

— 総 説 —

口腔 *Eubacterium*

星野悦郎	佐藤尚美	中澤太
上松弘幸	佐藤ミチ子	池田哲郎
栗原直美*	佐藤拓一**	佐藤牧子***

新潟大学歯学部口腔細菌学教室

*新潟大学歯学部歯科保存学第一教室

**新潟大学歯学部小児歯科学教室

***新潟大学歯学部歯科補綴学第一教室

Oral *Eubacterium*

Etsuro HOSHINO, Naomi SATO, Futoshi NAKAZAWA
 Hiroyuki UEMATSU, Michiko SATO, Tetsuro IKEDA
 Naomi KURIHARA*, Takuichi SATO**, Makiko SATO***

*Departments of Oral Microbiology,***Operative dentistry and Endodontics,****Pediatric Dentistry and*****Prosthetic Dentistry*

はじめに

偏性嫌気性菌取扱技術の進歩により、歯垢や歯周ポケット内容液中など、口腔の種々の場所の細菌叢には、従来報告されていた数以上の細菌が生息し、その大多数が偏性嫌気性菌であることが明らかとなり、グラム陽性桿菌、特に、*Eubacterium* 属の細菌の分離頻度が高まっている。

従来、口腔に生息する *Eubacterium* 属の研究は少なく、1980年頃までは、僅かに、近藤ら、Hoffman らによる *E. saburreum* についての研究が殆どで、その抗原の構造分析が中心であった¹⁻¹⁰⁾。最近、Hoshino¹¹⁾、Hoshino ら^{12,13)}、Ando & Hoshino¹⁴⁾は、歯垢やう蝕病巣^{11,12)}、初期歯髓病変部¹³⁾、

根管壁感染象牙質 (感染根管病巣)¹⁴⁾に生息する細菌の分析を行い、*Eubacterium* 属が主たる細菌属の1つである事を示し、う蝕やそれに続く歯髓病変、根管病変への関与を示唆している。また、Holdeman ら¹⁵⁾、Moore ら¹⁶⁻¹⁸⁾は、歯周病患者の歯周ポケットから多くの偏性嫌気性菌を分離し、歯周疾患の無い部位の細菌叢細菌との比較から、歯周疾患と *Eubacterium* 属の細菌との強い相関を示唆している。Uematsu & Hoshino¹⁹⁾は、従来の方法では検出困難な細菌が歯周ポケット内に多い事を示し、これらの多くが *Eubacterium* 属の細菌であったと報告している。以上のように、口腔の二大疾患であるう蝕と歯周疾患への *Eubacterium* の関与が示唆されている。

また、Holdeman や Moore ら¹⁶⁻¹⁸⁾、Hill ら²⁰⁾、Wade ら²¹⁾、Uematsu & Hoshino¹⁹⁾は、既存の菌種の特徴と合致しない新しいタイプの *Eubacterium* の分離を報告している。現在の *Eubacterium* 属の分類基準は、厳密さに欠け、性質の異なる雑多な細菌を含むと考えられ²²⁾、新しい分類基準が求められている。しかしながら、培養が難しく大量に菌体を得られない菌種では、菌体構成成分の分析や核酸の相同性などの、より精密な性状検査が困難な状況にあった。培養条件の改善と培養努力により、幾つかの菌種菌体が大量に得られるようになり、詳細な検査が進行している。

本総説では、口腔の種々の部位から検出される *Eubacterium* 属の細菌について、我々の研究を中心に述べると共に、それらの菌種の抗原としての特徴、更に分類学的問題点についても述べる。

(1) 偏性嫌気性菌に留意して再検討した口腔各部

の細菌叢の細菌構成と、そこに生育する *Eubacterium*

歯垢や歯周ポケットなど、口腔の種々の場所の細菌叢構成細菌の大多数は偏性嫌気性菌であり、空気に曝されると傷害を受けるものも多く、従来の方法では分離や同定が困難であったと思われる。したがって、従来の好気的な方法で検索した結果では不十分なため、偏性嫌気性菌に留意した方法によって再検討する必要性が生じていた。

本項では、偏性嫌気性菌に留意した方法によって調べた口腔各部の細菌叢構成細菌について述べる。偏性嫌気性菌に留意した実験方法として、1) 嫌気グローブボックス内で試料を採取する、あるいは、嫌気ガス噴射で作業を行うなど、できるだけ空気に曝さないように留意して試料を採取する。2) 採取した試料は、嫌気ガスの充満したスクリーブバイアル瓶に入れて輸送し、秤量後、できるだけ早く嫌気グローブボックス (AZ-HARD 型、平

