

健康成人および歯周炎患者の口腔レンサ球菌種の分布について

田近 志保子, 根本 優子, 金子 克, 八重柏 隆*

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(主任:金子 克 教授)

岩手医科大学歯学部保存学第二講座*

(主任:上野 和之 教授)

(受付:1996年2月29日)

(受理:1996年3月14日)

Abstract : We studied the distribution and proportion of oral streptococci isolated from dental plaque and saliva of healthy adults and from subgingival plaque and fluid of gingival pocket of periodontitis patients to clarify the relation between oral streptococci and periodontitis. α -hemolytic streptococci were isolated from all materials of the healthy adults and the periodontitis patients. The isolation rate of β -hemolytic streptococci from dental plaque of the healthy adults was 20%, and the isolation rates of subgingival plaque and fluid of gingival pocket of the periodontitis patients were 25% and 65%, respectively. The isolation rate of non-hemolytic streptococci from dental plaque of the healthy adults was 35% and the isolation rates of subgingival plaque and subgingival fluid of periodontitis patients were 65% and 60%, respectively. The 670 strains of these isolated oral streptococci on the basis of hemolysis were identified as *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. anginosus*, *S. intermedius* and *S. constellatus* through biochemical tests. The species which were identified by the biochemical tests, agree to the species identified by DNA-DNA hybridization. Eight of these strains were not identified by the biochemical tests, but were identified as *S. sanguis*, *S. mitis* and *S. gordonii* by DNA-DNA hybridization. The isolation rates of *S. gordonii*, *S. anginosus*, *S. intermedius* and *S. constellatus* from periodontitis patients were higher than those from healthy adults. These results suggest that those bacteria may be associated with periodontitis.

Key words : oral streptococci, distribution, periodontitis.

緒 言

口腔の細菌叢を構成する口腔レンサ球菌のうち、*Streptococcus mutans* や *S. sobrinus* はデンタルカリエスに関与し、*S. sanguis* は細菌性心内膜炎患者の血液から高率に分離され、起炎

菌として知られている。また、*S. mitis* は菌体外に炎症性サイトカインの産生を誘導する物質を産生し、種々の炎症性疾患の起炎菌としての可能性が示唆されている¹⁾。最近、“*S. milleri*” group といわれる菌種は *S. anginosus*, *S. intermedius*, および *S. constellatus* であるが

Distribution of species of oral streptococci isolated from healthy adults and periodontitis patients.

Shihoko TAJIKA, Yuko OHARA-NEMOTO, Masaru KANEKO and Takashi YAEGASHI*

(Department of Microbiology, and Periodontology*, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

これらは呼吸器疾患や化膿性疾患、歯科領域においては歯肉膿瘍などからの分離率が高いことが報告され²⁻⁵⁾、化膿性疾患との関連が示唆されている。

本研究では口腔レンサ球菌と歯周炎の関連を明らかにする目的で、健康成人と歯周炎患者の歯垢、歯周ポケット内容液などの材料から口腔レンサ球菌を分離し、これら材料中の口腔レンサ球菌を定量するとともに健康成人と歯周炎患者の口腔レンサ球菌種の分布を比較検討した。

材料と方法

1. 材料

21才から28才までの健康成人（歯周炎のない男子12名、女子8名）20名の歯垢（20検体）を滅菌つま楊枝を用いて大臼歯歯頸部から採取し、1 mlの trypticase soy broth (TSB, BBL) 試験管に入れたものを材料とした。唾液（20検体）は直接、滅菌シャーレに採取した。一方、岩手医科大学歯学部第二保存科で歯周炎（ポケットの深さ4 mmから10 mm）と診断した28才から42才までの19名（男子7名、女子12名）の歯肉縁下歯垢（20検体）をポケットプローブを用いて1 mlのTSBに採取した後に歯周ポケット内容液（20検体）をペーパーポイントでとり1 mlのTSBに入れたものをそれぞれ材料とした。

2. 口腔レンサ球菌数の定量と分離

分離培地はフェニルエチルアルコール寒天培地（PEA 寒天培地、ニッスイ）に0.5% yeast extract (Difco) と5%にヒト赤血球を加えたものを用いた。1 mlのTSBに採取した材料はバイブレーター（ヒラサワ）で混和して10倍、100倍に希釈したものの0.1 mlをPEA血液寒天培地に接種し、37°C、48時間、ガスバック（BBL）を用いて嫌気培養を行った。培養後、溶血を指標に α 溶血、 β 溶血および非溶血を示すコロニー数を算出して、歯垢1 mg当たり、また、唾液とポケット内容液は1 ml当たりのレンサ球菌数を算出した。

また、各材料の培地上のコロニーを溶血別に

1検体から5コロニーずつ釣菌し、 α 溶血レンサ球菌は80検体より400株、 β 溶血レンサ球菌は22検体より110株、非溶血レンサ球菌は32検体より160株の合計670菌株を分離した。

3. 口腔レンサ球菌の同定

1) レンサ球菌と類似菌の鑑別

グラム染色をしてグラム陽性球菌であることを確認して、カタラーゼ陰性、バンコマイシン（30 μ g/ml）感受性、ロイシンアミノペプチダーゼ⁶⁾陽性、ピロリドニールアリルアミダーゼテスト⁷⁾陰性、そして10°Cで発育しないことを確認し、レンサ球菌とした。

