義歯性口内炎診断用簡易培地（ストマスタット）の 各種口腔細菌に対する感受性について

夕田 貞之 浜田 泰三* 駒井 正**

Studies on the Sensitivities of the Simplified Culture for the Diagnosis of Denture Stomatitis (STOMASTAT) to Various Oral Bacteria

Sadayuki Yuhda, Taizo Hamada* and Tadashi Komai**

はじめに

義歯性口内炎は、義歯床下粘膜の一種の炎症で、*Candida albicans* が大きな役割をはたしていることが知られている¹⁾。

著者らは、すでに義歯性口内炎の主たる原因となる真菌 (*Candida albicans*) 検出用の簡易培地ストマスタットについて報告した^{2,3)}。

本培地は、義歯性口内炎の現症をよく反映し、日常臨床において、義歯装着者の口腔衛生管理や義歯性口内炎のスクリーニングなどに用いることが有益であることを示した²⁾。

本培地は、グルコースを炭素源とした選択培地であり、真菌主として *C. albicans* の酸産生能を促進するとともに、その発育を阻止しない範囲で細菌の発育を抑制する薬剤（クロラムフェニコール）が配合されている。しかし、多数の臨床例について採取された検体を培養するとき、細菌の発育を完全に抑制しているとはいえない。そこで本研究では、本培地ならびに本培地に緑膿

菌などのグラム陰性桿菌に強い抗菌力を持ち、アミノ配糖体系抗生剤の代表的薬剤の一つであるゲンタマイシンを添加して、各種口腔細菌に対する感受性についてさらに検討を行った。

実験材料および方法

1. ストマスタット

ストマスタットは、炭素源としてグルコース、細菌発育抑制剤としてクロラムフェニコールなどを含んでおり、さきに著者らが開発した培地組成のものを使用した²⁾。

また、ストマスタットにゲンタマイシンを 0.1 mg/ml 加えた培地をゲンタマイシン加ストマスタットとして使用した。

2. 使用菌株

醸酵研究所より分与を受けた *Candida albicans* IFO 1385, *Staphylococcus epidermidis* IFO 12993, *Streptococcus faecalis* IFO 12580, *Klebsiella pneumoniae* IFO 13541, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 13736, 鳥取大学医学部細菌学教室より分与を受けた *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens* 計 9 株を供試菌株として使用した。

3. 菌液の調製

C. albicans は Sabouraud 培地, *Str. faecalis* は Trypticase Soy Broth (BBL 社製), その他の菌株は Brain Heart Infusion 培地 (栄研) を用いて, 37°C, 18~20 時間静置培養し, 集菌洗浄後, 10^{2-9} cells/ml になるよう

三金工業株式会社中央研究所

* 広島大学歯学部歯科補綴学第二講座 (主任: 浜田泰三教授)

** 鳥取大学医学部歯科口腔外科学教室 (主任: 浜田 聡教授)
SANKIN Industry Co., Ltd. Dental Research Center

* Department of Prosthetic Dentistry, Hiroshima University School of Dentistry (Chief: Prof. Taizo Hamada)

** Department of Oral Surgery, Tottori University School of Medicine (Chief: Prof. Takeshi Hamada)

昭和 58 年 2 月 21 日受付

図 1 培養同定検査要項

に希釈調製し、菌懸濁液として使用した。

また、生菌数の測定には、上記培地に寒天を 1.5% 添加して使用した。

4. 種々の菌株によるストマスタットとゲンタマイシン加ストマスタットの pH 変化

ストマスタットおよびゲンタマイシン加ストマスタットに上記の菌懸濁液を接種し、37°C で静置培養を行い 24 時間後の pH 変化を観察した。

5. ストマスタットとゲンタマイシン加ストマスタットの臨床実験

外来患者* 61 名 (平均年齢 ± SE : 55.23 ± 1.87 歳, 義歯装着者 38 名) の口腔粘膜より、同時に 2 本の滅菌綿棒で検体を採取し、ストマスタットおよびゲンタマイシン加ストマスタットにそれぞれ綿棒を投入し、37°C で 24 時間静置培養後、pH メーター (東洋製作所 PT-20F) で pH を測定した。