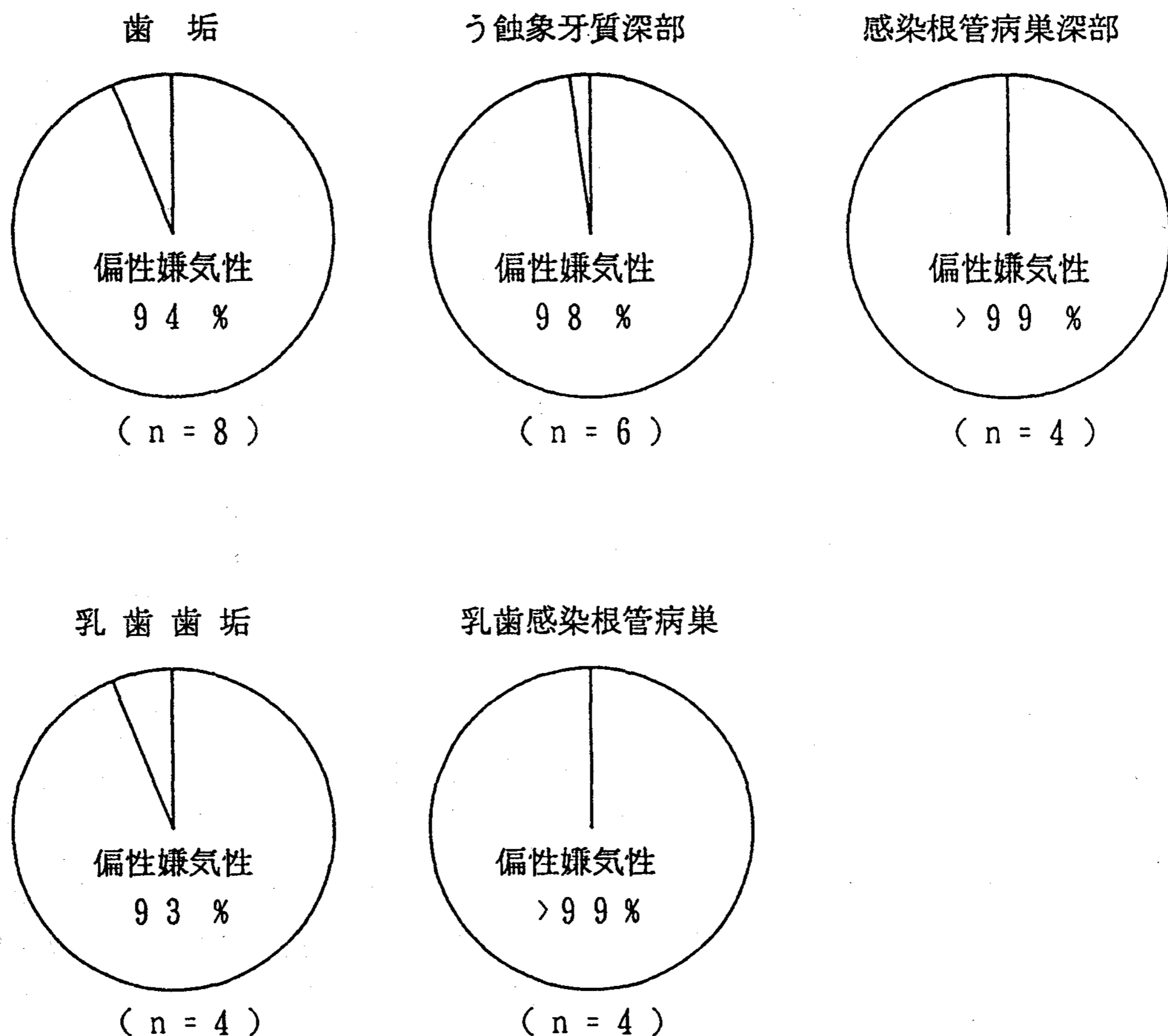


図1 新鮮分離時の嫌気性の細菌と好気性の細菌の割合

沢製、内部の気相は10%ずつの水素ガスと炭酸ガス、80%の窒素ガス)に搬入する。この際、還元処置をした輸送培地、輸送液の類は用いない。3) 培養に用いる培地は、予備実験で最も細菌回収の効率の良かった BHI-血液寒天平板²³⁾を用いた。また、4) 使用する緩衝液、培地類、実験器具類は、使用する前24時間以上嫌気箱に入れ、あらかじめ還元しておいたものを使用した。実験の詳細は、既述^{11-14, 19, 24-26)}の通りである。

口腔各部の細菌叢における

偏性嫌気性菌の占める割合

厳密な嫌気条件下での培養によって得られる試料中の細菌数は、試料中の偏性嫌気性菌と通性嫌気性菌の和として計算できる。一方、同一試料を好気培養して得られる細菌数は、通性嫌気性菌(あるいは通性好気性細菌)と偏性好気性菌の和であるが、口腔内には偏性好気性菌は殆ど生息していない事が分かっているため、好気培養による細菌は通性嫌気性菌と考えて良い。したがって、

嫌気培養による細菌数から好気培養による細菌数を差し引いた数は、偏性嫌気性菌数を示していると考えてよい。我々の実験の結果から、成人および小児の口腔各部(歯垢、う蝕病巣、根管壁感染象牙質病巣)の細菌叢細菌の新鮮分離時の偏性嫌気性の細菌の占める割合を求めると、図1に示したようになる。培養可能な細菌の圧倒的多数が、嫌気培養によってのみ生育可能で、試料採取部位で生育していた細菌の殆どが偏性嫌気性の細菌である事を示しており、その場が偏性嫌気性であった事を推定させる。新鮮分離時に偏性嫌気性を示す菌株の中には、培養を重ねたり、集団として接種されると、好气的環境で僅かに生育するようになる事がある。そこで本項では、「偏性嫌気性菌」を分離同定の過程で少なくとも3回以上嫌気条件でしか生育できない事を確認できたもの、という厳密な定義を用いる。口腔各部から採取した試料を適切に希釈し、嫌気培養によって得られたコロニー数が100以下となった血液寒天培地上の全コロニーを分離し、その部位で多数を占める優勢細

表1 口腔から分離される糖非分解性 *Eubacterium*

	<i>E. brachy</i>	<i>E. lentum</i>	<i>E. nodatum</i>	<i>E. timidum</i>	<i>E. U-group</i>
糖分解性	—	—	—	—	—
終末代謝産物* (PYGより)	ib, iv, ic phe-p	ナシ	a, B	phe-a	a, b
アルギニン分解	—	+	+	—	—
硝酸塩還元	—	+	—	—	—
エスクリン水解	—	—	—	—	—
ゲラチン水解	—	—	—	—	—

* a ; acetate b ; butyrate ib ; isobutyrate iv ; isovalerate ic ; isocaproate
phe-p ; phenyl propionate phe-a ; phenyl acetate

大文字は10mM以上を示す。

(*E. nodatum*と*E. U-group*株は互いにコロニーや細菌の形態が異なり、SDS-PAGE分布パターンも異なった。)

菌を得て、偏性嫌気性菌の占める割合を検索した結果を表2-10に示した。やはり圧倒的多数が偏性嫌気性菌である事が明らかとなっている。

口腔各部の細菌叢構成細菌について

偏性嫌気性菌に留意した実験による、天然歯上の自然歯垢、歯科材料に付着した歯垢、象牙質う蝕病巣、初期病変歯髄、乳歯及び永久歯の感染根管、歯周ポケット内容物、骨髄炎病巣、義歯床表面に付着した細菌叢、唾液等（引用文献11-14, 19, 24-26及び未発表データ）に生息する優勢菌の分析結果を表2-10に示したが、その圧倒的多数が、偏性嫌気性菌であることは前述の通りである。例えば、従来の好氣的な方法による歯垢の分析結果では、主に通性嫌気性の *Streptococcus*, *Actinomyces* で構成され、*Lactobacillus* はごく僅かであると考えられてきたが、分析方法の異なる我々の結果と比べる事はできない。我々の分析結果の特徴は、1) 口腔各部にみられる混合細菌叢構成細菌は、それぞれ多くの種類の菌属で構成されていた。2) 各々の菌属の占める割合は異なっていたが、構成する菌属は類似していた。3) 新鮮分離時に偏性嫌気性を示すものが、何れの場合でも圧倒的多数を占めていた。4) 偏性嫌気性の *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* を含む偏性嫌気性菌が、従来の方法による分析結果よりも多く分離された。これらの結果は、実験に当たって嫌気グローブボックスシステムを含む偏性嫌気性菌取扱技術によって厳密な嫌気条件を維持する事に留意した結果であると思われる。口腔の細菌叢細菌の中で、表2-10に示したように、*Eubacterium* 属の細菌は、優勢細菌属の一つとして検出された。

