

抗菌物質産生の口腔細菌とその生態

中村 武

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

Bacteriocins, Antimicrobial Substances from Oral Bacteria and Ecosystem of the Flora

TAKESHI NAKAMURA

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

Summary

Causative agents of oral infectious diseases are normal residents in the oral cavity. From the point of view that one of the conceivable factors which controls the ecosystem of normal flora is bacteriocin (or a bacteriocin-like substance), we have studied biological properties of some bacteriocins elaborated by the members of indigenous oral bacteria. Author report here an outline of the properties of several bacteriocins.

(i) Bacteriocins of dental plaque bacteria

Strains of *St. sanguis*, *P. acnes*, and *B. matruchotii* which produced bacteriocins, were isolated from dental plaque. M. W. of a bacteriocin from *St. sanguis* was 280,000. It inhibited the growth of *Bacterodes*, *P. acnes*, and *Actinomyces* bacteriostatically. A bacteriocin from *P. acnes* composed of five subunits. M. W. of the native from was 60,000. It's inhibitory spectrum was very narrow. *B. matruchotii* produced an extracellular bacteriocin by shaking cultivation. This purified bacteriocin contained two components. However, there was no significant difference in the inhibitory spectrum between the two components.

(ii) Bacteriocin of gingival crevice bacteria

About a half of *B. melaninogenicus* strains isolated from gingival crevice deposits exhibited antibacterial activity and the bacteriocin was obtained from cell extract of this organism. The purified bacteriocin was 105,000 in M. W. and inhibited the growth of *Bacteroides*, *Actinomyces*, *St. mitis*, and *St. salivarius*. It was also revealed that hematin accumulated within the cells of this organism was able to inhibit many gram positive bacteria including *St. mutans*.

(iii) Bacteriocin of saliva bacteria

In the culture supernatant of *S. aureus* obtained from saliva, a relatively low M. W. (6,000) bacteriocin was found. It was basic polypeptide with a pI value of 10.0, and a high content of lysine was characteristic. This bacteriocin killed *St. salivarius*, *P. acnes*, *A. israelii*, and nonbacteriocinogenic *S. aureus*.

On the basis of this information, the possible ecological role of the bacteriocins or bacteriocin-like substances in oral microorganisms on the flora is discussed.

はじめに

口腔内には極めて多種類の細菌が寄生している。しかし、正常口腔細菌叢の内容は定性的にも定量的にもほぼ一定している^{61),62)}。また、口腔各部位によって細菌学的特徴がみられる^{18),19)}。各菌叢の構成菌種と菌数はそれぞれ宿主との対応ならびに菌種の属性や菌種間相互の作用を総括して特徴を示す⁴⁾ものと考えられる。一方、内因感染の成立・進行には病原的属性菌の定着・増量が必須である⁶⁰⁾。すなわち、局所菌叢内でのこれら特定菌の数的変化は宿主に病的状態をもたらす大きな要因である。従って *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides melaninogenicus* など齲蝕や歯周病の病原菌^{7),8),25),36),49),63)}が寄生する歯垢ないし歯肉溝細菌叢の生態学はそれぞれの病因論と密接に関連する重要な課題である。

齲蝕や歯周病の病因に関連して歯面ないし歯周組織局所の bacterial colonization 機構には細菌の属性のみならず多くの領域から検討が加えられている^{14),46)}。しかし、各部位にみられる特異的菌叢の構成機序、特定菌種の変動機構は必ずしも明確ではない。このことは口腔の細菌に対する生態学的要因は極めて多く³⁷⁾、またその解剖学的特異性や諸因子の可変性と共に総合的解析による把握が困難であるからであろう。

内因感染にはもちろん colonization に直接関連する細菌属性は重要な因子となる^{14),16),46)}が生物学的活性を異にする細菌が濃厚に寄生している歯垢や歯肉溝では菌種間の生物活性を基盤とした相互作用は生態機構にとって重要な因子の一つでもある³⁷⁾。近年、菌種間相互作用として拮抗現象を主眼に生物活性物質である口腔細菌のバクテリオシンないしその類似物質（以下、バクテリオシン様、両者を含む場合にはバクテリオシン(様)と略記）の抗菌活性に多くの注目が寄せられてい

る^{12),24),26),34),38),52),54),66)}。バクテリオシン(様)は他の抗菌的代謝物質とは異なり、それぞれ産生菌種(株)によって特異性がみられる^{27),50)}。また、産生口腔細菌のバクテリオシン(様)は広域スペクトルのものが多い³⁸⁾。従って多様である口腔細菌叢の生態学ひいては特定菌種の動態機構にとってバクテリオシン(様)活性の意義は大きいと思われる。事実、多くの感染例でバクテリオシン(様)に起因した細菌間拮抗現象が起きることが証明されている^{26),31),53),54),70)}。

本稿では、常在菌叢の概要と主としてわれわれがこれまでに検討し得た口腔細菌のバクテリオシン(様)の性状を述べ、口腔細菌叢の生態を拮抗作用の一面から概説してみたい。

1. 口腔常在菌叢

口腔内各部位に常在する菌叢内容の概要は表1に示した。この成績は正常成人材料の培養で得られる平均的分布である^{18),25)}。部位別には舌、唾液、歯垢および歯肉溝に区別される。各部位から検出される菌種は極めて多い。また、定性的には近似するが量的には著しく異なっている^{17),62)}。しかし舌と唾液、歯垢と歯肉溝菌叢はそれぞれ大まかに質的量的にある程度近似しているといえる。唾液内菌数は1 ml 当り 10^8 で重量当り歯垢や歯肉溝菌数と比較するとこれらの1/100~1/1,000である。いずれの菌叢においても優勢を占めるのは gram 陽性球菌中レンサ球菌種である。このレンサ球菌を菌種別にみると舌、唾液で圧倒的に多いのは *Str. salivarius* である。これに対し歯垢や歯肉溝で本菌種は1%以下と少ない。この傾向は *Str. mutans*, *Str. milleri* およびブドウ球菌でもみられ、歯垢や歯肉溝ではこの逆の分布を示す。しかし、*Str. mutans* は可成りの個人差がみられることも事実である。歯垢の最も優勢菌種は *Str. sanguis* で1 g 当り 10^{11} である。本菌種はいずれの

表1 口腔各部位における細菌の分布

Bacterial group	Site			
	Plaque	Tongue	Saliva	Gingival crevice
Gram-positive facultative cocci	28.2	44.8	46.2	28.8
Streptococci	27.9	38.3	41.0	27.1
<i>Str. mutans</i>	(0-50)	(0-1)	(0-1)	(0-30)
<i>Str. sanguis</i>	(40-60)	(10-20)	(10-30)	(10-20)
<i>Str. mitior</i>	(20-40)	(10-30)	(30-50)	(10-30)
<i>Str. salivarius</i>	(0-1)	(40-60)	(40-60)	(0-1)
<i>Str. milleri</i>	(3-25)	(0-1)	(0-1)	(14-56)
Staphylococci	0.3	6.5	4.0	1.7
Gram-positive anaerobic cocci	12.6	4.2	13.0	7.4
Gram-negative anaerobic cocci	6.4	16.0	15.9	10.7
Gram-negative facultative cocci	0.4	3.4	1.2	0.4
Gram-positive facultative rods	23.8	13.0	11.8	15.3
Gram-positive anaerobic rods	18.4	8.2	4.8	20.2
Gram-negative facultative rods	ND	3.2	2.3	1.2
Gram-negative anaerobic rods	10.4	8.2	4.8	16.1
Spirochetes	ND	ND	ND	1.0

数字は全培養菌数に対する%

ND: 検出されない

Hamada, S., and Slade, D. H. (1980): Modified from Gibbons and van Houte (1973, 1975) より

