

〔原 著〕

ウィスター系とオズボーン系ラットから分離した  
mutans streptococciの性状とう蝕原性の比較研究

宮川 博史

北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座

(主任：馬場 久衛)

Characterization and cariogenicity of two mutans streptococci  
strains isolated from Wistar-albino and Osborne-mendel rats

Hiroshi MIYAKAWA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry,  
HEALTH SCIENCES UNIVERSITY OF HOKKAIDO

(Chief : Prof. Hisae BABA)

**Abstract**

Two mutans streptococci strains designated WS1 and OS1 were isolated from Wistar-albino and Osborne-mendel rats, respectively. The two strains differ in biochemical characterization; WS1 was characterized by hydrolysis of arginine, resistance to bacitracin, and it does not ferment starch and glycogen; OS1 showed no hydrolysis of arginine, but sensitivity to bacitracin and fermentation of starch and glycogen. Serotypes of the WS1 and OS1 strains were investigated with immunodiffusion: WS1 showed serotype *b* to react with anti *b* serum, but a serotype for OS1 could not be demonstrated by reaction with antisera to serotypes *a* to *h*. The OS1 reacted with anti *S. ferus* serum, suggesting that WS1 and OS1 were *S. rattus* and *S. ferus*, respectively.

The final pH of each strain after incubation in a medium including 1% glucose was 4.44 with WS1 and 4.28 with OS1, these pH values were almost the same as with standard strains derived from rats. Other standard strains showed lower pH than the standard and isolated strains of rats, and their acidogenicity was weak.

---

この研究の一部は第34回基礎歯科医学会(平成4年10月)にて発表した。本論文の要旨は北海道医療大学歯学部学位論文提出予定者 研究発表会(1996年10月: 本学)において発表した。  
受付: 平成9年3月24日

The cariogenicity of the two strains were investigated by isolating streptomycin resistant strains and inoculation to intersect each of the strains of rats. The results indicated that WS1 was strongly cariogenic in Wistar-albino rats, and OS1 was strongly cariogenic in Osborne-mendel rats, suggesting a relation between the strains isolated and the host rats.

**Key words :** mutans streptococci, cariogenicity, Wistar-albino rat, Osborne-mendel rat

## 緒 言

う蝕は歯周疾患と並んで歯学における2大疾患とされている。う蝕の発病に微生物が関与することを1889年にMiller<sup>1)</sup>が化学細菌説で提唱して以来、口腔細菌の中で強い乳酸産生能と耐酸性を持つ乳酸桿菌がう蝕の原因菌として注目されてきた。一方、1924年にClarke<sup>2)</sup>がヒトの抜去歯のう窩から多量の連鎖球菌を分離し、それが特殊な性状を示すことから、これを*Streptococcus* (*S.*) *mutans*と命名した。しかし、当時は乳酸桿菌がう蝕原因菌とされていたことから*S. mutans*は無視された。う蝕の発病に細菌が関与していることが、1954年のOrlandら<sup>3)</sup>による無菌飼育動物を用いた実験で初めて立証され、その後、Keyes<sup>4)</sup>、Fitzgerald<sup>5,6)</sup>などの研究者によりラット、ハムスター等の実験動物のう蝕病巣から分離された種々の菌について、う蝕誘発実験が行われた結果、強いう蝕原性を示す連鎖球菌が存在することが指摘された。その後、このようなう蝕原性を示す連鎖球菌が実験動物だけでなくヒトからも分離され<sup>7)~11)</sup>、種々の性状が解明されて行くに従い、これらの菌種がClarkeによって命名された*S. mutans*と同一菌種であることが確認され、歴史的背景から*S. mutans*と呼ばれるようになった。その後、*S. mutans*はう蝕の主要起因菌とされ、血清学的な研究から菌体表層多糖抗原によってa~hの8つの血清型<sup>12)~14)</sup>に分けられた。更に、遺伝学的な研究から主として染色体DNAのGC含量の相違によって7菌種 (*S. cricetus*, *S. rattus*, *S. mutans*, *S.*

*sobrinus*, *S. ferus*, *S. downei*, *S. macacae*)<sup>15)~18)</sup>に分類されており、現在ではこれらを総称してmutans streptococciと呼んでいる。これら7菌種のうち、ヒトから分離されるmutans streptococciとしては主として血清型c/e/fの*S. mutans*と血清型d/gの*S. sobrinus*の2菌種であるが、血清型aの*S. cricetus*や血清型bの*S. rattus*も若干分離されており、地域、家族単位などによって検出される菌種が異なることが報告されている<sup>19)</sup>。また、これらmutans streptococciのう蝕原性の強さは、ラットなどの実験動物を用いたう蝕誘発実験で異なっていることが報告されている<sup>20)~22)</sup>。一方、ラットから分離されるmutans streptococciとしては、前述の*S. rattus*が実験用ラットから、そして*S. ferus*が野生のラットから分離されている<sup>23)</sup>。しかし、ヒトにおいて異なる血清型あるいは菌種が分離されているように<sup>19)</sup>、ラットにおいても、系統によって更に異なるmutans streptococciが常在していることが考えられる。これまでにラットの系統の違いによるう蝕の罹患状況を調べた研究で、Larsonらは多系統のラットを用いてヒト由来の*S. mutans*を接種してう蝕誘発実験を行ったところ、ラット系統間でう蝕の発生に差があり、その原因として飼料の種類やその摂取量などが強く関連していることを報告している<sup>24)~27)</sup>。さらに彼らは、う蝕の少ない系統のラットと多い系統のラットを一緒に飼育するとう蝕の少ない系統のラットでもう蝕が誘発されると報告している。しかし、う蝕の発生にはう蝕原性菌の存在が問題となるが、各系統におけ

