

蟲齒罹患部 齒苔로부터 *Streptococcus mutans*의 分離·同定과 biotyping에 대한 研究

*慶熙大學校 醫科大學 微生物學 教室

**慶熙大學校 齒科大學 保存學 教室

李振鏞* · 夏潤文* · 鄭忠謨** · 朴尚進** · 崔浩永**

I. 緒 論

치아우식증은 현대문명의 발전에 따른 精製飲食의 多變化와 더불어 계속적인 발생증가추세에 있는 가장 광범위한 凡發性疾患으로 細菌에 의한 感染性疾患이며⁴⁸⁾, 최근 가장 중요한 原因菌은 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)라는 것이 hamster¹⁵⁾와 사 랫³⁷⁾에서 입증됨으로써 일반화 되었다. *S. mutans*의 齶蝕原性은 *S. mutans*의 細胞附着酵素인 gluco-syltransferase (GTF)를 이용하여 口腔내에 유입된 sucrose를 분해하여 非水溶性 glucan을 합성함으로써 *S. mutans*의 齒牙表面附着과 集落化에 의해 齒苔形成을 主導하여 치아우식증을 유발한다는 데에서 起因한다. ^{16, 17, 39, 40, 41)}

Coykendall^{9, 10)}은 DNA의 基本構成物의 量과 排列에 따라 *S. mutans*를 4가지 gentic group으로 나누었고, *S. mutans*의 細胞壁多糖體抗原 (cell wall-polysaccharide antigen)에 따라 Bratthall⁷⁾이 5가지 serotype으로, Perch들⁴⁾이 두가지 새로운 serotype을 추가하여 현재 α 부터 ϵ 까지 7가지의 serotype이 밝혀져 있다. *S. mutans*는 serotype에 따라 서로 다른 성질을 보이며 細菌集落의 형태도 다르게 나타나기 때문에^{24, 30)} 실제 *S. mutans*의 分離에는 약간의 까다로움이 介在될 수 있으나 培地와 分離方法의 개발로 蟲齒罹患部の 齒苔나 感染軟化象牙質에서 뿐만 아니라 糞便에서도 分離가 가능하여²¹⁾ *S. mutans*의 性狀에 관한 연구에 많은 도움을 주고 있다.

*S. mutans*에 관한 연구와 함께 최근 관심을 모으는 것은 *S. mutans*를 이용한 蟲齒豫防 vaccine의 가능성이다. 치아우식증이 細菌性疾患이라는 점에 根據하여 초기 Bowen⁴⁾이 동물실험을 통해 그 가능성을 提示하였고, 그후 많은 연구가 진행되어 *S. mutans*에 의한 免疫效果가 충분히 인정되고 있으며, ^{1, 35, 36, 54)} 免疫機轉에 관한 구체적인 연구, ^{14, 35, 49,}

⁵²⁾ *S. mutans*의 각 抗原免疫성에 관한 연구⁴⁶⁾, 免疫效果와 관련한 *S. mutans*의 serotype간의 血清學的交叉反應 (cross-reaction), *S. mutans*에 대한 抗體와 心筋간의 交叉反應에 따른 副作用에 관한 연구⁴⁵⁾ 등이 根幹이 되어 현실화를 위한 vaccine개발에 많은 진전이 있었음을 볼 때, *S. mutans*에 대한 獨自의인 연구가 시급히 要望되며, serotype과 관련해서, 蟲齒罹患部에서 분리되는 *S. mutans*중에는 serotype c가 가장 많이 나타나는 것으로 보이지만^{7, 21, 23, 44, 51)} 地域에 따라 달리 나타날 수 있는 것으로 指摘되고 있고, ^{23, 51)} 혹은 음식물섭취에 따라서도 多樣性이 伴될 수 있을 것으로 思料되어, 이를 위한 준비단계로 著者들은 우선, 환자의 蟲齒罹患部 齒苔에서 *S. mutans*의 分離·同定 및 生化學的 性狀을 근거로 한 biotype⁵¹⁾을 결정하였기에 이에 보고한다.

II. 材料 및 方法

標準菌株 :

본 실험의 標準菌株로서 *S. mutans* FA-1 (serotype b), NCTC 10449 (serotype c), Ingbritt (serotype c), JC-2 (serotype c), B-13 (serotype d), OMZ 65 (serotype g), *Streptococcus mitis* (*S. mitis*)를 사용하였다.

檢體의 採取 및 增菌 :

경희의료원 보존과에 來院한 환자 4명을 1차 대상으로 하였다.

환자의 蟲齒罹患部 齒苔를 火焰滅菌한 excavator로 채취하여 thioglycollate培地 (Difco)에 接種, 增菌 培養하였다.

*S. mutans*의 分離 및 1차 同定 :

*S. mutans*를 분리하기 위해 1% potassium tellurite溶液을 1 ml (培地 1 liter당) 가한 mitis-salivarius (MS) 寒天培地 (Difco)를 사용하였다.

增菌培養된 thioglycollate배지를 잘 흔들어 완전

히, 섞은 다음, pasteur pipette으로 菌液을 1滴에서 MS寒天培地에 떨어뜨려 劃線塗抹한 후 Gas-Pak (BBL)을 사용하여 37°C에서 48시간 嫌氣培養하였다. 하루동안 大氣중에 더 배양한 후 나타난 細菌集落가운데서 *S. mutans*의 集落形態를 보이는 것^{13, 20, 24}을 골라 Gram染色을 실시하여 streptococci의 형태와 배열을 확인한 다음 brain-heart infusion (Difco) 寒天斜面培地에 繼代培養하였다.

斜面培地에서 증식된 分離菌을 同定하기 위해 1차로 mannitol과 sorbitol分解試驗을 실시하였다. 요약하면, phenol red broth base(Difco)에 寒天 0.2%, mannitol과 sorbitol을 각각 1%씩 첨가한 후 115°C, 15분간 濕熱滅菌하여 각각의 分離菌을 접종한 다음, Gas-Pak을 이용하여 37°C, 48시간 嫌氣培養한 후 결과를 판독하였다.

