



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	口腔常在細菌の増殖性と酸化還元酵素について : I. 各種酸素濃度下における口腔常在細菌の増殖性
Author(s)	菊池, 裕子
Citation	歯科基礎医学会雑誌, 27(4), 1169-1177
Issue Date	1985-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/30108
Type	journal article
File Information	shika27-4.pdf



口腔常在細菌の増殖性と酸化還元酵素について

I. 各種酸素濃度下における口腔常在細菌の増殖性

菊 池 裕 子

北海道大学歯学部口腔細菌学講座（指導：鈴木武教授）

〔受付：昭和60年9月20日〕

Studies on the growth changes of oral indigenous bacteria and their oxidoreductase activities

I. The growth of oral indigenous bacteria under several oxygen concentrations

Hiroko Kikuchi

Department of Oralmicrobiology, School of Dentistry, Hokkaido University.

Nishi 7 chome, Kita 13 jo, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060

(Chief: Prof. Takeshi Suzuki)

[Accepted for publication: September 9, 20, 1985]

Key words: Growth / oral / indigenous / bacteria / aerotolerant.

Abstract: Effects of oxygen on the growth of oral indigenous aerotolerant anaerobes, *Streptococci* and *Lactobacilli*, and some other aerobes and anaerobes were studied by means of stab-, shake-, and shaking culture. The bacterial growth in shaking culture using a liquid medium was measured by absorbancy following incubation in aerobic and anaerobic conditions. The ratio of growth in aerobic shaking culture to growth in anaerobic shaking culture of a given strain was taken as a quantitative measure for comparing different species and strains with the effect of oxygen on their growth. The relative bacterial growth ratio (abbreviated to RBGR) thus defined varied from ∞ in obligate aerobes to 0 in obligate anaerobes, indicating a consistency with the usual qualitative observations using stab culture. RBGR in facultative anaerobes ranged from 6.0 to 1.8 and RBGR in aerotolerant anaerobes from 1.6 to 0.2. Growth inhibited zones were clearly observed below the medium surface for aerotolerant anaerobes and obligate anaerobes in shake culture using a semi-solid medium.

緒 言

口腔内の微生物叢は、多数の微生物が部位により、又は時間により、その構成内容を異にして成立している¹⁾。それらを細菌の増殖に及ぼす酸素の影響により分類し、obligate aerobes, facultative anaerobes, aerotolerant anaerobes, obligate anaerobes および microaerophiles とすることが

可能である。しかし、それらの定義は種々である。Wilson²⁾, Burnett³⁾らは、大気中の酸素分圧下においても、又は嫌気の条件下でも増殖できる微生物をすべて facultative anaerobes として記載している。McBee⁴⁾は、細菌培養後の性状とエネルギー代謝による相違点、又は類似点などに基づき、各種の組み合わせを検討して、細菌を分類することを提案したが、そのなかの1分類に“anaerobic aerotolerant with an anoxybiontic metabolism”

の一項がある。また、Loesche⁵⁾は、プラークからの細菌を定量的に分離培養する目的で、大気の酸素分圧下では増殖不可能である細菌を strict anaerobes, moderate anaerobes, microaerophiles の3群に分類し発表した。Broch⁶⁾は、1974年に発表した著書のなかで、いわゆる通性嫌気性菌群を2群に分類し、1群は facultative anaerobes とし、この細菌は酸素の有無に関らず増殖するが、特に酸素の存在下において、より良く増殖する細菌とした。また、他の群は aerotolerant anaerobes とし、この細菌は酸素の有無に関らず増殖するが、むしろ酸素の存在していない環境下において、より良い増殖を示す細菌とした。平野と高木⁷⁾は、aerotolerant anaerobes は酸素を利用せず、また酸素による障害も受けない菌であるとしている。奥貫⁸⁾は、aerotolerant anaerobes, obligate anaerobes は電子伝達のためには不完全なチトクロム系のみを有し、醗酵という機序によって代謝エネルギーを得ているため、他の群の微生物に比較し効率が悪い代謝系のみを有する細菌であるとしている。

以上の様に、facultative anaerobes, aerotolerant anaerobes の定義について、未だ明確ではないので、以下の実験を、口腔常在細菌を主として使用し定量的な測定を行うと共に、簡易な試験法についても実験を行った。

