

〔総説〕

口腔内偏性嫌気性糖非分解性細菌 *Eubacterium*
その意義と展望

中澤 太, 鎌口 有秀, 宮川 博史

北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座

Anaerobic, asaccharolytic and gram-positive rods, *Eubacterium*, in oral cavity
Its significance and prospects

Futoshi NAKAZAWA, Arihide KAMAGUCHI and Hiroshi MIYAKAWA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Historically, it has been suggested for a long time that there are so many uncultured, undescribed and unknown bacterial species including VNC (viable but non-cultivable) in the human oral cavity, especially infectious lesions such as periodontal pockets. All these strains are asaccharolytic anaerobic gram-positive rods, and have been proven to be difficult to culture and unreactive in the conventional biochemical tests.

The molecular systematic techniques including 16S rRNA gene sequencing analysis and DNA-DNA hybridization method have demonstrated that they are mainly *Eubacterium* and/or the related bacteria with *Eubacterium*, phylogenetically. And recently, many novel bacterial genera and species, such as genus *Slackia*, *Eggerthella*, *Cryptobacterium* and *Mogibacterium*, have been proposed on the basis of phylogenetic data for these bacterial strains.

A complete description of the microbial flora associated with oral infections lead to the potential benefits for the elucidation of disease causation and also the development of novel diagnostic tools. In this paper, we summarize the recent knowledge of these bacteria species, and also discuss the etiologic roles of these bacteria in human oral infections.

キーワード：偏性嫌気性細菌, 糖非分解性細菌, 口腔内感染病巣, *Eubacterium*, 新細菌属種

1. はじめに

ヒトの口腔内には細菌の他, ウイルスや真菌, 更にはアメーバ様生物など, 多種多様の微生物が生存し, 解剖学的に複雑な口腔環境中で, 特有な微生物叢を構成している. その中でも細菌が最も多く, 350以上の菌種が生息していると考えられている. それらの細菌種の大部分は口腔内固有のもので, 健康な口腔環境を保つ働きをすると同時に, う蝕や歯周疾患を代表とする種々の口腔内感染症の成立と進行に重要な役割を果たしている.

歯肉溝, 歯肉縁上及び縁下部, 舌, 頬粘膜などの口腔内各部位で優勢に生息する細菌種は, 温度, pH, 水分

や栄養成分など種々の条件で規定されるが, 最も重要な要因は嫌気度と考えられている. その嫌気度の程度は酸化還元電位 (mV) によって示され, 通常の水道水の酸化還元電位は+600~+900mV程度で, ヒトの体液や臓器は+300~-500mVと言われている. ヒトの口腔内では, ブラッシング直後の歯面 (歯冠部) は+200mV程度であるが, その後すぐに好気性菌の付着, 次いで嫌気性菌の付着など歯垢の蓄積が始まり, その酸化還元電位は-200mV程度まで低下し, 急速に嫌气的環境になる. 更に, 重篤な歯周ポケットの深部では-400mVの極めて高度な嫌气的環境下にあることも知られている. 従って,

受付:平成17年10月

通常のヒトの口腔内は嫌気的条件下にあり、嫌気性細菌の生息に適した環境である。事実、酸化還元電位の極めて低い感染病巣深部では、偏性嫌気性細菌が圧倒的優位に生息していることが多数報告されている (Ando et al., 1990; Holdeman et al., 1980; Moore et al., 1983; 1991)。

一方、ヒト口腔内には、VNC (Viable but Non-Cultivable) 細菌を含め、これまでに同定されていない (未同定) 細菌や培養されていない (または培養が困難な) 細菌種が多数生息することが、長い間示唆されていた。そして近年、Pasterら (Paster et al., 2001) 及びKazorら (Kazor et al., 2003) は、16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法によって、ヒト口腔内には215~700種の細菌 phylo-type (発生学的系統型) が存在し、その約半数以上は、これまでに報告されていない細菌種であることを明らかにしている。

我々はこれまで、種々のヒト口腔内感染症の病巣から多数分離され、従来の方法では既存の何れの細菌種にも分類されない細菌群 (即ち、これまでに報告されていない細菌群) について、その形態学的、生化学的、免疫血清学的、分子遺伝学的性状を検討してきた。その結果、これらの細菌は何れも、極めて培養が難しい偏性嫌気性細菌であり、生育してもそのコロニーは小さく、産生する終末産物は僅かで、通常の生化学的性状検査においても殆ど反応性を示さない糖非分解性グラム陽性桿菌*Eubacterium*またはその近縁の細菌群であることを明らかにした。

本稿においては、我々のこれまでの研究結果を中心として、ヒト口腔内感染病巣に多数生息する偏性嫌気性糖非分解性*Eubacterium*とその近縁細菌種について、最新の知見を概説すると共に、口腔内感染症におけるこれらの細菌群の意義を考察する。

2. 嫌気性菌とは

地球誕生直後の無酸素状態での最初の生物が嫌気性菌だと考えられている。その後、地上における酸素の発生に伴い、微生物は酸素寛容性 (酸素耐性) を獲得しながら好気性菌の出現へと進化してきた。一般的に酸素の存在によって、 $\cdot\text{O}_2$ (スーパーオキシドラジカル)、 H_2O_2 (過酸化水素)、 $\cdot\text{OH}$ (ヒドロキシラジカル) などの活性酸素が生成する。これらの活性酸素は、微生物のDNAや膜に重大な損傷を与える。酸素の存在する環境下で、好気性菌は、スーパーオキシドジスムターゼ ($2 \cdot\text{O}_2 + 2 \text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$)、カタラーゼ ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)、パーオキシダーゼ ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RH}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{R}$) 等

