

黒色色素産生 *Bacteroides* に対する口腔レンサ球菌 の抗菌活性, 抗菌物質の精製とその性状

中村 武, 志村隆二, 柴田幸永, 藤村節夫

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

Antimicrobial Activity of Oral *Streptococcus sanguis* Against Black Pigmented *Bacteroides*

TAKESHI NAKAMURA, RYUJI SHIMURA,
YUKINAGA SHIBATA and SETSUO FUJIMURA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. T. Nakamura)

Summary

Five bacterial strains which showed intense antimicrobial activity against *Bacteroides gingivalis* were isolated from gingival crevice materials. These bacteria were identified as *Streptococcus sanguis* based on their biological properties. The antimicrobial agent was found to be cell associated. Using one of the isolates (strain NF-10), the agent purified (from a cell extract prepared by ultrasonic treatment), by means of Q-Sepharose chromatography, gel filtration on Sephacryl S-300, further chromatography on hydroxylapatite column, and preparative polyacrylamide gel electrophoresis. A single stained protein band was observed in the PAGE of the purified antimicrobial agent. The specific activity increased 83.9-fold and the recovery was 15.3%. Its molecular weight was 74,000 and pI was 4.5. The activity was lost on heating at 60°C for 10 min. The action spectrum of this antimicrobial agent was narrow; of the 18 bacterial species examined, only *B. gingivalis* and *B. intermedius* were found to be inhibited by it.

緒 言

口腔領域感染症の多くは内因感染である¹⁾。今日、齲蝕や歯周疾患などの各病型によってそれぞれ主要病原菌種²⁾⁻⁶⁾も提示され、その病原性が注目されている。内因感染の病因論においてこれら

特定菌の病原性が重要であることが疑いない。しかし、その病原的作用の発現には局所でのこれら病原菌の増量が必須となる⁷⁾。従って特定病原菌の数的変化は宿主に病的状態をもたらす前提となる大きな因子である。われわれは、歯垢ないし歯肉溝菌叢における菌種相互作用を明らかにするた

め、これら口腔常在菌の抗菌的生物活性を検討して、これまで種々のバクテリオシンないしバクテリオシン様活性産生菌の存在と、その抗菌物質の性状について報告してきた⁸⁾⁻¹⁴⁾。本研究は、成人歯周炎の主要病原菌として注目されている¹⁵⁾黒色素産生 *Bacteroides* に対して抗菌的作用を有するレンサ球菌を分離して、この抗菌物質の精製を行い、その性状について検討したものである。

方 法

1. 抗菌活性産生菌の検索

黒色素産生 *Bacteroides* に対して抗菌活性を有する細菌の検索は、6名の成人歯肉溝材料を供試し、この希釈液を GAM 平板に塗抹した。各平板は嫌氣的に3日間培養後、これに *B. gingivalis* (381)を指示菌として重層培養して阻止活性を調べた。明瞭な阻止帯を発現した集落から通常の如く、抗菌活性を有する菌株を分離・純化した。

2. 抗菌活性の測定

各分離菌株について、これまでと同様に stab culture 法および寒天内拡散法(無細胞試料)で阻止活性を測定した⁸⁾。なお、無細胞試料の活性(U)は、試料 1 ml 当り阻止帯を発現する最高希釈度で表した⁹⁾。

3. 抗菌活性産生菌の生物的性状

6例の歯肉溝材料中3例から分離された強い阻止活性を有する5菌株について、レンサ球菌を指標として生物学的性状¹⁶⁾を調べた。

4. 抗菌物質の精製法

Fig. 1: Growth inhibition of *B. gingivalis* 381 by the isolated strains of *S. sanguis* from gingival crevice materials.

