

Fig. 3. Reconstructed three-dimensional images of 2-day biofilm after 18-h treatment with levofloxacin (10 x MIC). Confocal laser scanning microscopy with 100 x microscope objective was used to examine biofilms after staining with two-color fluorescence. Green and red signals are images for live and dead cells, respectively. A: upper layer, B: deeper layer.

され、多剤耐性緑膿菌の分離頻度も増加している。尿路バイオフィーム感染症の持続が宿主とそれを取り巻く環境におよぼす影響を考えると、除菌を目的とした治療方法の考案と積極的な予防策を講じる必要性はきわめて高いと考える。

フルオロキノロン系薬は緑膿菌性バイオフィームに対してある程度の効果を示すものの、単剤での効果は十分であるとは言えない¹⁵⁾。岡山大学泌尿器病態学分野では、岡山大学式ロビンスデバイスを用いて緑膿菌性バイオフィームに対するオフロキサシンとFOMの併用効果を確認⁵⁾、その作用機序は細胞壁合成阻害剤であるFOMによるフルオロキノロン系薬の菌体内取り込み量の増加であることを明らかにした⁶⁾。また、FOMはLVFXのみならず、ウリフロキサシン（プルリフロキサシンの活性本体）やシプロフロキサシンとも併用効果を示し、その程度は、3薬剤間で差異のないことを報告した^{7,8)}。さらに、キャピラリーフローセルシステムを使用して得られた成績の一部を第39回緑膿菌感染症研究会講演記録¹⁰⁾において報告したが、今回のGFP産生株を用いた検討においても、FOMとLVFXの併用効果が確認された。

以上の検討において、通常の臨床投与量で十分尿中に到達しうる薬剤濃度で併用効果が認められたことが重要な点である。In vitro 実験系は、臨床での併用効果のメカニズム解明と抗菌薬投与計画のエビデンス創出に有用であると考えられる。尿路の細菌バイオフィームは、カテーテル留置・尿路結石・尿路上皮の壊死部などを伴う症例で形成される。筆者らは、in vivo 実験系であるラット緑膿菌尿路感染症バイオフィームに対しても、

フルオロキノロン系薬とFOMの併用効果を確認した⁹⁾。フルオロキノロン系薬とFOMの併用により、短期間に解熱、菌陰性化が得られる可能性があり、有効症例の蓄積が期待される。

新しいバイオフィーム実験モデル系であるキャピラリーフローセルシステムは、緑膿菌性バイオフィーム（GFP産生株および非産生株）の観察において、再現性のある実験系として使用可能となった。本実験系は、新しい画像解析ソフトの導入により抗バイオフィーム剤探索のための基盤技術としてさらなる進化を遂げており、クォーラムセンシング阻害候補物質などの評価にも有用である。

V. 文 献

- 1) Kumon, H. : J. Infect. Chemother. , 2: 18-28, 1996.
- 2) 門田晃一、他 : 日本化学療法学会雑誌, 51: 426-430, 2003.
- 3) 門田晃一 : Bacterial Adherence & Biofilm, 17: 73-78, 2003.
- 4) 公文 裕巳 : Bacterial Adherence & Biofilm, 19: 9-16, 2005.
- 5) Kumon, H. et al. : Antimicrob. Agents Chemother. , 39: 1038-1044, 1995.
- 6) Monden, K. et al. : J. Infect. Chemother. , 8: 218-226, 2002.
- 7) Mikuniya, T. et al. : Acta Med. Okayama, 59: 209-216, 2005.
- 8) 三國谷 雄、他 : Bacterial Adherence & Biofilm, 17: 57-62, 2003.

- 9) 三國谷 雄、他 : Bacterial Adherence & Biofilm, 18: 11-16, 2004.
- 10) 狩山玲子、他 : 第39回緑膿菌感染症研究会講演記録, pp. 95-100, 2005.
- 11) 狩山玲子、他 : バイオフィルム実験講座, pp. 3-19, 2003.
- 12) Werner, E. et al. : Appl. Environ. Microbiol., 70: 6188-6196, 2004.
- 13) Hall-Stoodley, L. et al. : Nat. Rev. Microbiol., 2: 95-108, 2004.
- 14) 狩山玲子、他 : ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学, pp. 2-26, 2003.
- 15) Spoering, A. L. et al. : J. Bacteriol., 183: 6746-6751, 2001.

Evaluation of Effects of Antimicrobial Agents against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in a Capillary Flow Cell System

Reiko Kariyama, Ritsuko Mitsuhashi, Shinya Uehara, Koichi Monden and Hiromi Kumon
 Department of Urology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,
 Okayama University, Okayama, Japan

To identify antibiofilm agents, experimental models of complicated urinary tract infections (UTI) are utilized. Kumon et al. used modified Robbins devices and reported the synergy between ofloxacin and fosfomycin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. More recently, we began using a capillary flow cell system as an *in vitro* model. *P. aeruginosa* OP14-210 isolated from a patient with catheter-associated UTI was used. A GFP (green fluorescent protein)-producing strain, *P. aeruginosa* OP14-210 (pMF230), was constructed. Biofilms were grown in glass capillary tubes under continuous flow conditions with artificial urine, and were observed by confocal laser scanning microscopy. To evaluate the effects of potential antibiofilm agents, fosfomycin (FOM 3 times the MIC: 192 μ g/ml) and levofloxacin (LVFX 10 times the MIC: 80 μ g/ml) were tested. When both FOM and LVFX were added to the system 2-h after inoculation with the GFP-producing strain, very weak fluorescence signal indicating no biofilm formation was observed after 3-days. The GFP-producing 1-day biofilm after 72-h treatment with both FOM and LVFX was approximately half the thickness and irregular compared with no treatment or treatment with FOM alone or LVFX alone. The thickness of 2-day biofilms did not vary markedly after 18-h treatment with FOM or LVFX, either alone or in combination. BacLight staining was applied to assess the effects of treatment on the number of viable cells, and their distribution in biofilms. After combined treatment with FOM and LVFX, live and dead cells were distributed throughout the vertical profile of the biofilms, while a higher proportion of dead cells was observed in the upper third of the biofilms after treatment with LVFX alone. Our previous findings regarding the synergy between fluoroquinolones and FOM were confirmed using the present capillary biofilm system. Potential antibiofilm agents are currently under investigation.

投稿

再使用した気管内吸引カテーテルの 走査型電子顕微鏡による観察

著者 野村佳代*1, 大野勝雄*2, 光畑律子*3, 渡邊久美*4, 犬飼昌子*4,
千田好子*5, 狩山玲子*6

- *1 神戸大学医学部保健学科 講師 (前 岡山大学医学部保健学科)
- *2 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 技術長
- *3 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 技術補佐員
- *4 岡山大学医学部保健学科 助手
- *5 岡山大学医学部保健学科 教授
- *6 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助手

Ⅰ はじめに

気管内吸引カテーテル (以下カテーテル) は、原則として滅菌済み単回使用とされている¹⁾。しかし、在宅療養患者に使用する場合には、経済的負担や医療廃棄物の増加などの理由から、カテーテルは再使用されることが多い²⁾。

再使用した汚染カテーテルは、呼吸器感染など人体への悪影響が懸念される。カテーテルの汚染状況の評価については、かねてより生菌数の算定、消毒薬の効果、流し水の清浄度などの調査が行われてきた³⁻⁵⁾。しかしそれらは培養可能な微生物の調査であり、カテーテル汚染状況の可視的な評価は行われていない。

カテーテルの可視的な研究においては、微細な構造を見分けることのできる走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope, 以下SEM) が、凹凸の激しい試料表面でも鮮明に映し出せる⁶⁾ ことから有用であると考えられる。そこで、本研究ではSEMを用いて、在宅で使用されているカテーテルを観察することにより、その汚染状況を評価した。

Ⅱ 材料と方法

◆カテーテル

ポリ塩化ビニル製とゴム製カテーテルについて、未使用および再使用のものを研究対象とした。未使用カテーテルについては、SEMの試料作製過程での固定液やエタノールなどの試薬がカテーテル表面に何らかの影響を及ぼすことを考慮に入れて、試薬処理をしなかったものとしたものそれぞれ1本を用いた。再使用カテーテルは、気管内吸引が必要な在宅療養患者のうち、研究協力に同意を得て提供された、ポリ塩化ビニル製30本とゴム製7本の計37本であり、すべて試薬処理をした。

◆SEMでの観察

ポリ塩化ビニル製およびゴム製カテーテルの先端側孔から10cmの部分1cm分切断し、前固定液 (リン酸緩衝液 [PBS] 中1%グルタルアルデヒド) に4°C1時間浸漬後、PBS洗浄を4°Cにて2回行った。さらに、後固定液 (PBS中1%四酸化オスミウム) に4°C1時間浸漬後、再度PBS洗浄を4°C

再使用した気管内吸引カテーテルの 走査型電子顕微鏡による観察



にて2回行った。その後エタノール脱水系列（50%、60%、70%、80%、90%）を4℃で15～20分間それぞれ1回ずつ、次に100%にて室温で15～20分間2回行い、自然乾燥した。脱水後、カテーテル断片の内側ないし外側を上にして試料台に貼り付け、白金-パラジウムで蒸着した。試料はSEM（S-570型、日立製作所）で観察した。

結果

◆再使用カテーテルの使用状況

再使用カテーテル（37本）の使用回数は、1日2～30回（平均13.7回）で、使用時間は4～4,320時間（平均355時間）であった。

気管内吸引後のカテーテル外側の付着物を、アルコール綿で清拭・除去したものが21本、ティッシュペーパーで除去したものが11本、ティッシュペーパーとアルコール綿の両方で拭いたものが1本、除去しないままのものが4本であった。

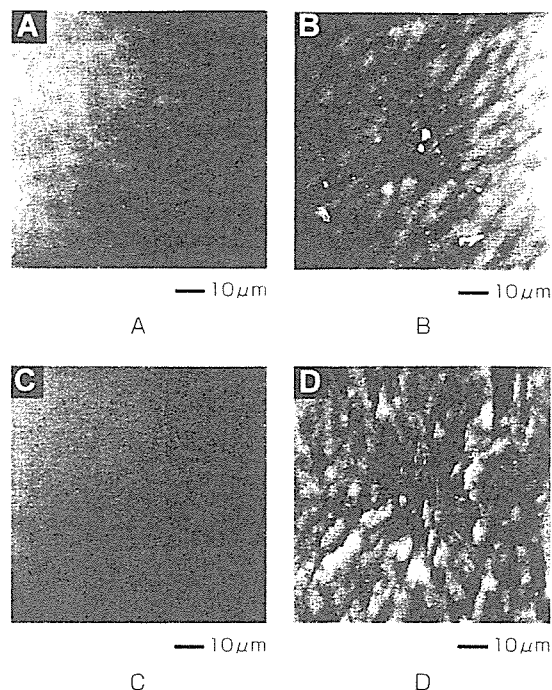
カテーテルの内腔洗浄用に使用された洗浄水は、水道水（16本）・滅菌精製水（11本）・煮沸水（8本）・消毒液（1本）・生理食塩水（1本）であった。