分離한 *S. mutans*의 확인同定 :

1) *S. mutans* NCTC 10449(serotype c)에 대한 抗血清에 의한 확인: 먼저 標準菌株 *S. mutans*, NCTC 10449(serotype c)를 토끼에 주사하여 抗血清을 얻었다. 요약하면 *S. mutans* NCTC 10449를 tryptic soy broth(Difco)에 37°C, 48시간 배양하였다. 培養液을 3,000rpm으로 20분간 遠沈시켜 上清液을 버리고 菌體를 0.01M phosphate buffered saline(PBS) 7.1pH로 3번 洗淨하고 난 다음 PBS로 희석하여 spectrophotometer(Coleman, Junior II)에서 580nm, optical density 0.45일 때 2.2×10^8 cells/ml를 기준으로²⁴ 최종농도가 1×10^8 cells/ml가 되도록 조절하였다. 洗淨된 生 *S. mutans* NCTC 10449를 토끼의 耳靜脈에 0.1ml(1×10^8 cells)씩 4일 간격으로 6회에 걸쳐 免疫하였다. 最終免疫 1주일 후 높은 抗體價(1:5, 120; 抗原 2.2×10^8 cells/ml²⁴)를 확인한 다음 頸動脈으로 부터 全採血하여 얻은 血液에서 血清을 분리하여 시험에 사용하였다.

총 14개의 分離菌株중 mannitol과 sorbitol分解試驗에서 陽性反應을 보인 7菌株를 抗血清에 대한 slide凝集反應에 의하여 확인하였다.

2) 分離된 *S. mutans*의 一般的 性狀의 확인: Perch들²⁴이 7가지 serotype, 210菌株를 시험하여 얻은 공통적인 性狀을 토대로 하여 分離菌株중 抗血清에 대해 凝集反應을 보인 두 菌株의 일반적 性狀과 比較檢討하였다.

糖分解試驗으로 mannitol, sorbitol, arabinose, glucose, lactose, maltose, salicin, sucrose, trehalose 分解試驗을 앞서와 같은 방법으로 실시하였고, acetoin

生成(V.P.)試驗을 실시하였다. 45°C에서의 生存여부를 관찰하기 위해 brain-heart infusion broth(Difco)에 45°C, 48시간 배양후 增殖狀態를 확인하였고, brain-heart infusion寒天培地에 食鹽을 각각 4%, 6.5%씩 첨가하고, 또 MS배지에 methylene blue를 0.1% 첨가한 후 嫌氣培養하여 생존여부를 관찰하였다.

3) 試驗管壁 附着現象의 확인: 細胞外多糖體, 특히 glucan合成에 의한 *S. mutans*의 附着性を 확인하기 위해 tryptic soy broth에 sucrose를 5% 첨가하여 37°C, 5% CO₂하에서, 試驗管을 30도 경사지게 놓고 3일간 배양한 후, 試驗管을 가볍게 흔든 다음 *S. mutans*의 試驗管壁 附着狀態를 관찰하였다.

分離된 *S. mutans*의 biotyping :

앞의 두 分離菌株의 biotype을 결정하기 위해 serotype이 알려진 *S. mutans* 菌株에 대한 生化學試驗結果를 토대로 한 Shklair와 Keene의 방법²¹을 기준으로 하여 분류하였다.

mannitol, sorbitol, raffinose, melibiose 分解試驗은 앞서와 같이 시행하였고, bacitracin에 의한 酸生成抑制試驗을 위해선 phenol red broth base에 mannitol을 1% 첨가하고, bacitracin(Sigma)을 배지 1ml당 2 units로 조절하고 나서 millipore(Millipore Corporation) 濾過滅菌하였다. L-arginine에서의 암모니아生成을 관찰하기 위해 Falkow's decarboxylase base(Gibco)에 寒天 0.2%, L-arginine 0.5%를 첨가하여 실시하였다. 이 시험들은 37°C, 48시간 嫌氣培養 후 판독하였다. 단 bacitracin 酸生成抑制試驗은 이후 5일간 더 好氣培養한 후 판독하였다.

collection of dental plaque, culture in thioglycollate medium for 48 hrs



culture on MS medium for 48 hrs, anaerobically



Gram's staining, subculture



fermentation tests of mannitol and sorbitol for identification of the isolates



identification of *S. mutans* confirmed by agglutinating reaction with anti-*S. mutans* NCTC 10449 antiserum



biochemical tests for general characteristics

of the isolated *S. mutans*
 ↓
in vitro test for adherence of *S. mutans*
 ↓
 biotyping of the isolated *S. mutans* strain

Fig. 1. Procedure of the isolation, identification and biotyping of *S. mutans* from dental plaque.

III. 實驗結果

*S. mutans*의 分離 및 同定:

4명의 환자로 부터 蟲齒罹患部 齒苔를 채취하여 MS배지에 배양하여 나타난 細菌集落 가운데 *S. mutans*라고 생각되는 集落을 각각 6, 4, 4, 4개씩 채취하여 mannitol과 sorbitol 分解試驗을 실시한 결과 첫번째 환자의 6개 菌株중 4, 두번째 환자에서 2, 세번째 환자에선 1개 菌株가 陽性反應을 보여 *S. mutans*로 同定되었다.

抗血清에 대한 slide凝集反應결과, 標準菌株 *S. mutans* NCTC 10449와 抗-*S. mutans* NCTC 10449 血清과의 반응정도, *S. mitis*와 이 抗血清과의 반응 정도를 기준으로 하였을 때 두 번째 환자의 두 菌株가 아주 강한 凝集反應(卅)을 보였고, 세번째 환자의 菌株들은 극히 미약한 반응(±)을 보였고, 첫번째 환자의 4 菌株는 약한 凝集反應(+)을 보였다. 아주 미약한 반응을 보인 세번째 환자의 分離菌株는 다음 確認試驗에서 제외시켰다.

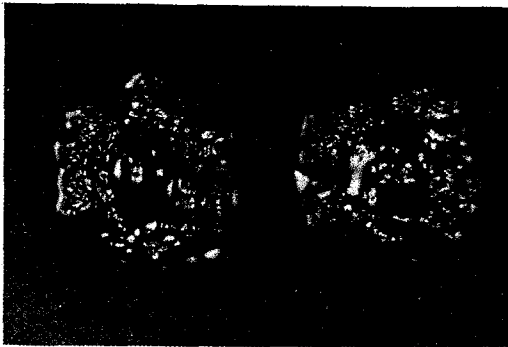


Fig. 2. Colonial morphology of P2-1 strain on MS agar medium.