A; Strains: a: NF-10, b: SFS-1, c: SFN-10, d: SYF-12

B; Localization of inhibitory activity;

a: Cell sonicate (NF-10)

b: Fraction of ammonium sulfate saturation (80%) from culture supernatant (NF-10)

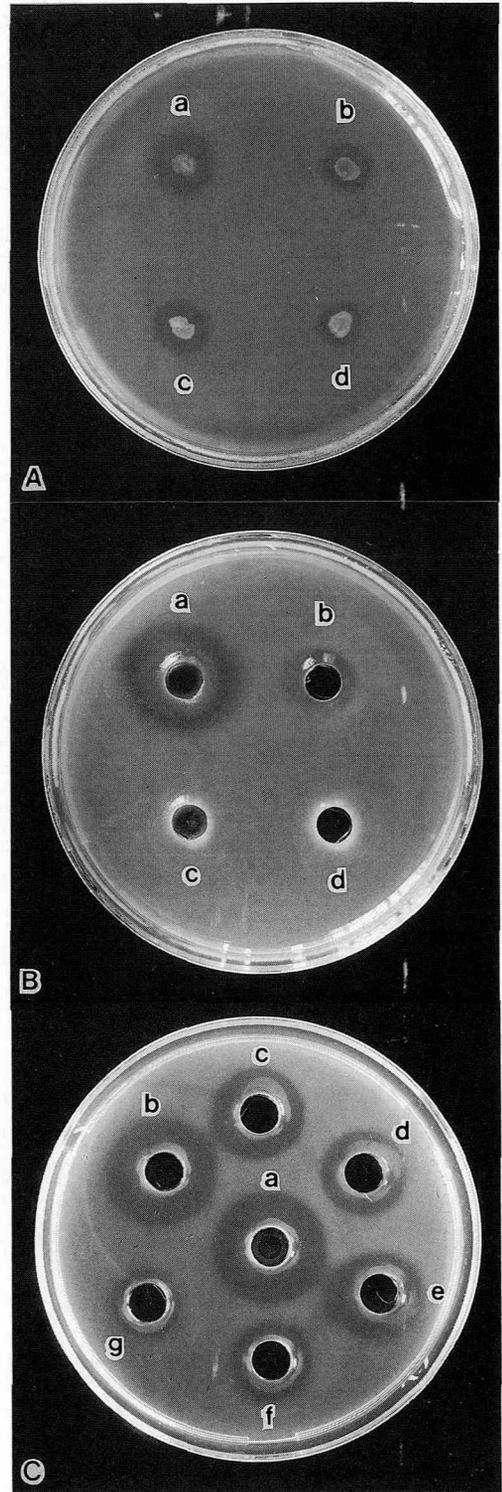
c: Heated sample of a.

d: Heated sample of b.

C; Effect of dilution of the cell sonicate (NF-10);

a: Original concentrate

b-g: 2-fold dilution of original sample, respectively



分離・同定した *S. sanguis* NF-10を供試して抗菌物質の精製を行った。すなわち、本菌株を0.2% Yeast Extract 加 BHI broth (4 ℓ) で嫌気培養して得た菌体を、0.05M Tris-HCl buffer (pH7.2)に懸濁して超音波処理した⁹⁾。この超遠心(10万 G, 40 min, 4℃)上清を精製の出発試料として Q-Sepharose, Sephacryl S-300, Hydroxylapatite カラムクロマトおよび PAGE 法によって精製した。

5. 蛋白質の定量

標準標品として bovine serum albumin (Sigma 社) を使用して、Lowry¹⁷⁾らの方法によって測定した。

結 果

1. 抗菌活性産生菌の生物学的性状

分離 5 菌株の生物学的性状は、いずれもグラム陽性のレンサ球菌で MS 培地で増殖した。全株がアセトインを産生せず、esculin を水解し、arginine からアンモニアを産生し、catalase 陽性であった。また、sucrose から可溶性 glucan を合成した。炭水化物分解能は、glucose, sucrose, raffinose および inulin を分解したが、mannitol および sorbitol を分解しなかった。これら生物学的性状は *S. sanguis* の性状¹⁶⁾と一致した。これらの生物学的性状から、本活性産生の分離菌株を *S. san-*

guis と同定した。

2. 分離菌の阻止活性

5 菌株は、stab culture 法で *B. gingivalis*(381) に対し 3~5 mm の明瞭な阻止帯を発現した (Fig. 1-A)。各菌株の阻止活性を GAM broth (300 ml) で培養した菌体(超音波抽出)試料および培養上清(80%硫酸飽和画分)試料について調べると、いずれも培養上清試料に対して菌体の超音波抽出試料の活性が強く発現した (Fig. 1-B, C)。この成績から、本菌の阻止活性は菌体結合性であると考えられた。

