

塩の複合菌口腔バイオフィルム形成への影響

泉福 英信, 中尾 龍馬

国立感染症研究所細菌第一部

概要 寝たきり高齢者は、歯垢(口腔バイオフィルム)に日和見菌のような病原性菌が多く検出される。近年、肺炎の死因率が脳血管疾患を抜いて第3位となった。肺炎は、口腔微生物が原因菌の一つとして考えられている。日和見菌として口腔でも検出される黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)は、感染性心内膜炎の原因や肺炎の原因として報告されている。塩は、食品の味付けに使用される一方、ヒトの体内細胞の維持に必要な必須ミネラル成分の一つである。しかし近年の研究成果から、塩は、*S. aureus* のバイオフィルム形成を促進する物質として注目されている。そこで、口腔常在菌である *Streptococcus mutans* と *S. aureus* との複合菌によるバイオフィルム形成に対して塩がどのように効果を発揮するか明らかにすることを目的として本研究を行った。

その結果、ある一定の濃度;0.032 M, 0.064 M, 0.125 M NaCl を加えると、*S. mutans* と *S. aureus* との混合菌によるバイオフィルム形成量を著しく上昇させた。この混合菌バイオフィルム内での *S. mutans* の生菌数は単独の場合と比べあまり変化がなかったが、*S. aureus* の生菌数は一定の割合で減少していた。浮遊菌での生菌数も、*S. mutans* および *S. aureus* 共に一定の割合で減少していた。よって、バイオフィルム形成が上昇したのは、生菌が死に、その死菌が蓄積したことによると考えられた。このバイオフィルム形成には、*S. mutans* のクオラムセンシングシステムの Com と Lux システムが関与していることが明らかになった。これは、一定濃度の NaCl によるストレスがクオラムセンシングを活性化し、そして死菌を誘導し、混合菌バイオフィルムを形成させることが考えられた。

唾液中の塩濃度が 0.25%前後、血液が 0.4%前後であることを考えると、食事から入ってくる塩濃度(1%<)は混合菌バイオフィルム形成に影響を与える可能性がある。食後にお茶や水を飲むことやうがいをすることは、口腔内塩分量を薄めることになるため、日和見菌の増加を阻止するために有効であると考えられた。

1. 研究目的

口腔バイオフィルムは、う蝕、歯周病の原因となる口腔微生物により歯の表面にできる生物群集のことである。食事をした後に口腔に残った栄養物を口腔微生物が代謝することにより、菌が歯表面に付着、増殖、凝集することにより形成される^(1, 2)。このバイオフィルムが形成されると、その中で微生物が抗菌物質に対して抵抗性を示すようになり、長く口腔に生き残るきっかけになる⁽³⁾。近年、肺炎の死因率が脳血管疾患を抜いて第3位となった⁽⁴⁾。肺炎は、口腔微生物が肺炎の原因菌として考えられている⁽⁵⁾。現在の日本は、少子高齢化により、高齢者比率が高まり寝たきり高齢者が増えている⁽⁶⁾。この寝たきり高齢者は、口

腔バイオフィルムに日和見菌のような病原性菌が増えている⁽⁶⁾。このことも、肺炎が死因として増加する一因となっている。塩は、食品の味付けに使用される一方、ヒトの体内細胞の維持に必要な必須ミネラル成分の一つである。蓄積された口腔バイオフィルムを除去するために歯磨きペーストに入れて使用されることもある。塩は、ある一定濃度になると殺菌性を示す。このことから、歯磨きペーストがない時代は、塩を直接利用して歯磨きを行っていた。しかし近年の研究成果から、塩はバイオフィルムの形成促進物質として報告されるようになった。日和見菌として口腔でも検出される黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)は、感染性心内膜炎の原因や肺炎の原因として報告されてい

る⁷⁾。この菌は、一定濃度の塩の含まれた培地で、バイオフィーム形成を促進することが報告された⁸⁾。塩は、殺菌性とバイオフィーム形成の促進と両面性を有していることが考えられる。これは塩の濃度に依存した現象と考えられるが、明確に整理されていない。そこで、本研究は口腔常在菌である *Streptococcus sanguinis* や *Streptococcus mutans* と *S. aureus* との複合菌によるバイオフィーム形成に対して塩がどのように効果を発揮するか明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

1) 使用菌株

Streptococcus mutans UA159, UA159.gtfB, UA159.gtfC, UA159.gtfBC, UA159.luxS, UA159.comC, UA159.comD, UA159.comE, UA159.comX, UA159.UA1992, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Staphylococcus aureus* cowan I, *Actinomyces naeslundii* x600, *Lactobacillus casei*