るう蝕原性細菌についてはまったく検討されていないことから、それぞれの系統のラットから分離した菌株を他系統のラットと交叉して接種し、それぞれにう蝕誘発能があるか否か検討することが必要である。

そこで、著者はまず継代飼育しているウィスター系とオズボーン系の2系統のラットの常在細菌叢について調べた。その結果、各系統のラットからそれぞれ形態の異なる *mutans streptococci* と思われる菌株を分離した。前述したように *mutans streptococci* はう蝕原因菌として研究されており、分離された菌株もラットにおけるう蝕の発生と強く関与していると考えられるので、まず、それぞれの血清型、菌種について知るために分離菌株の生化学的性状と血清型について既知の *mutans streptococci* 標準菌株やそれらに対する抗血清を用いて比較検討した。ついで、両分離菌株の streptomycin 耐性菌株を獲得して、得られた耐性菌株を2系統のラットそれぞれに対して交叉接種してう蝕原性の比較実験を行い、分離した *mutans streptococci* 菌株と2系統のラットにおけるう蝕の発生との関連性について比較検討したので報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 使用菌株と培養

ラット分離菌株としては当大学歯学部歯科薬理学教室で継代飼育しているウィスター系ラットから分離した WS1 株とオズボーン系ラットから分離した OS1 株の2株を実験に供した。また *mutans streptococci* 標準菌株として教室保存株である *S. cricetus* E49, HS1(a), *S. rattus* BHT, FA1(b), *S. mutans* Ingbritt, OMZ70(c), P4, LM7(e), OMZ175(f), *S. sobrinus* OMZ176(d), 6715(g) 株の11株と徳島大学医学部栄養衛生学講座、太田房雄教授より分与された *S. mutans* SE17(f), *S. sobrinus*

B13(d), OMZ65(g), *S. downei* MF25(h) 株の4株と岐阜大学医学部微生物学教室より分譲された *S. ferus* GIFU8820(c) 株の1株の合計16株を用いた [( ) 内は菌株の血清型を示す]。菌株の培養には Brain Heart Infusion (Difco, 以下BHI) ブロース, Trypticase Soy (Difco, 以下TS) ブロースを用い、菌株の保存には GAM 培地 (日水) に0.2%寒天を含んだ半流動培地を用い、6°Cに保存し、45日毎に継代した。

う蝕原性の比較実験に用いるために、分離菌株 WS1 株と OS1 株から streptomycin 耐性菌株を以下の方法で獲得した。BHI ブロースで18時間前培養した菌株を新しい BHI ブロースに接種し、37°Cで嫌気培養 ( $N_2$ : 70%,  $H_2$ : 15%,  $CO_2$ : 15%の混合ガス使用) し、対数増殖期に、その0.1mlを1000 $\mu$ g/mlの streptomycin (明治, 以下SM) を含んだ Mitis-Salivarius (Difco, 以下MS) 寒天培地に塗抹した。37°Cで48時間、嫌気培養して発育してきた集落を同じ培地で3~4回植え継いだ後、それぞれのラット分離菌株の SM 耐性菌株 (以下 WS1R 株と OS1R 株) を得た。得られた SM 耐性菌株は Api 20 strep system (Bio Merieux S. A.) を用いて親株と同じ性状を示すことを確認して (Table 4 参照) から、う蝕原性の比較実験に供した。

### 2. 使用菌株の生化学的性状と酸産生能

WS1 株, OS1 株, WS1R 株および OS1R 株と各標準菌株の生化学的性状は、Api 20 strep system を用いて調べ、更に、2 units/ml の bacitracin (P-L Biochemicals, Inc.) を含んだ MS 寒天培地での増殖の有無についても調べた。

また、TS ブロースで18時間前培養した各菌液を1% glucose を含んだ TS ブロースに接種し、48時間培養後に測定した培養液の pH 値を final pH とし、これを酸産生能として比較した。

### 3. WS1, OS1および*S. ferus* GIFU8820株の抗血清の調製

両分離菌株と*S. ferus* GIFU8820株の菌体表層多糖抗原に対する抗血清を増田の方法<sup>28)</sup>により調製した。まず各菌株をBHIブローで静置培養後、3600rpm, 10分間遠心分離して集菌した。これを0.85%生理食塩水(以下生食水)に懸濁した後、3600rpm, 10分間遠心分離して洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、菌体を $10^9$ 個/ml前後になるように生食水に浮遊し、60°C, 30分間加熱した。冷却後、その一部をMS寒天培地に塗抹し、菌が生存しないことを確認して残りを免疫原として以下の免疫に用いた。

免疫は第1週目には0.5ml, 第2週目には1.0ml, 第3, 4週目には2.0mlをそれぞれ週のうち5日間, 耳介静注した。さらに, 7~10日後に, 3~5日連続で2.0mlを追加免疫し, その最終免疫日より7日後に試験採血し, 免疫拡散法により十分抗体価が上昇していることを確認した後, 全採血した。分離した血清は-20°C下で保存した。

血清型a~hに当たるmutans streptococci E49(a), BHT(b), Ingbritt(c), OMZ176(d), P4(e), OMZ175(f), 6715(g), NCTC1139(h)株に対する抗血清は当大学歯学部口腔衛生学教室, 脇坂仁美助手より分与された抗血清を用いた。

### 4. 免疫拡散法

mutans streptococciの血清型についてはOuchterlony<sup>29)</sup>によって創案されたゲル内沈降反応を用いて調べた。寒天ゲルは前もって0.05Mバルビタール塩酸緩衝液(pH8.6, 和光純薬)に1% noble agar (Difco)を加えて加熱溶解したものを2.5mlずつ小試験管に分注し, 6°Cで保存しておいたものを用いた。使用時に加熱溶解し25mm×70mmのガラス板に注いで凝固させて寒天ゲルを作成した。抗血清および抗原のウェルは直径3mm, 深さ1.5mmでウェルの間隔が2mm