菌叢にも可成りの分布を示す。Gram 陽性球菌以外の他菌種においても各部位で差が認められる。例えば *Actinomyces* sp., *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium* sp., *B. melaninogenicus* など嫌気性 gram 陽性・陰性両桿菌群においては舌、唾液には全菌数中2.3~8.2%と少ないのに対し、歯垢および歯肉溝で10.4~20.2%といずれもその分布率は高い。さらに近年、Slots⁵⁹⁾が成人歯周炎病巣で増量し全菌数の75%をも占めることを示し、その病原菌として注目されている gram 陰性菌中の *B. melaninogenicus* やスピロヘータは正

常人歯垢内からは殆んど検出されないか極めて少ない。また、歯垢と歯肉溝間でも表2に示す¹⁵⁾如く菌種によって明らかな差異が認められる。このように正常人口腔菌叢は各部位によってそれぞれ細菌学的特徴を有し、その内容はほぼ恒常性である。この細菌学的特徴は寄生菌種の生物学的属性と口腔局所の生態を総括した結果に基づくと考えられるが、これら各菌叢構成についての生態学的機序など殆んど不明である。

表2 口腔各部位における *Bacteroides melaninogenicus* と *Streptococcus salivarius* の分布

Bacterial sp.	Gingival crevice	Dental plaque	Cheek	Tongue	Saliva
<i>B. melaninogenicus</i>	4.5	0.32	0.34	0.42	0.42
<i>Str. salivarius</i>	0.47	0.66	10.7	55.3	47.4

数字は全培養菌数に対する%

Gibbons, R. J., Kapsimalis, B. and Socransky, S. S. (1964) より

2. 口腔細菌の生態に関する諸因子

口腔内環境は解剖、理化学および栄養学的にも細菌の生息条件を満たした器官といえる。従って上述の如く多様な菌種と菌数が共生する所以であろう。しかし無制限ではない。寄生細菌の生態に関与する口腔内因子は極めて多い。

Morhart et al³⁷⁾は口腔内の生態学的デタミナントとして生理、栄養、力学的および抗菌的主要因子を挙げそれぞれの要因には様々な因子を内包していることを示している(表3)。これら因子には宿主である口腔に直接依存性のデタミナント(唾液の理化学的性質や種々の抗菌物質など)のみならず、細菌の種々の生物学的属性(凝集、付着性物質の産生ないし受容体など)に依存する諸因子、さらにはこの固有局所(宿主)と属性細菌

(適合)群で総括された菌叢に由来する生態系変化の生物学的因子をも包含している。従って上述の各部位別常在菌叢の組成の特徴は様々な因子の総括された応答の生態様相と理解される。反面、このことは菌叢内容の変動機構に直接的、間接的にかかわり合いを有する因子として生態学上のみならず内因感染症の病因論にも密接に関連している。各疾病の病因とりわけ齲蝕や歯周病の病原菌を主眼とした colonization 機構には上述の諸因子中菌体外産生多糖体(デキストラン)、表層物質(レクチン、線毛など)や凝集能などの有力因子も示されている^{14),16),46)}。しかし、本稿で主題である細菌由来の抗菌の生物活性の口腔内における役割や常在菌個々の生態学的属性を基盤とした挙動などについて未だ不明な点が多い。

表3 口腔細菌の生態学的諸因子

●生理的因子	●抗菌的因子
付着因子	唾液の抗菌物質
唾液中の凝集	リゾチム
直接的細菌間の結合	チオチアネートに関連する抗菌系
細胞外多糖体	ラクトフェリン
局所の特異的受容体	糖蛋白
生理的挙動	免疫グロブリン
●栄養的因子	白血球
固有の栄養源	細菌間拮抗
炭水化物	代謝産物
アミノ酸	バクテリオシン(様)
蛋白	細菌叢に依存する環境変化の影響
細菌間の栄養的關係	●力学的因子
固有の栄養源	
食物	
固有の炭水化物	
固有の炭白と脂質	
生理的定常性	

Morhart, T., Cowman, R. and Fitzgerald, R. (1980) より

3. 細菌の抗菌的諸因子

1) 代謝産物

細菌の代謝過程に起因して産生され、その作用が一般に非特異的な抗菌物質として過酸化水素、有機酸、遊離脂肪酸、 H_2S 、インドール、アンモニアなどが挙げられる^{37),47)}。これらはそれぞれ細菌の生理的屬性すなわち代謝系の相違、基質や属性

菌数によってその産生量が左右されるのは当然である。また、その生物学的消費系も存在する。歯垢細菌の代表的菌種である *Str. mutans* や *Str. sanguis* など多くの細菌は種々の炭水化物から乳酸や酢酸など種々の酸を産生する。しかし、*Veillonella sp.*はこの乳酸をC源として利用する属性のあることはよく知られている。また、*Str. sanguis* や *Str. mitior* などの菌種は過酸化水素を産

生するが、*P. acnes* や *A. viscosus*, *Bacterionema matruchotii* などは catalase を産生する²⁾。従って産生菌種のみならずこれら代謝産物の抗菌活性は菌種間相互の生物学的作用によっても変動する可能性は十分考えられよう。

2) 抗菌的生物活性 (バクテリオシンないしバクテリオシン様) 物質

抗菌的生物活性物質として良く知られているものに抗生物質がある。抗生物質とは微生物によって産生され、微生物の発育を阻止する抗菌物質の総称である⁶⁸⁾。さらに今日では抗生物質の範囲は微生物のみに限定されず、植物由来や制癌剤のような細胞に対する抑制作用を有する物質まで拡大されている。定義上からは抗生物質に属するが一般医療で使用されているような抗生物質とは抗菌性や化学構造⁶⁸⁾など諸性状の異なる細菌由来の抗菌物質に対し、Jacob et al²⁹⁾はバクテリオシンという名称を与えた。すなわちバクテリオシンとは化学的に高分子の蛋白、または蛋白を含む高分子物質で抗菌活性を示す本態は蛋白に依存すること、抗菌スペクトラムの範囲が非常に狭く、個有の受容体をもつ細菌にのみ作用し、その産生機構や作用機序は Bacteriophage に近似する物質と定義した。本定義に属する抗菌物質は大腸菌 (Colicin) で発見されて²⁰⁾以来、種々の菌種(株)がバクテリオシンを産生することが明らかにされ

た。それぞれ菌種にちなんだ Pyocin (*Pseudomonas aeruginosa*), Megacin (*Bacillus megaterium*), Staphylococcin (*Staphylococci*) など^{27), 58), 65)}の名称で知られている。現在、これらバクテリオシン中、特に Colicin を初めとしてその構造、抗菌的作用機序、遺伝学領域さらにはバクテリオシンに対する細菌免疫機構にまで言及される²⁸⁾に至っている。しかしバクテリオシンの定義に必ずしも属せしめ得ない抗菌物質も種々の細菌で見出され、これらバクテリオシン類似の物質をバクテリオシン様物質として一括されている^{27), 65)}。以下、バクテリオシン(様)活性を産生する主な口腔細菌とこれら抗菌物質の性状について述べる。

4. 歯垢培養試料のバクテリオシン(様)活性³²⁾

成人歯垢 4 例の培養 (0.2% Yeast Extract 加 BHI broth) 法別試料について、主な口腔細菌中の 6 菌種に対する阻止活性を調べてみると表 4 に示す結果が得られた。*Str. sanguis* に対しては、いずれの歯垢にも阻止活性は認められなかった。また、*Str. mutans* に対しては 2 例の嫌気培養の超音波破壊した菌体試料にのみ活性があった。1 例の静置培養を除く他の歯垢試料で *P. acnes* の発育を阻止し、その阻止帯も極めて広がった。*B. melaninogenicus* に対しては振盪および好氣的静