の酵素を産生する能力を獲得し、活性酸素による細胞障害から免れる。しかし、一般的に嫌気性菌の多くはこのような酵素を産生する能力はなく (または弱い)、活性酸素による細胞障害を強く受ける結果となり、酸素の多い好气的条件下では生育することが困難になる。

ヒトの口腔内は嫌気的環境下にあり、嫌気性菌が多数生息することは、前述の通りであるが、これらの嫌気性菌の酸素寛容性には、菌種間で相当大きな差異がある。明確な境界はないが、極めて酸素寛容性が低い場合を偏性嫌気性菌と、また酸素寛容性が比較的強い場合を通性嫌気性菌と言う (偏性好気性菌は、ヒト口腔内では殆んどいない)。そのため、一般的にヒト口腔内の試料中の細菌を培養する場合、嫌気グローブボックス内で行う。この嫌気グローブボックス内は、窒素80%、水素10%、二酸化炭素10%の割合で構成された混合ガスで充満され、酸素の混入を防ぎ、その酸化還元電位は -400mV 程度に保たれている。この条件下では通性嫌気性菌と偏性嫌気性菌は生育するが、嫌気グローブボックスを使わない好気培養の場合は通性嫌気性菌のみが生育する。ヒト口腔内感染病巣深部には偏性嫌気性菌が多いため、試料の培養のみならず、分散、希釈、播種など試料の調整も、この嫌気グローブボックス内で行う必要がある。

3. *Eubacterium*属細菌とは

細菌分類のバイブルとも言える *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* では、*Eubacterium* 属細菌はその終末代謝産物によって定義されている (Moore et al., 1986)。即ち、*Actinomyces* 属 (主たる終末代謝産物がコハク酸)、*Bifidobacterium* 属 (主たる終末代謝産物が酢酸と乳酸)、*Lactobacillus* 属 (主たる終末代謝産物が乳酸)、*Propionibacterium* 属 (主たる終末代謝産物がプロピオン酸) 以外の細菌で、蟻酸、酢酸、酪酸を終末代謝産物とする偏性嫌気性グラム陽性桿菌を*Eubacterium* 属と分類している。これは極めて曖昧な分類基準であり、長い間、表現形質並びに系統発生が大きく異なる多種多様の細菌が、この*Eubacterium* 属細菌として混在している可能性が指摘されていた。

我々は、ヒト口腔から分離される代表的*Eubacterium* 属10菌種の菌体構成タンパク質や免疫血清学的特異性を、それぞれSDS-PAGE及びWestern Immunoblotting法を用いて比較検討した結果、それらの菌種間で極めて大きな相違 (表1) があることを明らかにした (Nakazawa et al., 1993)。また、遺伝情報を担う全DNAのG+C含量は、これら10菌種では39~61%の広範囲に分布し (表2)、*Eubacterium* 属の標準菌種 (type species) である*E.*

limosum の50%とは大きく異なっていた (Nakazawa et al., 1994). 更に, 遺伝学的類縁性を示すDNA-DNA hybridization法によるDNA homologyを検討した結果, これらの細菌種は相互に20%以下の低い値 (表2) を示し, 発生系統学的に大きな隔たりがあることを報告した (Nakazawa et al., 1994). これらの研究結果は, 従来からの指摘, 即ちこれまで*Eubacterium*属細菌として分類されてきた細菌種は極めて不統一な細菌群であることを科学的に明らかにするものであり, *Eubacterium*属細菌の再分類の必要性を裏付けている.

一方, ヒト口腔由来で, 従来は培養できなかつた (または培養が困難な) 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 (または無視されていた) 細菌, 更には従来の方法では同定できない細菌の中で, 最も多数を占めるものが偏性嫌気性糖非分解性グラム陽性桿菌であった. そして, 従来と同定基準に拠れば, その多くは*Eubacterium*属細菌種に分類されてしまい, 更に混乱を招く結果となる. 従って, 口腔内感染病巣に生息する細菌種を正しく理解するためには*Eubacterium*属細菌や, それに近縁する細菌群に対する妥当な定義及び分類基準を設定することが重要であると考えられる.

表1 Western immunoblotting法による血清反応

抗血清 (標準株)	抗原									
	<i>E. aer.</i>	<i>E. ala.</i>	<i>E. bra.</i>	<i>E. len.</i>	<i>E. lim.</i>	<i>E. nod.</i>	<i>E. rec.</i>	<i>E. sab.</i>	<i>E. tim.</i>	<i>E. yur.</i>
<i>E. aerofaciens</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. alactolyticum</i>	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. brachy</i>	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. lentum</i>	-	-	-	++	-	-	w	-	-	-
<i>E. limosum</i>	w	w	w	w	++	-	w	-	-	-
<i>E. nodatum</i>	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>E. rectale</i>	-	-	-	-	-	-	++	-	-	w
<i>E. saburreum</i>	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-
<i>E. timidum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
<i>E. yurii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++

抗血清: 全菌体で免疫したウサギ血清
 抗原: 全菌体を超音波処理した可溶性抗原
 ++: 強い陽性反応
 w: 弱い陽性反応
 -: 陰性反応

表2 G+C含量およびDNA相同性

ターゲットDNA (標準株)	G+C (mol%)	標識DNA									
		<i>E. aer.</i>	<i>E. ala.</i>	<i>E. bra.</i>	<i>E. len.</i>	<i>E. lim.</i>	<i>E. nod.</i>	<i>E. rec.</i>	<i>E. sab.</i>	<i>E. tim.</i>	<i>E. yur.</i>
<i>E. aerofaciens</i>	51	100	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<i>E. alactolyticum</i>	61		100	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<i>E. brachy</i>	39			100	<10	<10	<10	<10	16	12	<10
<i>E. lentum</i>	62				100	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<i>E. limosum</i>	50					100	<10	<10	<10	<10	<10
<i>E. nodatum</i>	41						100	<10	<10	<10	<10
<i>E. rectale</i>	38							100	<10	<10	<10
<i>E. saburreum</i>	41								100	<10	<10
<i>E. timidum</i>	50									100	<10
<i>E. yurii</i>	40										100

