

原著

口腔内細菌の 532nm レーザー顕微 Raman 分析

長瀬あゆみ¹⁾、寒河江登志朗¹⁾²⁾、佐藤由紀江²⁾、佐藤 勇³⁾

¹⁾ 日本大学電子線利用研究施設 〒274-8501 千葉県船橋市習志野台 7-24-1

²⁾ 日本大学松戸歯学部 〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1

³⁾ 日本大学大学院総合科学研究科 〒102-8251 東京都千代田区五番町 12-5 日本学会館第 2 別館
(受理: 2007 年 10 月 18 日)

抄録: 従来診断などルーチンでの菌種の同定は、培養結果(選択培地等)、PCR法などにより行われている。しかし、研究では迅速性が必要であり、専門的に高度に熟練した技術が必要としない分析法を検討した。口腔内細菌を嫌気性環境で培養し、従来報告されていない Raman 分析法によるスペクトル分析を行い、菌種同定に有効な測定結果が得られたのでここに報告する

532nm Laser Raman Analysis of Intraoral Bacterium

Nagase Ayumi¹⁾, Sakae Toshiro^{1,2)}, Yukie Sato²⁾, Isamu Sato³⁾

¹⁾ Laboratory for Electron Beam Research and Application, (LEBRA), Nihon University, Funabashi, 274-8501, Japan

²⁾ Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan

³⁾ Advanced Research Institute for the Sciences and Humanities, Nihon University (ARISH) Chiyoda-ku, 102-8251, Japan

Abstract: The laboratory generally used method to identify a kind of bacterium by culture result using for example selective mediums, and PCR analysis.

We examined a simple method, which doesn't need advanced specialized technique.

The intraoral bacterium from a human patient was cultured in an anaerobic environment. The result of the intraoral bacterium is reported here.

Key words: Spectroscopic analysis, Raman spectrum analysis method, intraoral bacterium

緒言

従来、菌種の同定方法は、培養結果(選択培地等)、PCR法などにより行われている。

しかし、それらの方法には作業は複雑であり、時間と技術も要し、コンタミネーションと環境汚染を避けるための様々な点に注意を払わなくてはならない。そこで、迅速熟練した専門的に高度な技術が必要としない、コンタミネーションの危険の少ない同定方法として、スペクトル分析法が可能か否かを検討するため、細菌の Raman 分析法によるスペクトル分析を行った。ヒト口腔内細菌を嫌気性環境で培養し、従来報告されていない、測定結果が得られたので、ここに報告する。

材料および方法

材料:
細菌の採取・培養

材料としたのは被験者の口腔内より採取したブランクを用いた。

滅菌水にて希釈し菌液を作成(滅菌水 0.5 ml にて希釈)し、白金耳 10 μl にて血液寒天培地(栄研化学株式会社: E-MP23 ポアメディア血液寒天培地)に塗抹。

炭酸ガス培養法(ガスパック法; 三菱ガス科化学株式会社 アネロパック CO₂)に 37 48 時間培養した。確認できたコロニーをそれぞれ単独に分離するため同条件にて更に単離培養した。その培地のコロニーを直接顕微 Raman 分析にかけた。

Raman 分析については下記条件にて行った。

測定機種: RAMAN RXN SYSTEMS

RAMAN MICROBE(KAISER OPTICAL SYSTEM, INC)

測定条件: 励起波長; 532nm

Exposure 2 秒

Accums 10 回

対物レンズ：10 倍
 スポットサイズ：10 μm
 解析ソフト：GRAMS/AI

結果

培養結果：

培養の結果、3種類のコロニーを観察した。便宜的に Colony A, B, C と呼ぶ。

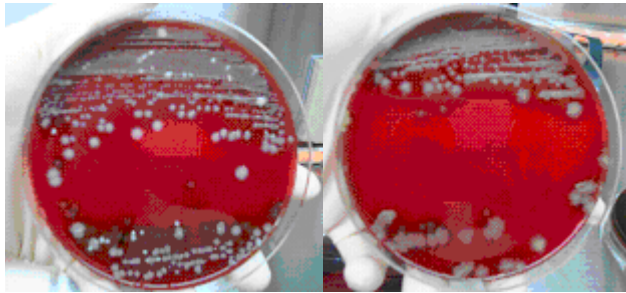


Fig.1 (Colony A)

Fig.2 (Colony B)