になるように寒天層に穿った。沈降反応に用いた菌体表層多糖抗原はRantzとRandallの方法<sup>30)</sup>に準じて抽出した。すなわち, TSブローで培養した菌体を集菌後, 生食水で洗浄した。洗浄した菌を培養液の1/100量から1/500量の生食水で浮遊したものを120°C, 20分間加熱抽出し, その遠心上清を抗原液とした。作成した寒天ゲルの各ウェルに抗血清, 抗原液を10~12μlずつ加え, 水を含ませたろ紙を敷いたシャーレに移し, 室温で一夜(18~20時間)保存し, 沈降線の出現の有無を観察した。

### 5. 実験動物および飼育方法

両分離菌株が分離された2系統のラット対して相互にう蝕誘発能を有するか否かを検討するために, 分離菌株のSM耐性菌株であるWS1R株とOS1R株をウィスター系とオズボーン系それぞれのラットに交叉接種してう蝕原性の比較実験を行った。それぞれのラットをSM耐性菌株を接種しないcontrol群, WS1R株を接種するWS1R株接種群, OS1R株を接種するOS1R株接種群の3群に分けた。全てのラットは生後21日で離乳し, う蝕誘発飼料としてはTable 1に示すようにsucroseを69%含んだ粉末配合飼料を制限下で, また飲料水として1000μg/mlのSM含有水道水を任意に与え飼育した。飼育は, 23°C, 湿度60%, 明暗12時間サイクルの条件下で行った。SM耐性菌株接種群にはSM耐性菌株を実験開始から毎週経口接種し, 4週間後に定着していることを確認し, その後は2週間毎にSM耐性菌株の接種を続けた。

Table 1 Experimental diets

Materials	Percentage(%)
Sucrose	69.0
Casein	20.0
Soybean oil	5.0
Salts	5.0
Choline chloride	0.5
Vitamins	0.5

### 6. 細菌叢検索のための試料および培養

ラットは実験開始から12週間後に屠殺し、直ちに歯牙を取り出し、下顎臼歯部咬合面の小窩裂溝部より歯垢を採取した。採取した歯垢を1/2濃度のチオグリコール酸塩培地に移し、均一な懸濁液となるまでホモジェネートし試料とした。得られた試料は、生食水により10倍希釈系列を作り、その0.1mlを1000 $\mu$ g/mlのSMを含んだ5%羊脱繊維血液加BHI寒天培地に塗抹し、37°C、48時間嫌気培養した。培養後、30~100個くらいの集落が発育した寒天培地を選び、集落の形態により分類した後、同一形態を示す集落より釣菌し、これを新しい寒天培地で純培養した。細菌数は培地に発育した形態の異なる集落毎に計数し、全集落数に対する割合によって表した。

### 7. 分離菌の性状検査

純培養した菌をグラム染色によりグラム染色性と形態によって分類し、さらにTable 2に示すような生化学的性状検査を行い Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>31)</sup>を参考にして同定した。また、glucoseを1%加えた培地で48時間培養後のfinal pHを測定し、同定された菌株の酸産生能についても検討した。

### 8. う蝕原性の比較

取り出した歯牙のう蝕の検査は木津<sup>32)</sup>、中井<sup>33)</sup>らの方法によって行った。すなわち、Table

Table 2 Identification of bacteria from dental plaque of rat

G(+)cocci	Api*20 strep system
G(+)lods	Api 20A system Catalase, Indole production, Ammonia from arginine Acid production from; Amygdalin, Arabinose, Fructose, Galactose, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Melezitose, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Salicin, Sorbitol, Trehalose, Xylose
G(-)cocci	Api 20A system
G(-)lods	Api 20A system, Api 20E system

\*BIO MERIEUX S. A.

Table 3 Observation of dental caries

The standards of this examination were as follows:

Grade 1:	Incipient caries showing a special brown color.
Grade 2:	Cavity detectable with explorer.
Grade 3:	Lesion spreading into the dentine.
Grade 4:	Lesion probably spreading into the pulp with incipient.
Grade 5:	Clear destruction of tooth with the crown of the tooth lost.

Caries incidence: Number of lesion per experimental rat used in this experiment

Caries extent: Caries incidence multiplied by caries grade

3に示すような基準で caries incidence と caries extentの2つの指数を用いて表し、t検定により比較検討した。

## 結 果

### 1. 分離菌株と標準菌株の生化学的性状と酸産生能の比較

2系統のラットからの分離菌株と標準菌株の生化学的性状を調べた結果をTable 4に示した。両分離菌株とも mutans streptococciの最大の特徴であるmannitol, sorbitolの糖分解性を示した。分離菌株の性状を比較するとWS1株とWS1R株ではarginineを加水分解し、bacitracinに耐性で、糖分解ではraffinoseを分解するが、inulin, starch, glycogenでは非分解性を示したのに対し、OS1株とOS1R株ではarginineは非加水分解性、bacitracinに感受性で、糖分解ではraffinoseは非分解性であるが、inulin, starch, glycogenを分解し、両分解菌株の生化学的性状は大きく異なっていた。標準菌株に比べると、WS1株とWS1R株は血清型bの*S. rattus*と、またOS1株とOS1R株は血清型cの*S. ferus*と同様の性状であり、それぞれラット由来のmutans streptococci標準菌株と同じである可能性が示唆された。

