

〔原著〕 松本歯学 3 : 8~14, 1977

歯垢より分離した bacteriocin 様活性産生菌の 生物学的性状

中村 武, 杉中芳幸, 山崎宣夫, 小幡直樹

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

Biological Characteristics of Bacteriocin-like Activity Producing Microorganisms Isolated from Human Dental Plaque

TAKESHI NAKAMURA, YOSHIYUKI SUGINAKA, NORIO YAMAZAKI and NAOKI OBATA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. T. Nakamura)

Summary

It was found by the authors that there was an activity which inhibited oral *Bacteroides* sp. and *Propionibacterium acnes* in the cultured cells of dental plaque. This inhibitory activity is derived from the bacteriocin-like activity producing microorganisms in dental plaque, but they have not been identified as yet. Twenty strains of bacteriocin-like activity producing microorganisms, isolated from adult dental plaques, were investigated their biological characteristics.

The bacteriocin-like activity producing strains proved to be Gram positive *Streptococci*. They grew well anaerobically, and were catalase negative. They produced α -hemolysis on blood agar, and grew on the Mitis-Salivarius agar and 40% bile blood agar, while they failed to grow in 6.5% saline broth, at 10°C and pH 9.6 broth. However, nine strains of them grew in either medium at 45°C. All strains produced ammonia from arginine. Twelve strains of them extracellularly synthesized polysaccharides in a 5% sucrose-containing broth. These strains fermented various carbohydrates, but all of strains failed to ferment mannitol, sorbitol and glycerol. Most of strains fermented inulin, while only few of strains fermented starch and raffinose. From these biological characteristics, the bacteriocin-like activity producing strains were identified as *Streptococcus sanguis*.

Streptococcus sanguis is a predominant species of dental plaque flora. From the bacteriocin-like activity of this species which inhibits the anaerobes important to the etiology of periodontal diseases, the possible role and significance of *Streptococcus sanguis* in the oral cavity was discussed.

結 言

口腔常在菌叢は、複雑な菌種で構成⁴⁾されている。これら細菌叢の生態学を明らかにすることは、indogenous infection である口腔領域疾患の病因に関連して重要である。しかし口腔細菌叢における生態学は、不明な点が多い²⁴⁾。口腔細菌の antagonistic factor として、近年、齲蝕の病因に関連する *Streptococcus mutans* の bacteriocin²⁾ 16)¹⁷⁾ が注目されている。著者らは、口腔内細菌の菌種相互作用を明らかにするために、歯垢細菌の bacteriocin 様活性について、系統的に検討している^{21) 22)}。これまで、歯垢培養菌中に歯周疾患の病因に重要な役割を有する *Bacteroides melaninogenicus*, heparinase 産生性 *Bacteroides*,²⁰⁾ *Propionibacterium acnes*²⁸⁾ および dextran 分解性の *Bacteroides ochraceus*²³⁾ の発育を阻害する bacteriocin 様活性を見出した²¹⁾。

本研究は、これら口腔内嫌気性菌の発育を阻害する bacteriocin 様活性産生菌を成人歯垢から分離して、本菌の生物学的性状を検索したものである。

実 験 方 法

生物学的性状の検索に供試した菌株は、16名の本学学生(19~24歳)の歯垢より血液平板を使用して分離した bacteriocin 様活性産生菌20株である。なお、本菌の培養は、いずれも anaerobic glove box¹⁾ (Coy社, Michigan) で嫌気培養した。これらの菌株は、*Bacteroides melaninogenicus*, heparinase 産生性 *Bacteroides*, *Propionibacterium acnes* および *Bacteroides ochraceus* の発育を阻害する菌株である (Fig. 1—a.b)。

生物学的性状の検索は、主に、口腔内レンサ球菌を対象とした Carlsson^{5) 6)} および Edwards^{10) 19)} らの方法に準じて行った。

形態学的観察は、Trypticase soy broth (Difco) の18時間培養菌を gram 染色して行った。catalase 産生は、Trypticase soy 平板上の24時間培養集落に3% H₂O₂ 溶液を滴下し、発泡の有無で検した。溶血性は、5%血液平板 (Heart Infusion broth (Difco) に5%馬血液, 1.5% agar を添加) に24時間培養後判定した。40% bile 加血液平板上の発育は、5%血液平板に40% oxgall (Difco)