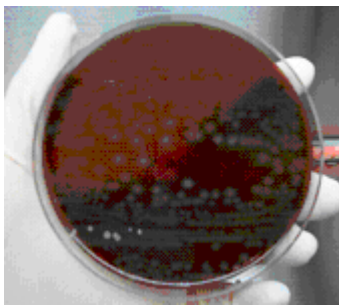


Fig.3 (Colony C)

Colony A (Fig.1) の外見は乳白色で円形、大きさが 1 ~ 3 mm 程度で厚さ 1 mm 程度、断面の形状はドーム状であった (Fig.1, 下部)。

Colony B (Fig.2) については乳黄白色で円形 ~ 不整形、大きさが 3 ~ 5 mm 程度で厚さ 1 ~ 2 mm 程度、断面の形状は扁 (Fig.2 下部)。

Colony C (Fig.3) は灰乳黄白色で不整形 ~ 鋸歯状、5 mm かそれ以上の大きさがあり、厚さは 1 mm 以下で非常に薄く、断面の形状は 凸凹であった。

これら 3 つのコロニーは以上の外見的特長からそれぞれことなった菌種であり、Colony C においては培地が赤から黒く変色していることから色素産生性の細菌と推測される。

RAMAN スペクトル分析：

Colony A, B, C のピークを Fig.4, 5, 6, Table.1 に示したピーク # 1, 5, 6, 7, 10, 16, 17, 19, 21 が共通したピークとして認められた。これ以外的一致していないピークがそれぞれのコロニーを同定する際の個々の特徴となると考え

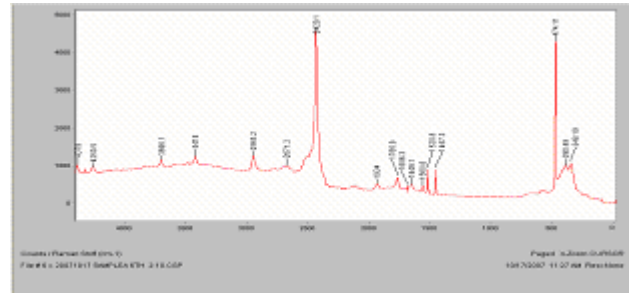
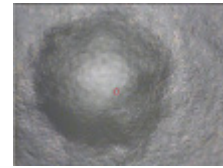


Fig.4

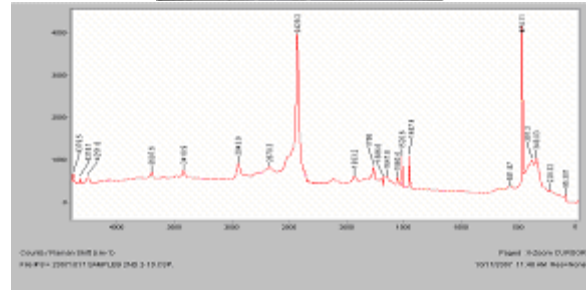


Fig.5

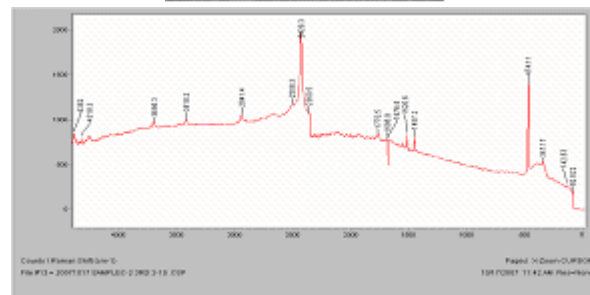
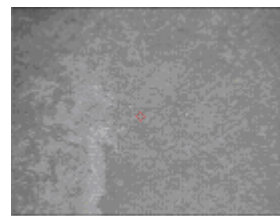


Fig.6

Table.1 : 口腔内細菌 Raman 分析データ (Colony A,B,C のピーク)

ピーク #	Colony A	Colony B	Colony C
1	4379	4380	4382
2	4251	-	-
3	-	4318	4318
4	-	4252	-
5	3696	3698	3695
6	3418	3419	3418
7	2945	2944	2941
8	2671	2670	-
9	-	-	2508
10	2429	2429	2429
11	1934	1933	-
12	1767	1766	-
13	-	-	1771
14	1649	1648	-
15	1561	1560	-
16	1521	1521	1521
17	1457	1457	1457
18	575	581	-
19	474	474	474
20	391	391	-
21	348	349	347
22	-	228	-
23	-	-	143