2) 培養方法

実験を行う前日に、5 ml Brain Heart Infusion (BHI) 培地に菌を接種し、一昼夜培養して、その生菌を実験に使用する。

3) 96穴マイクロタイタープレートを用いたバイオフィーム形成実験

成人全唾液を 10 ml 採取し、1,500 x g にて遠心を行い、デブリスを除去する。上清を 0.08 μ m フィルターで通し、さらに 0.022 μ m フィルターを通し、細菌などを除去する。その後すぐに、1 well に唾液 20 μ L を加え、冷蔵、1 時間放置する。その後、唾液を捨て、滅菌 PBS にて 2 回洗浄し、バイオフィーム形成実験に使用する。菌は、Tryptic soy broth without dextrose with 0.25% sucrose にて浮遊液を作り、96 well へ 200 μ L ずつ加えて行く。NaCl を 1 M から段階希釈し加える。16 時間⁹⁾、5% CO₂ 好気環境下、37°C で培養を行う。培養後、菌液を捨て、DW で 2 回洗浄し、0.5% サフラニン溶液にてバイオフィームを染色する。染色されたバイオフィームの 492 nm 吸収値を吸光度計にて測定し、それをバイオフィーム量とする。バイオフィーム内の死菌生菌の観察は、LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Viability Kit で染色し共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により蛍光強度を定量的に検討する。

4) Membrane Vesicle (MV)を用いたバイオフィーム形成実験

MV を BHI における *S. mutans* 培養液からの超遠心 (15 万 x g) にて回収した。3) と同様のバイオフィーム形成実験で 0.25M NaCl を加え、MV を 0.75 μ g/mL (蛋白質濃度) を加え、グルカンのような多糖体が合成されているか確認するために Alexa Fluor 647 を加え培養を行った。バイオフィーム形成量は、3) に記載した 0.5% サフラニン溶液にて染色後、492 nm 吸収値にて評価した。バイオフィーム内のグルカンの観察は、Syto 9 で生菌を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析によりグルカンと生菌との蛍光強度を定量的に検討する。

5) ポリピロールを用いたバイオフィーム形成実験

3) と同様のバイオフィーム形成実験で陽電荷が表出させた化合物であるポリピロールを 0.063% から段階的に希釈して加え、バイオフィーム形成量は、3) に記載した 0.5% サフラニン溶液にて染色後、492 nm 吸収値にて評価した。バイオフィーム内のグルカンの観察は、Syto 9 で生菌を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析によりグルカンと生菌との蛍光強度を定量的に検討した。

6) フローセルを用いたバイオフィーム形成実験

S. mutans や *S. aureus* を利用して、単独あるいは複合微生物 (*S. aureus* を含む) のバイオフィーム形成実験を、フローセルシステムを用いて行う。フローセル実験は、我々のグループにより確立された方法を用いる¹⁰⁾。ヒト唾液をセルにコートし PBS にて洗浄後、*S. mutans* や *S. gordonii* を単独接種ならびに *S. aureus* との混合菌接種をセル表面へ行う。1 時間静置しウェル表面に菌を付着させる。ブドウ糖か砂糖を含む TSB 培地に、NaCl を 0.65 mM 加え、培養を行う。培養後のバイオフィーム形成の評価は、LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Viability Kit で染色し共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により蛍光強度を定量的に検討する。

7) *S. mutans*, *S. aureus* との混合菌バイオフィーム内それぞれの菌量の測定

S. mutans, *S. aureus* のバイオフィーム内菌および浮遊菌量の測定を選択培地を用いた培養法にて行う。*S. aureus* は卵黄加マンニット食塩培地、*S. mutans* は bacitracin 入り Mitis Salivarius (MS) 培地にバイオフィーム懸濁液を撒き培養後菌量を測定する。

8) 総合的な検討

それぞれの NaCl の濃度により、バイオフィーム形成量、バイオフィーム内 *S. mutans*, *S. aureus* の菌量, eDNA の関与、バイオフィーム関連遺伝子がどのように関るか検討することにより、塩の口腔バイオフィームへの影響を明らかにする。

3. 結果

1) NaCl の様々な菌のバイオフィーム形成に対する効果

S. sanguinis のバイオフィーム形成は、ヒト唾液コートなし 96 穴プレートにおいて、0.25 M の NaCl が存在している時に著しいバイオフィーム形成の増加が認められた(図1)。一方、唾液コートありや他の NaCl 濃度では、バイオフィーム形成の増加が認められなかった。

S. mutans のバイオフィームは、sucrose 存在下において著しく形成されるが、NaCl を加えると 0.25, 0.5, 1 M の高濃度になるに従って減少するという結果となった(図2)。これは、*S. mutans* の増殖が高塩濃度により抑制されたためと考えられた。一方、sucrose を glucose に変えると、バイオフィーム形成が急激に低下し、NaCl の様々な濃度を加えても上昇させることはなかった。*S. aureus* のバイオフィーム形成は、NaCl の濃度依存的に上昇し、0.5 M の時にピークに達した(図3)。

