力な方法となり得るものと考えられる。

Str. mutans の齶蝕原性因子の探究⁽¹⁾⁽¹⁷⁾に、この遺伝学的研究³⁾が応用されてきているが、これまで研究されてきた変異株は必ずしも多くはなく、各種の性状を有する変異株について研究を進める必要がある。

本研究は *Str. mutans* の常用株の各血清型の菌株から、mutagen (nitrogenmasterd) 誘発による変異株 (mutattinal phase) を分離し、これらの変異株について齶蝕原性の指票とされる付着能、変異相共存下での相互の増殖様態について比較検討した。

II 研究の方法

1. 材料および方法

使用菌株

<i>streptococcus mutans</i>	HS-1	a*	R* *
	FA-1	b	R
	Ingbritt	c	H1
	10449	c	H1
	OMZ176	d	H2
	P4	e	H1
	OMZ175	f	H1
	KIR	g	H2
	RC-20		R

* BROTHALL¹⁻²⁾および PERCH¹⁵⁾による分類

* * 佐藤²⁰⁾による分類

H1 human type I

H2 human type II

R Rat type

2. 培地

増菌用液体培地として0.5%yeast extractを加えた Trypticase Soy broth (Y-TCS-broth), および STOPPELAAR (1976)¹⁸⁾の5% sucroseを加えた TYC brothを使用し、寒天培地は、これに1.5%に寒天末を加えた。

菌株の保存は TYC 寒天平板上の Colony を 3% gelysate TM peptone, 10% glycerin 溶液に浮遊し、少量ずつ分注してゴム栓を施し、-80℃で凍結保存し、各実験に際していずれも一度 Y-TCS-broth または TYC broth に増菌して使用した。各培養はいずれも95%N₂, 5%CO₂ ガス置換法または gas pak system (BBL) により、培養温度は35-37℃で行なった。

3. Mutagen 処理法

各菌株 (原株) を Y-TCS-broth または TYC broth に 37℃ 24hr 培養した培養液を 8,000rpm 30min 遠心し、菌体を CMRL buffer* で遠心洗浄して菌数約 10⁶CFU/ml に 0.01 ~ 0.05 mg / ml の nitrogenmastard を含む同 buffer 中に浮遊する、37℃ (Water bath 中で各 min 処理し、処理菌体は CMRL buffer を加えて 8,000rpm 30min 遠心洗浄を行ない、これを一度 TYC broth に 37℃ 10 ~ 12hr 培養したのち TYC 寒天平板上に 37℃ 48hr 培養した後更に 24hr 室温に静置して発育した colony 様態を観察した。

* Connought Medical Research Laboratories 処方, Applied microbiology Vol24. No3 : 506~507, 1972.

4. 付着性

付着性は各変異株を TYC broth に接種し Stainless wire を挿入する wire plaque 形成法は 37℃ 24hr ごとに新しい broth に移し培養し、試験管壁付着性は 37℃ 24hr ごとに新しい broth と入れ換えて培養を続け、それぞれの菌株の phase の plaque 形成と付着増殖様態を観察した。

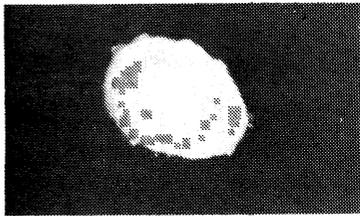
III 実験成績

1. 変異株の性状

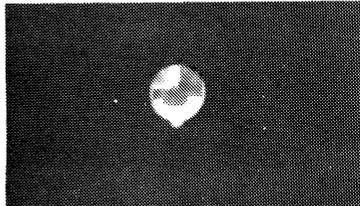
Str. mutans 各菌株から mutagen 誘発によって、TYC 寒天平板上に生ずる colony 性状などが、それぞれの原株とは明らかに異った変異株を分離した。