実験材料と方法

1) 使用細菌

口腔常在細菌として、以下の細菌を実験に用いた。

すなわち、*Neisseria mucosa* S-11*, *Staphylococcus aureus* 209 P, *Streptococcus salivarius* S-6*, *Str. mitior* S-8*, *Str. sanguis* ATCC 10557, *Str. sanguis* S-9*, *Str. mutans* Ingbritt, *Str. mutans* 1089**, *Str. mutans* MT 703, *Str. mutans* PK 1, *Str. mutans* OMZ 175, *Str. mutans* B 13, *Str. faecalis* ATCC 19433, *Str. faecalis* ATCC 9756, *Str. pyogenes* IID 689, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Veillonella alcalescens*

ATCC 17748, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Fusobacterium nucleatum* IID 891 である。

対照菌種として、*Escherichia coli* K12, *E. coli* K 67, *E. coli* B/r, *Proteus vulgaris* IID 874, *Salmonella enteritidis* IID 604, *Micrococcus luteus* NCTC 2665, *Pseudomonas aeruginosa* S-2* を用いて実施した。

2) 培養法

実験には、嫌気性菌用培地である GAM ブイヨン培地（ニッスイ）、および GAM 半流動寒天培地（ニッスイ）を用いた。

a) 穿刺培養法

直径12mm のネジ付試験管（以後培養管と呼ぶ）に入れた GAM 半流動高層培地に穿刺し、2日培養した。穿刺後の結果判定は、培地表層部の発育、および深部の発育に分けて肉眼観察によって実施した。

b) 混釈培養法（定性法）

本法では、大気中、および高濃度の酸素下で培養した。直径 12mm のネジ付試験管に入れた GAM 半流動寒天培地を高圧滅菌後、恒温槽中にて50°C に保った。GAM ブイヨンを用いて種培養した各 strain の菌を一定濃度に希釈し、これを加温溶解してある GAM 半流動培地に接種し、混釈した後急冷した。接種菌量は 10^6 – 10^7 CFU および 10^3 – 10^4 CFU である。また、各 strain につき2本宛接種した。高濃度の酸素下（約100% O₂）での培養のためには、接種後の培養管のうち1本を直ちに嫌気ジャー（トミーJK 1）に納め、内部の空気を酸素（局方品）にて置換した。圧力は大気圧に等しくした。対照として大気中（約20% O₂）に置いた培養管と共に37°C で2日培養した。混釈培養の結果判定にはマントー反応用ノギスを使用して増殖阻止帯の長さを測定した。

c) 混釈培養法（定量法）

本法では、高濃度の酸素下でのみ培養を行った。培養には、直径7mm の mini tube を使用し、接種方法は定性法に準じて行った。37°C で1–2日培養後、菌量の測定を行った。測定には Disc 電気泳動用 densitometer に準じた装置を製作し使用した。増殖量の定量のためには、GAM 寒天培地を培養管に重層した後、光路を移動させた。

* 北海道大学歯学部口腔細菌学講座分離株

** 愛知学院大学歯学部口腔微生物学講座分離株

培地各部の濁度を transmittance として記録した後、予め各濃度につき求めておいた係数を測定値に乗じて、吸光度 (A) として求めた。また、A = 1 以上の部位については、その部位の培地少量を採取し希釈後 A を求めた。

d) 振盪培養法

振盪培養 (今後、好気振盪培養、および嫌気

振盪培養と呼ぶ) の目的には、直径 18 mm の Monod type⁹⁾ のネジ付 L 字管を、静置培養の目的には、同径のネジ付試験管を培養管として使用した。各試験管には、GAM プイオンをそれぞれ 5 ml づつ分注した後その試験管を高圧滅菌した。同培地を用いて 24 時間培養した種培養の 0.05 ml を接種した。その後、好気振盪培養、および静置

Table 1 Bacterial growth in stab-and shaking cultures.