S. sanguinis のバイオフィーム形成を上昇させる NaCl の濃度が 0.25 M であった(図1)ことから、MV のバイオフィーム形成に 0.25 M NaCl を様々な菌に加えその影響を検討した。図4は、まずは NaCl を加えない場合の結果である。TSB with 0.25% sucrose が培地として使用された時に、MV は *A. naeslundii* のバイオフィーム形成を上昇させた(図4)。このような上昇は、*S. sanguinis* や sucrose 存在下でもバイオフィームを形成できない *S. mutans* UA159.gtfBC⁻においても認められた。*L. casei* や *S. pyogenis* のバイオフィームは MV 添加によりわずかな上昇が認められた。BHI を培地に使用した場合は、いずれの菌のバイオフィームにおいても MV による有意な上昇は認められなかった。

次に、NaCl の 0.25M を加えた時の検討を行った。しかし、NaCl 添加により MV によるバイオフィーム形成の大きな変化は認められなかった(図5)。よって、MV によるバイオフィーム形成には、NaCl が影響しないことが考えられた。

次に、バイオフィーム形成を誘導する化合物である

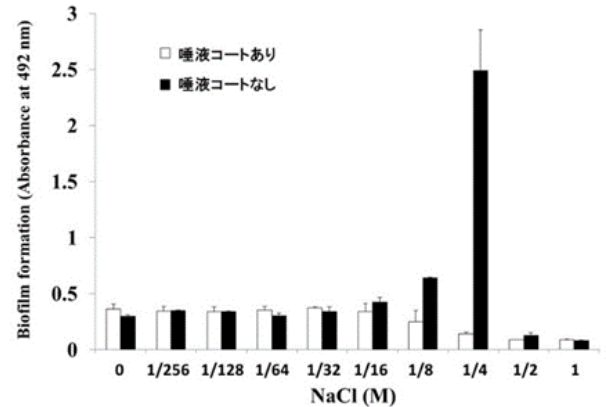


図1. *Streptococcus sanguinis* のバイオフィーム形成に対するNaClの効果

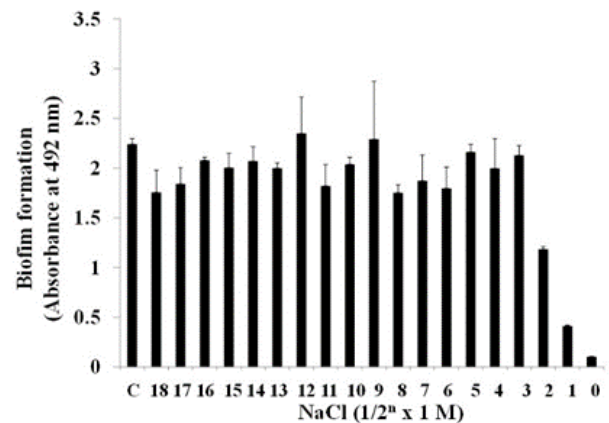


図2. *S. mutans* のバイオフィーム形成に対するNaClの効果
TSB with 0.25% sucrose non-coating plate

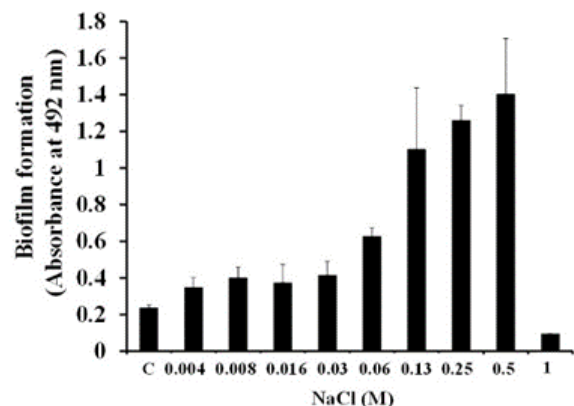


図3. *S. aureus* のバイオフィーム形成に対するNaClの効果
TSB with 0.25% sucrose non-coating plate

Polypyrrole によるバイオフィーム形成に対する NaCl の影響を検討した。NaCl が無い時は 63/2¹² (3.13 x 10⁻⁵) %と 63/2¹¹ (6.3 x 10⁻⁵) %の Polypyrrole 濃度の時にバイオフィル