表 4 歯垢の培養法別試料の阻止活性

Indicators	Aerobic culture								Anaerobic culture			
	Stationary				Shaking				Stationary			
	N	Y	H	K	N	Y	H	K	N	Y	H	K
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Bacterionema matruchotii</i> ATCC 14266	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> Ingbritt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10556	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> YM-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

- : 阻止活性陰性

+ : 阻止円の直径 (9 - 15mm)

+: 同じく 16mm 以上

S : 濃縮 (10倍) 培養上清試料

C : 超音波破壊菌体試料

置培養試料にいずれも活性は認められなかったが、3例の嫌気培養菌体からの試料に明らかな活性が認められた。一方、*Staphylococcus aureus* および *B. matruchotii* に対する阻止活性は、振盪培養試料でのみ4例中3例の歯垢試料に認められた。これらの試料は *Proponibacterium acnes* の発育も阻止した。

以上、培養試料で種々の口腔細菌に対する阻止活性がみられる所見は、歯垢細菌中にそれぞれの

菌種に対する抗菌活性産生菌の存在することを示している。事実、後述のバクテリオシン(様)活性産生菌はそれぞれ歯垢から分離されることから明らかである。また、種々の細菌が共生する生態系で検出されるこれら阻止活性は生態学上注目すべき点である。また、歯垢および培養法によって検出活性の異なる所見は各歯垢の当該産生菌数や呼吸を反映しているものと考えられる。

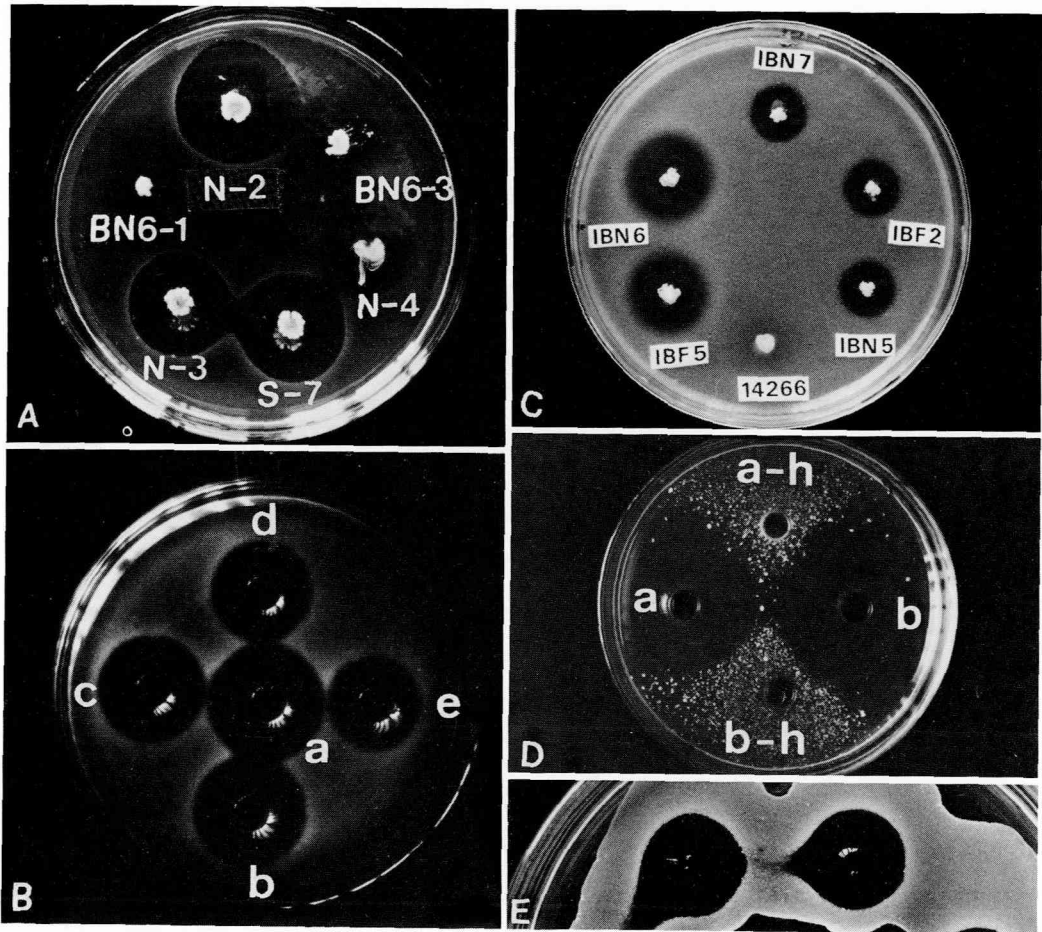


図1 口腔細菌のバクテリオシン(様)活性

- A : 穿刺培養法における *Str. sanguis* 菌株の *B. melaninogenicus* YM-5 に対する阻止所見
 B : *P. acnes* 菌体の超音波破壊試料による *P. acnes* (ATCC6919) に対する阻止所見
 a : CN-8, b : CN-1, c : CY-3, d : CY-5, e : CH-1 菌株
 C : 穿刺培養法における *B. matruchotii* 菌株の *B. matruchotii* (ATCC14266) に対する阻止所見
 D : *B. melaninogenicus* 菌体の超音波破壊試料による *A. viscosus* (ATCC15987) に対する阻止所見
 a : NM-2, b : NM-3, a-h, b-h : それぞれの菌株100℃, 10分加熱試料
 E : *B. melaninogenicus* 黒色集落 (hematin) による *Str. mutarns* (Ingbritt) に対する阻止所見

5. 口腔細菌のバクテリオシン(様)産生とその性状

1) 歯垢細菌

(1) Sanguicin^{11),43)}(*Streptococcus sanguis*)

成人歯垢を Trypticase broth で嫌気培養して得た試料の阻止活性を調べてみると先の歯垢培養試料と同様に菌体超音波破壊試料に著明な *B. melaninogenicus* を含めた *Bacteroides* sp. および *P. acnes* に対する阻止活性が多くの歯垢培養試料で認められた。これらの歯垢から本活性を産生する菌株を容易に分離することができた(図1—A)。本活性産生菌株は、いずれも *Str. sanguis* と同定された。*Str. sanguis* のバクテリオシン(様)活性についての報告はなく、本菌のバクテリオシン様物質を Sanguicin と名付けた。Sanguicin は菌体結合性で種々の蛋白分解酵素および60℃、10分で失活し、易熱性蛋白と考えられた。分子量は280,000と大きく、またアミノ酸組成では leucine, aspartic acid および glutaminic acid 含量が多かった。Sanguicin はいずれの *Str. sanguis* 菌株に対しても抗菌性はみられなかった。抗菌スペクトルは *B. melaninogenicus*, 他の *Bacteroides* sp., *P. acnes*, *A. israelii* および *A. naeslundii* の発育を阻止し、その作用は静菌的であった(表5)。Sanguicin は同種である *Str. sanguis* を含めた近縁の Streptococci に抗菌性はなく、gram 陰性の *Bacteroides* 種と嫌気性 gram 陽性菌に対して抗菌性を有することはバクテリオシン様物質としては極めて特異的である。歯垢常在菌叢中最も多い *Str. sanguis* とその寄生性が低い、*B. melaninogenicus* などの所見から考え合せ、*Str. sanguis* の保有するバクテリオシン様活性が歯垢内で作用している可能性を示唆する。

(2) Acnecin^{10),41)}(*Propionibacterium acnes*)

歯垢から分離した菌株中に *P. acnes* (ATCC 6919) に対する阻止活性も見出されたので、これら12菌株を得て生物学的性状を調べたところ、いずれも *P. acnes* と同定された。本菌の穿刺培養平板での阻止帯は狭いものであった。しかし菌体の超音波破壊試料では極めて広い阻止帯が認められた(図1—B)。本抗菌物質は、菌体結合性の蛋白を主体とするバクテリオシンと考えられこれを Acnecin と名付けた。Acnecin は分子量60,000で5

