

## DNA 解析によるミュータンスレンサ球菌の 家族内伝播に関する研究

中山 隆 介

### A Study on Intra-familial Transmission of Mutans Streptococci by Chromosomal DNA Analysis

Ryusuke Nakayama

(平成 8 年 1 月 12 日受付)

#### 緒 言

小児における歯科疾患のなかで、齲蝕は近年、減少傾向にあると言われている<sup>1)</sup>ものの、依然として主要な歯科疾患であり、低年齢児の齲蝕罹患率も欧米諸国に比較すると高い。ミュータンスレンサ球菌が、齲蝕の初発および進行に最も重要な役割を演じることは無菌動物実験系を使った多くの実験により明らかにされている<sup>2-4)</sup>。同菌は菌体外に産生される、グルコシルトランスフェラーゼによってスクロースの存在下で菌体表層あるいは菌体外に、不溶性グルカンを合成して、その粘着性で歯面に菌垢を形成する。次いで菌垢中で有機酸を産生することによって、歯面を脱灰し、齲蝕を進行させる。Keyes<sup>5)</sup>のとなえる齲蝕発症の3つの要因のうち、細菌の役割は大きく、齲蝕予防にあたって、口腔内のミュータンスレンサ球菌を標的とする方法として、口腔清掃による菌垢の機械的な除去、抗菌剤やグルカンの合成阻害剤の利用<sup>6,7)</sup>、免疫学的試み<sup>8,9)</sup>などが検討されている。これらの方法を成功させるためには、ミュータンスレンサ球菌の生態や疫学について十分に知識を得ることが必要で、特に同菌の小児への伝播経路を把握することは重要であると考える。

ミュータンスレンサ球菌はヒト口腔内に一般的にみられる細菌であって、その侵入から定着に至る経路を

明らかにすることは困難であったが、同菌に関する研究が進むにつれて、その性状には多様性があり、血清学的に分類されることが明らかになった<sup>10)</sup>。そしてこの血清学的分類法は同菌の疫学的研究に広く使用されるようになり<sup>10-13)</sup>、伝播経路の解明にも応用されるようになった。血清学的分類法によると同菌は主として *a-g* の 7 種類の血清型に分類され<sup>4)</sup>、しかもヒト口腔内に棲息するミュータンスレンサ球菌は血清型 *c* が多い<sup>4,10-14)</sup>。そこで伝播経路の解明にあたっては、*c* 型の菌株に比較して検出率の低い、*d* 型や *g* 型の菌株を追突することで研究されてきた<sup>15)</sup>。しかしこの方法による分類では、全てのミュータンスレンサ球菌の伝播経路を解明するためには不十分であった。

また、細菌の産生する抗菌性タンパクの一つであるバクテリオシンの存在が、ミュータンスレンサ球菌においても報告<sup>16)</sup>されると、菌株ごとのバクテリオシン活性の違いを利用して同菌を分類するバクテリオシン型別法の応用が試みられるようになった<sup>17,18)</sup>。続いて血清学的型別法とバクテリオシン型別法の併用も試みられるに至った<sup>19)</sup>。バクテリオシン型別法による分類は、血清学的型別法による分類と結果がよく一致し<sup>12,20,21)</sup>、お互いの型別法による分類を裏付けることは可能となったが、同菌の伝播経路を解明するため、より詳細な分類に使用するには、まだ不十分であった。

近年、各種細菌の菌株を系統的に分類するにあたって、DNA finger print 法が用いられるようになり<sup>22-27)</sup>、ミュータンスレンサ球菌の分類への応用も試みられてきた<sup>28-33)</sup>。

本研究では、Chromosomal DNA finger print 法を用

広島大学歯学部小児歯科学講座（主任：長坂信夫教授）論文の要旨は、平成 5 年 5 月の第 31 回日本小児歯科学会大会、平成 6 年 6 月の第 27 回広島大学歯学会総会、平成 7 年 5 月の第 33 回日本小児歯科学会大会において発表した。

いて小児を含む家族内における口腔内のミュータンスレンサ球菌の相同性を調べ、その家族内での菌株分布状態を把握することによって同菌の伝播様式を明らかにした。次いで菌株ごとに性状を分析し、この結果と家族内での菌株の分布状態を検討することで、ミュータンスレンサ球菌の伝播に関わる因子の一端を解明することを目的とした。

## 対象ならびに方法

### I. 研究対象

広島大学歯学部附属病院小児歯科診療室に来院した患児とその両親を含む計20家族、76名を研究対象とした。(表1)

表1 被験者

		20家族					総計
	父親	母親	小児				
			乳児	幼児	学童		
人数			男児	5	3	11	
			女児	1	9	7	
	20	20		6	12	18	76

### II. 供試菌の分離

被験者の口腔内の全歯牙より滅菌つま楊枝で歯垢を擦過して採取した。これを滅菌生理食塩水に懸濁し、ミュータンスレンサ球菌の選択培地である<sup>34,35)</sup> Mitis-Salivarius Bacitracin (MSB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 寒天平板培地に播種し、37°C, 48時間の培養を行った。生じたコロニーを実体顕微鏡下で無作為に鈎菌し、これを Brain Heart Infusion (BHI) (Difco) 液体培地に接種して、37°C で24時間培養した。この菌液を再び MSB 寒天平板培地に播種し、培養、鈎菌、BHI 液体培地による培養操作を数回繰り返すことによって純培養し、分離株を得た。

ミュータンスレンサ球菌の同定試験にはマンニトールおよびソルビトールの発酵能試験を全ての分離株について行った。すなわち Purple Broth Base (Difco) を含む Thioglycollate (Difco) 液体培地に1%のマンニトール(片山化学)あるいはソルビトール(片山化学)を加え、それぞれ分離株を培養し、培地の紫色が緑変することを指標として、糖の発酵を確認した。

### III. 分離菌株の相同性鑑別

#### 1. 染色体 DNA の精製

DNA の抽出には Kulkarni ら<sup>29)</sup> および Kozai ら<sup>30)</sup>

の方法を用いた。すなわち各分離株について、BHI 培地で前培養を行い、増殖の静止期に達した菌液を BHI 培地 5 ml に加え、37°C にて培養した。波長 550 nm で菌液の濁度を経時的に測定し、吸光度が0.4の対数増殖中期に達した時点で、5%になるよう glycine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を加えてよく攪拌した。さらに 37°C で45分間培養後、1,800×g で15分間遠心して集菌し、0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) で遠心洗浄した。菌体は使用まで -20°C にて保存した。

菌体からの染色体 DNA の抽出には phenol-chloroform を用いた。phenol-chloroform 抽出液の調製は、予め 10 ml の phenol に等量の 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) を加え十分に攪拌し平衡化を行った後、二層に分離するまで静置して上層を廃棄した。これに 10 ml の chloroform を加え再び十分に攪拌し、8時間以上静置して分離した下層を phenol-chloroform 抽出液 (1:1, v/v) として使用した。冷凍保存した菌体に 50 mM glucose, 10 mM ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA), 25 mM Tris-HCl buffer よりなる lysis buffer<sup>29)</sup> (pH 8.0) 150 μl を加え超音波ホモジナイザー (UR-20P, トミー精工) で5から10秒間超音波振動を加えた。さらに 10 mg/ml の lysozyme (Sigma) を含む lysis buffer を 141 μl 加え、37°C で30分間インキュベートして菌体を破壊した。ここに 9 μl の 5M NaCl および 150 μl の 10% sodium dodecylsulfate (SDS) を加えて軽く攪拌し、室温に10分間放置後、450 μl の phenol-chloroform 抽出液を加え十分に攪拌し、8,120×g で3分間遠心して染色体 DNA を分離した。染色体 DNA を含む上清を、別のマイクロチューブに下層が混濁しないように注意深く集めることで除タンパクを行った後、900 μl の ethanol を加えて、染色体 DNA を沈渣として得た。これをさらに数回 ethanol で濃縮し、100 μl の超純水に懸濁したものを染色体 DNA サンプルとして以降の実験に供した。使用までは -80°C にて保存した。

#### 2. 制限酵素による切断

電気泳動パターンによる分離菌の相同性の鑑別をより明確にするため、制限酵素には *EcoR* I, *Hind* III, *Sma* I (いずれも TOYOBO) の3種を用いた。11 μl の各制限酵素に特定の消化用 buffer (*EcoR* I: 50 mM Tris-HCl buffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol) (*Hind* III: 10 mM Tris-HCl buffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol) (*Sma* I: 10 mM Tris-HCl buffer, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 7 mM 2-mercaptoethanol), 7 μl の DNA サンプル (約 2.0 μg の DNA を含む), 2 μl の制限酵素液をこの順に 1.5

ml 容量のマイクロチューブにとり、軽く攪拌して、37°C (Sma I のみ 30°C) で約 6 時間反応させて消化した。5% SDS, 35% glycerol, 0.04% bromophenol blue (片山化学) より成る loading solution<sup>29)</sup> 5  $\mu$ l を消化後の反応液に加え 5 分間 70°C で、酵素反応を終了させ、電気泳動に供した。