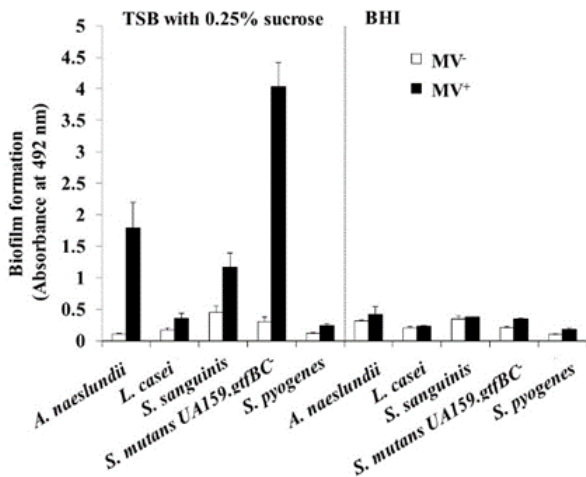


図4. 様々な菌におけるMVのバイオフィーム形成への効果

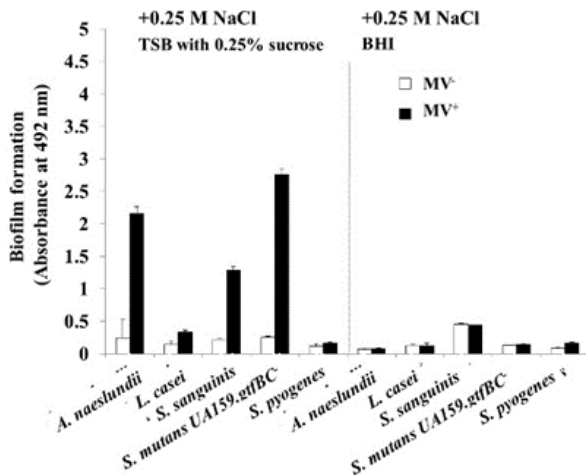


図5. NaCl存在下におけるMVの様々なバイオフィーム形成への効果

ム形成の有意な上昇が認められた(図6)。NaClを0.25 M 添加した時は、 $63/2^{13}$ (1.6×10^{-5} %)から $63/2^6$ (200×10^{-5} %) までの Polypyrrole の濃度でバイオフィーム形成の有意な 上昇が認められた(図7)。よって、NaClによってバイオフィ ーム形成を上昇させる Polypyrrole の濃度の範囲が広がる 事が明らかとなった。Polypyrrole は、細胞外 DNA による バイオフィーム形成に似たバイオフィーム形成機構を示す ため、NaCl がグルカンに依存しない細胞外 DNA によるバ イオフィーム形成誘導に影響を与えることが示唆された。

次に、*S. mutans*と*S. aureus*の混合菌バイオフィーム形成 にNaClがどのように影響するか検討を行った。NaCl濃度 が0.008 Mからバイオフィーム形成の上昇が始まり0.06 M でピークになった(図8)。0.13 M以上になるとそのバイオ フィーム形成量は低下した。NaClが*S. mutans*と*S. aureus*

の

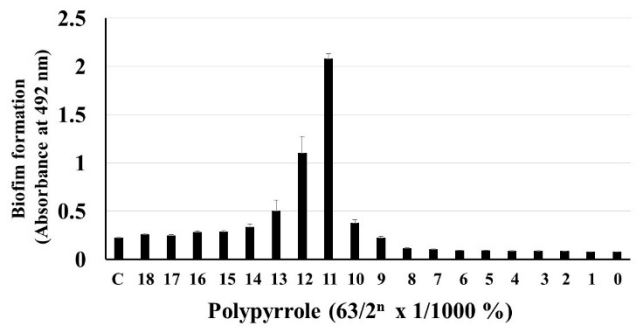


図6. Streptococcus sanguinis のバイオフィーム形成 TSB with 0.25% sucrose, hu saliva-coating plate

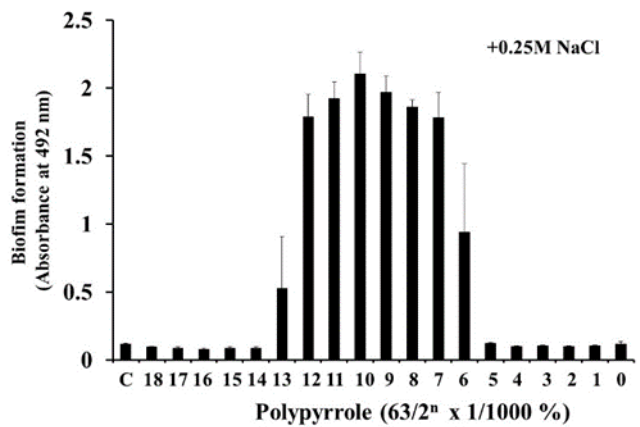


図7. NaClによるStreptococcus sanguinis バイオフィーム形成への影響 TSB with 0.25% sucrose, hu saliva-coating plate

