

—原 著—

感染根管治療のための 各種市販細菌培養検査用生培地の検討

桐 生 尚 明 栗 原 直 美 日 向 俊 之
吉 羽 永 子 佐々木 裕 道 佐 藤 郁 子
子 田 晃 一 岩 久 正 明 星 野 悦 郎*

新潟大学歯学部歯科保存学第一教室

(主任：岩久 正明 教授)

*新潟大学歯学部口腔細菌学教室

(主任：星野 悦郎 教授)

Evaluation of Various Tubed Media
for Efficient Bacteriological Examination in Endodontics

Takaaki KIRYU, Naomi KURIHARA, Toshiyuki HINATA,
Nagako YOSHIBA, Hiromichi SASAKI, Ikuko SATO, Kohichi KOTA,
Masaaki IWAKU and Etsuro HOSHINO*

*Department of Operative Dentistry and Endodontics, Niigata University School of Dentistry
(Chief: Prof. Masaaki IWAKU)*

**Department of Oral Microbiology, Niigata University School of Dentistry
(Chief: Prof. Etsuro HOSHINO)*

Key Words : 感染根管、細菌培養検査、市販生培地、培養能力、好気培養

Abstract

For efficient bacteriological examination in endodontics, 7 kinds of tubed media on market, i. e., Schaedler broth with vitamin K₁ and hemin (SD, Becton Dickinson), Trypticase soy broth (TSB, Becton Dickinson), Cystine trypticase agar medium (CTA-B, Becton Dickinson), Cystine trypticase agar medium (CTA-E, Eiken), Kyokuto HK

semi-solid medium (HK, Kyokuto), Pladia medium (PLAD, Showa), and Thioglycolate medium were tested. Samples were taken from endodontic lesions of 10 freshly extracted teeth, and cultured at 37°C for 2 and 7 days under aerobic conditions. Brain heart infusion medium with 4% bovine serum (BHI-Serum), which had revealed the most efficient bacterial recovery, was used as media for comparing the results.

Among the tubed media tested, bacteria of endodontic lesions were most efficiently recovered in HK, SD, PLAD, and TSB. Moreover HK contained 0.15% agar and thus bacterial growth can be judged easily. In addition, SD and TSB were evaluated to be easy to operate by 15 clinicians.

In this study, it was concluded that HK was the most efficient among the media tested under aerobic condition.

要 旨

歯内療法における細菌検査用培地として、感染根管病巣細菌の回収率の良好な培地を究明する目的で、各種市販生培地についてその培養能力を比較検討した。

検討した培地は、日本ベクトン・ディッキンソン社製 K₁H シェドラーブロス (SD)、トリプチケースソイブロス (TSB)、CTA 培地 (CTA-B)、栄研化学製 CTA 培地 (CTA-E)、極東製薬製 HK 半流動培地 (HK)、昭和薬品化工製 PLADIA (PLAD) である。また、本学付属病院保存科外来及び総合診療室において従来使用されていた粉末を調製して作製したチオグリコレート培地 (TG) についても検討した。尚、それらの培養能力について、当教室の安藤らが感染根管病巣の細菌の検出に適した培地を検討した研究で、最も優れた培養能力を示した BHI 血清加培地と比較検討した。

培養結果は、HK、SD、PLAD、TSB の4種の培地では、従来使用していた TG とほぼ同等かそれ以上の菌の生育が認められた。培養結果判定の容易性では、HK と TG は半流動培地のため菌が沈澱せず、臨床家が外来で肉眼で判定するために容易であると考えられるが、SD と TSB は液体培地のため菌が沈澱し、判定がやや困難であると思われた。

次に、臨床上の操作性について、当教室の医局員15人に通常の臨床使用での判定を依頼し、そのアンケート結果から、SD と TSB が従来の TG と同様に臨床操作性が優れているという結果が得

られた。

今回の検討結果では、HK が培養能力について最も良好な成績を示した。

緒 言

感染根管治療の根管充填時期判定には、最も客観的な方法として、一般に細菌培養検査が実施されている。安藤らは感染根管に存在する細菌の多くが偏性嫌気性菌であり¹⁾、これらの細菌は従来の好気培養法では生育せず、嫌氣的培養が有効であり、半流動培地として BHI 血清加培地が最も適していると報告している²⁾。しかしながら、これを一般臨床で用いるには、培地の保管性の改善や簡便な嫌気培養装置の考案など、なお検討すべき多くの問題がある。そこで、本研究では、臨床理想的な嫌気培養システムが確立されるまでの期間、暫間的に臨床で用いられる比較的培養能力の優れた培地を選択するために、各種市販生培地についてその培養能力を検討した。