口腔各部の細菌叢に生育する

Eubacterium 属細菌菌種

Eubacterium の菌属 (Genus) は、産出する揮発性低級脂肪酸や有機酸などの種類と量によって同定され、またその菌種 (Species) は、種々の性状によって同定される (Bergey's manual²⁷, VPI manual²³)。しかしながら、既存の同定基準に合致しない菌種も多く、我々が新たに導入して

いる性状を含めて、その基準を表1に示した（上松ら、未発表データ）。

歯垢¹²の場合、総分離菌数584の内、前記の基準によって同定された *Eubacterium* 属の細菌は33株で、*E.aerofaciens*, *E.alactolyticum*, *E.brachy*, *E.lentum*, *E.limosum*, *E.nodatum*, *E.rectale*, *E.saburreum*, *E.timidum* であった (表2)。

う蝕象牙質病巣¹¹から分離された総菌数は、275で、*Eubacterium* は、51株分離され、*E.aerofaciens*, *E.alactolyticum*, *E.saburreum* であった (表3)。初期歯髄侵入細菌の場合¹³、総分離菌数が153株 (表4) で、そのうち *Eubacterium* が88株を占め

表2 歯垢の細菌構成¹²

分離菌数	584株(100%)
偏性嫌気性菌	420株(72%)
<i>Eubacterium</i>	33 (6%)
<i>E.aerofaciens</i>	4 (0.7%)
<i>E.alactolyticum</i>	1 (0.2%)
<i>E.brachy</i>	1 (0.2%)
<i>E.lentum</i>	2 (0.3%)
<i>E.limosum</i>	2 (0.3%)
<i>E.nodatum</i>	5 (0.9%)
<i>E.rectale</i>	6 (1%)
<i>E.saburreum</i>	11 (2%)
<i>E.timidum</i>	1 (0.2%)
<i>Actinomyces</i>	75 (13%)
<i>Lactobacillus</i>	53 (9%)
<i>Propionibacterium</i>	9 (2%)
<i>Peptostreptococcus</i>	35 (6%)
<i>Ruminococcus</i>	1 (0.2%)
<i>Streptococcus</i>	128 (22%)
<i>Veillonella</i>	36 (6%)
<i>Bacteroides</i>	26 (4%)
<i>Fusobacterium</i>	11 (2%)
<i>Leptotrichia</i>	4 (0.7%)
<i>Wolinella</i>	1 (0.2%)
<i>Clostridium</i>	2 (0.3%)
unidentified	6 (1%)
通気嫌気性菌	163株(28%)
<i>Actinomyces</i>	60 (10%)
<i>Bacterionema</i> (<i>Corynebacterium</i>)	2 (10%)
<i>Lactobacillus</i>	6 (1%)
<i>Rothia</i>	8 (1%)
<i>Staphylococcus</i>	3 (0.5%)
<i>Streptococcus</i>	79 (14%)
<i>Neisseria</i>	1 (0.2%)
<i>Actinobacillus</i>	4 (0.7%)
Unidentified	1株(0.2%)

表3 う蝕象牙質病巣の細菌構成¹¹

分離菌数	275株(100%)
偏性嫌気性菌	221株(80%)
<i>Eubacterium</i>	51 (19%)
<i>E. aerofaciens</i>	2 (0.7%)
<i>E. alactolyticum</i>	47 (17%)
<i>E. saburreum</i>	2 (0.7%)
<i>Actinomyces</i>	13 (5%)
<i>Bifidobacterium</i>	19 (7%)
<i>Lactobacillus</i>	26 (9%)
<i>Propionibacterium</i>	91 (33%)
<i>Peptostreptococcus</i>	10 (4%)
<i>Streptococcus</i>	2 (0.7%)
<i>Bacteroides</i>	2 (0.7%)
<i>Fusobacterium</i>	1 (0.4%)
<i>Clostridium</i>	4 (1.5%)
unidentified	2 (0.7%)
通气嫌気性菌	53株(19%)
<i>Actinomyces</i>	25 (9%)
<i>Lactobacillus</i>	17 (6%)
<i>Propionibacterium</i>	2 (0.7%)
<i>Rothia</i>	2 (0.7%)
G(+) cocci	7 (3%)
unidentified	1株(0.4%)

表5 感染根管象牙質病巣深部の細菌構成¹⁴

分離菌数	256株(100%)
偏性嫌気性菌	205株(80%)
<i>Eubacterium</i>	9 (4%)
<i>E. aerofaciens</i>	5 (2%)
<i>E. alactolyticum</i>	3 (1%)
<i>E. brachy</i>	1 (0.4%)
<i>Actinomyces</i>	4 (2%)
<i>Lactobacillus</i>	78 (30%)
<i>Propionibacterium</i>	23 (9%)
<i>Peptostreptococcus</i>	14 (5%)
<i>Ruminococcus</i>	11 (4%)
<i>Streptococcus</i>	34 (13%)
G(+) coccobacilli	19 (7%)
<i>Veillonella</i>	8 (3%)
<i>Acidaminococcus</i>	3 (1%)
<i>Clostridium</i>	2 (0.8%)
通气嫌気性菌	50株(20%)
<i>Actinomyces</i>	10 (4%)
<i>Lactobacillus</i>	10 (4%)
<i>Rothia</i>	3 (1%)
<i>Streptococcus</i>	11 (4%)
<i>Actinobacillus</i>	1 (0.4%)
<i>Corynebacterium</i>	15 (6%)
Lost	1株(0.4%)

表4 初期歯髓感染細菌¹³

分離菌数	153株(100%)
偏性嫌気性菌	141株(92%)
<i>Eubacterium</i>	88 (58%)
<i>E. lentum</i>	77 (50%)
<i>E. sp. (unidentified)</i>	11 (7%)
<i>Actinomyces</i>	18 (12%)
<i>Lactobacillus</i>	7 (5%)
<i>Propionibacterium</i>	20 (13%)
<i>Peptostreptococcus</i>	4 (3%)
<i>Veillonella</i>	3 (2%)
<i>Streptococcus</i>	1 (0.7%)
通气嫌気性菌	11株(7%)
<i>Actinomyces</i>	5 (3%)
<i>Lactobacillus</i>	1 (0.7%)
<i>Streptococcus</i>	5 (3%)
Lost	1株(0.7%)