2) 生化学的性状検査

アルギニン、エスクリン、アセトイン、ポリサッカライド産生性、マンニトール、ラフィノース、イヌリン、メリビオース、アミグダリン、N-アセチルグルコサミン、ラクトースの発酵および胆汁酸溶解陰性、バシトラシン（2 U）耐性など各種性状について検査⁸⁻¹⁰⁾を行った。また、酵素活性としてノイラミニダーゼ、 α -D-グルコシダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、 α -L-フコシダーゼ、 β -D-フコシダーゼ、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、ヒアロニダーゼについて^{9,11,12)}検討した。

3) DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる菌種の同定

(I) 供試菌株

基準株を含む対照株〔*S. sanguis* (ATCC 10556^T), *S. gordonii* (ATCC 10558^T), *S. oralis* (ATCC 10557), *S. mitis* (ATCC 9811), *S. salivarius* (ATCC 7073^T), *S. mutans* (ATCC 25175^T), *S. sobrinus* (ATCC 33478^T), *S. anginosus* (NCTC 10713^T), *S. intermedius* (GAI 1157), *S. constellatus* (ATCC 27823^T)〕10菌株と生化学的性状検査により同定した分離株の各菌種5株ずつの合計50株と生化学的性状検査では同定不能であった8株（健康成人の歯垢由来3株、唾液由来2株、歯周炎患者のポケット内容液由来3株）を用いた。

Table 1. The number and proportion of materials of streptococci isolated on the basis of hemolysis.

Hemolysis	Materials of healthy adults (Number)			Materials of periodontitis patients (Number)		
	Dental plaque (20)	Saliva (20)	Total (40)	Subgingival plaque (20)	Fluid of gingival pocket (20)	Total (40)
α -hemolysis	20 (100.0)*	20 (100.0)	40 (100.0)	20 (100.0)	20 (100.0)	40 (100.0)
β -hemolysis	4 (20.0)	0 (0.0)	4 (10.0)	5 (25.0)	13 (65.0)	18 (45.0)
Non-hemolysis	7 (35.0)	0 (0.0)	7 (17.5)	13 (65.0)	12 (60.0)	25 (62.5)

Each hemolysis was observed on PEA blood agar. Each value indicates the number of materials from which streptococci could be isolated.

These isolates were from healthy adults and periodontitis patients.

* : (%)

Table 2. The number of oral streptococci from dental plaque and saliva in healthy adults.

Subjects		Dental plaque (CFU/mg)			Saliva (CFU/ml)
		α -hemolytic streptococci	β -hemolytic streptococci	Non-hemolytic streptococci	α -hemolytic streptococci
Male	11	8.1×10^4	0	8.1×10^3	5.6×10^6
	13	2.8×10^5	0	0	3.7×10^7
	28	9.6×10^4	0	0	4.8×10^6
	29	4.7×10^5	1.3×10^4	3.7×10^3	7.4×10^5
	43	1.6×10^3	0	1.4×10^2	6.7×10^6
	45	8.7×10^4	0	1.4×10^3	3.6×10^6
	59	9.2×10^3	0	0	8.4×10^5
	61	1.1×10^6	0	0	6.2×10^6
	62	1.7×10^5	0	0	2.4×10^7
	76	2.7×10^5	0	0	5.5×10^6
	77	7.4×10^5	4.3×10^3	1.3×10^3	6.5×10^5
78	2.2×10^5	5.0×10	0	7.8×10^6	
Mean		3.0×10^5	1.4×10^3	1.2×10^3	8.2×10^6
Female	10	8.0×10^5	0	0	3.2×10^7
	12	1.3×10^4	0	0	4.5×10^6
	26	6.1×10^4	1.7×10^4	6.1×10^4	8.3×10^5
	27	8.0×10^4	0	0	3.4×10^6
	44	2.1×10^5	0	0	2.5×10^7
	46	2.3×10^5	0	0	3.6×10^7
	60	3.9×10^3	0	1.4×10	3.8×10^7
	75	7.5×10^4	0	0	6.3×10^6
Mean		1.9×10^5	2.1×10^3	2.5×10^3	1.8×10^7
Mean of total		2.5×10^5	1.8×10^3	1.9×10^3	1.3×10^7

(II) DNA の抽出

DNA は 30 ml の Todd Hewitt 培地 (BBL) で 48 時間、嫌気培養して得た全菌体から Ezaki ら¹³⁾の方法に従って調整した。すなわち、菌体を 1 ml の 5 mM EDTA 溶液に浮遊し、0.5 mg/ml のアクロモペプチダーゼ (和光純薬) 50 μ l を加えて、37°C、30 分間反応させて溶菌したのち、遠心分離して上清からフェノール/クロロホルムで DNA を抽出した。

(III) フォトビオチンの標識

DNA のフォトビオチン標識は McInnes ら¹⁴⁾の方法に従い、菌体から抽出した 0.5 μ g/ μ l の DNA 10 μ l に 0.5 mg/ml のフォトビオチン (Sigma) 10 μ l を加え、300 ワットのランプで照射して行った。

(IV) DNA-DNA ハイブリダイゼーション

DNA-DNA 相同性による菌種の同定はマイクロプレートを用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーション^{15,16)}に従って行った。すなわち、一本鎖にした基準株を含む対照株と被検株の DNA をマイクロプレートに固定して、フォトビオチンで標識して一本鎖にした被検株の DNA とハイブリダイゼーションを行った。未反応の標識 DNA を洗浄し、streptoavidin-AP-conjugated-enzyme (ペーリンガー) を加え、ビオチンとストレプトアビジンを結合させ、洗浄後基質を加え、2 本鎖になった DNA を定量して相同性を算出した。相同性の算出¹⁷⁾は標識 DNA と同じ株の DNA を固定したウェルの吸光度を 100% (ウェル 3 個の値の平均値) とし、陰性コントロールを 0% として相同性を計算し、相同性が 70% 以上を示したものを同一菌種と判定した。