一方、1%glucoseを含んだ培地で48時間培養した時のfinal pHは、WS1株とWS1R株で4.44、

Table 4 Biochemical characteristics and final pH of mutans streptococci

Characteristics	WS1	WS1R	OS1	OS1R	<i>S. cricetus</i>	<i>S. rattus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. downei</i>	<i>S. ferus</i>
final pH	4.44	4.44	4.28	4.28	3.96-4.06	4.26-4.30	3.92-4.13	3.92-3.97	3.94	4.22
Hydrolysis of										
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
Arginine	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Fermentation of										
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+
Inulin	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
Raffinose	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Starch	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Glycogen	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Resistance to										
Bacitracin	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-

OS1 strain isolated from Osborne-mendel rat : WS1 strain isolated from Wistar-albino rat

final pH measured, after strains were incubated for 48 hours

+ . positive reaction - : negative reaction ± . difference of strain

Mutans streptococci strains is *S. cricetus* : E49, HS1 *S. rattus* BHT, FA1 *S. mutans* , Ingbritt, OMZ70, P4, LM7, OMZ175, SE17 *S. sobrinus* : OMZ176, B13, OMZ65, 6715 *S. downei* : MF25 *S. ferus* . GIFU8820 respectively.

Table 5 Immunodiffusion reaction of mutans streptococci strains and antisera

Antigen (serotype)	Antisera of each serotypes and isolated strains										
	WS1	OS1	GIFU 8820	a	b	c	d	e	f	g	h
WS1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
OS1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GIFU8820(c)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E49(a)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
BHT(b)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FA1(b)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ingbritt(c)	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
OMZ176(d)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
P4(e)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
OMZ175(f)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
6715(g)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
MF25(h)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+

Antisera of serotype a-h prepared from mutans streptococci strains of E49, BHT, Ingbritt, OMZ176, P4, OMZ175, 6715, NCTC1139, respectively

+ : positive reaction - : negative reaction

OS1株とOS1R株では4.28で、ラット由来の標準菌株である*S. rattus*, *S. ferus*の4.22~4.30とほぼ同じ値を示した。しかし、ラット由来以外の他の標準菌株は3.92~4.13を示し、ラット由来の標準菌株、分離菌株の酸産生能は比較的弱い傾向を示した。

## 2. 分離菌株の血清型の判定

分離菌株の血清型を免疫拡散法で調べた結果をTable 5 およびFig. 1に示した。血清型 b の*S.*

*rattus* BHT株に対する抗血清は、WS1株抗原と、同じ血清型 b の*S. rattus* FA1株抗原および自らの抗原と3本の沈降線を形成し (Fig. 1A)、WS1株に対する抗血清は、WS1株抗原とは2本の沈降線を形成し、また、FA1株抗原とBHT株抗原とも沈降線を形成した (Fig. 1B)。これらのことから、WS1株は血清型 b の*S. rattus*と考えられた。また、WS1株にはFA1株とBHT株には存在しないもう1つのエピトープが存在するこ

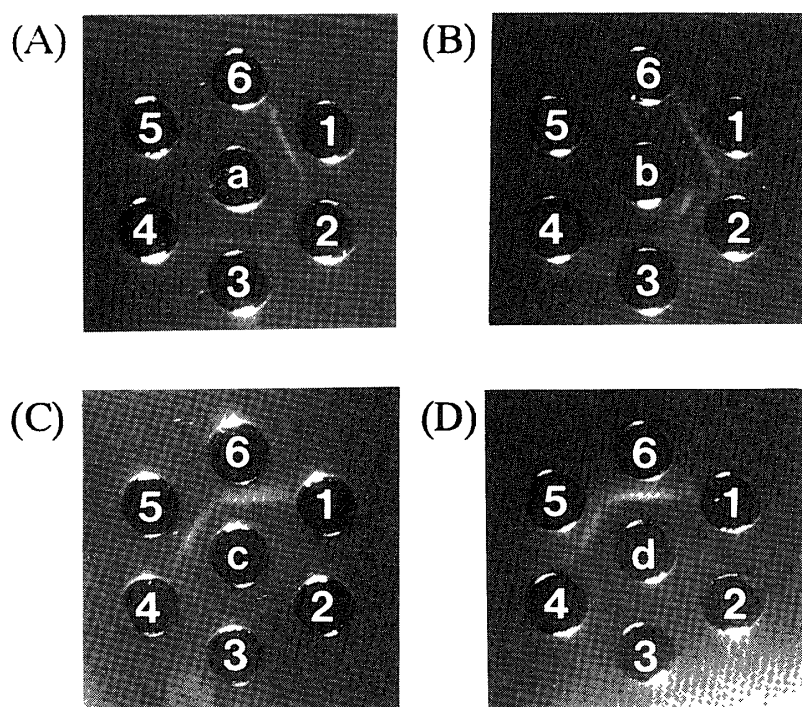


Fig 1. Immunodiffusion reaction of extract from mutans streptococci with antisera for BHT, WS1, GIFU8820, OS1 strains. The center well contained antiserum from BHT(a), WS1(b), GIFU8820(c), OS1(d), respectively. The peripheral wells contain antigen from FA1(1), WS1(2), BHT(3), Ingbritt(4), GIFU8820(5), OS1(6), respectively.