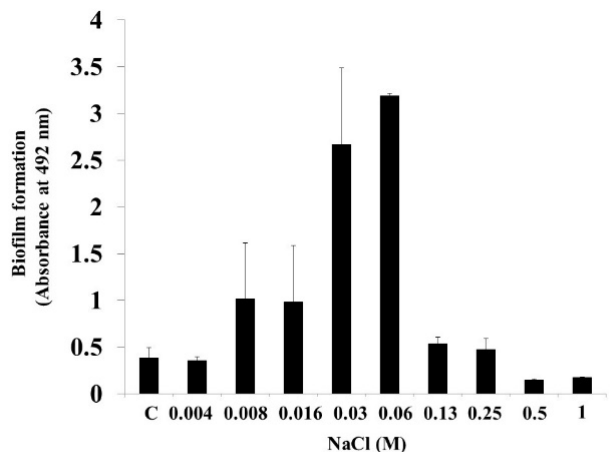


図8. S. aureusとS. mutansとのバイオフィーム形成に対する NaClの効果 TSB with 0.25% sucrose hu-saliva coating plate

混合菌バイオフィーム形成を誘導することが明らかとなっ た。NaClにより誘導されたバイオフィームがどのようなメカ

ニズムで誘導されたのか明らかにするために、生菌と死菌をコンフォーカル顕微鏡により観察した。NaCl の濃度が上昇するに従って、死菌の量は増加していき、その結果、増加した混合菌バイオフィームは死菌に覆われたバイオフィームであることが明らかになった(図9, 10)。両菌のうちどちらの菌が死んでいるのかバイオフィームおよび浮遊菌を集めて、生菌量を測定した。その結果、*S. mutans* の浮遊菌は *S. aureus* との混合培養において、単独菌の場合に比べ著しく菌量が減少した(図11)。一方、バイオフィーム内の *S. mutans* 菌量はあまり減少しなかった。*S. aureus* の方は、この混合菌バイオフィームおよび浮遊菌ともに単独の場合よりも著しい減少が認められた。この結果から推察すると、死んでいるのは *S. mutans* の浮遊菌および *S. aureus* のバイオフィーム形成菌および浮遊菌であることが考えられた。この結果から、*S. mutans* はバイオフィームを形成すると、バクテリオシンのような他の菌を殺す物質を放出しているか、他の菌が存在する環境で生き残るシステム有しているなどが考えられる。その結果、死菌が誘導され死菌の蓄積によりバイオフィーム形成量が増量し、結果的に他の菌が結合したバイオフィームが形成されることが示唆された。

そこで、この混合菌バイオフィーム形成のメカニズムを明らかにするために、*S. mutans* のバイオフィーム形成に重要に関わるグルカン合成を行うグルコシルトランスフェラーゼ(GTF)に注目した。GTF には、水溶性グルカンを合成する GTF-I と非水溶性グルカンを合成する GTF-S が存在する。これらの GTF-I をコードする遺伝子が *gtfB* と *gtfC* である。これら両方の遺伝子変異株を作製して、*S. aureus* と混合バイオフィーム形成を検討した。その結果、混合菌バイオフィームは形成されなくなった(図12)。この結果は、GTF-I が混合菌バイオフィーム形成に深く関与していることを示している。次に *gtfB* と *gtfC* をそれぞれ単独で変異株

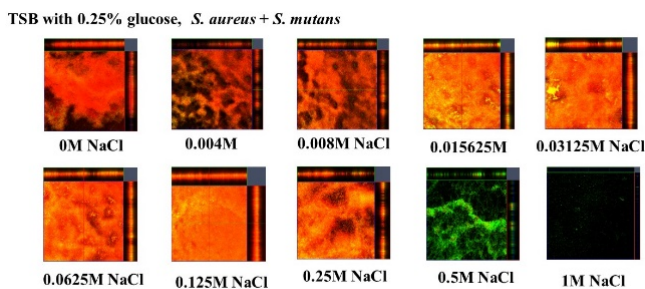


図9. *S. aureus*と*S. mutans*とのバイオフィーム形成における生菌と死菌の2D観察

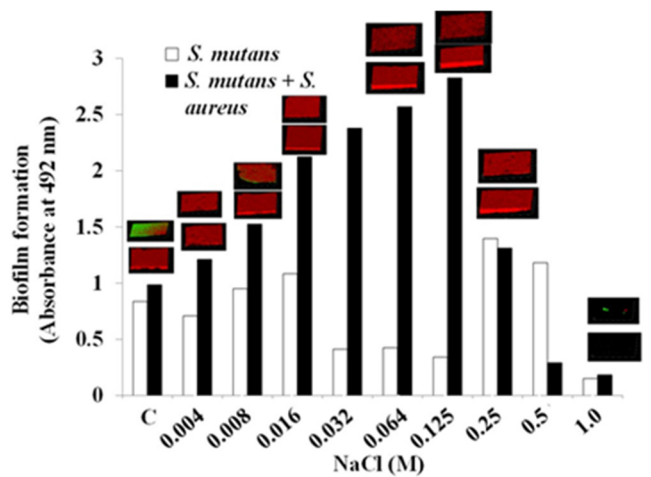


図10. *S. aureus*と*S. mutans*とのバイオフィーム形成における生菌と死菌の3D観察
上段の写真が*S. mutans*単独、下段が混合菌バイオフィーム