使用後のカテーテル保管は、消毒液・生理的食塩水・水道水に浸漬していたものがそれぞれ34本、1本、1本あり、空の容器に保管していたものは1本であった。

◆ポリ塩化ビニル製カテーテルのSEM像

①未使用ポリ塩化ビニル製カテーテルの表面

未使用のポリ塩化ビニル製カテーテルの内・外側の両面を観察した（図1）。試薬処理をしなかった（未処理）カテーテルの内側（図1-A）は平らであるが、外側（図1-B）はやや波打つ形状が観



- A：試薬にて処理しなかったカテーテルの内側
- B：試薬にて処理しなかったカテーテルの外側
- C：試薬処理をしたカテーテルの内側
- D：試薬処理をしたカテーテルの外側

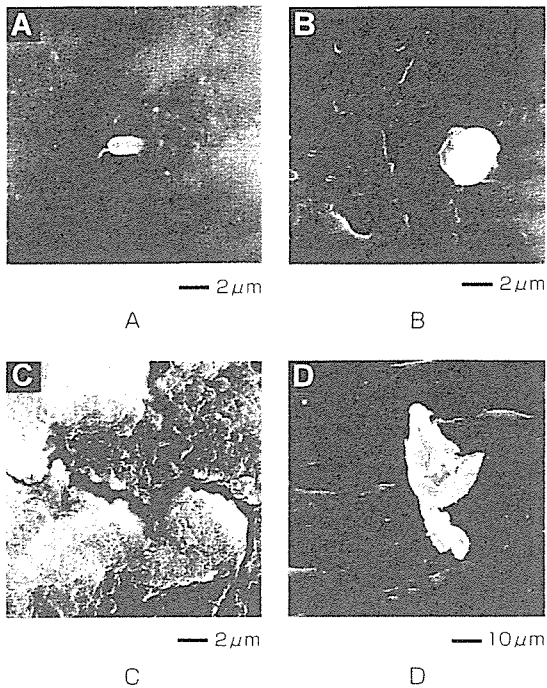
図1 未使用ポリ塩化ビニル製カテーテルのSEM像

察された。また試薬処理をしたカテーテルの内側（図1-C）・外側（図1-D）の両面についても、未処理と同様の形状が観察され、試薬処理による影響は認められなかった。

②再使用ポリ塩化ビニル製

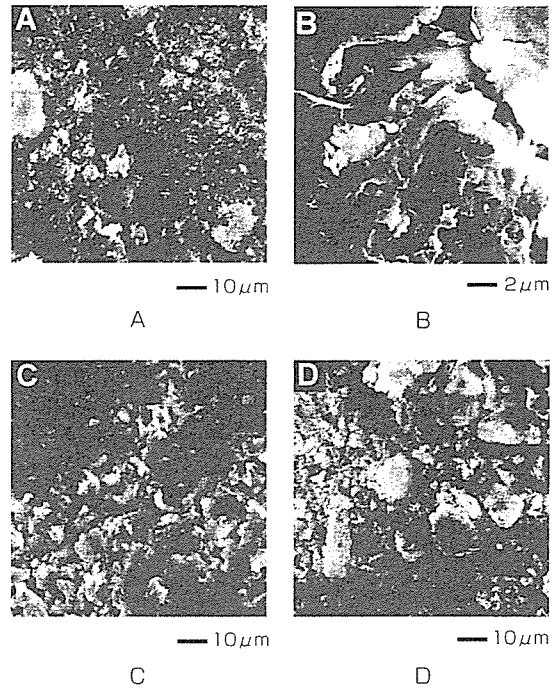
カテーテル表面の微生物

再使用ポリ塩化ビニル製カテーテル30本中21本の内側に、球菌（ $1 \times 1 \mu\text{m}$ ）や桿菌・短桿菌（ $1 \times \text{数} \mu\text{m}$ ）とみられる微生物が観察された。そのうち典型的なSEM像を図2-Aに示した。カテーテル外側のSEM像でも30本中14本に球菌や桿菌



A：微生物が確認できたカテーテルの内側
 B：微生物と付着物が確認できたカテーテルの外側
 C：微生物は確認できないが、分厚い膜様の付着物を認めたカテーテルの内側
 D：微生物は確認できないが、点在する付着物を認めたカテーテルの外側

図2 再使用ポリ塩化ビニル製カテーテルのSEM像



A：試薬にて処理しなかったカテーテルの内側
 B：試薬にて処理しなかったカテーテルの外側
 C：試薬処理をしたカテーテルの内側
 D：試薬処理をしたカテーテルの外側

図3 未使用ゴム製カテーテルのSEM像

とみられる微生物が観察され、そのうちの典型的なSEM像を図2-Bに示した。

③再使用ポリ塩化ビニル製

カテーテル表面の付着物

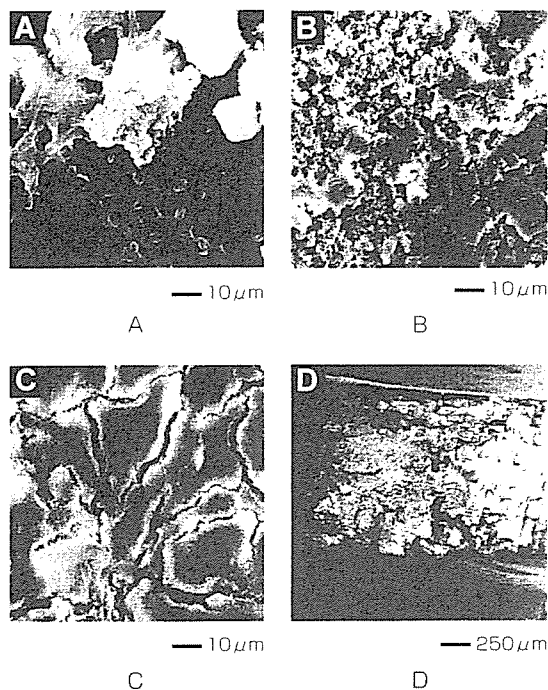
再使用ポリ塩化ビニル製カテーテル30本すべての内・外側の両面に付着物が観察された。これらの付着物は、分厚くカテーテルの表面が見えないもの（図2-C）から膜様の薄いものまで、さらには点在のみのもの（図2-D）もあり、多様であった。

◆ゴム製カテーテルのSEM像

①未使用ゴム製カテーテル表面

未使用ゴム製カテーテルも同様に内・外側の両面を観察した（図3）、試薬処理をしなかった（未処理）カテーテルは両面ともに凹凸が激しく、特に内側の凹凸が顕著であった（図3-A）。外側は比較的滑らかであるが窪みが存在し、その大きさは $2 \times 2 \mu\text{m}$ に達している部分もあった（図3-B）。試薬処理をしたカテーテルも同様に、両面ともにか

再使用した気管内吸引カテーテルの 走査型電子顕微鏡による観察



A：微生物かどうかの確認が困難であるカテーテルの内側
B：微生物かどうかの確認が困難であるカテーテルの外側
C：明らかな付着物を認めるカテーテルの内側
D：明らかな付着物を認めるカテーテルの外側

図4 再使用ゴム製カテーテルのSEM像

なりの凹凸が観察された（図3-C, D）。ゴム製カテーテルの内・外側の両面は、ポリ塩化ビニル製カテーテルの表面とは異なり、試薬未処理・試薬処理とも凹凸が顕著であったが、試薬処理による影響は認められなかった。

②再使用ゴム製カテーテル表面の微生物

再使用ゴム製カテーテルでは、内・外側の両面ともに微生物が存在している可能性はあるが、未使用カテーテルとの判別が困難であり、微生物の確認は不可能であった（図4-A, B）。

③再使用ゴム製カテーテル表面の付着物

再使用ゴム製カテーテル7本中5本の内・外側の両面ともに、付着物が存在するかどうかの判別は困難であった。しかし、そのうち2本は明らかに厚い付着物で覆われていた（図4-C, D）。

■ 考 察

未使用ポリ塩化ビニル製カテーテルでは、未使用ゴム製カテーテルにおいて確認されたような凹凸は認めなかった。このことは、微生物や付着物がカテーテルに付着しにくい形状であり再使用が可能とも考えられた。しかし、カテーテルは単回使用を目的として製造されており、日本看護協会の看護業務基準⁷⁾においても、在宅で多用される開放式カテーテルの使用は単回を原則としている。

小森ら⁸⁾は、頻回の吸引を必要とする場合には、外側をアルコール清拭、内側を滅菌水吸引することにより、再使用も可能としているが、カテーテルに付着した細菌の存在はこれまでも確認され、その対策も講じられてきた²⁾。今回の検討において、再使用したポリ塩化ビニル製カテーテル30本中、21本のカテーテル内側および14本の外側に細菌が存在することが確認された。つまり、使用後のカテーテルを、外側はアルコールで清拭し、内腔を洗淨水で吸引したのち、消毒液に浸漬するといった方法では、カテーテルの細菌汚染は防止できないことが明らかとなった。

また、ポリ塩化ビニル製カテーテル30本すべての内・外側両面に付着物が確認された。付着物の特定は困難であったが、吸引された分泌物の一部が変性して付着した可能性が高い。これはカテーテル使用后、外側をアルコール清拭し、洗淨水を

吸引してもカテーテルに付着した分泌物を除去することは困難であることを示していた。またカテーテルを消毒薬に浸漬する保管方法では、残留分泌物の中に消毒薬やそのほかの不純物が含まれる可能性が高くなる。これらの混合物が変性してカテーテルに付着した場合、手技をマニュアル通りに実施しても、カテーテルを頻回使用した場合には不純物が蓄積することとなり、人体への悪影響が懸念される。またカテーテルを空の容器に保存する方法でも付着物が存在していたが、これは付着物が乾燥することによってむしろ除去しにくい状況になっているとも考えた。

以上から、ポリ塩化ビニル製カテーテルの再使用は避けたほうが安全であるといえる。

今回の検討において、介護者が実施していた清潔操作は、患者が病院に入院していた時に看護師から習ったものとしていたが、その実施状況はさまざまであった⁹⁾。在宅でカテーテルを再使用する場合は、正しい感染対策が実践できるよう、介護者への指導の強化が必要であると考えた。

