

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659863

研究課題名（和文）潜在的病原性を有する口腔難培養菌の分離培養戦略

研究課題名（英文）In vivo cultivating system for oral biofilm bacteria.

研究代表者

金本 大成 (KANAMOTO TAISEI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：20260755

研究成果の概要（和文）：従来の培養法では培養できない常在菌を高効率に培養し取得する目的で、多孔性中空糸膜を応用したヒト口腔内で使用可能な口腔バイオフィーム細菌培養装置を開発し運用した。このシステムは、通常の培養方法に比べ、より高い効率での培養が可能であった。しかし、取得した菌株の新規性と多様性については、期待した程の優位性は見られなかった。新規性の高い菌株の取得には、装置および運用法の更なる改良が必要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Oral biofilm flora contains over a thousand of bacterial strains and some of them are fastidious in growth. To cultivate these fastidious oral bacteria effectively, we have invented an *in vivo* cultivating system using hollow fiber membrane chamber. With our system, we could acquire oral bacteria in higher efficiency than that with the conventional cultivation method. However, our system did not excel in diversity and novelty of the bacterial strains acquired.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来の感染症の概念においては、口腔常在菌のような、いわゆる弱毒菌には医学上の重要性はほとんどないと考えられてきた。しかし、近年、口腔細菌は、う蝕や歯周病などの口腔疾患だけでなく、感染性心内膜炎や誤嚥性肺炎などの全身感染症のリスクファクターとして重要性が認識されるようになってきた。口腔には、細菌の生育に必要な栄養や水が豊富である上に、好気環境（歯や粘膜の表面）と嫌気環境（歯肉溝、デンタルプラーク深部）、軟組織（粘膜）と硬組織（歯）が共に存在し、また、温度や pH の恒常性は基本的に保たれているが、食事等により時々極端な変動がある、という

微生物学的にユニークで複雑な環境がある。そのため、口腔には生体においてもっとも多様かつ高密度の細菌叢が形成されている。ところが腸内などとは違ってアクセスが容易な部位にもかかわらず、口腔細菌叢の全容は明らかになっていない。その理由のひとつには口腔に限らずヒト常在細菌叢の少なからぬ割合を占めていると推定されている「生存するも培養不可能な（viable but non-culturable, 以下 VBNC と略）細菌」の存在がある。細菌の本来の生育環境と現行技術による培養環境の違いは大きく、生体や環境に生息する菌の 0.01～4% 程度しか人工的に培養できないと言われている。実際、感染性心内膜炎の臨床においては原因菌同

定のための血液検体が培養陰性となる症例が5~35%存在するという報告があり、治療上の大きな問題となっている。

(2) 生体に寄生し潜在的な病原性を持つにもかかわらず、培養条件の特殊性のために培養不能となっている細菌の分離・培養が可能になれば、培養陰性として適切な治療や処置がなされずにきた感染性疾患の解明に役立つと考えられる。さらに、宿主や他の細菌と様々な相互作用しながら、宿主免疫能をかいくぐって皮膚や粘膜表面に棲息し続ける常在菌は、有用生物資源の面からも興味深い。そこで、多様かつ高密度の常在菌のリザーバーであり、また、多くの外来性細菌の通過経路になっている口腔からVBNC細菌を含む口腔バイオフィルム細菌を高い効率で培養することを考えた。

2. 研究の目的

(1) 貧栄養の水界環境におけるVBNC細菌の分離培養のために研究分担者の常田らが開発した2種類のゲルと多孔性中空糸膜を用いた細菌培養システム（以下、Dual-Gel HFMC培養システムと略）を応用し、ヒト口腔内で運用可能なVBNC菌を含む口腔バイオフィルム細菌を高い効率で獲得可能な培養システムを開発する。

(2) 上記システムを用いてヒト口腔バイオフィルムから獲得した菌株の生化学的、分子遺伝学的解析を行い、それらの菌の病原性や有用性、分類学的な新規性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 被験者

20代の男女各2名のボランティアにおいてDual-Gel HFMC培養システムを運用し、検体を得た。各ボランティアはいずれも非喫煙者で口腔および全身に健康上の問題は特にみられなかった。

