

最近のトピックス

口腔由来の糖非分解性偏性嫌気性グラム陽性桿菌とその新しい分類 Oral Asaccharolytic Anaerobic Gram Positive Rods (AAGPR) and their taxonomic positions

新潟大学歯学部口腔細菌学講座

中澤 太, 星野悦郎

Department of Oral Microbiology

Faculty of Dentistry, Niigata University

Futoshi Nakazawa and Etsuro Hoshino

1. はじめに

ヒトの身体にはウイルスや真菌の他に700種の細菌が住み着き、その中でも口腔内は最もその種類が多く、約350種以上にも及ぶと言われている。更にそれら細菌叢の大部分は口腔内固有の細菌種であると同時に偏性嫌気性細菌種が圧倒的優勢菌であることが数多くの報告によって明らかにされている。また、近年、偏性嫌気性細菌の取り扱い技術の進歩によって、従来は培養出来なかった細菌種や、生育が極めて遅いためその存在が見落とされていた（又は無視されていた）細菌種など、これまでの認識とは異なる新しい細菌種が多数報告されている。その中でも、最も代表的なものが糖非分解性偏性嫌気性グラム陽性桿菌(AAGPR)である。

本稿では、ヒト口腔由来のAAGPRについて、我々のデータを含め、現在得られている知見を概説する。

2. 多 様 性

従来は、口腔由来のAAGPRの多くは*Eubacterium*属に分類されていた。しかし、その分類は、終末代謝産物を主たる基準としているために極めて曖昧であると同時に、この*Eubacterium*属には性状が大きく異なる多種多様の細菌種が混在している可能性が指摘されていた。実際、Nakazawa & Hoshinoは、*Eubacterium*属細菌11種を用いて、SDS-PAGEによる菌体構成蛋白、Western Immuno-blottingによる免疫学的特異性¹⁾及びDNA-DNA hybridizationによるDNA homology²⁾等を検討し

た結果、それらの細菌種間に極めて大きな相違が認められることを報告している。同様にSprattらは、16S rDNA sequence解析の結果から、*Eubacterium*属には遺伝学的に大きな隔たり(diversity)がある菌種が多数含まれていることを明らかにした³⁾。このような研究結果は、口腔由来のAAGPRの多様性を示すと共に、従来とは異なる新しい分類基準の必要性を示している。

3. 口腔内分布と病原性

Hoshinoらは、う蝕病巣や根管壁感染象牙質に生息する主たる細菌種の一つが*Eubacterium*属細菌であることを示し、それらの菌種がう蝕及びその進行に関与していることを示唆している⁴⁾。又、Uematsuらは、厳密な偏性嫌気性菌取り扱い技術を駆使し、歯周病患者の歯周ポケット内の細菌叢を検討した結果、分離総数422株中177株、即ち総菌数の42%がgenus *Eubacterium*に属するAAGPRであることを報告し、歯周疾患とそれらの細菌種と強い相関性を示唆している⁵⁾。その他に、歯垢、乳歯感染根管病巣、骨髄炎病巣、義歯付着歯垢など、ヒトの口腔内の殆どの部位からAAGPRが分離され、種々の口腔内感染症に及ぼすその役割の重要性が指摘されている⁶⁾。

1970年代の後半から80年代の後半にかけて、ある種のグラム陰性桿菌が歯周病患者の歯周ポケットで優勢であると言う報告を受けて、多くの研究者がその免疫学的、遺伝学的研究を行い、種々の病原因子を明らかにしている。一方、う蝕関連菌としても、幾つかのグラム陽性球菌の病原因子が多数報告されている。それらの口腔感染症において、このような病原性や病原因子を無視するものではないが、従来その培養が困難であったAAGPRが新しい技術によって検出可能になったこと、更にはそれを用いた最近の研究によって、特に歯髄炎、感染根管、骨髄炎、歯周ポケットなどの感染病巣部位からのAAGPRの分離頻度が高いことが明らかにされたこと等の事実は、これらのAAGPRが持つ病原性に関する解明は極めて重要となると考えられる。