ゴム製カテーテルは、未使用でも内・外側ともに凹凸が激しく、大きさが1 μ mほどの微生物が入り込み増殖しやすい形状であった。このようなカテーテルの凹凸の存在は、吸引後の流し水や消毒綿での拭き取りなどの手技を完全に実施しても、すべての分泌物や不純物などを除去することは困難であることを示していた。日本看護協会の看護業務基準⁷⁾では吸引カテーテルの素材についての言及はないが、ゴム製カテーテルは非滅菌であり、再使用にはガス滅菌での対応が求められている。しかし在宅においてのガス滅菌は不可能に近く、煮沸消毒や消毒薬による消毒ではゴムの変性が予測されることから、在宅療養での安全な使

用は困難といえる。また、ゴム製カテーテルの製造過程において内側に炭酸マグネシウムが付着することからも、ゴム製カテーテルの再使用は避けたいほうがよいと考えた。

SEM像による再使用ゴム製カテーテルの微生物および付着物の確認は困難であったため、ポリ塩化ビニル製とゴム製カテーテルの汚染度についての比較はできなかった。しかし、ゴム製カテーテル表面の形状や消毒方法が限定されることなどから、ゴム製カテーテルは使用しないほうが望ましいといえる。

以上、カテーテル汚染状況の評価において、SEMが有用な研究手段であることを示したといえる。

おわりに

再使用したカテーテルのSEM観察により、以下のことが明らかになった。

- 1) ポリ塩化ビニル製カテーテルは、内・外側の表面に分泌物の変性とみられる付着物が存在していた。
- 2) ゴム製カテーテルは、内・外側表面の凹凸が顕著であり、ゴム素材そのものと付着物との判別は困難であったが、分泌物の変性とみられる明らかな付着物を7本中2本に認めた。

謝辞

本研究の実施にあたり、調査にご協力くださいました在宅介護者および訪問看護ステーションの皆様には厚くお礼申し上げます。また、本研究成果に関する先駆け実験に従事した医学生、上岡 亮氏および田村佳久氏の貢献に深謝いたします。

再使用した気管内吸引カテーテルの 走査型電子顕微鏡による観察



なお、本研究は、文部科学省科学研究費補助金（基盤C）、（H16-18年度，No.16592199）および平成16年度厚生労働科学研究費補助金（H16-医療-014）による医療技術評価総合研究事業の助成を受けて行った。

文 献

- 1) 尾家重治. 合理的な処置で感染防止. Expert Nurse. 19 (2), 2003, 63.
- 2) 逢坂範子. 見直しの実際①気管内吸引-吸引カテーテルの適正使用. 看護管理. 10 (6), 2000, 446-50.
- 3) 尾家重治ほか. 気管内吸引チューブの微生物汚染とその対策. 日本環境感染学会誌. 8 (1), 1993, 15-8.
- 4) 佐藤真理子ほか. 気管内吸引カテーテルに対する各種消毒剤の効果. ICUとCCU. 25 (6), 2001, 459-62.
- 5) 佐藤鈴子ほか. 気管内吸引における流し水の清浄度に関する研究. 看護研究. 27 (4), 1994, 276-83.
- 6) 尾上孝利. 口腔微生物の走査電子顕微鏡 (SEM) 観察- SEMで何がわかるか. 電子顕微鏡. 38 (2), 2003, 138-41.
- 7) 日本看護協会編. 看護ケアと感染防止. 日本看護協会看護業務基準集2003年. 東京, 日本看護協会出版会, 2004, 103-17.
- 8) 小森由美子ほか. 看護・在宅介護の現場における吸引カテーテルと消毒剤の取り扱いに関する指導マニュアルの検討. 医療薬学. 28 (5), 2002, 478-83.
- 9) 渡邊久美ほか. 介護者による気管内吸引カテーテル管理の現状と課題. 訪問介護と介護. 10 (8), 2005, 666-73.

Oral Microflora and Their Relation to Health and Disease

口腔微生物フローラ研究と
保健荅口 進^{a)} 前田 博史^{b)}

Susumu Kokeguchi

Hiroshi Maeda

^{a)} 岡山大学大学院医歯学総合研究科社会環境生命科学専攻国際環境科学講座口腔微生物学分野
岡山市鹿田町2-5-1Division of Oral Microbiology, Department of International Environmental Sciences, Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama University
2-5-1, Shikata-cho, Okayama 700-8525, Japan^{b)} 岡山大学大学院医歯学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野
岡山市鹿田町2-5-1Division of Periodontal Science, Department of Patho-Physiology, Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama University
2-5-1, Shikata-cho, Okayama 700-8525, Japan

Summary

Natural microflora in the oral cavity become established during childhood and then change throughout the stages of life under the influence of various environmental and behavioral factors. If the profile of microbial communities is altered, pathogenic activity may be exhibited, resulting in dental caries or periodontal disease. Furthermore, recent studies have demonstrated that microorganisms in dental plaques can play an etiological role in systemic diseases such as diabetes and atherosclerosis. Dental plaque is now recognized as a complex microbial biofilm consisting of over 600 different bacterial species in the human oral cavity. Previous microbiological studies based on traditional culture methods did not accurately estimate microbial content of biofilms due to the existence of many uncultivable microorganisms. Recent advances

in molecular microbiological techniques have thus demonstrated that oral microflora are more complex and diverse than hitherto envisaged. In this article, we provide an overview of oral microflora, with an especial focus on roles in oral and systemic health. In addition, recent advances in molecular microbiological techniques allowing effective analysis of oral microflora, i.e., loop-mediated isothermal amplification and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, are presented. Our understanding of oral microflora is rapidly growing and changing under the impact of new molecular technology. New findings on oral microflora will clearly help us to develop new microbiological interventions to reduce oral disease, and thus contribute to improved treatment and prevention strategies.

1. はじめに

歯科領域の2大疾患であるう蝕と歯周病は細菌学および免疫学的な広範で多岐にわたる研究によって、口腔微生物による感染症であることが明らかとなり、それらの病因や発症の科学的メカニズムの理解は深まった。現在ではう蝕と歯周病はデンタルプラークの蓄積によって引き起こされる口腔硬組織あるいは軟組織の傷害という事象から発展して、口腔バイオフィーム感染症という新しい概念で捉えられるに至っている。さらに、様々な口腔疾患におけるバイオフィームの微生物フローラについ

ては最先端の分子生物学的手法で解析が進められ、全身健康への影響や全身疾患との関連が調べられている。

う蝕と歯周病を口腔バイオフィーム感染症として捉え、それらが複雑な微生物フローラの病的な遷移変化に起因するという病因論的理解は歯科医療概念にも変革をもたらすようになってきている。すなわち、う蝕と歯周病に関しては口腔バイオフィーム感染病因論を基本として、科学的根拠に基づいた新しい予防と診断・治療体系が再構築されつつある。

ここでは、まず口腔微生物フローラの特徴について概説する。さらに口腔バイオフィーム感染症へと繋がる口腔微生物フローラに関して、伝統的な細菌分離培養法か

ら始まるこれまでの研究の歴史を辿り、現在の分子生物学的手法を駆使した微生物フローラ解析研究がどのように全身健康や保健に寄与できるのかについて述べたい。

2. 口腔微生物フローラの成り立ち

無菌状態であった胎児は出産時に産道で初めて微生物に触れ、出生後は外界の環境や母親をはじめ様々なヒトと接することを通して多種多様な微生物と遭遇する。その過程で、微生物は皮膚面やそれに隣接する粘膜表面、口腔、消化管や泌尿生殖器等の各部位に定着、生息し始める。

多種多様な微生物は生体各部位への親和性や増殖環境条件（栄養、温度、pH等）によって、それぞれの部位に特有の群生を始め、微生物群集を形成する。このような微生物群集を植物が群れている様子（草叢（くさむら）、フローラ）になぞらえて、微生物叢（微生物フローラ）と呼ぶ。なかでもヒトに恒常的に生息している微生物集合体を正常微生物叢（正常微生物フローラ）あるいは常在微生物叢と称する。口腔内は生体の中でも湿度、温度、栄養に富み、微生物の定着・生育に適した環境を与えている。口腔内の微生物叢は宿主が健全な状態ではそのほとんどが細菌種であり、あとはごく少量の真菌、マイコプラズマやウイルスから構成されているので口腔細菌叢（口腔細菌フローラ：oral microflora）と呼ばれることが多い。

3. 口腔微生物フローラの遷移

新生児は、母親などからの授乳や育児等の際の接触によって、腸管の初代微生物フローラが形成されると同時に数日で口腔微生物フローラの形成が始まる。当初は主に *Streptococcus salivarius* や少数の *Neisseria* 属や *Staphylococcus* 属等の細菌が検出される。しかしながら、新生児期の口腔微生物フローラは不安定であり、時に *Candida albicans* が一過性に増殖して鵝口瘡（がこうそう）の発症をみることもある。帝王切開で出生した新生児の口腔内の細菌数は自然分娩で出生した新生児に比べて極めて少なく、また栄養チューブで経管栄養を受けている未熟児の口腔微生物フローラは *Staphylococcus*

aureus が優位となり、口腔内にチューブを長期に留置している場合には通常的新生児口腔内には認められない *Pseudomonas*、*Serratia* あるいは *Enterobacter* 等のグラム陰性桿菌も検出される¹⁾。それは老齢期における要介護状態の患者の口腔微生物フローラに似ている。

乳幼児期では、成長とともに *Streptococcus mitis* や、*Streptococcus oralis* をはじめ各種口腔レンサ球菌や *Veillonella* 種等を主体とする口腔微生物フローラが形成されてゆく。生後2、3ヶ月の乳幼児の口腔内にはすでに嫌気性細菌 *Fusobacterium* 種や *Prevotella* 種も検出され、*Actinomyces* 種もその割合を増し、徐々に個人特有の口腔微生物フローラが確立されてゆく²⁾。

生後6ヶ月頃からの乳歯の萌出は乳幼児の口腔環境における大きな変化であり、口腔微生物フローラにも影響を与える。口腔硬組織に付着の場を与えられた *Streptococcus gordonii* やう蝕の原因菌である *mutans streptococci* の定着が始まり、特に *S. gordonii* はその他の細菌との共凝集の足場を築く初期プラーク形成に関わる。さらに、この菌は *Fusobacterium nucleatum* とともに各種細菌との共凝集に関係し、より複雑な口腔微生物フローラ形成へと導く（図1）³⁾。

乳歯が生え揃うのに伴い、口腔微生物フローラも整い始める生後19ヶ月から31ヶ月の期間は *mutans streptococci* が母親から子へと垂直感染する危険が高い時期である⁴⁾。

口腔微生物はある時期に別々に口腔内に定着するのではなく、口腔内の各所から菌塊（口腔バイオフィルム）として剥離し、母親や近親者あるいは兄弟、姉妹間から、おそらく唾液（キス、食事の口移しや食べかけの食品の分与等）を介して持続的に伝播し定着する。そしてそれぞれ口腔内で定着、生育に適した場所（niche）、すなわち、口腔各所（舌、頬粘膜、歯表面あるいは歯肉溝）で微生物フローラが形成される。嫌気性細菌（*Prevotella* 属や *Porphyromonas* 属等）もすでに乳幼児期に口腔に感染し、定着を始めるのは菌塊（口腔バイオフィルム）の深部は外界から遮断され、酸素濃度が低いためであろう。