成 績

1. 口腔レンサ球菌の分離と定量

Table 1 に健康成人、歯周炎患者の材料から α 溶血、 β 溶血そして非溶血レンサ球菌の分離した結果を示した。 α 溶血レンサ球菌は健康成人、歯周炎患者の全ての検体から分離したが、 β 溶血レンサ球菌は健康成人では歯垢 20 検体

中 4 検体 (20%) からのみ分離し、唾液からは分離できなかった。歯周炎患者では歯肉縁下歯垢 20 検体中 5 検体 (25%) から β 溶血レンサ球菌を分離し、歯周ポケット内容液では 20 検体中 13 検体 (65%) から β 溶血レンサ球菌を分離した。そして非溶血レンサ球菌は健康成人では歯垢 20 検体中 7 検体 (35%) から分離し、唾液からは分離できなかった。歯周炎患者の歯肉縁下歯垢では 20 検体中 13 検体 (65%) から非溶血レンサ球菌を分離し、歯周ポケット内容液からは 20 検体中 12 検体 (60%) から非溶血レンサ球菌を分離した。

健康成人に比べ、歯周炎患者では非溶血レンサ球菌の検出率が 60% 以上で高率であった。

Table 2 に健康成人男子 12 名、女子 8 名の歯垢と唾液中の α 溶血、 β 溶血、非溶血レンサ球菌数を示した。男女 20 名の平均菌数をみると歯垢中の α 溶血レンサ球菌は 2.5×10^5 CFU/mg、 β 溶血レンサ球菌は 1.8×10^3 CFU/mg、そして非溶血レンサ球菌は 1.9×10^3 CFU/mg であった。唾液では α 溶血レンサ球菌のみで 1.3×10^7 CFU/ml であった。健康成人のレンサ球菌数に男女差は認められなかった。

Table 3 に歯周炎患者男子 7 名、女子 12 名の歯肉縁下歯垢と歯周ポケット内容液中のレンサ球菌数を示した。男女 19 名の平均菌数をみると歯肉縁下歯垢中の α 溶血レンサ球菌は 7.6×10^5 CFU/mg、 β 溶血レンサ球菌は 3.3×10^2 CFU/mg、非溶血レンサ球菌は 2.3×10^5 CFU/mg であった。歯周ポケット内容液の α 溶血レンサ球菌 2.5×10^6 CFU/ml、 β 溶血レンサ球菌は 2.2×10^4 CFU/ml、非溶血レンサ球菌は 1.1×10^5 CFU/ml であった。歯周炎患者のレンサ球菌数に男女差は認められなかった。また、健康成人にくらべて歯周炎患者では非溶血レンサ球菌の菌数が多かった。

2. 口腔レンサ球菌の菌種

健康成人の歯垢と唾液および歯周炎患者の歯肉縁下歯垢と歯周ポケット内容液、それぞれ 20 検体から分離した口腔レンサ球菌 670 株の溶血別、菌種別の分離菌株数を Table 4 に示した。

Table 3. The number of oral streptococci from subgingival plaque and fluid of gingival pocket of periodontitis patients.

Subjects		Subgingival plaque (CFU/mg)			Fluid of gingival pocket (CFU/ml)		
		α -hemolytic streptococci	β -hemolytic streptococci	Non-hemolytic streptococci	α -hemolytic streptococci	β -hemolytic streptococci	Non-hemolytic streptococci
Male	2	3.4×10^5	0	1.0×10^4	3.6×10^5	1.0×10^2	0
	8	1.6×10^6	0	5.0×10^2	1.2×10^6	0	5.2×10^5
	12	6.4×10^3	0	0	2.1×10^5	2.5×10^2	1.3×10^4
	13	1.5×10^3	0	0	7.0×10^4	2.7×10^4	9.2×10^4
	15	1.8×10^6	0	9.7×10^5	1.3×10^6	2.3×10^6	9.6×10^5
	16	2.2×10^4	1.5×10^3	0	3.6×10^6	2.4×10^5	4.0×10^5
	18	9.0×10^4	4.0×10^3	1.1×10^6	9.6×10^5	5.2×10^5	3.0×10^4
Mean		5.6×10^5	7.9×10^2	8.7×10^5	1.1×10^6	4.4×10^5	2.9×10^5
Female	1	7.0×10^3	0	0	8.1×10^5	1.0×10^3	5.0×10^3
	2	4.5×10^3	0	5.0×10^2	1.0×10^5	5.0×10^2	0
	4	4.6×10^6	0	2.1×10^6	4.1×10^6	1.7×10^4	1.8×10^5
	5*	1.1×10^6	0	4.0×10	6.4×10^5	0	8.4×10^3
	5*	9.0×10^4	0	0	3.2×10^4	0	0
	6	3.6×10^6	2.0×10^2	0	3.0×10^6	3.0×10^2	0
	7	2.8×10^5	0	1.6×10^3	4.5×10^6	5.0×10^2	1.6×10^4
	9	3.8×10^4	0	1.6×10^2	9.4×10^5	2.0×10^2	0
	10	1.6×10^3	3.0×10^2	2.8×10^3	1.4×10^5	2.4×10^3	4.0×10^3
	11	2.0×10^2	5.0×10^2	2.0×10^2	4.0×10^2	0	2.0×10^2
	14	5.2×10^4	0	0	4.8×10^6	0	0
	17	2.0×10^5	0	9.2×10^4	3.8×10^6	0	0
19	1.3×10^6	0	1.3×10^6	1.9×10^7	0	0	
Mean		8.7×10^5	7.6×10	2.7×10^5	3.2×10^6	5.1×10^2	1.6×10^4
Mean of total		7.6×10^5	3.3×10^2	2.3×10^5	2.5×10^6	2.2×10^4	1.1×10^5

* : Fluid of gingival pocket and subgingival plaque of the subjects were sampled at different sites.