G+C: HPLC法
 相同性%: 同菌種の相同性を100%として算出

4. 遺伝学的性状による分類の意義

歴史的に細菌の分類や命名は, 新しい知見や手法の導入によって多くの変遷を繰り返してきた. 従来は, グラム染色性や菌体の形態, 培養条件や糖分解性, 病原性や産生酵素などの細菌学的, 生化学的性状によって分類されてきた. その後, 細菌の細胞壁, ペプチドグリカンやLPSの化学構造の相違, 免疫学的血清反応による違いなどの性状も加えられて, 発見される細菌種の増加に対応しながら, その分類が進められてきた. 1990年代初めに, 細菌の遺伝学的情報を用いた手法, 即ちゲノムDNAのG+C含量比やDNA-DNA hybridization法によるDNA相同性 (DNA homology), 16S rRNAの塩基配列による遺伝学的類縁性 (DNA similarity) 等が細菌の分類, 同定法として本格的に導入された. そして, 現在の細菌分類においては, 従来の変現形質と最近の遺伝学的情報を組み合わせた多相解析分類が中心になっている.

その中でも, 細菌の進化論的類縁関係を示す16S rRNA遺伝子をPCR法にて増幅し, そのDNAの塩基配列を解析する手法, 即ち16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法が決定的な役割を担い (Woese, 1987), これまでの細菌の分類は大きく様変わりした. 例えば, 50種以上の細菌種が列挙されていた*Bacteroides*属細菌は, 16S rRNA遺伝子塩基配列の違いによってその大部分が他の菌属 (*Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*属など) に移され (Paster et al., 1994), 現在では*B. fragilis*を標準菌種として僅か14菌種が残っているに過ぎない. また, 長い間その分類や名称が混乱していた*Streptococcus*属細菌 (Kawamura et al., 1998) も, 16S rRNA遺伝子塩基配列類縁性の違いから6群 (*pyogenic-*, *anginosus-*, *mutans-*, *mitis-*, *salivarius-*, *bovis-group*) に明確に分類され, それぞれの分類学的位置が確立された.

16S rRNA遺伝子は全ての細菌が保有し, 全長は僅か1,500bp程度と短く, その全塩基配列の解析は容易である. 現在, 約9割以上の細菌種の16S rRNA遺伝子塩基配列が解明され, GenBankなどに蓄積・公開されており, 細菌分類の重要なデータベースとなっている.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriologyは, 現在20年ぶりの大改訂作業が進んでいるが, その主要な分類基準として, 16S rRNA遺伝子クローンライブラリーデータを中心とした遺伝学的性状を採用することを, Editor-in-chiefであるDr. G. M. Garrityは明言している.

5. 新しい*Eubacterium*

従来, 糖非分解性*Eubacterium*属細菌種としては, *E. brachy*, *E. lentum*, *E. nodatum*, *E. timidum*の4菌種が知ら

れていた。1993年Uematsuらは、ヒトの菌周ポケットから分離した未同定の偏性嫌気性糖非分解性グラム陽性桿菌を*Eubacterium*の新しい細菌種*E. saphenum*として報告している (Uematsu et al., 1993)。本菌種は、*E. nodatum*と同様に酢酸及び酪酸を終末代謝産物とし、硝酸塩還元能を有さないが、アルギニン水解性を示し、その菌体構成タンパク質やG+C含量などにおいて、明らかに*E. nodatum*のそれらとは異なっていた。また、菌体由来全DNAを用いたDNA-DNA hybridization法により算出されるDNA homologyは、これまでの糖非分解性*Eubacterium* 4種の何れに対しても、10%以下の低い値を示すことを報告した。

1996年には、*Eubacterium*属の4つの新しい細菌種が、International Journal of Systematic Bacteriologyに一斉に報告された。Pocoらは、ヒトの菌周疾患病巣から得られたM-6, M-7, M-8の3株を*Eubacterium minutum* (Poco et al., 1996a)と、また、壊死歯髄や根尖病巣由来の5株を*Eubacterium exiguum* (Poco et al., 1996b)と、それぞれを新しい細菌種として報告している。厳密に管理された偏性嫌気性条件下で培養した場合、何れの菌種も生育が遅く、BHI血液寒天培地に出現するコロニーも極めて小さい偏性嫌気性糖非分解性グラム陽性桿菌である。*E. minutum*は終末代謝産物として僅かに酪酸を産生し、硝酸塩還元能及びアルギニン水解能は陰性を示す。一方、*E. exiguum*の終末代謝産物はガスクロマトグラフィーで検出できず、その硝酸塩還元能とアルギニン水解能はそれぞれ陰性及び陽性であると報告されている。また、*E. minutum*と*E. exiguum*のRapid ID32A API ZYM codeは、それぞれ“0000 0526 01”と“2000 0337 05”で、*E. brachy* (0000 4200 00), *E. lentum* (2000 1100 00), *E. nodatum* (0000 0100 00), *E. timidum* (0000 0040 00), *E. saphenum* (0000 0000 000)とは異なっていた。更にSDS-PAGE法による菌体構成タンパク質やWestern Immunoblotting法による免疫血清反応でも、これらの新しい細菌種は、既報のそれとは全く異なる分布を示していた。DNA homology解析の結果、2つの新菌種は従来の菌種に対して13%以下の低い相同性を示したが、*E. exiguum*のG+C含量は60~63%で、*E. lentum* (62%)同様、*Eubacterium*の標準細菌種*E. limosum*のそれ (50%)と、差異が認められた。