変異株は colony 性状で各菌株間で多少の差異はあるが、いずれも 3type の特徴的形態を示した。このような *Str. mutans* の変異株の colony 形態の表現について、colony 表面の粘着物の差から smoth, rough, mucoid, semi-mucoid および non-mucoid 型などと呼称されているが⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁹⁾, *Str. mutans* は一般的な培養に於てもしばしば自然変異的にも相互間で変異性がみられ、mutagen の誘発により更に高い変異性を示してくることからみても、これらは本菌の変異相 (mutattinal phase) と考えるのが妥当であり、これらの変異株を変異相 I (mutattinal phas I), 変異相 II (mutattinal phase II) および変異相 III (mutattinal phase III) と名付けて区別した (PHOTO I)

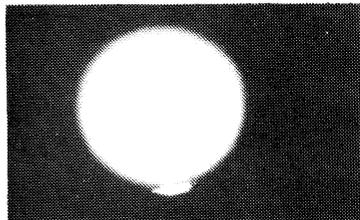
PHOTO 1



Phase I



Phase II



Phase III

Colonial morphology of *Streptococcus mutans* (human type I, 10449) on TYC agar.

1) mutational phase I (相I)

この phase は性状からみて齲蝕を誘発する野生型(原株)と考えられ、TYC 寒天平板上に菌株によって多少異なるが colony は質的に硬い多量の不溶性の dextran 様多糖体に塊状に覆われている。菌株によっては phase I ⇄ phase II 間での自然変異性はよくみられ、mutagen の誘発により高い変異率を示す。phase I の分離純化は誘発後 TYC proth などに強い付着性と TYC 寒天平板上に硬い多量の dextran 様多糖体を形成する colony を再分離を繰り返して選定した。原株のような phase I ⇄ phase II 間の変異性はなく、ラットおよびハムスターを用いた実験系で強い齲蝕誘発を示す。

2) mutational phase II (相II)

この phase はどの菌株でも自然変異的に出現してくるが、誘発変異により明確な colony が形成される。TYC 寒天平板上では極く微量の不溶性 dextran 様多糖体が核のようになり、その上に球状または水滴状の多量の水溶性 dextran 様多糖体に覆われている。菌株によって差はあるが、安定性にとぼしく、つねに phase II ⇄ phase I (原株に近い性状) 相互間の変異がみられ、従って付着性やラットやハムスター実験系での齲蝕誘発現性も不定である。

3) mutational phase III (相III)

この phase はいずれの菌株からも一般的な培養で自然変異的に出現してくることはなく、誘発変異によってのみ出現した。不溶性 dextran 様多糖体の産生能は欠失しているため、各菌株共に差はなく、TYC 寒天平板上で扁平の正輪廓の大形の colony を形成する。性状は極めて安定しており、phase III → phase I, phase II 間の変異はみられない。ラットおよびハムスターに長期間に亘り経続投与しても定着するが齲蝕を誘発することはない。

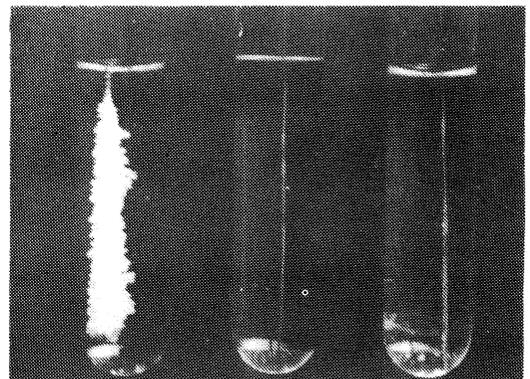
2. Mutational phase の付着性 (plaque 形成)

TYC broth での wire plaque 形成や試験管壁などの付着性が齲蝕誘発の第一の指標と考えられている。各菌株の各 phase の付着性は菌株間の差はなく、phase I は著明に強固な付着様態を示す。phase II は先にも述べた如く、安定性に乏しく、つねに変異性を示すので付着性も変動する。phase III は dextran 様多糖体の産生能が欠失しているため付着性を示すことはない。(PHOTO 2)

