

Title	Streptococcus mutansが菌体外に産生するバクテリオシン (mutacin) の性状およびデンタルプラークの細菌叢に対する作用
Author(s)	今西, 秀明
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/33092">http://hdl.handle.net/11094/33092</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	いま 今	にし 西	ひで 秀	あき 明
学位の種類	歯	学	博	士
学位記番号	第	5	5	5
学位授与の日付	昭和57年3月6日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	<b><i>Streptococcus mutans</i>が菌体外に産生するバクテリオシン(mutacin)の性状およびデンタルプラークの細菌叢に対する作用</b>			
論文審査委員	(主査) 教授	祖父江鎮雄		
	(副査) 教授	小谷 尚三	教授 常光	旭 助教授 村山 洋二
	講師	竹村 金造		

### 論 文 内 容 の 要 旨

う蝕ならびに歯周疾患の発病に重要な役割を演じるデンタルプラーク（以下プラークと略す）を構成する細菌は多岐にわたるが、そのなかでも *Streptococcus mutans* がヒト、特に小児う蝕の主要な原因菌となっていることが良く知られている。一方、*S. mutans* の多くの株がバクテリオシン(mutacin)を産生することが明らかにされている。しかし mutacin の本態、抗菌機序、ならびに mutacin がプラークの細菌叢の生態におよぼす影響などについては、不明な点が多い。

著者は、同一家族の母子から増田典男博士が分離した血清型gの *S. mutans* が培養上清中に mutacin を産生することを見出し、1株を選んで菌体外 mutacin の精製を試み、かつ部分精製標品の基本的性状、抗菌機序ならびにヒトプラークの細菌叢に対する作用を in vitro で調べた。

代表に選んだ *S. mutans* MT 3791株の mutacin 産生能は、寒天平板培地にあらかじめ穿刺培養しておき、指示菌株を軟寒天と共に重層、培養した際に、穿刺部周辺の生育阻止帯を検出する穿刺培養法、ならびに、寒天平板に播種した指示菌上に培養上清を滴下し培養して生育阻止の有無を調べる滴下法によって検定した。いずれの検定法でも、MT 3791株は、*S. mutans* (血清型a~g)、*S. sanguis*, *S. salivarius* などのレンサ球菌計3菌種、合計63株に対して mutacin 活性を示した。しかしレンサ球菌のなかでも *S. mitior* の3株には抗菌作用を示さず、また *staphylococcus*, *Lactobacillus* および *Actinomyces* に属する6菌種、計11株、ならびに *Escherichia coli* k12株には作用しなかった。特記すべき所見として、MT 3791株による菌体外 mutacin の産生は、これまでの報告とは異なり、Trypticase Soy ブロースなど5種類の市販の培地で安定して認められ、培地を選ぶことがなかった。さらに Tryptose Phosphate ブロース(difco)から調製した透析外液培地においても、本株は十分な力価の

mutacin を菌体外に産生した。

菌体外 mutacin はつぎのように濃縮，部分精製した。すなわち上記透析外液培地に18時間培養した MT3791株の培養上清を硫酸の60%飽和で塩析濃縮後，沈澱した mutacin の PBS 「溶液」を300,000<sub>xg</sub> で18時間超遠心して部分精製した。以上の操作により培養上清の mutacin 活性を余すことなく回収しかつ単位蛋白質重量当りの力価（比活性）を約1,500倍に上昇させることができた。

部分精製した mutacin はパパイソリンやプロナーゼ処理では失活したが，トリプシン，ペプシン，リパーゼ，フォスフォリパーゼ，核酸分解酵素やカタラーゼの処理では活性の低下を示さなかった。また80℃，30分間の加熱では活性の低下を示さず，100℃，1時間の加熱後も完全には失活しなかった。pH 3.8~7.6の間では安定であり，かつ抗菌作用の発現の減弱も認められなかった。Mutacin MT3791は，試みた限りの感受性菌株の凍結乾燥菌体に吸着し，非感受性の *E. coli* K12株には吸着しなかった。*S. sanguis* OMZ9株や *S. mitior* ATCC903株は mutacin を吸着はするが，その抗菌作用を蒙らず，吸着は抗菌作用の発現を必ずしも結果しなかった。

つぎに指示菌，*S. mutans* MT703R株の Tryptose Phosphate プロース培養でのトリチウムで標識したアミノ酸混合物，チミジンおよびウリジンの取り込みを調べたところ，mutacin 添加後時を移さず取り込みが停止すること，すなわち蛋白質，DNA および RNA の合成のすべてが mutacin の作用によって停止し，指示菌の生育が阻止されることが明らかになった。一方滅菌生理食塩水に懸濁した指示菌の生菌数は，1単位の mutacin の存在により，37℃，1時間の反応で非添加対照群のその数%に低下し，供試 Mutacin が静菌作用のみならず殺菌作用をも発揮することが示された。また小児のう蝕病巣表面より採取したプラークを0.1%酵母エキス加滅菌生理食塩水中に懸濁したものに，最後力価1単位の部分精製 mutacin を作用させ，Goldらが考案したMSB寒天平板培地を用いて *S. mutans* の生菌数を数えたところ，*S. mutans* の生菌数は，mutacin 添加後30分では約50%，2時間後には10数%にまで減少することを知った。この際，Trypticase Soy 寒天平板および Mitis Salivarius 寒天平板培地を用いて数えた総細菌および総レンサ球菌の生菌数には有意の減少は認められなかった。

今回報告した mutacin MT3791は以上述べたように熱に対してかなり安定ではあるが，パパイソリンやプロナーゼの処理によって失活することから，その抗菌作用に何らかの風に蛋白質が関与していることが推定される。分子サイズについては，Sepharose 4Bカラムに添加し，PBSで溶出したところ mutacin 活性はボイド容量に溶出され，2,000,000 dalton 以上の分子量を有するようには見えた。しかし溶出を1% Tween80や6Mの尿素を加えたPBSで行うと mutacin 活性の溶出位置は大幅に後退し，供試 mutacin が「凝集」体を形成していることが示唆された。

以上，*S. mutans* MT3791株が菌体外に産生する mutacin の濃縮と部分精製法，基本的性状，抗菌機序その他について述べたが，この mutacin がヒトプラーク中の *S. mutans* に選択的な殺菌作用を示す事実は，*S. mutans* のう蝕原性に鑑み，注目すべき所見と言えよう。

## 論文の審査結果の要旨

本研究は、血清型gの *Streptococcus mutans* が菌体外に生成するバクテリオシン(mutacin)を部分精製し、その基本的性状、抗菌機序ならびにヒトプラークの細菌叢に対する作用を精査したものである。このmutacinは、その生成に当って培地を選ばないこと、またヒトプラークを構成する多数の細菌種のなかで *S. mutans* に選択的な殺菌作用を発揮するなど、従来報告されているmutacinと様相を異にしている。特に後者の所見は、このmutacinが、プラークの細菌叢における *S. mutans* の動態に大きな影響を及ぼす可能性を示唆している。

以上のように、今西秀明君の業績は、プラーク細菌叢のエコロジーを左右する因子としてのmutacinをめぐる種々の研究課題に新しい知見を加え、さらにう蝕コントロールへの応用の可能性をも秘めた優れた研究であり、歯学博士の学位請求に十分値するものと認める。