つの Subunit (12,000 M. W.) から構成されると推定された。等電点 (pH) は5.5であった。種々の蛋白分解酵素で失活し、易熱性であった。Acnecin には脂質は検出できなかったがわずかの糖を含有していた。アミノ酸組成中 glutamic acid, glycine, alanine および aspartic acid 含量が多かった。抗菌スペクトルは、穿刺培養法では種々の gram 陽性菌の発育を阻止したが、精製 Acnecin は、非産生の *P. acnes* 菌株および近縁の *Corynebacterium parvum* のみに静菌的に阻止した(表5)。しかし、産生菌株間での阻止作用は認められなかった。

(3) Mutacin,^{23),24)} Bacteriocin^{12),26)} (*Streptococcus mutans*)

Str. mutans の抗菌活性については多くの報告がある。^{5),23),24),33),34),35),52)}しかし、その殆んどが平板上での阻止所見である。Hamada and Ooshima^{24),25)}も平板上の阻止活性から本菌のバクテリオシン様物質に Mutacin と名付けている。本菌の抗菌活性は、他のレンサ球菌でもみられる性状と近似し液体培養試料から cell free での回収が困難^{6),23),64),66)}な理由からであろう。われわれも平板上での本菌株の阻止活性を認めているがその回収はできなかった⁴⁰⁾。しかし、近年 Ikeda et al²⁶⁾および Fukushima et al¹²⁾は本菌のそれぞれ異なる菌株で活性を見出し、バクテリオシンを抽出・精製してその性状を明らかにしている。Ikeda et al の菌株のバクテリオシンは、分子量4800、等電点 (pH) 10.0の塩基性蛋白で α -chymotrypsin と pancreatin によって部分失活し、広い pH 域と熱に対して安定 (121℃) である。抗菌スペクトルは、種々の *Str. mutans* 株の他に多くの口腔内 gram 陽性菌に阻止作用を示し、殺菌的であると述べている。また、指示菌として1株を使用した *B. melaninogenicus* にも阻止作用を示す。一方、Fukushima et al のバクテリオシンは、pH3.1で沈殿する aspartic acid, alanine, leucine, lysine 含量の多い高分子の蛋白質 (973,000 M. W.) で Pyocin⁵⁸⁾などに見られる繊維状の構造¹⁾をもつ特徴あるバクテリオシンを示している¹²⁾。*Str. mutans* のこれらの性状は、口腔細菌のバクテリオシンとしては、極めて特異的である。抗菌スペクトルは Ikeda et al のバクテリオシンと近似して種々の gram 陽性菌に作用し殺菌的であると報

表5 主な口腔細菌のバクテリオシン(様)の性状

産生菌とバクテリオシン (株)		Streptococcus sanguis	Propionibacterium acnes	Bacterionema matruchotii	Bacteroides melaninogenicus	Staphylococcus aureus	Streptococcus mutans
性 状		Sanguin	Acnein	Matrucin (A, B)	Melaninocin (Hematin)	Aureucin	Bacteriocin I* Bacteriocin II**
菌体結合性		+	+	+	+	+	・ +
菌体外産生性		±	±	±	・	±	+
硫酸(飽和)塩析		70%	60%	50%	・	70%	60%
精 製		Diallo membrane (XM-50不通過)	DEAE cellulose Sephadex G-100	クロホルム・メタノール ケイ酸カラム (AとBに分離)	DEAE cellulose Sephadex G-200	75%エタノール処理 CM-32 Sephadex G-50	pH3.1 Precipitate Sephadex G-200
比 活		98倍	72倍	A : B = 8 : 1	106倍	1370倍	343倍
回 収		37%	47%	・	37%	23%	23%
等 電 点 (pH)		・	5.5	・	・	10.0	10.0
分 子 量		280,000	60,000 5 subunit (12,000)	1,000 <	105,000	6,000	4,800
主要含有アミノ酸		leucine aspartic acid glutamic acid (他14種)	glutamic acid glycine alanine aspartic acid (他13種)	methionine tyrosine phenylalanine 同定不能1種	aspartic acid glutamic acid lysine (他14種)	lysine histidine phenylalanine (他12種)	glycine alanine lysine isoleucine leucine valine (他10種)
抗菌スペクトル		B. melaninogenicus Heparinase -producing Bacteroides B. ochraceus P. acnes Actinomyces sp.	P. acnes C. parvum	B. matruchotii Sta. aureus Str. salivarius A. viscosus A. naestlundii A. israelii L. casei L. acidophilus	A. viscosus A. naestlundii Str. mitis Str. salivarius B. oralis B. ochraceus	Sta. aureus Str. salivarius P. acnes C. parvum A. israelii	Sta. aureus Str. mutans Str. sanguis Str. salivarius Lactobacillus sp. P. acnes B. melaninogenicus
阻 止 作 用		静菌的	静菌的	静菌的	静菌的	殺菌的	殺菌的

*: Ikeda, T. et al (1982) より

**: Fukushima, H. et al (1982) より

告している。この精製された2つのバクテリオシンの性状からも明らかのように *Str. mutans* の抗菌スペクトルは一般に広域である(表5)。このことは多くの平板上での阻止所見とも一致している。

歯垢に多い種々のレンサ球菌種に対しても阻止作用を示す広域スペクトルを有する Bacteriocinogenic *Str. mutans* の本活性は、歯垢形成過程で感受性菌の駆逐に参画する可能性が高い。

Ikeda et al.²⁶⁾は gontobiotics とあらかじめ ampicillin などによって特異的病原菌を抑制したラット群を使用し、先のバクテリオシンを飲料水および飼料に加えた実験からバクテリオシンによる明らかな caries score の減少を認めている。しかし、同種の *Str. mutans* であっても菌株間において産生と感受性が異なることも事実である^{23),35)}。また、本活性の液体中での産生性やバクテリオシンの化学的組成にも大きな差異もみられるので *Str. mutans* の産生するバクテリオシン(様)は多様であることを示している。

(4) Matrucin^{32),69)}(*Bacterionema matruchotii*)

14例の成人歯垢を BHI 寒天平板で好気培養し、*B. matruchotii* (ATCC 14266) を指示菌として抗菌活性産生菌を調べてみると供試歯垢の半数以上に阻止活性産生集落が認められる(図1-C)。各歯垢培養平板(5枚)から計測された阻止菌数の成績は表6に示す如くである。準定量的であるが歯垢によって阻止菌数にばさつきが認められる。しかし、先の歯垢培養試料でみられた強い活性の歯垢では阻止菌数が多く検出されている。先の本菌に対する阻止活性はこれら産生菌に由来することを示している。産生菌は、いずれも培地固着性の R 型集落であった。これら産生菌株を分離して

細胞壁組成や生物学的諸性状を検索すると、いずれの菌株も *B. matruchotii* と同定することができた。各菌株はいずれも先の歯垢培養試料と同様に振盪培養によって活性が培養上清中に強く発現した。この *B. matruchotii* の抗菌物質は本稿で示した他の口腔細菌のバクテリオシン(様)と諸性状は極めて異なるものであった。*B. matruchotii* の抗菌的屬性についての報告はないので本物質を Matrucin と名付けた。Matrucin は培養上清から硫酸で濃縮・回収できたが水難溶性で通常の蛋白を主体としたバクテリオシン(様)を指標とした方法での精製は困難であった。また硫酸による濃縮試料の薄層クロマトグラムによる検討から本菌の阻止活性は Rf 値の異なる抗菌2物質(A, B)から成ることがわかった。これら2物質はケイ酸カラムを用い、クロロホルム、メタノール、アセトンなど有機溶媒によって分離精製することができた。Matrucin A および B の精製収量は、A : B = 8 : 1 で比活性も A は B に比較して高かった。両 Matrucin は強い紫外外部吸収(365nm)を示す特徴を有していた。両者ともメタノール、アセトン、クロロホルムおよび酢酸エチルに可溶、水、石油エーテルおよびエーテルに難溶性であった。薄層クロマト上での各種呈色反応は両者に殆んど差はなく磷脂質、糖、遊離アミノ基、ステロールおよび糖エステルに対する反応は陰性であった。しかし、イミノ基およびケトンに対する反応は陽性であった。UV スペクトルも $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}} 205, 215.5$ および 305nm に吸収が認められ、両者には殆んど差は認められなかった。また、IR スペクトルは、両者で 1640, 3300⁻¹ 付近で強い吸収が認められ酸アミド結合およびイミノ基の存在が示唆された。しかし、糖のエステル結合に対する特異吸収は認め