	Strains	Growth on semi-solid agar		Growth in broth [#]			RBGR [®]
		Surface.*	Deep.†	Shaking in air.	Not shaken.	Anaerobic shaking.	
obligate aerobes	<i>M. luteus</i> NCTC 2665	++	—	0.15	0.02	0.00	∞
	<i>N. mucosa</i> S-11	++	—	2.00	0.05	0.04	50.0
	<i>Ps. aeruginosa</i> S-2	++	—	0.07	0.09	0.01	7.0
Facultative anaerobes	<i>E. coli</i> IID 861	++	+	3.05	0.58	0.51	6.0
	<i>E. coli</i> K 67	++	+	2.75	0.52	0.49	5.6
	<i>E. coli</i> B/r	++	+	1.53	0.46	0.52	2.9
	<i>Proteus vulgaris</i> IID 874	++	+	0.93	0.36	0.42	2.2
	<i>Staph. aureus</i> IID 671	++	+	0.95	0.44	0.48	2.0
	<i>Sal. enteritidis</i> IID 604	++	+	1.08	0.61	0.61	1.8
Aerotolerant anaerobes	<i>Str. faecalis</i> ATCC 9756	+	+	1.32	0.83	0.82	1.6
	<i>Str. mutans</i> MT 703	+	+	0.18	0.23	0.13	1.4
	<i>Str. mutans</i> PK 1	+	+	1.42	0.59	0.98	1.4
	<i>Str. faecalis</i> ATCC 19433	+	+	1.42	0.96	1.08	1.3
	<i>Str. pyogenes</i> IID 689	+	+	0.35	0.54	0.28	1.3
	<i>Str. mutans</i> OMZ 175	+	+	0.54	0.41	0.47	1.1
	<i>Str. mutans</i> B 13	+	+	0.52	0.42	0.46	1.1
	<i>Str. sanguis</i> S-9	+	+	0.24	0.25	0.24	1.0
	<i>Str. mutans</i> Ingbritt	+	+	0.15	0.14	0.16	1.0
	<i>Str. mutans</i> 1089	+	+	0.14	0.15	0.18	0.8
	<i>Str. salivarius</i> S-6	+	+	0.13	0.54	0.52	0.3
	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	+	+	0.06	0.20	0.18	0.3
	<i>Str. sanguis</i> ATCC 10557	+	+	0.13	0.39	0.38	0.3
	<i>Str. mitior</i> S-8	+	+	0.05	0.21	0.25	0.2
Obligate anaerobes	<i>V. alcalescens</i> ATCC 17748	—	+	0.02	0.10	0.12	0.2
	<i>Prop. acnes</i> ATCC 11827	—	+	0.01	0.97	0.99	0
	<i>F. nucleatum</i> IID 891	—	+	0.01	0.43	0.37	0

* ++ : Growth was observed at the whole surface area, + : Growth was recognized in a small region around the stabbed point, — : No growth was recognized.

† + : Growth was observed at portions below the surface region (apart from the surface by more than 5 mm), — : No growth was observed.

[#] Asorbancy.

® RBGR = A₁/A₂ (A₁: absorbancy of aerobically shaken culture, A₂: absorbancy of anaerobically shaken culture)

培養のためには、ラバーライナー付スクリーキャップで緩く栓をした。嫌気振盪培養の目的には、ガラス管を挿入したゴム栓を用い、L字管内の空間部および培地中に溶存する酸素を真空ポンプを用いて吸引した後、減圧下でガラス管を溶封した。振盪培養は、定温振盪機 (NBS, Gyrotory incubator shaker G24, USA) を用いて400 rpmで行った。37°Cで24時間培養後、増殖状況の判定は光度計 (Leitz, photometer model M, USA) を使用し、Aフィルターを用いて吸光度を測定し増殖量Aとした。好気振盪培養によって求められた値をA₁、嫌気振盪培養によって求められた値をA₂とした。この2つの吸光度の比を相対的増殖比 (Relative Bacterial Growth Ratio; RBGR) とした。

RBGR = A₁/A₂ として表現される。

実験結果

大気中での穿刺培養および振盪培養による増殖結果 (Table 1)

半流動寒天培地を用い、穿刺培養を行った。発育を表層部および高層部に分けて肉眼で観察した。obligate aerobesの各 strain は、培地表層部にのみ著しい増殖が認められ、高層部には増殖が認められなかった。facultative anaerobesの各 strain は、表層部に著しい増殖が認められると同時に高層部にも増殖が認められた。aerotolerant anaerobesの各 strain では、培地の表層部も高層部も穿刺部位に添ってみ増殖が認められた。また、obligate anaerobesの各 strain は、高層部の下部のみに増殖が認められた。