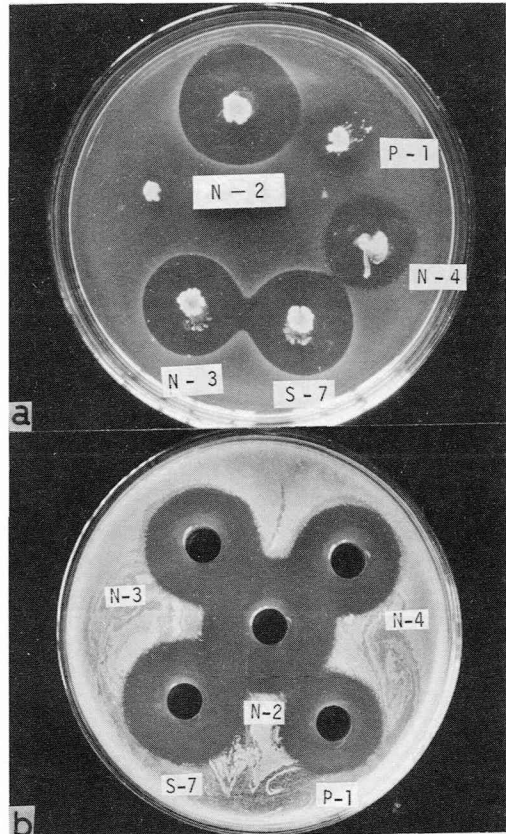


Fig. 1. Growth inhibition of *Bacteroides* sp. by *Streptococcus* strains isolated from human dental plaque.

- indicator: *B. melaninogenicus* (Stab culture method).
- indicator: heparinase-producing *Bacteroides*, 70% ammonium sulfate fraction extracted from ultrasonicated cell of bacteriocin-like activity producing strains (Diffusion method).

を添加した培地を使用した。また Mitis-Salivarius agar (Difco) での発育も検した。10℃ および 45℃ における発育能は、litmus milk tube (Oxoid) を使用し、10℃ および 45℃ で一週間培養後色調の変化で判定した。6.5%食塩培地における発育は、phenol red broth base (Difco) に1% glucose および6.5%食塩加培地を使用した。pH 9.6 broth の発育は、Trypticase soy broth を1% NaOH 溶液を用いて pH 9.6 にした培地で検索した。arginine からアンモニアの産生は、Niven らの方法²⁵⁾によった。すなわち、arginine broth (Tryptone Yeast Extract 5g, K₂HPO₄ 2g,

glucose 0.5g, arginine monohydrochloride 3g, 水 1,000 ml) で 3 日培養液の 5 ml に 0.25 ml の Nessler 試薬²⁷⁾を添加して黄褐色を呈するものを陽性とした。glucose から acetoin の産生は, MRVP-medium (Oxoid, CM43) で 7 日間培養後 Barritts 法⁸⁾によって判定した。菌体外多糖体の合成能は, 5% sucrose 加 BHI broth (Difco) で 48 時間培養後, この培養液の遠沈 (12,000r.p.m, 20 分) 上清に 1.2 倍量の ethanol を添加し, 白濁度から判定²³⁾した。付着性は, 5% sucrose 加 BHI broth 中のガラス棒およびステンレス線を使用し

て検した。

炭水化物分解能は, 教室常用の Trypticase broth (glucose を含まない) に, 0.07% agar および各供試 12 種の炭水化物を 1% に添加した培地で 7 日間培養した後, 0.02% BTB 溶液を滴下して判定した。

実験成績

bacteriocin 様活性産生菌は, 形態学的にいずれも gram 陽性のレンサ状球菌であった。これら菌株の生物学的性状は, Table 1 および Table 2 に

Table 1. Biological characteristics of bacteriocin-like activity producing *Streptococcus* strains isolated from human dental plaque

Tested strains	Gram stain	Form	Biological characteristics										
			Hemo-lysis	M-S agar	40% bile -blood	Growth		6.5% NaCl	pH 9.6 broth	Ammonia from arginine	Acetoin from glucose	Poly-saccharide synthesis	Cata-lase
A - 1	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
B - 2	+	cocci	alpha	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
D - 1	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
E - 3	+	cocci	alpha	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
F - 1	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
F - 3	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
M - 2	+	cocci	alpha	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
N - 1	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
N - 2	+	cocci	alpha	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
N - 5	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
N - 6	+	cocci	alpha	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
N - 8	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
O - 1	+	cocci	alpha	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
P - 1	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
P - 5	+	cocci	alpha	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
R - 1	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
S - 2	+	cocci	alpha	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
S - 6	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
S - 7	+	cocci	alpha	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
T - 2	+	cocci	alpha	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-