### 3. 電気泳動

電気泳動はサブマリン型泳動槽 (日本エイドー) を用いた。buffer には 0.1M Trizma base (Sigma), 0.1M boric acid (Amresco, Solon, OH, USA), 2 mM di-sodium EDTA より成る TBE buffer を用いた。アガロースゲルは 7% に調整し、サイズは 14 cm  $\times$  18 cm, 7 mm 厚さとした。またコウムは厚さ 1 mm, 16 ウェルのものを使用した。マーカーには  $\lambda$ Hind III digest (TOYOBO) を使い、各ウェルに 25  $\mu$ l ずつサンプルを添加し、電源装置 (NC-1017, 日本エイドー) にて 30 mA で約 15 時間泳動を行った。泳動の終わったゲルは 0.5  $\mu$ g/ml の ethidium bromide を含む TBE buffer 中で 30 分間染色し、超純水中で 2 時間脱色を行った。このゲルをトランスイルミネーター (DT-20M, ATTO) の紫外線 (312 nm) 下で、ランドカメラ (MP-4, Polaroid, Cambridge, MS, USA) を用いてフィルム (インスタントバックフィルム 667, 日本ポラロイド) に撮影した。

### 4. 相同性の判定

各分離株の電気泳動パターンの相同性判定は、フィルム上の泳動パターンに見られるバンドの数と位置を比較することによって行った。全ての分離株について、個人ごとに続いて家族ごとに泳動を行った後、判定の困難な、あるいは濃度に差があるパターンは、再度泳動を行い電気泳動パターンの相同性判定を明確にした。

また、得られた電気泳動パターンの写真をスキャナ (GT-8000, セイコーエプソン) でパーソナルコンピューター (Macintosh IIci, アップルコンピュータージャパン) に画像データとして取り込み、専用の解析ソフト (NIH Image, NIH, USA) を用いて濃度曲線を比較し、パターンの相同性鑑別の参考とした。

同一パターンを示す分離株は、同一由来の菌株と考え家族内における菌株の分布状態を検討して、ミュータンスレンサ球菌の家族内での伝播について考察した。

## IV. 菌株の各種性状

Chromosomal DNA finger print 法を用いて全分離株の相同性を判定し分類した、被験者の保有する全菌株を以下に述べる性状について分析し、ミュータンスレ

ンサ球菌の伝播との関わりを検討した。

### 1. 血清型による分類

血清型の分類は北村の方法<sup>36)</sup> に準じて行った。

ミュータンスレンサ球菌各血清型を代表する菌株として、*Streptococcus cricetus* E49 (血清型 a), *S. rathus* BHT (b), *S. mutans* Ingbritt (c), *S. sobrinus* B13 (d), *S. mutans* LM7 (e), *S. mutans* SE11 (f), *S. sobrinus* OMZ65 (g) を免疫原とした。これらの菌株は BHI で 24 時間培養し、1,800  $\times$  g で 15 分間遠心洗浄を行った。波長 550 nm で濁度が 1.0 になるよう生理食塩水に菌を懸濁し、60°C, 30 分加熱後、Incomplete adjuvant (Difco) を加えた。この菌液を白色家兎に 0.5 ml ずつ数回静注した。抗体価の十分な上昇を免疫拡散法<sup>11)</sup> によって確認した後、血液を採取して血清を分離した。このうちいくつかの免疫血清は、他の血清型の抗原と交差反応を示したため吸収操作を行い型特異血清とし、-20°C で保存した。

抗原の調製には Rantz と Randal<sup>37)</sup> の方法を用いた。各菌株は 5 ml の BHI 培地で増殖静止期まで培養後、1,800  $\times$  g で 15 分間遠心洗浄し、0.1 ml の生理食塩水に懸濁した。これを 120°C で 15 分間加熱処理し、得られた上清を抗原として使用した。

0.05M barbital-HCl buffer (pH 8.2) 中に、1% になるよう添加した寒天を加熱溶解し、寒天ゲル平板を作製した。平板上に間隔が 8 mm となるように直径 4 mm, 深さ 1.5 mm のウェルを作り、それぞれに抗原および抗血清を加え室温で 24 および 48 時間後に、沈降線の有無を判定して、血清型を決定した。

### 2. 菌株の性状

#### (1) 菌体疎水性

菌体疎水性の指標として、Busscher ら<sup>38)</sup> の方法を用いて、菌株ごとの接触角を測定した。

波長 550 nm で濁度が 1.0 になるように調製した菌懸濁液を pore size 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルター (TOYO membrane filters TM 2, 東洋濾紙) 上に層状に集菌し、コンタクトアングルメーター (CA-D 型, 協和界面科学) を用い 1-bromonaphthalene (ナカライテスク) による液滴法で Young の接触角を測定した。

全ての菌株について測定を 7 回行い、最高と最低を除いた 5 回の平均を接触角のデータとした。

#### (2) 不溶性グルカン合成能

香西<sup>39)</sup> の方法を用いて各菌株の不溶性グルカン合成能を測定した。

菌株は BHI 培地で前培養後、400 ml の Berman 液体培地で 37°C にて対数増殖後期まで培養した。これを 5,000  $\times$  g で 20 分遠心除菌し、上清に 60% 飽和となるように硫酸アンモニウムを加えておよそ 12 時間、

4°C 下で塩析を行った。5,000×g で20分遠心して得られた沈渣をセルロースチューブ (Spectrum, Houston, TX, USA) に集め、0.01M phosphate buffer (pH 6.5) 中で24時間透析した。サンプルを 8,500×g で20分遠心した上清を粗グルコシルトランスフェラーゼ (GTase) として凍結保存し、実験に供した。

5 μl の粗 GTase は 10 μl の 0.2M phosphate buffer (pH 6.5), 5 μl の [<sup>14</sup>C]-Sucrose (NEC 100, DU PONT, Boston, MA, USA) とともに 37°C で1時間反応させた。これをよく攪拌し一部を残して、5,000×g で5分間遠心した。遠心前の反応液と遠心後の上清のそれぞれ 5 μl を濾紙 (ADVANTEC 51A, 東洋濾紙) にプロットして、溶媒に 1-butanol:pyridine:水 (6:4:3, v/v) を用いた上昇法にてペーパークロマトグラフィを行った。展開後、濾紙の原点部分 (グルカン相当部分) を切り取り、放射線量を液体シンチレーションカウンター (LSC-903, アロカ) を用いて測定し、グルカン合成量を算定した。遠心前の数値を全グルカン合成量、遠心後の上清の数値を水溶性グルカン合成量とし、その差から不溶性グルカン合成量を求め、その全グルカン合成量に対する割合を百分率で表したものを不溶性グルカン合成能とした。

### (3) バクテリオシン活性

各家族ごとに保有する菌株の相互のバクテリオシン活性を Hamada ら<sup>17)</sup> の穿刺培養法に準じて測定した。

前培養した菌株を 5 ml の Trypticase Soy (TS) (Difco) 液体培地で 37°C 18時間培養後、TS 寒天平板培地に穿刺して約48時間培養し、バクテリオシン被験菌株とした。一方、別の菌株を同じく TS 液体培地で18時間培養しその 0.5 ml を、55°C に保った 4 ml の TS 軟寒天培地 (寒天0.8%) に加えた。この軟寒天菌液をさきに被験菌株を穿刺培養した平板培地上に均一に重層しバクテリオシン指示菌株とした。この重層培地を 37°C で18時間培養後、発育阻止帯の有無、その直径を測定し、バクテリオシン活性の指標とした。

### (4) 菌増殖能

菌の増殖能として、各菌株の世代時間を測定した。すなわち BHI 培地中で 37°C で菌を培養して菌液の濁度を測定し、世代時間を以下の式で求めた。

$$g = (t_2 - t_1) \log 2 / \log B - \log b = 30 \times 0.301 / \log B - \log b \quad (\text{min.})$$

(g: 世代時間, B:  $t_2$  時の菌数, b:  $t_1$  時の菌数)

全ての菌株について5回の測定を行い、その平均をデータとした。

### (5) 酸産生能

菌株ごとの酸産生能は、増殖静止期に達した菌液の pH を指標とした。

菌株は BHI 培地中で増殖静止期に達するまで 37°C で培養し、pH メーター (φ71, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) を用いて pH を測定した。全ての分離株について5回の測定を行い、その平均をデータとした。

## 結 果

### I. 分離菌株の相同性鑑別

全ての分離菌株の Chromosomal DNA finger print 法による電気泳動パターンは数回の泳動で詳細に比較し、各被験者の保有する全ての菌株を、家族ごとに一つのゲル上に泳動して写真撮影した。図1に今回研究した20家族のうち、家族1の電気泳動パターンの写真を示す。

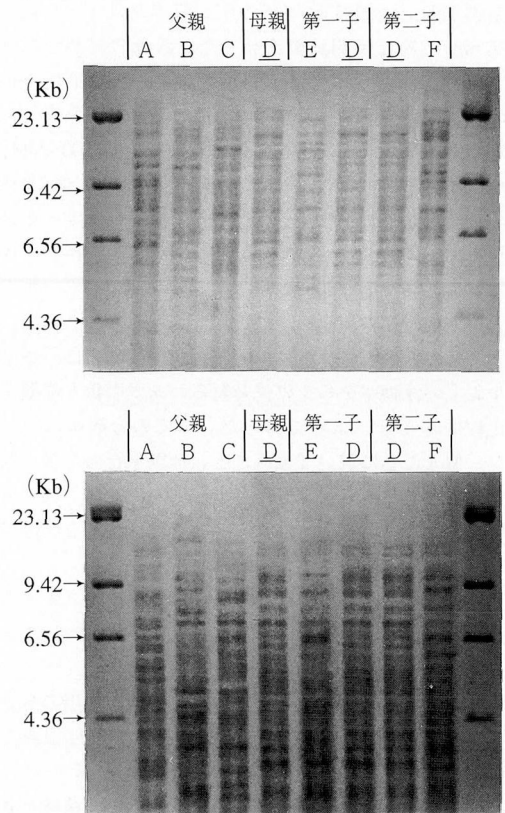


図1-1 家族1の電気泳動パターン (上: *EcoRI* 下: *Hind III*) .