Table 4. The number of each streptococci varied hemolysis.

Hemolytic streptococci (Number of strains)	Species	The number of isolated oral streptococci(%)
α -hemolytic streptococci (400)	<i>S. sanguis</i>	98 (24.5)
	<i>S. gordonii</i>	54 (13.5)
	<i>S. oralis</i>	60 (15.0)
	<i>S. mitis</i>	97 (24.3)
	<i>S. salivarius</i>	31 (7.7)
	<i>S. mutans</i>	35 (8.7)
	<i>S. sobrinus</i>	17 (4.3)
	NI*	8 (2.0)
β -hemolytic streptococci (110)	<i>S. anginosus</i>	110 (100.0)
Non-hemolytic streptococci (160)	<i>S. intermedius</i>	104 (65.0)
	<i>S. constellatus</i>	56 (35.0)

Each of 5 hemolytic streptococcal colonies was isolated from materials of dental plaque, saliva, fluid of gingival pocket and subgingival plaque, respectively.

* : The species could not be indetified by biochemical test.

生化学的性状検査により同定した α 溶血レンサ球菌400株のうち *S. sanguis* は98株 (24.5%), *S. mitis* が97株 (24.3%) であった。また, *S. oralis* は60株(15%), *S. mutans*が35株(8.7%), *S. salivarius*が31株(7.7%),そして*S. sobrinus*が17株 (4.3%) であった。一方, 同定不能株が8株 (2%) あった。 β 溶血レンサ球菌は110株すべて *S. anginosus* であった。また, 非溶血レンサ球菌160株のうち *S. intermedius* は104株 (65%), *S. constellatus* が56株 (35%) であった。

健康成人の歯垢と唾液, 歯周炎患者の歯肉縁下歯垢と歯周ポケット内容液のそれぞれ20検体から分離した口腔レンサ球菌の菌種別分離数およびその分離率を Table 5 に示した。

S. sanguis は健康成人の歯垢では20検体中11検体 (55%) から分離し, 唾液では20検体中18検体 (90%) から分離し, 歯周炎患者の歯肉縁下歯垢では20検体中14検体 (70%), そして歯周

ポケット内容液では20検体中10検体 (50%) から *S. sanguis* を分離した。*S. gordonii* は健康成人の歯垢そして唾液からは分離できなかった。歯周炎患者の歯肉縁下歯垢では20検体中14検体 (70%), 歯周ポケット内容液では20検体中12検体 (60%) から *S. gordonii* を分離した。*S. oralis* は健康成人の歯垢では20検体中3検体 (15%), 唾液では20検体中14検体 (70%) から分離した。また, 歯周炎患者の歯肉縁下歯垢では20検体中9検体 (45%) から, 歯周ポケット内容液では20検体中7検体 (35%) から *S. oralis* を分離した。*S. mitis* は健康成人の歯垢では20検体中15検体 (75%) から, 唾液では20検体中13検体 (65%) から分離した。歯周炎患者の歯肉縁下歯垢では20検体中12検体 (60%) から, 歯周ポケット内容液では *S. mitis* は20検体中12検体 (60%) から分離した。*S. salivarius* は健康成人の唾液20検体すべてから分離したが, 歯垢からは分離できなかった。

Table 5. The number and proportion of materials of streptococcal species isolated from healthy adults and periodontitis patients.

Streptococcal species	Materials of healthy adults (Number)			Materials of periodontitis patients (Number)		
	Dental plaque (20)	Saliva (20)	Total (40)	Subgingival plaque (20)	Fluid of gingival pocket (20)	Total (40)
<i>S. sanguis</i>	11 (55.0)*	18 (90.0)	29 (72.5)	14 (70.0)	10 (50.0)	24 (60.0)
<i>S. gordonii</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (70.0)	12 (60.0)	26 (65.0)
<i>S. oralis</i>	3 (15.0)	14 (70.0)	17 (42.5)	9 (45.0)	7 (35.0)	16 (40.0)
<i>S. mitis</i>	15 (75.0)	13 (65.0)	28 (70.0)	12 (60.0)	12 (60.0)	24 (60.0)
<i>S. salivarius</i>	0 (0.0)	20 (100.0)	20 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>S. mutans</i>	12 (60.0)	4 (20.0)	16 (40.0)	3 (15.0)	0 (0.0)	3 (7.5)
<i>S. sobrinus</i>	8 (40.0)	3 (15.0)	11 (27.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>S. anginosus</i>	4 (20.0)	0 (0.0)	4 (10.0)	5 (25.0)	13 (65.0)	18 (45.0)
<i>S. intermedius</i>	6 (30.0)	0 (0.0)	6 (15.0)	8 (40.0)	11 (55.0)	19 (47.5)
<i>S. constellatus</i>	2 (10.0)	0 (0.0)	2 (5.0)	7 (35.0)	6 (30.0)	12 (30.0)

* : (%)