+ : Positive

- : Negative

Table 2. Biological characteristics of bacteriocin-like activity producing *Streptococcus* strains isolated from human dental plaque

Characteristics	Results/ Tested strains	Per cent of positive
Hemolysis: alpha	+ 20/20	100
Growth on: mitis-salivarius agar	+ 20/20	100
40% bile-blood agar	+ 20/20	100
Growth at: 10°C	- 20/20	0
45°C	+ 9/20, - 11/20	45
Growth in: 6.5% NaCl broth	- 20/20	0
pH 9.6 broth	- 20/20	0
Ammonia from arginine	+ 20/20	100
Acetoin from glucose	- 20/20	0
Extra-cellular polysaccharide from sucrose	+ 12/20, - 8/20	60
Catalase	- 20/20	0

示す如くである。全株が嫌気性で発育が良く、血液平板上で α 溶血を示す S 型集落であった。Mitis-Salivarius agar 平板に発育し、本培地では濃青色で培養時間と共にやや培地固着性集落を呈した。40% bile 加血液平板でも発育が認められた。10°C では全株が発育しなかったが、45°C で 9 株が発育した。6.5%食塩および pH 9.6 の液体培地では、いずれの菌株も発育しなかった。全株が arginine からアンモニアを産生し, glucose から acetoin および catalase は陰性であった。12 株が sucrose から菌体外多糖体を合成した。これら合成能のある菌株は, いずれもガラスおよびステンレス線に付着性を示した。

炭水化物分解能は、Table 3 および Table 4 に示す如く、全株が、glucose, maltose, lactose, sucrose, trehalose および cellobiose を分解した。しかし mannitol, sorbitol および glycerin 分

解能は、いずれの菌株にも認められなかった。inulin は、20 株中 12 株が分解し、starch および raffinose はそれぞれ 14 株、15 株が分解しなかった。

Table 3. Carbohydrate fermentation of bacteriocin-like activity producing *Streptococcus* strains isolated from dental plaque

Tested strains	Glucose	Maltose	Lactose	Sucrose	Trehalose	Acid from Cellobiose	Inulin	Starch	Raffinose	Mannitol	Sorbitol	Glycerin
A - 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B - 2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
D - 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E - 3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
F - 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
F - 3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
M - 2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
N - 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
N - 2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
N - 5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
N - 6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
N - 8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
O - 1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
P - 1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
P - 5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
R - 1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
S - 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S - 6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S - 7	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
T - 2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-

+ : Positive

- : Negative

Table 4. Carbohydrate fermentation of bacteriocin-like activity producing *Streptococcus* strains isolated from human dental plaque

Carbohydrate	Results / Tested strains	Per cent of positive
Acid from Glucose	+ 20/20	100
Maltose	+ 20/20	100
Lactose	+ 20/20	100
Sucrose	+ 20/20	100
Trehalose	+ 20/20	100
Cellobiose	+ 20/20	100
Inulin	+ 12/20, - 8/20	60
Starch	+ 6/20, - 14/20	30
Raffinose	+ 5/20, - 15/20	25
Mannitol	- 20/20	0
Sorbitol	- 20/20	0
Glycerin	- 20/20	0

考 察

bacteriocin 様活性産生菌の生物学的性状を Bergey's manual of Determinative Bacteriology³⁾に徴してみると *Streptococcus sanguis* の性状と近似する。*Streptococcus sanguis* は、口腔内レンサ球菌中、近年、齲蝕誘発性ないし歯垢形成機序の面から注目されている *Streptococcus mutans* 7) 11) 12) 15) 18) と極めて類似し、しばしば分類学的に問題とされる菌種である。しかし、*Streptococcus mutans* との主な criteria の key は、arginine からのアンモニアの産生、mannitol および sorbitol の非分解性である^{5) 6) 9) 10) 19)}。ここに示された bacteriocin 様活性産生菌は、これらの性状が明らかに *Streptococcus mutans* と異なっている。また、口腔より分離した *Streptococcus sanguis* について、Carlsson⁵⁾ および White and Niven²⁹⁾ らの成績と比較すると Table 5 の如く、著者らの分離菌

Table 5. Comparison of biological characteristics between bacteriocin-like activity producing *Streptococcus* strains and reference strains

Characteristics	Bacteriocin-like activity producing <i>Streptococcus</i>		<i>Streptococcus sanguis</i>	
	Results/Tested strains	Our strains (1977)	Carlsson (1965)	White and Niven (1946)
Growth in 6.5% NaCl broth	— 20/20	0	0	0
Ammonia from arginine	+ 20/20	100	96	100
Acid from Lactose	+ 20/20	100	100	100
Raffinose	+ 5/20	25	23	33
Inulin	+ 12/20	60	96	81
Mannitol	— 20/20	0	0	0
Sorbitol	— 20/20	0	.	.