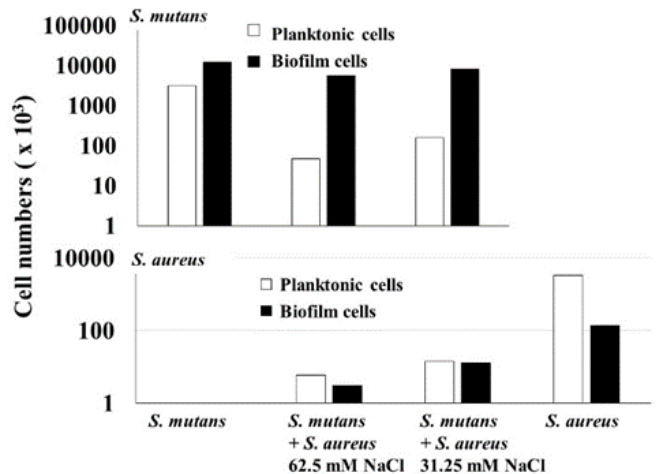


図11. *S. aureus*と*S. mutans*とのバイオフィームと浮遊菌における生菌と死菌量の検討

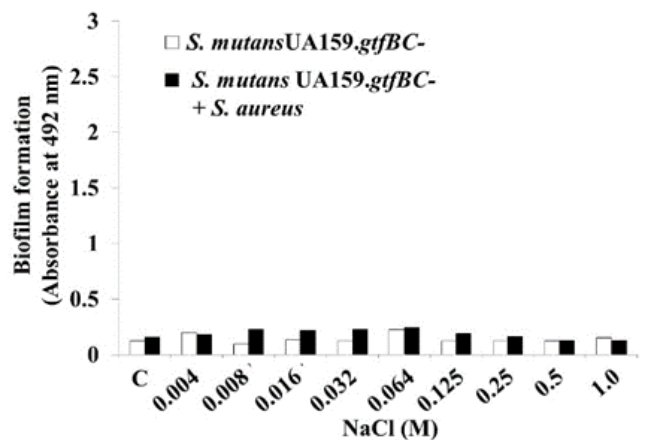


図12. *S. aureus*と*S. mutans* UA159.gtfBC-とのバイオフィーム形成に対するNaClの効果

TSB with 0.25% sucrose hu-saliva coating plate

を作製して、混合菌バイオフィーム形成実験を行うと、両変異株ともバイオフィーム形成量が減少した(図13)。この結果も、*gtfB* および *gtfC* ともに GTF-I をコードしているため、GTF-I がこのバイオフィームに関与していることを示している。

死菌誘導が混合菌バイオフィーム形成に関与していることを考えると、クオラムセンシングシステムにより制御を受けていることが考えられる。そこで、*S. mutans* のクオラムセンシングに関わる遺伝子である *luxS* に着目した。*luxS* は、オートインデューサーである AI-2 の産生に関わる遺伝子で、その変異株を作製して *S. aureus* との混合菌バイオフィーム形成実験を行った。その結果、*S. mutans* UA159.*luxS*- と *S. aureus* との混合菌バイオフィームは、有意に形成されなかった(図13)。

S. mutans は *luxS* 以外にも ComC 依存クオラムセンシングシステムを有している。そこで、ComC 依存クオラムセンシングに関与する遺伝子の変異株を作成して、それら変異株と *S. aureus* との混合菌バイオフィーム形成実験を行った。その結果、*comC* と共に *comD*, *comE* および *comX* の変異株すべてにおいて、混合菌バイオフィームの有意な形成が認められなかった(図14)。

S. mutans と *S. aureus* との混合菌バイオフィーム形成には、0.008 M~0.06 M NaCl, GTF-I とクオラムセンシングシステムが深く関わっていることが考えられた。

これらの結果は、すべて 96 穴マイクロタイタープレートで行った結果であることから、菌体からの代謝産物の影響も加味しなければならない。そこで、代謝産物の影響を少なくするために、フローセルシステムを用いて、62.5 mM NaCl におけるバイオフィーム形成実験を行った。その結果、フローセルにおける実験でも有意な *S. mutans* と *S. aureus* との混合菌バイオフィーム形成が認められた(図15)。死菌も誘導されていた。よって、ある一定の塩濃度は、日和見菌である *S. aureus* と口腔常在菌の *S. mutans* との混合菌バイオフィーム形成を誘導することが明らかとなった。

4. 考察

S. mutans は、0.032, 0.064, 0.125 M の加えた NaCl で *S. aureus* と混合菌バイオフィーム形成を誘導した。この濃度は、約 0.18%, 0.37%, 0.73% に相当する濃度で、TSB 培地には予め 0.5% の NaCl が含まれていたことを考えると、TSB