表6 歯垢中のバクテリオシン(様)産生 *B. matruchotii* の分布

Dental plaque	Bacteriocinogenic colonies*	Number of dental plaque Inhibition positive / tested
B, D, H, N, S, Y	20 <	6 / 18
C, I, M, O	10 ~ 19	4 / 18
F, 1	1 ~ 9	2 / 18
A, E, L, R, T, W	0	6 / 18

指示菌: *B. matruchotii* ATCC 14266

*: 歯垢培養平板(各5枚)から得られた産生菌数

られなかった。両 Matrucin の加水分解試料から methionine, tyrocinine, phenylalanine と同定不能な1種のアミノ酸が検出された。両 Matrucin はスペクトル膜 (1000 M. W.) を通過した。抗菌スペクトルは両者共殆んど差はなく、*Str. mutans*, *Str. sanguis* および *Str. mitis* を除く、他の多くの gram 陽性菌種に対し発育を阻止し、その作用は静菌的であった(表5)。Matrucin のこの広域スペクトルは *Str. mutans* に近似するが、*Str. mutans*, *Str. sanguis* などレンサ球菌に非感受性である点は *Str. mutans* のバクテリオシンと異なっていた。

本菌を含めた線状菌は歯垢形成初期には少なく、成熟と共に増量し⁵¹⁾歯垢全層にわたって広く分布する^{51), 67)}。これまで歯垢形成過程における線状菌のこのような菌叢変化を説明する所見は見当らなかった。*B. matruchotii* は口腔細菌のバクテリオシン(様)活性に感受性が極めて低い反面、本菌の産生するバクテリオシン様物質は広域スペクトルを有する。*B. matruchotii* のこのバクテリオシン様物質の特性からみて本菌の産生活性が歯垢成熟過程ひいては歯垢内菌叢変化に関与する可能性が強いことを示唆する。一方、Matrucin は口腔細菌のバクテリオシン(様)にはみられない化学組成上の特異性を有し、その諸性状はペプチット系抗生物質⁶⁸⁾に類似している。本物質の構造や作用機序について検討中である。

2) 歯肉溝細菌

(1) Melaninocin^{42), 48)} (*Bacteroides melaninogenicus*)

成人歯肉溝から分離した *B. melaninogenicus* 23株について本菌種の各菌株に対する阻止活性を穿刺培養法で交差試験すると14菌株は、他の2~10菌株の発育を阻止した。これらの阻止帯は狭いものであった。9株はいずれの菌株にも阻止作用は認められなかった。5菌株以上を阻止した産生菌株に限定して各菌株間の産生と感受性との関係をみると表7に示す如くである。亜種の *intermidis* 菌株はいずれも2~4菌株を阻止したに過ぎなかった。しかし各亜種間での産生と感受性の関連は検討菌株も少なく結論はできない。

本菌の阻止活性は、*Str. mutans* と同様に各菌株によって産生と感受性に可成りの差異が認められる。このことは菌株の抗菌物質の特異性によるのか、感受性の違い、いわゆるバクテリオシンに対する受容体や免疫機構^{28), 65)}によるかは不明である。しかし本菌のバクテリオシンは菌株レベルの阻止作用であるというバクテリオシン性状^{27), 29)}を如実に示しているといえる。交差阻止試験からは一般に狭い抗菌スペクトルを有する菌株群は他の菌株のバクテリオシンに感受性である傾向が同える。本菌のバクテリオシンには Melaninocin と名付けた。

産生菌の培養菌体を超音波で破壊するとそれぞれ強い活性が認められた(図1-D)。Melaninocin の精製は、NM-2株の超音波破壊した菌体試料から行い、分子量は105,000と算定された。アミノ酸組成では aspartic acid, glutamic acid および lysine 含量が多かった。本活性は蛋白分解酵素お

表7 穿刺培養法による *B. melaninogenicus* 菌株の交差阻止作用

産生菌株(亜種)	NM-2	NM-3	219-2	137-3	204-1	204-2	204-3	219-3	SM-3	KM-7	MM-2	SM-1	YM-5	その他の 阻止菌株数	全阻止 菌株数
NM-2 (m)	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	1	10
NM-3 (m)	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	1	9
219-2 (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	4	8
137-3 (m)	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	2	8
204-1 (m)	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	0	7
204-2 (m)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	1	7
204-3 (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	3	7
219-3 (a)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	1	5
SM-3 (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4
KM-7 (m)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
MM-2 (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
SM-1 (m)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
YM-5 (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2

* 亜種 (a): asaccharolyticus, 同 (m): melaninogenicus,

(+): 阻止作用陽性, (-): 阻止作用陰性

よび65°C, 10分で失活した, Melaninocin の抗菌スペクトルは, 上述の感受性 *B. melaninogenicus* 菌株の他に *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *Str. mitis*, *Str. salivarius*, *B. oralis*, *B. ochraceus* の発育を阻止し, 静菌的作用であった(表5).

付) Hematin (*Bacteroides melaninogenicus*) の阻止活性^{39), 44)}

B. melaninogenicus は血液加培地で培養すると細胞内にヘマチンを蓄積して黒色集落を形成する⁵⁷⁾特異菌種である。われわれは, この黒色化した本菌が *Str. mutans* の発育を強く阻止する(図1-E)ことを見出し, この抗菌の本態はヘマチンであることを明らかにした。本ヘマチンの阻止作用は, 菌株レベルではなく, *Str. mitis*, *B. matru-chotii*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* および *P. acnes* に対しても阻止作用を有していた。ヘマチンの阻

止作用は静菌的である(表5)。

以上, *B. melaninogenicus* のバクテリオシンおよびヘマチンが他菌種, 特に *Actinomyces sp.* に対して抗菌性を有する事実は生態学上興味深い。歯周病中歯肉炎から歯周炎への移行を細菌学的に説明するからである。すなわち, 歯肉にのみ病変が限局されている歯肉炎局所には *A. viscosus* や *A. naeslundii* が優位に多い⁶³⁾。炎症が広範に拡大した成人歯周炎では *B. melaninogenicus* が優位を占め⁵⁹⁾、それぞれの病原的意義が評価されている^{59), 63)}。しかし成人歯周炎が歯肉炎ないし極めて初期の病変すなわち *A. viscosus* や *A. naeslundii* によって主宰されている段階から何故に嫌気性 gram 陰性桿菌が優位な菌叢に変化するかはこれまで問われていなかった。ここで示された本菌の強い抗菌活性は, この菌叢変化を細菌学的に説明