나머지 6 菌株의 細菌集落을 標準菌株의 것과 비교하기 위해 MS배지에서 37°C, 48시간 嫌氣培養하고 1일간 大氣하에서 배양한 결과, 두번째 환자의 두 菌株는 모두 1mm정도 크기의 작고 거칠

며, 가장자리는 波動形의 불규칙한, 약간 솟아오른 淡靑色의 細菌集落을 보여(그림 2) NCTC 10449와

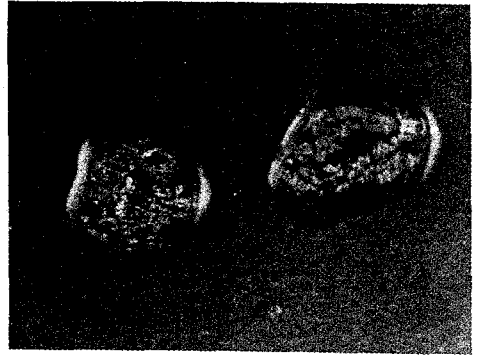


Fig. 3. Colonial morphology of *S. mutans* NCTC 10449 (serotype c) on MS agar medium.

Colonies of P2-1 and NCTC 10449 are small, raised, rough and irregular.

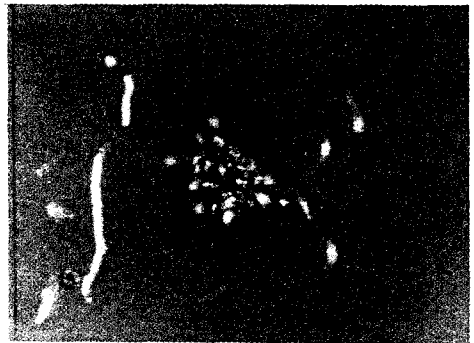


Fig. 4. Colonial morphology of P1-2 strain on MS agar medium.

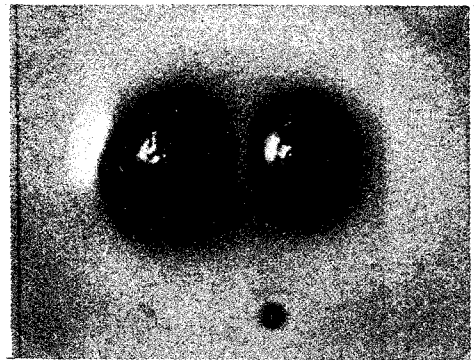


Fig. 5. Colonial morphology of *S. mutans* B-13 (serotype d) on MS agar medium.

Colonies of P1-2 and B-13 are surrounded by typical zoogloea.

거의 유사한 集落形態로 나타났다(그림 3). 첫번째 환자의 4 菌株은 MS배지에서 확인배양한 결과, 모두 같은 형태의 細菌集落으로 변하였다. 이 集落의 형태는, 中央部가 거칠고 淡青色이나 集落주위에는 粘着集落(zooglea)이 형성되어 粘性을 띄며 1~2 mm크기로(그림 4) *S. mutans* B-13과 비슷한 형태를 보였다(그림 5). 이들 모든 集落은 白金線

으로 배지로 부터 쉽게 떼어낼 수 있었다.

다음 실험에서는 두번째 환자에서 1개(P2-1으로 命名), 첫번째 환자에서 1개의 菌株(P1-2로 命名)를 선택하여 사용하였다.

標準菌株와 두 分離菌株와의 一般的 性狀의 比較: 그 결과는 표 1에 나타난 바와 같다.

Table 1. General biochemical characteristics of standard and isolated *S. mutans* strains

	P1-2*	P2-1**	FA-1	NCTC 10449	Ing-britt	JC-2	B-13	OMZ 65	<i>S. mitis</i>
mannitol(v)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
sorbitol(v)	+	+	+	+	+	+	-	+	-
arabinose(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glucose(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lactose(v)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
maltose(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
salicin(v)	+	+	+	+	+	+	-	-	-
sucrose(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
trehalose(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
acetoin(+)	+w	+	+	+	+	+	+	+	+
4% NaCl(+)	±	+	±	+	+	+	+	+	+
6.5% NaCl(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1% methylene blue(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
incubate at 45°C (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
agglutination with anti-NCTC 10449 antiserum	+	+++	+	+++	++	+	+	+	-



Fig. 6. Adherence ability of *S. mutans* strains to the wall of the test tube containing 5% sucrose broth. White cloudy mass

* represents first patient's second strain
 ** represents second patient's first strain
 +: positive
 -: negative
 v; variable reaction between different strains
 w; weak

on the wall of the test tube is due to the adherence of *S. mutans* to the wall of the tube. From left to right: *S. mitis*, P1-2, P2-1, NCTC 10449, JC-2, Ingbritt, B-13, OMZ 65, FA-1.

S. mutans의 試驗管壁 附着現象 :

5% sucrose배지에 배양한 후, 그 培養試驗管을 가볍게 흔들고 나서 나타난 각 菌株의 試驗管壁 附着狀態는 그림 6과 같다. P2-1과 S. mutans 標準菌株 대부분은 단단히 부착되었으나 S. mitis와

S. mutans Ingbritt, P1-2은 약하게 부착되어 있었다.

分離된 S. mutans 菌株의 biotyping :

결과는 표 2에 표시된 바와 같다.

P2-1은 Shklair와 Keene⁵¹⁾의 특징적인 biotype

Table 2. Biochemical results for biotyping of the isolated Streptococcus mutans

Biochemical test	PI-2	P2-1	FA-1 b	NCTC 10449 c	Ing- britt c	JC-2 c	B-13 d	OMZ 65 g
mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	+
raffinose	-	+	+	+	+	+	-	-
melibiose	-	+	+	+	+	+	-	-
NH ₃ from L-arginine	-	-	+	-	-	-	-	-
mannitol +2 units/ml bacitracin	+	+	+	+	+	+	+	+

c의 결과를 보였고, P1-2는 biotype d와 같은 生化學試驗結果를 보였다.