3. Matational phase 相互間での増殖阻害

各菌株より誘発変異により出現した phase III と phase I 共存下での plaque 形成などの増殖様態について調べてみたが、TABLE 1 に示した如く、phase III の共存下で phase I の増殖等は極度に抑制され、短期間に phase I は消失する。また phase I の wire plaque を継代し、形成された時点で phase III を接種すると、phase III が plaque に付着侵入し旺盛に増殖を示すため、しだいに崩壊し、phase I は消失する。これらの関係について菌株の異なる両 phase の相互間でも検討したが、おなじ経過をたどった。

PHOTO 2



Phase I

Phase III

Phase I in addition to phase III culther.

Adherence of *streptococcus mutans* (human type I, 10449) on the stainless wire.

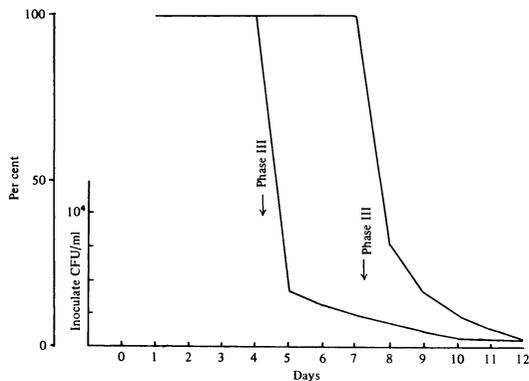


Table 1 Inhibition of proliferation of the mutants observed when mutant in the phase III was inoculated in culture of mutants in the phase I
Streptococcus mutants human type (10449)

IV 考察ならびに結論

Str. mutans の齲蝕誘発原性の支配因子を解明する目的で、human type I, human type II および rat type のいくつかの菌株からnitrogenmastardによる誘発変異により変異株を分離した。これらの変異株は TYC 寒天平板上での colony 性状および生化学的性状から菌株によって多少の差はあるが、3 type に大別され、これらを mutational phase I (変異相 I), mutational phase II (変異相 II) および mutational phase III (変異相 III) と命名分類した。

齲蝕誘発の第一のステップと考えられている、歯牙面への定着性と関連するといわれている plaque 形成等は phase I のみが強固な付着性を示した。これらの差は産生する dextran 様多糖体の質的な差によって異なり、最大の因子は産生する cell associated の dextran であるといわれている⁴⁾⁸⁻⁹⁾。mutational phase 相互間の付着性の差もこの違いを示している。

mutational phase 相互間の変異性は phase I ⇄ phase II 間では自然変異的にもみられるが、誘発変異によって、その変異率も幾分変更される。phase I → phase III 間の変異は誘発変異によってのみ出現し、phase III → phase I, phase II への変異について種々検討したが、現在のところ全く認められない。

mutational phase I と phase III の共存条件のもとの相互の増殖様態と付着性の関係についてみると、接種菌量の差が方法等によらず、いずれの培養に於ても、増殖率の占める割合は phase I が極度に抑制され、殆んど

が phase III で占められる。また各菌株の phase I を継代し序々に plaque が形成されつつある時点で phase III を接種し継代すると、同様な経過を辿り、plaque 内で旺盛な増殖を示すため、短期間のうちに崩壊して phase I は消失する。

両 phase 共存のもとでの、このような関係は、両 phase の増殖率の差、即ち broth 培養のような限定された条件下での増殖に於ては、集団変化の率に影響を与え得るいくつかの要因が関与してくることは当然予想される。まず phase I が、その置かれた環境条件と、よりよく適応した phase III の増殖、phase I と phase III との増殖率や生存能力の差などが影響してくることも考えられる。

phase III は dextran 様多糖体の欠失により単独では付着性は示さないが、phase I の plaque のような付着的要因があれば、付着侵入して旺盛な増殖を示す。これらのことは相互間で GIBBONS⁷⁾が指適している如く、両菌株のもつ繊毛層の付着機構が関与していることが考えられ、極めて興味ある現象である。