材料および方法

検討した生培地は、表1に示すように、日本ベクトン・ディッキンソン社製の K₁H シェドラーブロス (SD)、トリプチケースソイブロス (TSB)、CTA 培地 (CTA-B)、栄研化学製の CTA 培地 (CTA-E)、極東製薬製の HK 半流動培地 (HK)、及び昭和薬品化工製の PLADIA (PLAD) である。また、本学付属病院保存科外来及び総合診療室において従来使用されていた粉末を調製して作製したチオグリコレート培地 (TG) についても検討した。なお、従来筆者らの研究で最も優

表1 検討した各種生培地

培 地	略 号	製 造 会 社
K ₁ H シェドラーブロス	SD	日本ベクトンディッキンソン
トリプチケースソイブロス	TSB	日本ベクトンディッキンソン
CTA 培地	CTA-B	日本ベクトンディッキンソン
CTA 培地	CTA-E	栄研化学
極東HK半流動培地	HK	極東製薬
プラディア	PLAD	昭和薬品化工
チオグリコレート培地	TG	日水製薬
BHI 血清加培地	BHI-S	自家処方

表2 各種生培地の保管条件と有効期間

培地	保管条件	有効期間
SD	2~8℃	約8ヶ月*
TSB	2~25℃	約18ヶ月*
CTA-B	2~8℃	約8ヶ月*
CTA-E	2~10℃	4ヶ月**
HK	遮光室温保存	6ヶ月**
PLAD	記載なし	記載なし

*: 有効期限はラベルに記載 **: 有効期限はパッケージに記載

表3 各種生培地の容器のサイズ

培地	直径	全長	蓋の長さ	液層までの距離
SD	28	102	16	46
TSB	28	102	16	61
CTA-B	28	102	16	46
CTA-E	16	96	24	59
HK	16	137	22	43
PLAD	10	55	20	23

単位 mm

表4 各種生培地の寒天の含有量

培地	寒天の含有量 (%)
SD	0
TSB	0
CTA-B	0.25
CTA-E	0.25
HK	0.15
PLAD (寒天+塩化ナトリウムなど)	0.8

れた培養能力を示した BHI 血清加培地を比較培地とした。

各種培地のメーカー指定の保管方法および有効期間は、表2に示した。TSBとHKは室温にて保管可能であり、その他のものは冷蔵を要する。PLADは保管方法について記載がなかった。また、SDとCTA-Bは使用前に、キャップを弛め沸騰水で5-10分間煮沸し脱気するよう指示があった。

市販品として供給される容器の大きさは表3に示す通りで、SD、TSBおよびCTA-Bは、製造会社が同じため同じ底の平らのスクリーチューブ型容器、CTA-Eは小型の、HKは細長いスクリーチューブ型容器、PLADは小型のアンプル型容器となっている。

各種培地の寒天含有量は表4に示される。SDとTSBは寒天が含まれていない液体培地であり、HKは半流動性で、CTA-BならびにCTA-Eは寒天濃度が一番高く流動性がほとんどない。なお、PLADについては寒天+塩化ナトリウムなどで0.8%と報告されており、正確な寒天濃度の記載はなかった。

細菌学的試験(図1)

感染根管を有する新鮮抜去歯の根管内容物と根管壁象牙質の混合物を嫌気箱³⁾中で採取し、1mlの40mMリン酸緩衝液中で電動ホモジナイザーで均一化し、その10μlをペーパーポイントに吸収させて各種培地に投入した。また、この原液の10倍連続希釈を行い、原液及び希釈液のそれぞれ10μlを各種培地へ接種した。ペーパーポイントの投入と菌液の接種は、市販の培地の場合は嫌気箱の外で実際に即したやり方として好气的に行い、一方、比較培地として用いたBHI-Sでは嫌気箱中で行った。また、無菌操作の確認のため陰性コントロールとして滅菌生理食塩水を前記の操作を経て全培地に接種した。培養は、市販の培地は37℃大気中で、またBHI-Sは嫌気箱中で行い、2日後と7日後に判定を行った。