ついで、液体培地を用いて好気振盪、および嫌気振盪を行った。obligate aerobesの各 strain は、好気振盪培養によっては旺盛に増殖するが、嫌気振盪培養によっては、ほとんど増殖しないため、相対的増殖比 (RBGR) は7.0以上として示された。facultative anaerobesの各 strain は、RBGRは1.8-6.0であり、好気振盪を行うとすべての strain において菌収量が増加していた。aerotolerant anaerobesの各 strain では、RBGRは0.2より1.6の範囲に有った。そこでA群一酸素供給量を増加すると菌収量が増加する群 (*Str. fae-*

calis ATCC 9756, *Str. mutans* MT 703, *Str. mutans* PK 1, *Str. faecalis* ATCC 19433, *Str. pyogenes* IID 689), B群一酸素供給を増加しても菌収量が変わらない群 (*Str. mutans* OMZ 175, *Str. mutans* B13, *Str. sanguis* S-9, *Str. mutans* Ingbritt, *Str. mutans* 1089), C群一酸素供給量を増加すると菌収量が減少する群 (*Str. salivarius* S-6, *L. acidophilus* ATCC 4356, *Str. sanguis* ATCC 10557, *Str. mitior* S-8) の3群に分けられた。各群の平均値と標準偏差 ($\bar{X} \pm \sigma$) は、A群 1.40 ± 0.122 , B群 1.00 ± 0.122 , C群 0.28 ± 0.05 となり、Student の t 検定を行うと、A, B群間では、 $P=5.77$, B, C群間では、 $P=6.72$ となり、各群間に有意の差が認められた。obligate anaerobesの strain のうち、*V. alcalescens* ATCC 17748のみ、RBGRは0.2であったが、他は0であった。

酸素分圧を増加して aerotolerant anaerobes を混釈培養した場合の阻止帯形成について (Table

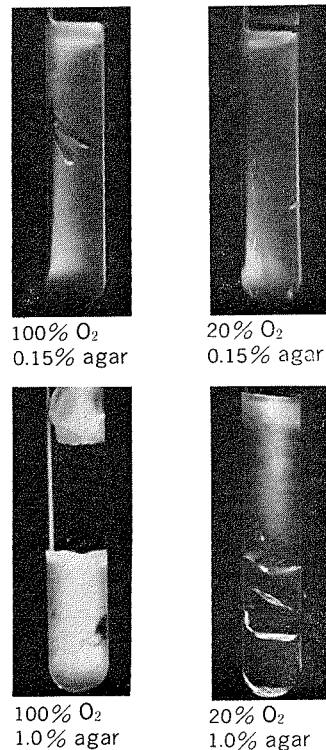


Fig. 1 Growth of *E. coli* K 12 in GAM Medium.

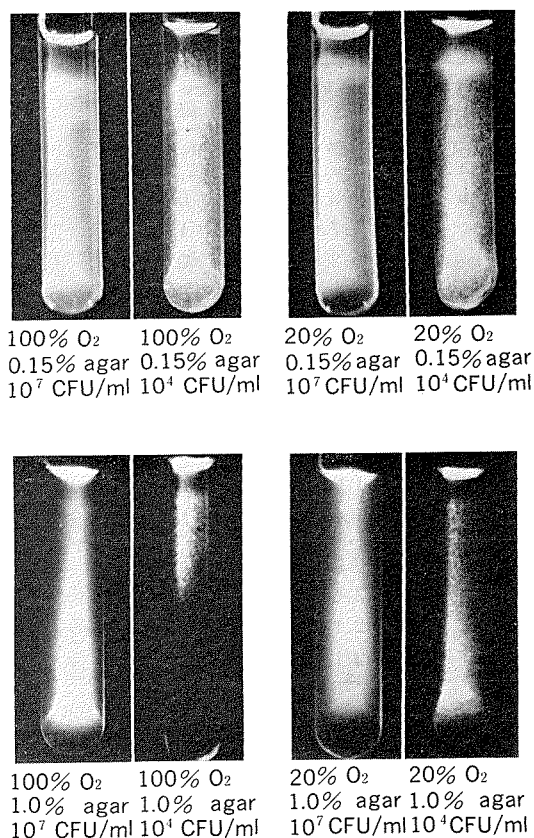


Fig. 2 Growth of *Str. mutans* Ingbritt in GAM Medium.

