

- 原著 -

ヒト口腔由来と腸管由来の *Enterococcus faecalis* に
おける遺伝学的検討中 條 和 子^{1,2)}, 中 澤 太¹⁾, 星 野 悦 郎¹⁾新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
口腔健康科学講座¹⁾口腔環境・感染防御学分野, ²⁾う蝕学分野Phylogenetic Diversity of *Enterococcus faecalis* from
Human Oral Cavities and Intestinal TractsNakajo Kazuko^{1,2)}, Nakazawa Futoshi¹⁾, Hoshino Etsuro¹⁾Division of Oral Ecology in Health and Infection¹, Cariology²,
Department of Oral Health Science, Course for Oral Life Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

平成15年11月14日受付 11月14日受理

Key words : *Enterococcus faecalis*, 16S rDNA sequence similarity (16SリボソームDNA塩基配列類似性),
Phylogenetic diversity (遺伝学的多様性) Human oral cavities and intestinal tracts (ヒト口腔由来株と
腸管由来株)

Abstract : *Enterococcus faecalis* has been isolated frequently from human intestinal tracts. Also we have reported previously that these bacterial species has been occurred as predominant alkali resistant bacteria in human infected root canals. The aim of this study is to evaluate phylogenetic diversity of 16S rRNA of the human oral *E. faecalis*.

In the present study, we used 9 strains of *E. faecalis*, ATCC 19433^T, 4 strains isolated from human infected root canals and 4 strains isolated from human feces. From cells of these bacterial strains, genomic DNAs were extracted by using InstaGene Matrix and used as templates for amplification of 16S rDNA with universal primer sets in Polymerase Chain Reactions (PCR). For cycle sequence method of 16S rDNA sequence analysis, a Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit was used with the 11 universal primer sets labeled with Cy-5, following the manufacture's protocol. Sequences of 16S rDNA were analyzed with a DNA sequencer. The segmented nucleotide sequences of 16S rDNA were connected using Seqman in LASERGENE computer program. Sequence similarity was analyzed by a clustal W method, which is programmed by Megalign in the LASERGENE computer program.

16S rDNA sequences of the *E. faecalis* reference strain (ATCC 19433^T) was highly similar (98.4~100%) to those of the feces isolates and oral isolates, respectively. On the other hands, when the 16S rDNA sequences of oral isolates were compared to those of isolates from feces, these similarities were ranged widely and low (93.1~99.1%). These results of the present study has suggested that some of human oral *E. faecalis* may adapt to oral conditions and change genetically.

抄録 : *Enterococcus faecalis*はヒトの腸管細菌叢に広く生息している。我々はこれまで、本菌種が感染根管象牙質から検出されることや、強いアルカリ耐性を示すことを報告してきた。今回は、生息の場の違いによる遺伝学的変異を明らかにする目的で、感染根管及び腸管分離 *E. faecalis* について、その16S rRNA geneの塩基配列を明らかにし、相

互に比較検討した。

E. faecalis の標準株 ATCC 19433 の他, 感染根管象牙質, およびヒト糞便から得た *E. faecalis* 分離株を用い, その培養菌体から InstaGene Matrix にて DNA を抽出した。その DNA を template とし, universal primers を用いて PCR 法にて 16S rDNA を増幅後, 精製 16S rDNA, Thermo Sequenase Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP と 11 種類の primer にて PCR し, ALF express を使ってその塩基配列を明らかにした。更に sequence 解析プログラム LASERGENE を用いて相互の sequence similarity を明らかにし, 遺伝学的相互関係を検討した。

その結果, 根管由来と腸管由来の菌株それぞれと, 標準株との比較では著しく高い同一性 (98.4 ~ 100 %) を示したのに対し, 根管由来と腸管由来の菌株間の同一性は 93.1 ~ 99.1 % であった。これらの結果から, 根管由来と腸管由来の *E. faecalis* においては, 生息の場の違いと共に菌株間にも遺伝学的差異が認められた。