歯周炎患者の歯肉縁下歯垢, 歯周ポケット内容液からも *S. salivarius* は分離できなかった。*S. mutans* は健康成人の歯垢では20検体中12検体(60%)から分離したが, 唾液では20検体中4検体(20%)から分離した。歯周炎患者では歯肉縁下歯垢の20検体中3検体(15%)から *S. mutans* を分離できたが, 歯周ポケット内容液からは分離できなかった。*S. sobrinus* は健康成人の歯垢では20検体中8検体(40%)から分離したが, 唾液では20検体中3検体(15%)から分離した。しかし歯周炎患者では *S. sobrinus* は分離できなかった。*S. anginosus* は健康成人では歯垢の20検体中4検体(20%)から分離したが唾液からは分離できなかった。歯周炎患者では歯肉縁下歯垢20検体中5検体(25%)から *S. anginosus* を分離したが, 歯周ポケット内容液では20検体中13検体(65%)から分離した。*S. intermedius* は健康成人では歯垢20検体中6検体(30%)から分離したが, 唾液からは分離できなかった。歯周炎患者の歯肉縁下歯垢では

20検体中8検体(40%)から *S. intermedius* を分離し, 歯周ポケット内容液では20検体中11検体(55%)から分離した。*S. constellatus* は健康成人では歯垢20検体中2検体(10%)から分離したが, 唾液からは分離できなかった。また, 歯周炎患者の歯肉縁下歯垢20検体中7検体(35%)から *S. constellatus* を分離したが, 歯周ポケット内容液では20検体中6検体(30%)から分離した。

歯周炎患者では, 健康成人に比べて *S. gordonii*, *S. anginosus*, *S. intermedius*, *S. constellatus* は高い検出率であった (Table 5)。

3. DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる菌種の同定

生化学的性状検査で同定できた分離株のうち10菌種の各5株ずつ, 合計50株の相同性をしらべた (Table 6)。

分離株のうちA-1株の吸光度を100%とし, 陰性コントロールを0として最も反応の強かった1との相同性を計算すると, 88%で1の

Table 6. Identification by DNA-DNA hybridization.
(1) Isolated strains identified by biochemical tests.

Labeled DNA	Coated DNA*											Identification
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A-1**	88	48	47	42	21	17	14	19	20	18	100	<i>S. sanguis</i>
A-2	86	50	51	43	23	18	15	21	20	18	100	"
A-3	84	49	50	40	22	16	17	21	20	18	100	"
A-4	83	52	57	46	25	18	16	20	23	15	100	"
A-5	85	49	48	42	20	14	13	16	20	18	100	"
G-1	43	91	45	39	24	14	15	36	35	19	100	<i>S. gordonii</i>
G-2	45	86	55	43	26	13	18	33	32	17	100	"
G-3	40	83	39	36	22	11	13	29	30	14	100	"
G-4	39	85	42	40	23	16	17	27	38	11	100	"
G-5	46	89	45	40	27	18	16	35	34	17	100	"
O-1	43	58	90	56	19	16	17	13	18	20	100	<i>S. oralis</i>
O-2	40	55	88	53	21	15	16	15	19	18	100	"
O-3	38	54	87	54	23	18	15	17	21	22	100	"
O-4	42	57	86	52	24	21	19	16	17	25	100	"
O-5	45	59	84	53	16	13	12	10	15	14	100	"
M-1	50	43	48	85	14	12	22	16	15	24	100	<i>S. mitis</i>
M-2	47	42	46	83	13	10	21	14	13	21	100	"
M-3	43	39	42	84	15	15	24	18	18	26	100	"
M-4	43	40	43	84	14	16	23	17	17	25	100	"
M-5	52	48	47	85	16	17	25	19	18	27	100	"
V-1	30	34	32	33	98	21	20	20	19	18	100	<i>S. salivarius</i>
V-2	32	33	31	34	92	20	18	19	18	17	100	"
V-3	29	31	30	31	88	22	23	25	21	22	100	"
V-4	36	35	35	37	86	16	18	15	17	16	100	"
V-5	35	35	36	37	91	24	22	25	22	19	100	"
T-1	13	16	17	20	17	84	62	9	10	10	100	<i>S. mutans</i>
T-2	15	17	19	22	16	82	59	8	12	11	100	"
T-3	14	15	17	23	19	83	61	10	13	12	100	"
T-4	16	17	19	24	18	84	63	11	11	14	100	"
T-5	19	18	19	25	16	86	65	8	9	10	100	"
B-1	17	20	22	20	15	60	86	8	8	9	100	<i>S. sobrinus</i>
B-2	19	22	21	19	14	57	83	9	10	11	100	"
B-3	18	21	23	22	16	59	84	12	11	10	100	"
B-4	20	23	24	22	17	62	85	14	12	11	100	"
B-5	18	23	21	23	17	59	85	9	10	9	100	"
S-1	22	25	30	32	21	10	8	91	67	61	100	<i>S. anginosus</i>
S-2	19	23	29	30	20	11	9	90	64	60	100	"
S-3	21	22	32	36	25	12	12	88	63	62	100	"
S-4	19	20	34	33	24	9	11	87	62	59	100	"
S-5	23	22	31	32	24	12	10	99	62	60	100	"
I-1	23	20	22	19	18	9	10	54	86	64	100	<i>S. intermedius</i>
I-2	24	21	20	18	17	8	9	52	87	67	100	"
I-3	22	20	19	17	15	9	11	49	83	62	100	"
I-4	21	19	18	16	15	11	12	54	86	63	100	"
I-5	26	24	23	19	19	13	12	56	84	68	100	"
C-1	17	14	15	11	13	13	11	61	69	91	100	<i>S. constellatus</i>
C-2	18	13	14	10	15	15	13	59	65	88	100	"
C-3	19	12	16	12	16	17	14	63	67	90	100	"
C-4	21	16	17	13	17	16	12	67	64	87	100	"
C-5	23	22	21	12	14	17	15	63	65	85	100	"