られる。各々のピークの同定は今後の課題である。微生物の FT-IR は特定の指紋のようなパターンで微生物の同定に使用することができる非常に優れたものである。

フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) の簡単さと有効性はそれを亜種レベルにおける迅速な、分類、識別、および大規模なスクリーニングのための多様な技術に適している。今回の RAMAN 分析の結果、細菌の同定にスペクトル分析法が有用であることがわかった。今後更に検討を重ね菌種の迅速分析法を確立したい。

考察

今回培養した口腔内細菌を Raman 分析した菌種毎のスペクトルに特徴がみられ、菌種の同定に有効であることが示された。

Beekes et al.¹⁾ は FT-IR を使ってグラム陰性、陽性菌、酵母を分析しそれらの分類を示した。また Rebuffo-Scheer et al.²⁾ も顕微 FT-IR を使い非結核性菌の分析に有効であることを示している。

Huang et al.³⁾ は FTIR を使い生体内での微生物による分解経路を研究した。

Winder et al.⁴⁾ は *Acinetobacter* の迅速同定に FT-IR を用いている。Maquelin et al.⁵⁾, Choo-Smith et al.⁶⁾, Orsini et al.⁷⁾, Zeroual et al.⁸⁾, Erukhimovitch et al.⁹⁾, Goodacre et al.¹⁰⁾ は FT-IR が微生物の研究に有用であることを示している。

Naumann¹¹⁾ は FTIR のほかに FT-Raman でも微生物の研究に有用であると示している。

今回の結果も同様に FT-Raman の有効性を示している。一般的に FT-Raman のほうが FT-IR よりピークの分解能が良く、従って詳細な解析に適している。

今後、FT-Raman を使ったデータの集積が急がれるであろう¹²⁻¹³⁾。

謝辞

本研究経費の一部は日本学術振興会科学研究費補助金(基盤(C)課題番号 17591927) および学術フロンティア推進事業(「可変波長高輝度単色光源の高度利用に関する研究」

2000-2004・A2005-2007) によるものである。

この研究を進める上で、細菌採取に協力いただいた沼田靖子歯科医師(松戸歯学部大学院)・諏訪武利歯科医師(PD,LEBRA) 顕微 Raman 分析装置を利用させていただいた日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設(LEBRA)のメンバーの方々をはじめ多くの関係者に厚くお礼申し上げます。

References

1. Beekes M, Lasch P, Naumann D: Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Veterinary Microbiology*, 2007 123:305-319
2. Rebuffo-Scheer C.A, Kirschner C, Staemmler M, Naumann D: Rapid species and strain differentiation of nontuberculous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 2007 68:282-290
3. Huang W.E, Hopper D, Goodacre R, Beckmann M, Singer A, Draper J: Rapid characterization of microbial biodegradation pathways by FT-IR spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 2006 67:273-280
4. Winder C.L, Carr E, Goodacre R, and Seviour R: The rapid identification of *Acinetobacter* species using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of applied Microbiology*, 2004 96:328-339
5. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith L-P, Ngo-Thi N.A, van Vreeswijk T, Staemmler M, Endtz H.P, Bruininr H.A, Naumann D, and Puppels G.J: Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003 324-329
6. Choo-Smith L-P, Maquelin K, van Vreeswijk T, Bruining H.A, Puppels G.J, Ngo-Thi N.A, Kirschner C, Naumann D, Ami Villa D.A.M, Orsini F, Doglia S.M, Lamfarraj H, Sockalingum G.D, Manfait M, Allpuch P, and Endtz H.P: Investigation Microbial (Micro) colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001 1461-1469
7. Orsini F, Ami D, Villa A.M, Sala G, Bellotti M.G, Doglia S.M: FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. *Journal of Microbiological Methods*, 2000 42:17-27
8. Zeroual W, Choisy C, Doglia S.M, Bobichon H, Angiboust J-F, Manfait M: Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994 1222:171-178
9. Erukhimovitch V, Pavlov V, Talyshinsky M, Souprum Y, Huleihel M: FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005 37:1105-1108
10. Goodacre R, Timmins E.M, Rooney P, Rowland J.J, Kell D.B: Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and neural network. *FEMS Microbiology Letters*, 1996 140:233-239
11. Naumann D: FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. Gremlich H.U. (Ed.), *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*. Marcel Dekker, New York, USA, 2001, 323-377
12. Branam N, Todd N, and Wells A: Microorganism characterization using ATR-FTIR on an ultrathin polystyrene layer. *Vibrational Spectroscopy* 2007, 44:192-196
13. Naumann D, Helm D, and Labischinski H: Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *NATURE* 1991, 51:81-82