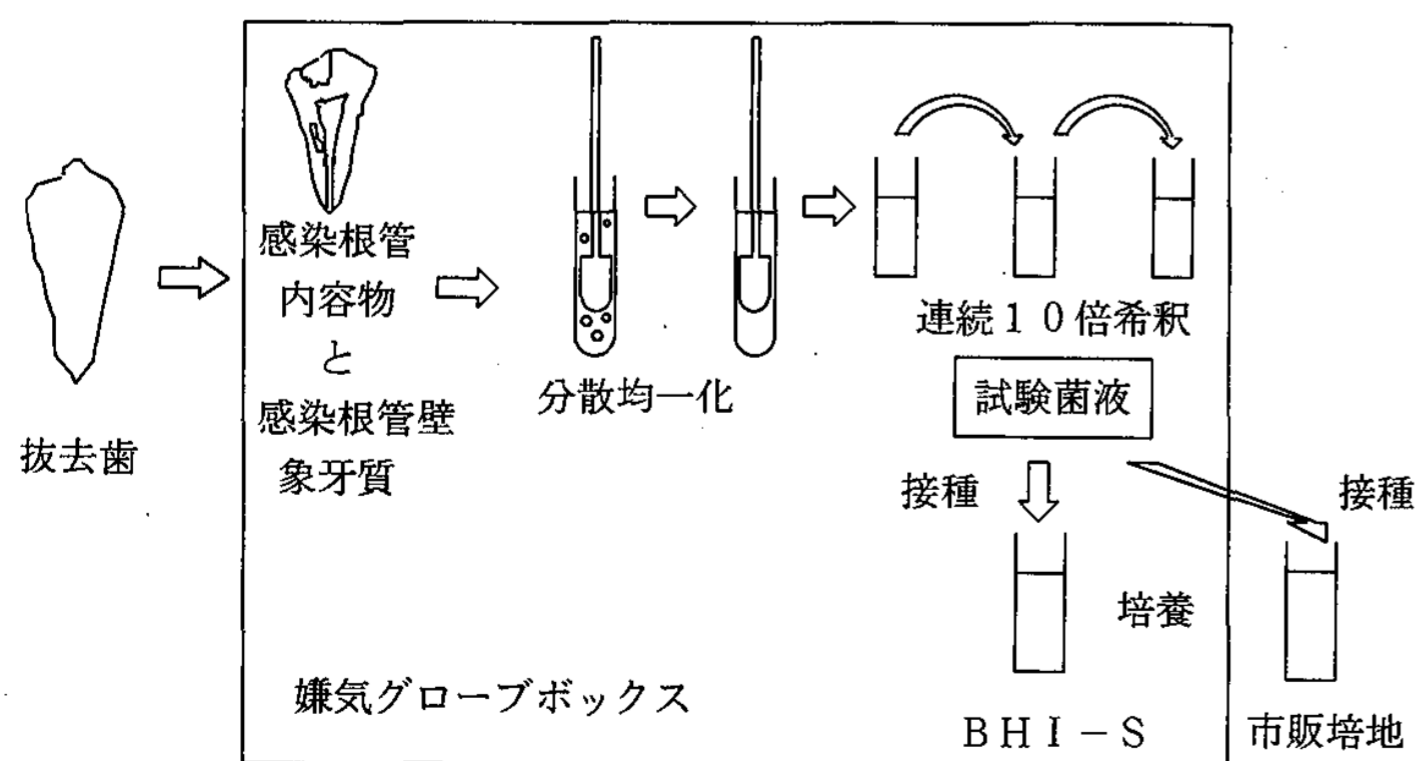


図1 試験菌液の調製と各種培地への接種

図1 試験菌液の調製と各種培地への接種

表5 細菌培養試験の結果(ペーパーポイント): 培養期間2日

培地 \ 菌液	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	CONTROL(-)
SD	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
TSB	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
CTA-B	-	±	+	-	-	-	-	±	+	+	-
CTA-E	±	+	+	±	-	+	+	+	+	+	-
HK	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PLAD	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
TG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHI-S*	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

±: 菌の生育が乏しく判定が困難であったことを示す
*: 嫌氣的に培養し細菌の存在の確認に使用した

表6 細菌培養試験の結果(ペーパーポイント): 培養期間7日

培地 \ 菌液	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	CONTROL(-)
SD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
TSB	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
CTA-B	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
CTA-E	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
HK	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PLAD	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
TG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHI-S*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