*1. *S. sanguis*(ATCC 10556^T), 2. *S. gordonii*(ATCC 10558^T), 3. *S. oralis*(ATCC 10557), 4. *S. mitis*(ATCC 9811), 5. *S. salivarius*(ATCC 7073^T), 6. *S. mutans*(ATCC 25175^T), 7. *S. sobrinus*(ATCC 33478^T), 8. *S. anginosus*(NCTC 10713^T), 9. *S. intermedius*(GAI 1157), 10. *S. constellatus*(ATCC 27823^T), 11. Homologous strain, labeled DNA.

** Isolated strain identified biochemical tests.

Table 7. Identification by DNA-DNA hybridization.

(II) Isolated strains non-identified by biochemical tests.

Labeled DNA	Coated DNA*											Identification
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
N-1**	50	62	63	<u>78</u>	18	17	15	22	23	19	100	<i>S. mitis</i>
N-2	48	65	60	<u>75</u>	22	20	18	10	8	12	100	<i>S. mitis</i>
N-3	<u>77</u>	50	53	55	26	30	40	16	19	17	100	<i>S. sanguis</i>
N-4	<u>75</u>	48	52	54	16	15	13	14	18	12	100	<i>S. sanguis</i>
N-5	63	61	60	<u>79</u>	15	20	13	17	9	7	100	<i>S. mitis</i>
N-6	<u>73</u>	62	59	53	32	30	28	24	17	16	100	<i>S. sanguis</i>
N-7	50	<u>76</u>	51	62	35	40	32	22	19	18	100	<i>S. gordonii</i>
N-8	58	<u>75</u>	54	55	29	20	18	12	14	13	100	<i>S. gordonii</i>

*1. *S. sanguis* (ATCC 10556^T), 2. *S. gordonii* (ATCC 10558^T), 3. *S. oralis* (ATCC 10557), 4. *S. mitis* (ATCC 9811), 5. *S. salivarius* (ATCC 7073^T), 6. *S. mutans* (ATCC 25175^T), 7. *S. sobrinus* (ATCC 33478^T), 8. *S. anginosus* (NCTC 10713^T), 9. *S. intermedius* (GAI 1157), 10. *S. constellatus* (ATCC 27823^T), 11. Homologous strain, labeled DNA.

** Isolated strain non-identified biochemical tests.

菌種 *S. sanguis* と同定できた。分離株 A-1 から A-5 は 1 の *S. sanguis* に相同性が 83% から 88% を示し, *S. sanguis* と同定できた。同様に他の菌種の分離株も生化学的性状検査で同定した菌種と DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる菌種の同定結果と一致した成績を示した。次に生化学的性状検査で同定不能であった 8 株について DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果 (Table 7) をみると, 同定不能であった 8 株は相同性は 73% から 79% を示し, *S. sanguis* 3 株, *S. mitis* 3 株, *S. gordonii* 2 株の菌種が同定できた。

考 察

ヒトの口腔内には多くの細菌種が生息し, その中でもレンサ球菌は主要な構成細菌である。しかし, レンサ球菌と歯周炎との関連性についての報告は少ない。著者らは本研究において口腔レンサ球菌と歯周炎の関連性を明らかにする目的で, 健康成人の歯垢と唾液, 歯周炎患者の歯肉縁下歯垢と歯周ポケット内容液から口腔レンサ球菌を分離してその分離率や菌数, 菌種の

分布を比較検討した。各材料から分離した溶血別の分離検体数と菌数は, α 溶血レンサ球菌では健康成人, 歯周炎患者いずれの材料からも分離検体数および菌数に差を認めなかったが, β 溶血レンサ球菌では歯周炎患者の歯周ポケット内容液からの分離率が 65% と健康成人の検体に比較して高かった。また, 非溶血レンサ球菌は分離した検体数, 菌数ともに健康成人にくらべて歯周炎患者からの検体で多く分離でき, 健康成人と歯周炎患者では口腔内におけるレンサ球菌の分布が異なることが示唆された。さらに健康成人と歯周炎患者材料から分離した口腔レンサ球菌の菌種を生化学的性状検査により同定し, その分布を比較検討したところ, 健康成人からは *S. mutans* (40%) や *S. sobrinus* (27.5%) を分離できたが, 歯周炎患者からは *S. mutans* の分離率は 7.5% と低く, *S. sobrinus* は分離できなかった。また, 歯周炎患者では健康成人から全く分離することができなかった *S. gordonii* を高率 (65%) に分離した。さらに *S. anginosus* が 45%, *S. intermedius* が 47.5%, そして *S. constellatus* が 30% と “*S. milleri*”

group の分離率が健康成人にくらべ歯周炎患者で高く (Table 5), 菌種の分布や比率が健康成人と歯周炎患者では異っていた。

口腔レンサ球菌は同属間で近縁関係にある菌種も多く¹⁵⁾, 必ずしも生化学的性状検査のみでは正確な菌種の同定ができない場合もある。そこで DNA-DNA ハイブリダイゼーションをあわせ行うことにより正確な口腔レンサ球菌の同定も必要となる。本研究での DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる菌種の同定では, 生化学的性状検査により同定した口腔レンサ球菌の菌種と一致した成績が得られ, 生化学的性状検査で同定した菌種の確実さが裏付けられた。また, 生化学的性状検査で同定不能であった 8 株については, DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより菌種の同定ができた。今後, 生化学的性状検査で同定不能の場合には DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる菌種の同定法も導入していく必要があると考える。このような手法を用いて正確な口腔レンサ球菌種の同定を行い, 口腔レンサ球菌の分布やその生態を知ることは, 歯周炎への口腔レンサ球菌の関与を検討する上で重要であると考えらる。