IV. 總括 및 考察

S. mutans를 口腔내 다른 streptococci와 區別同定하는 데 가장 중요한 것은 MS배지상에서의 集落形態와 mannitol과 sorbitol分解能力, sucrose를 이용한 非水溶性 glucan 合成에 의한 附着能力에 대한 檢査이다.^{20, 44)} MS배지상에 나타난 S. mutans 이외의 대부분의 streptococci는 mannitol이나 sorbitol分解能力이 없으나, S. mutans는 몇몇 菌株를 제외하고(본 실험의 標準菌株중 S. mutans B-13; 표 1, 2) 모두 mannitol과 sorbitol을 분해할 수 있는 특성을 가진 것^{20, 24, 44, 51)} 외에 몇가지 生理化學的 試驗을 통해 85% 이상 同定이 가능한 것으로 보인다.²⁰⁾ 1일 嫌氣培養에 이어 1일간 大氣培養으로 나타난 細菌集落形態로 S. mutans를 어느 정도 同定해 낼 수 있는 것으로 指摘되고 있다.²⁰⁾ 그러나 serotype에 따라 차이를 보여, serotype c/e/f는 MS 배지상에서 작고 거칠며 솟아오른 형태임에 반해, d/g는 集落주위에 粘着集落을 형성하는 것이 특징의 하나로 보여지고 있다.²⁰⁾ 본 실험에서 P2-1은 serotype c/e/f, P1-2는 d/g의 특징적인 集落形態를 보여주고 있다(그림 2, 4). 이런 특징적 集落形態에 반해 본 실험의 標準菌株 JC-2는 전혀 다른 樣相을 보

였는데, 크고(5~6mm) 엷은 靑色の 粘液性인 集落들이 한데 엉겨 나타났다. 이것은 S. mutans菌株의 變異(variant)인 것으로 보이나¹³⁾ 확인할 수 없었다. 또한, 실제 臨床檢體에서는 分別에 곤란함을 자주 느껴 S. mutans의 選擇培地가 考察되었는데, Ikeda와 Sandham³¹⁾은 BCY배지를 사용하면 다른 口腔내 streptococci와 구별이 용이하고, MS 배지보다 S. mutans를 50% 더 분리해 낼 수 있다고 하였으나 繼代培養하면 특징적인 集落形態를 나타내지 않을 수도 있어 新鮮分離株인 경우에만 同定이 가능하였다. 또한 Gold들¹⁸⁾은 既存MS배지에 sucrose 20%, bacitracin을 0.2 unit 첨가한 MSB培地로 檢體를 회석하지 않고도 만족할 만한 결과를 얻을 수 있었으나, serotype a는 bacitracin에 感受的이기 때문에⁵¹⁾ 增殖이 抑制될 가능성이 있고,²⁰⁾ potassium tellurite溶液이 첨가된 MS배지로 S. mutans를 분리하여 良好한 결과를 얻을 수 있으며,²⁰⁾ 치아우식증이 진행될 수록 S. mutans의 數도증가하기 때문에³⁷⁾ 齒齦罹患者에서 S. mutans를 분리하는 데는 어려움이 없을 것으로 思料된다. 본 실험에서 4명의 환자 가운데 3명에서 S. mutans가 분리되었으나 齒齦보다 더 많은 S. mutans가 분리되는 것으로 보이는 感染軟化象牙質²¹⁾을 檢體로 직접사용하거나, 細菌集落形態에 유의하고, mannitol과 sorbitol分解試驗結果를 충분한 시간에 걸쳐 관찰한다

년²⁰⁾ 더 좋은 결과를 期待할 수 있을 것으로 思料된다.

한편, 臨床檢體에서 처음 *S. mutans*를 분리하고자 할 때는 *S. mutans*가 嫌氣狀態에서 增殖이 잘 되고¹⁾ 특히 serotype a는 嫌氣性²⁾이기 때문에 가능한 嫌氣培養이 바람직하며, 다른 streptococci와 쉽게 구별하기 위해 1일 嫌氣培養후 1일 大氣培養이 要請되고 있다.²⁰⁾ 본 실험에서도 Gas-Pak에 의한 嫌氣培養이 好氣培養보다 더 특징적인 集落形態를 보였고, 細胞자체의 形態나 排列에 있어서도 보다 특징적으로 나타나 첫 분리에서는 嫌氣培養이 原則이라 하겠다.

*S. mutans*의 同定과 齶蝕原性を 증명하기 위해 시행하여야 할 試驗管內 試驗은 sucrose를 이용한 非水溶性細胞外多糖體合成과 이에 관련된 附着力에 관한 것이다.^{20, 44)} 합성된 非水溶性 glucan의 附着性은 *S. mutans*의 齶蝕原성과 관련된다고 밝혀져 있다.^{2, 11, 12, 14, 25, 39, 40, 41, 53)} *S. mutans*의 齒面集落化는 sucrose가 없이도 형성되나²⁰⁾ 細胞外多糖體 合成은 sucrose 이외에는 비효과적이고⁴²⁾ 細胞附着 glucan (cell-bound glucan) 合成과 細胞附着 GTF와의 관계, 이에 따른 *S. mutans*의 附着能力이 sucrose와 관계 있으며²⁰⁾, sucrose에 의해 *S. mutans*가 齒牙表面에 定着되면서 치아우식증이 야기되고,³⁴⁾ sucrose에 의해 *S. mutans*數가 증가하고,¹⁷⁾ 어떤 糖보다도 sucrose가 細胞外多糖體合成과 치아우식증에 관계하며⁴²⁾, sucrose의 투여횟수는 *S. mutans*의 口腔내 定着과 치아우식증발생정도에 직접적으로 관련되어 있음³⁾을 보고하였다. 이것은 *S. mutans*가 細胞附着 GTF를 이용하여 sucrose를 분해, glucose의 重合體인 非水溶性 glucan을 합성함으로써 齒牙表面에 부착하고, *S. mutans*의 集落化 (agglutination)가 이루어지기 때문^{2, 11, 16, 17, 25, 26, 39, 40, 41)}이라는 것이 지배적인 見解로 보인다. 이같은 非水溶性 glucan의 附着能力은 근본적으로 *S. mutans*表面의 GTF附着部와 glucan附着部가 관계하고 있으며,^{2, 28, 40, 41)} 非水溶性 glucan의 主構成成分인 α -1,3 glucosidic linked glucan (mutan)은 非水溶性을 띄고 α -1,3 chain에 얼마간 分枝되어 있는 α -1,6 linked glucan (dextran)이 附着성에 관여하고 있으며^{12, 25, 39)} 이것을 조절하는 것은 *S. mutans*의 endohydrolytic dextranase인 것으로 보인다.¹⁶⁾ 한편 *S. mutans*의 集落化는, GTF의 細胞附着뿐만 아니라 集落形成에 근본이 되는 primer glucan^{2, 8, 16, 17, 40)}에 附着, 活性化된 GTF로부터 생성된 glucan^{2, 9)}이 두 *S. mutans*가 서로 부착할 수 있을 만한 충분한 크기의 分子量을 가져야 가능한 것

