

偏性嫌気性の極めて強い細菌菌株の新しい培養条件について

歯学部 口腔細菌学講座 池田哲郎

1. はじめに

現在、歯科疾患として対策が急がされているものに歯周疾患が有ります、その病因に直接あるいは間接的に関与しているのが、歯周疾患の原因となる歯周ポケット中の優勢細菌、特に偏性嫌気性菌で、その種類は非常に多い。ところが、Eubacterium 菌種は偏性嫌気性の極めて強い細菌菌株であるため、その培養が難しく、従来の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状態にただけでは増殖の乏しい物があり、したがって、これまでは詳細な研究が困難でした。これらの増殖の乏しい細菌菌株の最適な培養条件を確立することが急務であり、そこで本研究では、偏性嫌気性の極めて強く、増殖の乏しい細菌菌株の新しい培養条件を確立することを目的とした。なおこの研究は平成7年度奨励研究(B)、及び平成8年度奨励研究(B)をもらって研究を行いました。

2. まず口腔細菌の関係について話を進めます。

①、これは、体に棲みつく細菌の数を示した物です。人は一生のほぼ百分の1にあたる期間を、全く無菌の状態に保護された母親の胎内で過ごします。しかし生まれるとすぐに微生物にさらされ、体の各部位で細菌が増殖を開始します、と同時に死ぬまで長い付き合いが始まります。

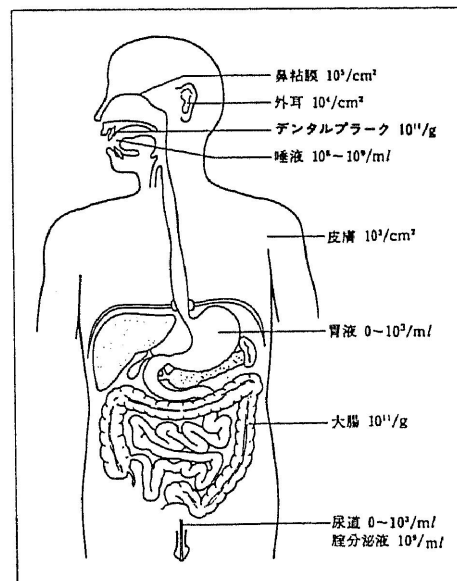


図.体に棲みつく細菌の数

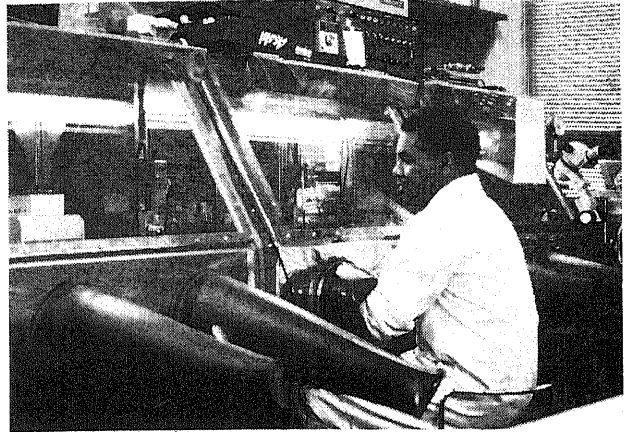
微生物と言うとすぐに悪いバイ菌ばかりを想像しがちですが、けっしてそうではありません。チーズやヨーグルトを作るのも細菌ですし皆さんの好きなビール、日本酒、ワイン等作るのも菌類です。細菌にも人にとって良い菌と悪い菌が有るのです。

結構体の色々の場所に住み着いています、(上から鼻粘膜 $10^5/cm^2$ 、外耳 $10^4/cm^2$ 、デンタルプラーク $10^{11}/g$ 、唾液 $10^8 \sim 10^9/ml$ 、皮膚 $10^3/cm^2$ 、胃液 $0 \sim 10^3/ml$ 、大腸 $10^{11}/g$ 、尿道 $0 \sim 10^3/ml$ 、腔分泌液 $10^9/ml$) その中でも口腔内と大腸が圧倒的に多く住み着いています。口腔内では400種類、 $10^{13 \sim 15}$ の細菌、大腸では100種類以上100兆個が住み着いています。嫌気性に留意した方法によるともっと多くの細菌を検出することができます。

②、嫌気性菌を取り扱う技術として確立されたものの一つとして嫌気グローボックスがあります。

これは完全に外部と密閉され、外気と遮断された実験機器で、内部を酸素がない状態にすることができ、嫌氣的に細菌を取り扱うことができます。嫌気ガスとして窒素80%、水素10%、炭酸ガス10%の混合ガスを使用している。内部には種々の実験機器、

培養フランクシー、冷蔵庫、などが設置されています。中に触媒を入れてあるので多少の酸素が入っても酸素と中の水素を反応させて水に変えてしまいます。嫌気度チェックとしてはレサズリン、メチルピオローゲンを使用しています。従来の炭酸ガス培養では培養が困難であった偏性嫌気性菌が培養できるようになってきました。



