ヒト歯周ポケットから分離した *Selenomonas* 様微生物の性状について

栗 本 孝 雄 立 花 親 徳
鈴 木 幹 雄 渡 辺 武 彦

日本歯科大学・歯学部・細菌学教室（主任：渡辺武彦 教授）

〔受付：昭和60年9月18日〕

Morphological, biological and biochemical characteristics of gram negative motile rods isolated from foci of human periodontal disease

Takao Kurimoto, Chikanori Tachibana, Mikio Suzuki
and Takehiko Watanabe

Department of Microbiology, Nippon Dental University, Tokyo
1-9-20, Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102

(Chief: Prof. Takehiko Watanabe)

〔Accepted for publication: September 18, 1985〕

Key words: *Selenomonas* / motile rod / periodontal disease

Abstract: Five strains of gram negative, motile rods were isolated from foci of human periodontal disease. According to morphological, biological and biochemical characteristics, these isolates seemed to belong to the genus *Selenomonas*.

However, the ability to ferment carbohydrates of these strains were different from those of *S. sputigena* described in the VPI manual and Bergey's manual.

緒 言

Selenomonas はグラム陰性、運動性を有する嫌気性桿菌である。

Bergey's manual of systematic bacteriology volume 1¹⁾ (以後 Bergey's manual と略す) および Anaerobe laboratory manual 第4版²⁾ (以後 VPI manual と略す) には、*Selenomonas* 属として *S. ruminantium* と *S. sputigena* の二種が記載されており、ヒトの口腔には後者、すなわち *S. sputigena* 一種のみ生息していることになっている。

Listgarten らの一連の歯周ポケット内の微生物叢の暗視野顕微鏡観察での検討の結果³⁻¹⁰⁾ から、臨

床的にみてほぼ正常（健全）な歯肉溝では球菌と桿菌の占める割合が高く、病的状態すなわち歯周ポケットでは、*Spirochaetaceae* や *Selenomonas* を含んだ運動性桿菌の割合が高くなることが知られるようになり、これらの諸報告から、運動性桿菌が歯周病原微生物のひとつとして注目されるようになってきた。

現在までにヒトの口腔に生息しているグラム陰性の運動性桿菌としては *Selenomonas* の他 *Campylobacter*, *Wolinella*, *Treponema* などが知られているが *Selenomonas* の生物学的性状および病原因子についての報告は非常に少ない。

この度、私共は、ヒトの辺縁性歯周炎病巣部から *Selenomonas* と思われるグラム陰性、運動性桿菌を5株分離培養することができた。この分離

菌株の諸性状について報告する。

材料および方法

1. 分離培養

Brain heart infusion (Difco) 3.7g, L-Cystine (Difco) 0.07g, Bacto agar (Difco) 0.8g を精製水100ml に加熱溶解後、pH を6.5に調節してから高圧滅菌した。培地が50°C 前後まで冷却するのをまってから、ウマ血清を10%添加し、滅菌小型シャーレ（直径3 cm, 深さ3 cm, 蓋付）に分注して硬化させ、使用前に滅菌駒込ピペットで培地中央付近に3～5 mm の凹みをつけた。この分離培地の凹みの部分から、ヒトの辺縁性歯周炎病巣の膿様物を底部から5 mm 程度のところまで穿刺し、直ちに5% CO₂, 95% N₂ による嫌気的条件下で37°C, 5～7日間培養した。培地内に形成された半透明の発育層の外縁部の一部を、滅菌毛細管ピペットで無菌的に採取し、ウマ血清を10%に添加した GAM ブイヨン（日水）を希釈液として limiting dilution を行い、形成させたコロニーをさらにウマ血清加 GAM 寒天平板培地にて数回分離培養を行い、純培養株を得た。

2. 純培養株の保存

上記方法により得た純培養株をウシ肝浸出液加培地¹¹⁾に接種したのち、直ちに5% CO₂, 95% N₂ による嫌気的条件下で37°C, 5～7日間培養して純培養株を保存している。

3. 純培養株の形態観察

純培養株の形態および運動性は主に暗視野法で観察し、細胞の微細構造、特に鞭毛の派生位置は主にリンタンゲステン酸によるネガティブ染色を

施したのち、透過型電子顕微鏡 JEM 100B（日本電子）により観察した。

4. 生物・生物化学的性状検査 : Bergey's manual^{1), 12), 13)} および VPI manual²⁾ の記載項目を中心に、VPI manual²⁾ の方法に準じて行った。