表6 乳歯感染根管病巣の細菌構成

分離菌数	275株(100%)
偏性嫌気性菌	253株(92%)
<i>Eubacterium</i>	48 (17%)
<i>E. alactolyticum</i>	16 (6%)
<i>E. brachy</i>	4 (1%)
<i>E. lentum</i>	1 (0.4%)
<i>E. nodatum</i>	2 (0.7%)
<i>E. timidum</i>	1 (0.4%)
<i>E. sp. (unidentified)</i>	24 (9%)
<i>Propionibacterium</i>	24 (9%)
<i>Lactobacillus</i>	4 (1%)
<i>Bifidobacterium</i>	3 (1%)
<i>Actinomyces</i>	3 (1%)
<i>Peptostreptococcus</i>	63 (23%)
G(+) cocci	5 (2%)
<i>Fusobacterium</i>	37 (13%)
G(-) rods	2 (0.7%)
<i>Bacteroides</i>	1 (0.4%)
<i>Prevotella</i>	1 (0.4%)
<i>Veillonella</i>	2 (0.7%)
G(-) cocci	6 (2%)
unidentified	54 (20%)
通气嫌気性菌	21株(8%)
<i>Lactobacillus</i>	4 (1%)
G(+) rods	5 (2%)
<i>Enterococcus</i>	1 (0.4%)
unidentified	11 (4%)
Lost	1株(0.4%)

表7 下顎骨慢性骨髓炎病巣の細菌構成

分離菌数	113株(100%)
偏性嫌気性菌	96株(85%)
<i>Eubacterium</i>	20 (18%)
<i>E. brachy</i>	2 (2%)
<i>E. nodatum</i>	2 (2%)
<i>E. timidum</i>	16 (14%)
<i>Propionibacterium</i>	46 (41%)
<i>Lactobacillus</i>	11 (10%)
<i>Peptostreptococcus</i>	4 (4%)
<i>Streptococcus</i>	6 (5%)
<i>Bacteroides</i>	5 (4%)
<i>Selenomonas</i>	1 (0.9%)
<i>Wolinella</i>	2 (2%)
unidentified	1 (0.9%)
通气嫌気性菌	16株(15%)
<i>Actinomyces</i>	2 (2%)
<i>Propionibacterium</i>	1 (0.9%)
<i>Streptococcus</i>	12 (11%)
<i>Staphylococcus</i>	1 (0.9%)
Lost	1株(0.9%)

ていた。77株は *E. lentum* で、その他は菌種不明の11株であった。

感染根管病巣¹⁴⁾から分離された総菌数は、256で、*Eubacterium* は、9株分離され、これらは、*E. aerofaciens*、*E. alactolyticum*、*E. brachy*であった(表5)。乳歯の感染根管病巣(佐藤拓一ら、未発表)から分離された総菌数は275で、*Eubacterium* は、48株分離され、24株は *E. alactolyticum*、*E. brachy*、*E. lentum*、*E. nodatum*、*E. timidum* で、残り24株は菌種不明であった(表6)。

下顎骨慢性骨髓炎病巣(星野ら、未発表)からの総分離菌数は、113で、*Eubacterium* は、20株分離され、*E. brachy*、*E. nodatum*、*E. timidum* であった(表7)。

義歯床付着細菌叢²⁵⁾からの総計185株の分離菌のうち、*Eubacterium* は5株分離され、*E. lentum* であった(表8)。また、高齢無歯顎者の唾液(佐藤牧子ら、未発表)からの分離菌151株の内、*E. timidum* 株が1株検出されている(表9)。

成人性慢性辺縁性歯周炎^{19,24)}の歯周ポケット内容液からの総分離菌数は601株で、*Eubacterium* は

表8 義歯床付着細菌叢の細菌構成²⁵⁾

分離菌数	185株(100%)
偏性嫌気性菌	90株(49%)
<i>Eubacterium</i>	5 (3%)
<i>E. lentum</i>	5 (3%)
<i>Propionibacterium</i>	2 (1%)
<i>Lactobacillus</i>	10 (5%)
<i>Bifidobacterium</i>	14 (7%)
<i>Actinomyces</i>	9 (5%)
<i>Peptostreptococcus</i>	1 (0.5%)
<i>Ruminococcus</i>	1 (0.5%)
<i>Veillonella</i>	45 (23%)
unidentified	3 (2%)
通气嫌気性菌	95株(51%)
<i>Actinomyces</i>	3 (2%)
<i>Lactobacillus</i>	31 (16%)
<i>Streptococcus</i>	60 (31%)
<i>Staphylococcus</i>	1 (0.5%)

表9 高齢無歯顎者の唾液内細菌叢

分離菌数	151株(100%)
偏性嫌気性菌	43株(28%)
<i>Eubacterium</i>	1 (0.7%)
<i>E. timidum</i>	1 (0.7%)
<i>Actinomyces</i>	1 (0.7%)
<i>Lactobacillus</i>	1 (0.7%)
<i>Veillonella</i>	26 (17%)
<i>Prevotella</i>	7 (5%)
<i>Bacteroides</i>	1 (0.7%)
<i>Mitsuokella</i>	1 (0.7%)
<i>Anaerorhabdus</i>	1 (0.7%)
<i>Eikenella</i>	1 (0.7%)
<i>Fusobacterium</i>	1 (0.7%)
<i>Wollinella</i>	1 (0.7%)
unidentified	1 (0.7%)
通气嫌気性菌	99株(66%)
<i>Actinomyces</i>	20 (13%)
<i>Lactobacillus</i>	4 (3%)
<i>Propionibacterium</i>	3 (2%)
<i>Streptococcus</i>	51 (34%)
<i>Stomatococcus</i>	12 (8%)
<i>Enterococcus</i>	9 (6%)
Lost	9株(6%)

表10 成人慢性慢性辺縁性歯周炎の歯周ポケット内容液の細菌構成^{19,24}

分離菌数	601株(100%)
偏性嫌気性菌	523株(87%)
<i>Eubacterium</i>	292 (49%)
<i>E. alactolyticum</i>	51 (8%)
<i>E. brachy</i>	10 (2%)
<i>E. nodatum</i>	39 (6%)
<i>E. rectale</i>	1 (0.2%)
<i>E. timidum</i>	74 (12%)
<i>E. yurii</i>	1 (0.2%)
<i>E. U-group</i>	114 (19%)
<i>E. sp. (unidentified)</i>	2 (0.3%)
<i>Actinomyces</i>	4 (0.7%)
G(+) short rods	5 (0.8%)
<i>Peptostreptococcus</i>	37 (6%)
G(+) cocci	4 (0.7%)
<i>Veillonella</i>	3 (0.5%)
<i>Fusobacterium</i>	36 (6%)
<i>Prevotella</i>	11 (2%)
<i>Bactroides</i>	3 (0.5%)
<i>Selenomonas</i>	2 (0.3%)
<i>Wolinella</i>	52 (9%)
G(-) motile rods	41 (7%)
G(-) coccobacilli	1 (0.2%)
<i>Clostridium-like</i>	8 (1%)
unidentified	24 (4%)
通気嫌気性菌	45株(7%)
<i>Actinomyces</i>	28 (5%)
<i>Propionibacterium</i>	2 (0.3%)
<i>Streptococcus</i>	11 (2%)
<i>Actinobacillus</i>	1 (0.1%)
G(-) coccobacilli	2 (0.3%)
G(-) rods	1 (0.1%)
Unidentified G(-)Rods	6株(1%)
Lost	27株(5%)