また、Cheesemanらは、歯周病患者の試料中から、これまでの報告には無い新しい細菌種を分離し、その16S rRNA塩基配列の解析から、*Eubacterium infirmum*と*Eubacterium tardum*の2菌種を提唱した (Cheeseman et al., 1996)。終末代謝産物として、*E. infirmum*は少量の

酢酸と酪酸を、*E. tardum*は酪酸のみを産生し、何れもアルギニン水解能は陰性で、16S rRNA塩基配列に基づくphylogenetic treeにおいて、それぞれ異なるクラスターを形成することを報告している。

これらの新しい細菌種は、独立して遂行された異なる研究機関からの発表であるが、*E. minutum*と*E. tardum*の記述が極めて類似していた。その後Wadeらは、*E. minutum*と*E. tardum*の標準株を用いて、同一の手法で終末代謝産物、構成タンパク質、Rapid ID 32A API ZYM code, G+C含量, 16S rRNA塩基配列, DNA-DNA homologyを解析した。その結果、この2菌種は全く同じであることが明らかとなり、*E. minutum*が優先権を持つと報告している (Wade et al., 1999a)。

6. *Eubacterium*近縁の新細菌属

Wadeらは、16S rRNA遺伝子塩基配列データベースを用いた広範な解析を行い、*E. exiguum*が発生遺伝学的に*Peptostreptococcus heliotrinireducens*と極めて近縁関係にあることを報告している。同時に*E. lentum*も、その2菌種とは異なるクラスターを形成しながらも、遺伝学的近縁関係にあることを明らかにし、それぞれを新しい細菌属及び細菌種として*Slackia exigua*, *Slackia heliotrinireducens*, *Eggerthella lenta*として再分類することを提唱した (Wade et al., 1999b)。これらの新細菌属*Slackia*属及び*Eggerthella*属は、同じく新設の細菌属*Coriobacterium*属や*Atopobium*属と共に*Coriobacteriaceae*科に含まれている。この再分類は、*E. exiguum*のG+C含量が60~63%で、*E. lentum*のそれが62%と、いずれも高い割合を示した我々の研究結果からも容易に予想された妥当な提案であった (Poco et al., 1996)。そして最近我々は、*S. exigua*, *S. heliotrinireducens*, *E. lenta*及び近縁の細菌種について、全ゲノムDNAを用いたDNA-DNA hybridization法により、相互のDNA相同性を解析し、Wadeらの細菌種の再分類が正当であることを明らかにした (Nakazawa et al., 2004)。

一方、Kageyamaらは、表現形質及び遺伝学的情報の詳細な解析から、*Eubacterium aerofaciens*を新細菌属*Collinsella*属の*C. aerofaciens*に変更すること (Kageyama et al., 1999a)、更に*E. lentum*の16S rRNA遺伝子塩基配列が*E. limosum* (*Eubacterium*属のtype species)のそれと著しく異なることから、*C. aerofaciens*や*Coriobacterium glomerans*, *Atopobium*属細菌に近縁の新しい細菌属に移すことを提唱している (Kageyama et al., 1999b)。この研究はWadeらとは全く独立して行われ、偶然にも1999年にInternational Journal of Systematic Bacteriology Vol. 49

に同時に掲載されている。

更に我々は、ヒト口腔内の種々の感染病巣から得られ、従来の細菌種のいずれにも同定されない10株 (D2-3, D2-18, D5-2: 歯周ポケット由来, KV43-B, P9 a-h, UJB13-d: 壊死歯髄由来, BA11a-f: 感染根管由来, HM-6, HM-7, HH-31: 舌垢由来) についてその同定と分類を試みた。これらの10株は何れも、その培養が難しく、生化学的性状検査における反応性が乏しい偏性嫌気性糖非分解性の桿菌である。

菌株によって差異はあるが、グラム染色した場合、いずれも培養時間によってグラム陰性化しやすい傾向が認められた。しかし、透過型電子顕微鏡による観察(図1)では全ての菌体が典型的なグラム陽性の細胞壁構造を有していることが確認された。これら10株について、構成タンパク質 (SDS-PAGE法)、免疫血清反応 (Western Immunoblotting法)、DNAのG+C含量 (高速液体クロマトグラフィー)、DNA相同性 (DNA-DNA hybridization法)、16S rRNA遺伝子類縁性 (塩基配列解析) を解析し、既に確立している他の標準株のそれらと比較検討した。その結果、これらの10株はこれまでに報告された細菌属とは全く異なる細菌であることが判明し、*Cryptobacterium*属と*Mogibacterium*属の2つの新しい細菌属を提案し、国際機関に登録した (Nakazawa et al., 1999; 2000)。終末代謝産物を全く産生しないD2-3とKV43-Bの2株は*Cryptobacterium curtum*に、フェニール酢酸を唯一の代謝産物とする*Mogibacterium*属は、更に*M. pumilum* (D2-18とBA11a-f株)、*M. ves-*

cum (D5-2株)、*M. diversum* (HM-6, HM-7, HH-31株)、*M. neglectum* (P9 a-h, UJB13-d株) の4菌種に分類されることを報告した。また16S rRNA遺伝子塩基配列類縁性から、これまで*Eubacterium timidum*に分類されていた細菌群は、この新細菌属*Mogibacterium*に移すことの妥当性を明らかにし、*M. timidum*として再分類した (Nakazawa et al., 2002)。