とが示された。

一方、血清型cの*S. ferus* GIFU8820株に対する抗血清は、OS1株抗原と自らの抗原とのみ沈降線を形成し(Fig. 1C)、また、OS1株の抗血清も、同様に自らの抗原とGIFU8820株抗原とのみ沈降線を形成した(Fig. 1D)。しかし、GIFU8820株とOS1株の抗血清は、同じ血清型cの*S. mutans* Ingbritt株抗原とは沈降線を形成しなかった(Fig. 1C, D)。また、*S. ferus* GIFU8820株とOS1株の抗原はヒト由来の*S. mutans* Ingbritt株やその他の血清型の菌株に対する抗血清とはいずれも沈降線を形成しなかった(Table 5)。したがって、OS1株は*S. ferus*と考えられたが、*S. ferus* GIFU8820株とOS1株の血清型についてはヒト由来の血清型cの*S. mutans*株とは異なる可能性が示唆された。なお、mutans streptococciの各血清型の菌株および分離菌株に対する抗血清と抗原の反応

性についてはTable 5に示したが、本研究で用いた抗血清は非特異的な結合を吸収操作で除いていないため、血清型d~gに対する抗血清のように他の血清型の抗原との間で非特異的に反応する抗血清も見られた。

### 3. 分離菌株のう蝕原性の比較

両分離菌株のう蝕誘発能を比較するためにSM耐性菌WS1R株とOS1R株を獲得し、ウイスター系とオズボーン系ラットをそれぞれcontrol群、WS1R株を接種するWS1R株接種群、OS1R株を接種するOS1R株接種群の3群ずつに分けてう蝕原性の比較実験を行った。実験終了後まず、各実験群から分離された菌株を同定して接種菌の定着性を調べるとともに、同定された菌株のfinal pHについても調べた。その結果、Table 6に示すように、ウイスター系ラットのcontrol群ではmutans streptococciは検出されず、*Lactobacillus acidophilus*が69.6%、*L.*

**Table 6** Detection rate and final pH of bacteria in the dental plaque of Wistar-albino rat

Organisms	final pH	Detection rate(%)		
		control	WS1R	OS1R
WS1R	4.44	—	97.2	—
OS1R	4.28	—	—	96.5
otherG(+)cocci	—	—	—	1.3
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4.02	69.6	0.7	0.5
<i>L. fermentum</i>	4.74	13.3	1.7	1.3
<i>Enterobacter cloacae</i>	5.76	7.4	—	0.4
otherG(-)lods	—	0.1	—	—
<i>Veillonella parvula</i>	—	9.6	0.4	—

control group : no inoculated SM resistant strains

WS1R group : inoculated SM resistant of WS1

OS1R group : inoculated SM resistant of OS1

— : not detect

*fermentum*が13.3%と大部分がグラム陽性桿菌であった。その他、嫌気性グラム陰性球菌の *Veillonella parvula*9.6%や腸内細菌である *Enterobacter cloacae*7.4%等が検出された。またWS1R株接種群ではWS1R株が97.2%と圧倒的多数で、またOS1R株接種群でも投与したOS1R株が96.5%と圧倒的多数を占めており、接種した菌株は良く定着していた。その他、それぞれの実験群で2%前後の乳酸桿菌が検出された。mutans streptococci以外に検出された菌株のfinal pHは *L. acidophilus*が4.02, *L. fermentum*が4.74, *E. cloacae*が5.76を示し, *L. acidophilus*の酸産生能が強いことが示された。*V. parvula*は糖を分解できないのでfinal pHは

測定しなかった。

一方、オズボーン系ラットの歯垢中ではTable 7に示したように、control群で *Actinomyces naeslundii*が75.4%, *L. fermentum*が8.5%, その他のグラム陽性桿菌が1.7%とウイスター系ラットと同様にグラム陽性桿菌が多くみられたが、主要な構成細菌には違いが見られた。その他、グラム陽性球菌が14.2%見られた。OS1R株接種群ではOS1R株が94.0%, WS1R株接種群ではWS1R株が92.0%検出され、それぞれに接種した菌株が定着していることが確認された。その他、それぞれの実験群から本ラットの固有常在菌である *A. naeslundii*が5%前後検出された。final pHでは *A.*

**Table 7** Detection rate and final pH of bacteria in the dental plaque of Osborne-mendel rat

Organisms	final pH	Detection rate(%)		
		control	OS1R	WS1R
WS1R	4.44	—	—	92.0
OS1R	4.28	—	94.0	—
otherG(+)cocci	—	14.2	1.0	0.5
<i>Actinomyces naeslundii</i>	4.01	75.4	4.8	6.7
<i>L. fermentum</i>	4.74	8.5	—	—
otherG(+)lods	—	1.7	0.2	0.8
G(-)lods	—	0.2	—	—

control group : no inoculated SM resistant strains

WS1R group : inoculated SM resistant of WS1

OS1R group : inoculated SM resistant of OS1

— : not detect



Table 8 Experimental dental caries of rat

Rat	Group	No. of rat	Dental caries	
			incidence	extent
Wistar-albino rat	control	5	7.0±1.1	10.2±1.6
	WS1R	5	11.2±1.5]**	16.4±2.5]**
	OS1R	5	8.2±1.5	10.8±1.5
Osborne-mendel rat	control	6	6.3±0.8	9.0±1.5
	OS1R	6	9.0±1.5]**	13.5±2.6]**
	WS1R	6	7.5±1.7	11.3±3.1

\*\* : significant at 1% level (t test)

*naeslundii*が4.01と最も低い値を示し、強い酸産生能を示した。

次に各ラットのう蝕罹患状況の検査結果をTable 8に示した。ウィスター系ラットでは本ラット固有のstreptomycin耐性菌株接種群であるWS1R株接種群がcaries incidence 11.2±1.5, caries extent 16.4±2.5を示し、control群のcaries incidence 7.0±1.1, caries extent 10.2±1.6との間で、それぞれ1%の危険率でう蝕の発病性に有意な差が見られた。しかし、オズボーン系ラット由来のOS1R株接種群では、caries incidence 8.2±1.5, caries extent 10.8±1.5となり、control群とほぼ同等のう蝕の発病性を示しただけであった。

一方、オズボーン系ラットにおいては本ラット固有のstreptomycin耐性菌株接種群であるOS1R株接種群がcaries incidence 9.0±1.5, caries extent 13.5±2.6となり、control群のcaries incidence 6.3±0.8, caries extent 9.0±1.5との間でそれぞれが1%の危険率で有意に高いう蝕の発病性を示した。しかし、WS1R株接種群ではcaries incidence 7.5±1.7, caries extent 11.3±3.1となり、control群との間で統計的にう蝕の発病性に有意な差は見られなかった。