口腔微生物フローラは出生後から加齢に伴い、乳幼児期、学齢期、成年期および老年期の各ライフステージに従って大きく変化する口腔環境（歯の萌出、乳歯から永久歯への交換、歯列形成、不正咬合、修復物、補綴物、インプラントによる治療、歯肉退縮、歯の欠損、義歯装着あるいは無歯顎等）によって様々に遷移してゆく。さらには食生活等の生活習慣、口腔清掃状態や唾液分泌量

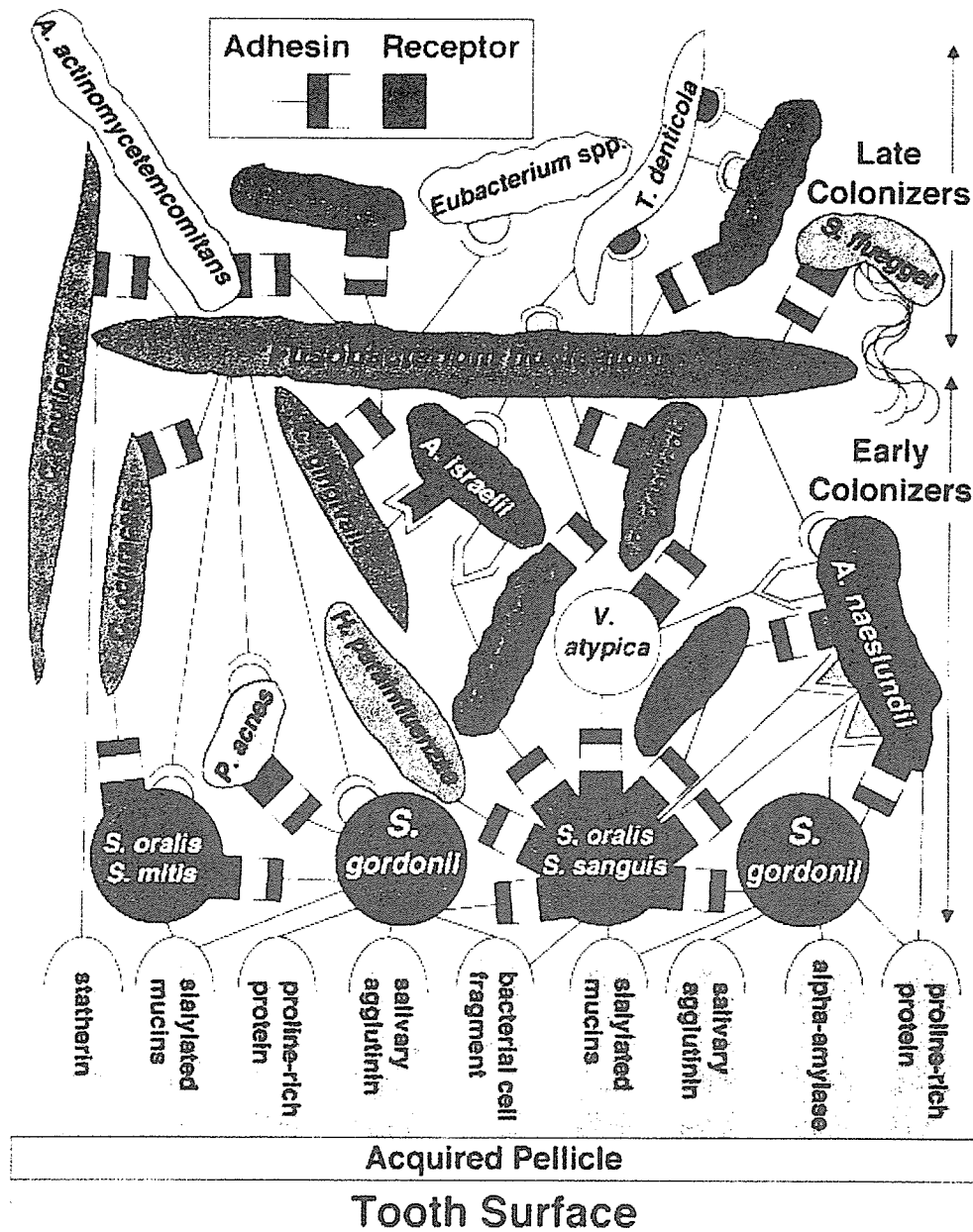


図1. 口腔細菌の特異的共凝集機構 (Kolenbrander et al., (2002)³⁾ から引用)
 歯面ペリクルへ初期付着したレンサ球菌種に付着素とレセプターを介して様々な細菌群が凝集し、プラーク微生物フローラを形成してゆく。

あるいは生体の生理や免疫機能の状態等の要因も複雑に相互作用して口腔環境を変化させ、個人の口腔微生物フローラに影響を及ぼす。

4. デンタルプラーク

成人の口腔内にはおよそ600種類以上の口腔細菌が主に唾液由来の蛋白質成分（アルブミン、イムノグロブリン等）に覆われた各口腔組織（舌、頬粘膜、歯表面、

歯肉溝）に付着・沈着・凝集し、あるいは唾液中に浮遊しながら、それぞれの生態学的空間（ecological niche）に適応して、特有な微生物フローラを形成している。初期のデンタルプラークは主に歯面や粘膜上に定着した菌塊（口腔バイオフィルム）が生育し、さらにその凝集塊を拡大し、菌体外に多糖体等の被膜を形成し、成熟した多種多様な細菌群集であり、口腔微生物フローラの主体をなす⁵⁾。

初期プラークに生息する細菌群集は口腔内の生育環境および生体側要因によってその構成細菌（数や種類）が

変動するが、通常は、細菌群集の中で複雑な相互関係（共生、拮抗）が成り立ち、微妙な均衡（ecosystem）が保たれている。また、生体との間でも一定の均衡を保っている。

初期プラークから成熟プラークに至る過程では、生活環境因子等が影響して、プラーク細菌叢の均衡が崩れて、ある特定細菌群集の量と割合が増加してゆく。初期プラークと成熟プラークの間には構成細菌叢と潜在的な病原性には違いが認められる。成熟したデンタルプラークの1mgには 10^8 から 10^9 個の球状、桿状およびらせん状の様々な細菌種が生息している。口腔内においてデンタルプラークは特徴的な微生物フローラをなし、歯面プラークと歯肉縁上プラークと歯肉縁下プラークとに大別され、その構成細菌は異なる。デンタルプラークが蓄積し、成熟する過程で、口腔微生物フローラは正常細菌叢から病原性細菌叢へと遷移し、各部位で病変を引き起こす。すなわち、歯面にう蝕原性細菌が定着し、プラーク細菌叢における割合が増加し、さらにその酸産生状態が持続することで歯の表面の脱灰すなわち、う蝕へと進行する。また歯肉縁上や歯肉縁下プラーク細菌叢における歯周病細菌の割合が増加することが歯周病の発生と進行の大きな要因となる。

5. 口腔微生物フローラ研究

5-1. う蝕・歯周病の病因細菌の探求

オランダ人のLeeuwenhoekが単眼顕微鏡を自作し、はじめて歯垢（デンタルプラーク）を観察し、口腔内に運動性を有するものを含め多くの微小生物を記述してから現在までに約300年の時が経った。

1800年代後半から1900年代前半にかけPasteurとKochによって近代微生物学が体系づけられ、炭疽菌および結核菌をはじめ数々の歴史的な病原微生物の発見が相次ぎ、医学微生物学の黄金時代の幕開けとなった。口腔微生物分野でも、デンタルプラークからう蝕および歯周病の病因細菌の探求が始まった。しかしながら、う蝕も歯周病も1種類の病原細菌による急性あるいは慢性の細菌感染症とは異なり、多種多様な細菌群が関係する混合あるいは複合感染であり、さらに定着、感染、そして病的変化を起こす発症までの過程が曖昧な感染症である。したがって、特に歯周病に関しては口腔微生物フローラの変遷が当初から着目され、重要視されていた。

う蝕では1889年にMillerが口腔内の酸産生菌が歯を脱灰させ、う蝕を生じさせるという化学細菌説を唱え、ようやく口腔疾患と微生物の関係が取り上げられた⁶⁾。1924年、Clarke⁷⁾がヒトう蝕病巣から多数のレンサ球菌を分離し、その中から*Streptococcus mutans*として報告したが、約40年の空白期間を経て再認識され、1960年になってようやく動物実験によってそのう蝕原性が科学的に実証され、*S. mutans*がデンタルプラークにおけるう蝕病因細菌として特定された。1962年にKeyes⁸⁾はう蝕成立要因として、宿主（歯）、プラーク細菌およびショ糖の相互関係を提唱した。現在ではこれに生活習慣、すなわち時間という因子も加えられて、口腔微生物フローラをう蝕原性フローラへと変遷させるという4つの輪として説明されている。

一方、歯周病病因細菌について、1965年、Löeら⁹⁾は口腔清掃を10～21日間停止させることで、健康な歯肉に歯肉炎を発症させ、その細菌叢と歯肉状態の変化を観察した。健康な歯肉にはプラークも少なく、グラム陽性球菌や桿菌が主に検出された。口腔清掃を停止するとプラーク形成が始まり、歯肉辺縁部プラーク中の細菌数は増加した。その細菌叢は糸状菌からなる複雑な構成に変化して*Vibrio*菌、スピロヘータおよびグラム陰性菌が優勢となっていた。Löeは口腔細菌フローラ変化と口腔病変について明らかにした先駆者であった。1967年、Ritz¹⁰⁾も口腔清掃を中止して9日間にわたる歯肉縁上プラークの細菌種（細菌叢）の変化について調べ、*Nocardia*種の減少に伴って*Fusobacterium*、*Actinomyces*および*Corynebacterium*種等の顕著な増加を報告した。

これらの報告を基に歯周病は、ある特定の口腔細菌種に加えて様々な宿主要因、環境要因および生活習慣等が、プラーク細菌叢均衡の破綻を誘発し、複雑な細菌叢の量的ならびに質的な遷移を起こすことによって、発症、進行することが明らかになった¹¹⁾。しかしながら、その細菌叢の複雑さゆえ、歯周病病因菌の特定には時間を要し、歯周病の病因論については、明確な解答を得ないまま、時代とともにプラーク病因説、プラーク中の非特異的細菌説、特異細菌（歯周病細菌）説、細菌-宿主相互作用説へと変遷してきた。現在では歯周病の炎症から全身疾患への関連や健康への影響が重要とする歯周病細菌-全身疾患関連説に多くの研究者の興味注がられている。