2, Fig. 1, 2, 3)

高濃度の酸素下、または大気中における条件のもとで、穿刺培養法と混釈培養法とによって培養した結果を比較すると、従来の方法による分類によって確立されていた細菌群の間において下記の結果を得た。i) obligate aerobes と facultative anaerobes との2群間には、その増殖度において培養法による顕著な差異がなかった。また、1%寒天培地で混釈培養を行うと、ガス発生菌では、寒天の断裂を来し、観察が出来なかった(Fig. 1)。Aerotolerant anaerobes を混釈培養すると、酸素濃度の割合により程度の差は認められたが、高層部の表面近くに細菌の増殖の認められない部分が存在していることが観察された。その増殖阻止帯の長さは、高濃度の酸素下に培養した場合、および接種菌量の少ない場合に著しく現れた。この現象は、大気中における培養では少量の菌体を接種

した半流動高層寒天培地において特に認められた(Fig. 2, Table 2)。obligate anaerobes については、増殖阻止帯が高濃度の酸素下、および大気中のいずれの培養においても認められた。また、1%寒天培地で混釈培養を行っても、阻止帯は短くなるが出現した。混釈培養法(定量法)による結果を Fig. 3 に示す。obligate aerobes である *Ps. aeruginosa* は、表層部においては A=12 に達するまで増殖するが、表層直下の層にのみ止まり、高層部では増殖を示していなかった。facultative anaerobes である *E. coli* では、表層部は A=4 に達するまで増殖し、高層部では A=0.8 において深部に至るまで増殖していた。aerotolerant anaerobes である *Str. mutans* Ingbritt では、表層より3.5mm に至るまで増殖阻止帯がみられ、その直下には A=1-1.5 を示す増殖帯が存在しており、それ以下は A=0.3 において深部まで増殖しているのが明らかであった。obligate anaerobes である *F. nucleatum* IID 891 は、表層より12 mm の深さにおいて増殖阻止帯が存在し、以下 A=1.5 において深部まで増殖しているのが明らかであった。

考 察

口腔常在細菌のうち、重要な位置を占める *Streptococci*, *Lactobacilli* などを「増殖に及ぼす遊離酸素の作用」について区分する時、その定義は、各研究者により様々^{4,6,10)}である。

本研究では、初めに細菌の発育条件を可能な限り規格化し、一定の条件下で培養して遊離酸素が細菌の増殖に及ぼす作用を数値として表現することにより、定量的に示すことを目的とした。

まず、GAM 半流動寒天培地を使用した穿刺培養法によって定性的に obligate aerobes, facultative anaerobes, aerotolerant anaerobes, obligate anaerobes, および microaerophiles の5群に分けることができ、Broch の分類と⁹⁾一致できた。

定量的比較をするために振盪培養により相対的増殖比(RBGR)を比較する方法について実験した。培地として、多種類の細菌に対し増殖支持能を持つ、GAM ブイヨンを用いた。振盪培養後、比濁法により RBGR を算出して比較検討した。

Table 2 Growth inhibited bands in shake culture observed with aerotolerant anaerobes under high concentrated oxygen and atmosphere.