3. 抗菌物質の精製

菌体を超音波処理して得た試料の Q-Sepharose (0.05M Tris-HCl buffer pH7.2; カラム, 2.6×38.0 cm, Fraction, 15 ml/tube) カラムクロマトの溶出パターンは Fig. 2 に示した。阻止活性は、本カラムに吸着し、これを食塩濃度勾配で溶出すると 0.3~0.4 M 食塩濃度で溶出した。この活性画分を集めて濃縮・透析し、この試料を Sephacryl S-300 (0.15M NaCl 加 0.05M Tris-HCl buffer pH7.2; カラム, 2.6×90 cm, Fraction, 5 ml/tube) でゲル濾過すると、活性は Fraction No. 62 をピークとする 280 nm 吸光度と一致して溶出した (Fig. 3)。この活性画分を集め、これを 10 mM phosphate buffer (pH7.0) で透析した試料を同 buffer で平衡化した Hydroxylapatite カ

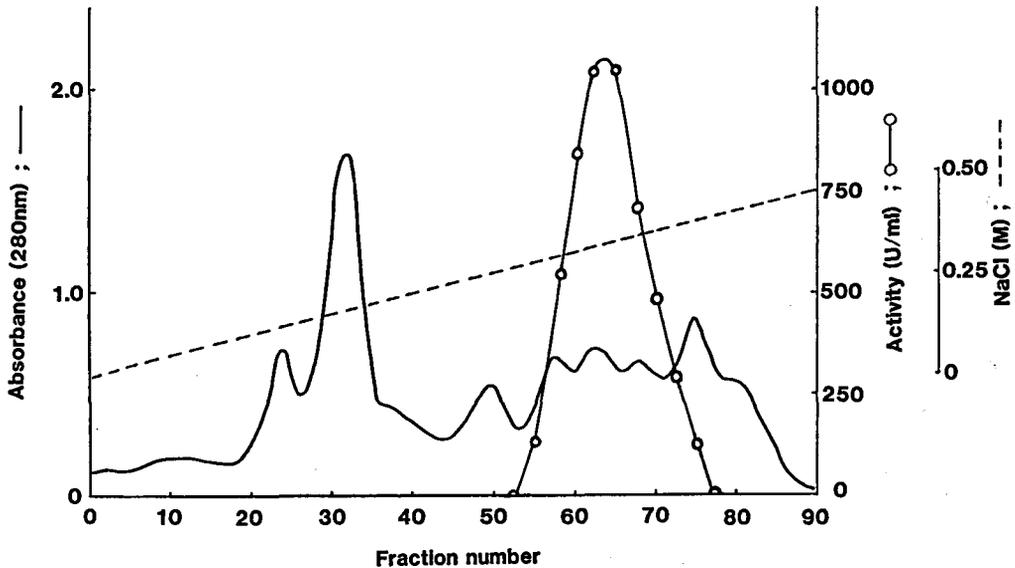


Fig. 2: Q-Sepharose column chromatography of antibacterial agent

ラム (2.6×10.0 cm) に吸着させ、同 buffer の濃度勾配で溶出 (Fraction: 8 ml/tube) すると活性は、前溶出の大きな 280 nm 吸光度ピークとは一致せず、70~100 mM 濃度で溶出した (Fig. 4)。さらにこの活性画分を集め濃縮後、0.05 M Tris-HCl buffer (pH7.2) に対して透析した試料を 7.5% polyacrylamide スラブ (130×110×3 mm) を用

いて電気泳動的 (4℃) に抗菌物質の分離・精製を行った。すなわち、泳動ゲルを連続切片 (3 mm) として切り出し、各切片ゲルは 20 ml の Tris-HCl buffer (pH7.2) で振盪 (24時間, 4℃) 抽出して各 Fraction の活性を調べた。活性は No. 14 の Fraction (泳動: 39~42 mm) のみに強く認められた。この活性画分試料の精製純度を再び PAGE