このようにして、20家族、76名より得た総計1,940株のミュータンスレンサ球菌分離株について Chromosomal DNA finger print 法により相同性を比較して、分類した菌株の分布結果を表2に示す。家族内での菌株の分布状態は、家族ごとにかかなり違った様相を呈し

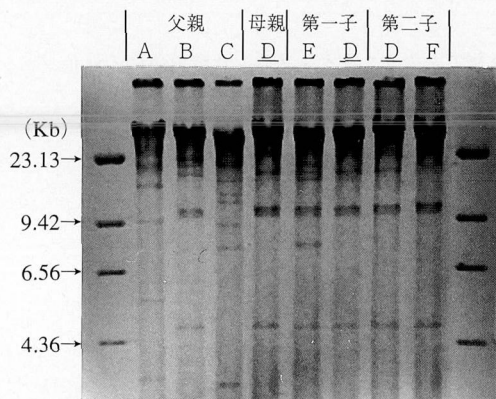


図1-2 家族1の電気泳動パターン (Sma I).

泳動方向は上から下である。

どの制限酵素を使用したものも、父親が3種、母親が1種、2人の子供がそれぞれ2種ずつの異なるパターンを示す菌株を保有しており、このうちDとマークされた母親と2人の子供の保有する株が同じパターンを示し、他の菌株のパターンはすべてバンドの数や位置で違いが見られた。

ていた。たとえば、家族4では2種類の菌株のみが分離され、家族全員が共通に保有する菌株があった。家族6, 10, 18, 20では小児の保有する菌株はすべて母親から伝播したもので、それ以外からの伝播はなかった。逆に家族12では小児に伝播した2種類の菌株は、どちらも父親の保有する菌株であった。

表3には各被験者の保有するミュータンスレンサ球菌の菌株数を示す。一人で保有する菌株は、2菌株を有するものが76名中45名と最も多数を占めた。その他は1菌株のみ有するものが17名、3菌株を有するものが13名、4菌株を有するものが1名であった。表4には家族ごとに保有するミュータンスレンサ球菌の菌株数を示す。家族単位で保有する菌株は2から8菌株と様々で、4菌株を有する家族が最も多数を占めた。また、異なる家族間で共通な株を保有することはなかった。

被験小児の保有する菌株の両親との共有は、表5に示すように、全74菌株のうち33菌株 (44.6%) は同じ菌株を母親も保有していた。また23菌株 (31.1%) については父親が共通の菌株を保有しており、2菌株 (2.7%) は父親も母親もともに共通の菌株を保有していた。残りの16菌株 (21.6%) は父親とも母親とも共通しない菌株であった。

小児からの分離株のうち家族内で伝播した菌株と家族外から伝播した菌株の占める割合について、男女差、年齢差、出生順などの項目で統計的な検定を行ったが、有意な差は認められなかった。しかし同胞数で

比較すると、一人より二人、三人の方が、全分離株のうち家族内で伝播した菌株の占める割合が高い傾向を示し、一人と三人の間では有意差が認められた (表6)。

一方、菌株の家族内伝播の状況を、個人ごとにみると、36名の小児のうち31名 (86.1%) は母親と共通の菌株を保有しており、20名 (55.6%) は父親と共通の菌株を保有していた。両親の保有しない菌株を保有していた小児は、13名 (36.1%) であった (表7)。さらに同様に家族ごとにみると、表8に示すように、20家族のうち90%を占める18家族で小児への菌株の伝播に、母親が関係していた。父親が関係していた家族は、55%の11家族、両親以外が関係していた家族は、50%の10家族であった。

## II. 菌株の各種性状

### 1. 血清型による分類

表9は被験者の保有する全150菌株を血清型によって分類したものである。c型が67.3%と最も多く、ついでd型12.7%、e型12.0%、g型が8.0%見られ、a, bおよびf型は検出されなかった。c型の菌株では、家族内で伝播した菌株 (以下伝播菌株と略す) と家族内で伝播しなかった菌株 (以下非伝播菌株と略す) はおよそ半数ずつであったが、d型、e型およびg型では3血清型の平均で89.1%と、その多くが伝播菌株であった。個人としては、1種類の血清型のみ有するものが65.8%であり、そのうちc型のみ有するものが48.7%であった。2種類の血清型を有するものは31.6%、3種類を有するものは2.6%であった。

### 2. 菌株の性状

#### (1) 菌体疎水性

菌体疎水性と家族内伝播の関係を図2および表10に示す。接触角は伝播菌株では平均  $27.9 \pm 2.2^\circ$ 、非伝播菌株では平均  $32.9 \pm 3.9^\circ$  であり、この二つのグループ間で0.1%以下の危険率で有意差が認められた。また個人の口腔内から高い割合で分離された菌株は、接触角が小さい傾向がみられた。

#### (2) 不溶性グルカン合成能

不溶性グルカンの合成量と家族内伝播の関係を図3および表10に示す。不溶性グルカン合成量の割合は、伝播菌株では平均  $85.0 \pm 4.5\%$ 、非伝播菌株では平均  $55.4 \pm 20.4\%$  であり、この二つのグループ間で0.1%以下の危険率で有意差が認められた。さらに、非伝播菌株のうち、両親ともに保有しないが小児が保有する菌株、つまり家族外から小児に伝播した菌株のグループと両親のいずれかが保有しているが小児に伝播していない菌株のグループの間では、不溶性グルカン合成

表 2-1 Chromosomal DNA finger print 法により分類した家族ごとのミュータンスレンサ球菌菌株の分布 (家族 1 ~ 10)

家族番号	家族構成員	保有菌株数	家族ごとの菌株の分布							
1	父親	3	* A(67.5) B(20.0) C(12.5)							
	母親	1	D(100)							
	第一子	2	D(70.0) E(30.0)							
	第二子	2	D(25.0) F(85.0)							
2	父親	3	A(37.5) B(55.0) C(2.5)							
	母親	2	D(95.0) E(5.0)							
	第一子	3	A(65.0) F(30.0) G(5.0)							
	第二子	3	A(70.0) F(10.0) H(20.0)							
3	父親	1	A(100)							
	母親	1	B(100)							
	第一子	3	A(70.0) B(5.0) C(25.0)							
	第二子	1	A(100)							
	第三子	2	B(90.0) D(10.0)							
4	父親	2	A(60.0) B(40.0)							
	母親	1	A(100)							
	第一子	2	A(75.0) B(25.0)							
	第二子	2	A(60.0) B(40.0)							
5	父親	3	A(80.0) B(10.0) C(10.0)							
	母親	2	D(90.0) E(10.0)							
	第一子	2	A(15.0) B(10.0) C(100) D(85.0)							
	第二子	3	A(75.0) B(10.0) D(15.0)							
6	父親	2	A(90.0) B(10.0)							
	母親	2	C(85.0) D(15.0)							
	第一子	1	C(100)							
	第二子	1	C(100)							
7	父親	2	A(70.0) B(30.0)							
	母親	2	B(15.0) C(85.0)							
	第一子	2	A(40.0) C(60.0)							
8	父親	1	A(100)							
	母親	1	B(100)							
	第一子	2	B(90.0) C(10.0)							
	第二子	1	B(100)							
9	父親	2	A(10.0) B(90.0)							
	母親	1	C(100)							
	第一子	2	C(45.0) D(55.0)							
10	父親	3	A(25.0) B(60.0) C(15.0)							
	母親	2	D(85.0) E(15.0)							
	第一子	2	D(50.0) E(50.0)							

表 2-2 Chromosomal DNA finger print 法により分類した家族ごとのミュータンスレンサ球菌菌株の分布 (家族11~20)