Numerals : express in per cent positive

は、これら先人の性状と一致する。従って口腔内 *Bacteroides* sp. および *Propionibacterium acnes* の発育を阻害する bacteriocin 様活性を有する菌種は *Streptococcus sanguis* と考えられる。

さて、口腔内細菌叢の部位別特長として、*Streptococcus sanguis* は、唾液ないし歯肉溝に少ない¹³⁾。しかし *Streptococcus mutans* および *Streptococcus mitis* などと共に歯垢に多く存在し、歯垢細菌叢の主要菌種である^{13) 14) 26)}。著者らが口腔細菌の bacteriocin 様活性を系統的に検討し、成人のいずれの歯垢培養例においても嫌気性菌の発育を強く阻害する活性を認め得たことは²¹⁾、*Streptococcus sanguis* の口腔内常在性を如実に示すものである。*Streptococcus sanguis* の歯垢細菌叢における分布状況からみて^{13) 14) 26)}、本菌の保有する bacteriocin 様活性は、歯周疾患の病因に重要な役割を有する種々の *Bacteroides* (dextran 分解性 *Bacteroides ochraceus* を含む) および *Propionibacterium acnes* に特異的であることは注目すべき点である。近年、歯垢中に多い *Streptococcus mutans* の bacteriocin が報告されているが^{2) 17)}、これらは嫌気性菌に対する作用は認められない¹⁶⁾。また、*Streptococcus sanguis* の bacteriocin 様活性は、液体培地中においても明らかに阻害を示す^{21) 22)}ことから、本菌の bacteriocin 様活性は、口腔内においても上述の嫌気性菌に作用し、歯垢細

菌叢構成に影響を及ぼす可能性が十分考えられる。もちろん、口腔細菌叢の部位別菌種構成には、局所における種々物理化学的ないし栄養学的要因もあろう⁴⁾。しかし、*Streptococcus sanguis* の保有する bacteriocin 様活性に感受性であるこれら嫌気性菌は、歯肉溝に多く、歯垢中に少ない事実^{13) 14)}は著者らが見出した bacteriocin 様活性による拮抗現象が細菌叢構成に深く関連する事を支持する。口腔細菌叢の生態学は、これら菌種間における作用機序を糸口として解明しなければなるまい。

結 論

本学学生の歯垢より、種々の *Bacteroides* および *Propionibacterium acnes* の発育を阻害する bacteriocin 様活性産生菌 20 株を分離し、その生物学的性状を検索した。これら bacteriocin 様活性産生菌株は、形態学的にいずれも gram 陽性のレンサ球菌で、genus *Streptococcus* に属するものであった。本菌の生物学的性状は、Bergey の分類および口腔内レンサ球菌についての先人が報告した *Streptococcus sanguis* の性状と一致していた。歯垢から分離したこれら bacteriocin 様活性産生菌を、*Streptococcus sanguis* と同定した。

Streptococcus sanguis は、歯垢細菌叢で predominant な species である。歯周疾患の病因に重

要な嫌気性菌を阻害する *Streptococcus sanguis* の保有する bacteriocin 様活性を通じて、本菌の口腔細菌叢に及ぼす役割と意義について考察した。