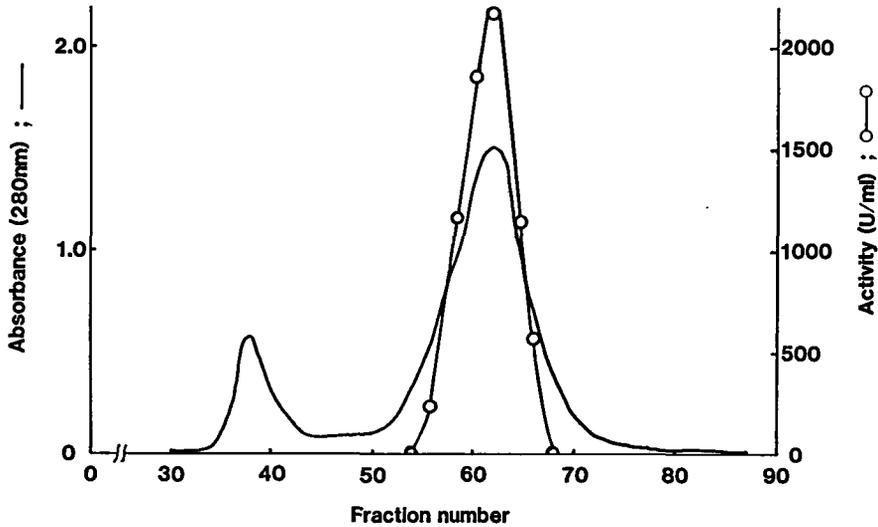


Fig. 3: Sephacryl S-300 gel filtration of antibacterial agent

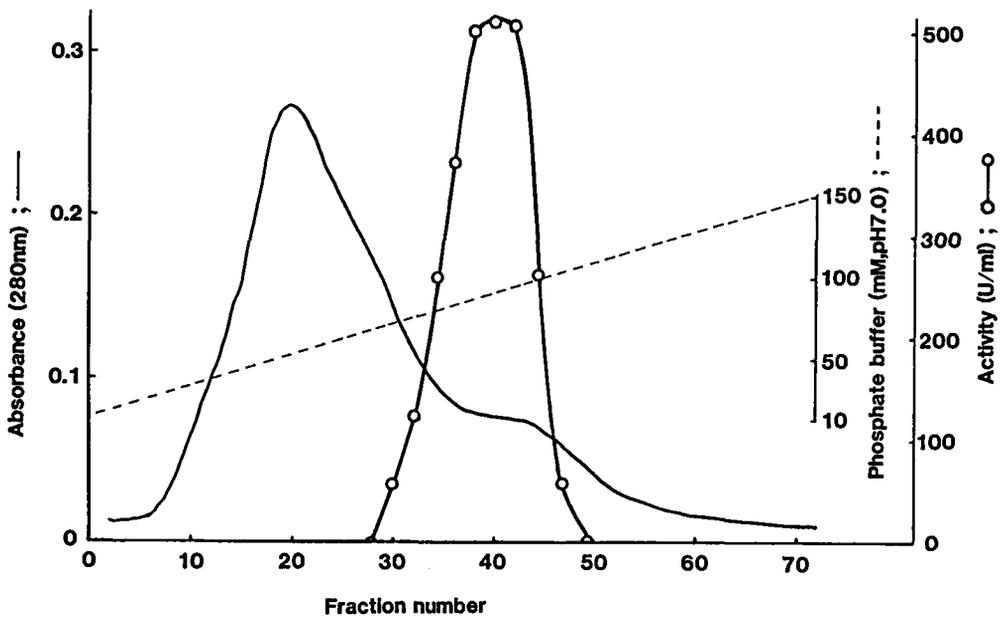


Fig. 4: Hydroxylapatite column chromatography of antibacterial agent

によって調べたところ、銀染色で単一の染色バンドが得られた(Fig. 5)。このPAGE所見から、本抗菌物質は以上の精製過程によって極めて高純度に精製されたものと考えられた。

各精製過程における成績はTable 1に一括した。菌体の超音波処理の出発試料に対して、最終的なPAGEによって得た精製試料の比活性は約84倍に上昇し、その回収率は15.3%であった。

4. 抗菌物質の性状

1) 等電点 (pI)

等電点はVesterberg¹⁸⁾らの方法に準じてカラ



Fig. 5: Polyacrylamide gel electrophoresis (silver stained) of the purified antibacterial agent.

