

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06051

研究課題名(和文) ヒトプラークの代謝活性のリアルタイム測定法の確立

研究課題名(英文) The establishment of the monitoring the metabolic activity of real human dental plaque in real-time

研究代表者

石黒 和子 (Ishiguro, Kazuko)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00755829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまで技術的に難しかった実際のヒトプラークを用いた代謝活性測定手法を確立した。その結果、採取部位間、個人間などにより、その代謝活性が大きく異なることが示唆され、ヒトプラークバイオフィルムの病原性を探る研究においては、これらの変動を考慮した上で評価する必要があることが示唆された。また、本手法は、糖だけではなくアミノ酸など様々な基質由来の代謝活性を測定可能であるが、同時にプラーク内のアミノ酸代謝に関するメタボローム解析手法も確立し、今後のプラーク代謝研究に新視点を与える成果を得られた。

研究成果の概要(英文)：The measurement of the metabolic activity using real human dental plaque has been limited by the technical difficulties. In this study, I established the new method for the measurement. As a result, it was suggested that the metabolism activity was various among individuals, the sample collection part. These results suggested that these variations should be considered for the evaluation of the pathogenicity related to the metabolic activity. In addition, this technique can measure the metabolic activity derived from various substrates including sugars, amino acids. Also, I established the metabolomics technique using human dental plaque. These new methods established in this study give a new viewpoint to the metabolism study of human dental plaque in future.

研究分野：口腔生化学、予防歯科学

キーワード：プラークバイオフィルム 代謝 メタボロミクス 蛍光色素

1. 研究開始当初の背景

齲蝕、歯周炎、口臭などの口腔疾患や誤嚥性肺炎は、プラーク細菌によって引き起こされるため、プラークの病原性に関する研究がこれまで多数なされてきた。

しかしその多くは、プラーク構成細菌の種類や量についての研究、すなわち、「何がどれだけいるか？」に主眼を置いたものが主であり、実際に疾患の発症や進行に関わるプラークの代謝活性、すなわち、「どのような代謝をどのくらい活発にしているのか？」についての研究はほとんど行われていない。

その理由として、実際のプラークの代謝活性を簡便に評価する方法がないことが挙げられる。細菌の代謝活性評価法としては、酸産生量をモニターする pH stat 法があるが、歯周炎関連菌など酸を産生しない細菌の代謝活性は測定できない。また、測定には多量の細菌が必要となるため、採取量に限りがあるプラークへの応用は困難である。そのため、少量のプラークを用いて、その代謝活性を簡便かつリアルタイムに測定する方法の開発が不可欠であった。

近年、我々は、細菌の代謝活性に伴い産生される還元力を蛍光色素 resazurin を用いてモニターすることで、酸を産生しない歯周炎関連菌を含めた種々の口腔細菌の代謝活性を測定できる新たなリアルタイム代謝活性測定法の確立を模索中である。

そこで本研究では、この手法を応用し、微量プラークの代謝活性測定法を確立することに至った。

2. 研究の目的

齲蝕や歯周炎はプラーク細菌叢によって生ずる。これまでプラーク構成細菌の種類や量については広く研究されてきたが、発症や進行に直接関わるプラーク代謝活性については殆ど行われていない。代謝活性測定法として、酸産生量をモニターする pH stat 法があるが、酸産生以外の代謝活性は測定できず、また多量の細菌を要するためプラークへの応用も困難であった。一方、我々は、代謝に伴い産生される還元力を蛍光色素 resazurin でモニターすることで、酸を産生しない歯周炎関連菌を含めた種々の口腔細菌の代謝活性を測定しうるリアルタイム代謝活性測定法を確立した。そこで本研究では、(1) 本手法を応用して微量プラーク代謝活性測定法を確立することを目的とする。さらに、(2) 各種抗菌性薬剤などの効果をプラーク代謝抑制効果という視点から評価するとともに、(3) CE-TOFMS を用いたメタボローム解析を併用することでプラーク全体の代謝機構およびその抑制機構の解明に取り組むことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被験者からのヒトプラーク採取方法の確立

プラークの採取は、十分な説明を受け同意書に署名をした被験者より、口腔内の各種部位(平滑面と隣接面、前歯部と臼歯部、舌苔など)より滅菌器具を用いて採取した。

(2) プラークの代謝活性測定法の確立(最適な実験条件の検討)

これまで培養細菌を対象として確立してきた従来法では、一定量の細菌試料に蛍光色素 resazurin を一定時間作用させ、代謝の結果産生される還元力による蛍光発色を蛍光分光光度計にて測定し、経時的变化を観察することで、代謝活性の測定、評価を行ってきた。