292株分離された。290株は、*E. alactolyticum*, *E. brachy*, *E. nodatum*, *E. rectale*, *E. timidum*, *E. yurii*, *Eubacterium U-group* で、残り2株は菌種不明であった(表10)。

口腔各部で検出される *Eubacterium* 菌種を表11にまとめた。これらのうち、1)、2)、5)、7)、8)は、糖分解性であり、また、3)、4)、6)、9)、10)、11)、12)は、糖非分解性である。この性質と分離された部位の特徴との関連を考えると、軟組織に囲まれていたり、血液や血清などが供給される病巣(ここでは骨髓炎病巣、歯周ポケットが代表的なものであるが)からは、糖非分解性の *Eubacterium* 菌種が分離され、タンパク質やペプチドなどの分解によってエネルギーを得ているものと思われた。この結果は、Mooreらの歯周ポケットでの結果¹⁶⁻¹⁸⁾と一致している。一方、歯垢など外界からの糖の供給が多いと思われる部位では、糖分解性の菌種が多くみられた。また、う蝕象牙質には、感染根管壁の感染象牙質を含めて、*E. alactolyticum* が多くみられた。この結果はEdwardssonのう蝕象牙質での結果²⁸⁾と一致している。この理由の1つとして、う蝕の進行にともなって歯質内に侵入してくる乳酸を、エネルギー源として利用できる可能性がある。同様の性質を持つ *Propionibacterium* がう蝕象牙質に多い^{11,29)}のも事実である。

このように、部位によって検出される *Eubacterium* の菌種が異なり、その部位における疾患(硬組織病変としてのう蝕、軟組織炎症)の病的環境での

表11 口腔各部から検出される *Eubacterium* 菌種

	歯垢	う蝕象牙質	初期歯髓病変	永久歯感染根管	乳歯感染根管	下顎骨骨髓炎	義歯床附着歯垢	無歯顎者唾液	歯周ポケット
1) <i>E. aerofaciens</i>	+	+		+					
2) <i>E. alactolyticum</i>	+	+		+	+				+
3) <i>E. brachy</i>	+			+	+	+			+
4) <i>E. lentum</i>	+		+		+		+		
5) <i>E. limosum</i>	+								
6) <i>E. nodatum</i>	+				+	+			+
7) <i>E. rectale</i>	+								+
8) <i>E. saburreum</i>	+	+							
9) <i>E. timidum</i>	+				+	+		+	+
10) <i>E. yurii</i>									+
11) <i>E. U-group</i>									+
12) <i>E. sp. (unidentified)</i>			+		+				+

有機物質の供給状態、言い換えれば、細菌にとっての栄養補給に関連していると思われた。また、*Eubacterium* 属の細菌は、優勢菌の1つとしてその数が多いため、特に軟組織炎症病変部では、免疫反応の抗原としての役割が大きい。

(2) *Eubacterium* 属細菌菌種の抗原分析

軟組織炎症病変としての歯周疾患、あるいは根尖病変に、免疫反応が重要な役割を果たしている。本項では、口腔由来の *Eubacterium* の免疫学的活性を知るため、*Eubacterium* の細菌表面多糖質抗

原、および菌体タンパク質（ペプチド）性抗原を検索した結果をまとめた。

Eubacterium saburreum 菌体多糖質抗原の

化学構造の研究

本項は、新潟大学歯学部口腔細菌学前教授、故近藤 亘先生の指導によって行われた研究（引用文献1-8, 30-31及び未発表データ）をまとめたものである。

凍結乾燥菌体からホルムアミド抽出した、血清反応のそれぞれ異なる多糖質抗原の糖構成とその

図2 *Eubacterium saburreum* 多糖質抗原の構成糖の化学構造

Chemo group	Constituents	Sero type	Antigen Chemical Structure		
1	gal-hep O-acetyl	1	OM 		
		2	T17 		
		3	T27 		
2	gal-hep 6-deoxy-hep O-acetyl	4	OG 		
		5	O2 		
		6	S29 		
		7	T110 		
		3	gal-hep fucose O-acetyl	8	T21
				9	T15
				10	T19
4	galactose ribose dideoxy-hexose	11	V3 		
		12	KR 		
5	galactose rhamnose dideoxy-hexosamine	13	V5 		

構成糖の略号は表12の凡例及び本文参照。

多糖構造を分析したもので、口腔から分離する事のできる *E. saburreum* は13の血清型に分類された。その内、10の血清型は、独特な糖、D-glycero-D-galacto-heptose (hep と略称) を含んでいた。それぞれの血清型の多糖構造の基本的な繰り返し構造を図2に示した。これらの化学構造は、ガスクロマトグラフィー、ガスマススペクトロメトリー、MNR 等によって決定されたもので、hepのみから成る血清型1-3型 (chemo group 1)、6-deoxy-D-altro-heptose を含む4-8型 (chemo group 2)、fucose を含む9-10型 (chemo group 3) に大きく分ける事ができるものであった。一方、hep を含まない抗原 (11-13) のうち、11型は、9、10型と交叉反応し、共に fucose を含むので chemo group 3 に分類された。また、pentose、hexose を含む12型と、dideoxy-hexosamine を含む13型はそれぞれ異

なる chemo group に属すると考えられた。構成糖が同じ場合でもその環構造がピラノース型か、フラノース型か、あるいは側鎖にアセチル基が付いていた。すなわち、*E. saburreum* の多糖質抗原は、いくつかの特徴的な糖構造を持ち、それらが抗原に特異的な型特異性を付与していることが明らかになっている。しかしながら、抗原の化学構造が類似しているもの (同じ chemo group に属するもの) の間では、弱い交叉反応が見られることから、ある一つの抗原決定基に特異性を持つ抗体が、類似した構造を持つ他種の抗原決定基と弱い免疫反応を起こし得る事を示していた。