表3は、ヒトの口腔内で最も多く生息する偏性嫌気性糖非分解性グラム陽性桿菌5属 (それぞれtype species) の性状を比較したものである (従来の基準によれば、*Eubacterium*属のtype speciesは*E. limosum*であるが、*E. limosum*は糖分解性のため、表3では典型的な糖非分解性*Eubacterium*である*E. minutum*と比較した)。何れも殆んど生化学的性状を示さないが、終末代謝産物 (極少量)、アルギニン水解性、硝酸塩還元性において、僅かに差異が認められた。また、G+C含量は、*Eggerthella*属や*Slackia*属は高G+C% (約60%) である一方、*E. minutum*のそれは38%と著しく低く、中程度 (50%前後) の*Cryptobacterium*属や*Mogibacterium*属を含め広い範囲に分布していた。

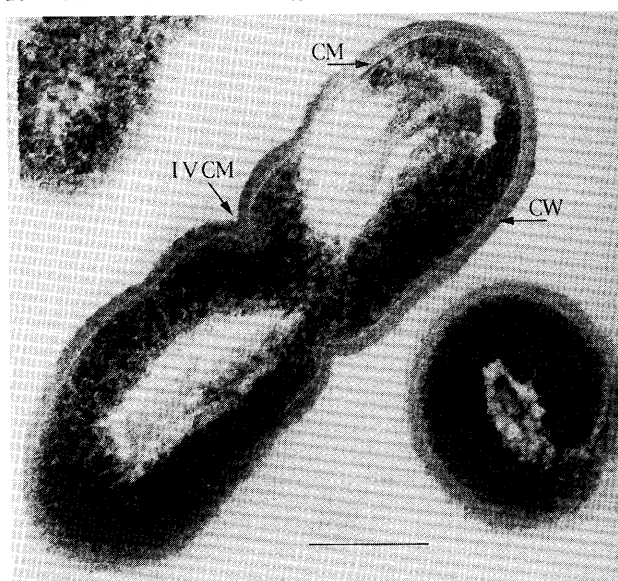
表3 ヒト口腔由来の偏性嫌気性糖非分解性グラム陽性桿菌の比較

属名	G+C含量%	代謝産物 ⁽¹⁾	アルギニン分解性	硝酸塩還元性
<i>Eggerthella</i>	62	無	+	+
<i>Slackia</i>	60	無	+	-
<i>Cryptobacterium</i>	51	無	+	-
<i>Mogibacterium</i>	46	フェニール酢酸	-	-
<i>Eubacterium minutum</i> ⁽²⁾	38	酪酸	-	-

(1): PYG液体培地

(2): 典型的糖非分解性*Eubacterium* (Type speciesは *E. limosum*)

図1 透過型電子顕微鏡による*Cryptobacterium curtum*の観察



CM: Cytoplasmic Membrane細胞質膜

CW: Cell Wall細胞壁

IVCM: Invagination of Cytoplasmic Membrane細胞陥没部細胞質膜

—: 100nm

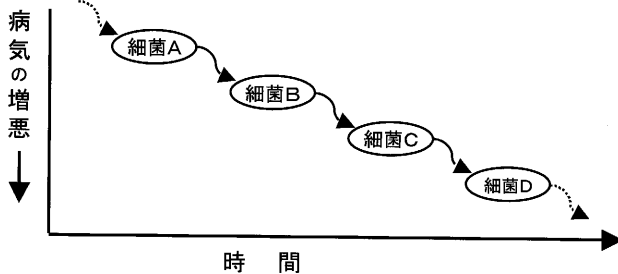
7. 口腔内感染症における意義と病原因子

う蝕及び歯周疾患など多くのヒト口腔内細菌性感染症の原因細菌については、必ずしもコッホの4原則 (Koch's postulate) が符号しない。種々の細菌種が相互に関連して感染が成立し、更に病気進行の過程で異なった細菌種が関与する複合的感染 (polymicrobial infections) と考えられる (図2)。このような感染症においては、どのような細菌が、進行過程のどの段階で生息し感染の増悪に関与するかを知ることは、原因解明の第一歩と言える。

これまで、歯周疾患の歯周ポケットやう蝕象牙質など、種々の口腔内感染病巣に存在する細菌構成については膨大な報告がある。1980年代において、幾つかのグラム陰性桿菌が歯周病患者の歯周ポケットで優勢に生息するという報告に端を発して、多くの研究者がそれらの細菌種の形態学的、生化学的、免疫学的研究を行い、様々の病原因子を明らかにしている (Nakazawa et

al., 1988; Zambon et al., 1988). また, う蝕誘発関連細菌としても, グラム陽性球菌を中心に多数の細菌種やその病原因子が報告されている。

図2 複数の細菌が関与する複合的感染



しかし, それらの研究は何れも容易に培養できる細菌種についての解析である. ヒト口腔内は嫌気的環境下であり, そこに生息する偏性嫌気性細菌には, これまでに同定, 培養されていない細菌種が多いことから, 口腔感染病巣における細菌構成の全容は未だ明らかになっていないと言える. 実際, 16S rRNA遺伝子中の特異的塩基配列から構成したprimerを用いたPCR法により, 種々の細菌の検出を検討したWilsonらは, ヒト口腔内感染病巣に生息する細菌の約50%は未知の菌種であると報告している (Wilson et al., 1997). また, 同様の方法を用いてSprattらは, 糖非分解性*Eubacterium*に類縁の偏性嫌気性細菌から約50ヶのPCR産物を解析している (Spratt et al., 1999). その結果, それらの細菌は遺伝学的に異なる4群に大別され, これまでに報告のない多くの菌種がヒト口腔内感染の進行に重要な役割を担っている可能性を示唆している。

このような事実から, 同定や培養は困難である (または培養出来ない) が, 実際の感染病巣に存在する細菌種を明らかにし, 次いで, その細菌が有する種々の病原因子を解明することは, 口腔感染症の発症と進行のメカニズムを解明し, 効果的治療及び予防法の確立のために不可欠であると考えられる。

一方, 種々の口腔内感染症と*Eubacterium*属との関連については多く報告がある. 特に歯周疾患においては, 1980年代から, *Eubacterium*属細菌が歯周疾患に重要な役割を果たしている研究結果が多数報告されている. 例えば, Tewら及びVincentらは, 重篤な急性進行性歯周炎患者の血清中では, 健常者のそれに比較して*E. brachy*や*E. nodatum*に対する抗体値が著しく高いと報告している (Tew et al., 1985; Vincent et al., 1986). また, 若年性歯周炎患者においては, *E. timidum*に対する高い血清抗体値が認められると同時に, その病巣部位の最も優勢な細菌種が*E. timidum*であると報告されている (Gunsolley et al., 1990).