Clarkeら¹²⁾は歯周病の罹患性について、局所因子に加えて、口腔清掃、全身因子、社会環境、ストレスおよび生活習慣因子等がリスクファクター（risk factor：危険

因子)になるという概念を提示した。Keyesの提唱と併せて考えると、様々なリスクファクターが口腔微生物フローラに影響し、病的状態に遷移させ、う蝕や歯周病等の口腔疾患を発症させることが統合的に説明できる。したがって、これらのリスクファクターを軽減させ、取り除くことが口腔微生物フローラの恒常性を維持させ、口腔疾患予防に繋がるとされている。

1975年以降、嫌気性培養技術の進歩によって、*Porphyromonas gingivalis*、*Campylobacter rectus*あるいは*Tannerella forsythia*を始め種々の嫌気性グラム陰性桿菌が歯周病細菌として特定され、その病原性が明らかにされ、歯周病研究の黄金時代を迎えた¹³⁾。さらにThe Institute for Genome Research (TIGR; <http://www.tigr.org/>)が中心となり、う蝕原性細菌のうち*S. mutans*、また歯周病細菌では*P. gingivalis*、*F. nucleatum*、*Treponema denticola*、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*および*Prevotella intermedia*についてそれぞれの染色体全塩基配列が次々に決定され、口腔微生物についても遺伝子レベルでの比較解析が行えるゲノム研究の時代が訪れた(図2)¹⁴⁾。

5-2. 口腔バイオフィルム感染症

個々の口腔病因細菌についてそれぞれの病原性や性状について遺伝子レベルで詳細に解析が進められ、その理解は深まった。しかしながら、これまでの伝統的な細菌学すなわち、単一細菌種による感染症学からの知見と理

論では口腔疾患(う蝕や歯周病)の病因や病態を十分説明できない部分もあった。すなわちデンタルプラークのような細菌群集においては複数菌種の相互作用、協同作用による病原性の発揮や増強、抗菌剤に対する抵抗性等も病因に関与してくる。

Costertonら¹⁵⁾がデンタルプラークを生体内におけるバイオフィルムの代表例の1つとして紹介して以来、う蝕と歯周病は口腔バイオフィルム感染症という新しい概念で捉えられるようになった。これは口腔領域の疾患が、複数種の口腔細菌によって引き起こされる病態を合理的に説明でき、理解しやすいものであった^{16,17)}。

口腔バイオフィルム感染症(う蝕と歯周病)では次の1)~6)の過程を経てバイオフィルムが形成され、口腔疾患が発症、進行する。それは1)ペリクルの形成、2)細菌の付着、3)プラーク細菌叢の形成、成熟から病的状態への遷移、4)プラーク細菌の莢膜様糖衣(glycocalyx)に覆われた抵抗性の獲得(バイオフィルム形成)、そして、5)口腔組織への病変の形成と進行、6)細菌の伝播である⁵⁾。

また、口腔バイオフィルム感染症の特徴には次の1)から6)が挙げられる。1)起因菌となる口腔細菌複数種の関係する混合感染であり、内因感染である、2)感染源は両親や近親者からの垂直あるいは水平感染が疑われるが未だ不明である、3)細菌が口腔内に定着してから発症までが遅延型で数年経過する、4)発症に至るまでに複数種の細菌が協同作用するが、発症や病状悪化に必

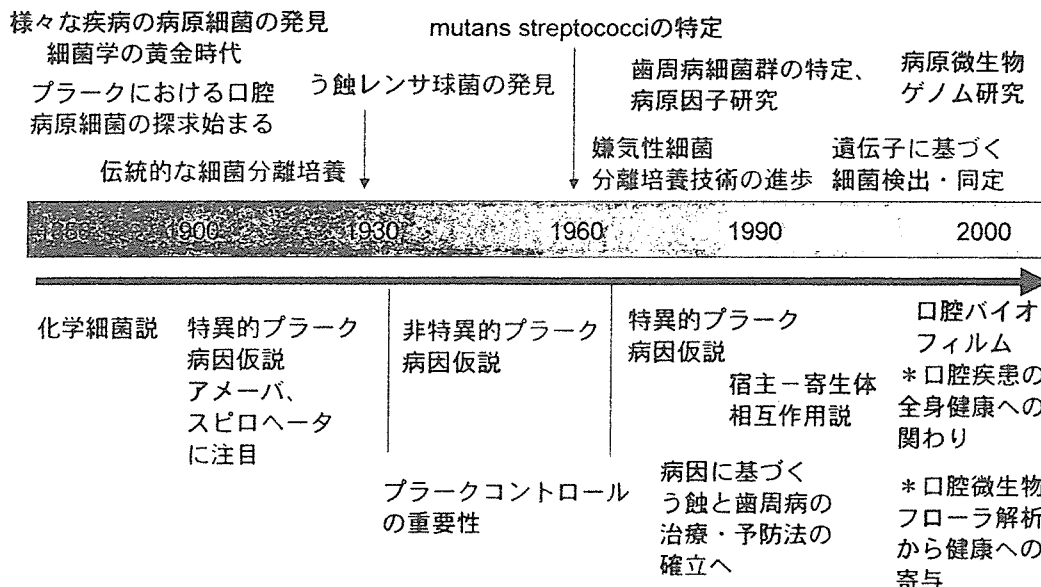


図2. 口腔微生物フローラ研究の変遷
細菌検査方法の進歩とともに口腔内疾患の病態に対する解釈は変化してきた

要な病因細菌の単独閾値は 10^4 から 10^6 細菌数と比較的高い、5) 機械的除去や化学的除去が主な治療となるが、抵抗性をしめし、また6) 生態学的特徴をもつ。すなわち歯の喪失によってその発症は消失する。

このような口腔バイオフィーム感染症としての細菌群集の複雑な共凝集および生息環境適応および病因機構についても遺伝子レベルでの解析が進められている。バイオフィーム形成には細菌の密度を調節するという自己誘導因子 (autoinducer, AI) を介するクォーラムセンシングシステム (Quorum sensing system) が関与していること、また、細菌同士がレセプターを介して凝集する際には浮遊状態では認められない遺伝子が発現すること等が明らかになってきた³⁾。

デンタルプラークがバイオフィームという新しい視点で捉えられても、なお現在600種をこえる細菌種から構成されると目される口腔微生物フローラの実態やその遷移過程は複雑で、その全容は未だ明らかでない。これまでの細菌培養法を駆使した多くの研究に加えて、ようやく現在、最新の分子生物学的手法を用いて口腔微生物フローラ解析が進められつつある。

5.3. 口腔微生物フローラ解析

デンタルプラーク (口腔バイオフィーム) のような様々な微生物種が混在した微生物群集を知るには、まずは群集を構成する微生物を分離し、同定することが必要となる。これまではKochおよびPasteur等によって培われてきた細菌分離培養法、生化学的性状さらには免疫血清学的性状に基づく細菌同定法等によって口腔微生物フローラの解析が進められてきた。培養法を中心としたこれまでの方法では細菌検出同定にいたるまでの手技に熟

練を要し、また手法が繁雑であったり、時間を要すること等が難点となっていた。近年の遺伝子工学の進歩により、細菌の同定は細菌遺伝子そのものを標的に行われている。特に微生物の系統学的分類の指標として重要視されている細菌16S ribosomal RNA遺伝子 (16S rDNA) を標的遺伝子として口腔細菌の同定が行われるようになってきている。その遺伝子は約1,540塩基対から構成されており、その塩基配列を菌種間で比較すると全ての細菌種によく保存された不変領域と菌種特異的に変化に富む可変領域の存在することが明らかとなった (図3)。

現在では種々の細菌の16S rDNAデータベースが構築され整備されてきている。その可変領域の菌種特異的な塩基配列を利用して、細菌の検出および菌種の同定を遺伝子レベルで行うことができる。

分子生物学的手法を用いた微生物フローラ解析によって、デンタルプラークは培養の難しい偏性嫌気性細菌や現在の技術をもってしても培養できない数多くの未知の微生物群から構成されていることが明らかとなった。従来の培養法に基づく方法では、デンタルプラークにおける培養困難な微生物を検出することは困難であり、口腔微生物フローラ群集構造の全容を詳細に把握できない。このような多種多様な口腔微生物フローラの全容を解析し、把握するには、直接遺伝子を標的に解析する分子生物学的手法が有効である。これまでに口腔微生物フローラ解析のために様々な技術が開発され、現在研究が進められている。分子生物学的手法を用いた口腔微生物フローラ解析のための戦略は大きく2つに分けられる。

1つはある特定の口腔内細菌種を高感度にかつ特異的に検出するものである。これにはDNA-DNAハイブリダイゼーション-チェッカーボード法¹⁸⁾、蛍光*in situ*ハイ

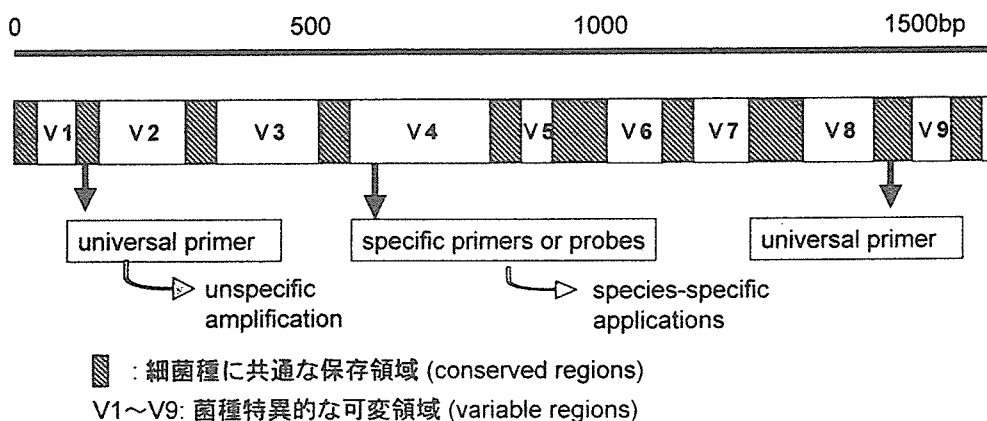


図3. 16SリボソームRNA遺伝子 (16S rDNA) の構造

細菌の16S rDNAには細菌種に共通した保存領域と細菌種に特異的な配列を示す可変領域が存在する。それぞれの領域から細菌検査のためのプライマーやプローブが設計できる。