その他の口腔 Eubacterium の

細菌菌体表層の多糖質抗原構成成分

我々の研究結果として口腔から頻度高く検出される *Eubacterium* 菌種を、口腔 *Eubacterium* とし

表12 *Eubacterium* 多糖質抗原の構成糖

Strain	Sugar constituents ^a									
	Gly	Pen	Rha	Man	Gal	Glc	GlcN	GalN	FucN	U-P ^b
<i>E. aerofaciens</i>	-	+	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-
<i>E. lentum</i>	-	+	+++	-	+++	+	+	-	-	-
<i>E. alactolyticum</i>										
<i>E. yurii yurii</i>	-	+	+++	-	+	+	+	+	-	-
<i>E. yurii margaretae</i>	-	+	++	-	-	+	+	+	-	-
<i>E. limosum</i>	-	+	+++	-	-	+	+	+++	-	-
<i>E. rectale</i>	-	+	-	-	++	++	++	-	-	+++
<i>E. timidum</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>E. brachy</i>	++	+	-	++	+	+	+	-	-	+++
<i>E. nodatum</i>	++	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
<i>E. sp S-1</i>	-	+	+++	+	+	-	+	+	+	+
<i>E. sp J-92</i>	-	+	++	-	++	-	+	+	-	+
	Sugar constituents									
	Gly	Rib	Rha	Gal	6-H	Fuc	Man-H	Gal-H	GlcN	GalN
<i>E. saburreum</i> ATCC 33271	-	+	+++	++	-	-	++	++	++	++
<i>E. saburreum</i> ATCC 33318	-	++	+++	-	+++	-	++	+++	+	++
<i>E. saburreum</i> T15	-	++	+++	-	-	+++	++	+++	++	+++

^a: 略号

Gly, glycerol; Rha, rhamnose; Glc, glucose; Gal, galactose; Man, manose; GlcN, glucosamine; GalN, galactosamine; FucN, fucosamine; 6-H, 6-deoxy-D-altro-heptose; Fuc, D-fucose; Gal-H, D-glycero-D-galacto-heptose,

^b: 不明ピーク

て取り扱った。実験には、我々の研究室で歯垢、象牙質う蝕病巣、歯周ポケットなどから分離し保存している菌種と、ATCCから購入した対照菌種を用いた。

口腔の *Eubacterium* 菌属の各菌種が持つ特徴の1つとして、ホルムアミド抽出細菌菌体表層の多糖質抗原を構成する糖成分を分析した結果（佐藤尚美ら、未発表）を表12に示す。構成糖として、glycerol、pentose、rhamnose、galactose、glucose の中性糖、また、アミノ糖として、glucosamine、galactosamine、未同定の構成物（U：アミノ糖分析で galactosamine の近くにピークを持つ）が検出された（表12）。多糖質抗原を構成する糖成分では、*E. saburreum* に heptose を含有する特徴があり、他の菌種では、含有糖種に違いがあるが、菌種特異的な糖成分は無く、幾つかの糖の含有割合が異なっていた。このように、*E. saburreum* 以外の *Eubacterium* 菌属の抗原多糖の糖構成の菌種特異性は見られなかった。多糖質抗原は、特異抗体産生に作用するだけでなく、その性質から、ポリクロナール性の抗体産生、あるいは、過敏症関連の細胞性免疫にも関与していると考えられる。

口腔 *Eubacterium* の

菌体タンパク質（ペプチド）性抗原

口腔 *Eubacterium* 菌体から超音波処理をして得たタンパク質（ペプチド）性の抗原を SDS-電気泳動し、その泳動ペプチドバンドパターンを比

較したところ、主要なペプチドバンドの中に、口腔 *Eubacterium* 菌種に共通にバンドが見られなかった（中澤ら、未発表）。同種の菌種ではこのパターンが極めて類似している事が報告されており、また類縁の菌種間でも、共通のバンドが見られる事が多く、この結果は、口腔 *Eubacterium* の菌種同志が、近縁でない事を示唆していた。口腔 *Eubacterium* それぞれの菌種の菌体をウサギに免疫して得た抗体は、Western blot された電気泳動バンドの1部と反応し、これらのペプチドバンドが抗原能を持っていた（すなわち抗原決定基を含んでいた）が、それぞれの菌種特異抗体が反応するバンドの位置は、菌種によって異なっており、多分子としてのペプチドとして異なっているだけでなく、その立体的な構造あるいは抗原決定基としてのアミノ酸配列も菌種毎に異なっていることが予想された（表13、中澤ら、未発表）。

この抗原に反応する抗体が、歯周疾患の罹患患者から検出される。その反応は、歯周疾患罹患患者で高く、健康歯肉を持つ人で低い³²⁾。口腔 *Eubacterium* の菌種は、腸管の細菌叢の構成菌種でもあるので、*Bacteroides* などの細菌同様、健康歯肉の人でも腸炎等によって抗体値が上昇している事が有りうるが、この場合、健康人では、抗体値の上昇は見られなかった³²⁾。このように、歯周疾患では、口腔 *Eubacterium* の菌種が免疫反応を惹起しており、慢性炎症が病変の主体である根尖病巣等でもこれら口腔 *Eubacterium* の菌種の免疫反応が、病態に大きく関与している可能性が高い。

表13 口腔 *Eubacterium* の血清反応

anti-serum	a n t i g e n										
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
A : <i>E. aerofaciens</i> ATCC 25986	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B : <i>E. alactolyticum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C : <i>E. brachy</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	W
D : <i>E. lentum</i>	-	-	-	+	W	-	W	-	-	-	-
E : <i>E. limosum</i>	W	W	W	W	+	W	-	-	-	-	W
F : <i>E. nodatum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
G : <i>E. rectale</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	W	-
H : <i>E. saburreum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
I : <i>E. yurii</i> sp <i>margaretiae</i> ATCC 43714	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J : <i>E. yurii</i> sp <i>yurii</i> ATCC 43715	-	-	-	-	-	-	-	-	W	+	-
K : <i>E. timidum</i> ATCC 33092	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ : Positive W : Weakly Positive - : Negative

(3) 口腔に生息する *Eubacterium* 属細菌の分類学的考察

Eubacterium 菌属の分類学的問題点

Bergey's Manual²⁷⁾にも記載されているが、現在 *Eubacterium* 菌属の分類に用いられている基準は、VPI Manual²³⁾に記述されているもので、最終代謝産物の種類による。嫌気性のグラム陽性桿菌のうち、最終産物として、主にプロピオン酸を作る *Propionibacterium*、主に乳酸を作る *Lactobacillus*、コハク酸を作る *Actinomyces*、乳酸と酢酸を作る *Bifidobacterium* とは区別される細菌群で、酪酸、酢酸あるいはギ酸などを最終産物とする細菌群という、厳密さを欠く分類基準となっている。いわば、それぞれに分類されるグラム陽性の嫌気性桿菌を取り去った残りの細菌群である²²⁾。同様に嫌気性グラム陰性桿菌の分類学的な残り物のたまり場としての *Bacteroides* 属の細菌菌種は、その殆どが、新しく作られた菌属に再分類されている³³⁾。