6. ストマスタットとキャリー・ブレア培地における一般細菌と真菌の同定

ストマスタットの結果が陰性群と陽性群について、それぞれ 5 名 (平均年齢 ± SE : 50.80 ± 4.74 歳) の口腔粘膜より滅菌綿棒で検体を採取し、無菌生理食塩水 2 ml に懸濁させ、ストマスタット 2 ml とキャリー・ブレア培地 (表 1) 5 ml に 0.2 ml, 0.5 ml ずつ接種した。

接種したストマスタットおよびキャリー・ブレア培地で、37°C, 24 時間静置培養した培養液について一般細菌および真菌を図 1 に示した方法で兵庫県登録衛生検査センターで同定を行った。

表 1 キャリー・ブレア培地

チオグリコール酸ナトリウム	1.5gr
リン酸-水素ナトリウム	1.1gr
塩化ナトリウム	5.0gr
塩化カルシウム	0.09gr
寒 天	5.0gr
精製水	1,000ml
pH	8.4

研究結果

1. 種々の菌株によるストマスタットとゲンタマイシン加ストマスタットの pH 変化

ストマスタットに種々の菌懸濁液 10^{2-9} cells/ml を接種し、37°C で 24 時間静置培養した後の pH を測定した結果を表 2 に示した。供試菌のうち、グラム陽性菌の *Str. faecalis*, *Str. pneumoniae*, グラム陰性菌の *Kle. pneumoniae*, *Ser. marcescens* は、初発菌数が 10^8 cells/ml 以上になるとストマスタットの pH を低下させた。ついでグラム陽性菌の *Sta. epidermidis*, *Sta. aureus* は 10^9 cells/ml 以上になると同様に pH を低下させた。また、グラム陽性菌の *Str. viridans*, グラム陰性菌の *Pse. aeruginosa* については pH の低下は認められなかったが、*Pse. aeruginosa* はストマスタットの pH を上昇させる傾向があった。

ストマスタットの pH をよく低下させた *Str. pneumo-*

* 日新堂歯科医院 (宝塚市)

表 2 種々の細菌における菌濃度とストマスタットの pH (24 時間後)

菌 種 名	初 発 菌 数 (cells/ml)	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6$	$\times 10^7$	$\times 10^8$	$\times 10^9$
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IFO 12993		5.80	5.80	5.80	5.80	5.80	5.81	5.80	5.30
<i>Staphylococcus aureus</i>		5.80	5.80	5.79	5.80	5.80	5.80	5.81	5.18
<i>Streptococcus faecalis</i> IFO 12580		5.80	5.80	5.80	5.80	5.79	5.71	5.38	4.94
<i>Streptococcus viridans</i>		5.80	5.80	5.80	5.80	5.80	5.80	5.80	5.82
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		5.80	5.80	5.80	5.80	5.80	5.78	5.23	4.22
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 13541		5.80	5.80	5.80	5.80	5.80	5.52	4.96	4.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13736		5.80	5.84	5.91	5.89	5.95	5.93	6.10	6.23
<i>Serratia marcescens</i>		5.80	5.80	5.80	5.79	5.80	5.81	5.19	4.70

* ストマスタットの初発 pH 5.80

図 2 ストマスタットとゲンタマイシン加ストマスタットにおける 3 菌株の初発菌数と pH (24 時間後) の関係

図 3 ストマスタットの pH とゲンタマイシン加ストマスタットの pH の相関関係
平均年齢 55.23 $\pm$ 1.87 (MEAN $\pm$ SE)

niae, *Kle. pneumoniae* について、ストマスタットとストマスタットにゲンタマイシンを 0.1 mg/ml 添加した培地で pH の低下を比較した結果を図 2 に示した。また、*C. albicans* についても同様に調べた。その結果、ストマスタットにゲンタマイシンを添加した場合、*Str. pneumoniae* および *Kle. pneumoniae* は初発菌数が 10^8 cells/ml 以上の菌濃度で pH の低下がストマスタットの時より大きくなった。また、*C. albicans* については、ストマ