4. 新しい細菌種の発見

従来、糖非分解性*Eubacterium*属細菌種としては、*Eubacterium timidum*, *E. lentum*, *E. nodatum*, *E. brachy*の4種が知られていた。しかし、その後、Mooreら、Hillら、Wadeら、Hoshinoら、等多数の研究者が、既報の細菌種には合致しない新しいタイプのAAGPRが

ヒトの口腔からの分離されることを報告している。1993年Uematsuらはアルギニン水解能において*E. nodatum*と異なる新菌種のAAGPRとして*E. saphenum*を報告している⁹⁾。更に1996年には*E. minutum*と*E. exiguum*がPoco¹⁰⁻¹¹⁾らによって、また*E. tardum*と*E. infirmum*がCheeseman¹²⁾らによって、それぞれ新しいAAGPR菌種として登録された。その後、16S rDNA sequence分析の結果から、*E. exiguum*は*Slakia exigua*として、また*E. lentum*は*Eggenhella lenta*として、各々異なる新しいgenusに移された。そして、1999年から今年にかけて、終末代謝産物を全く産生しない*Cryptobacterium*属(*C. curtum*)¹³⁾や、フェニール酢酸を唯一の終末代謝産物とし、アルギニン水解と硝酸塩還元が共に陰性を示す*Mogibacterium*属¹⁴⁾の2つの新しいAAGPRの細菌属が提案され、*M. pumilum*, *M. vescum*, *M. diversum*, *M. neglectum*の4菌種が登録された。また、これまでの*E. timidum*は、この新細菌属に移され*M. timidum*とされた。このように新しい培養技術を用いた最近の研究によって、これまで培養が困難であった多数のAAGPRが新菌属、新菌種として次々に報告されてきた。

5. 現在の分類

細菌の分類は新しい手法が導入され新しい知見が得られると、それに伴って変遷を繰り返してきた。従来、その形態観察や生化学的性状試験等の手法が、細菌分類の主流であったが、その後DNAを使った手法が本格的に導入され、種々の細菌群に於いてその分類が再検討された。特にDNA-DNA hybridizationや16SリボソームRNA(16S rRNA) gene sequenceなどを用いた分類法は、細菌の進化論的類縁性を指標にした優れた手法として認められている^{16,17)}。

現在知られているヒトの口腔から分離される主なAAGPRを、その特徴的な性状と共にTable 1に列挙した。これらの細菌種は、示した生化学的性状によって、細菌属(genus)レベルでの区別は概ね可能であるが、同一細菌属内を含め細菌種(species)レベルの判別は不可能である。これらAAGPRの細菌種の同定は、DNA-DNA homologyや16S rRNA gene sequence similarityなどの手法によって初めて可能になったものである。Fig.1は、主なAAGPRとその近縁の細菌種の16S rRNA gene sequenceを比較したphylogenetic分析によって、相互の遺伝学的類縁関係を示したものである。この進化論的系統樹は、これらのAAGPRが相互に異なった幾つかの遺伝学的clusterを形成することを示すと同時に、従来の*Eubacterium*属のtype speciesである*E. limosum*とは遺伝学的に大きく異なっていることから、現在*Eubacterium*属に分類されている多くのAAGPR

は、今後は新菌属を含めた他の細菌属に移される可能性が高いことを示している。

6. 検 出

前述のように、近年の研究で、種々の口腔疾患部位から、従来はその培養が困難であったAAGPRの新しい菌種が次々に検出されるようになった。しかし、その区別は従来の表現形質の比較では不可能であることから、これらの細菌群の検出・同定にはDNAレベルでの検討が必要であることが明らかにされた。

Satoらは、PCR法によって増幅した16S rDNAを制限酵素で切断した際に得られるその分布パターンの比較(PCR-RFLP法)によって、種々のAAGPRが容易に判別できることを報告している¹⁵⁾。一方、田村らは、軟化象牙質から分離され、これまで単一菌種とされてきた*Pseudoramibacter alactolyticus*(旧*Eubacterium alactolyticum*)には、PCR-RFLP法によって区別される3つのグループが存在することを明らかにしている。また橋村らは、16S rDNA sequenceを比較し、代表的なAAGPRである*S. exigua*, *M. timidum*, *E. saphenum*の3菌種について、それぞれの特異的配列に基づいたspecies specific primerを用い、臨床試料から直接これらの細菌種を検出することに成功している。