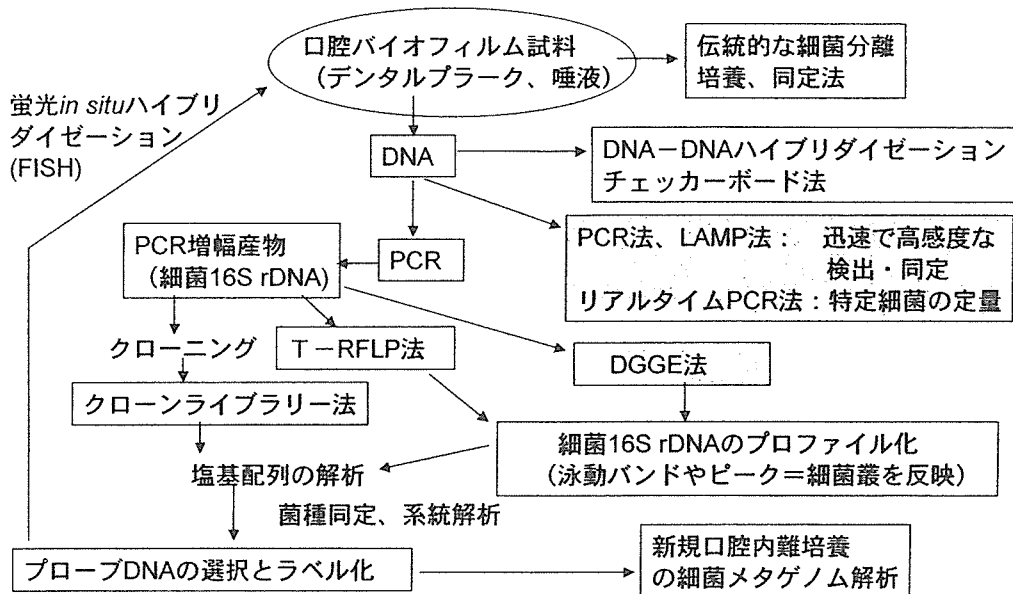


図4. 分子生物学的手法による口腔微生物フローラ解析へのアプローチ
様々な分子生物学的手法が口腔微生物フローラ解析に応用されている。それぞれに特徴を理解し、目的に応じて活用する必要がある。

ブリダイゼーション (FISH) 法^{3, 19, 20}、PCR法²¹、リアルタイムPCR法²² あるいはLAMP法^{23, 24} 等が活用されている。もう1つは、口腔微生物フローラに存在する微生物種すべてを網羅的に捉えようとするものであり、細菌16S rDNAクローンライブラリー解析法²⁵⁻²⁷、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP、制限酵素末端断片長解析) 法²⁸ あるいはPCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法²⁹ 等がある。これまでの培養法を駆使して解析され、積み上げられてきた知見に加えて、これらの分子生物学的手法によって、さらなる口腔微生物フローラ解析研究の進展が期待できる (図4)。

このうち、我々が行っている口腔微生物フローラ解析研究の中で最近のトピックスであるLAMP法およびPCR-DGGE法について取り上げたい。

5-3-1. LAMP法

LAMPとはLoop-Mediated Isothermal Amplificationの略で、PCR法に代わる安価、迅速、簡易そして高精度な遺伝子増幅法として栄研化学株式会社が独自に開発したものである。標的遺伝子の6箇所の領域に対して4種類のプライマーを設定することによって、より標的遺伝子配列を特異的に増幅できる。また、鎖置換型DNA合成酵素を利用することによって等温 (65°C付近) で増幅反応が連続的に進行する。その増幅産物は同一鎖上で互いに相補的な配列を持つ特徴的な繰り返し構造となる (図5)³⁰。

増幅効率が高く、DNAを15分~1時間という短時間で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅することができ、増幅産物の有無を視覚的に確認することができる。現在、栄研ではレジオネラ菌、サルモネラ菌および腸管出血性大腸菌をはじめとする様々な細菌の検出キットが開発されている。今後、このLAMP法は様々な口腔病原細菌検出における応用が期待できる。

我々はこのLAMP法に着目し、まず、歯周病細菌の*P. gingivalis*の検出に適用した。その結果、口腔内サンプルから*P. gingivalis*の16S rDNAを特異的に短時間に増幅でき、*P. gingivalis*を簡便に高感度に検出することができた (図6)²³。

また増幅DNA産物の量についてインターカラーター (SYBR[®]Green I) を用いて蛍光強度を経時測定するリアルタイムLAMP法によって、菌の定量検出が可能であった。その感度および精度は従来のリアルタイムPCR法²³と遜色ないものであった。

う蝕原性細菌*S. mutans*や*S. sobrinus*についてもこのLAMP法と同様に検出、定量できる²⁴。LAMP法はデンタルプラークからある特定の細菌種を簡便かつ高感度に検出、定量でき、歯科医療におけるLAMP法を用いた細菌検査キット開発が期待できる。

最近、Leppら³¹は古細菌 (Archaea) の一種であるメタン生成菌*Methanobrevibacter oralis*様新規ファイロタイプと別の新規*Methanobrevibacter*ファイロタイプの歯周病との関わりを指摘している。歯周病患者の36%から

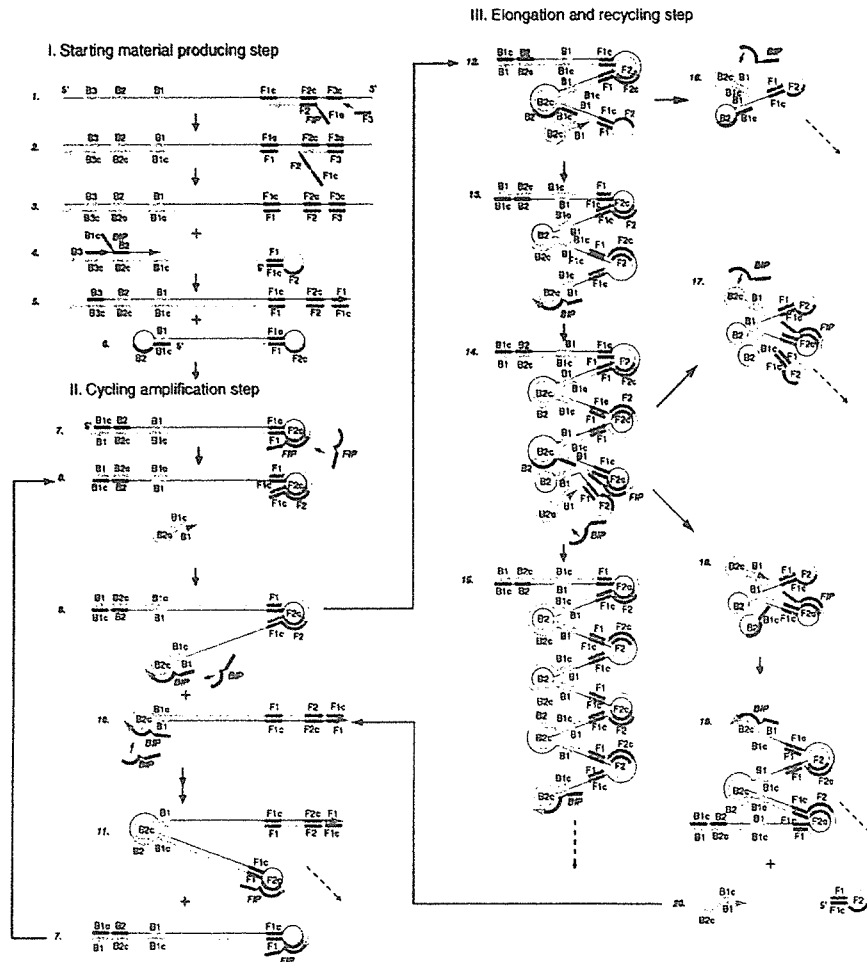


図5. LAMP法による遺伝子増幅の原理 (Notomi *et al.*, (2000)³⁰ から引用)
 LAMP用のプライマーはループ構造を形成するように設計されている (図のB1c、F1c部分)。このループ部分 (1本鎖部分) にプライマーがハイブリダイズすることで増幅反応が等温 (65°C前後) で継続する。さらに鎖置換型のDNAポリメラーゼ (*Bst* DNA polymerase) を使用することで、多量の増幅産物を得ることができる。増幅産物はターゲット領域が連続したカリフラワー様構造となる。

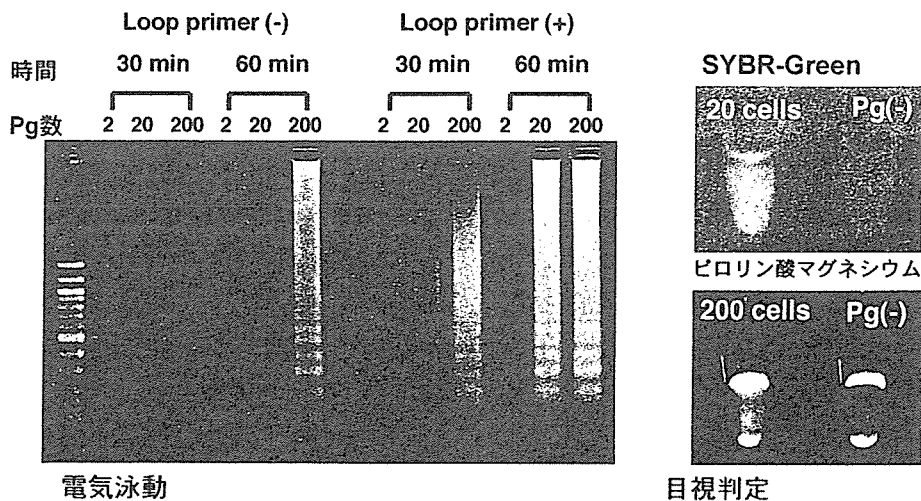


図6. LAMP法による歯周病細菌 (*P. gingivalis*) の検出 (Maeda *et al.*, (2005)²³ から引用)
 左図にはLAMP法による増幅産物の電気泳動像を示す。ループ部分にハイブリダイズするプライマー (loop primer) を追加することで増幅効率が上がり、約30分の反応で*P. gingivalis*の検出が可能である。また高い遺伝子増幅率はSYBR-Green添加や、反応副産物のピロリン酸マグネシウムの白濁による目視判定を可能にする (右図)。

この古細菌のrDNAを検出し、リアルタイムPCR法で定量した結果、進行した病巣では実に全細菌叢の20%近くをしめると報告している。LAMP法は口腔微生物フローラにおける古細菌や新規の口腔細菌の検出ならびに定量にも適用できよう。

5-3-2. PCR-DGGE解析法

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法はヒトの遺伝子変異検出のために用いられていた電気泳動法であった。この原理をMuyzerら²⁹⁾が河川、海洋および土壌をはじめとする環境微生物群集解析へ応用した。この方法はこの10年あまりで急速に環境微生物生態学研究に、また、生体における複雑な微生物フローラ解析研究にも普及した。このPCR-DGGE法を我々は歯周病巣細菌叢解析に応用した。PCR-DGGE法の原理を図に示す(図7)。