またUematsuらは, 7名の進行した成人性歯周病患者の歯周ポケットの細菌叢について, 厳密に管理した偏性嫌気性条件下で試料の調整及び培養を行い, その細菌種の構成を詳細に検討している. その結果, 分離した細菌422株中177株 (42%) が*Eubacterium*に属する偏性嫌気性グラム陽性桿菌であり, それらの細菌群と歯周疾患との高い相関性を報告している (Uematsu et al., 1992).

また, Wadeらが, 偏性嫌気性糖非分解性*Eubacterium*属細菌が成人性歯周病の進行に密接に関係していることを明らかにした報告 (Wade, 1997) を受け, Smithらは成人性歯周炎, 難治性歯周炎, 急性進行性歯周炎の患者それぞれ46, 14, 6名について, *E. brachy*, *E. exiguum*, *E. nodatum*, *E. timidum*に対する血清中のIgG, IgA, IgM量を詳細に解析している. その結果, 従来のTewら及びVincentらの報告の正当性を裏付けると同時に, 歯周炎活動部位では特に新菌種*E. exiguum*に対する抗体値が高いこと, 難治性歯周炎では*E. exiguum*と*E. timidum*のIgA抗体レベルの上昇が認められることなどを明らかにし, 糖非分解性*Eubacterium*属細菌種が種々の歯周病に及ぼす潜在的病原性を報告している (Smith et al., 1999).

一方, う蝕との関連においても, Hoshinoらは, 平滑面う蝕病巣や根管壁感染象牙質に生息する主な細菌属の一つが*Eubacterium*であることを明らかにし, それらの細菌がう蝕の進行に深く関与していることを示唆している (Hoshino et al., 1985; 1992).

歯周ポケットや感染根管などの感染病巣深部では, 強い嫌気的環境に保たれていることは前述の通りであるが, 通常の細菌のエネルギー源となる食物由来の糖類は必ずしも豊富ではなく, 破壊された組織や血液由来のタンパク質やペプチドが多いことが推定される. このような環境下では, 糖が無くても生育できる細菌, 即ちアミノ酸やペプチドを代謝してエネルギーを獲得する糖非分解性細菌の生育が著しく促進される. その代表的な細菌群が偏性嫌気性糖非分解性*Eubacterium*属細菌及びその近縁細菌であり, それらの細菌群の優勢な増殖は病気の進行に重要な役割を担っていると考えられる。

更に, 偏性嫌気性糖非分解性*Eubacterium*属細菌及び近縁細菌種の多くは, アミノ酸の1種であるアルギニンを水解して, シトルリン (citrulline) やオルニシン (ornithine) などを經由して酪酸 (butyrate) を産生することが知られている (Uematsu et al., 2003). この酪酸は口臭の原因の1つとなる有機酸であると同時に, 種々の病原性が指摘されている. 特に, ヒト歯肉繊維芽細胞や内皮細胞の増殖抑制作用, 蛋白質合成抑制作用, 免疫T及びB細胞におけるアポトーシス誘導作用などは, 感染病巣の

増悪に深く関与すると推定される (Jeng et al., 1999; Kurita-Ochiai et al., 1997; 1998; 1999; Pollanen et al., 1997; Tonetti et al., 1987; Tse et al., 1992).

8. 今後の展望

前述のように、細菌の遺伝情報を応用した新しい手法を用いた最近の研究により、ヒト口腔内感染病巣から、これまでに報告されていなかった細菌種が多数検出されてきている。これらの細菌の多くは培養が困難であると同時に種々の生化学的反応性が乏しく、従来の表現形質による同定が不可能の場合が多い。このような場合での細菌種 (species) レベルでの同定には、その系統発生学的近縁性を明らかにするためにDNA相同性や16S rRNA 遺伝子塩基配列類似性等の遺伝学的性状を解析することが重要になっている。

これまでに *Eubacterium* 属には55菌種 (sub-speciesを含め) が登録されてきたが、近年それらの遺伝学的性状の違いによって、本属細菌種は大きく再分類されてきていると同時に、種々の近縁細菌の存在が明らかにされてきた。表4に、ヒトの口腔内から多数分離される偏性嫌気性糖非分解性グラム陽性桿菌の新しい細菌属種、*Eubacterium* 属の新細菌種や再分類種をまとめた。これらの細菌種の16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく進化論的系統樹は、これらの細菌が相互に異なる遺伝学的クラスターを形成することから、その遺伝学的多様性を示唆していると考えられる。