으로 밝혀져 있다.¹⁷⁾ 이와같은 附着과 集落化의 機轉은 분명히 서로 다른 要求條件을 필요로 하는 것으로 指摘되고 있다.^{2, 40, 41)}

Bratthall⁷⁾과 Perch⁴⁴⁾의 serotype에 따라 細菌集落形態에 차이를 보여 Hamada²⁴⁾은 MS배지 상에 나타난 集落形態에 따라 크게 c/e/f群과 d/a群으로 나누었고, Ikeda²⁰⁾은 PD培地상에 나타난 集落形態에 따라 3群으로 나누었다. serotype a는 d와 비슷한 集落을 형성하고, b는 *S. sanguis*같이 培地내로 들어가면서 단단히 附着되어 增殖하는 것으로³²⁾ 알려져 있는 데, 본 실험의 標準菌株 FA-1 (b)도 集落주위에 약간 파인 듯이 들어간 狀態의 集落이 형성되어 있었으나 배지로 부터 白金線으로 集落을 떼어내는 데 곤란은 없었다. 한편 serotype d는 c보다 많은 量의 細胞外多糖體를 만들고, c는 非水溶性보다는 水溶性多糖體를 더 많이 생성하며⁵⁾, 같은 菌株라도 細落集落的 type에 따라 非水溶性 glucan의 合成能力이 다르나⁴³⁾ 集落形態에 따른 齶蝕原性에는 有意한 차이가 없는 것으로 보인다.¹³⁾ 細胞外多糖體合成能力和 口腔내 streptococci의 齶蝕原性사이에 뚜렷한 연관성이 발견되지 않는 것¹¹⁾은 細胞外多糖體合成能力和 齶蝕原性에 관계하는 附着性과는 구별되기 때문³³⁾인 것으로 보인다. 水溶性多糖體와 非水溶性多糖體 둘다 치아우식증을 유발할 수 있기 때문에 水溶性/非水溶性多糖體의 比가 菌株의 齶蝕原性에 어떤 영향을 주는 지 알 수 없으나⁵⁵⁾ 附着性, 非水溶性多糖體를 합성하지 못하는 *S. mutans*의 變異種 (mutant)은 齶蝕原성이 감소하는 것⁴⁵⁾으로 봐서 그 연관성을 짐작할 수 있지만 非水溶性에 관계하는 因子가 α -1,3/ α -1,6 linkage 比만이 아닌 것⁴³⁾처럼 이들 다른 因子들이 附着과 齶蝕原性에도 관계되어 있는 것이 아닌가 思料된다. 또한 serotype과 齶蝕原性사이에도 연관성은 없는 것으로 보인다.²³⁾

이같은 사실로 보아 serotype이나 集落的 形態로 glucan의 非水溶性, 附着力, 齶蝕原성과의 一律의 인 연관성을 설명하기 어려운 것으로 보인다. 본 실험에서도 serotype c인 NCTC 10449는 거친 集落으로 中程度의 附着力을 보였고, Ingbritt는 거친 集落이지만 附着力은 아주 약했으며, 같은 serotype인 JC-2는 粘性的 集落을 보였고, 非水溶性 glucan을 많이 생성하지 못하는 것으로 알려져 있으나³⁾ 附着力은 前者들에 비해 훨씬 강한 것으로 나타났다. 그러나 거친 集落的 P2-1은 가장 강한 附着力을 보인 반면, 粘着集落을 보인 P1-2는 附着

력이 거의 없었고, 같은 粘着集落을 보인 B-13 (serotype d), OMZ 65 (serotype κ)은 강한 附着性을 보였고, serotype b인 FA-1은 NCTC 10449 정도의 附着性을 보여(그림 6) -II성이 없는 것으로 나타났으나 보관 중에 나타날 수 있는 菌株의 集落形態나 性狀의 변화^{13, 20, 44})도 고려해야 할 것으로 思料된다.