ム等電点電気泳動法によって調べた。すなわち、精製試料(4000 U)を1%グリシン液に対して24時間透析後、この試料を110 mlのカラム(LKB)にpH3.5~10.0のアンフォライト(LKB)を1%濃度に加え、600 V定電圧で24時間泳動後、各Fractionを3 ml/tubeで分取した。各画分のpHおよび280 nm吸光度を測定した後、0.05M Tris-HCl buffer (pH7.2)に対して24時間(4℃)透析し、各画分について阻止活性を調べたところ、pH4.5を中心とした280 nmの吸光度ピークと一致して最大活性を示した(Fig. 6)。この成績から本抗菌物質の等電点(pI)は4.5と推定された。

2) 分子量

分子量は、SDS-PAGE法¹⁹⁾によって測定した。抗菌物質は標準蛋白質のphosphorylase b (94 K)とbovine serum albumin (67 K)の間に泳動し、その分子量は74,000と算定された(Fig. 7, Fig. 8)。

3) 熱抵抗性

精製試料を40~70℃の各温度で10分間処理した後、残存活性を測定したところ、40~45℃では活性に影響はみられなかったが、50℃、10分ですでに40%程度の活性低下がみられ、60℃、10分で完全に失活した(Fig. 9)。この成績から本抗菌物質は極めて易熱性蛋白質と考えられた。

4) 抗菌スペクトラム

主要な標準および教室保存菌株計18株を供試して抗菌スペクトラムを調べた成績は、Table 2に一括した。本抗菌物質は、供試指示菌株中黒色色素産生 *Bacteroides* である *B. gingivalis* (381, ATCC33277) および *B. intermedius* (ATCC-25611) のみに極めて感受性を有していた。また、本抗菌物質の阻止作用は生菌数の測定結果から静菌的と考えられた。しかし、その他の供試グラム陽・陰性の球・桿菌株に対しては全く阻止作用を示さなかった。

Table 1: Purification of antibacterial agent from oral *S. sanguis*

Step	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	272.4	56,320	206.7	1	100
Q-Sepharose	60.3	40,310	668.6	3.2	71.5
Sephacryl S-300	32.8	32,640	995.1	4.8	57.9
Hydroxylapatite	2.1	20,160	9,600.0	46.4	35.7
PAGE	0.5	8,670	24,820.0	83.9	15.3

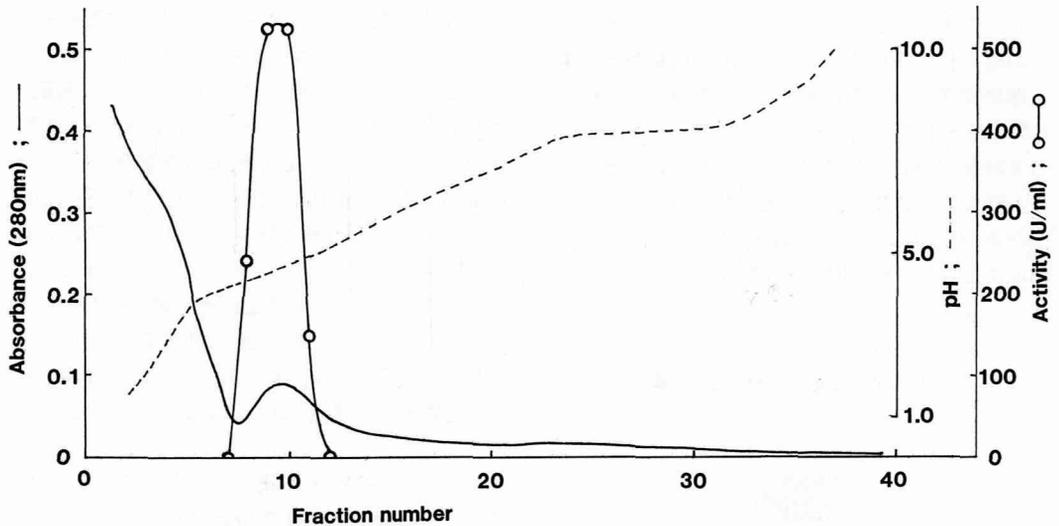


Fig. 6: Isoelectric focusing of the purified antibacterial agent

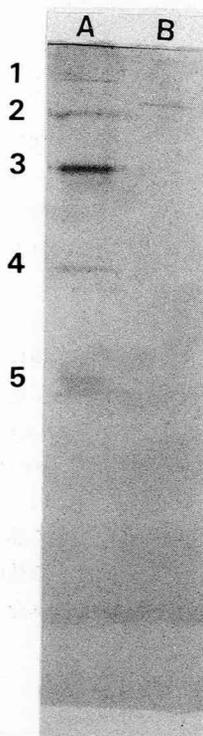


Fig. 7: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (silver stained) of the purified antibacterial agent.

