

氏名	山 本 龍 生		
学位(専攻分野)	博 士(歯 学)		
学位授与番号	博 甲 第 1113 号		
学位授与の日付	平成 5 年 3 月 28 日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文題目	歯肉縁上歯垢より分離した <i>Capnocytophaga</i> 属の二新種について		
論文審査委員	教授 渡邊 達夫	教授 谷口 茂彦	教授 福井 一博

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

Capnocytophaga 属は二酸化炭素要求性で滑走運動を行うグラム陰性桿菌である。この菌は口腔内常在菌であるが、若年性歯周炎や日和見感染による敗血症の原因菌としても注目されてきた。一方、森田らは歯石保有者の歯肉縁上歯垢に *Capnocytophaga* 属が多いことを報告し、歯石形成に関与する可能性を示唆した。また、DNA 相同性で種の同定を行うと、約 25% の菌株は *Capnocytophaga* 属の基準株との DNA 相同性が低く、未同定の種の存在を示唆した。

本研究では、種の同定ができなかった菌株の形態学的、生化学的、遺伝子学的性状を調べ、その分類学的な検討を行うことを目的とした。

【材料と方法】

1. 菌の分離

岡山大学歯学部附属病院外来初診患者の歯肉縁上歯垢を嫌氣的に採取し、*Capnocytophaga* 属の選択培地である TBBP 培地（羊脱線維素血，バントラシン，ポリミキシン B 添加トリプテケース・ソイ寒天培地）に播種した。37℃，5 日間嫌気培養した後、*Capnocytophaga* 属に類似したコロニーを釣菌した。

2. 種の同定

6 種の ATCC 株 (*Capnocytophaga gingivalis* ATCC 33624, *C. ochracea* ATCC 27872, ATCC 33595, ATCC 33596, *C. sputigena* ATCC 33612, *C. sp.* ATCC 23817) を対照株として DNA 相同性により種の同定を行った。未同定の菌株を対象として以下の性状を調べ、対照株と比較、検討した。

3. 形態学的性状

コロニーはTBBP培地と血液寒天平板培地上で観察した。菌体はグラム染色後、光学顕微鏡で観察した。菌の微細構造は、超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察した。

4. 生化学的性状

一般的な生化学的性状の他に、アミノペプチダーゼ活性は6種の β -ナフチルアミド誘導体を基質として測定した。菌体脂肪酸は塩酸メタノール法による脂肪酸のメチル化の後、ガスクロマトグラフィーで分析した。イソプレノイドキノンはクロロホルム・メタノール抽出、薄層クロマトグラフィーでの精製の後、高速液体クロマトグラフィーで分析を行った。

5. 遺伝子学的性状

Saito and Miuraの方法でDNAを精製した。DNA相同性は、非RIでマイクロタイタープレートを用いたDNA-DNAハイブリダイゼーション法で調べた。DNAのグアニン・シトシン含量(GC含量)は、DNAをヌクレオシドに分解した後、高速液体クロマトグラフィーで分析した。

【結果】

20人から376株分離した。そのうち対照株とのDNA相同性が低い(20%以下)38株を、さらにDNA相同性により24株(グループA)と14株(グループB)に分けた。A、Bの各グループ内のDNA相同性はそれぞれ82%以上、64%以上であった。この二種を本研究の対象とした。

グループA、Bとも*Capnocytophaga*属に特徴的な性状を示した。すなわち、形態学的にはグラム陰性桿菌であり、生化学的にはコロニーの橙色色素産生能(+), 滑走運動能(+), 二酸化炭素要求性(+), カタラーゼ反応(-), オキシダーゼ反応(-), 硫化水素産生能(-), インドール産生能(-), 胆汁による菌の増殖阻害(+), グルコース, ラクトース, マルトース, マンノース, スターチ, スクロースの発酵能(+), マンニトール, リボース, ソルビトール, キシロースの発酵能(-), グルコースの終末代謝産物として酢酸, コハク酸の産生(+))であった。菌体脂肪酸は*i*-C_{15:0}が主成分であり、イソプレノイドキノンはMK-6メナキノンが主成分であった。

グループA、Bが既知の*Capnocytophaga*種と異なる性状は以下のとおりである。グループAは初代培養株がTBBP培地で β 型溶血を示し、アミノペプチダーゼ活性は認められなかった。DNAのGC含量は、既知の*Capnocytophaga*種よりも高く、DNA相同性は、グループBを含めたその他の種に対して7%以下であった。グループBは菌体内に顆粒を持ち、好気で増殖が可能であった。GC含量は既知の*Capnocytophaga*種よりも高く、DNA相同性は、グループAを含めたその他の種に対して19%以下であった。

【考察および結論】

グループA、Bはともに*Capnocytophaga*属に特徴的な性状を示し、しかもDNA相同性をはじめとして既知の種とは異なる性状を備えていた。従って、この二種は*Capnocytophaga*

属の新種であると考えられる。

1989年、Brennerらは、*Capnocytophaga* 属の新種を報告した。しかし、これらは1979年に Leadbetter らが提示した *Capnocytophaga* 属の所用条件に合致しない点があり、かつグループA、Bとも明らかに性状が異なっていたため、対照株に含めなかった。

それぞれの特徴に基づき、グループAを *Capnocytophaga haemolytica*、グループBを *Capnocytophaga granulorum* と命名し、*Capnocytophaga* 属の新種として埼玉県和光市の Japan Collection of Microorganisms に登録した。

論文審査の結果の要旨

本申請論文は、*Capnocytophaga* 属2新種を成人の歯肉縁上歯垢より分離同定したものである。一つはβ型溶血を示すこと、アミノペプチダーゼ活性が認められないこと、DNA-DNA 相同性等において既知の *Capnocytophaga* 種とは異なっており、これを *C. haemolytica* と命名した。他の一つは菌体内に顆粒がみられること、好氣的条件下で増殖が可能なこと、DNA-DNA 相同性等において既知の種とは異なっており、これを *C. granulorum* と命名した。これらの2新種を理化学研究所 Japan Collection of Microorganisms に登録した。

審査委員より、論文の構成の方法、種と株の概念の区別、表のまとめ方、学術用語の用法等について指摘を受け、加筆・訂正することとした。

本論文は *Capnocytophaga* 属の細菌分類学的新知見を示したものであり、博士（歯学）の学位論文としての価値を認められた。