Strains	O ₂ conc.	High concentrated oxygen (about 100% O ₂)		Atmosphere (about 20% O ₂)	
	Inoculation	10 ⁶ -10 ⁷ CFU	10 ³ -10 ⁴ CFU	10 ⁶ -10 ⁷ CFU	10 ³ -10 ⁴ CFU
<i>Str. faecalis</i> ATCC 19433		0.2 mm*	0.5 mm	0.2 mm	0.5 mm
<i>Str. faecalis</i> ATCC 9756		1.7	1.7	1.7	1.7
<i>Str. pyogenes</i> IID 689		0.2	1.2	0.2	0.2
<i>Str. salivarius</i> S-6		2.5	3.4	1.1	0.5
<i>Str. sanguis</i> ATCC 10557		0.5	2.2	1.0	1.5
<i>Str. sanguis</i> S-9		3.8	3.8	0.3	0.7
<i>Str. mitior</i> S-8		0.7	0.7	0.7	0.7
<i>Str. mutans</i> OMZ 175		2.8	3.8	0.7	2.5
<i>Str. mutans</i> Ingbritt		3.4	3.9	0.3	2.5
<i>Str. mutans</i> MT 703		1.1	5.1	1.0	1.5
<i>Str. mutans</i> 1089		1.1	5.6	1.1	1.1
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356		6.0	12.5	0.8	5.1
<i>V. alcalescens</i> ATCC 17748		2.6	11.9	2.6	2.5
<i>Prop. acnes</i> ATCC 11827		6.3	N.G†	2.1	N.G.
<i>F. nucleatum</i> IID 891		6.6	N.G.	2.1	N.G.

* Depth of growth inhibited band from the surface.

† No growth is abbreviated as N.G.

その結果、下記の知見が得られた。すなわち、総合的に観察すると、RBGR による分類の結果は、従来の主観的肉眼的観察による分類^{11,12)}と大旨一致していた。しかし、特に aerotolerant anaerobes については、好気振盪培養と嫌気振盪培養とを比較検討すると、種々の程度で増殖度の差が観察された。すなわち、aerotolerant anaerobes の群は、振盪により培地中に酸素を供給すると、増殖が促進される群、増殖阻止を受ける群、および無影響の群の3群に類別できることが判明した。更に facultative anaerobes のうち最も RBGR の小さい値を示す *Staph. aureus* と、aerotolerant anaerobes のうち最も RBGR の大である *Str. faecalis* について比較すると、両者の間には数値に連続性があり、両群の間に明確な境界はなかった。aerotolerant anaerobe のうち最も RBGR の小である *Str. mitior* と obligate anaerobes のうち最も RBGR の大である *V. alcalescens* と比較すると、その数値は等しく、この場合も両群の間に明確な境界はなかった。また、obligate anaerobes である *V. alcalescens* が好気振盪培養でもわ

ずかながら増殖するという興味ある知見が得られた。この *V. alcalescens* の好気振盪については、熱海、上羽¹³⁾も大量の種培養を接種した場合は嫌気培養によるよりも収量が良いことを報告している。上記の実験によって、細菌の増殖量が嫌気振盪培養、好気振盪培養、および静置培養の3種の培養法によって異なった結果が得られる理由として、Pastuer 効果、および菌体表面における物質移動の促進効果が考えられた。しかし、振盪培養法では各群の間に明確な境界がなく、この方法では細菌を群別するのは適切でないことが明らかにされた。

更に、各群の酸素感受性を見る目的で、大気中(約20% O₂)と高濃度の酸素下(約100% O₂)の培養条件で混釈培養を実施した。その結果、各群間の差異は、大気中よりも高濃度の酸素下での培養の方が大きいことが定性的に認められた。また、aerotolerant anaerobes では、菌株によって種々の程度に増殖阻止帯が出現した。本実験では寒天量の少ない半流動寒天培地を使用した。これにより、酸素などのガスの拡散速度は速いが、ゲルの収縮などにより、阻止帯形成と粉らわしい現象を