A; Standard protein, 1: phosphorylase b, 2: bovine serum albumin, 3: ovalbumin, 4: carbonic anhydrase, 5: trypsin inhibitor

B; Purified antibacterial agent

考 察

B. gingivalis に対する歯肉溝細菌の抗菌活性を指標として平板法で調べたところ、6例中3例の歯肉溝材料から本菌に対して強い阻止活性を有するレンサ球菌株が分離され、その生物学的性状から *S. sanguis* と同定された。*S. sanguis* は歯垢や歯肉溝菌叢での優勢菌種である^{20),21)}。しかし、歯肉溝材料の培養平板上で阻止帯を発現する集落数は必ずしも多くはないこと、また、明瞭な阻止活性が検出されず、分離されなかった歯肉溝材料例もあった。これらの知見から、本抗菌活性は口腔 *S. sanguis* の普遍的属性ではなく、Bacteriocinogenic²²⁾なレベルと考えられる。

われわれは、すでに歯垢から分離した *S. sanguis* のバクテリオシン様 (sanguicin) 活性とその性状について明らかにしている^{8),10),23)}が、sanguicin と、本研究で明らかになった抗菌物質とは分子量や抗菌スペクトラムなどの性状が明らかに異なるものであった。すなわち、sanguicin の分子量は280,000と大きく、また、抗菌スペクトラムも黒色色素産生 *Bacteroides* (*B. melaninogenicus*) のほかに *B. heparinolyticus*, *P. acnes*, *B. ochraceus*, *A. viscosus* および *A. naeslundii* に阻止作用を示し、その抗菌スペクトラムも広い。これに対し本抗菌物質の分子量は、74,000と小さく、抗菌スペクトラムも *B. gingivalis* および *B. inter-*

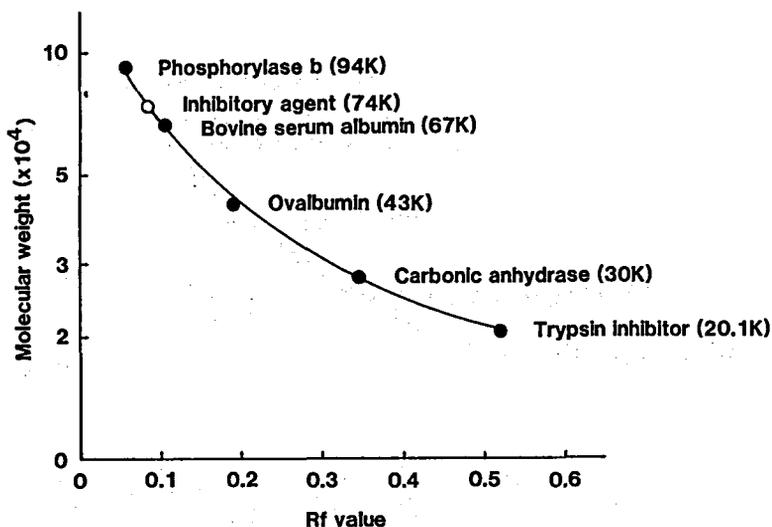


Fig. 8 : Estimation of molecular weight of antibacterial agent by SDS-PAGE

Table 2 : Inhibitory spectrum of antibacterial agent from oral *S. sanguis*

Microorganisms	Strain	Susceptibility
<i>Bacteroides gingivalis</i>	381	##
<i>Bacteroides gingivalis</i>	ATCC 33277	##
<i>Bacteroides intermedius</i>	ATCC 25611	##
<i>Staphylococcus aureus</i>	209P	—
<i>Streptococcus mutans</i>	Ingbritt	—
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 10556	—
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 10557	—
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 9811	—
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 9759	—
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 1469	—
<i>Bacterionema matruchotii</i>	ATCC 14266	—
<i>Actinomyces viscosus</i>	ATCC 19246	—
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC 12104	—
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	ATCC 33624	—
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	ATCC 33596	—
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	F-9	—
<i>Bacteroides heparinolyticus</i>	ATCC 35895	—
<i>Bacteroides oralis</i>	ATCC 33269	—