本研究において歯周炎患者材料からの分離率が高かった菌種すなわち “*S. milleri*” group の *S. anginosus* は, 他の口腔レンサ球菌に比べ成人歯周炎から高率に分離されるという報告がある¹⁸⁾。また, *S. anginosus* 培養上清がヒト末梢血単核球やマウス腹腔マクロファージにインターロイキン (IL) - 1, IL-6 や腫瘍壊死因子- α などの炎症性サイトカイン, および誘導型のプロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 の mRNA 発現を誘導し, マウス腹腔マクロファージからプロスタグランジン E₂ を産生するという報告があり¹⁹⁾, *S. anginosus* が炎症に関連する活性物質を産生して歯周炎などの炎症性疾患に関与していることが示唆されている。さらに “*S. milleri*” group の *S. constellatus* と *S. intermedium* は病原因子のひとつとして菌体外に組織破壊酵素を

産生し^{20, 21)}, そして *S. constellatus* は歯周炎関連細菌と考えられている *Porphyromonas gingivalis* とともに歯周炎病巣から混合感染の形で高頻度に分離されるといわれている²²⁾。また, *S. gordonii* は *P. gingivalis* の線毛を介してコンプレックスを形成し *P. gingivalis* が歯垢の構成細菌となる際, 接着因子として重要な働きを担っているという報告がある²³⁾。これらの報告と本研究における健康成人と歯周炎患者からの口腔レンサ球菌の分離とその分布, すなわち *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedium* や *S. gordonii* が歯周炎患者材料から多く分離されたという結果から, これら菌種が歯周炎に関連している可能性が考えられる。

現在, 主要な歯周炎関連細菌としては, *P. gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* などのグラム陰性桿菌群があげられる²⁴⁾。また, グラム陽性桿菌である *Propionibacterium acnes* は *P. gingivalis* などの主要歯周炎関連細菌の増殖を促進するような物質を産生し, 間接的に歯周炎を増悪させることも知られている²⁵⁾。歯周炎病巣にはこれらの菌種をはじめとして多数の菌種が存在し, 混合感染²⁶⁾をしている場合が多く, 病巣に分布している菌種間の相互作用などが歯周炎の発症や炎症の拡大に関連していることも考えられる。

S. anginosus, *S. constellatus* や *S. intermedium* が炎症や組織破壊に関連する種々の菌体外物質を産生するという報告¹⁹⁻²¹⁾, また, *S. gordonii* が歯周炎関連細菌 *P. gingivalis* の歯垢への接着因子となっている²³⁾ ことなど, 本研究の健康成人と歯周炎患者から分離した口腔レンサ球菌の分布についての研究結果をあわせ考えると歯周炎においては *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedium* や *S. gordonii* は直接的な歯周組織の破壊および歯周組織中のマクロファージなど免疫細胞を刺激して, 炎症性サイトカインなどのメディエーターを産生し, 組織に傷害を与えることや歯周炎関連細菌の病巣への定着, 増殖

に影響をおよぼすなどの間接的な機構により歯周炎に関与している可能性が示唆された。

結 論

1. α 溶血レンサ球菌は健康成人 (20 名), 歯周炎患者 (19 名) すべての検体から分離した。

β 溶血レンサ球菌は健康成人の歯垢からは 20%, 歯周炎患者の歯肉縁下歯垢中と歯周ポケット内容液からはそれぞれ 25%, 65% の分離率であった。非溶血レンサ球菌は健康成人の歯垢からは 35%, 歯周炎患者の歯肉縁下歯垢中と歯周ポケット内容液からはそれぞれ 65%, 60% の分離率であった。歯周炎患者では健康成人にくらべて非溶血レンサ球菌の分離率が高かった。

2. 分離菌種についてみると健康成人では, *S. sanguis* (72.5%), *S. mitis* (70.0%), *S. salivarius* (50.0%), *S. oralis* (42.5%), *S. mutans* (40.0%), *S. sobrinus* (27.5%), *S. intermedius* (15.0%), *S. anginosus* (10.0%), そして *S. constellatus* (5.0%) の順であった。また, 歯周炎患者では, *S. gordonii* (65.0%), *S. sanguis* (60.0%), *S. mitis* (60.0%), *S. intermedius* (47.5%), *S. anginosus* (45.0%), *S. oralis* (40.0%), *S. constellatus* (30.0%), そして *S. mutans* (7.5%) の順であった。歯周炎患者では健康成人にくらべて *S. gordonii*, *S. anginosus*, *S. intermedius* そして *S. constellatus* の分離率が高かった。

3. DNA-DNA 相同性による菌種の同定では, 生化学的性状検査により同定した菌種と一致した。また, 生化学的性状検査で同定不能であった 8 株は DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより *S. sanguis* 3 株, *S. mitis* 3 株そして *S. gordonii* 2 株と同定できた。DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより, 生化学的性状検査で同定した菌種の確実さが裏付けられ, 生化学的性状検査で同定不能であった株の菌種を同定できた。