以上のことから、両ラットともにそのラット固有のmutans streptococci菌株のう蝕誘発能が高く、異系統のラット由来のmutans streptococci菌株のそれは低くなる傾向を示した。

## 考 察

Clarke<sup>2)</sup>によって1924年にヒトのう蝕病巣より分離、命名された*S. mutans*は、長い間注目されずにきたが、1960年代に実験動物に強いう蝕原性を示す連鎖球菌として再認識されて以降、う蝕起因菌として種々の性状が調べられた結果、血清学的、遺伝学的にいくつかの菌種に分類されるようになった。現在ではそれらに共通の性状を持つ口腔連鎖球菌をmutans streptococciと総称している。これらmutans streptococciは、Chapman<sup>34)</sup>が報告した連鎖球菌の選択培地であるMS寒天培地にラフ型、ムコイド型といった特徴的な集落の形態を示すので、容易に口腔の試料から単離できる。また、その性状の最大の特徴として、mannitol, sorbitol (*S. sobrinus*の一部の菌株と*S. downei*を除く)の糖発酵能をもつことがあげられる。今回、ウィスター系とオズボーン系ラットの下顎臼歯の小窩裂溝部の歯垢から分離されたWS1株とOS1株は、MS寒天培地上にラフ型の特徴的な集落を形成し、糖発酵能を調べたところmannitol, sorbitolの発酵能を有しておりmutans streptococciと考えられた (Table 4)。そこで、mutans streptococciの標準菌16株と分離されたWS1株とOS1株の生化学的性状、血清型について比較し、菌種について検討した。その結果、WS1株は、arginineを加水分解し、bacitracinには耐性で、糖分解ではraffinoseを分解し、血清型bの*S. rattus*に特徴的な性状を示した。更に、

免疫拡散法による血清型判定でも *S. rattus* とのみ交叉反応を示した (Fig. 1A, B) ので, WS1株は血清型 b の *S. rattus* と推察した。これまでに *S. rattus* はヒトから分離されたという報告も若干見られる<sup>35-37)</sup>が, 一般的にラットから分離される mutans streptococci と考えられており, WS1株は継代飼育していたウイスター系ラットに常在していたと思われた。一方, OS1株は, 血清型 c の *S. ferus* GIFU8820株と同様に inulin, starch, glycogen の糖分解性を有しており, 他の mutans streptococci とは異なる性状を示した。この特徴は Karl<sup>38)</sup>, Beighton<sup>17)</sup>らも糖分解性で starch, glycogen を分解するのは mutans streptococci の中でも *S. ferus* だけであることを報告しており, これらの糖分解性は他の mutans streptococci 菌株と *S. ferus* 菌株を簡単に分別する 1 つの指標になるものと思われる。さらに, OS1株の血清型について調べた結果, 生化学的性状で一致した *S. ferus* GIFU8820株との間で互いの抗血清に対してのみ交叉反応が見られた (Fig. 1C, D) ので OS1株は *S. ferus* と考えられた。しかし, 一般に *S. ferus* は血清型 c と言われているにもかかわらず, 本研究では OS1株と *S. ferus* GIFU8820株はどちらも血清型 c の Ingbritt株に対する抗血清とは反応しなかった (Table 5)。このことについては, Kral<sup>38)</sup>も同様に *S. ferus* が血清型 c の菌株に対する抗血清と反応しなかったと報告しており, 今後, モノクローナル抗体等を用いた詳細な血清型に関する研究, 特に血清型 c の *S. mutans*, *S. macacae* との関係について調べる必要があると思われる。また, *S. ferus* は 1974 年に Coykendall<sup>23)</sup> がサトウキビを飼料としていた野生ラットの口腔から最初に単離した報告と, その後に埋立地に生息していた野生ラットから分離した報告<sup>39)</sup>以外には報告例がなく, 今回単離した OS1株が実験動物の口腔から単離された最初の報告であり, 野生のラットだけでなく実験用のラット

にも常在している可能性が示唆された。

これらラット由来の mutans streptococci である *S. rattus* と *S. ferus* の酸産生能は他の動物由来の標準菌株に比べて若干弱い傾向がみられた (Table 4)。 *S. rattus* はアフリカでう蝕のないヒトの口腔内から多く分離されたという報告<sup>40)</sup>などから, ヒトのう蝕発生にはあまり関与していないと考えられている。しかし, ラットにはう蝕原性のあることが示されており<sup>41)</sup>, 分離されたウイスター系ラットのう蝕発生に関与していると思われる。本研究で示された *S. rattus* の酸産生能が比較的弱いことも, ヒトやラットに対してう蝕原性が異なる原因の一つと考えられる。一方, 野生ラットから分離された *S. ferus* に関しては, *S. sobrinus* と比較して実験用ラット (Sprague-Dawley系ラット) にはう蝕誘発能がなく, 耐酸性のないことがその原因として報告されている<sup>42)</sup>。しかし, OS1株が分離されたオズボーン系ラットにおけるう蝕発生に関与していないとは言えない。また, これまでにラット由来である *S. rattus* と *S. ferus* のう蝕原性を比較したり, 異なる系統のラットから分離した菌株をそれぞれが分離された系統のラットに対して交叉接種してう蝕原性を比較した報告もこれまでにない。

そこで, 本研究では分離菌株の streptomycin 耐性株を用いて, Fitzgerald<sup>5)</sup> や Guggenheim<sup>43)</sup> の考案した普通飼育動物に抗生物質を投与し続けるう蝕原性の比較実験により両分離菌株がそれぞれのラットに対してう蝕原性を有するかどうか調べた。その結果, 接種した WS1R株と OS1R株はウイスター系とオズボーン系ラットそれぞれから 92.0~97.2% の割合で検出された (Table 6 と 7)。このことは, 接種菌がいずれのラットにもよく定着することを示している。一方, control 群ではラット由来の mutans streptococci よりも酸産生力の高いグラム陽性桿菌がそれぞれ分離され, ウイスター系ラットから