表4 ヒトの口腔から分離される主な *Eubacterium* 及びその近縁細菌

現在の名称	備考
<i>Atopobium fossor</i>	新設属:旧 <i>Eubacterium fossor</i>
<i>Atopobium minutum</i>	新設属:旧 <i>Lactobacillus minutum</i>
<i>Collinsella aerofaciens</i>	旧 <i>Eubacterium aerofaciens</i>
<i>Coriobacterium glomerans</i>	新設属種
<i>Cryobacterium curtum</i>	新設属種
<i>Eggerthella lenta</i>	新設属:旧 <i>Eubacterium lentum</i>
<i>Eubacterium brachy</i>	
<i>Eubacterium combesii</i>	新設種
<i>Eubacterium infirmum</i>	新設種
<i>Eubacterium limosum</i>	
<i>Eubacterium minutum</i>	新設種
<i>Eubacterium nodatum</i>	
<i>Eubacterium rectale</i>	
<i>Eubacterium saburreum</i>	
<i>Eubacterium saphenum</i>	新設種
<i>Eubacterium yurii</i> subsp. <i>margaretiae</i>	
<i>Eubacterium yurii</i> subsp. <i>schtitka</i>	
<i>Eubacterium yurii</i> subsp. <i>yurii</i>	
<i>Mogibacterium diversum</i>	新設属種
<i>Mogibacterium neglectum</i>	新設属種
<i>Mogibacterium pumilum</i>	新設属種
<i>Mogibacterium vescum</i>	新設属種
<i>Mogibacterium timidum</i>	新設属:旧 <i>Eubacterium timidum</i>
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	新設属:旧 <i>Eubacterium alactolyticum</i>
<i>Slackia exigua</i>	新設属:旧 <i>Eubacterium exiguum</i>
<i>Slackia heliotrinireducens</i>	新設属:旧 <i>Peptostreptococcus heliotrinireducens</i>

最近Djaisらは、歯周ポケットなどのヒト口腔内感染病巣には、未同定の糖非分解性偏性嫌気性グラム陰性球菌群も生息していることを報告している (Djais et al., 2004)。これらの細菌群はそのG+C含量によって2群に大別され (35%群と45%群)、16S rRNA 遺伝子塩基配列の結果から *Dialister pneumosintes* や *Dialister invisus* と類縁関係にあることを明らかにしている。

これまで述べてきたように、ヒトの口腔内には種々の理由によってこれまで見逃されてきた細菌が多数存在し、種々の口腔感染症の発症と進行に深く関与していることが次第に明らかになってきている。病巣に残るDNA断片の増幅によって得られる遺伝情報の検索によって、今後も糖非分解性 *Eubacterium* 属細菌種やその近縁細菌群を中心に、更に多くの新しい細菌属、細菌種が発見されると予想される。そして、ヒト口腔内の複合的感染 (polymicrobial infections) に関与する細菌の全容が解明されることが期待される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本総説を執筆する機会を与えて下さいました北海道医療大学歯学会の関係各位に深く感謝致します。本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金 (No. 11671798, 12470383) 及び新潟大学プロジェクト推進経費によって、新潟大学大学院医歯学総合研究科で行われました。御協力頂きました同研究科口腔環境・感染防御学分野の星野悦郎教授、佐藤ミチ子氏、池田哲郎氏に感謝申し上げます。

文 献

- Ando N and Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Int Endo J* 23, 20–27, 1990.
- Cheeseman SL, Hiom SJ, Weightman AJ and Wade WG. Phylogeny of oral asaccharolytic *Eubacterium* species determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison and proposal of *Eubacterium infirmum* sp. nov. and *Eubacterium tardum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46, 957–959, 1996.
- Djais A, Nakazawa F and Hoshino E. Profiles of unknown Asaccharolytic Anaerobic Gram Negative Cocoids (AAGNC) from human oral cavities. *J Oral Biosci* 178, 2004.
- Gunsolley JC, Tew JC, Gooss C, Marshall DR, Burmeister JA and Schenkein HA. Serum antibodies to periodontal bacteria. *J Periodontol* 61, 412–419, 1990.
- Hodeman LV, Cato EP, Burmeister JA and Moore WEC. 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.
- Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res* 64, 1195–1198, 1985.
- Hoshino E, Ando N, Sato M and Kota K. Bacterial inversion of non-