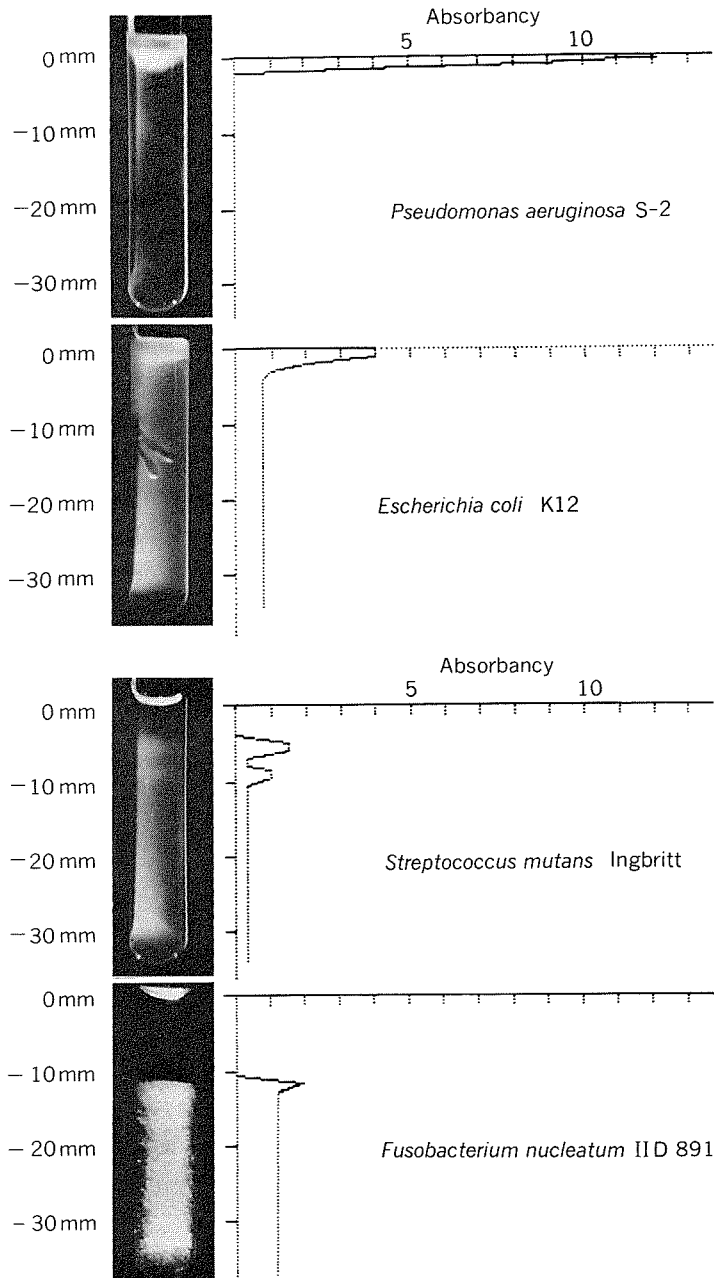


Fig. 3 Growth of Bacteria in GAM Semi-solid Agar Medium.

生ずることも考えられた。そこで寒天濃度を増して同様の実験を行ってみたところ、その場合でも明らかに阻止帯は形成されたので、酸素による増殖阻止帯であると確認された。増殖阻止帯の出現する理由として、Carlsson ら¹⁴⁾は、培地を滅菌す

ると Ca^{++} , Mn^{++} などが触媒となり溶存酸素から過酸化水素が生成されると推定し、培地中の過酸化水素などによる増殖阻止作用は細菌の産生する catalase により中和されると説明している。本実験でも阻止帯の形成される大部分の strain は cata-

lase 陰性であるが、一部の strain は catalase を持つにもかかわらず、阻止帯が形成され、この説明のみでは不十分であると考えられた。

更に、定量的な結果を得る目的で、培養管に入った半流動寒天培地中の各部分の細菌の増殖程度を直接、比濁定量する方法を考案した。その結果、obligate aerobes である *Ps. aeruginosa* の表層部の吸光度は約12も有ることが判明した。また、aerotolerant anaerobes および obligate anaerobes において増殖阻止帯の直下に一重、または二重の増殖増強帯ともいふべき band が出現した。この理由は、ゲル内の栄養物質および代謝物質の移動、または阻止帯内部において酸化作用により形成された過酸化物質およびその他の物質による刺激作用などが考えられるが、なお、今後検討を行ってきたい。

以上の点から、口腔常在細菌の増殖能に及ぼす酸素の影響を観察し群別を行う場合、GAM 半流動高層寒天培地での穿刺培養法が一番簡便であり、混釈培養法も酸素の感受性を見るためには良い方法であると考えられた。しかし、増殖阻止帯を定量的に測定する装置については、なお、検討する余地があると思われる。