は*L. acidophilus*が69.6%, オズボーン系ラットからは*A. naeslundii*が75.4%と高い割合で検出された。しかし, う蝕罹患率を比較した結果 (Table 8)では, それぞれが分離された系統のラットに耐性菌株を投与したウィスター系ラットのWS1R株接種群とオズボーン系ラットのOS1R株接種群の方がcontrol群よりもう蝕罹患率が高く, それぞれが1%の危険率でその差は有意であった。これとは逆に, それぞれのラットに異種のラット由来のmutans streptococciを交叉して接種した実験群では, control群との間でう蝕の罹患率に差は見られなかった。このことは, そのラット固有のmutans streptococciは, その由来したラットにはう蝕誘発能は高いがラットの系統が異なるとそのう蝕誘発能が低くなることを示唆しているものと思われる。したがって, ラットを用いて細菌のう蝕誘発能を検討する際には, 用いるラットの系統に留意することが必要であると思われる。このような異なる系統のラットにおけるう蝕の発病性を比較した報告で, Königら<sup>26)</sup>はオズボーン系とNIH-ブラック系の2系統のラットにおいてう蝕発生に違いが見られ, ラットの飼料の摂取の仕方が異なることがその原因の1つとしている。しかし, 両系統のラットにおける細菌叢との関連性については検討されていないので, 今後, 宿主であるラットのう蝕に関する因子と微生物との関連性についてもさらに検討する必要があると考えられる。今後さらに, 異なる系統間でのラット固有常在菌叢によるう蝕の発病性のメカニズムについて検討していく所存である。

## 結 論

ウィスター系とオズボーン系の2系統のラットよりそれぞれ分離したmutans streptococciについて生化学的性状や血清型を標準菌株と比較検討し, さらにそれぞれのラットに対してこれらの分離菌株を交叉接種してう蝕原性の比較

実験を行い, 以下の結果を得た。

1. ウィスター系ラットとオズボーン系ラットからそれぞれ分離したmutans streptococci菌株の生化学的性状や血清型について調べた結果, ウィスター系ラット分離菌株は血清型bの*S. rattus*と, オズボーン系ラット分離菌株は*S. ferus*と考えられた。しかし, *S. ferus*はこれまで血清型cと言われてきたが, 本研究では*S. ferus*に対する抗血清はヒトから分離された血清型cの*S. mutans*菌株抗原とは反応せず, *S. ferus*標準菌株や分離菌株が異なる血清型であることが示唆された。

2. う蝕原性の比較実験から, 分離菌株はそれぞれのラットに対して良く定着していた。しかし, ウィスター系ラット分離菌株はウィスター系ラットに, オズボーン系ラット分離菌株はオズボーン系ラットにとそれぞれが分離されたラットに対してのみ強いう蝕原性を示し, その傾向はオズボーン系ラット分離菌株で強く見られ, 分離菌株とそれらの宿主のラットとの間に関連性があることが示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座馬場久衛教授に感謝の意を表すとともに, 御教示, 御校閲を賜りました歯科薬理学講座松本仁人教授, 御校閲を賜りました口腔衛生学講座上田五男教授に感謝の意を表します。また, 今回使用しました菌株を御供与いただきました徳島大学医学部栄養衛生学講座太田房雄教授, 抗血清を御供与くださいました口腔衛生学講座脇坂仁美助手に感謝の意を表します。そして, 本研究に対して多大な御協力をいただきました歯科薬理学講座松井聡子助手, 口腔細菌学講座鎌口有秀助教授ならびに教室員各位に感謝致します。

## 文 献

1. Miller, W.D : The micro-organisms of the human mouth, p. 24. The S. S. White Manufacturing Co., Philadelphia, 1890
2. Clarke, J.K. : On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. Br. J. Exp. Pathol., 5 : 141-147, 1924.
3. Orland, F. J., Blayney, J. R., Harrison, R. W., Reyniers, J. A., Trexler, T. C., Wagner, M., Girton, H. A. and Luckey, T. D. : Use of the germ-free animal technic in the study of experimental dental caries. 1. Basic observations on rats reared free of all microorganisms J. Dent. Res., 33 : 147-174, 1954.
4. Keyes, P. H. . The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Arch. oral Biol, 1 : 304-320, 1960.
5. Fitzgerald, R. J. and Keyes, P. H. : Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster J. Am. Dent. Assoc., 61 : 9-19, 1960
6. Fitzgerald, R. J., Jordan, H. V and Stanley, H. R. : Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. J. Dent. Res., 39 : 923-935, 1960.
7. Krasse, B. : Human streptococci and experimental caries in hamsters Arch. oral Biol., 11 : 429-436, 1966.
8. Gibbons, R. J., Berman, K. S, Knoettner, P and Kapsimalis, B. : Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin Arch. oral Biol., 11 : 549-560, 1966.
9. Gibbons, R. J. and Banghart, S. : Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque Arch. oral Biol., 12 : 11-24, 1967.
10. Edwardsson, S : Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. Arch. oral Biol., 13 : 637-646, 1968.
11. De Stoppelaar, J. D., Van Houte, J. and Dirks, O. B. : The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. Caries Res., 3 : 190-200, 1969.
12. Bratthall, D. : Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. Odontol Revy., 21 : 143-152, 1970.
13. Perch, B., Kjems, E. and Ravn, T. : Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. Acta Pathol Microbiol. Scand, 82 : 357-370, 1974.
14. Beighton, D., Russell, R. R. B. and Hayday, H. . The isolation and characterization of *Streptococcus mutans* serotype *h* from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). J. Gen. Microbiol, 124 : 271-279, 1981.
15. Coykendall, A. L. : Proposal to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status, based on their molecular composition. Int. J. Syst. Bacteriol, 27 : 26-30, 1977.
16. Coykendall, A. L. : *Streptococcus sobrinus* nom rev. and *Streptococcus ferus* nom rev. Habitat of these and other mutans streptococci. Int. J. Syst. Bacteriol., 33 : 883-885, 1983
17. Beighton, D., Hayday, H., Russell, R. R. B and Whiley, R. A. : *Streptococcus macacae* sp. nov. from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*) Int. J. Syst. Bacteriol., 34 : 332-335, 1984.
18. Whiley, R. A., Russell, R. R. B., Hardie, J. M and Beighton, D. : *Streptococcus downei* sp. nov. for strains previously described as *Streptococcus mutans* serotype *h*. Int. J. Syst. Bacteriol., 38 : 25-29, 1988
19. Loesche, W. J. : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev., 50 : 353-380, 1986.
20. Willcox, M. D., Drucker, D. B. and Green, R. M. : Comparative cariogenicity and dental plaque-forming ability in gnotobiotic rats of four species of mutans streptococci. Arch. oral Biol., 34 : 825-828, 1989.
21. Harper, D. S., and Loesche, W. J. : Effect of pH upon sucrose and glucose catabolism by the various genogroups of *Streptococcus mutans* J. Dent. Res., 62 : 526-531, 1983.
22. Denepitiya, L and Kleinberg, I. : A comparison of acid-base and aciduric properties of various