Eubacterium 菌属の基準菌種は、現在、*E. limosum* が採用されている。しかし、この菌種は、1980年に細菌菌種に分類の見直しを行った時に制定されたもので、それ以前の基準菌種 *E. foedans* の対照株はすでに消滅してしまっている。同定の基準となる菌種が無くなってしまった訳で、その代わりに現在の基準菌株が考慮されているが、厳密な意

味で分類学的に問題を残している。

口腔 *Eubacterium* 属細菌菌種の DNA-GC含量

遺伝情報を担う DNA の GC 含量を分析した結果を表14に示す。類似した GC 含量を持つ菌株は、大まかに遺伝子が類似した菌株同志であることを示すため、分類の1つの基準として調べられる。GC 含量で、*Eubacterium* 菌属の菌種を、大きく幾つかのグループに分けることができた(表14、中澤ら、未発表)。

口腔 *Eubacterium* 属細菌菌種の DNA 相同性

細菌を菌属、菌種に分類する際に、細菌の持つ遺伝情報が近縁の細菌同志では類似性が高い事を利用し、DNA の塩基配列の相同性が調べられる。DNA 相同性を調べるために、多量の細菌菌体が必要となるが、従来、口腔 *Eubacterium* 菌属の幾つかの細菌の培養が困難であるため、菌体を多量に得る事ができず、口腔の *Eubacterium* 菌属の菌種間の DNA 相同性を調べた研究が見当たらなかったが、中澤ら(未発表)は、前記のような培養技術を用いて検討を行い、表15に示した結果を得た。同じ菌種の菌株同志、あるいは類似の菌種(亜種)の関係の菌株同志では、それぞれの高い DNA 相同性を示したが、菌種の異なる菌株では、いずれの菌種同志も相互にごく低い相同性を示したにすぎなかった。その相同性の低さは、菌属が異なる

表14 口腔 *Eubacterium* の GC 含量

GC%	
≒60	<i>E. lentum</i> ATCC 25559
	<i>E. alactolyticum</i> ATCC 23263
≒50	<i>E. aerofaciens</i> ATCC 25986
	<i>E. limosum</i> ATCC 8486
	<i>E. timidum</i> ATCC 33092
	<i>E. timidum</i> ATCC 33093
≒40	<i>E. nodatum</i> ATCC 33099
	<i>E. brachy</i> ATCC 33089
	<i>E. rectale</i> ATCC 33656
	<i>E. saburreum</i> ATCC 33318
	<i>E. saburreum</i> OM
	<i>E. yurii</i> sp <i>margaretiae</i> ATCC 43714
	<i>E. yurii</i> sp <i>yurii</i> ATCC 43715

表15 口腔 *Eubacterium* のDNA相同性

target DNA	probe DNA											
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
A : <i>E.aerofaciens</i> ATCC 25986	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B : <i>E.alactolyticum</i> ATCC 23263		++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C : <i>E.brachy</i> ATCC 33089			++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D : <i>E.lentum</i> ATCC 25559				++	-	-	-	-	-	-	-	-
E : <i>E.limosum</i> ATCC 8486					++	-	-	-	-	-	-	-
F : <i>E.nodatum</i> ATCC 33099						++	-	-	-	-	-	-
G : <i>E.rectale</i> ATCC 33656							++	-	-	-	-	-
H : <i>E.saburreum</i> ATCC 33318								++	-	-	-	-
I : <i>E.yurii sp margaretiae</i> ATCC 43714									++	+	-	-
J : <i>E.yurii sp yurii</i> ATCC 43715										++	-	-
K : <i>E.timidum</i> ATCC 33092											++	++
K : <i>E.timidum</i> ATCC 33093												++

- : <20% + : 70~90% ++ : >90%

菌株同志の間の違いのレベルであった(中澤ら、未発表)。この実験結果は、現在 *Eubacterium* と分類されている口腔 *Eubacterium* 菌属の多くの菌種が、*Eubacterium* 菌属の代表菌種である *E.limosum* と近縁の関係ではない事を意味しており、その他の性状の検査の結果と合わせて、口腔の *Eubacterium* 菌属の菌種の分類学的位置を再検討する必要がある。極めて近い将来、口腔の *Eubacterium* 菌属の菌種は、異なる細菌菌属の菌種に再分類される可能性が高い。

ま と め

口腔 *Eubacterium* は、現在のところ、口腔の細菌叢細菌の中では研究の進んでいない細菌菌属である。それは主に、偏性嫌気性の性質からくるもので、従来の好気的な方法では、検出される事が少なく、また、菌種によっては単に培養条件を嫌気にしただけでは増殖の悪いものがあり、したがって、詳細な研究が困難であった。

我々を含む研究グループによって種々の細菌学的培養技術の改善、改良が行われ、嫌気グローブボックスを含む偏性嫌気性菌取扱技術の確立によって、多くの *Eubacterium* 菌種、および多くの数の *Eubacterium* が検出されるようになった、また、実際に口腔 *Eubacterium* 菌種の持つ抗原に反応する抗体が、患者血清から検出され、この意味で、口腔の細菌性の疾患への関わりが確実視されるよ

うになった。非細菌性の炎症、外傷、装着物などの口腔内諸病変部、治療部位も、多数の細菌が生息している口腔環境に晒されるため、これらの細菌に影響される。この場合、その場で優勢な細菌群が最も強く関与する事が予想され、優勢菌である口腔 *Eubacterium* の関与が示唆される。特に、軟組織の炎症病変には、糖非分解性の菌種の関与が示唆され、象牙質う蝕や感染根管などではその他の糖分解性の菌種の関与も示唆される。

口腔の種々の病変に関与すると思われる *Eubacterium* 菌種であるが、その分類学的位置が不適切である事が明らかとなり、分類の再検討が必要となっている。

お わ り に

以上の研究成果は、文部省科学研究費の補助によって遂行することができた。その主なものを列記して(課題番号757218; 957221; 077143; 257451; 357535; 557417; 56570623; 57570651; 58570748; 59570764; 59570784; 59771286; 60440088; 61440076; 62771409; 01771462; 01790543; 02857285; 03404055; 04671093; 04807130; 04807150)、心から感謝したい。