Shklair와 Keene⁵¹)은 *S. mutans*의 serotype에 대한 疫學調查에 있어 血清學的方法의 難易性 때문에 生化學的 性狀을 토대로 하여 分類한 결과, serotype a는 嫌氣性⁹)과 bacitracin에 의한 酸生成抑制⁵¹)에 의해 구별이 되고, e는 melibiose⁵¹), d는 melibiose와 raffinose에 의해^{9, 51}), serotype b는 L-arginine에서 암모니아를 생성하는 것^{9, 28, 51})에 의해 구별이 된다. 그러나 이 分類法에는 f와 κ 에 대한 것이 없고, 다른 serotype의 분류에 있어서도 c와 e의 중요한 鑑別點이 되는 melibiose 分解試驗에서 e의 경우도 melibiose를 分解하는 菌株가 많으며,^{24, 44}) 集落形態도 비슷하고,²⁴) 細胞壁炭水化合物과 遺傳的 類似性^{9, 10}) 血清學的으로 강한 交叉反應이 나타나^{23, 44, 50}) 정확한 구별이 곤란하며, 이같은 어려움은 c와 f 사이에서도 마찬가지인 것으로 보인다.^{26, 44}) 또한 a와 d/ κ 사이에서도 강한 交叉反應이 나타나고,^{6, 23, 44}) 遺傳的으로 d와 κ 는 類似性이 있고,^{9, 10}) a와 κ 사이에서 抗原轉移가 있으며,⁴⁷) 일반적인 生理化學的 檢査로는 구분이 더욱 곤란한 것으로 보인다.²⁸) 따라서 Shklair와 Keene의 分類法은 biotyping 으로서 serotype을 위한 screen 檢査法으로 活用하는 것이 妥當하다 하겠으며, Perch⁴⁴)들과 Hardie와 Bowden²⁸)의 試驗內容을 참고로 하면 어느 정도 有用할 것으로 보이나 정확한 serotyping을 위해서는 serotype - 單一特異性抗血清 (serotype-monospecific antiserum)을 이용한 寒天免疫擴散法^{7, 21, 22, 23})이나 免疫電氣泳動法^{7, 47}), 免疫螢光法^{6, 19, 23, 36, 44}) 등이 시행되어야 한다는 것이 原則으로 提示되고 있다. 또한 *S. mutans*는 다른 口腔내 streptococci와도 交叉反應이 나타나기 때문에^{6, 27}) 본 실험에서 사용한 精製되지 않은 serotype - 非特異性抗 *S. mutans* NCTC 10449血清을 *S. mutans*의 同定에 직접, 확정적인 방법으로는 쓸 수 없지만 *S. mutans* 同定을 위한 細菌集落選別에 큰 도움을 줄 수 있으며, 1차 同定된 *S. mutans* 중 serotype c뿐 아니라 交叉反應이 나타나는 e^{23, 44, 50})나 a, d/ κ ^{19, 50})에 속한 菌株들을 확인하는 데도 도움을 줄 수 있을 것으로 思料된다.

본 실험에서 bacitracin에 대한 酸生成抑制試驗은

Shklair와 Keene의 실험⁵¹)에서 thioglycollate without carbohydrate or indicator와 purple broth base를 기본배지로 하여 48시간 培養으로 결과가 나타나는 것과는 달리 본 실험의 기본배지 조건하에서는 2일 嫌氣培養후 3일 (B-13, OMZ 65)째부터 7일 (JC-2)에 가서야 陽性反應이 나타났고, P1-2는 2일 嫌氣, 5일 好氣培養에선 별다른 반응이 나타나지 않았으나 Gas-Pak에 의한 嫌氣培養을 계속한 결과, 3일 째부터 미약한 陽性反應이 시작되어 5~7일에 가서야 완전한 陽性反應이 나타났다. 따라서 bacitracin에 의한 酸生成抑制試驗은 충분한 관찰시간, 嫌氣培養에 따른 결과판독이 바람직할 것으로 思料된다.

P1-2는 酸生成抑制試驗이 好氣狀態에선 陰性으로 나타났고 嫌氣狀態에서 陽性反應이 이루어졌지만, 好氣狀態에서도 增殖은 가능했기 때문에 嫌氣性은 아닌 것으로 보이며, bacitracin과 好氣狀態라는 두 因子에 의해 增殖이 크게 制限되었기 때문인 것으로 보인다. 그러나 P1-2 菌株는 아주 약한 試驗管壁 附着力을 보였고(그림 6), acetoin 生成試驗에서는 느리고 약한 陽性反應을 보였으며, 4% NaCl에서도 增殖이 극히 미미한 狀態로 나타났기 때문에(표 1) Perch⁴⁴)이나 Shklair와 Keene⁵¹)의 試驗菌株들과는 다른 성질의 菌株인 것으로 생각된다.

齒齶罹患部에서 분리된 *S. mutans* 중에는 serotype c가 가장 많이 나타나나,^{7, 21, 23, 44, 51}) 오히려 c가 적고 b가 많이 나타나기도 하여¹⁹) serotype은 地域에 따라 다르게 나타날 수 있는 것으로 생각하게 되었으며^{23, 51}) 검사방법에 따라서도 차이를 나타낼 수 있는 것으로 보인다.³⁶) 한편, 한 사람의 檢體에서 한 가지 serotype만이 나오는 것이 아니라서^{21, 28, 51}) 注意를 요하지만 對照染色을 이용한 直接螢光抗體法^{19, 36})을 사용한다면 어려움이 해결될 것이며, 시간절약과 정확한 診斷이 가능하여 *S. mutans*의 同定뿐만 아니라 serotype의 分布를 파악하는데 큰 도움을 주는 것으로 보인다.

이와같이 *S. mutans*에 대한 多角的인 연구가 이루어지고 있는 데 반해, 우리나라에서는 *S. mutans*의 分離·同定, serotype의 分布에 대한 연구등이 이루어져 있지 않음에 비취 著者들은 *S. mutans*의 分離·同定, serotype의 分布에 관한 基礎段階로써 이 실험을 진행했으며, 이 실험내용은 앞으로 *S. mutans*에 대한 연구에 도움을 줄 수 있을 것으로 期待한다.

V. 結 論

患者 4명의 齒齦罹患部에서 齒苔를 採取하여 MS 培地에서 嫌氣培養하여 특징적인 *S. mutans*의 集落 形態를 보인 菌株을 mannitol과 sorbitol分解試驗에 의해 *S. mutans*로 同定하였고, 抗 *S. mutans* NCTC 10449血清과의 凝集反應, 一般的 生化學性狀, 5% sucrose broth試驗管壁-附着能力에 의해 *S. mutans*를 확인하였다. 分離된 *S. mutans*는 Shklair와 Keene의 分類方法에 따라 biotype을 결정하였다. 이 實驗의 結果로,

1. 細菌集落的 形態와 mannitol과 sorbitol 分解試驗에 의해 4명의 患者중 3명에서 *S. mutans*가 分離되었다.

2. 分離된 *S. mutans*菌株중 P2-1은 抗 *S. mutans* NCTC 10449血清과 강한 凝集反應, 試驗管壁에서 강한 附着能力을 보였고, P1-2은 약한 凝集反應과 附着力을 보였으며, 두 菌株 모두 *S. mutans*의 一般的인 生化學性狀을 보여 *S. mutans*로 확인할 수 있었다.