±: 菌の生育が乏しく判定が困難であったことを示す
*: 嫌氣的に培養し細菌の存在の確認に使用した

表7 細菌培養試験の結果(10μl 接種例): 培養期間2日

培地 \ 菌液	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	CONTROL(-)
SD	3	3	3	3	-	2	3	3	2	3	-
TSB	3	3	3	3	-	1	3	3	2	3	-
CTA-B	0	1	0	-	-	0	1	-	0	-	-
CTA-E	2	2	1	-	-	1	3	3	1	3	-
HK	3	3	3	3	1	3	3	3	2	3	-
PLAD	1	3	3	3	0	2	3	3	2	3	-
TG	2	3	3	2	1	2	3	3	2	3	-
BHI-S*	3	3	3	3	2	2	3	3	2	2	-

0: 原液のみ 1: 10倍 2: 100倍 3: 1000倍希釈まで菌が生育した
小数字は菌の生育が乏しく判定が困難であったことを示す
*: 嫌氣的に培養し細菌の存在の確認に使用した

表8 細菌培養試験の結果(10μl 接種例): 培養期間7日

培地 \ 菌液	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	CONTROL(-)
SD	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	-
TSB	3	3	3	3	-	3	3	3	2	3	-
CTA-B	1	1	0	-	-	0	1	-	0	-	-
CTA-E	2	3	1	-	-	1	3	3	1	3	-
HK	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3	-
PLAD	3	3	3	3	0	2	3	3	2	3	-
TG	3	3	3	2	1	2	3	3	2	3	-
BHI-S*	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	-

0: 原液のみ 1: 10倍 2: 100倍 3: 1000倍希釈まで菌が生育した
小数字は菌の生育が乏しく判定が困難であったことを示す
*: 嫌氣的に培養し細菌の存在の確認に使用した

成 績

表5はペーパーポイント投入後2日間、表6は同7日間培養したものの成績を示す。±は生育が乏しく判定が困難であった例を示している。2日後では、HKとTGの菌の生育が最も良く、7日後では、SDも同等の培養結果を示した。

表7、表8は10μl 接種例の結果であり前者が2日間培養例で後者が7日間培養例である。数字は陽性を示した最大希釈倍数の指数を示している。なお、小数字は生育が乏しく判定が困難であった例である。

表7の2日後の培養結果では、HKとSDで従来使用していたTGと同等またはそれ以上の菌の生育が見られ、表8の7日間培養では、TSBとPLADもほぼ同等の菌の生育が認められた。PLADはスクリーキャップではないため密封性に欠け7日目には培地が2/3位に減少していた。

以上の結果をまとめると、HK、SD、PLAD、TSBでは従来使用していたTGとほぼ同等かそれ以上の菌の生育が認められた。

また、培養結果判定の容易性については、HKとTGは半流動培地のため菌が沈澱せず判定が容易であったが、SDとTSBは液体培地のため菌が沈澱してしまい、菌の発育が少ない時には、判定がやや困難であった。

次に歯科保存学第一教室の医局員15人に臨床で

表9 臨床操作性に関するアンケート結果

培地	TGと比較して		
	良い	同じ	悪い
SD	1	9	5
TSB	1	8	6
CTA-B	0	0	15
CTA-E	1	1	13
HK	1	2	12
PLAD	1	1	13

対象: 新潟大学歯学部歯科保存学第一教室員15人

行っているのと同様の技法でペーパーポイントを培地に投入させ、操作性についてアンケートを行った。その結果、表9に示すようにSDとTSBが従来のTGとほぼ同等の評価を得、他の4種は操作性が悪いという結果が得られた。その理由として、寒天を含まない液体培地であるSDとTSBでは、ペーパーポイントの培地内部への投入は容易であるが、CTA-B、CTA-Eなど寒天濃度の高い培地ではペーパーポイントの投入が困難であるということ、HKは半流動培地であるにもかかわらず筒の直径が小さく液面までの距離が長いこと投入しづらい、PLADはアンプルカット時破片が飛散りやすく、切り口に鋭利な部分ができ危険である、などであった。

考 察

6種類の市販生培地の中では、HKが最も多く細菌を生育させ、それについて、SD、TSB、PLADがほぼ同等の成績をおさめた。この理由としてHKは、キャップを開けるまで、培地が嫌気状態に保たれており、寒天を0.15%含み、かつ高層培地であるため培養中の培地内への酸素の浸透を遅らせ、低い酸化還元電位を保つのに役立っていたこと⁴⁾⁵⁾、添加物の種類が多く広範囲の細菌の生育を促進したこと、また半流動培地であるため判定が容易であったことなども考えられる。