表 3 ストマスタットの陰性群と陽性群について
輸送用培地とストマスタットの培養液の菌
同定結果

	輸 送 用 培 地	ストマスタット
陰 性 群	<i>Neisseria species</i>	No micro-organism
	<i>Streptococcus viridans</i>	
	<i>Serratia species</i>	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	<i>Candida species</i>	
陽 性 群	<i>Neisseria species</i>	<i>Candida albicans</i>
	<i>Streptococcus viridans</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Candida albicans</i>	

平均年齢 50.80±4.74 (MEAN±SE)

スタットの時と比較して pH の低下を阻害する傾向がみられた。

2. ストマスタットとゲンタマイシン加ストマスタットの臨床実験

ストマスタットとストマスタットにゲンタマイシンを 0.1 mg/ml 添加した培地を用いて、24 時間後の pH 変化を臨床的に調べた結果を図 3 に示した。ストマスタットの pH 変化とゲンタマイシン加ストマスタットの pH 変化について検定した結果、図にみられるように相関係数 $r=0.897$ と高い相関性 ($P<0.0001$) を示した。回帰直線は $Y=0.85X+0.83$ であった。

3. ストマスタットとキャリー・ブレア培地における一般細菌と真菌の同定

表 3 にストマスタットとキャリー・ブレア培地で、一般細菌と真菌の培養同定検査を行った結果を示した。表にみられるようにストマスタットは、ストマスタットの陰性群については、一般細菌および真菌とも検出されなかった。また、陽性群についても一般細菌は検出されず、真菌として *C. albicans* が検出同定された。

キャリー・ブレア培地では、ストマスタットの陰性群および陽性群について一般細菌が検出同定され、また陰性群でも *Candida* が検出された。

考 察

ストマスタットは、24 時間後の pH および色変化と義

歯性口内炎の臨床所見との間には高い相関関係が認められ、齶蝕原性細菌である *Str. mutans* や乳酸菌に対しては、pH 変化および色変化を示さないことをすでに報告した²⁾。

今回、これらの関係をさらに検討する目的で、8 種類の口腔細菌について、初発菌数とストマスタットの 24 時間後の pH 変化について検討を行った。その結果、初発菌数が 10^8 cells/ml 以上になると pH を低下させる菌株 *Str. faecalis*, *Str. pneumoniae*, *Kle. pneumoniae*, *Ser. marcescens* があった。この点については、ストマスタットにゲンタマイシンを 0.1 mg/ml 添加した培地で検討した。

ゲンタマイシンは、抗緑膿菌性アミノ配糖体系抗生剤であるが、本剤は緑膿菌ばかりでなく、他のグラム陰性菌およびグラム陽性菌にも強い抗菌力をもち⁴⁾、現在のところ本剤に対する耐性菌が少なく⁵⁾、温度、湿度、光に対してきわめて安定な⁶⁾広域スペクトラムをもつ抗生物質である。

しかし、0.1 mg/ml ゲンタマイシン加ストマスタットでは、*Str. pneumoniae*, *Kle. pneumoniae* の pH 低下を抑制することができず、むしろ *C. albicans* の pH 低下を阻害する傾向があった (図 2)。なお、追加実験で義歯装着者 38 名の Newton 分類⁷⁾による臨床症状とストマスタットおよびゲンタマイシン加ストマスタットの 24 時間後の pH との間の相関性を調べてみると、両者間に有意の差は認められなかった。

このように、 10^8 cells/ml 以上の菌数になるとストマスタットの pH を低下させる口腔細菌を完全に抑制しようとするれば、真菌の生育や酸産生も同時に阻害されると思われる。そして一般に綿棒で口腔粘膜から検体を採取する場合、採取される菌数は $1\sim10^6$ cells/ml である⁸⁾とされているので、日常臨床においては、ストマスタットの抗菌力で十分臨床所見を反映するものと考えられる。