PCR-DGGE法ではまずGCクランプ(ゲル内で2本鎖DNAの完全解離を防ぐためのGCに富む配列)付きの細菌共通領域から設計した16S rDNA増幅プライマーで16S rDNA断片約580bpを増幅する。このPCR産物を変性ポリアクリルアミドゲル(尿素とホルムアミドの変性剤濃度勾配ゲル)にて65°Cで電気泳動する。ゲル温度と変性剤の濃度によって2本鎖DNAの構造変化が生じ、変性したDNA断片はゲルの網目構造を泳動されにくくなる。16S

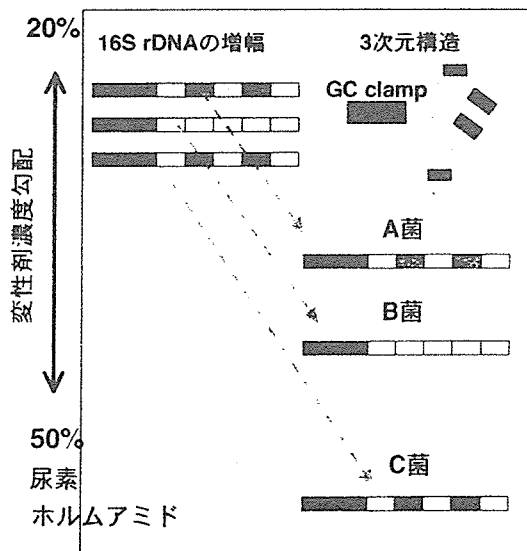


図7. DGGE法の原理

保存領域から設計されたプライマーによってフローラ中の各菌から増幅された16S rDNAは変性濃度勾配ゲル中で電気泳動される。増幅産物のDNA鎖長は菌種間ではほぼ同じだが、変性ゲル中では可変領域の配列の違いからそれぞれが異なった高次構造をとるようになる。この構造の違いによって各菌種の16S rDNAはゲルの異なった位置に展開される。プライマーに付与されたGCクランプ(■)によって完全な2本鎖DNAの完全解離は起こらない。

rDNAにおける細菌種特異領域の塩基配列の違いで、ゲル内での電気泳動移動度が異なり、それぞれの菌種から増幅されたDNA断片はバーコード状のDNAバンドとして分離され可視化される。さらに、分離されたDNAバンドを切り出して塩基配列を決定すれば、細菌16S rDNAデータベースより菌種の同定や既知種との系統関係を推定できる。

そこで、我々はまずこのPCR-DGGE法で歯肉縁下プラーク細菌叢解析を行った。個々のサンプルごとに特有の泳動パターンとなり、細菌叢の多様性が認められた。また、歯周ポケットの浅い部位からのサンプルはバンドのパターンも単純で細菌種も少なくレンサ球菌群等から構成されていた。しかしながら、病状が進行し歯周ポケットが深くなるに従って、検出バンドの数(構成細菌種)が増え、代表的な歯周病細菌*P. gingivalis*が優勢に同定された(図8)²⁹⁾。

細菌16S rDNAクローンライブラリー解析法²⁵⁻²⁷⁾も口腔微生物フローラ解析に現在用いられている方法である。それはプラークサンプルから全微生物DNAを抽出し、細菌16S rDNAをPCR法で増幅する。増幅遺伝子断片をプラスミドにクローニングして、その塩基配列を決定して、細菌種を同定し、網羅的に解析するものである。

PCR-DGGE法は16S rDNAクローンライブラリー法よりサンプルの微生物群集構造を泳動によって形成されるDNAバンドパターンによって視覚的に、簡便に分析することのできる有効な手法である。さらに多数のサンプルでもPCR-DGGE法ではそれぞれの細菌群集を一度に

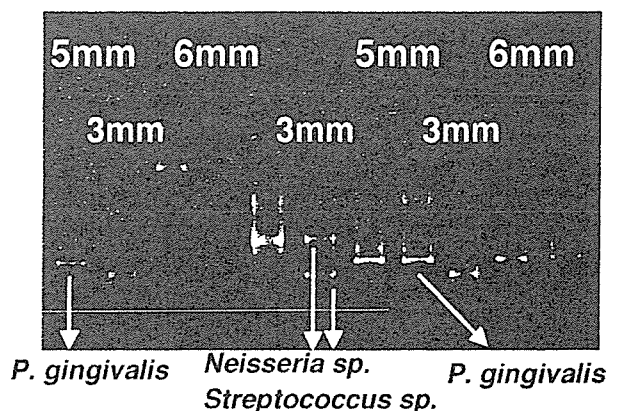


図8. DGGEによる歯肉縁下細菌叢の解析 (Fujimoto *et al.*, (2003)²⁹⁾ から引用)

歯肉縁下プラーク中の細菌から増幅した16S rDNAをDGGE法で展開した。それぞれのプラークサンプルの細菌叢はバンドパターンとして表現されている。歯周病の進行した深いポケット内の細菌叢は浅い歯周ポケットに比べて多種類の細菌で構成されていることが分かる。主要なバンドの塩基配列を解析して細菌種を同定したところ、深い歯周ポケットからは*P. gingivalis*が優勢に検出された。

DNAバンドのパターンとして比較分析でき、微生物群集構造の変化も容易に解析できる。PCR-DGGE法は感染根管内における細菌分布様態や歯科治療による口腔微生物フローラ遷移解析等にも応用できる有用な方法である。

一方、Sakamotoら³⁶⁾はT-RFLP法を口腔微生物フローラ解析に適用し、その有用性を報告している。T-RFLP法は、まずサンプル中の細菌16S rDNAをDNA合成の始点になるプライマーに蛍光色素を付けて増幅した後、制限酵素で切断する。制限酵素によって消化された様々なDNA断片をDNAシーケンサーでフラグメント解析を行い、口腔内細菌全体の種とその量の構成パターンを反映した「口腔細菌フローラのプロファイル」をクロマトグラムとして得るものである。

このような新しい分子生物学的手法を応用した細菌遺伝子を標的とする検出・定量法や微生物フローラ解析法によって、口腔微生物フローラがどのように全身健康に関わるのかが徐々に解明されつつある。

6. 全身健康への影響

一般に口腔微生物フローラは微妙な平衡を保ちながら、外界からの病原微生物の定着を妨げている。その平衡が重篤な疾病（白血病、免疫不全症、骨髄および臓器移植ならびに悪性新生物等）、各種感染症に対する抗生物質投与や加齢（特に要介護状態）等によって崩れたときには、菌交代症の発症や外界から一過性フローラの定着を許すことになり、これが深刻な日和見感染の問題を引き起こす。

介護が必要な高齢者の口腔衛生管理（いわば口腔微生物フローラ管理）が重篤な肺炎の予防に繋がるとして重要視されている³⁷⁾。最近、デンタルプラークと呼吸器疾患との因果関係が分子遺伝学的レベルで証明された。長期療養施設の高齢者患者のデンタルプラークを分析したところ、肺炎や日和見感染の原因菌である黄色ブドウ球菌、グラム陰性菌、緑膿菌を検出した。そのうち肺炎を発症した患者の歯垢と肺から分離された黄色ブドウ球菌、グラム陰性菌ならびに緑膿菌について、パルスフィールド電気泳動によるDNA分子疫学的分析の結果、歯垢および肺に潜む細菌の遺伝子型が一致したというものである³⁸⁾。

歯面や歯周縁下組織に形成され、成熟したデンタルフ

ラーク（口腔バイオフィルム）は機械的ならびに化学的除去に抵抗し、その治療および予防は困難であり、時に慢性、難治性疾患となる。このような病的状態の深部う蝕および重症の歯周病は菌性病巣感染症として全身の健康ならびに疾患へも影響することが広範な疫学的調査によって明らかになってきた。さらに、遠隔病巣組織に口腔病因細菌が存在することが分子生物学的手法、とくにPCR法あるいはFISH法による検出によって証明されるようになってきた。すなわち、誤嚥性肺炎、菌（敗）血症や細菌性心内膜炎をはじめ、心臓血管疾患（冠動脈疾患およびアテローム性動脈硬化症）の起因にも関わることが明らかとなった^{39, 35)}。

また、歯周病は糖尿病や妊娠障害（低体重児出産および早産）をはじめ様々な全身健康に直接的、間接的なメカニズムによって影響を及ぼすことが研究されている^{36, 37)}。

特に妊娠によって女性ホルモン（エストロゲンおよびプロゲステロン）の血中濃度が上昇し、歯肉溝滲出液へ移行すると、それを利用する*P. intermedia*や*Prevotella nigrescens*が歯肉縁下で増加し、妊娠性歯肉炎が起りやすくなる。それに伴い口腔内微生物フローラも変動し、う蝕発生のリスクも高まることに加えて、歯肉溝内では特に歯周病細菌のグラム陰性細菌群が増加し、この内毒素がIL-1等のサイトカインおよびプロスタグランジンの産生を誘導し、これらが妊娠障害を引き起こすとされている³⁹⁾。

また子供のう蝕予防には出産前から母親の唾液中のミュータンスレンサ球菌をフッ素およびクロルヘキシジン溶液の含漱によって減少させることが、有効とされる。このことは、母親の口腔微生物フローラが胎児の成育や健康に影響するばかりでなく、その後の子供の口腔微生物フローラ成因の良し悪しを左右することを示すものである。

一方、歯周病を有する糖尿病患者の口腔治療を行い、炎症マーカーのTNF- α 値や血糖コントロール値HbA1cを改善できたことや肝移植患者の口腔衛生管理によって病巣感染のリスクを軽減し、全身状態改善に導いたことが報告されている³⁹⁾。言い換えれば、これらは口腔微生物フローラの改善が全身健康に寄与することを示したものといえよう。

さて、一時期、胃潰瘍および胃がんの発症に関わるとして*Helicobacter pylori*は口腔微生物フローラがそのリザーバー（生息場所）として注目されたが、現在では口腔内からのこの菌の検出は一過性のものであることに落ち

ついた。最近になって、歯周病細菌である口腔内スピロヘータ *T. denticola* および口腔レンサ球菌の中で *Streptococcus anginosus* ならびに *S. mitis* が特に食道ガンの病巣組織から高頻度かつ優勢に検出されることが明らかとなった⁴⁰⁾。これら口腔細菌が口腔内から嚥下を通じて食道組織に定着し、そこに炎症を惹起し、ガン発症過程に関係していることが推察されており、注目される(図9)。