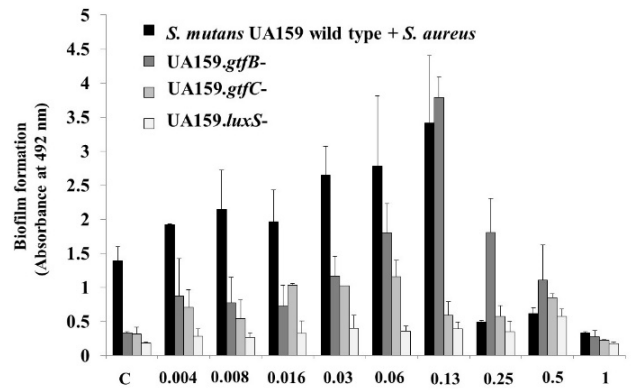


図13. *S. aureus*と*S. mutans* UA159.*gtfB*-, UA159.*gtfC*-および UA159.*luxS*-とのバイオフィーム形成に対するNaClの効果 TSB with 0.25% sucrose hu-saliva coating plate

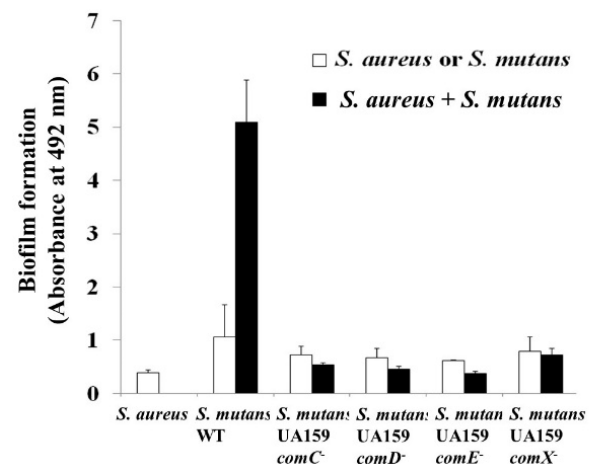


図14. *S. aureus*と*S. mutans* UA159.*comC*-, *comD*-, *comE*- and *comX*-とのバイオフィーム形成に対するNaClの効果 TSB with 0.25% sucrose hu-saliva coating plate

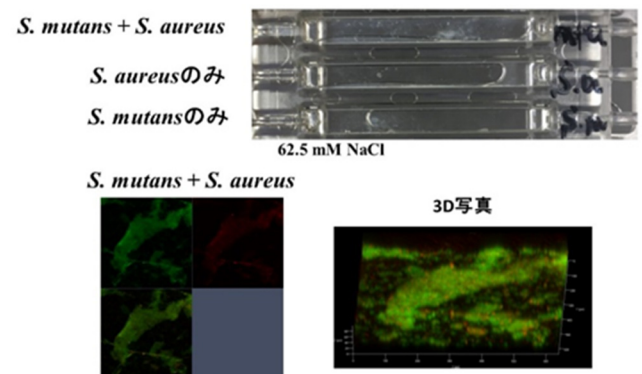


図15 Flow cell system における混合菌バイオフィーム形成実験

のNaClの約2倍量前後の濃度が混合菌バイオフィーム形成を誘導したと考えられた。TSBに含まれるNaCl濃度は、菌が最適に増殖できる濃度であり、その2倍量だと、菌は

ストレスを受けていると考えられる。加えた NaCl の 0.25 M 以上でバイオフィーム形成量が減少したのは、菌が増殖できなくなる濃度であると考えられる。菌は増殖できるが多大なストレスを与える濃度の塩を加えると混合菌バイオフィーム形成が誘導された。

クオラムセンシングシステムの Lux や Com のシステムがこのバイオフィーム形成に影響を及ぼしているという結果が得られた。これは、上述のようにストレスに応答して、これらのシステムが働き、バクテリオシンやオートライシンなどが産生され死菌が誘導されるというメカニズムが考えられる。様々なストレスがクオラムセンシングの起点となることは報告されている⁽¹¹⁾。さらにバイオフィームを形成している *S. mutans* は混合菌バイオフィームで形成量が減らなかった。様々な報告を含めると^(12, 13)、これも *S. mutans* でクオラムセンシングが働き、耐酸性や抗菌物質耐性の機構が働いた可能性が考えられる。

一方、*S. aureus* の方は、バイオフィームを形成しても、抗菌物質に耐性が示せず、浮遊菌と共に減少していた。しかし、*S. mutans* のバイオフィームと死菌に囲まれて、減少した *S. aureus* の生菌はバイオフィームを形成していることも明らかになった。