文 献

- 1) 近藤 亘, 桶谷修三, 佐藤尚美: 人の歯垢から分離された沃度可染性線状菌の血清学的分

- 類. 歯基礎誌, **13**: 586—593, 1971.
- 2) Kondo, W., Sato, N. and Ito, T.: Chemical structure of the polysaccharide antigen of *Eubacterium saburreum*, strain 02. Carbohydr. Res., **70**: 117—123, 1979.
 - 3) Kondo, W., Nakazawa, F. and Ito, T.: Isolation and identification of 3, 6-dideoxy-3-(L-glyceroylamino)-D-glucose, a constituent of the antigenic polysaccharide of *Eubacterium saburreum*, strain V-5. Carbohydr. Res., **83**: 129—134, 1980.
 - 4) 佐藤尚美: *Eubacterium saburreum* T-110株の抗原多糖の構造について. 新潟歯誌, **10**: 10—22, 1980.
 - 5) Kondo, W., Nakazawa, F., Sato, M. and Ito, T.: Structural studies of the antigenic polysaccharide of *Eubacterium saburreum* strain S29. Carbohydr. Res., **97**: 279—283, 1981.
 - 6) 唐 福隆: *Eubacterium saburreum* T-21株の抗原多糖の構造に関する研究. 新潟歯誌, **12**: 15—28, 1982.
 - 7) Kondo, W., Nakazawa, F., Sato, M. and Ito, T.: Structural studies of the antigenic polysaccharide of *Eubacterium saburreum*, strain T-27. Carbohydr. Res., **117**: 125—131, 1983.
 - 8) Nakazawa, F.: Structural studies of the antigenic polysaccharide of *Eubacterium saburreum*, strain T17. Carbohydr. Res., **143**: 185—190, 1985.
 - 9) Hoffman, J., Lindberg, B., Svensson, S. and Hofstad, T.: Structure of the polysaccharide antigen of *Eubacterium saburreum*, strain L44. Carbohydr. Res., **35**: 49—53, 1974.
 - 10) Hoffman, J., Lindberg, B., Lönngren, J. and Hofstad, T.: Structural studies of the polysaccharide antigen of *Eubacterium saburreum*, strain L49. Carbohydr. Res., **47**: 261—267, 1976.
 - 11) Hoshino, E.: Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. J. Dent. Res., **64**: 1195—1198, 1985.
 - 12) Hoshino, E., Sato, M., Sasano, T. and Kota, K.: Characterization of bacterial deposits formed *in vivo* on hydrogen-ion-sensitive field-effect transistor electrodes and enamel surfaces. Jpn. J. Oral Biol., **31**: 102—106, 1989.
 - 13) Hoshino, E., Ando, N., Sato, M. and Kota, K.: Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. Int. Endo. J., **25**: 2—5, 1992.
 - 14) Ando, N. and Hoshino, E.: Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. Int. Endo. J., **23**: 20—27, 1990.
 - 15) Holdeman, L. V., Cato, E. P., Burmeister, J. A. and Moore, W. E. C.: Description of *Eubacterium timidum* sp. nov., *Eubacterium brachy* sp. nov., and *Eubacterium nodatum* sp. nov. isolated from human periodontitis. Int. J. Syst. Bacteriol., **30**: 163—169, 1980.
 - 16) Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Hash, D. E., Burmeister, J. A. and Ranney, R. R.: Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. Infect. Immun., **38**: 1137—1148, 1982.
 - 17) Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A. and Ranney, R. R.: Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. Infect. Immun., **42**: 510—515, 1983.
 - 18) Moore, W. E. C., Moore, L. H., Ranney, R. R., Smibert, R. M., Burmeister, J. A. and Schenkein, H. A.: The microflora of periodontal sites showing

- active destructive progression. J. Clin. Periodontol., **18**: 729-739, 1991.
- 19) Uematsu, H. and Hoshino, E.: Predominant obligate anaerobes in human periodontal pockets. J. Periodont. Res., **27**: 15-19, 1992.
- 20) Hill, G. B., Ayers, O. M. and Kohan, A. P.: Characteristics and sites of infections of *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium timidum*, *Eubacterium brachy* and other asaccharolytic *Eubacteria*. J. Clin. Microbiol., **25**: 1540-1545, 1987.
- 21) Wade, W. G., Slayne, M. A. and Aldred, M. J.: Comparison of identification methods for oral asaccharolytic *Eubacterium* species. J. Med. Microbiol., **33**: 239-242, 1990.
- 22) 星野悦郎: *Eubacterium*. 「歯学微生物学」口腔細菌学談話会(編), 267-269頁. 医歯薬出版, 東京, 1992.
- 23) Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. E. C. (eds): Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed. Blacksburg VA: Virginia Polytechnic Institute and State University, P. 1-152, 1977.
- 24) Hoshino, E., Sato, M., Uematsu, H. and Kota, K.: Bactericidal efficacy of metronidazol against bacteria of periodontal pockets *in vitro*. Jpn. J. Oral Biol., **33**: 463-468, 1991.
- 25) 星野悦郎, 佐藤ミチ子: 全部床義歯付着細菌叢の細菌構成. 補綴誌, **32**: 763-766, 1988.
- 26) Hoshino, E., Echigo, S., Yamada, T. and Teshima, T.: Isolation of *Propionibacterium acnes* from sclerosing osteomyelitis of mandibles. Jpn. J. Oral Biol., **26**: 306-309, 1984.
- 27) Moore, W. E. C. and Holdeman-Moore, L. V.: Genus *Eubacterium*. P. 1353-1373. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.
- 28) Edwardsson, S.: Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. Odont. Revy. **25** (Supp. 32): 1-143, 1974.
- 29) Hoshino, E., Horigome, T., Kagawa, R., Kaketa, A. and Okuda, R.: Characteristics of *Propionibacterium* and *Arachnia* isolated from carious dentine. Jpn. J. Oral Biol. **26**: 276-279, 1984.
- 30) Nakazawa, F., Ito, T., Sato, N., Sato, M. and Hoshino, E.: Chemical composition and immunological characterization of polysaccharide antigen from *Eubacterium saburreum* T18. Infect. Immun., **55**: 871-876, 1987.
- 31) Nakazawa, F. and Hoshino, E.: Immunological and structural characterization of the antigenic polysaccharide from *Eubacterium saburreum* T18. Oral Microbiol. Immunol., **7**: 182-186, 1992.
- 32) Nakazawa, F. and Hoshino, E.: Specific serological reactions of oral *Eubacterium*. J. Dent. Res. **68** (Special Issue): 878, 1989.
- 33) Shah, H. N. and Collins, D. M.: *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. Int. J. Syst. Bacteriol., **40**: 205-208, 1990.