: Inhibition positive ; 64 fold dilution of the purified antibacterial agent

— : Inhibition negative ; original concentrate of the purified antibacterial agent

medius の黒色素産生 *Bacteroides* のみに感受性を有する狭いものであった。これら両 *S. sanguis* の抗菌物質の諸性状が異なる事実は、口腔内 *S. sanguis* の抗菌的屬性が多様であることを示唆する。

バクテリオシンないしバクテリオシン様活性に

起因した細菌間拮抗現象がいくつかの感染例で証明されており^{24)~27)}、歯垢や歯肉溝菌叢で優勢を占める *S. sanguis* 中これら抗菌活性を有する *S. sanguis* の存在は生態学上意義深い。本研究で明らかになった *S. sanguis* の抗菌活性は、成人歯周炎の主要病原菌種である *B. gingivalis* および *B.*

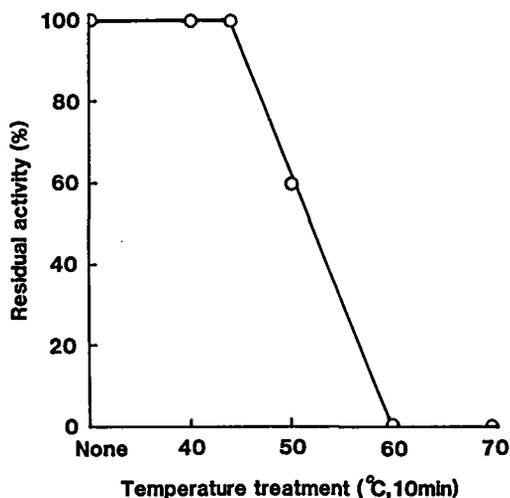


Fig. 9: Heat stability of antibacterial agent

intermedius のみに感受性であることは、本活性が歯肉溝菌叢内でもこれら菌種に作用する可能性が強いからである。歯肉溝菌叢内におけるこれら *S. sanguis* の抗菌活性を通じての生態学的役割については、さらに産生菌数や感受性である黒色素産生菌数などの定量的検討も必要であると考え

結 論

B. gingivalis に対する歯肉溝細菌の抗菌活性を検索して、強い活性を有する 5 菌株を分離した。この分離菌株はいずれもグラム陽性のレンサ球菌で、その生物学的性状から *S. sanguis* と同定された。分離 *S. sanguis* の抗菌活性は菌体結合性であった。抗菌物質は、NF-10 菌株の培養菌体を超音波処理して得た試料を、Q-Sepharose, Sephacryl S-300, Hydroxylapatite カラムクロマトグラフィおよび PAGE 法によって精製した。

精製試料は、PAGE で単一のバンドを示し、比活性は 83.9 倍に上昇し、回収率は 15.3% であった。抗菌物質の分子量は 74,000、等電点 (pI) は 4.5 であった。本活性は、60°C、10 分処理で失活した。この精製抗菌物質は、主要口腔細菌種 18 菌株中、*B. gingivalis* および *B. intermedius* のみに阻害作用を有し、その抗菌スペクトラムが狭いものであった。