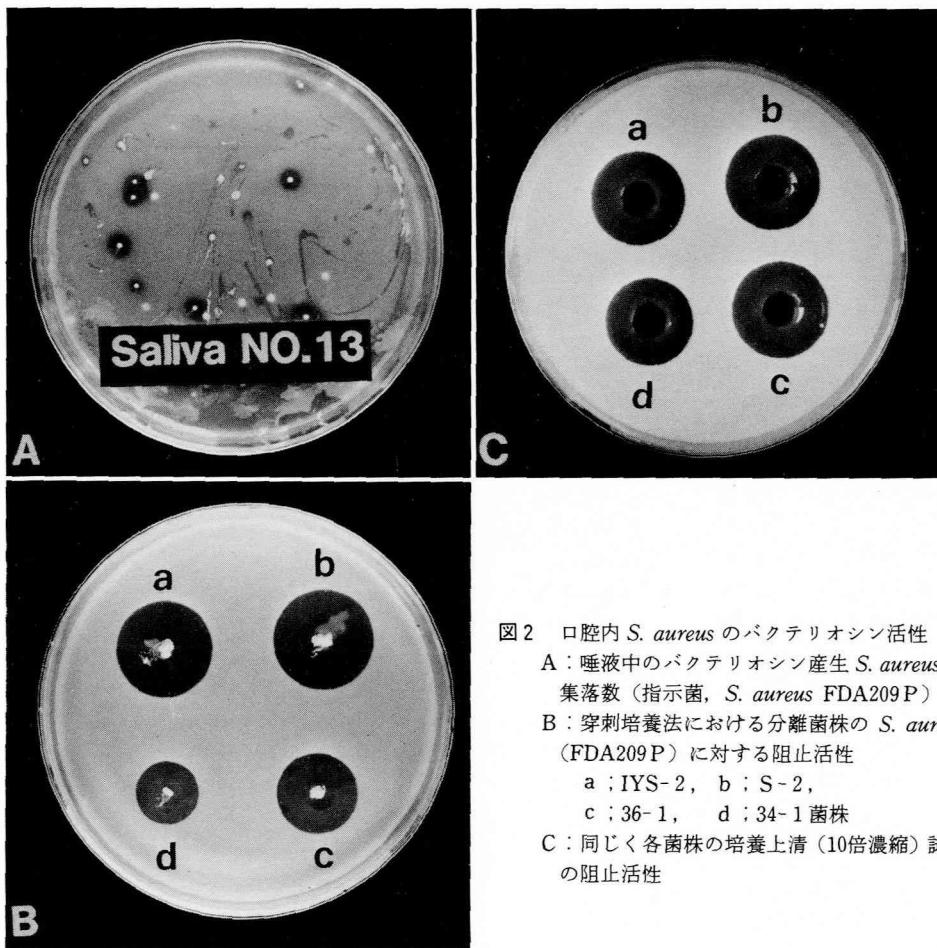


図2 口腔内 *S. aureus* のバクテリオシン活性

A: 唾液中のバクテリオシン産生 *S. aureus* の集落数(指示菌, *S. aureus* FDA209 P)

B: 穿刺培養法における分離菌株の *S. aureus* (FDA209 P) に対する阻止活性

a: IYS-2, b: S-2,

c: 36-1, d: 34-1 菌株

C: 同じく各菌株の培養上清(10倍濃縮)試料の阻止活性

するものと考えられる。

3) 唾液細菌

(1) Aureucin^{45),71)} (*Staphylococcus aureus*)

成人の安静唾液をブドウ球菌用選択培地で培養して *S. aureus* (FDA 209P) を指示菌とし、抗菌活性産生菌を定量的に調べてみると52例中34例(65%)の唾液に指示菌の発育を阻止する集落が認められた(表8, 図2-A)。各唾液によって阻止菌数にばらつきがあるが、全く阻止菌数のみられない唾液や全ブドウ球菌数に対して30%近くをも阻止菌数で占める唾液例もあった。抗菌活性産生菌(図2-B)は、生物学的諸性状から *S. aureus* と同定された。このいずれの菌株も振盪培養で阻止活性は著明に培養上清中に認められ(図2-C)、本活性は菌体外産生性であった。阻止活性は、種々の蛋白分解酵素で失活するが熱(100℃)に安定であった。抗菌物質を精製し、本物質は分子量約6,000, 等電点(pH)10.0であることがわかった。本抗菌物質中には lysine 含量は多く、塩基性ポリペプチットを主体とするバクテリオシンと考えら

れたので Aureucin と名付けた。Aureucin の抗菌スペクトルは比較的狭かった。*S. aureus* の非産生菌株の他に *Str. salivarius*, *P. acnes*, *C. parvum*, *A. israelii* の発育を阻止し、その作用は殺菌的であった(表5)。

口腔由来株ではない *Staphylococcin* (*bacteriocin*)について多くの報告がある^{13),21),22),30),55)}。非口腔由来株の *Staphylococcin* (*S. epidermidis*)の中には、Aureucin の化学組成と可成り類似するバクテリオシンもみられる⁵⁵⁾が、非口腔由来株の *Staphylococcin* は一般に広域スペクトルを有している。このことはブドウ球菌のバクテリオシンは由来株によって多様であることを示唆する。Aureucin 産生菌が唾液中に広く分布すること、またブドウ球菌は唾液に次いで歯肉溝に寄生性である^{17),25)}ので本活性のこれら局所での感受性菌種の拮抗に関与することが示唆される。

(2) Bacteriocin 様物質 (*Streptococcus salivarius*)

近年, Dempster and Tagg⁶⁾は指示菌として *S.*

表8：唾液におけるバクテリオシン産生菌の分布

Saliva※	Positive Colonies / Total	Saliva	Positive Colonies / Total	Saliva	Positive Colonies / Total
No. 1	3 / 157	No. 19	8 / 216	No. 35	0 / 410
No. 2	9 / 71	No. 20	4 / 23	No. 36	0 / 123
No. 3	8 / 286	No. 21	16 / 165	No. 37	0 / 64
No. 4	24 / 88	No. 22	22 / 316	No. 38	0 / 81
No. 5	14 / 312	No. 23	2 / 49	No. 39	0 / 196
No. 6	2 / 296	No. 24	8 / 163	No. 50	0 / 362
No. 7	4 / 260	No. 25	4 / 208	No. 51	0 / 105
No. 8	2 / 258	No. 26	3 / 142	No. 42	0 / 216
No. 9	3 / 212	No. 27	4 / 84	No. 43	0 / 96
No. 10	2 / 246	No. 28	3 / 127	No. 44	0 / 125
No. 11	6 / 62	No. 29	4 / 183	No. 45	0 / 83
No. 12	3 / 88	No. 30	3 / 95	No. 46	0 / 386
No. 13	8 / 38	No. 31	2 / 63	No. 47	0 / 263
No. 14	4 / 64	No. 32	3 / 96	No. 48	0 / 213
No. 15	3 / 152	No. 33	7 / 61	No. 49	0 / 92
No. 16	2 / 213	No. 34	6 / 308	No. 50	0 / 104
No. 17	7 / 296			No. 51	0 / 226
No. 18	12 / 361			No. 52	0 / 168

指示菌株：S. aureus FDA 209 P

培地：Staphylococcus agar No.110

※：0.5 ml

epidermidis 株を使用し唾液中にバクテリオシン様活性を産生する *Str. salivarius* が広く分布すること、これら産生菌の各菌株に対する抗菌パターンによって 6 prototype に分け、各産生菌株のバクテリオシン様活性について報告している。本菌の抗菌活性は液体培養からの回収は困難で詳細な化学組成などわかっていない^{3), 6), 66)}。彼らは各産生菌の平板培養から得た粗試料を用いて限定透析膜の通過性によって本菌のバクテリオシン様物質はいずれも分子量約 8,000 の熱安定性蛋白と推定している。産生菌株によって抗菌スペクトルが一樣ではないが、A 群、C 群、G 群レンサ球菌と動物由来の B 群レンサ球菌および *A. viscosus* に感受性で多くは静菌的作用であると報告している。しかし、*Str. mutans*, *Str. sanguis*, *Str. mitior*, *A. naeslundii*, *Lactobacillus* sp. および gram 陰性桿菌に対しては殆んど菌株が阻止作用を示さない。本菌は A 群レンサ球菌に極めて感受性であることから彼らはすでに示されている本菌の A 群による咽頭炎の防禦的役割⁵⁶⁾や咽頭における肺炎球菌の colonization の抑制³¹⁾を支持している。