家族番号	家族構成員	保有菌株数	家族ごとの菌株の分布					
11	父親	2	A (80.0)	B (20.0)				
	母親	1			C (100)			
	第一子	2	A (80.0)		C (20.0)			
	第二子	2	A (15.0)		C (85.0)			
12	父親	2	A (50.0)	B (50.0)				
	母親	2			C (50.0)	D (50.0)		
	第一子	2	A (15.0)	B (85.0)				
	第二子	2	A (20.0)	B (80.0)				
13	父親	3	A (65.0)	B (20.0)	C (15.0)			
	母親	2				D (90.0)	E (10.0)	
	第一子	2	A (55.0)			D (45.0)		
	第二子	2	A (45.0)			D (55.0)		
	第三子	2	A (30.0)			D (70.0)		
14	父親	2	A (45.0)	B (55.0)				
	母親	1			C (100)			
	第一子	2			C (60.0)	D (40.0)		
15	父親	2	A (85.0)	B (15.0)				
	母親	2			C (30.0)	D (70.0)		
	第一子	3	A (35.0)		C (30.0)		E (35.0)	
16	父親	3	A (15.0)	B (70.0)	C (15.0)			
	母親	2			C (15.0)	D (85.0)		
	第一子	1				D (100)		
	第二子	2				D (70.0)	E (30.0)	
17	父親	1	A (100)					
	母親	2		B (10.0)	C (90.0)			
	第一子	3	A (10.0)		C (20.0)	D (70.0)		
18	父親	2	A (70.0)	B (30.0)				
	母親	1			C (100)			
	第一子	1		C (100)				
19	父親	4	A (45.0)	B (15.0)	C (15.0)	D (25.0)		
	母親	2					E (70.0)	F (30.0)
	第一子	2	A (30.0)				E (70.0)	
	第二子	3	A (45.0)				E (35.0)	G (20.0)
20	父親	2	A (80.0)	B (20.0)				
	母親	2			C (90.0)	D (10.0)		
	第一子	2			C (80.0)	D (20.0)		
	第二子	2			C (65.0)	D (35.0)		
	第三子	2			C (90.0)	D (10.0)		

\* : 表内のアルファベットは、家族ごとの菌株に便宜的に付けたものである。

\*\* : ( ) 内の数値は、被験者ごとに各菌株の全分離株に占める割合を%で示した。

表3 被験者の保有するミュータンスレンサ球菌菌株数

保有菌株数	人数 (%)
1	17 (22.4)
2	45 (59.2)
3	13 (17.1)
4	1 (1.3)
総計	76 (100.0)

表4 家族ごとに保有するミュータンスレンサ球菌菌株数

保有菌株数	家族数 (%)
2	1 (5.0)
3	4 (20.0)
4	7 (35.0)
5	5 (25.0)
6	1 (5.0)
7	1 (5.0)
8	1 (5.0)
総計	20 (100.0)

表5 被験小児の保有する全菌株の両親との共有

被験小児の保有する菌株のうち	菌株数 (%)
母親と共通の菌株	33 (44.6)
父親と共通の菌株	23 (31.1)
母親とも父親とも共通の菌株	2 (2.7)
母親とも父親とも共通しない菌株	16 (21.6)
総計	74 (100.0)

量の割合の平均に危険率1%以下で有意差が認められた。

### (3) バクテリオシン活性

バクテリオシン活性は、血清型ごとにその特徴がみられ、血清型 *g* の菌株は全菌株中12株と数は少ないものの、そのすべてが *c* 型株と *e* 型株に対してバクテリオシン活性を示した。ことに *e* 型株に対しては *c* 型株に対するよりも強いバクテリオシン活性を示した。これ以外では *c* 型株同士でわずかにバクテリオシン活性を示す組み合わせがいくつかみられたが、大部分の組み合わせではバクテリオシン活性は示されなかった。さらに、表11に示すように *g* 型株を保有す

表6 男女別、年齢別、同胞数および出生順位別にみたミュータンスレンサ球菌の家族内伝播菌株の占める割合

	人数	伝播菌株の平均占有率*
性別	男児 17	89.1±19.5
	女児 19	85.8±22.3
年齢別	乳児 6	85.0±24.0
	幼児 12	91.2±15.3
	学童 18	85.3±24.0
同胞数	1 7	72.9±28.8
	2 20	88.5±19.7
	3 9	96.1±8.6
出生順位	1 20	85.5±21.5
	2 13	88.1±22.3
	3 3	96.7±5.8

\*：小児の全分離株中、母親あるいは父親由来の菌株が占める割合 (%)

表7 被験小児のミュータンスレンサ球菌の伝播の由来

菌株の由来	人数 (%)
母親のみ	9 (25.0)
父親のみ	3 (8.3)
両親	11 (30.6)
母親、その他	7 (19.4)
父親、その他	2 (5.6)
両親、その他	4 (11.1)
総計	36 (100.0)
菌株の伝播に	
母親が関係している	31 (86.1)
父親が関係している	20 (55.6)
両親以外も関係している	13 (36.1)

る構成員を含む家族については、強いバクテリオシン活性を示した *g* 型株のすべてが家族内で伝播した菌株であり、それを保有する個人の口腔内からの分離率も高い結果となった。

### (4) 菌増殖能

各菌株の世代時間と伝播との関係を図4および表10に示した。世代時間については菌株間で大きな違いは見られず、菌増殖能と家族内伝播や口腔内からの分離率との関係には統計的有意差は認められなかった。

### (5) 酸産生能

増殖安定期に達した菌液の pH と伝播との関係を図



表8 家族別にみたミュータンスレンサ球菌の伝播の由来

菌株の由来	家族数	(%)
母親のみ	4	(20.0)
父親のみ	1	(5.0)
両親	5	(25.0)
母親, その他	5	(25.0)
父親, その他	1	(5.0)
両親, その他	4	(20.0)
総計	20	(100.0)

菌株の伝播に	家族数	(%)
母親が関係している	18	(90.0)
父親が関係している	11	(55.0)
両親以外も関係している	10	(50.0)

表9 全菌株の血清型による分類

血清型	菌株数 (%)	伝播菌株 (%)	非伝播菌株 (%)
c	101 (67.3)	49 (53.3)	52 (89.7)
d	19 (12.7)	17 (18.5)	2 (3.4)
e	18 (12.0)	14 (15.2)	4 (6.9)
g	12 (8.0)	12 (13.0)	0 (0.0)
総数	150(100.0)	92(100.0)	58(100.0)

5および表10に示した。菌液のpHについても世代時間と同様に菌株間で統計的に有意な差は認められなかった。

## 考 察

ミュータンスレンサ球菌が、スクロースの存在下で齲蝕の発生に重要な役割を演じていることは多くの研究者によって明らかにされており<sup>4,14)</sup>、齲蝕予防にあ

たって、抗生物質やChlorhexidineなどの抗菌剤を用いて、口腔内のミュータンスレンサ球菌数を減少させる試みが数多くなされてきた<sup>7,40,41)</sup>。これらの研究では、菌数の減少は一過性であり、処置を中止すると菌数が処置前のレベルまで増加するという結果を得ている。また、Svanbergら<sup>42,43)</sup>は成人の口腔内へのミュータンスレンサ球菌の移植実験で、すでに固有のミュータンスレンサ球菌が存在する菌叢に、他のミュータンスレンサ球菌を大量に接種し、定着させてもやがては消失していくと報告している。これらの報告は<sup>42,43)</sup>、ミュータンスレンサ球菌がすでに定着して、菌叢が安定している状態では、これを抑制したり排除する、あるいは他の菌株と置き換えることは、困難であることを示唆している。一方、Masudaら<sup>44)</sup>は血清型による分類方法で、幼児の口腔内に棲息するミュータンスレンサ球菌を経年的に調べ、単一の血清型の菌株しか保有していなかった症例が、複数の血清型の菌株を保有するようになったり、優位を占める血清型の菌株が変化することを報告している。これは幼児の口腔内の菌叢が成人ほど安定していないことを示している。そこで、低年齢児へのミュータンスレンサ球菌の伝播をできるだけ遅れさせたり、菌の量をできるだけ低いレベルに抑えることが齲蝕予防において有効であると考えられる。

一般に感染症に対して適確な対処をするためには、その病原微生物の感染経路を正確に把握することが必要である。齲蝕はミュータンスレンサ球菌による一つの感染症であり、同菌を標的とした齲蝕予防を考えるにあたっては、まずその侵入から定着に至る、伝播の経路を明確にすることも重要となる。しかし齲蝕については、その初発が低年齢でかつ罹患率も高く、感染対象である小児を取り囲むほとんど全てのヒトが、ミュータンスレンサ球菌を保有していることから、同菌の伝播経路を解明することは困難である。これまでは主に、血清学的型別法を利用して同菌の菌株の相同性を判定し、伝播経路を考察する研究が多くなされて

表10 ミュータンスレンサ球菌菌株の接触角、不溶性グルカン合成能、世代時間およびpHと家族内伝播の関係

	平均±標準偏差			
	接触角(°)	不溶性グルカン合成能 (%)	世代時間 (分)	pH
伝播菌株	37.9±2.2	85.0±4.5	24.4±0.4	5.7±0.2
非伝播菌株	32.9±3.9	55.4±20.4	25.6±0.4	5.7±0.2