抄録：各種の口腔常在細菌の酸化還元酵素産生能とそれらの細菌の増殖能に及ぼす酸素の影響との関係について研究を行った。本報では細菌の増殖能に及ぼす酸素の影響についてのみ述べる。実験は半流動寒天培地を用いた穿刺、および混釈培養と、液体培地を用いた好気および嫌気振盪培養を行った。穿刺培養は好気条件下で、混釈培養は好気および高濃度の酸素の環境下で培養を行った。振盪培養では嫌気振盪の濁度を基準として好気振盪の濁度との比 (RBGR) を求めた。facultative anaerobes では、RBGR は (1.8-6.0) の値を示した。aerotolerant anaerobes では、混釈培養法で少量の細菌を接種した場合、大気中でも上層部に増殖阻止帯が認められた。この阻止帯は、高濃度の酸素下では著明となった。このことから、阻止帯の出現は酸素の影響によるものと考えられた。これらのことから、aerotolerant anaerobes は obligate anaerobes と同じく酸化還元酵素系の発達が悪く、酸素に対して感受性を持つことが示唆された。

文 献

- 1) Gray, T. R. G. and Parkinson, D.: The Ecology of Soil Bacteria, p. 681, University of Toronto Press, Tront, 1968.
- 2) Wilson, G. S. and Miles, A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 6th edn., Vol. I, pp. 106-107, Edward Arnold London, 1975.
- 3) Burnett, G. W., Scherp, H. W. and Schuster, G. S.: Oral Microbiology and Infectious Disease 4th edn., pp. 76-80, Williams & Wilkins Company, Tront, New York, 1976.
- 4) McBee, R. H., Lamanna, C. and Weeks, O. B.: Definitions of bacterial oxygen relationships. Bacteriol. Rev. 19: 45-47, 1955.
- 5) Loesche, W. J.: Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. Appl. Microbil. 18: 723-727, 1969.
- 6) Brock, T. D.: Biology of Microorganisms, 2nd edn., pp. 313-318, Prentice-Hall Inc.,

また、酸素による増殖抑制の原因は、細菌細胞の持つ酸化還元酵素の産生能および性状によるものと思われるので、続報にて述べる予定である。

結 語

1) 口腔内微生物叢の研究をするためには、遊離酸素が口腔常在細菌の増殖に及ぼす作用により群別することが必要である。穿刺培養法、好気および嫌気振盪培養法、混釈培養法につき実験を行い、比較した。その結果、GAM 半流動寒天を用いた混釈培養法が最も有利であった。

2) 半流動寒天を用いる混釈培養を実施すると、aerotolerant anaerobes においては、培地上層部に増殖阻止帯を生じることが認められた。増殖阻止帯は酸素濃度を高めることによって、その長さがより増大することが明らかにされた。

謝辞：稿を終えるにあたり、御指導と御校閲をいただきました北海道大学歯学部口腔細菌学講座、鈴木武教授に心から感謝致します。また、御校閲と御鞭撻をいただきました北海道大学歯学部小児歯科学講座、及川清教授、予防歯科学講座、谷 宏教授に感謝致します。

- Englewood Cliffs, Newjersey, 1974.
- 7) 平野清寿, 高木 篤: 戸田細菌学 (戸田忠雄, 武谷健二編), pp. 388-392, 南山堂, 東京, 1981.
 - 8) 奥貫一男, 山中健生: 微生物のチトクロム, pp. 1-6, 講談社サイエンティック, 東京, 1975.
 - 9) Monod, J.: Recherches sur la Croissance des Cultures Bacterienne, 2nd edn., Herman, Paris, 1958.
 - 10) Tally, F. P., Goldin, B. R., Jacobus, N. V. and Gorban, S. L.: Superoxide dismutase in anaerobic bacteria of clinical significance. Infect. Immun. **16**: 20-25, 1977.
 - 11) Weiz, P. B.: The Science of Biology, 2nd edn., McGraw-Hill, London, 1963.
 - 12) 内田庸子: 第三の生物, メタン生産菌の同定と細胞進化の概念. 蛋白質 核酸 酵素 **23**: 156-158, 1978.
 - 13) 熱海智子, 上羽隆夫: 嫌気性菌 *Veillonella alcalescens* の増殖における酸素の影響, 歯基礎誌 **26**(補冊): 387, 1984.
 - 14) Carlsson, J., Nyberg, G. and Wrethen, J.: Hydrogen peroxide and superoxide radical formation in anaerobic broth media exposed to atmospheric oxygen., Appl. Environ. Microbiol. **36**: 223-229, 1978.