- exposed pulp. *Int Endo J* 25, 2–5, 1992.
- Jeng JH, Chan CP, Ho, YS, Lan WH, Hsieh CC and Chang MC. Effects of butyrate and propionate on the adhesion, growth, cell cycle kinetics and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 70, 1435–1442, 1999.
- Kageyama A, Benno Y and Nakase T. Phylogenetic and phenotypic evidence for the transfer of *Eubacterium aerofaciens* to the genus *Collinsella* as *Collinsella aerofaciens* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49, 557–565, 1999.
- Kageyam A, Benno Y and Nakase T. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium lentum* to the genus *Eggerthella* as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49, 1725–1732, 1999.
- Kawamura Y, Hou XG, Todome Y, Sultana F, Hirose K, Shu SE, Ezaki T and Ohkuni H. *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 48, 921–927, 1998.
- Kazor CE, Mitchell PM, Lee A., Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE and Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 41, 558–563, 2003.
- Kurita–Ochiai T, Fukushima K and Ochiai K. Butyric acid–induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cell and human Jurkat T cell. *Infect Immun* 65, 35–41, 1997.
- Kurita–Ochiai T, Fukushima K and Ochiai K. Lipopolysaccharide stimulates butyric acid–induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 67, 22–29, 1999.
- Kurita–Ochiai T, Ochiai K and Fukushima K. Volatile fatty acid, metabolic by–product of periodontopathogenic bacteria, induces apoptosis in WEHI 231 and RAJI B lymphoma cells and splenic B cells. *Infect Immun* 66, 2587–2594, 1998.
- Moore WEC, Hodeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA and Ranney RR. Bacteriology of moderate(chronic)periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun* 42, 510–515, 1983.
- Moore WEC and Holdeman–Moore LV. Genus *Eubacterium*. In : Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG.(eds) *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. William & Wilkins, Baltimore. 1353–1373, 1986.
- Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA and Scjhenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol* 18, 729–739, 1991.
- Nakazawa F and Hoshino E. Immunological specificity of oral *Eubacterium* species. *J G Microbiology* 139, 2635–2640, 1993.
- Nakazawa F and Hoshino E. Genetic relationships among *Eubacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 44, 787–790, 1994.
- Nakazawa F and Hoshino E. DNA–DNA relatedness and phylogenetic positions of *Slackia exigua*, *Slackia heliotrinireducens*, *Eggerthella lenta* and other related bacteria. *J Oral Microbiol* 19, 343–346, 2004.
- Nakazawa F, Poco SE, Jr, Ikeda T, Sato M, Kalfas S, Sundqvist G and Hoshino E. *Cryptobacterium curtum* gen. nov., sp. nov., a new genus of gram–positive anaerobic rod isolated from human oral cavities. *Int J Syst Bacteriol* 49, 1193–1200, 1999.
- Nakazawa F, Poco SE, Jr, Sato M, Ikeda T, Kalfas S, Sundqvist G and Hoshino E. Taxonomic characterization of *Mogibacterium diversum* sp. nov. and *Mogibacterium neglectum* sp. nov., isolated from human oral cavities. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 115–122, 2002.
- Nakazawa F, Sato M, Poco SE, Jr, Hashimura T, Ikeda T, Kalfas S, Sundqvist G and Hoshino E. Description of *Mogibacterium pumilum* gen. nov., sp. nov. and *Mogibacterium vesicum* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Eubacterium timidum* (Holdeman et al.1980) as *Mogibacterium timidum* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 50, 679–688, 2000.
- Nakazawa F, Zambon JJ, Reynolds HS and Genco RJ. Serological studies of oral *Bacteroides intermedius*. *Infect Immun* 56, 1647–1651, 1988.
- Paster BJ, Bocches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A and Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183, 3770–3783, 2001.
- Paster BJ, Dewhirst FE, Olsen I and Fraser GJ. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella* and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. *J Bacteriol* 176, 725–732, 1994.
- Poco SE, Jr, Nakazawa F, Ikeda T, Sato M, Sato T and Hoshino E. *Eubacterium exiguum* sp. nov., isolated from human oral lesions. *Int J Syst Bacteriol* 46, 1120–1124, 1996.
- Poco SE, Jr, Nakazawa F, Sto M and Hoshino E. *Eubacterium minutum* sp. nov., isolated from human periodontal pockets. *Int J Syst Bacteriol* 46, 31–34, 1996.
- Pollanen MT, Overman DO and Salonen JI. Bacterial metabolites sodium butyrate and propionate inhibit epithelial cell growth in vitro. *J Periodont Res* 32, 326–334, 1997.
- Smith AJ and Wade WG. Serum antibody response against oral *Eubacterium* species in periodontal disease. *J Periodont Res* 34, 175–178, 1999.
- Spratt DA, Weightman AJ and Wade WG. Diversity of oral asaccharolytic *Eubacterium* species in periodontitis–identification of novel phylotypes representing uncultivated taxa. *Oral Microbiol Immunol* 14, 56–59, 1999.
- Tew JG, Marshall DR, Moore WEC, Best AM, Palcanis KG and Ranney RR. Serum antibody reactive with predominant organisms in the subgingival flora of young adults generalized severe periodontitis. *Infect Immun* 48, 303–311, 1985.
- Tonetti M, Efimiadi C, Damiani G, Buffa P, Buffa D and Botta GA. Short chain fatty acids present in periodontal pockets may play a role in human periodontal diseases. *J Periodont Res* 22, 190–191, 1987.
- Tse CS and Williams DM. Inhibition of human endothelial cell proliferation in vitro in response to n–butyrate and propionate. *J Periodont Res* 27, 506–510, 1992.
- Uematsu H and Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human periodontal pockets. *J Periodont Res* 27, 15–19, 1992.
- Uematsu H, Nakazawa F, Ikeda T and Hoshino E. *Eubacterium saphenum* sp. nov., isolated from human periodontal pockets. *Int J Syst Bacteriol* 43, 302–304, 1993.
- Uematsu H, Sato N, Hossain MZ, Ikeda T and Hoshino E. Degradation of arginine and other amino acids by butyrate–producing asaccharolytic anaerobic gram–positive rods in periodontal pockets. *Arch Oral Biol* 48, 423–429, 2003.
- Vincent JW, Falkler WA and Suzuki JB. Systemic antibody of *Eubacterium brachy* initially and following periodontal therapy. *J Periodontol* 57, 625–631, 1986.
- Wade WG. The role of *Eubacterium* species in periodontal disease and other oral infections. *Microb Ecol Health Dis* 9, 367–370,

- 1997.
- Wade WG, Downes J, Dymock D, Hiom SJ, Weightman AJ, Dewhirst FE, Paster BJ, Tzellas N and Coleman B. The family *Coriobacteriaceae* : Reclassification of *Eubacterium exiguum*(Poco et al.1996) and *Peptostreptococcus heliotrinireducens*(Lanigan 1976)as *Slackia exigua* gen. nov., comb. nov. and *Slackia heliotrinireducens* gen. nov., comb. nov., and *Eubacterium lentum*(Prevot 1938)as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol 49, 595–600, 1999.
- Wade WG, Downes J, Munson MA and Weightman AJ. *Eubacterium minutum* is an earlier synonym of *Eubacterium tardum* and has priority. Int J Syst Bacteriol 49, 1939–1941, 1999.
- Wilson MJ, Weightman AJ and Wade WG. Application of molecular ecology in the characterization of uncultured micro-organisms associated with human disease. Rev Med Microbiol 8, 91–101, 1997.
- Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev 51, 221–71, 1987.
- Zambon JJ, Umemoto T, DeNardin E, Nakazawa F, Christersson LA and Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of human periodontal disease. Advan Dent Res 2, 269–274, 1988.