(2) 倫理上の配慮

本研究課題は、ボランティアに口腔内培養装置を装着し検体の提供を受けるものであった。そのため、研究を開始する前に研究の目的、実験方法、同意説明文書などを研究を実施する聖マリアンナ医科大学と早稲田大学の生命倫理に関する委員会にそれぞれ提出して審査を受け、研究実施の承認を得た。研究が進行する中で上記申請内容に変更がある場合は、その都度、変更届を提出し承認を得た。

(聖マリアンナ医科大学 生命倫理委員会承認番号第1556号、早稲田大学 人を対象とする研究に関する倫理委員会 申請番号2009-81)

(3) Dual-Gel HFMC 培養システム

多孔性中空糸膜内でアガロース微小ゲル(GMD、粒径30~50 μm)に包埋した細菌を培養する手法であり、細菌が実際に生育している環境(口腔内)に装置を投入して培養する。中空糸膜は孔径0.1 μm の穴を多数持ち、菌およびGMDは膜外に出ることはできないが、環境中に存在する水と栄養分、宿主および菌からの代謝産物やシグナル物質などは出入りが可能である。

① 口腔から綿棒またはデンタルフロスにて採取した口腔バイオフィルムを生理食塩水に懸濁した。一部を染色して菌数を計測し、1個のGMD中に1または0個の菌体を含むように濃度を調製した。Cell Sys 100 Microdrop Maker (One Cell Systems, Inc. MA, USA)にゲルマトリックスと検体をセットし、装置製造元の説明に従ってゲルマトリックスと検体を攪拌することで菌体を内包するGMDを作成した(図1)。

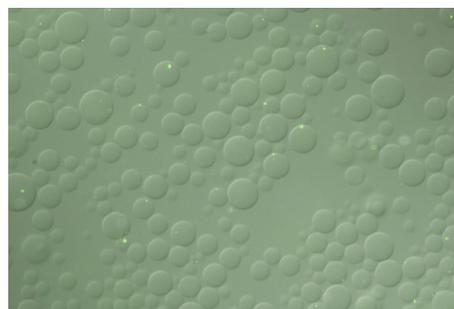


図1. 菌体を含むGMD(培養前)

② 菌を含むGMDを1%アルギン酸ナトリウム水溶液と混和し、中空糸膜内に封入した。この中空糸を塩化カルシウム溶液で処理することでアルギン酸ナトリウムをゲル化した。ゲルは中空糸膜の形を保つと共に過成長によりGMDから漏れ出た菌体が他のGMDに付着することを防ぐ。

③ 前もって被験者の口腔の形状に合わせて作成しておいた中空糸膜を収める空間を持つ可撤式装置にGMDを封入した中空糸膜を取り付けた(図2)。可撤式装置は、食事や歯磨き時を除いて口腔内(上顎部)に3日間において可及的長時間装着して口腔バイオフィルム細菌を培養した(1次培養)。

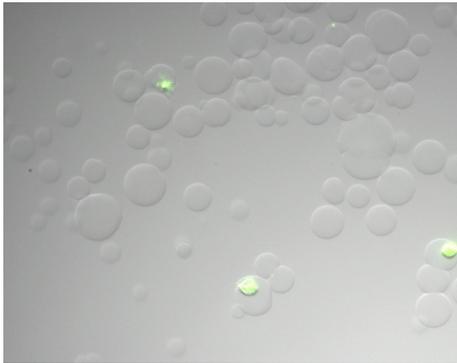


図2. 可撤式口腔内培養装置
(左:床型、右:マウスピース型)

(4) 2次培養と取得菌株の同定

3日間の口腔内培養の後、中空糸膜から取り出した GMD を密度勾配遠心法によって洗浄、回収した。一部を染色し、菌体の入った GMD の割合を計測した (図 3)。1 プレートあたり 200 個の菌体入り GMD を含むようにヒツジ血液寒天培地に播き、37°C、2 週間、好気または嫌気環境で培養した (2 次培養)。培地上に生育したコロニー数をカウントし、培養効率を次の式で算出した。培養効率 (%) = 平板培地上のコロニー数 / 播種した菌体入り GMD 数 (200) × 100