※: p<0.001

表11 4組の家族におけるバクテリオシン活性パターン

		菌株 家族3：(分離率)* 血清型							
被験菌株	指示菌株	F-A	M-B	C <sub>1</sub> -A	C <sub>1</sub> -B	C <sub>1</sub> -C	C <sub>2</sub> -A	C <sub>3</sub> -B	C <sub>3</sub> -D
		(100) <i>g</i>	(100) <i>c</i>	(70) <i>g</i>	(25) <i>c</i>	(25) <i>c</i>	(100) <i>g</i>	(90) <i>c</i>	(10) <i>c</i>
F-A	<i>g</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
M-B	<i>c</i>	11**	0	10	0	0	11	0	0
C <sub>1</sub> -A	<i>g</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>1</sub> -B	<i>c</i>	10	0	10	0	0	11	0	0
C <sub>1</sub> -C	<i>c</i>	8	0	8	0	0	7	0	0
C <sub>2</sub> -A	<i>g</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>3</sub> -B	<i>c</i>	10	0	11	0	0	11	0	0
C <sub>3</sub> -D	<i>c</i>	12	5	11	5	0	12	6	0

		菌株 家族4：(分離率) 血清型						
被験菌株	指示菌株	F-A	F-B	M-A	C <sub>1</sub> -A	C <sub>1</sub> -B	C <sub>2</sub> -A	C <sub>2</sub> -B
		(60) <i>g</i>	(40) <i>e</i>	(100) <i>g</i>	(75) <i>g</i>	(25) <i>e</i>	(60) <i>g</i>	(40) <i>e</i>
F-A	<i>g</i>	0	0	0	0	0	0	0
F-B	<i>e</i>	18	0	18	17	0	16	0
M-A	<i>g</i>	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>1</sub> -A	<i>g</i>	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>1</sub> -B	<i>e</i>	17	0	18	18	0	17	0
C <sub>2</sub> -A	<i>g</i>	0	0	0	0	0	0	0
C <sub>2</sub> -B	<i>e</i>	17	0	17	17	0	17	0

		菌株 家族8：(分離率) 血清型				
被験菌株	指示菌株	F-A	M-B	C <sub>1</sub> -B	C <sub>1</sub> -C	C <sub>2</sub> -B
		(100) <i>c</i>	(100) <i>g</i>	(90) <i>g</i>	(10) <i>c</i>	(100) <i>g</i>
F-A	<i>c</i>	0	12	12	0	12
M-B	<i>g</i>	0	0	0	0	0
C <sub>1</sub> -B	<i>g</i>	0	0	0	0	0
C <sub>1</sub> -C	<i>c</i>	7	11	12	0	11
C <sub>2</sub> -B	<i>g</i>	0	0	0	0	0

		菌株 家族18：(分離率) 血清型			
被験菌株	指示菌株	F-A	F-B	M-C	C <sub>1</sub> -C
		(70) <i>c</i>	(30) <i>c</i>	(100) <i>g</i>	(100) <i>g</i>
F-A	<i>c</i>	0	0	11	11
F-B	<i>c</i>	0	0	11	12
M-C	<i>g</i>	0	0	0	0
C <sub>1</sub> -C	<i>g</i>	0	0	0	0

血清型 *g* の菌株を保有する4家族について、家族ごとに保有する全菌株相互のバクテリオシン活性を示した。

\*：各菌株の被験者ごとの全分離株に占める割合 (%)

\*\*：発育阻止帯の直径 (mm)

きたが、ヒトが最も多く保有している *c* 型については、相同性を判別することができないため、検出されにくい、いわば特殊な血清型である *d* 型や *g* 型の菌

株を追跡することで伝播経路が推定されてきた<sup>15)</sup>。また、バクテリオシンパターンを相同性判定のためやすとする研究<sup>12,18,20,21,45-47)</sup>も血清型によるタイピングと

表12 全菌株の血清型とバクテリオシン活性

血清型	菌株数	バクテリオシン 活性菌株(%)*	伝播菌株(%)**	平均占有率***
c	101	12 ( 11.9)	8 ( 66.7)	64.6
d	19	0 ( 0.0)	—	—
e	18	0 ( 0.0)	—	—
g	12	12 (100.0)	12 (100.0)	87.9

\*: 各血清型の菌株のうち, その他の血清型の菌株にバクテリオシン活性を示した菌株数およびその割合

\*\* : 各血清型のバクテリオシン活性菌株のうち, 家族内伝播した菌株数およびそのバクテリオシン活性菌株に対する割合

\*\*\* : バクテリオシン活性菌株の被験者ごとの全分離株に占める割合の平均 (%)

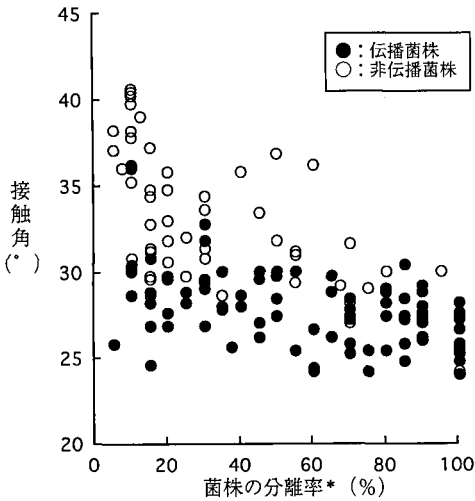


図2 菌体疎水性と家族内伝播の関係。

\*: 被験者ごとに各菌株の全分離株に占める割合

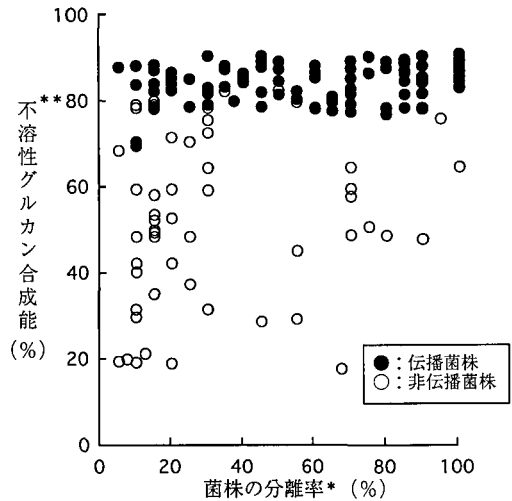


図3 不溶性グルカン合成能と家族内伝播の関係。

\*: 被験者ごとに各菌株の全分離株に占める割合

\*\* : 全グルカン合成量に対する不溶性グルカン合成量の割合

同様に, 全ての菌株の相同性を明らかにするという点で, 不十分なものであった。これらの研究では, 母親とその子供から分離されたミュータンスレンサ球菌の血清型は一致し, バクテリオシン産生のパターンも一致したことから, 母子間の伝播を示唆している。このような結果が得られたのは, 乳幼児期の育児を担当することが多く, 結果的に最も接触頻度の高くなる母親が感染源になりやすいためと思われ, ミュータンスレンサ球菌を定着させるためには多量で頻繁な接種が必要であることを示した研究<sup>42,48-51)</sup>によっても支持されてきた。しかし一方で, Rogers<sup>21)</sup>や北村<sup>36)</sup>は母子から検出されるミュータンスレンサ球菌の血清型が必ずしも一致せず, 母親の保有しない血清型の菌株を子供が保有していたと報告しており, 父親からの伝播の

可能性など, その伝播経路の多様性を示すとともに, 同菌の伝播は必ずしも接触機会や菌量といった量的な因子だけに影響されるものではないことを示唆している。

今回著者の用いた, DNA finger print 法は, 微生物の染色体 DNA やプラスミド DNA をある特定の部位に働く制限酵素で切断し, 生じたいくつかの長さの異なる塩基対断片を電気泳動することで, 菌株ごとに固有のパターンを得, 菌株の相同性を判定する方法である。この方法は菌の持つ DNA の相同性を正確に知ることができ, 過去に多くの研究者が, ウイルス<sup>52)</sup>や各種細菌<sup>53-57)</sup>, などのタイピングに用いてきた。さ