実際のプラークの代謝活性の為には、採取量がごく少量となるため、従来の測定手法をより高感度化する必要があった。そのため測定時間の設定や最低必要量の模索を含め、その適切な手法を検討した。

また、代謝基質としては、糖のほか、アミノ酸、タンパク質ペプチド等を対象とした。

(3) 確立した手法を用いた、各種条件下でのプラーク代謝活性の検討

これら確立した手法を用いて、同一口腔内の各種部位より採取したプラーク間で代謝活性に違いがあるのかを検討した。

採取部位は平滑面と隣接面、前歯部と臼歯部、舌苔とした。

また被験者の口腔内の有病状況のデータを基に、それらとの相関性などについても検討した。

さらに、薬剤成分への感受性に関して、個人差があるのかについても検討を行った。薬剤成分としては、歯磨き剤や洗口剤中の各種薬効成分として、フッ化物、クロロヘキシジン、塩化セチルピリジニウムを用いた。

これらの各種薬効成分などをプラーク試料に作用させ、その代謝活性への影響を確認し、代謝的側面からみた薬剤感受性についても考察した。

(4) CE-TOFMS を用いたメタボローム解析

上記の代謝活性の測定に並行してメタボローム解析も試みた。

採取した各試料は、通法に従って前処理(メタノール抽出による代謝産物の抽出、液液分配による夾雑物質の除去、フィルター処理による除タンパク)を行った。処理後の試料を CE-TOFMS で解析し、糖代謝関連代謝産物、および各種アミノ酸、アミノ酸代謝関連代謝産物を中心に、網羅的に解析を行い、そ

の変化などを比較することで、代謝活性の上昇につながった pathway の特定を目指した。

4. 研究成果

(1) ヒトプラークの代謝活性測定法の確立及び各種条件下でのプラーク代謝活性の検討

インフォームドコンセントを得た被験者より、プラークを5部位(上顎前歯、下顎前歯、上顎臼歯、下顎臼歯、舌背)から採取し、これらの試料に、代謝基質として 0.5% glucose、0.5% tryptone、10 mM cysteine もしくは 10 mM arginine) 及び 1% alamarBlue を加え、37 °C での蛍光強度を蛍光分光プレートリーダーにて連続的に測定した。さらに、それぞれの部位より採取した試料に含まれる細菌数を細菌カウンター (Panasonic 製) にて計測した。

その結果、代謝基質非添加でも、プラークバイオフィーム内に含有されている基質の代謝に由来する蛍光強度の緩やかな増加が観察されたが、代謝基質を添加すると蛍光強度が急増したことから、本法によって様々な基質に由来するプラークによる代謝活性を測定できることが示された。

さらに、測定に必要な量をできるだけ減らすため、蛍光分光マイクロプレートリーダーを用いて、できるだけ小さな反応系を用いた測定手法を模索した結果、現段階で 0.05-0.1 mg といった極少量のプラーク試料でも代謝活性測定が可能であることを示すことができた。

さらに、測定された代謝活性は、単位細菌数当たりで採取部位間、個人間、採取日間により、最大で約 10 倍異なる事例も確認されており、実際のヒトプラークバイオフィームの代謝活性に関する研究においては、これらの変動を考慮した上で評価する必要があることが示唆された。

また、一部薬剤(フッ化物や CPC などを含む含嗽薬)の使用前後に採取したプラークの代謝活性に、違いが観察されるかを確認したところ、個人間で大きな違いが見られ、あまり変化のないケースも見られた。個人毎に、薬剤の効果が異なることが考えられ、オーダーメイド医療と同様の考え方で、このような日常使用の薬剤に置いても、その使用効果に個人差があることを念頭に置く必要が示唆された。

これまでに得られているプラークの代謝に関する知見の多くは、代表的な口腔内細菌を培養したものをを用いて行われてきた代謝研究で得た知見をプラークの代謝とみなしてきたものがほとんどであるが、今回確立した手法は、実際のヒトプラークを用いてその代謝活性を測定できることから、これまでわからなかった新たな知見の発見に寄与できる可能性が大いにありとされている。

また、薬剤による代謝の影響についても、これまでの代表的な口腔細菌を用いていること、また、菌の死滅を目指すという視点で行われていることが多かったが、本手法では様々な菌の混合である実際のプラークに対し、代謝のみを抑えればよいという別視点での研究展開を新たにもたすものであり、場合によっては、個人により、より適切な濃度で使用することを推奨することや、より低濃度での使用で効果を得られる可能性があれば、生体に優しい新たな薬剤使用方法の提案にも寄与できる可能性があると考えている。