図 3. 口腔内培養後の GMD (洗浄済)



平板培地から拾ったコロニーからゲノム DNA を抽出し、16S rRNA シークエンス解析により、菌種を同定した。1 次培養を経ずにヒツジ血液寒天培地に菌体入り GMD を播種し好気または嫌気培養した場合と本システムにより口腔内培養を加えた場合との培養効率および獲得された菌株の多様性と新規性を比較した。

4. 研究成果

H23~24 年度に 4 人の被験者に対し、延べ 20 回の本システムによる口腔内培養実験を行った。研究前半では主として口腔内培養装置の開発と運用プロトコルを決定するために実験を行った。研究後半にはそれまでの結果を踏まえて培養実験を行ったが、手技上の問題や未確定の原因のため有効なデータを取得できなかったことがあった。

本システムを用いて口腔バイオフィルム検体を口腔内培養した場合は、同じ検体を口腔内培養を経ずに従来法である平板培地で培養した場合に比べ、より高い効率での培養が可能であった。しかし、取得した菌株の新規性と多様性については、研究前に期待した程度の優位性は見られなかった。取得された菌株の多様性は被験者毎にある程度の特徴がみられたが、この多様性の違いが実際のものなのか、実験手技に起因するものなのかは更なる検討が必要である。以下に 3 人の被験者(男

性 1 名 [M2]、女性 2 名 [F1、F2]) に対して延べ 4 回実施した培養実験の結果を示す。

(1) 培養効率

2 次培養が好気または嫌気にかかわらず、すべての培養実験において口腔内培養を行った方が行わなかった場合よりも高い培養効率を示した。また、口腔内培養の培養効率向上効果は 2 次培養を好気で行った場合の方が嫌気の場合よりも著しいという傾向があった (表 1)。

表 1. 培養効率 (%)

2 次培養	被験者	口腔内培養	
		あり	なし
好気	M2-1	14.1	2.4
	M2-2	12.1	3.4
	F1	16.6	2.7
	F2	35.0	5.1
嫌気	M2-1	13.2	9.4
	M2-2	10.3	9.5
	F1	15.7	8.6
	F2	13.7	1.4

(2) 取得菌株の多様性

5 つの門から合計で 28 属 49 種 527 株を得た。内訳は以下の通り。Firmicutes (9 属 18 種)、Actinobacteria (7 属 12 種)、Proteobacteria (10 属 15 種)、Bacteroidetes (1 属 3 種)、Fusobacteria (1 属 1 種)。そのうち口腔内培養を経た場合のみに得られたのは 16 種、口腔培養を経ずに直接 GMD を血液寒天培地に播種し培養した場合に得られたのは 20 種であった。残りの 13 種はどちらの培養方法でも取得することができた。それぞれの培養方法で取得した菌名と菌株数を表 2 に示す。

表 2. 取得菌種

菌名	口腔内培養		なし	
	2 次培養	あり	好気	嫌気
<i>Streptococcus gordonii</i>	2	2		
<i>Streptococcus sanguinis</i>	6	10	2	2
<i>Streptococcus mutans</i>			1	1
<i>Streptococcus mitis</i>	32	71	9	39
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10	3		2
<i>Streptococcus parasanguinis</i>		1		
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	3	1	
<i>Streptococcus milleri</i>	1			1
<i>Streptococcus cristatus</i>	1	1		
<i>Granulicatella adiacens</i>	10	12	4	13
<i>Granulicatella elegans</i>		2		
<i>Abiotrophia defectiva</i>	3	6	5	