成 績

1. 形態的特徴 : グラム染色性は陰性で、やや湾曲した細胞形態を呈していた。暗視野顕微鏡下では活発な運動性を示した。細胞は0.3～0.5×1.0～2.0μm の腎臓形をした短桿状であり、鞭毛の派生位置は細胞の湾曲部のみで、そこから数本の鞭毛がゆるやかなカーブを描いて細胞外部へと伸びていた (Fig. 1)。

2. 培養検査 : 分離菌株のウマ血清加 GAM 寒天平板培地上でのコロニーは、大きいもので直径が約1 mm 程度であり、滑沢な半球状を呈し、コロニーの辺縁は明瞭であった (Fig. 2)。

ウマ血清加 GAM ブイヨンに分離菌株を接種し、好気的条件下で培養したところ、どの菌株とも発育しなかった。しかし、同培地で嫌気的条件下、37°C で培養したところ著しい発育がみられた。また、同培地を用い、分離菌株を嫌気的条件下で培養しても25°C での発育はみられなかった。さらにウマ血清加 GAM 半流動高層培地に、胆汁、グリシン、あるいは NaCl をそれぞれ添加した培地で嫌気培養しても、いずれの分離菌株とも発育はみられなかった。予め培地 pH を6.0あるいは8.1に調整したウマ血清加 GAM 半流動高層培地で嫌気的に培養するといずれの分離菌株とも発育した (Table 2)。

Table 1 Morphological characteristics of anaerobic Gram negative motile rods isolated from foci of human periodontal disease

	Isolates (5 strains)	<i>Selenomonas sputigena</i> *
Cell morphology	curved, short kidney	short kidney, crescent-shaped or vibrioid
Cell size (μm)	0.3-0.5×1.0-2.0	0.9-1.1×3.0-6.0
Motility	+	+
Flagellar arrangement	tuft in center of concave side	tuft in center of concave side

* : Bergey's manual of systematic bacteriology (1984).

Fig. 1 Electron micrographs of isolates showing flagellar arrangement. Flagella of isolate occur as a tuft at the center of the concave side of the cell (a). Flagella are arranged linearly near the middle of the concave side of the cell (b). Bars, 1 μ m.

Fig. 2 A colony of isolates from foci of human periodontal disease.

3. 生物・生物化学的性状検査：この度分離した5菌株は Table 3 に示すようにインドールの産生，硫化水素の産生，ゼラチンの液化，尿素の分解，カタラーゼの産生，コアグララーゼの産生，レシチナーゼおよびウレアーゼの産生，馬尿酸の分解およびエスクリンの水解などすべてが陰性であった。

グルコースからの最終産物は主としてプロピオン酸および酢酸であり少量の乳酸もみられた。し

Table 2 Growth test of isolates

	Isolates	<i>S. sputigena</i> *
Aerobically	—	—
Anaerobically		
25°C	—	—
37°C	+	+
1 % bile	—	—
1 % glycine	—	nd
3 % NaCl	—	nd
6.5% NaCl	—	nd
pH 6.0	+	nd
pH 8.1	+	nd
pH 9.6	—	nd

*: Bergey's manual (1984).

+: 90% or more of strains are positive.

—: 90% or more of strains are negative.

nd: not described.

かし，コハク酸は培地中に認められなかった。

分離5菌株の糖発酵能を Table 4 に示した。供試した25種の炭水化物からの酸の産生を調べたところ，グルコース，フルクトースおよびマンノースの3種を添加した場合には培地の pH が5.5以下になり対照培地の pH よりも1.0以上低下し

Table 3 Biochemical characteristics of isolates

Isolates	<i>S. sputigena</i>		
	#1	#2	
Products from PYG	*P,A,l	L,p,(a,s)	P,A,(l,s)
Indole production	—	—	—
H ₂ S production	—	v	—
Nitrate reduction	—	—	+
Gelatin liquefaction	—	—	—
Catalase	—	—	—
Lecithinase	—	—	nd
Urease	—	nd	nd
Coagulase	—	nd	nd
Oxidase	—	nd	nd
Hippurate digestion	—	—	nd
Esculin hydrolysis	—	— ⁺	nd

#1: VPI manual 4th ed., #2: Bergey's manual (1984).

+ : 90% or more of strains are positive.

— : 90% or more of strains are negative.

—⁺ : most strains negative, some strains positive.

v : strains may be either + or —.

nd : not described.

* : Capital letter ≥ 1 meq acid produced in 100 ml of medium ; small letter < 1 meq acid produced in 100 ml of medium.