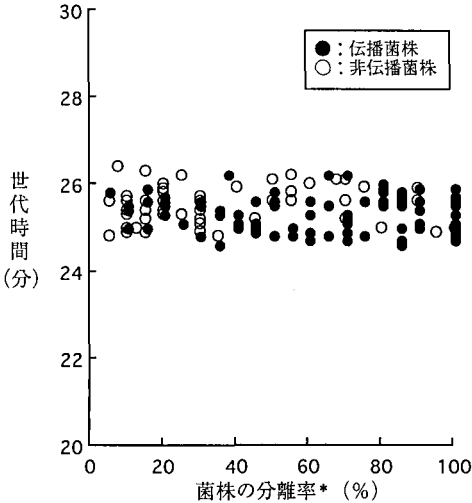


図4 菌増殖能と家族内伝播の関係。

\*: 被験者ごとに各菌株の全分離株に占める割合

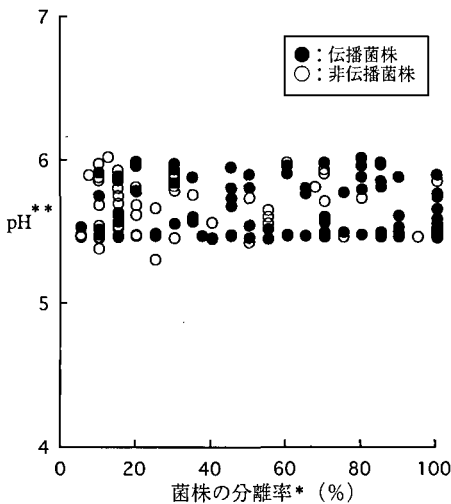


図5 酸産生能と家族内伝播の関係。

\*: 被験者ごとに各菌株の全分離株に占める割合

\*\* : 増殖静止期の菌液の pH

らに本方法は、菌周病関連菌の追跡や<sup>22,23,25)</sup>メチリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の追跡<sup>24,26,58)</sup>にも応用され、ミュータンスレンサ球菌においても1989年の Kulkarni ら<sup>29)</sup>や Caufield ら<sup>28)</sup>の報告以来、この方法を用いた菌株の伝播についての研究が行われている。Kulkarni らの報告<sup>29)</sup>では、個人が複数の (最高で5種類) 異なるタイプを示す菌株を保有しており、また子供の保有する菌株の中には父親と一致するもの

や、両親とも一致しないものもあり、それ以前の分類方法では解り得なかった、個人の保有する菌株の種類多様性や、小児への菌株の伝播経路の多様性が示された。その一方で最近 Li ら<sup>33)</sup>は、複数の母子についてこの方法を用いて研究し、約70%と高い確率で母子間の菌株の一致がみられ、ミュータンスレンサ球菌の母子間伝播の優位性を報告している。

今回の研究では母親だけではなく、両親の保有しているミュータンスレンサ球菌の分離を行って、計20家族における菌株の分布を分析した。その結果、個人では86.1%、家族では90.0%において母子間の伝播がみられ、その優位性が示された。その一方で父親からの伝播が、個人では55.6%、家族では55.0%認められ、父子間の伝播も母子間ほどではないが、頻度の高いことが示された。さらに両親以外の家族外からの伝播は、個人では36.1%、家族では50.0%認められ、家族外の伝播経路も確認された。

しかし、このような伝播経路の多様性は、全ての家族で普遍的なものではなく、家族間で異なる様相を呈していた。つまり小児への菌株の伝播に母親のみが関与している家族もあれば、母親をはじめとして父親や家族外からの伝播も認められる家族もあった。この要因として、小児をとりまく家庭環境の違いが、ミュータンスレンサ球菌の伝播様式に影響を与えていることが考えられる。今回、家族内伝播に男女差や年齢差などによる違いは認められなかったが、同胞数が多いほど家族内伝播している割合が高い傾向にあったことは、その一つの表われとも言えるかもしれない。

家族以外からの伝播経路については、接触機会という観点から考えると、祖父母をはじめ、幼稚園や保育所などの幼育施設といった、低年齢児の昼の養育に関わる環境からの伝播が疑われる。今回の研究対象で、両親以外から伝播した菌株を保有していた小児のなかには、幼育施設に通っていた小児も含まれており、保母や他の小児の口腔からの直接的な伝播以外にも、手指を介した、あるいは小児の行動範囲内の生活環境物、例えば食器や玩具などを介した間接的な伝播の可能性も考えられる。Köhler ら<sup>59)</sup>はドアのノブなどから、また Svanberg<sup>43)</sup>は練り歯磨きや歯ブラシからミュータンスレンサ球菌を分離しており、同菌は口腔外でもかなり長期間にわたって生存し得ることを報告している。このことはミュータンスレンサ球菌の間接的な伝播の可能性を支持するものである。

ミュータンスレンサ球菌の伝播に関わる、量的な因子としては上述した感染源との接触機会以外にも、感染源の口腔内のミュータンスレンサ球菌菌数も関係していると考えられる<sup>7,60)</sup>。今回の研究でも、両親の口

腔から高い割合で分離された菌株、つまり口腔内で優位を占める菌株は、他の菌株に比較して、小児へと伝播しやすい傾向にあった。

その一方で、小児へ家族内伝播したミュータンスレンサ球菌菌株の中には、母親や父親の口腔内にごく僅かしか存在していないものもあり、Köhler ら<sup>7)</sup>の報告でも、母親の口腔内にきわめて低レベルでしか存在していない菌株も、小児への伝播が起こるとしている。このことはミュータンスレンサ球菌の量的因子だけではなく、菌株の持つ性状や宿主側の因子などが関わりあっていることを示唆している。

ミュータンスレンサ球菌の定着に関して Socransky ら<sup>61)</sup>は、ヒトの歯面を研磨しても5分後には1 cm<sup>2</sup>あたり10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>個の菌が付着し、およそ8時間まではほとんど同じレベルを保ち、その後10<sup>8</sup>個のオーダーに達して、16日経過後もほぼ一定の菌数を保つと報告している。この定着の初期の段階ではエナメル質表面に吸着した、唾液中の糖タンパクがつくるペリクルと細菌とが相互的に作用して、吸着現象が起こる。吸着現象にはいくつかの物理的な力などが働いていることが考えられ、そのメカニズムも口腔細菌の種類によって違ってくると思われる。そのなかで各細菌に非特異的なものとしては、ペリクルとの静電的な吸着、ペリクルとの水素結合による吸着、エナメル質表層のハイドロキシアパタイトとの疎水的な結合による吸着などが存在すると言われている<sup>62)</sup>。今回の研究ではこのうち疎水結合の作用について、菌体の疎水性を調べ、家族内での伝播との関係を検討した結果、家族内伝播した菌株と、家族内伝播していない菌株とでは、疎水性の指標となる接触角の値に有意な差が認められた。つまり、疎水性の高い菌はより吸着しやすく、伝播しやすいと考えられる結果となった。また、佐藤<sup>63)</sup>はいくつかの口腔レンサ球菌について、4種類の controlled glass を用いて付着実験を行い、口腔レンサ球菌の中では比較的疎水性の低い *S. mutans* では、疎水結合よりむしろ静電的結合の寄与がより強いと述べており、ミュータンスレンサ球菌の吸着に関しては、疎水性以外の因子についても分析を行う必要がある。

ミュータンスレンサ球菌の定着および歯垢形成は、スクロースの存在下でミュータンスレンサ球菌の菌体外グルコシルトランスフェラーゼにより、不溶性グルカンが合成されその粘性性によって平滑面に強固に付着することによって行われる<sup>64,65)</sup>。今回の結果では、家族内で伝播した菌株、家族外から小児に伝播した菌株、両親が保有していたが小児に伝播しなかった菌株の3つのグループ間で、その不溶性グルカン合成能に有意な差が認められた。つまり、不溶性グルカン合成

能の高い菌株ほど、伝播しやすいことが示唆された。しかしその一方で、不溶性グルカン合成能が低いにもかかわらず、小児に伝播している菌株も存在した。

そこで複数のミュータンスレンサ球菌菌株の相互作用としてバクテリオシンについて分析を行った。バクテリオシンはコリシン、ピオシンなどと同様の細菌の産生する抗菌性タンパクであり、ミュータンスレンサ球菌については Kelstrup ら<sup>16)</sup>による穿刺培養法によって、バクテリオシン活性が初めて報告された。過去の報告<sup>36)</sup>ではバクテリオシン産生株とそのバクテリオシン感受性株を混合培養すると、感受性株が時間とともに消失し、またこの2つの菌株が同時に口腔内に感染するとバクテリオシン活性の強い菌株が優位を占める(ラットによる実験)ことから、バクテリオシン活性が菌の定着に強く関与する因子であるとしている。家族ごとに保有する菌株全ての組み合わせで、バクテリオシン活性を調べたところ、150菌株のうち12菌株と数は少ないが、血清型 *g* の菌株の全てが強いバクテリオシン活性を示した。これらの菌株はすべて小児へ伝播しており、個人の分離株中では多くを占めていることから、口腔内での分布優位性も高いと考えられる。*g* 型株以外では、*c* 型株でわずかなバクテリオシン活性を示すものがいくつかみられたが、これらの菌株については *g* 型株でみられた程の強い伝播性や口腔内での分布優位性は認められなかった。つまり強いバクテリオシン活性を示す菌株は、定着しやすく、しかもほかの菌株の定着を抑える力があり、バクテリオシン活性が菌株の伝播に関わる一つの因子であることが示唆された。口腔内の菌叢が不安定な状態にある小児では、バクテリオシン活性の強い菌株は、分布の割合が低くても定着する可能性が高い。一方北村<sup>36)</sup>は、ラットによる実験で、すでに口腔内に定着している菌株がバクテリオシン感受性菌株であっても、定着している菌量によって、バクテリオシン産生株の影響を受けにくいことを示している。今回の結果においても、強いバクテリオシン活性を示した組み合わせであっても、夫婦間での伝播がみられなかったことから、口腔内の菌叢が安定している成人や、小児でもすでに他の菌株が多量に定着している場合は強いバクテリオシン活性菌株であっても、伝播しないことが考えられる。