文 献

- 1) Takada, H., Kawabata, Y., Tamura, M., Matsu-shita, K., Igarashi, H., Ohkuni, H., Todome, Y., Uchiyama, H., and Kotani, S.: Cytokine induction by extracellular products of oral viridans group streptococci. *Infect. Immun.* 61: 5252 - 5260, 1993.
- 2) 佐々木次郎: 歯性感染症からの検出菌とその薬剤感受性, 日歯医学誌, 6: 89 - 104, 1987.
- 3) 永田邦昭: 化膿性病巣より分離される *Streptococcus milleri* の重要性, 感染症誌, 64: 444 - 453, 1990.
- 4) 新里 敬, 斉藤 厚: ストレプトコッカスミレリグループ, 化療の領域, 8: 81 - 87, 1992.
- 5) 新里 敬, 斉藤 厚: 呼吸器感染症における口腔内常在菌の意義, メディヤサークル, 39: 189 - 185, 1994.
- 6) Oya, H., Yamamoto, T., and Nagatsu, T.: Presence of leucine aminopeptidase activity in human saliva from the parotid gland and the submaxillary sublingual glands. *Archs oral Biol.* 13: 941 - 948, 1968.
- 7) Kloos, W. E., and Lambe, D. W., Jr.: *Staphylococcus*, In: Balows, A., Hausler, W. J. Jr., Herrmann, K. L., Isenberg, H. D., and Shadomy, H. J. (eds.), Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp 222 - 237, 1991.
- 8) Maiden, M. F. J., Lai, C. H., and Tanner, A.: Characteristics of oral gram-positive bacteria. In: Slots, J., Taubman, M. A. (eds.), Contemporary oral microbiology and immunology. Mosby Year Book, St. Louis, pp 342 - 372, 1992.
- 9) Kilian, M., Mikkelsen, L., and Henriksen, J.: Taxonomic study of viridans streptococci: Description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982, and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder, 1906). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 19: 471 - 484, 1989.
- 10) Little, W. A., Thomson, L. A., and Bowen, W. H.: Antibiotic susceptibility of *Streptococcus mutans*: Comparison of serotype profiles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 440 - 443, 1979.
- 11) Smith, R. F., and Willett, N. P.: Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. *Appl. Microbiol.* 16: 1434 - 1436, 1968.
- 12) Whiley, R. A., Fraser, H., Hardie, J. M., and Beighton, D.: Phenotypic differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* strains within the "*Streptococcus milleri*" group. *J.*

- Clin. Microbiol.* 28 : 1497 - 1501, 1990.
- 13) Ezaki, T., Saidai, D. M., Hashimoto, Y., Yamamoto, H., and Yabuuchi, E. : Rapid procedure to determine the DNA base composition from small amount of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 67 : 127 - 130, 1990.
 - 14) MacInnes, J. L., Vise, P. D., Habili, N., and Symons, R. H. : Chemical biotinylation of nucleic acid with photobiotin and their use as hybridization probes. *Focus* 9 : 1 - 4, 1987.
 - 15) Ezaki, T., Hashimoto, Y., Takeuchi, N., Yamamoto, H., Liu, S., Miura, H., Matsui, K., and Yabuuchi, E. : Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Microbiol.* 26 : 1708 - 1713, 1988.
 - 16) 江崎孝行, Adnan, S., 三宅正美 : 菌種の分類学的類似度を測定する定量的マイクロプレートハイブリダイゼーション法, 日細菌誌, 45 : 851 - 855, 1990.
 - 17) Ezaki, T., Takeuchi, N., Liu, S., Kai, A., Yamamoto, H., and Yabuuchi, E. : Small-scale DNA preparation for rapid genetic identification of *Campylobacter* species without radioisotope. *Microbiol. Immunol.* 32 : 141 - 150, 1988.
 - 18) Flynn, M. J., and Slots, J. : Beta-hemolytic streptococci in advanced periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 8 : 295 - 297, 1993.
 - 19) Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., and Kaneko, M. : Induction of inflammatory cytokine and cyclooxygenase-2 mRNA expression by secreted substances from oral streptococci. *Dent. J. Iwate Med. Univ.* 20 : 284 - 290, 1995.
 - 20) Unworth, P. F. : Hyaluronidase production in *Streptococcus milleri* in relation to infection. *J. Clin. Pathol.* 42 : 506 - 510, 1989.
 - 21) Homer, K. A., Denbow, L., Whiley, R. A., and Beighton, D. : Chondroitin sulfate depolymerase and hyaluronidase activities of viridans streptococci determined by a sensitive spectrophotometric assay. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 1648 - 1651, 1993.
 - 22) Slots, J., Rams, T. E., Feik, D., Taveras, H. D., and Gillespie, G. M. : Subgingival microflora of advanced periodontitis in Dominican republic. *J. Periodontol.* 62 : 543 - 547, 1991.
 - 23) Lamont, R. J., Bevan, C. A., Gil, S., Persson, R. E., and Rosan, B. : Involvement of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in adherence to *Streptococcus gordonii*. *Oral Microbiol. Immunol.* 8 : 272 - 276, 1993.
 - 24) Iino, Y., and Hopps, R. M. : The bone resorption activities in tissue culture of lipopolysaccharides from the bacteria *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* isolated from human mouse. *Archs. Oral. Biol.* 29 : 59 - 63, 1984.
 - 25) 奥田克爾 : 口腔領域の慢性感染症と化学療法, ファルマシア, 31 : 750 - 754, 1995.
 - 26) Choi, I., Nakagawa, T., Yamada, S., Takazoe, I., and Okuda, K. : Clinical microbiological and immunological studies on recurrent periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 17 : 426 - 434, 1990.