A, a : acetic ; P, p : propionic ; L, l : lactic ; s : succinic.

た。また、マルトース添加培地では5菌株中4株が発酵し、pHが5.5以下となった。また、シュクロースをはじめとする21種類の炭水化物添加培地では、いずれの場合とも培地pHは6.0~6.8であり酸の産生はみられなかった。特にシュクロース、ガラクトースの発酵能についてみると、供試5株は、Bergey's manual¹⁾ および VPI manual²⁾ に記載されている *S. sputigena* とは異なった。

考 察

歯周ポケット内には多数の細菌が生息している。Listgarten らの一連の研究報告³⁻¹⁰⁾ によれば臨床的にみて健全な歯肉溝では球菌+桿菌の占める割合が70%以上と高く、これとは逆に病的な状態、すなわち歯周ポケットが形成されると *Spirochaetaceae* や *Selenomonas* のような運動性細菌の占める割合が急激に増加することとであ

Table 4 Biochemical characteristics of isolates

Isolates	<i>S. sputigena</i>		
	#1	#2	
Acid Production			
glucose	a	a	+
fructose	a	a ⁻	nd
mannose	a	w ^a	nd
maltose	a(4)w(1)	a ^w	+
sucrose	—	a	+
galactose	—	a	+
mannitol	—	—	+
esculin	—	—	+
inulin	—	—	+
lactose	—	a ^w	+
arabinose	—	a ⁻	+
xylose	—	a ⁻	+
starch	—	— ^w	+
glycerol	—	— ^w	+
raffinose	—	a ⁻	d
trehalose	—	— ^a	d
cellobiose	—	— ^a	—
dextrin	—	nd	+
cellulose	—	nd	—
xylan	—	nd	—

sorbitol, inositol, dulcitol, salicin and adnitol were all —

#1: VPI manual 4th ed., #2: Bergey's manual (1984). a, + : pH in broth 5.5 or below ; — : pH in broth above 5.7 ; w : pH in broth 5.5 to 5.7 ; a^w : most strains a, some strains w ; a⁻ : most strains a, some strains — ; w^a : most strains w, some strains a ; —^a : most strains —, some strains a ; —^w : most strains —, some strains w ; d : 11-89% of strains + ; nd : not described.

る。特にポケットの深さがますますつれ *Spirochaetaceae* や運動性桿菌の割合が高くなる傾向がみられる。しかし、このような病巣部でもルートプレーニングなどの機械的プラークの除去あるいは歯周ポケット局所にテトラサイクリンやメトロニダゾールを投与するようなプラークの化学的除去を行うと *Spirochaetaceae* や運動性桿菌の割合が激減するとともに歯周ポケットの病態が良化することも知られている。そのため *Spirochaetaceae* や運動性桿菌は歯肉溝・歯周ポケットの病態を知るためのパラメータとして用いられると同時に歯周病原細菌としても注目されてきた。

これらをふまえたうえで、著者らはヒトの辺縁性歯周炎病巣部の膿様物からグラム陰性の有運動性、嫌気性菌株5株を分離した。

今回の分離菌株を Bergey's manual¹²⁾に記載された *Bacteroidaceae* 科の属を同定する key 性状に照らしてみると、運動性があり、主要な終末代謝産物がプロピオン酸と酢酸であり、湾曲した細胞の凹部に鞭毛叢をもつことで、*Selenomonas* 属に一致していた。同書には湾曲した細胞の凹部に鞭毛が並んでいる *Pectinatus* 属が記載されている¹³⁾。*Pectinatus* 属は細胞の端まで鞭毛が存在し 15~40°C で発育するのに対して、*Selenomonas* 属は鞭毛が中央部に限られ、20~30°C では発育しない。分離菌株は、鞭毛が中央部に限られ (Fig. 1), 25°C で発育が認められなかった (Table 2) ことから *Selenomonas* 属であると考えられる。

ヒトの口腔に由来する *Selenomonas* は *S. sputigena* 1種しか記載されていない^{1,2)}。*S. sputigena* は比較的多種の糖から酸を産生するが、分離菌株はグルコース、フルクトース、マンノース、マルトースからしか酸の産生が認められない (Table 4) 点で *S. sputigena* とは異なっていた。鷹森¹⁴⁾も *S. sputigena* よりも less-saccharolytic で、血清学的にも異なる *Selenomonas* 様微生物がヒトの口腔に存在すると指摘しており、興味深