③、歯垢をグラム染色したものです、倍率は1,000倍です。

多くの種類の細菌が塊を作っています。青紫色に染まっている物を陽性、赤く染まっている物を陰性といいます。また楊枝の先にとれるほどの歯垢量（約1mg）で、 10^{10} （100億）個くらいの細菌が生息しています。これは地球の人口にひびつきますくらいの数です。

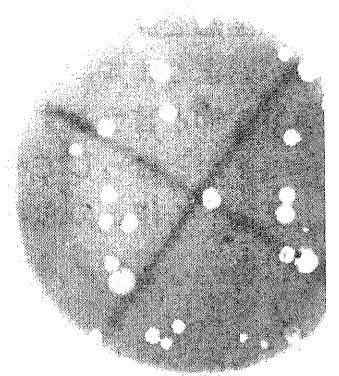
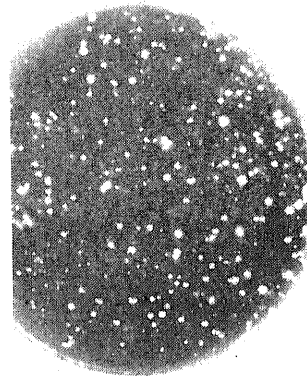


④、歯垢の嫌気培養と好気培養

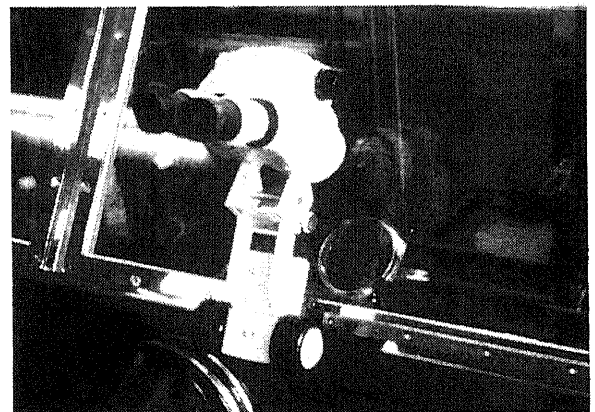
歯垢をホモジナイズして希釈して同じ試料を大気中と嫌気グローボックス中で培養したものです。好気（右側）より嫌気（左側）の方が1,000倍位コロニーが生育している。嫌気性菌が圧倒的多数を占めています。

嫌気培養

好気培養

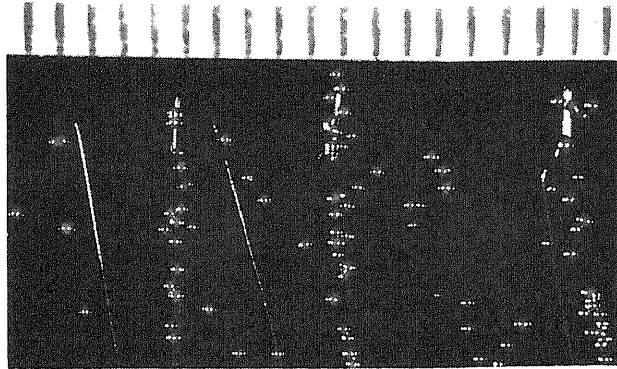


⑤、そのようなコロニーの一部をさらに実体顕微鏡で拡大してみると、目に見えるコロニーの周辺に極めて小さなコロニーが見られます。この様な小さなコロニーを一つ一つていねいに分離して行くと、大きさが0.5mm未満のコロニーの割合を示した物です。分離菌総数246中6%でした。大きさが0.5mm程度のコロニーの割合、分離菌総数246中33%でした。歯周ポケットから分離された細菌、7症例中、分離菌総数422中54%がEubacteriumでした。

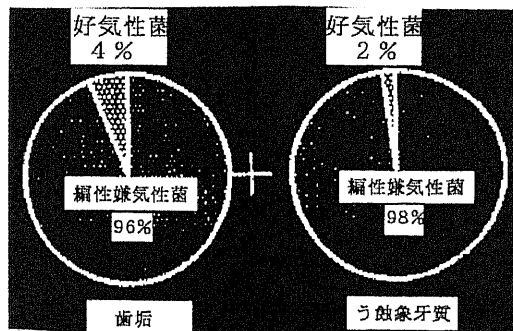


⑥、Eubacterium exiguum の BHI 血液寒天平板のコロニーです。

これは私たちの講座で新たに分離した新種の菌株の一つです、上にメジャーを置いてあります、コロニーは 0.3 mm 位しかならず普通は 2 ~ 3 mm 位になるので如何に小さくて培養が困難か分かります。

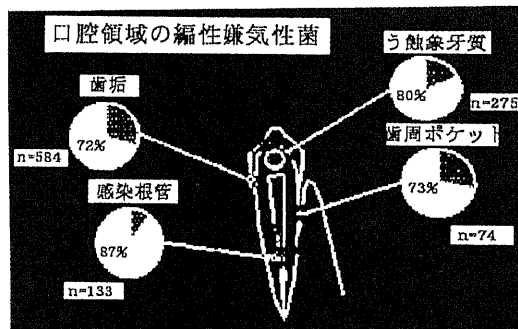


⑦、偏性嫌気性菌と好気性菌の割合は、
 (左側) 歯垢では 96% が偏性嫌気性菌、
 (右側) う蝕象牙質では 98% が偏性嫌気性菌でした。
 その種類も数百種の菌種が見られます。