諸 言

ヒトの生体には多種多様の細菌種が生息し, その生息場所に応じた独自の細菌叢を形成している。即ち, 細菌はそれぞれに最も適した環境を持つ場所に生息し, その細菌叢は独特の細菌群によって構成され, それぞれに遺伝学的進化を展開していると考えられる。例えば, ヒト歯周病の原因菌の 1 つとされる黒色色素産生性グラム陰性桿菌 *Porphyromonas gingivalis* は, その大部分が口腔領域に生息しており, 非口腔領域から分離され生物学的に酷似している菌種 *Porphyromonas asaccharolyticus* と遺伝学的に異なっていることが明らかにされている¹⁾。また, これまで同じ *Lactobacillus* 属の細菌種として分類されていた *Lactobacillus uli* と *Lactobacillus rimae* は, 16S リボソーム RNA (16S rRNA) gene の塩基配列を明らかにした近年の研究によって, 発生遺伝学的に *Lactobacillus* 属の基準菌種とは極めて異なっていることが明らかになり, ヒト口腔内に生息する *Lactobacillus uli* は *Olsenella uli* として, また非口腔由来の *Lactobacillus rimae* は *Apotobium rimae* として, 新しく再分類されている²⁻⁴⁾。同様なことは *Propionibacterium acnes* にも見られ, ヒト口腔内から分離される *P. acnes* 株は, ヒトの皮膚などに生息し, ニキビなどの炎症を起こす *P. acnes* の分離株とは異なった生化学的性状を示すことが知られ, 生息場所の異なる *P. acnes* は遺伝学的にも異なる可能性が示唆されている⁵⁾。

Enterococcus faecalis はヒトの腸管細菌叢に広く生息する通性嫌気性グラム陽性球菌である。長い間, 本菌種は *Streptococcus* 属の血清 D 群に属する *Streptococcus faecalis* として分類されていた。しかし, 細菌の DNA を用いた分類方法の導入によって DNA-DNA hybridization による DNA 同一性において *Streptococcus* 属の他の菌種との間に著しい違いがあることが明らかになり, *Enterococcus faecalis* として再分類された^{6, 7)}。また表現形質においても *E. faecalis* は *Streptococcus* 属細菌種とは異なり 6.5 % NaCl 存在下で生育することも報告されている⁸⁾。

一方, *E. faecalis* はヒト歯蝕象牙質や歯内病巣部から分離されることが知られている。現在, 根管治療において最も効果が期待される薬剤のひとつとして, 水酸化カルシウム製剤が広く使用されている。しかし, 水酸化カルシウム製剤貼薬後の根管から, *Enterococcus* 属細菌種が高頻度に分離されることが報告されている^{9, 10)}。また, 高濃度アルカリ性培地を用い, 根尖性歯周炎, 歯周歯内病変におけるアルカリ耐性細菌を検討した結果, *E. faecalis* が高い頻度で検出され, アルカリ耐性細菌としての *E. faecalis* の重要性が指摘されている¹¹⁾。

本研究では, これらヒト口腔から分離される *E. faecalis* の由来を明らかにする目的で, ヒト口腔内から分離した *E. faecalis* と, ヒト腸管由来と考えられる糞便から分離した *E. faecalis* を用い, その 16S rRNA gene の塩基配列を明らかにし, 相互の遺伝学的類縁性を比較検討した。

材料および方法

1: 使用細菌株

Enterococcus faecalis の標準株である ATCC 19433 株の他, 表 1 で示したヒト口腔由来 (感染根管から分離) の 4 株と, ヒト腸管由来 (糞便から分離) の 4 株を用いた。

2: 細菌種の同定方法

1) 一般性状検査: 本研究で用いた分離株は, 純培養を確認した後, Virginia Polytechnic Institute manual¹²⁾ に準じて性状検査を行った。また Pepton-yeast extract-glucose (PYG) broth に産生された最終産物をガスクロマトグラフィーを用いて分析を行い^{13, 14)}, 更にグラム染色, 6.5 % NaCl 含有培地における生育の確認を行った。

2) Polymerase Chain Reactions (PCR) 法: BHI 血液寒天平板に培養した菌株のコロニーをエッペンドルフチューブに採取し, 滅菌生理食塩水で遠心洗浄後, InstaGene Matrix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を加え, 通法に従って加熱処理を加