V 文献

- 1) BROTHALL, D. : Demonstation of five serogical groups of streptococci strains resembling *Str. mutans*, Odont. Revy, 21 : 143, 1970.
- 2) BROTHALL, D. : Immunodiffusion studies on the serological specificity of streptococcc : resembling *Str. mutans*, Odont. Revy, 20 : 231, 1969.
- 3) COYKENDALL, A, L : Genetic heterogeneity *streptococcus mutans*. J. Bacteriol., 106 : 192-196, 1971.
- 4) EDWARDSSON, S. : The Caries-inducing property of variant of *streptococcus mutans* Odont. Revy, 21 : 153-157, 1970.
- 5) 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.
- 6) GIBBONS, R. J. : Formation and Significance of bacterial polysaccharides in Caries etiolog. Caries. Res., 2 : 164-171, 1968.
- 7) GIBBONS, R. J., VAN HOUTE, J. : Bacterial adherence in oral microbial ecology, Ann. Rev. Microbiol. 29 : 19-44, 1975.
- 8) GIBBONS, R. J. and NYGAARD, M. : Synthesis

- of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. *Archs. Oral. Biol.*, 13 : 1249-1262, 1968.
- 9) GUGGENHEIM, B. and SCHROEDER, H. E. : Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by Cariogenic streptococci : *Helv. Odont. Acta*, 11 : 131-152, 1967.
- 10) GUGGENHEIM, B. and NEWBRUN, E. : Extracellular glycosyltransferase activity of an HS strain of *streptococcus mutans*. *Helv. Odont. Acta*, 13 : 84-97, 1969.
- 11) GUGGENHEIM, B. : Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferase from a strain of *streptococcus mutans*, *Helv. Odont. Acta*, 14 : 89-106, 1970.
- 12) GUGGENHEIM, B. : Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Internat. Dent. J.*, 20 : 657-678, 1970.
- 13) 井上昌一, 江上立子, 竹原直道, 大杉利幸, 森本俊夫 : *streptococcus mutans* AHT 株の産生する菌体外 sucrose の部分精製ならびに性状に関する研究, 口腔衛生会誌, 24 : 6-18, 1974.
- 14) JOHNSON, M. C. BoZZOLA, J. J. and SHECHMEISTER, L. L. : Morphological study of *Streptococcus mutans* and two extracellular polysaccharid mutants, *J. Bacteriol.*, 118 : 304-311, 1974.
- 15) PERCH, B. : Biochemical and Serological properties of *Str. mutans* from Various human and animal Sources, *Acta. path. Microbial. scand*, section B, 82 : 357, 1974.
- 16) 力石秀実, 臼井千雄, 加畑みち子, 熊谷勝男 : *streptococcus mutans* における M, m, N 変異, 菌基礎誌 16 : 105-114, 1974.
- 17) SCHACHTELE, C. E., GERMAINE, G. R. and HARLANDER, S. K. : production of elevated levels of dextransucrase by a mutant of *streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 12 : 934-937, 1975.
- 18) STOPPELAAR, J. D. De, HOUTE, J. VAN and MODR, C. E. De : The presence of dextranforming bacteria, resembling *Streptococcus bovis* and *streptococcus sanguis* in human dental plaque. *Archs. Oral. Biol.*, 12 : 1199-1201, 1967.
- 19) STOPPELAAR, J. D. De : Decreased Cariogenicity of a mutant of *streptococcus mutans*. *Archs, Oral, Biol.*, 16 : 971-975, 1971.
- 20) 佐藤誠 : *Streptococcus mutans* の抗原分析と人及び動物口腔内における *Str. mutans* の型別分布, 口腔衛生会誌 28, 2 : 195-219, 1978.