⑧、口腔領域の偏性嫌気性菌を調べたものです。

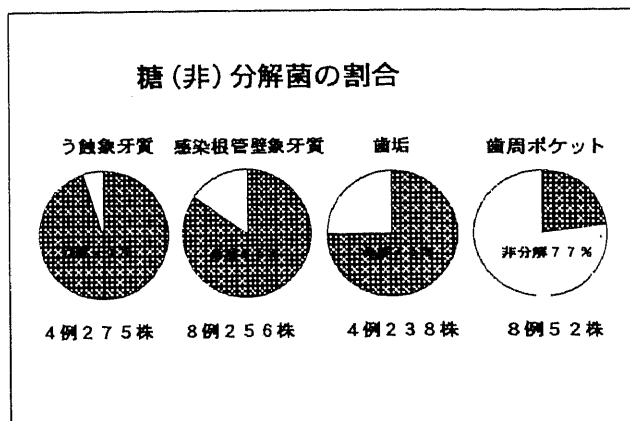
厳密な嫌気条件によって口腔各部の細菌叢の細菌構成を調べると、嫌気性菌が圧倒的多数を占めている。分離の初期には嫌気性を示しても、分離の途中で数回にわたって 30% の CO₂ を加えた大気中で培養した時にわずかでも生育するものも、通性嫌気性に分類しています。図の説明：(左上) 歯垢、(左下) 感染根管、(右上) う蝕象牙質、(右下) 歯周ポケットです、n というのは分離した細菌の数です。



⑨、糖(非)分解性菌の割合

口腔の細菌叢にしめる酸産生菌、齲蝕関連部位では、糖から酸を産生する菌種

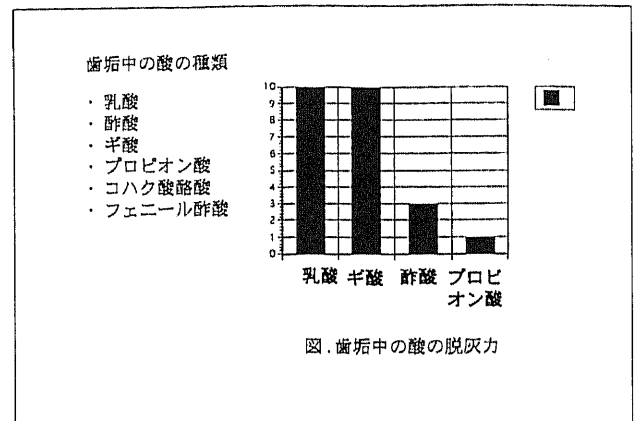
(糖分解菌) が圧倒的多数を占めるが、隔絶された空間(歯周ポケット内など)や軟組織の感染部位などでは糖非分解菌(アミノ酸を分解するものが多く、産物を産生するものが、同時にアルカリ性の産物も作るため環境の pH を下げないものが多い)が多くなる。



図の説明：(左から) 齲蝕象牙質、感染根管象牙質、歯垢、歯周ポケットです。

⑩、歯垢中の酸

歯垢細菌が作る酸の種類は、乳酸、酢酸、ギ酸が主で他にはプロピオン酸、コハク酸、酪酸、フェニール酢酸などです。脱灰力は（右側）の図に示したように乳酸、ギ酸を10とすると酢酸は3、プロピオン酸は1くらいです。



3、新しい培養条件まとめ

増殖の乏しい細菌菌株について、液体培地に各種のアミノ酸などを加え、培養条件の検索を行った。その結果、Aminopeptidase 活性が高い、口腔Eubacterium 菌種では、従来用いられているBHI+牛血清液体培地などと比較して、2%Trypton (Oxoid) + 1%Yeast extract + 0.3% Arginine という新しい組み合わせの、比較的シンプルな液体培地で、より効果的に増殖することが分かった。この培養方法を用いて集菌し、DNA-DNA hybridization の実験に用いた。

このように偏性嫌気性菌取り扱い技術の進展により、極めて多くの細菌を分離することができるようになってきています。

参考文献：

- 1) 中沢 太, 池田哲郎, 橋村剛志, 星野悦郎; 歯科基礎医学会雑誌: 新菌種Eubac. curtum 及び Eubac. pumilum. 1997.39.169
- 2) SERGIO E. POCO, JR., F. NAKAZAWA, T. IKEDA, M SATO, T. SATO, E. HOSHINO; Int.J.Syst. Bacteriol: Eubacterium exiguum sp. nov.isolated from human oral lesions . 1996.46.1120-1124
- 3) H. UEMATSU, F. NAKAZAWA, T. IKEDA, E. HOSHINO; Int. J. Syst. Bacteriology : Eubacterium saphenum sp.nov.isolsted from human periodontal pockets . 1993. 43. 302-304
- 4) 星野悦郎, 佐藤尚美, 中沢太, 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; 新潟歯学会雑誌: 口腔 Eubacterium. 1992. 22. 1-14