- serotypes of the bacterium *Streptococcus mutans* associated with dental plaque. Arch. oral Biol., 29: 385-393, 1984.
23. Coykendall, A. L., Specht, P. A. and Samol, H. H.: *Streptococcus mutans* in a wild, sucrose-eating rat population. Infect. Immun., 10: 216-219, 1974.
24. Larson, R. H. and Simms, M. E.: Genetic and environmental influences on dental caries in the Osborne-Mendel and the NIH Black rat. Arch. oral Biol., 10: 663-668, 1965.
25. Larson, R. H. and Goss, B. J.: Diet as a limiting factor in the transmissibility of caries activity between rats of different strains. Arch. oral Biol., 12: 1085-1093, 1967.
26. König, K. G., Larson, R. H. and Guggenheim, B.: A strain-specific eating pattern as a factor limiting the transmissibility of caries activity in rats. Arch. oral Biol., 14: 91-103, 1969.
27. Larson, R. H. and Zickus, C. S.: Patterns of dental caries in Osborne-Mendel and NIH Black rats in relation to length of the caries test period. J. Dent. Res., 51: 1375-1381, 1972.
28. 増田典男; *Streptococcus mutans*の分離と型別, 浜田茂幸: う蝕と歯周病—研究の進歩, Vol. 1: 1-33, 日本歯科評論社, 1982.
29. Ouchterlony, O.: The techniques of double diffusion in two dimensions, p. 31-32, In O. Ouchterlony (ed.), Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis, Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 1968.
30. Rantz, L. A. and Randall, E.: Use of autoclaved extract of hemolytic streptococci for serological grouping. Stanford Med. Bull., 13: 290-291, 1955.
31. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (ed.): Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
32. 木津弘司: 幼若白鼠における栄養成績と齲歯の発生について, 歯科学報, 41: 512-535, 1961.
33. 中井一仁: 乳児栄養に関する実験的研究, Caseinを蛋白源とした高蛋白並びに低蛋白飼料を与えたシロネズミの実験的齲歯の発生および歯牙の灰分, CaおよびP含有量について, 歯科学報, 66: 273-280, 1966.
34. Chapman, G. H.: The isolation and testing of fecal streptococci. Am. J. Digest Dis., 13: 105-107, 1946.
35. Facklam, R. R.: Characteristics of *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and blood. Int. J. Syst. Bacteriol., 24: 313-319, 1974.
36. Berkowitz, R. J., Jordan, H. V. and White, G.: The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. Arch. oral Biol., 20: 171-174, 1975.
37. Ota, F., Kiso, M., Okada, K., Kato, H., Hirota, K., Fukui, K., Yasuoka, M., Ono, M., Uegaki, K. and Morimoto, Y.: *Streptococcus mutans* serotype b strain (*St. rattus*, Coykendall): First isolation in Japan from human dental plaque. Microbiol. Immunol., 29: 1005-1010, 1985.
38. Kral, T. A. and Daneo-Moore, L.: Biochemical differentiation of certain oral streptococci. J. Dent. Res., 60: 1713-1718, 1981.
39. Coykendall, A. L., Bratthall, D., O'connor, K. and Dvarskas, R. A.: Serological and genetic examination of some nontypical *Streptococcus mutans* strains. Infect. Immun., 14: 667-670, 1976.
40. Kilian, M., Thylstrup, A. and Fejerskov, O.: Predominant plaque flora of Tanzanian children exposed to high and low water fluoride concentrations. Caries. Res., 13: 330-343, 1979.
41. Rosen, S.: Comparison of sucrose and glucose in the causation of dental caries in gnotobiotic rats. Arch. oral Biol., 14: 445-450, 1969.
42. Coykendall, A. L. and Freedman, M. L.: Colonization and cariogenicity of *Streptococcus ferus* in rats. Infect. Immun., 32: 80-85, 1981.
43. Guggenheim, B., König, K. G. and Muhlemann, H. R.: Modifications of the oral bacterial flora and their influence on dental caries in the rats. I. The effects of inoculating 4 labelled strains of streptococci. Helv. Odontol. Acta, 9: 121-129, 1965.