おわりに

以上、口腔細菌の抗菌的生物活性として主にわれわれが検討したバクテリオシンないしバクテリオシン様活性産生菌とこれら物質の性状の概要を述べた。これら産生菌の阻止活性にもとづいて口腔細菌間における拮抗的作用性を単純にまとめてみると表 9 に示すごとく要約されよう。なお、*Str. mutans*, *Str. salivarius* の抗菌の活性はそれぞれ他の研究グループの成績である。また、この他にもバクテリオシン様活性産生菌が認められている⁹⁾。われわれが対象とした口腔内主要な指示菌種やその分布状況など考慮して概観すると、バクテリオシン(様)活性産生菌としては *Str. sanguis*, *Str. mutans*, *Str. salivarius*, *S. aureus*, *B. matruchotii*, *P. acnes* および *B. melaninogenicus* などあげられる。各バクテリオシン(様)の抗菌スペクトルにはそれぞれ特異性がみられ多様であるが他菌種由来の多くのバクテリオシン(様)(4 菌種以上)に対して感受性である菌種として *Str. salivarius*, *P. acnes* および *Actinomyces* sp. が挙げら

表 9 主な口腔細菌の産生バクテリオシン(様)とその感受性

Oral bacteria	Bacteriocin (like) and Producing bacteria							
	<i>Str. sanguis</i> Sanguicin	<i>Str. mutans</i> Bacteriocin* "Mutacin"	<i>Str. salivarius</i> Bacteriocin**	<i>S. aureus</i> Aureucin	<i>B. matruchotii</i> Matrucin	<i>P. acnes</i> Acnecin	<i>B. melaninogenicus</i> Melaninocin	(Hematin)
<i>Streptococcus</i>								
<i>sanguis</i>	—	+	+	—	—	—	—	—
<i>mutans</i>	—	+	—	—	—	—	—	+
<i>mitis</i>	—	+	+	—	—	—	+	—
(<i>milleri</i> , <i>mitior</i>)								
<i>salivarius</i>	—	+	+	+	+	—	+	+
<i>Staphylococcus</i>								
<i>aureus</i>	—	+	+	+	+	—	—	—
<i>epidermidis</i>	—	+	+	—	—	—	—	—
<i>Bacterionema</i>								
<i>matruchotii</i>	—	+	•	—	+	—	—	+
<i>Lactobacillus</i>								
<i>acidophilus</i>	—	+	—	—	+	—	—	—
<i>casei</i>	—	+	—	—	+	—	—	—
<i>Propionibacterium</i>								
<i>acnes</i>	+	+	•	+	+	+	+	+
<i>Actinomyces</i>								
<i>viscosus</i>	+	+	+	—	+	—	+	+
<i>naeslundii</i>	+	+	—	—	+	—	+	+
<i>israelii</i>	—	•	•	—	+	—	—	+
<i>Bacteroides</i>								
<i>melaninogenicus</i>	+	—	—	—	—	—	+	—
Other								
<i>Bacteroides</i> sp.	+	•	—	—	—	—	+	—

* : Hamada, S. et al (1975), Ikeda, T. et al (1982), Fukushima, H. et al (1982) より

** : Dajani, A. S. et al (1976), Dempster, R. P. et al (1982) より

+: 多くの菌株に対して阻止作用を示す

—: 殆んどの菌株に対して阻止作用を示さない

(•): 非バクテリオシン(様)

れよう。正常口腔の各部位にみられるそれぞれ特異の菌叢構成に関する生態学的機序は不明確でもある。抗菌の生物活性が菌叢構成に関与している可能性は各菌叢に見られる特異的組成と考え合せ本稿で示したバクテリオシン(様)産生と感受性菌種との関連性からある程度説明できる一面もある。もちろん殆どバクテリオシン(様)活性の作用範囲は菌株レベルであること、in vitro の抗菌活性はそのまま口腔内で反映されるとは限らない。しかし産生菌数の分布やバクテリオシン(様)の理化学的特性からみて口腔内諸因子によって不活化され難いバクテリオシン(様)活性の局所での生態学的役割は注目される。われわれが検討したバクテリオシン(様)活性は、種々の細菌が共生する生態系でも検出される事実から考え多様かつ濃厚である口腔細菌叢におけるバクテリオシン(様)活性は局所菌叢内での菌種間拮抗ひいては菌種変動機構に参画する可能性は強いと思われる。本稿で示したバクテリオシン(様)個々の生態学上の役割をさらに明確にするためには同一個体での菌叢構成菌の産生と感受性など定量的検討・解析が必要でありさらに検討しなければならない。

(本研究内容は、主に藤村節夫、谷口裕朗、小幡直樹、山崎宣夫、金川直博との共同によることを銘記する)。

文 献

- 1) 天児和暢, 安仲加公子 1979. バクテリオシンの形態, バクテリオシン, 遺伝から酵素まで, 蛋白質核酸酵素, 24: 719-726.
- 2) Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E. 1974. *Bergey's manual determinative bacteriology*. 8th ed. 659-681. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 3) Dajani, A. S., Tom M. C., and Law, D. J. 1976. Viridin, bacteriocin of alpha-hemolytic streptococci: Isolation, characterization, and partial purification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9: 81-88.
- 4) Davies, R. M. 1972. General ecology of the commensal microflora of the mouth. Host resistance to commensal bacteria. 19-33. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- 5) Delisle, A. L. 1975. Production of bacteriocins in a liquid medium by *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8: 707-712.
- 6) Dempster, R. P., and Tagg, J. R. 1982. The production of bacteriocin-like substance by the oral bacterium *Streptococcus salivarius*. *Archs. Oral Biol.* 27: 151-157.
- 7) Edwardsson, S. 1968. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 13: 637-646.
- 8) 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.
- 9) Franker, K. C., Herbert, A., and Ueda, S. 1977. Bacteriocins from *Actinomyces odontolyticus* with temperature-dependent killing properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 410-417.
- 10) 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.
- 11) Fujimura, S., and Nakamura, T. 1979. Sangucin, a bacteriocin of oral *Streptococcus sanguis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 262-265.
- 12) Fukushima, H., Fukushima, S., Umemoto, T., Fukuhara, H., and Sagawa, H. 1982. Purification and chemical analysis of a bacteriocin from the oral bacterium *Streptococcus mutans* RM-10. *Archs. Oral Biol.* 27: 721-727.
- 13) Gagliano, V. J., and Hinsdill, R. D. 1970. Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *J. Bacteriol.* 104: 117-125.
- 14) Genco, J. R., and Mergenhausen, S. E. 1982. Host-parasite interaction in periodontal disease. 86-138. American Society for Microbiology, Washington.
- 15) Gibbons, R. J., Kapsimalis, B., and Socransky, S. S. 1964. The source of salivary bacteria. *Archs. Oral Biol.* 9: 101-103.
- 16) Gibbons, R. J., and Socransky, S. 1962. Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques. *Archs. Oral Biol.* 7: 73-80.
- 17) 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.
- 18) Gibbons, R. J., and Van Houte, J. 1973. On the formation of dental plaque. *J. Periodontol.* 44: 347-360.
- 19) Gibbons, R. J., and Van Houte, J. 1975. Dental caries. *Ann. Rev. Med.* 26: 121-136.
- 20) Gratia, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de