また比較培地として用いたBHI-Sと比較しても細菌の生育状態に大きな差が見られなかった。この理由としては、第1に今回の細菌の採取部位が根管壁表層であり、好気培養を行ったHK中でも生育可能な細菌が試験菌液中に多数存在していたこと³⁾、第2にはBHI-Sが液体培地でHKの半流動培地に比べて判定がやや困難であったこと、第3に、細菌数が多い部位⁶⁾を採取したため発育の差が明確に出にくかったこと、などが考えられる。

また、SDの1例で2日後では陰性と思われたにもかかわらず、7日後には陽性となったものがあった。この理由としてSDは液体培地であり、接種した菌数が少ない場合には生育した菌が分散してしまい、肉眼で陽性と判定されるようになる

のに半流動培地より時間を要したものと思われる。またSundqvistら⁷⁾は発育の遅い嫌気性菌の中には、7日以上長期の培養が必要なものもあると述べており、菌によっては2日の培養では不十分であったのかも知れない。

今回の検討結果では、HKが最も良好な成績を示したが、安藤ら¹⁾の報告のように、根管清掃後にも残存しやすい根管壁象牙質深部の細菌叢は大気中では生育が困難な偏性嫌気性菌が圧倒的多数を占めていることを考慮すると、今後、特に偏性嫌気性菌についての培養能力を比較検討する必要があるものと考えられる。このため、一般臨床においても培養中の気相を嫌氣的に保つ簡便な培養装置の開発が必要であると思われる。

結 論

歯内療法に於ける細菌検査のための嫌気培養システムが確立されるまで暫間的に臨床で用いるための比較的有効な培地を究明する目的で、各種市販生培地についてその培養能力を比較検討した結果、以下の知見を得た。

1. ペーパーポイント投入例：2日後では、HKとTGの菌の生育が最も良く、7日後では、SDも同等の培養結果を示した。
2. 試験菌液10 μ l接種例：2日後の培養結果では、HKとSDで従来使用していたTGと同等またはそれ以上の菌の生育が見られ、7日間培養では、TSBとPLADもほぼ同等の菌の生育が認められた。
3. 培養結果をまとめると、HK、SD、PLAD、TSBでは従来使用していたTGとほぼ同等かそれ以上の菌の生育が認められた。
4. 培養結果判定の容易性については、HKとTGは半流動培地のため菌が沈澱せず判定が容易であったが、SDとTSBは液体培地のため菌が沈澱してしまい、菌の発育が少ない時には、判定がやや困難であった。
5. 歯科保存学第一教室の医局員15人に操作性に関するアンケートを行ったところ、SDとTSBが従来のTGとほぼ同等の操作性であり、他の4種はやや操作性に難があるという結果が得

られた。

今回の検討結果では、HK が最も良好な成績を示したが、今後、特に偏性嫌気性菌についての培養能力を比較検討する必要がある。このため、一般臨床においても培養中の気相を嫌氣的に保つ簡便な培養装置の開発が必要である。

文 献

- 1) Ando, N. and Hoshino, E.: Predominant obligate anaerobes invading into deep layers of root canal dentine. *Int. Endod. J.*, **23**: 20-27, 1990.
- 2) Ando, N., Hoshino, E., Sato, M., Kota, K. and Iwaku, M.: Culture conditions for efficient recovery of bacteria from infected dental root canals. *Jpn. J. Oral. Biol.*, **31**: 603-608, 1989.
- 3) Sundqvist, G.: Bacteriological studies of necrotic dental pulps. *Umeå University Odontological Dissertations. No. 7, P. 1-94, Umeå Sweden, 1976.*
- 4) 鈴木祥一郎, 上野一恵: 臨床嫌気性菌マニュアル. ニッスイライブラリーNo. **6**, 1-31頁, 日水製薬株式会社, 東京, 1979.
- 5) 赤塚清人, 大谷 昌: 臨床検査のための嫌気性細菌学. ニッスイライブラリーNo. **3**, 2-35頁, 日水製薬株式会社, 東京, 1978.
- 6) 平井久行, 小島寿雄, 見田美千代, 錦 和彦, 星川ますみ, 松本 開, 東堤 稔, 坂本雅子, 小野裕美, 恵比須繁之, 木村重信, 岡田 宏: 根管内細菌の病原的意義—感染象牙質の細菌学的検索. *日歯保誌*, **31**: 616-625, 1988.
- 7) Sundqvist, G., Johansson, E. and Sjögren. U.: Prevalence of black-pigmented Bacteroides species in root canal infections. *J. Endod.*, **15**: 13-19, 1989.