これらの結果から、唾液中の塩濃度が 0.25%前後、血液が 0.4%前後であることを考えると、食事(1%<)から入ってくる塩濃度は混合菌バイオフィーム形成に影響を与える可能性があると考えられた。食後にお茶や水を飲むことやうがいをするのは、口腔内塩分量を薄めることになるため、日和見菌の増加を阻止するために有効であると考えられた。

また唾液よりも血液の方が、塩濃度が高いことから歯周病のように、口腔内に出血すると口腔内塩濃度が高まるために、混合菌バイオフィームが形成される傾向になることが考えられる。本研究の結果から、歯周病を予防することが、健康的な口腔フローラを維持することに繋がることも考えられた。

本研究で、混合菌バイオフィームにおいて、*S. mutans* があまり減らず、*S. aureus* の方が減ったこと、死菌が *S. mutans* 由来なのか *S. aureus* 由来なのか明らかにすることなどが今後の課題として残る。今後のさらなる検討が必要である。

5. 参考文献

- 1) Loesche WJ. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 50(4):353-380.
- 2) Hamada S, Slade HD. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 44(2):331-384.
- 3) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318-1322.
- 4) 平成 23 年度人口動態統計月報年計, 厚生労働省
- 5) Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T, Sasaki H. 1999. Oral care and pneumonia. *Oral Care Working Group. Lancet.* 354: 515.
- 6) Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H, Hanada N. 2003. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology.* 49: 301-309.
- 7) El-Solh AA, Pietrantonio C, Bhat A, Aquilina AT, Okada M, Grover V, Gifford N. 2003. Microbiology of severe aspiration pneumonia in institutionalized elderly. *Am J Respir Crit Care Med.* 167:1650-1654.
- 8) O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O'Gara JP. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol.* 45:1379-1388.
- 9) Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H. 2009. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 24:152-161.
- 10) Motegi M, Takagi Y, Yonezawa H, Hanada N, Terajima J, Watanabe H, Senpuku H. 2006. Assessment of genes associated with *Streptococcus mutans* biofilm morphology. *Appl Environ Microbiol.* :6277-6287.
- 11) Dufour D, Lévesque CM. 2013. Cell death of *Streptococcus mutans* induced by a quorum-sensing peptide occurs via a conserved streptococcal autolysin.

J Bacteriol. 195:105-114.

12) Sztajer H, Lemme A, Vilchez R, Schulz S, Geffers R, Yip CY, Levesque CM, Cvitkovitch DG, Wagner-Döbler I. 2008. Autoinducer-2-regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic

effect of the luxS mutation. J Bacteriol. 190:401-415.

13) Wang BY, Alvarez P, Hong J, Kuramitsu HK. 2011. Periodontal pathogens interfere with quorum-sensing-dependent virulence properties in *Streptococcus mutans*. J Periodontal Res. 46:105-110.

Effects of Salts on Complex Bacterial Biofilm Formation

Hidenobu Senpuku, Ryoma Nakao

National Institute of Infectious Diseases

Summary

Opportunistic pathogens are frequently isolated in oral plaque (oral biofilm) from bedridden elderly. In recent years, the cause of death of pneumonia became the third place past cerebrovascular disease. Oral microorganism is considered as one of pathogens for development of pneumonia. *Staphylococcus aureus*, which is also detected in the oral cavity as opportunistic bacteria, has been reported as a cause of infective endocarditis and cause of pneumonia. While salt is used for seasoning foods, salt is one of essential mineral components necessary for maintaining human body cells. However, from recent research results, salt has attracted attention as a substance promoting *S. aureus* biofilm formation. Therefore, this study was conducted to clarify how salt exerts its effect on biofilm formation by complex bacteria of *Streptococcus mutans* and *S. aureus* which are resident oral cavity bacteria. As a result, addition of some concentrations; 0.032 M, 0.064 M, and 0.125 M NaCl significantly increased biofilm formation by mixed bacteria of *S. mutans* and *S. aureus*. The viable cell count of *S. mutans* did not change much as compared with the single case, but the viable cell counts of *S. aureus* decreased at a fixed rate, in this mixed bacterial biofilm. The number of viable bacteria in the planktonic bacteria also decreased at a certain rate for both *S. mutans* and *S. aureus*. Therefore, the increase of biofilm formation might be induced by systems that viable bacteria died and their dead bacteria accumulated. Moreover, it was indicated that Com and Lux S-dependent quorum sensing system of *S. mutans* contributed to this biofilm formation. Taken together, it was considered that stress responses to some concentrations of NaCl activated quorum sensing and induced killed bacteria to form mixed bacterial biofilms of *S. mutans* and *S. aureus*. Considering that the salt concentration in saliva is around 0.25% and the blood is around 0.4%, the salt concentration (1% <) coming from the meal may affect the formation of mixed bacteria biofilm. Drinking or gargling with tea or water after a meal would reduce the amount of salinity in the oral cavity, therefore it seemed to be effective to prevent the increase of opportunistic pathogens.