(2) CE-TOFMS を用いたメタボローム解析

実際に採取したヒトプラーク内の代謝中間体を実際に検出できることは、これまで我々の研究室で確立してきたが、今回、その検出対象を広げ、糖代謝だけでなくアミノ酸代謝でも可能かどうかの確認を試みた。

その結果、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、アルギニン、システインなどのアミノ酸を代謝した際に、各種代謝中間体及び最終代謝産物量に変動が見られ、これらのアミノ酸が、ヒトプラークにより実際に利用されることが示唆された。また、各種代謝中間体、最終代謝産物の変動データを基に、代謝経路を検討したところ、これまで代表的な口腔細菌を用いて予測されてきた代謝経路が、実際にヒトプラーク内で働いていることが示唆された。

しかし、今回の実験では採取したプラークを *in vitro* で代謝したデータを示している。最終的にはこれらのアミノ酸溶液による含嗽前後のプラークで、各種代謝産物の検出量の違いを検討したいと考えていたが、当該研究期間中に明らかな結果を示すには十分なデータが得られなかったため、これについては今後の検討課題とした。

本研究により確立したヒトプラーク代謝活性リアルタイムモニタリングシステムと、ヒトプラークのメタボローム解析手法を組み合わせ、今後もさらに代謝全体の解明を目指しているところである。

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1件)

Ishiguro K, Washio J, Sasaki K, Takahashi N., Real-time monitoring of the metabolic activity of periodontopathic bacteria., *J Microbiol Methods*. 2015 May 15; 115:22-26.
doi:10.1016/j.mimet.2015.05.015. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

河内美帆, 佐野拓人, 涌井杏奈, 平吹有香, 曾田彩花, 竹中佑太, 米田茜音, 中畑那奈, 相原 瞳, Vidanapathirana GU, 佐藤拓一, 鷺尾純平, 安彦友希, 石黒和子, 真柳 弦, 高橋信博: ペットボトルの口の部分に付着する細菌および飲料物中の細菌の量および構成の解析(第2報) 第7回口腔保健用機能性食品研究会、2018年1月21日、柏原

Washio J, Suzuki Y, Dimas Prasetianto Wicaksono, Ishiguro K, Nishino M, Otake T, Sasaki S, Tadokoro S, Takahashi S, Ishiguro K, Takahashi N.: A novel method to screen and isolate nitrate-producing bacteria from the oral cavity. International Symposium for Multimodal research and Education in IOHS-Liaison 2018.. 13-14 January, 2018, Sendai, Japan.

Sano H, Aida A, Vidanapathirana G.U., Wakui A, Takenaka Y, Kawachi M, Aihara H, Washio J, Abiko Y, Mayanagi G, Ishiguro K, Yamaki K, Takahashi N, Sato T. Microbiota Profiling at the Mouth of Plastic Bottles after Drinking Straight from Bottles. International Symposium for Multimodal research and Education in IOHS-Liaison 2018.. 13-14 January, 2018, Sendai, Japan.

曾田彩花, 佐藤拓一, 石黒和子, 安彦友希, 真柳 弦, 鷺尾純平, 高橋信博: ペットボトルの口の部分に付着する細菌の量および構成(A pilot study), 第6回口腔保健用機能性食品研究会・総会, 2017年1月29日, 横浜

鷺尾 純平, 石黒 和子, 入江 大貴, 内山 愛理, 高橋 信博: 蛍光色素を用いた口腔プラークバイオフィルム代謝活性の高感度測定法. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016年8月24-26日, 札幌

Washio J, Ishiguro K, (ダブル筆頭著者) Irie D, Uchiyama A, Takahashi N: A high sensitive fluorescence-mediated assessment of plaque metabolic activity. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science 18-19 January, 2016, Sendai

鷺尾純平, 小川珠生, 北村 淳, 森島浩允, 田 玲錫, 石黒和子, 真柳 弦, 安彦友希, 佐藤拓一, 高橋信博: メタボローム解析: 口腔疾患の発生機序解明への新たなアプローチ 第68回東北大学歯学会 インターフェイス口腔健康科学研究紹介 2015

年12月11日, 仙台

〔図書〕(計0件)

特になし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 和子 (Ishiguro Kazuko)

東北大学・大学院歯学研究科・非常勤講師

研究者番号: 00755829