文 献

- 1) Burnett, G. W., Scherp, H. W. and Schuster, G. S. (1976) Oral microbiology and infectious disease. 4th ed pp. 259—382. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 2) Fitzgerald, R. J. and Keyes, P. H. (1960) Demonstration of the etiologic role of *streptococci* in experimental caries in the hamster. J. Am. Dent. Assoc. 61: 9—19.
- 3) Hamada, S. and Slade, H. D. (1980) Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44: 331—381.
- 4) Syed, S. A. and Loesche, W. J. (1978) Bacteriology of human experimental gingivitis: Effect of plaque age. Infect. Immun. 21: 821—829.
- 5) 奥田克爾 (1981) 歯周疾患の病原菌とその免疫 (part I), 同 (part II). 歯科ジャーナル. 13: 476—492, 13: 619—629.
- 6) Slots, J. and Genco, R. J. (1984) Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factor in colonization, survival and tissue destruction. J. Dent. Res. 63: 412—421.
- 7) Socransky, S. S. (1970) Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J. Dent. Res. 49: 203—222.
- 8) Nakamura, T., Suginaka, Y., Obata, T., Obata, N. and Yamazaki, N. (1977) Bacteriocin-like activities of human dental plaque flora against oral anaerobic microorganisms. Bull. Tokyo Dent. Coll. 18: 217—229.
- 9) Fujimura, S. and Nakamura, T. (1978) Purification and properties of a bacteriocin-like substance (acnecin) of oral *Propionibacterium acnes*. Antimicrob. Agents Chemother. 14: 893—898.
- 10) Fujimura, S. and Nakamura, T. (1979) Sanguicin, a bacteriocin of oral *Streptococcus sanguis*. Antimicrob. Agents Chemother. 16: 262—265.
- 11) Nakamura, T., Fujimura, S., Obata, N. and Yamazaki, N. (1981) Bacteriocin-like substance (Melaninocin) from oral *Bacteroides melaninogenicus*. Infect. Immun. 31: 28—32.
- 12) Nakamura, T., Yamazaki, N., Taniguchi, H. and Fujimura, S. (1983) Production, purification, and properties of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* isolated from saliva. Infect. Immun. 39: 609—614.
- 13) 中村 武 (1983) 抗菌物質産生の口腔細菌とその

- 生態. 松本歯学. 9 : 135—150.
- 14) Nakamura, T., Kanagawa, N. and Fujimura, S. (1984) Bacteriocin activity of the bacterium *Bacterionema matruchotii* isolated from dental plaque in man. Archs. Oral Biol. 29 : 739—743.
 - 15) Okuda, K. and Takazoe, T. (1988) The role of *Bacteroides gingivalis* in periodontal disease. Adv. Dent. Res. 2 : 260—280.
 - 16) Carlsson, J. (1968) A numerical taxonomic study of human oral *Streptococci*. Odont. Revy 19 : 137—160.
 - 17) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265—275.
 - 18) Vesterberg, O., Wadstrom, T., Vesterberg, K., Svensson, H. and Malmgren, B. (1967) Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*, I. Separation and characterization of enzymes and toxin by isoelectric focusing. Biochem. Biophys. Acta. 133 : 435—445.
 - 19) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
 - 20) Gibbons, R. J., Socransky, S. S., Dale, A. C. and Van Houte, J. (1964) Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque. Archs. Oral Biol. 9 : 365—370.
 - 21) Socransky, S. S., Gibbons, R. J., Dale, A. C., Bortnick, L., Rosenthal, E. and Macdonald, J. B. (1963) The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts of specific organisms. Archs. Oral Biol. 8 : 275—280.
 - 22) Ivanovics, G. (1962) Bacteriocin and bacteriocin-like substance. Bacteriol. Rev. 26 : 108—118.
 - 23) 中村 武, 杉中芳幸, 山崎宣夫, 小幡直樹(1977) 歯垢より分離した bacteriocin 様活性産生菌の生物学的性状. 松本歯学 3 : 8—14.
 - 24) Johanson, W. G. Jr., Blackstock, R. Pierr, A. K. and Sanford, J. P. (1970) The role of bacterial antagonism in Pneumococcal colonization of the human pharynx. J. Lab. Clin. Med. 75 : 946—952.
 - 25) Rogers, A. H., Van der Hoeven, J. S. and Mikx, F. H. (1979) Effect of bacteriocin production by *Streptococcus mutans* on the plaque gnotobiotic rats. Infect. Immun. 23 : 571—576.
 - 26) Russell, C. and Tagg, J. R. (1981) Role of bacteriocin during plaque formation by *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* on a tooth in an artificial mouth. J. Appl. Bact. 50 : 305—313.
 - 27) Ikeda, T., Iwanami, T., Hirasawa, M., Watanabe, C., McGhee, J. R. and Shiota, T. (1982) Purification and certain properties of a bacteriocin from *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 38 : 861—868.