い。*S. sputigena* の歯周病原性について Crawford¹⁵⁾は、無菌ラットに *S. sputigena* を接種すると歯槽骨が吸収されることを報告した。また、今回分離した *Selenomonas* から抽出精製した lipopolysaccharide (LPS) の生物活性は、比較的強いことが示されている¹⁶⁾。このような点をふまえると、歯周病原細菌として *Selenomonas* には無視できないものがあると思われる。

結 論

この度、ヒトの辺縁性歯周炎病巣部の膿様物からグラム陰性、嫌気性の運動性菌株を5菌株分離した。これらの分離菌株の諸性状を検討し、次のような結論を得た。

1. 形態的特徴、特に湾曲した菌体の凹部中央付近から複数の鞭毛が派生していること、あるいは主要代謝産物がプロピオン酸と酢酸であることから、これら5株は *Selenomonas* 属に所属させるのが妥当であると考えられた。

2. しかし、菌種についてみると、これまでにヒトの口腔内に生息していると記載されている *S. sputigena* とは、グルコース、フルクトース、マンノース、マルトースの4種の糖からのみ、酸の産生が認められた点で異なっていた。

以上のことから、菌種の同定にはさらに詳しく検討する必要があると考えられる。

抄録：ヒトの辺縁性歯周炎病巣部の膿様物からグラム陰性、嫌気性の運動性桿菌を5菌株分離した。鞭毛の派生位置が細胞湾曲部中央付近であること、あるいは生物、生物化学的特徴から、これら5菌株は *Selenomonas* 属に所属させることができた。しかし、菌種については、これまでにヒトの口腔内に生息していると記載されている *S. sputigena* とは若干異なる所見が認められた。

文 献

- 1) Bryant, M. P.: Genus IX. *Selenomonas*, In Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1. (edited by N. R. Krieg and J. G. Holt), pp. 650-653, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- 2) Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. E. C. (ed.): Anaerobe laboratory manual 4th edn., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
- 3) Listgarten, M. A. and Helledén, L.: Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. J. Clin. Periodontol. 5: 115-132, 1978.
- 4) Listgarten, M. A., Lindhe, J. and Helledén, L.: Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. Clinical, microbiological and histopathological observations. J. Clin. Periodontol. 5: 246-271, 1978.
- 5) Mousques, T., Listgarten, M. A. and Phillips, R.: Composition of human subgingival microflora. J. Periodont. Res. 15: 144-154, 1980.
- 6) Listgarten, M. A. and Schiffer, C.: Differ-

- ential dark field microscopy of subgingival bacteria as an aid in selecting recall intervals : result after 18 months. J. Clin. Periodontol. **9** : 305-316, 1982.
- 7) Lindhe, J., Liljenberg, B. and Listgarten, M. A. : Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. J. Periodontol. **51** : 246-269, 1980.
 - 8) Listgarten, M. A. and Levine, S. : Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration. J. Clin. Periodontol. **8** : 122-138, 1981.
 - 9) Rosenberg, E. S., Evian, C. I. and Listgarten, M. A. : The composition of the subgingival microflora after periodontal therapy. J. Periodontol. **52** : 435-441, 1981.
 - 10) Listgarten, M. A. : Electron microscopic observations on the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J. Periodontol. **36** : 328-345, 1965.
 - 11) 渡辺武彦, 鈴木幹雄, 黒崎哲三朗, 竹谷幹夫, 国本時雄 : Oral Treponema の形態学的, 生物学および生物化学的諸性状. 歯学 **67** : 2-52, 1979.
 - 12) Holdeman, L. V., Kelley, W. and Moore, W. E. C. : Family 1. *Bacteroidaceae*, In Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1. (edited by N. R. Kreig and J. G. Holt), pp. 602-603, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
 - 13) Lee, S. Y. : Genus XI. *Pectinatus*, In Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1. (edited by N. R. Kreig and J. G. Holt), pp. 655-658, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
 - 14) 鷹森健志郎 : 口腔内 Bacterial flora —特に minor group について—. 日細菌誌 **39** : 259-260, 1984.
 - 15) Crawford, A. C. R., Socransky, S. S., Smith, E. and Phillips, R. : Pathogenicity testing of oral isolates in gnotobiotic rats. J. Dent. Res. **56** : B275, 1977.
 - 16) Kurimoto, T., Tachibana, C., Suzuki, M. and Watanabe, T. : Biological and chemical characterization of lipopolysaccharide from *Selenomonas* sp. in human periodontal pockets. Infect. Immun. **51**(3) : in press, 1986.