また、ストマスタットにもし細菌が发育したとしても、*Candida* の生化学的性状の一つであるガスの発生およびアルコール臭の有無を調べることにより、容易に区別することができる。ただ、より詳細な検討を行うためには、細菌学的手法に準じて慎重に操作し、形態学的、生化学的性質等を利用して検出同定していく必要がある。

一般に日常臨床において微生物検査を行う場合、輸送用培地としてトランスポート培地やキャリー・ブレア培地などが用いられている。しかし真菌を検査する場合、

輸送用培地を用いると表 3 に示したように、 10^2 以下の菌数であっても *Candida* を検出する可能性がある。

真菌特に *C. albicans* は口腔常在菌であり、唾液や口腔粘膜より検出され、健常者においても 20~60% 程度の *Candida* が検出されている⁹⁾。Renner らは、口蓋粘膜から綿棒で検体を採取したとき、*C. albicans* が $10^4 \sim 10^6$ cells/ml の菌数があれば、臨床的に何らかの対応が必要であると述べている⁹⁾。

ストマスタットは、*C. albicans* が $10^3 \sim 10^6$ cells/ml の菌数があれば 37°C、24 時間で pH および色変化を生じるように調製してある。また今回の実験でストマスタットは、ストマスタットの陰性群においては一般細菌ならびに真菌が全く検出されず、陽性群でも一般細菌の生育は認められなかった。

上述のことから、真菌検査を行う場合、臨床所見と高い相関性を示すストマスタットを用いて真菌同定検査を行った方が、キャリー・ブレア培地などの輸送用培地を用いるより診断的価値が高くなると思われる。

要 約

1. ストマスタットは、口腔細菌 *Str. faecalis*, *Str. pneumoniae*, *Kle. pneumoniae* および *Ser. marcescens* の初発菌数が 10^8 cells/ml 以上になると pH を低下させることがわかった。また、0.1 mg/ml ゲンタマイシンを添加したストマスタットは、*C. albicans* による pH 低下を阻害する傾向があった。

2. 臨床実験におけるストマスタットの培養同定検査の結果、ストマスタットの判定結果が陰性群および陽性群において一般細菌の生育は認められなかった。

日常臨床における真菌 (*Candida*) 検査では、キャリー・ブレア培地などの輸送用培地を用いるよりも、ストマスタットの方が臨床所見とよく一致することがわかった。

稿を終るにあたり、菌株の供与をはじめ貴重なるご教示をいただきました鳥取大学医学部細菌学教室、高木 篤教授ならびに鳥取大学医学部歯科口腔外科学教室、浜田 聰教授に深謝いたします。

また、菌同定にあたりご指導、ご協力をいただいた兵庫県登録衛生検査センター、吉田 勲所長に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Budtz-Jørgensen, E.: The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis, Scand. J. Dent. Res., 82: 151~190, 1974.
- 2) 浜田泰三, 小谷博夫, 中島妙子, 夕田貞之: 義歯性口内炎診断用簡易培地, 補綴誌, 26: 948~953, 1982.
- 3) 浜田泰三: デンチャー プラー クコントロール, 日本歯科評論, 466: 87~103, 1981.
- 4) 中沢昭三, 横田芳武, 金森政一, 吉田進彦, 石田邦子: 新抗生物質 Gentamicin に関する細菌学的研究, Chemotherapy, 15: 477~482, 1967.
- 5) 小酒井望, 小栗豊子: 臨床材料分離の各種病原細菌の Gentamicin 感受性について, Jap. J. Antibiotics, 29: 229~237, 1976.
- 6) Oden, E.M., Stander, H. and Weinstein, M.J.: Microbiological assay of Gentamicin, Antimicro. Agents and Chemo., 8~13, 1963.
- 7) Newton, A.V.: Denture sore mouth, a possible aetiology, Br. Dent. J., 112: 357~360, 1962.
- 8) Renner, R.P., Lee, M., Andors, L. and McNamara, T.F.: The role of *C. albicans* in denture stomatitis, Oral Surg., 47: 323~328, 1979.
- 9) Epstein, J.B., Pearsall, N.N. and Truelove, E.L.: Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects, J. Clin. Microbiol., 12: 475~476, 1980.