3. P2-1은 Shklair와 Keene의 biotype c의 특징적인 生化學試驗結果를 보였고, P1-2은 biotype d와 같은 結果를 보였다.

- REFERENCES -

- Bahn, A.N., Shklair, I.L., & Hayashi, J.A.: Immunization with dextransucrases, levansucrases, and glycosidic hydrolases from oral streptococci. II. Immunization with glucosyltransferases, fructosyltransferases, and glycosidic hydrolases from oral streptococci in monkeys. J. Dent. Res., 56:1586, 1977.
- Beachey, E.H.: Bacterial adherence. Receptors and recognition, Series B, Volume 6, Chapman and Hall, p.107-135, 1980.
- Birkhed, D., Rosell, K.G., & Granath, K.: Structure of extracellular water-soluble polysaccharides synthesized from sucrose by oral strains of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus*. Archs. Oral Biol., 24:53, 1979.
- Bowen, W.H.: A vaccine against dental caries. Brit. Dent. J., 126:159, 1969.
- Bowen, W.H., Amsbaugh, S.M., Monell-Torrens, S., Brunelle, J., Kuzmiak-Jones, H., & Cole, M.F.: A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. JADA, 100: 677, 1980.
- Bratthall, D.: Immunofluorescent identification of *Streptococcus mutans*. Odont. Revy, 23:181, 1972.
- Bratthall, D.: Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. Odont. Revy, 21: 143, 1970.
- Chuldzinski, A.M., Germaine, G.R., & Schachtele, C.F.: *Streptococcus mutans* dextransucrase: Purification, properties, and requirement for primer dextran. J. Dent. Res., 55:C75, 1976.
- Coykendall, A.L.: Four types of *Streptococcus mutans* based on their genetic, antigenic, and biochemical characteristics. J. Gen. Microbiol., 83:327, 1974.
- Coykendall, A.L.: Genetic heterogeneity in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol., 106: 192, 1971.
- Dummer, P.M.H., & Green, R.M.: A comparison of the ability of strains of streptococci to form dental plaque-like deposits *in vitro* with their cariogenicity in gnotobiotic rats. Archs. Oral Biol., 25:245, 1980.
- Ebisu, S., & Misaki, A.: The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextransucrase. Carbohydr. Res., 38:374, 1974.
- Edwardsson, S.: The caries-inducing property of variants of *Streptococcus mutans*. Odont. Revy, 21:153, 1970.
- Evans, R.T., & Genco, R.J.: Inhibition of glucosyltransferase activity by antisera to known serotypes of *Streptococcus mutans*. Infect. Immunity, 7:237, 1973.
- Fitzgerald, R.J., & Keyes, P.H.: Demonstration of the etiologic role of streptococci

- in experimental caries in the hamster. JADA, 61:9, 1960.
16. Germaine, G.R., Harlander, S.K., Leung, W.S., & Schachtele, C.F.: *Streptococcus mutans* dextranase: Functioning of primer dextran and endogenous dextranase in water-soluble and water-insoluble glucan synthesis. Infect. Immunity, 16:637, 1977.
 17. Gibbons, R.J., & Fitzgerald, R.J.: Dextran-induced agglutination of *Streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plaques. J. Bacteriol., 98:341, 1969.
 18. Gold, O.G., Jordan, H.V., & van Houte, J.: A selective medium for *Streptococcus mutans*. Archs. Oral Biol., 18:1357, 1973.
 19. Grenier, E.M., Eveland, W.C., & Loesch, W.J.: Identification of *Streptococcus mutans* serotypes in dental plaque by fluorescent antibody techniques. Archs. Oral Biol., 18:707, 1973.
 20. 浜田茂辛, 増田典男, 鳥居光男: 齶蝕原性 ショ糖球菌の分離・同定法・日本歯科評論, 415:125, 1977.
 21. Hamada, S., Masuda, N., & Kotani, S.: Isolation and serotyping of *Streptococcus mutans* from teeth and feces of children. J. Clin. Microbiol., 11:314, 1980.
 22. Hamada, S., Masuda, N., & Kotani, S.: Demonstration of serotype *d* and *g* specificities of *Streptococcus mutans* by immunodiffusion. Archs. Oral Biol., 23:495, 1978.
 23. Hamada, S., Masuda, N., Ooshima, T., Sobue, S., & Kotani, S.: Epidemiological Survey of *Streptococcus mutans* among Japanese children. Japan. J. Microbiol., 20:33, 1976.
 24. Hamada, S., Masuda, N., & Shimamoto, T.: Some biological properties of *Streptococcus mutans* isolated from human mouths, with reference to the correlation with serotypes. Archs. Oral Biol., 24:627, 1979.
 25. Hamada, S., Mizuno, J., Murayama, Y., Ooshima, T., Masuda, N., & Sobue, S.: Effect of dextranase on the extracellular polysaccharide synthesis of *Streptococcus mutans*: Chemical and scanning electron microscopy studies. Infect. Immunity, 12:1415, 1975.
 26. Hamada, S., & Slade, H.D.: Synthesis and binding of glucosyltransferase and *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* grown in a synthetic medium. Archs. Oral Biol., 24:399, 1979.
 27. Hardie, J.M., & Bowden, G.H.: Some serological cross-reactions between *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, and other dental plaque streptococci. J. Dent. Res., 55:C50, 1976.
 28. Hardie, J.M., & Bowden, G.H.: Physiological classification of oral viridans streptococci. J. Dent. Res., 55:C166, 1976.
 29. van Houte, J., Burgess, R.C., & Onose, H.: Similar implantation of human strains of *Streptococcus mutans* in Sprague-Dawley rats for sucrose or glucose diet. J. Dent. Res., 55:B177, 1976 (IADR abstracts No. 464).
 30. Ikeda, T., Ochiai, K., & Shiota, T.: Taxonomy of the oral *Streptococcus mutans* based on colonial characteristics and serological, biochemical and genetic features. Archs. Oral Biol., 24:863, 1979.
 31. Ikeda, T., & Sandham, H.J.: A medium for the recognition and enumeration of *Streptococcus mutans*. Archs. Oral Biol., 17:601, 1972.
 32. Jablon, J.M., Ferrer, T., & Zinner, D.D.: Identification and quantitation of *Streptococcus mutans* by the fluorescent antibody technique. J. Dent. Res., 55:A76, 1976.
 33. Koga, T., & Inoue, M.: Effects of dextranase on cell adherence, glucan-film formation and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. Archs. Oral