- Colibacille. Compt. Rend. Biol. 93: 1040—1041.
- 21) Hale, E. M., and Hinsdill, R. D. 1973. Characterization of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* strain 462. Antimicrob. Agents Chemother. 4: 634—640.
 - 22) Hale, E. M., and Hinsdill, R. D. 1975. Biological activity of staphylococcin 462: Bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 7: 74—81.
 - 23) Hamada, S., and Ooshima, T. 1975. Production and properties of bacteriocin (Mutacins) from *Streptococcus mutans*. Archs. Oral Biol. 20: 641—648.
 - 24) Hamada, S., and Ooshima, J. 1975. Inhibitory spectrum of a bacteriocin like substance (Mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res. 54: 140—145.
 - 25) Hamada, S., and Slade, H. D. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44: 331—384.
 - 26) 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. 35: 861—868.
 - 27) Ivanovics, G. 1962. Bacteriocin and bacteriocin-like substance. Bacteriol. Rev. 26: 108—118.
 - 28) 岩下淑子 1979. バクテリオシン研究をめぐる最近の動向と課題. バクテリオシン, 遺伝から酵素まで. 蛋白質核酸酵素, 24: 895—900.
 - 29) Jacob, F., Simonovitch, L., and Wollman, E. L. 1953. Comparaison entre la biosynthèse induite de la colicine et des bactériophages et entre leur mode d'action. Ann. Inst. Pasteur. 84: 313—318.
 - 30) Jetten, A. M., Vogel, G. D., and De Windt, F. 1972. Production and purification of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. J. Bacteriol. 112: 235—242.
 - 31) 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.
 - 32) 金川直博 1983. 歯垢細菌間の拮抗, 特に *Bacterionema matruchotii* のバクテリオシン様活性とその性状に関する研究. 歯科学報, 83: 1219—1237.
 - 33) Kelstrup, J., and Funder, T. D. 1977. Synthesis of bacteriocins in liquid culture of *Streptococcus mutans*. J. Biol. Buccale. 5: 99—106.
 - 34) Kelstrup, J., and Gibbons, R. J. 1969. Bacteriocin from human and rodent streptococci. Archs. Oral Biol. 14: 251—258.
 - 35) Kelstrup, J., Richmond, S., West, C., and Gibbons, R. J. 1970. Fingerprinting human oral streptococci by bacteriocin production and sensitivity. Archs. Oral Biol. 15: 1109—1116.
 - 36) Krasse, B. 1966. Human streptococci and experimental caries in hamsters. Archs Oral Biol. 11: 429—436.
 - 37) Morhart, R., Cowman, R., and Fitzgerald, R. 1980. Ecologic determinants of the oral microbiota. Menaker, L (ed). The biologic determinants of the oral microbiota. The biologic basis of dental caries. 278—296. Harper & Row Publishers, Hagerstown.
 - 38) 中村 武 1983. 口腔細菌叢における拮抗現象—特にバクテリオシン活性について—. 日本歯科評論, (491): 212—223.
 - 39) 中村 武, 藤村節夫, 金川直博 1980. *Bacteroides melaninogenicus* の black pigment (hematin) の抗菌活性. 松本歯学, 6: 100—108.
 - 40) 中村 武, 藤村節夫, 小幡直樹, 山崎宣夫, 金川直博 1978. 口腔内 *Streptococcus* の *Propionibacterium acnes* に対する発育阻害因子. 松本歯学, 4: 76.
 - 41) Nakamura, T., Fujimura, S., Obata, N., Yamazaki, N., and Kanagawa, N. 1978. Bacteriocin (Acnecin) activity of oral *Propionibacterium acnes*. Bull. Tokyo Dent. Coll. 19: 235—244.
 - 42) Nakamura, T., Fujimura, S., Obata, N., and Yamazaki, N. 1981. Bacteriocin-like substance (Melaninocin) from oral *Bacteroides melaninogenicus*. Infect. Immun. 31: 28—32.
 - 43) 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.
 - 44) Nakamura, T., Suginaka, Y., Obata, N., Yamazaki, N., and Takazoe, I. 1978. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* by the black pigment (haematin) of *Bacteroides melaninogenicus*. Archs. Oral Biol. 23: 593—595.
 - 45) Nakamura, T., Yamazaki, N., Tahiguchi, H., and Fujimura, S. 1983. Production, purification, and properties of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* isolated from saliva. Infect. Immun. 39: 609—614.
 - 46) Navia, J. M., 1980. Plaque biochemistry. Menaker, L (ed). The biologic basis of dental caries. 313—331. Harper & Row Publishers, Hagerstown.

- 47) Newman, H. N. 1980. Dental plaque. The ecology of the flora human teeth. 8—21. Charles C. Thomas Publishers. Illinois.
- 48) 小幡直樹 1982. 口腔内 *Bacteroides melanogenicus* の bacteriocin に関する研究. 歯科学報, 82 : 1355—1368.
- 49) 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.
- 50) Reeves, P. 1972. The bacteriocin, 8-9. Springer Verlag, New York.
- 51) Ritz, H. L. 1967. Microbial population shifts in developing human dental plaque. Archs. Oral Biol. 12 : 1561—1568.
- 52) Rogers, A. H. 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strain of *Streptococcus mutans*. App. Microbiol. 24 : 294—295.
- 53) Rogers, A. H., Van der Hoeven, J. S., and Mikx, F. H. 1979. Effect of bacteriocin production by *Streptococcus mutans* on the plaques of gnotobiotic rats. Infect. Immun. 23 : 571—576.
- 54) 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.
- 55) Sahl, H. G., and Brandis, H. 1981. Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. J. Gen. Microbiol. 127 : 377—384.
- 56) Sander, C. C., Nelson, G. E., and Sander, W. E. Jr. 1977. Bacterial interference IV. Epidemiological determinants of the antagonistic activity by the normal throat flora against group A streptococci. Infect. Immun. 16 : 599—603.
- 57) Schwabacher, H., Lucas, D. R., and Rimington, C. 1947. *Bacterium melaninogenicus* a misnomer. J. Gen. Microbiol. 1 : 109—120.
- 58) 塩野谷博 1975. ピオシン, 本間 遜, 小酒井 望, 滝上正編, 緑膿菌とその感染症. 87—106. 文光堂, 東京.
- 59) Slots, J. 1979. Subgingival microflora and periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 6 : 351—382.
- 60) Socransky, S. S. 1970. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J. Dent. Res. 49 : 203—222.
- 61) Socransky, S. S. 1977. Microbiology of periodontal disease-present status and future consideration. J. Periodontol. 48 : 497—504.
- 62) 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.
- 63) Syed, S. A., and Loesche, W. J. 1978. Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque age. Infect. Immun. 21 : 821—829.
- 64) Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. 1975. Bacteriocin of a group B *Streptococcus*: partial purification and characterization. Antimicrob. Agents Chemother. 7 : 764—772.
- 65) Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocin of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40 : 722—756.
- 66) Tagg, J. R., and Russell, C. 1981. Bacteriocin production by *Streptococcus salivarius* strain P. Can. J. Microbiol. 27 : 918—923.
- 67) 高添一郎 1982. 歯面沈着物の形態学, 歯面沈着物の微生物学. 歯界展望, 59 : 791—793, 794—799.
- 68) 田中信男, 中村昭四郎 1967. 抗生物質大要, 3—148. 東京大学出版会, 東京.
- 69) Taniguchi, H., Fujimura, S., Kiuchi, N., and Nakamura, T. 1983. Purification and properties of low molecular weight antimicrobial agents from oral bacterium, *Bacterionema matruchotii*. Antimicrob. Agents Chemother. (投稿中).
- 70) Weerkamp, A., Bongaerts-Larik, L., and Vogel, G. D. 1977. Bacteriocin as factors in the in vitro interaction between oral streptococci in plaque. Infect. Immun. 16 : 773—780.
- 71) 山崎宣夫 1982. 口腔内 *Staphylococcus aureus* のバクテリオシンに関する研究. 歯科学報, 82 : 1669—1685.