7. おわりに

AAGPRの多くは従来その培養が困難であったと同時に、その生化学的反応性に乏しいが故にその同定も困難であった。しかし、上記に示したようにDNAの増幅による遺伝情報の検索によって、それらAAGPRの検出及び同定が比較的容易になったことから、今後ヒト口腔内に於ける感染症病巣部位からのAAGPRの検出頻度は更に増加すると考えられる。現在、我々はこのAAGPRが口腔感染症に及ぼす病原性を解明すべく、本菌種の持つ種々の病原因子の同定を進めている。

参 考 文 献

- 1) Nakazawa, et al. J.Gen.Microbiol., 139:2635-2640, 1993.
- 2) Nakazawa, et al. Int.J.Syst. Bacteriol., 44:787-790,1994.
- 3) Spratt, et al. Oral Microbiol.Immunol., 14:56-59, 1999.
- 4) Hoshino, et al. J.Dent.Res., 64:1195-1198, 1985.
- 5) Hoshino, et al. Int.Endo.J., 25:2-5, 1992.
- 6) Ando et al. Int.Endo.J., 23:20-27, 1990.

- 7) Uematsu, et al. J.Periodont.Res., 27:15-19, 1992.
 8) 星野悦郎 他, 新潟歯学会雑誌22:1-14, 1992.
 9) Uematsu, et al. Int.J.Syst.Bacteriol., 43:302-304, 1993.
 10) Poco, et al. Int.J.Syst. Bacteriol., 46:31-34, 1996.
 11) Poco, et al. Int.J.Syst.Bacteriol., 46:1120-1124, 1996.
 12) Cheeseman, et al. Int.J.Syst.Bacteriol., 46:957-959, 1996.
 13) Nakazawa, et al. Int.J.Syst.Bacteriol., 49:1193-1200, 1999
 14) Nakazawa, et al. Int.J.Syst.Evol.Microbiol., 50:679-688, 2000.
 15) Sato, et al. Oral Microbiol.Immunol., 13:23-29, 1998.
 16) 中澤 太 他, 新潟歯学会雑誌25:61-61, 1995.
 17) Nakazawa, et al. Oral Microbiol. Immunol., 12:189-192, 1997.

Table 1: Comparison of Asaccharolytic Anaerobic Gram Positive Rods (AAGPR)

Taxon (1)	End products from PYG (2)	Arginine hydrolysis	Nitrate reduction	G + C %
<i>Mogibacterium diversum</i>	phe-a	-	-	42
<i>Mogibacterium neglectum</i>	phe-a	-	-	42
<i>Mogibacterium vescum</i>	phe-a	-	-	46
<i>Mogibacterium pumilum</i>	phe-a	-	-	46
<i>Mogibacterium timidum</i> (<i>Eubacterium timidum</i>)	phe-a	-	-	50
<i>Cryptobacterium curtum</i>	-	+	-	51
<i>Slakia exigua</i> (<i>Eubacterium exiguum</i>)	-	+	-	60
<i>Eggenhella lenta</i> (<i>Eubacterium lentum</i>)	-	+	+	62
<i>Eubacterium minutum</i>	B or b	-	-	38
<i>Eubacterium tardum</i>	B or b	-	-	45
<i>Eubacterium infirmum</i>	B or b	-	-	38
<i>Eubacterium nodatum</i>	a, B	+	-	41
<i>Eubacterium saphenum</i>	a, b	-	-	45
<i>Eubacterium brachy</i>	ib, ic, iv, phe-p	-	-	39

(1) Data of the type strains.

(2) a: acetate, b: butyrate, ib: isobutyrate, ic: isocaproate, iv: isovalerate, phe-a: phenylacetate, phe-p: phenylpropionate. Capital letters represent an amount of product equal or more than 10mM, and small letters represent less than 10mM.

Fig.1 Evolutionary tree based on 16S rRNA gene sequence comparison showing the phylogenetic position of oral Asaccharolytic Anaerobic Gram Positive Rods (AAGPR)