- Biol., 24:191, 1979.
34. Lehner, T., Challacombe, S.J., & Caldwell, J.: An experimental model for immunological studies of dental caries in the rhesus monkey. *Archs. Oral Biol.*, 20:299, 1975.
 35. Lehner, T., Challacombe, S.J., Wilton, J.M.A., & Caldwell, J.: Cellular and humoral immune response in vaccination against dental caries in monkeys. *Nature*, 264:69, 1976.
 36. Loesche, W.J., & Grenier, E.: Detection of *Streptococcus mutans* in plaque samples by the direct fluorescent antibody test. *J. Dent. Res.*, 55:A87, 1976.
 37. Loesche, W.J., Rowan, J., Straffon, L.H., & Loos, P.J.: Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infect. Immunity*, 11:1252, 1975.
 38. Michalek, S.M., McGhee, J.R., Mestecky, J., Arnold, R.R., & Bozzo, L.: Ingestion of *Streptococcus mutans* induces secretory immunoglobulin A and caries immunity. *Science*, 192:1238, 1976.
 39. Mukasa, H., & Slade, H.D.: Mechanism of the adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. III. Purification and properties of the enzyme complex responsible for adherence. *Infect. Immunity*, 10:1135, 1974.
 40. Mukasa, H., & Slade, H.D.: Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. II. Nature of the binding site and adsorption of dextran-levan synthetase enzymes on the cell-wall surface of the *Streptococcus*. *Infect. Immunity*, 9:419, 1974.
 41. Mukasa, H., & 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. Immunity*, 8:555, 1973.
 42. Newbrun, E.: Sucrose, the arch criminal of dental caries. *Odont. Revy*, 18:373, 1967.
 43. Nisizawa, T., Imai, S., Akada, H., Hinoide, M., & Araya, S.: Extracellular glucans produced by oral streptococci. *Archs. Oral Biol.*, 21:207, 1976.
 44. Perch, B., Kjems, E., & Ravn, T.: Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *Acta Path. Microbiol. Scand. Section B*, 82:357, 1974.
 45. van de Rijn, I., Bleiweis, A.S., & Zabriskie, J.B.: Antigens in *Streptococcus mutans* cross reactive with human heart muscle. *J. Dent. Res.*, 55:C59, 1976.
 46. Russell, M.W., Challacombe, S.J., & Lehner, T.: Specificity of antibodies induced by *Streptococcus mutans* during immunization against dental caries. *Immunology*, 40:97, 1980.
 47. Russell, R.R.B.: Comparison of oral *Streptococcus mutans* AHT with strains of serotypes *a* and *g* by biochemical and electrophoretic methods. *Archs. Oral Biol.*, 24:617, 1979.
 48. Scherp, H.W.: Dental caries: Prospects for prevention. *Science*. 173:1199, 1971.
 49. Scully, C.M., & Lehner, T.: Opsonization, phagocytosis and killing of *Streptococcus mutans* by polymorphonuclear leucocyte, in relation to dental caries in the rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Archs. Oral Biol.*, 24:307, 1979.
 50. Scully, C.M., & Lehner, T.: Bacterial and strain specificities in opsonization, phagocytosis and killing of *Streptococcus mutans*. *Clin. Exp. Immunol.*, 35:128, 1979.
 51. Shklair, I.L., & Keene, H.J.: A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.*, 19:1079, 1974.
 52. Sonis, S.T., Mirando, D., Stelos, P., & Lamster, I.B.: Capacity of human oral

- leucocytes to mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Archs. Oral Biol.*, 24:235, 1979.
53. De Stoppelaar, J.D., König, K.G., Plaschaert, A.J.M., & van der Hoeven, J.S.: Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.*, 16:971, 1971.
54. Taubman, M.A., & Smith, D.J.: Effects of local immunization with *Streptococcus mutans* on induction of salivary immunoglobulin A antibody and experimental dental caries in rats. *Infect. Immunity*, 9:1079, 1974.
55. Trautner, K., Gehring, F., & Lohmann, D.: Extracellular glucans synthesized by strains of two types of *Streptococcus mutans in vitro*. *Archs. Oral Biol.*, 23:175, 1978.

ISOLATION AND BIOTYPING OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* FROM DENTAL PLAQUE OF CARIOUS LESION

Jean-Yong Lee, D.D.S.,* Youn-Mun Ha, Ph.D.*
 Choong-Mo Chung, D.D.S., M.S.D.,** Sang-Jin Park, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,**
 Ho-Young Choi, D.D.S., Ph. D.**

*Department of Microbiology, School of Medicine**
*Department of Operative Dentistry, School of Dentistry** Kyung Hee University*

..... > Abstract <

Streptococcus mutans were isolated from dental plaques of carious lesions of 4 patients on mitis-salivarius agar medium. Three patients known to harbor *S. mutans* in their dental plaques. Identification of the isolated *S. mutans* was established by colonial morphology on mitis-salivarius agar medium, the fermentation of mannitol and sorbitol, and confirmed by agglutinating reaction with home made anti-*S. mutans* NCTC 10449 (serotype *c*) antiserum. Of the isolated *S. mutans*, one strain (P2-1) showed strong agglutinating reaction with antiserum, another strain (P1-2) showed weak agglutinating reaction. P2-1 strongly adhered to the wall of the test tube containing 5% sucrose broth, while p1-2 weakly colonized on the wall of the test tube. Biotyping of the isolated *S. mutans* based on the fermentation of mannitol, sorbitol, raffinose and melibiose, and the production of ammonia from L-arginine, and the inhibition of acid production by bacitracin. Biochemical characteristics of P2-1 strain correlated with the recognized biotype *c*, p1-2 strain resembled biotype *d* of *S. mutans*.