つぎに、伝播しやすい菌株は増殖能が高いことを予想して、世代時間を調べたが、菌株間で有意差は認められず、今回の実験では増殖能は伝播に関わる性状因子としては否定される結果となった。同様に酸産生能も菌株の伝播に影響しないことが示された。

小児の口腔内にミュータンスレンサ球菌が定着する

のは、乳歯の萌出後であると成書に述べられているが、増田<sup>12)</sup>が小児の糞便中から口腔内と同じ血清型のミュータンスレンサ球菌を分離していることから、唾液を介した同菌の口腔内への侵入の機会は歯牙萌出以前からあり、乳歯萌出後に菌面に定着すると考えられる<sup>66)</sup>。Alaluusua<sup>67)</sup>は小児へのミュータンスレンサ球菌の伝播時期を遅らせることが、齲蝕予防にとって大切であり、主な感染源である母親の口腔内の菌数を低く抑えることが重要であると述べている。今回の研究によりミュータンスレンサ球菌は母親のみならず父親や家族以外からも小児へ伝播していることが示されたことを考え合わせると、乳幼児期の小児の周囲に存在する、母親をはじめとした養育者が、自らを含め口腔衛生状態に留意し、小児へのミュータンスレンサ球菌の伝播の機会を可能な限り減らすことが、小児の齲蝕予防に効果的であることが示唆された。さらに、菌体疎水性、不溶性グルカン合成能、バクテリオシン活性が伝播に関わる因子として明らかとなったことから、小児口腔内へのミュータンスレンサ球菌の伝播、さらには定着様式を解明する有力な手がかりを得ることができた。

## 結 論

本研究では、20家族の父母子の口腔内から分離したミュータンスレンサ球菌を Chromosomal DNA finger print 法を用いて詳細に調べることにより、同菌の家族内での分布を把握して伝播様式を考察することで、これまでの母子間伝播が有力であるという考え方を検証しようとした。さらに、伝播に関わると考えられる、いくつかの因子について Chromosomal DNA finger print 法で分類された菌株ごとに研究し、その結果と分布状態とを比較して伝播に関わる因子について検討した。その結果は次の通りである。

### I. Chromosomal DNA finger print 法を用いた家族内でのミュータンスレンサ球菌菌株分布

1. 個人で保有する菌株は1～4菌株で、2菌株を有するものが59.2%と最も多数を占めた。家族ごとに保有する菌株は2～8菌株と幅が広がった。
2. 小児の保有するミュータンスレンサ球菌菌株のうち母親から伝播したと考えられるものが47.3%、父親からが33.8%、それ以外からが21.6%であった。
3. 被験小児の86.1%、被験家族の90.0%でミュータンスレンサ球菌の伝播に母親が関与しており、被験小児および被験家族の半数以上で伝播に父親が関与していた。

### II. ミュータンスレンサ球菌菌株の性状と伝播の関係

1. 血清型による分類ではc型が67.3%と最も多数を占め、伝播菌株はそのうちの約半数であった。d型、e型およびg型は数は少なかったが、そのうち伝播菌株の占める割合は3つの血清型の平均で89.1%と高かった。
2. 全グルカン合成量に対する不溶性グルカン合成量の割合で示した不溶性グルカン合成能は、家族内伝播した菌株で平均85.0±4.5%、家族内伝播していない菌株で55.4±20.4%であり、家族内伝播した菌株が有意に高かった。
3. 接触角は家族内伝播した菌株で平均27.9±2.2°、家族内伝播していない菌株で32.9±3.9°であり、家族内伝播した菌株が有意に疎水性が高かった。
4. 血清型g型の菌株は、c型e型の菌株に対して強いバクテリオシン活性を示し、全てが家族内伝播した菌株であり、かつ個人の口腔内でも優位を占めた。
5. 世代時間や菌液のpHについては菌株間での違いは認められず、菌の増殖能や酸産生能の伝播への関与はみられなかった。

以上によりミュータンスレンサ球菌の小児への伝播には、母親に限らず父親なども関与し、その由来には多様性があり、定着にあたって、不溶性グルカン合成能、菌体疎水性、バクテリオシン活性などの因子が影響を与えていることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えていただき、終始御懇篤なる御助言と御校閲を賜った本学小児歯科学講座長坂信夫教授に深厚なる謝意を表します。また本研究に際し、細部にわたる御教示、御校閲を賜った本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授ならびに本学予防歯科学講座岩本義史教授に深謝いたします。さらに、研究遂行および本論文作成に御指導と御鞭撻を戴いた本学小児歯科学講座香西克之講師に衷心より感謝いたします。最後に、本研究に多くの御支援を戴いた三浦一生助教授をはじめとする本学小児歯科学講座ならびに本学口腔細菌学講座の皆様方に心から感謝いたします。

## 文 献

- 1) 厚生省健康政策局歯科衛生課：平成5年歯科疾患実態調査報告．，財団法人口腔保健協会，東京，43-71，1995.
- 2) 大嶋 隆：実験動物におけるう蝕誘発系を用い

- たう蝕の病因論に関する研究. 1. 日本人小児より分離した口腔レンサ球菌, 特に *Streptococcus mutans* のう蝕原性について. 小児歯誌 16, 149-160, 1978.
- 3) Loeshe, W.J. and Staffon, L.H.: Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infect. Immun.* 26, 498-507, 1979.
  - 4) Hamada, S. and Slade, H.D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44, 331-384, 1980.
  - 5) Keyes, P.H.: Bacteriological findings and biological implications. *Inter. D.J.* 12, 443-464, 1962.
  - 6) Kelstrup, J., Holm-Pedersen, P. and Poulsen, S.: Reduction of the formation of dental plaque and gingivitis in humans by crude mutanase. *Scand. J. Dent. Res.* 86, 93-102, 1978.
  - 7) Köhler, B., Bratthall, D. and Krasse, B.: Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. *Archs. Oral Biol.* 28, 225-231, 1983.
  - 8) Douglas, C.W. and Russell, R.R.B.: Effect of specific antisera on adherence properties of the oral bacterium *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.* 27, 1039-1045, 1982.
  - 9) Michalek, S.M., Morisaki, I., Harmon, C.C., Hamada, S. and McGhee, J.R.: Effective immunity to dental caries: gastric intubation of *Streptococcus mutans* whole cells or cell walls induces protective immunity in gnotobiotic rats. *Infect. Immun.* 39, 645-654, 1983.
  - 10) Bright, J.S., Rosen, S. and Chorpenning, R.W.: Survey of the seven serological types of *Streptococcus mutans* in six-year-old children. *J. Dent. Res.* 56, 1421, 1977.
  - 11) 増田典男: 血清学的型別を基礎にした日本人小児における *Streptococcus mutans* の疫学的ならびに生態学的研究. 1. 蛍光抗体法による *Streptococcus mutans* の型別分布について. 小児歯誌 16, 183-194, 1978.
  - 12) 増田典男: 血清学的型別を基礎にした日本人小児における *Streptococcus mutans* の疫学的ならびに生態学的研究. 2. う蝕罹患児の口腔および糞便より分離した *Streptococcus mutans* の血清型の比較ならびに家族内での伝播. 小児歯誌 16, 195-203, 1978.
  - 13) 増田典男: 血清学的型別を基礎にした日本人小児における *Streptococcus mutans* の疫学的ならびに生態学的研究. 3. 幼児における *Streptococcus mutans* の初期定着とその後の推移. 小児歯誌 16, 204-208, 1978.
  - 14) Loeshe, W.J.: Role of *Streptococcus mutans* in dental decay. *Microbiol. Rev.* 50, 353-380, 1986.
  - 15) Masuda, N., Shimamoto, T., Kitamura, K., Sobue, S. and Hamada, S.: Transmission of *Streptococcus mutans* in some selected families. *Microbios.* 44, 223-232, 1985.
  - 16) Kelstrup, J. and Gibbons, R.J.: Bacteriocin from human and rodent streptococci. *Archs. Oral Biol.* 14, 251-258, 1969.
  - 17) Hamada, S. and Ooshima, T.: Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* 54, 140-145, 1975.
  - 18) Rogers, A.H.: Bacteriocinogeny and the properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.* 21, 99-104, 1976.
  - 19) Kuramitsu, H.K. and Paul, A.: Role of bacterial interactions in the colonization of oral surfaces by *Actinomyces viscosus*. *Infect. Immun.* 29, 83-90, 1980.
  - 20) Berkowitz, R.J. and Jordan, H.V.: Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. *Archs. Oral Biol.* 20, 725-730, 1975.
  - 21) Rogers, A.H.: The source of infection in the intrafamilial transfer of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 15, 26-31, 1981.
  - 22) DiRienzo, J.M., Cornell, S., Kazorski, L. and Slots, J.: Probe-specific DNA fingerprinting applied to epidemiology of localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 5, 49-56, 1990.
  - 23) Genco, R.J. and Loos, B.G.: The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 18, 396-405, 1991.
  - 24) Ichiyama, S., Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N. and Takeuchi, J.: Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2690-2695, 1991.
  - 25) Van Steenberghe, T.J.M., Van der Velden, U., Abbas, F. and De Graaff, J.: Microflora and bacterial DNA restriction enzyme analysis in young adults with periodontitis. *J. Periodontol.* 62, 235-241, 1991.
  - 26) Tveten, Y., Kristiansen, B.E., Ask, E., Jenkins, A. and Hofstad, T.: DNA fingerprinting of isolates of *Staphylococcus aureus* from newborns and their contacts. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1100-1105, 1991.
  - 27) Carles-Nurit, M.J., Christophle, B., Broche, S., Gouby, A., Bouziges, N. and Ramuz, M.: DNA polymorphisms in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2092-2096, 1992.
  - 28) Caufield, P.W. and Walker, T.M.: Genetic di-

- iversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 27, 274-278, 1989.
- 29) Kulkarni, G.V., Chan, K.H. and Sandham, H.J.: An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. *J. Dent. Res.* 68, 1155-1161, 1989.
  - 30) Kozai, K., Wang, D.S., Sandham, H.J. and Phillips, H.I.: Changes in strains of mutans streptococci induced by treatment with chlorhexidine varnish. *J. Dent. Res.* 70, 1252-1257, 1991.
  - 31) 脇坂仁美, 広瀬公治, 磯貝恵美子, 三浦宏子, 磯貝 浩, 上田五男: ヒト口腔内ミュータンスレンサ球菌の家族内伝播. *口腔衛生会誌* 41, 438-439, 1991.
  - 32) 相沢 譲, 磯部 豊, 花田信弘, 片山 剛: DNA fingerprint 法および PCR 法による mutans streptococci の chromosome DNA の比較. *口腔衛生会誌* 42, 564-565, 1992.
  - 33) Li, Y. and Caufield, P.W.: The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J. Dent. Res.* 74, 681-685, 1995.
  - 34) Gold, O.G., Jordan, H.V. and Van Houte, J.: A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.* 18, 473-477, 1973.
  - 35) Van Palenstein Helderma, W.H., Ijsseldijk, M. and Huis in't Veld, J.H.J.: A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans*, isolated from human dental plaque and saliva. *Archs. Oral Biol.* 28, 599-603, 1983.
  - 36) 北村京一: *Streptococcus mutans* の感染およびその定着に及ぼすバクテリオシン産生能を有する *S. mutans* 株の影響について. *小児歯誌* 23, 153-177, 1985.
  - 37) Rantz, L.A. and Randall, E.: Use of autoclaved extract of hemolytic streptococci for serological grouping. *Stanford Med. Bull.* 13, 290-291, 1955.
  - 38) Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., Van der Mei, H.C., Van Pelt, A.W.J., De Jong, H.P. and Arends, J.: Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 980-983, 1984.
  - 39) 香西克之: 大腸由来のプラーク抑制作用をもつ成分の単離ならびにその作用機序. *廣大歯誌* 17, 1-20, 1985.
  - 40) Jordan, H.V. and Depaola, P.E.: Effect of a prolonged topical application of Vancomycin on human oral *Streptococcus mutans* populations. *Archs. Oral Biol.* 22, 193-199, 1977.
  - 41) Loeshe, W.J., Bradbury, D.R. and Woolfolk, M.P.: Reduction of dental decay in rampant caries individuals following short-term Kanamycin treatment. *J. Dent. Res.* 56, 254-265, 1977.
  - 42) Svanberg, M. and Loeshe, W.J.: The salivary concentration of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* and their colonization of artificial tooth fissures in man. *Archs. Oral Biol.* 22, 441-557, 1977.
  - 43) Svanberg, M.: Contamination of toothpaste and toothbrush by *Streptococcus mutans*. *Scand. J. Dent. Res.* 86, 412-414, 1978.
  - 44) Masuda, N., Tsutsumi, N., Sobue, S. and Hamada, S.: Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J. Clin. Microbiol.* 20, 33-34, 1979.
  - 45) Kelstrup, J., Richmond, C., West, C. and Gibbons, R.J.: Fingerprinting human oral streptococci by bacteriocin production and sensitivity. *Archs. Oral Biol.* 15, 1109-1116, 1970.
  - 46) Kolstad, R.A.: Strain typing of oral Streptococci by the use of bacterial antagonisms. *J. Dent. Res.* 55, A154-A165, 1976.
  - 47) Davey, A.L. and Rogers, A.H.: Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Archs. Oral Biol.* 29, 453-460, 1984.
  - 48) Krasse, B., Edwardsson, S., Svensson, I. and Trell, L.: Implantation of caries-inducing streptococci in the human oral cavity. *Archs. Oral Biol.* 12, 231-236, 1967.
  - 49) Jordan, H.V., Englander, H.R., Engler, W.O. and Kulczyk, S.: Observations on the implantation and transmission of *Streptococcus mutans* in humans. *J. Dent. Res.* 51, 515-518, 1972.
  - 50) Van Houte, J. and Green, D.B.: Relationship between concentration of bacteria in saliva and colonization of teeth in humans. *Infect. Immun.* 9, 624-630, 1974.
  - 51) Svanberg, M. and Loeshe, W.J.: Implantation of *Streptococcus mutans* on tooth surfaces in man. *Archs. Oral Biol.* 23, 515-518, 1978.
  - 52) Maitland, N.J., Smith, I.W., Pentherer, J.F., Robertson, D.H.H. and Jones, K.W.: Restriction endonuclease analysis of DNA from genital isolate of herpes simplex virus type 2. *Infect. Immun.* 38, 834-842, 1982.
  - 53) Markowitz, S.M., Veazey Jr., J.M., Macrina, F.L., Mayhall, C.G. and Lamb, V.A.: Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: Implications of a conjunctive R plasmid. *J. Infect. Dis.* 142, 106-112, 1980.
  - 54) Kaper, J.B., Bradford, H.B., Robers, N.C. and Falkow, S.: Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in the U.S. Gulf coast. *J. Clin. Micro-*



- biol.* **16**, 129-134, 1982.
- 55) Bjorvatn, B., Lund, V., Christiansen, B., Korsnes, L., Spanne, O. and Lundqvist, B.: Applications of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 763-765, 1984.
- 56) Bradbury, W.C., Pearson, A.D., Marko, M.A., Congi, R.V. and Penner, J.L.: Investigation of a *Campylobacter jejuni* outbreak by serotyping and chromosomal restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* **9**, 342-346, 1984.
- 57) Kristiansen, B., Sorensen, B., Bjovatt, B., Falk, E.S., Fosse, E., Bryn, K., Frøholm, L.O., Gausstad, P. and Bovre, K.L.: An outbreak of group B meningococcal disease: Tracing the causative strain of *Neisseria meningitidis* by DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 764-767, 1986.
- 58) Schlichting, C., Branger, C., Fournier, J.M., Witte, W., Boutonnier, A., Wolz, C., Goulet, P. and Döring, G.: Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 227-232, 1993.
- 59) Köhler, B. and Bratthall, D.: Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. *Scand. J. Dent. Res.* **86**, 35-42, 1978.
- 60) Van Houte, J., Yanover, L. and Brecher, S.: Relationship of levels of the bacterium *Streptococcus mutans* in saliva of children and their parents. *Archs. Oral Biol.* **26**, 381-386, 1981.
- 61) Socransky, S.S., Manganiello, A.D., Propas, D., Oran, V. and Van Houte, J.: Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J. Periodontal Res.* **12**, 90-106, 1977.
- 62) 古賀敏比古, 浜田茂幸: 口腔細菌の付着とプラーク形成; 齲蝕と歯周病—研究の進歩 (浜田茂幸編). 1, 日本歯科評論社, 東京, 71-112, 1982.
- 63) 佐藤尚毅: 口腔レンサ球菌の固体表面への付着機構に関する研究. 広大歯誌 **19**, 69-79, 1987.
- 64) Mukasa, H. and Slade, H.D.: Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. I. Roles of insoluble dextran-levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. *Infect. Immun.* **8**, 555-562, 1973.
- 65) Koga, T. and Inoue, M.: Cellular adherence, glucosyltransferase adsorption, and glucan synthesis of *Streptococcus mutans* AHT mutants. *Infect. Immun.* **19**, 402-410, 1978.
- 66) Tappuni, A.R. and Challacombe, S.J.: Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from predentate and dentate children and adults. *J. Dent. Res.* **72**, 31-36, 1993.
- 67) Alaluusua, S.: Transmission of mutans streptococci. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **87**, 443-447, 1991.