<i>Gemella morbillorum</i>	9			
<i>Parvimonas micra</i>	4			
<i>Oribacterium sinus</i>	2			
<i>Veillonella parvula</i>			5	
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	1			
<i>Solobacterium moorei</i>			3	
<i>Atopobium parvulum</i>	1		3	
<i>Atopobium rimae</i>			1	
<i>Actinomyces naeslundii</i>		40	18	
<i>Actinomyces viscosus</i>		6	1	
<i>Actinomyces meyeri</i>			1	
<i>Propionibacterium australiense</i>			3	
<i>Propionibacterium acnes</i>	1			
<i>Propionibacterium propionicum</i>			1	
<i>Actinomyces georgiae</i>			4	
<i>Actinobaculum urinale</i>	1			
<i>Rothia dentocariosa</i>		6		
<i>Corynebacterium durum</i>		2		
<i>Aggregatibacter segnis</i>	8	4		
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>			1	
<i>Cardiobacterium hominis</i>			2	
<i>Eikenella corrodens</i>	3	9		
<i>Brachymonas denitrificans</i>			2	
<i>Kingella potus</i>			4	
<i>Neisseria flava</i>	23	10	4	
<i>Neisseria subflava</i>	14	1		
<i>Neisseria lactamica</i>			7	
<i>Neisseria perflava</i>	3		9	
<i>Neisseria elongata</i>	18	1	1	1
<i>Kingella denitrificans</i>			1	1
<i>Lautropia mirabilis</i>			1	
<i>Methylobacterium isbiliense</i>	1			
<i>Campylobacter concisus</i>		2		
<i>Capnocytophaga ochracea</i>			11	
<i>Capnocytophaga granulosa</i>			1	
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	4	6	3	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>			1	
計	140	164	122	101

*口腔内培養を経た場合のみ取得可能であった菌種をハイライトした。

(3) 取得菌株の新規性

取得した菌株が属する上記5つの門は口腔常在細菌の属する門としては一般的なものであった。TM7、SR1や *Synergistetes* など、口腔に常在する可能性が示唆されるも未培養の菌を含む門に属する菌株の取得はならなかった。既知の菌種との16S rRNA シークエンスの相同性が98%未満だった菌種数は口腔内培養を経た場合4、口腔内培養をしない場合5であった。

(4) 改善すべき点

口腔バイオフィルム細菌の培養において本研究で開発した口腔内培養システムを使用することで培養効率の向上がみられたが、取得した菌株の新規性と多様性については当初期待した程の効果はみられなかった。効率よく新規性の高い難培養菌や未培養菌を獲得するためには、以下の問題点を改善する必要があることが本研究を遂行する過程でわかった。

①口腔内に優勢に存在し易培養性で新規性の低い *Streptococcus* 属のような細菌をスクリーニング・アウトする方法が必要である。いくつかのアプローチが考えられるが、スクリーニング・アウトを口腔内培養の前に行う場合は、被験者に対して害のない方法でなくてはならない。

② GMD に菌を包埋する過程で加熱 (42℃) と冷却 (氷上) の必要がある。また、この作業は好気環境で行っている。このため、温度変化や好気環境に弱い菌種にはこれらの刺激が増殖に対するストレスになっている可能性がある。検体に対して可及的にストレスを与えない方法を検討する必要がある。しかし、何らかのストレスによって増殖のスイッチが入る菌種もあると考えられるので、その方向性での検討も必要である。

③ 2次培養はヒツジ血液寒天培地を用いて37℃で行ったが、菌種によっては口腔内での1次培養で増殖することができても2次培養の段階で増殖能が失われている可能性がある。培地、温度、期間など2次培養における培養条件の更なる検討が必要である。低温または高温、何らかの栄養素を添加した液体培地などの検討が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計2件)

1. 北川真衣、鈴木拓也、常田聡、金本大成、青井輝義. *In vivo* 培養システムの開発と口腔内に生息する未培養性微生物の取得・解明. 第14回化学工学会学生発表会東京大会、2012年3月3日、東京工業高等専門学校(東京都)

2. 北川真衣、青井輝義、鈴木拓也、金本大成、常田聡. *In vivo* 培養システムの開発と口腔内に生息する未培養性微生物の取得・解明. 2011年度バイオフィルムと複雑系研究会、2011年10月22日、早稲田大学TWIns(東京都)

〔その他〕

ホームページ等

Tsuneda Laboratory

<http://www.waseda.jp/sem-tsuneda/japanese/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金本 大成 (KANAMOTO TAISEI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：20260755

(2) 研究分担者

常田 聡 (TSUNEDA SATOSHI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：30281645