Paster²⁵⁾ は歯周病患者と健康人から得たプラークサンプルから細菌16S rDNAクローンライブラリーを作成しその細菌群集解析を行った。その結果、未知の難培養細菌を含めて口腔内には約500菌種にのぼる多様な微生物群集が存在することを明らかにした。しかしながら、口腔微生物フローラはどれだけの細菌種で構成されているのかは未だ結論は出ていない。舌苔について同様の方法で分析したKazor²⁶⁾ の報告では、口腔内には少なくとも600種以上の細菌種が生息していることを推定している。最新の分子遺伝学的な手法をもってしても複雑な口腔微生物フローラの全容の解析は道半ばであるのかもしれない。またPaster²⁵⁾ はTM7 (7) というPhylum (門) に属する新規の口腔ファイロタイプが歯周疾患と関連している可能性を指摘している。Kumar²⁷⁾ はこれ以外にも分離培養されていない様々な新規細菌種クローンと歯周病との関連も指摘している。その一方で *Atopobium* 細菌種や分離培養されていない新規の2細菌種等は口腔内の健康状態に寄与していることが推測され

ている。

Phylotypeと分類される新規口腔細菌種は、現在では16S rDNAの塩基配列情報のみが捉えられた段階である。多くの未知難培養細菌種の口腔疾患との関わりについては、これまでのように培養細菌を捉えて、その病原性を解明する方法をとることができないという難題がある。従って、口腔プラークから未知難培養細菌の全ゲノムDNAを回収して、遺伝子レベルからまずその難培養細菌の機能および病原性について調べるメタゲノム解析という新手法の適用が待たれる⁴¹⁾。

さらに口腔微生物フローラの解析が進めば、新規口腔細菌と全身疾患や健康との関連性が明らかになるかもしれない。

7. おわりに

これまでの口腔微生物学は口腔疾患(う蝕および歯周病)の病因細菌を単離し、その性状や病原性について研究することで一定の成果を挙げてきた。さらに分子生物学的手法を用いた口腔細菌の検出、同定および定量検査によって科学的根拠に基づいたより予知性の高い口腔疾患の診査・診断が可能になりつつある。一方、口腔疾患の予防と治療方策の1つは機械的、化学的除去方法での専門的ケアあるいはセルフケアによるデンタルプラークコントロールである。すなわち、プラークを量的に減少

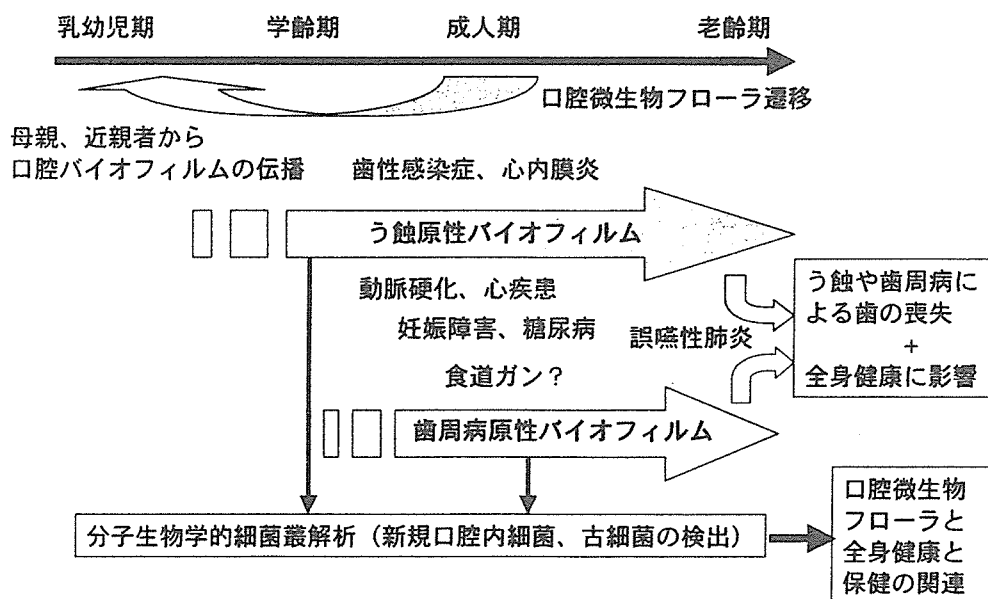


図9. 口腔微生物フローラの遷移と全身健康への影響

病原性をもった口腔内のバイオフィルムは全身疾患にも影響を及ぼす。全身的な疾患の治療や予防、健康増進のためにも分子生物学的な口腔細菌叢の解析とこれに基づいた細菌叢のコントロールが必要である。

させることで、それに伴う口腔微生物フローラ遷移を期待している。これに対して現在、ある種の乳酸菌を使ってう蝕原性細菌や歯周病細菌を抑制するというプロバイオティクスや乳酸産生を人為的に欠損させう蝕原性を減弱させた*S. mutans*によるリプレースメントセラピーによって積極的に口腔微生物フローラのバランスを人為的に変えようとする試みがなされている。一旦、口腔微生物フローラの恒常性 (ecosystem) が確立されてしまった状態では、それを変えることには困難が予想される。しかしながら、口腔微生物フローラ解析研究によって新しい有益細菌種が見つかり、その発育や活動を活発にする物質を補充するプロバイオティクスやそれと同時に有益細菌をプロバイオティクスとして用いるシンバイオティクスによっては口腔微生物フローラを変化させることができるかもしれない。さらに、バイオフィーム形成に関わるとされるクオラムセンシングシステムを化学的にうまくコントロールできれば、口腔微生物フローラを変化させることがより容易になるであろう。

近い将来、口腔微生物フローラの全容を把握し、理解することができれば、プラークコントロールからフローラコントロールによって口腔疾患を予防し、制御することが可能となるかもしれない。デンタルプラークを口腔バイオフィームとして捉え、その多様で複雑な微生物フローラについて分子生物学的解析研究が進められている。それは、多くの未知難培養細菌の存在を明らかにし、細菌群集の遷移と口腔疾患病態との関連だけでなく、全身健康との関わりについても新しい知見を与えてくれている。例えば、これまでは森の中の特定の樹木にばかり注目を払ってきたが、今後は森の細部にわたって全体を眺め渡すことが可能に、そして必要になってきたといえる。全身健康や保健に寄与する口腔微生物フローラ解析研究がますます重要になってきた。

引用文献

- 1) 高橋尚人, 仁志田博司, 新井敏彦, 福田雅文, 星順, 渡辺洋子, 加部一彦, 坂元正一, 内山竹彦, 荒明美奈子, 阿部廣幸, 安藤智博, 日本新生児学会雑誌, 25, 824-828(1990).
- 2) E. Könönen, *Oral Dis.*, 5, 278-285(1999).
- 3) P. E. Kolenbrander, R. N. Andersen, D. S. Blehert, P. G. Eglund, J. S. Foster and R. J. Jr. Palmer, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 486-505(2002).
- 4) P. W. Caufield, G. R. Cutter and A. P. Dasanayake, *J. Dent. Res.*, 72, 37-45(1993).
- 5) 荅口進, 村山洋二, "プログレッシブテクニック 臨床医のた

- めの歯周治療", 石川烈, 山田了編, 永末書店, 2001, pp. 4-7.
- 6) M. E. Ring, *N Y State Dent. J.*, 68, 34-37(2002).
- 7) J. K. Clarke, *Br. J. Exper. Pathol.*, 5, 141-147(1924).
- 8) P. H. Keyes, *Int. Dent. J.*, 12, 443-464(1962).
- 9) H. Löe, E. Theilade and S. B. Jensen, *J. Periodontol.*, 36, 177-187(1965).
- 10) H. L. Ritz, *Arch. Oral Biol.*, 12, 1561-1568(1967).
- 11) 荅口進, 村山洋二, "最先端医療シリーズ歯科医学2: 歯周病-新しい治療を求めて", 岡田宏, 石川烈, 村山洋二, 石田甫編, 先端医療技術研究所, 2000, pp. 215-222.
- 12) N. G. Clarke and R. S. Hirsch, *J. Clin. Periodontol.*, 22, 136-145(1995).
- 13) A. D. Haffajee and S. S. Socransky, *Periodontol. 2000*, 5, 78-111(1994).
- 14) M. J. Duncan, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 14, 175-187(2003).
- 15) J. W. Costerton, P. S. Stewart and E. P. Greenberg, *Science*, 284, 1318-1322(1999).
- 16) S. S. Socransky and A. D. Haffajee, *Periodontol. 2000*, 28, 12-55(2002).
- 17) P. D. Marsh, *Caries Res.*, 38, 204-211(2004).
- 18) S. S. Socransky, A. D. Haffajee, C. Smith, L. Martin, J. A. Haffajee, N. G. Uzel and J. M. Goodson, *Oral Microbiol. Immunol.*, 19, 352-362(2004).
- 19) P. T. Sunde, I. Olsen, U. B. Göbel, D. Theegarten, S. Winter, G. J. Debelian, L. Tronstad and A. Moter, *Microbiology*, 149, 1095-1102(2003).
- 20) F. Cavrini, V. Sambri, A. Moter, D. Servidio, A. Marangoni, L. Montebugnoli, F. Foschi, C. Prati, R. Di Bartolomeo and R. Cevenini, *J. Med. Microbiol.*, 54, 93-96(2005).
- 21) G. Mayanagi, T. Sato, H. Shimauchi and N. Takahashi, *Oral Microbiol. Immunol.*, 19, 379-385(2004).
- 22) H. Maeda, C. Fujimoto, Y. Haruki, T. Maeda, S. Kokeguchi, M. Petelin, H. Arai, I. Tanimoto, F. Nishimura and S. Takashiba, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 39, 81-86(2003).
- 23) H. Maeda, S. Kokeguchi, C. Fujimoto, I. Tanimoto, W. Yoshizumi, F. Nishimura and S. Takashiba, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 43, 233-239(2005).
- 24) 津田啓方, 山下喜久, *Dental Diamond*, 12, 65-70(2004).
- 25) B. J. Paster, S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe and F. E. Dewhirst, *J. Bacteriol.*, 183, 3770-3783(2001).
- 26) C. E. Kazor, P. M. Mitchell, A. M. Lee, L. N. Stokes, W. J. Loesche, F. E. Dewhirst and B. J. Paster, *J. Clin. Microbiol.*, 41, 558-563(2003).
- 27) P. S. Kumar, A. L. Griffen, J. A. Barton, B. J. Paster, M. L. Moeschberger and E. J. Leys, *J. Dent. Res.*, 82, 338-344(2003).
- 28) M. Sakamoto, Y. Huang, M. Ohnishi, M. Umeda, I. Ishikawa and Y. Benno, *J. Med. Microbiol.*, 53, 563-571(2004).
- 29) C. Fujimoto, H. Maeda, S. Kokeguchi, S. Takashiba, F. Nishimura, H. Arai, K. Fukui and Y. Murayama, *J. Periodontol. Res.*, 38, 440-445(2003).
- 30) T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonakawa, K. Watanabe, K. Amino and T. Hase, *Nucleic Acids Res.*, 28, E63(2000).
- 31) P. W. Lepp, M. M. Brinig, C. C. Ouverney, K. Palm, G. C. Armitage and D. A. Relman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6176-6181(2004).