文 献

- 1) Aranki, A., Syed, A. S., Kenny, B. E. and Fretter, R. (1969) Isolation of anaerobic bacteria from human gingiva and mouse cecum by means of a simplified glove box procedure. Appl. Microbiol. 17: 568—576.
- 2) Berkowitz, J. R. and Jordan, V. H. (1975) Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. Archs oral Biol. 20: 731—734.
- 3) Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., Cowan, S. T., Hat, J. G., Liston, J., Murray, R. G. E., Niven, C. F., Ravin, A. W. and Strier, R. Y. (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., p. 490—509, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 4) Burnett, W. G., Schep, W. H. and Schuster, S. G. (1976) Microbial flora of the oral cavity. Oral Microbiology and Infectious Disease. 4th ed., p. 219—258, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 5) Carlsson, J. (1965) Zooglyca-forming *Streptococci*, resembling *Streptococcus sanguis*, isolated from dental plaque in man. Odont. Revy, 16: 348—358.
- 6) Carlsson, J. (1968) A numerical taxonomic study of human oral *Streptococci*. Odont. Revy, 19: 137—160.
- 7) Carlsson, J. (1968) Plaque formation and *Streptococcal* colonization on teeth. Odont. Revy, 19 (Suppl.): 1—14.
- 8) Cowan, S. T. and Steel, K. J. (1965) Manual for the Identification of Medical Bacteria. p. 160, Cambridge at the University press. London.
- 9) Edwardsson, S. (1968) Characteristics of caries-inducing human *Streptococci* resembling *Streptococcus mutans*. Archs oral Biol. 13: 637—646.
- 10) Edwardsson, S., Koch, G. and Öbrink, M. (1972) *Strep. sanguis*, *Strep. mutans* and *Strep. salivarius* in saliva. Odont. Revy, 23: 279—296.
- 11) Facklam, R. R. (1974) Characteristics of *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and blood. Int. J. syst. Bacterial. 24: 313—319.
- 12) Fitzgerald, R. J. and Keyes, P. H. (1960) Demonstration of the etiologic role of *Streptococci* in experimental dental caries in the hamster. J. Am. dent. Ass. 61: 9—19.
- 13) Gibbons, R. J., Socransky, S. S., Sauyer, S., Kapsimalis, B. and Macdonald, J. B. (1963) The microbiota of the gingival crevice area of man; II The predominant cultivable organisms. Archs oral Biol. 8: 281—289.
- 14) Gibbons, R. J., Socransky, S. S., de Araujo, W. C. and van Houte, J. (1964) Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque. Archs oral Biol. 9: 365—370.
- 15) Gibbons, R. J. and Fitzgerald, R. J. (1969) Dextran induced agglutination of *Streptococcus mutans* and its potential role in formation of microbial dental plaque. J. Bact. 98: 341—346.
- 16) Hamada, S. and Ooshima, T. (1975) Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (Mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res. 54: 140—145.
- 17) Kelstrup, J. and Gibbons, R. J. (1969) Bacteriocins from human and rodent *Streptococci*. Archs oral Biol. 14: 251—258.
- 18) Krasse, B. (1966) Human *Streptococci* and experimental caries in hamsters. Archs oral Biol. 11: 429—436.
- 19) Mejare, B. and Edwardsson, S. (1975) *Streptococcus milleri* (Guthof); An indigenous organism of the human oral cavity. Archs oral Biol. 20: 757—762.
- 20) 中村 武 (1969) 口腔内嫌気性 Heparinase 産生菌に関する研究. 十全会誌, 78: 509—530.
- 21) 中村 武, 杉中芳幸, 征矢文恵 (1975) 口腔内嫌気性菌に対する歯垢細菌の Bacteriocin 様活性 (講演抄録). 歯基礎誌, 17: 479.
- 22) 中村 武, 杉中芳幸, 征矢文恵 (1976) 口腔内 Bacteroides に対する歯垢細菌の bacteriocin 様活性 (講演抄録). 日細菌誌, 31: 100.
- 23) Nakamura, T., Suganaka, Y. and Obata, T. (1976) Enzymatic action of oral *Bacteroides* against the dental plaque forming substance from *Streptococci*. Bull. Tokyo dent. Coll. 17: 107—122.
- 24) Newman, H. N. and Poole, D. F. G. (1974) Structural and ecological aspects of dental plaque. The Normal Microbial Flora of Man. p. 111—134, Academic Press. London & New York.
- 25) Niven, G. F. Jr., Smiley, K. L. and Sherman, J. M. (1942) The hydrolysis of arginine by *Streptococci*. J. Bact. 43: 651—660.
- 26) Rogers, A. H. (1969) The proportional distribution and characteristics of *Streptococci* in hu-

- man dental plaque. Caries Res. 3: 238—248.
- 27) 坂崎利一 (1974) 医学細菌同定の手びき. 第2版, P. 237. 近代出版. 東京.
- 28) Takazoe, I. and Nakamura, T. (1971) Experimental mixed infection by human gingival crevice material. Bull. Tokyo dent. Coll. 12:85—93.
- 29) White, J. C. and Niven, C. F., Jr. (1946) *Streptococcus s. b. e*; a *Streptococcus* associated with subacute bacterial endocarditis. J. Bact. 51:717—722.