

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20635

研究課題名(和文)糖代謝からみる口腔Bifidobacteriumの齲蝕関連性について

研究課題名(英文)Carbohydrate metabolism related to cariogenicity of oral Bifidobacterium

研究代表者

安彦 友希 (ABIKO, YUKI)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00470170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Bifidobacteriumは腸内細菌として知られているが、近年、齲蝕病変からも検出されることが明らかになった。そこで本研究では代表的な齲蝕関連細菌であるStreptococcus mutansと比較分析し、糖代謝の側面から齲蝕関連性について検討した。その結果、Bifidobacteriumは、グルコースを代謝し酢酸を産生したことから、乳酸が主要な代謝産物であるS. mutansとは異なる機序で齲蝕に関与していることが推察された。またグルコースをグリコーゲンの形で菌体内に蓄積していたことから、齲蝕病巣のような外部からの糖供給が少ない環境でも代謝活性を維持し酸を産生し続けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bifidobacterium have recently been detected in carious lesions. Thus, the purpose was to examine the cariogenic potential of oral Bifidobacterium by analyzing the carbohydrate metabolism and acidic end-products. In addition, intracellular polysaccharide was characterized. The acid production of Bifidobacterium was lower than that of S. mutans, and maintained even after 2 hours. Without glucose addition, the acid production was also found. Both with and without glucose, the acid production was higher at pH 5.5 than that at pH 7.0. The main acidic end-product was acetate. Absorption spectrum indicated that the intracellular polysaccharide was glycogen-like. Bifidobacterium showed a higher acid production at pH 5.5 than 7.0, and had a considerable amount of glycogen-like intracellular polysaccharides, suggesting that oral Bifidobacterium can maintain and promote the environment of carious lesions, i.e. sugar limit and acidic.

研究分野：口腔細菌

キーワード：齲蝕 Bifidobacterium 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

Bifidobacterium は腸内細菌として知られているが、*Bifidobacterium* 選択培地の開発により、ヒト唾液からも検出されることが明らかになった (Beighton *et al.*, 2008)。以後、小児～成人の齲蝕病巣 (Mantzourani *et al.*, 2009) や、初期齲蝕病巣部 (white spot lesions) さらには歯肉炎部位のプラーク細菌叢 (Tanner *et al.*, 2012) から特徴的に検出されることが報告されている。

Bifidobacterium は「ピフィドシャント (bifid shunt)」と呼ばれる特殊な糖代謝経路を持つことが知られている。ミュータンスレンサ球菌等の一般的な解糖系では、グルコース 2 分子あたり 4 分子の ATP が生成されるが、ピフィドシャントではグルコース 2 分子あたり 5 分子の ATP が生成されるため、エネルギー効率率は最大で 1.25 倍となり得る。さらに、一般的な解糖系ではグルコース 2 分子から乳酸 4 分子が産生されるが、ピフィドシャントではグルコース 2 分子から酢酸 3 分子と乳酸 2 分子が産生されることから、酸産生効率も高くなっていると考えられる。

またこれまでの研究で、口腔 *Bifidobacterium* はミュータンスレンサ球菌よりも高い耐酸性能を持つことが報告されている (Nakajo *et al.*, 2010) ことから、口腔 *Bifidobacterium* は乳酸桿菌等と同様、齲蝕が発生しやすい環境作りに寄与していることが予測される。

さらに、口腔 *Bifidobacterium* は、環境中に糖が無い状態でも、菌体内に取り入れた多糖体を分解することにより、酸を産生し続ける性質を持つことが報告されている (Nakajo *et al.*, 2010)。糖の有無に関わらず酸産生を行う能力があることから、本菌は齲蝕への強い関連性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、糖代謝の側面から *Bifidobacterium* の齲蝕関連性について明らかにするために、口腔を模した環境における *Bifidobacterium* の糖代謝活性及び最終代謝産物について分析、検討した。また菌体内多糖の抽出・同定、さらにその合成・分解過程について検討した。

3. 研究の方法

Bifidobacterium dentium JCM1197, *Bifidobacterium longum* JCM1217、対照として *Streptococcus mutans* NCTC10449 を用い、実験は全て嫌気条件下で行った。対数増殖期の後期 Late-log growth phase (OD 660 nm = 1.0 - 1.2) で集菌し、150 mM KCl と 5 mM MgCl₂ を含む 2 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄後、同じ緩衝液に懸濁した菌懸濁液 (OD 660 nm: 3.5) を実験に用いた。

(1) 酸産生活性の測定

嫌気培養装置内に設置している自動中和滴定装置 (pH-stat 法) により pH 7.0 及び 5.5 でのグルコースからの酸産生活性を 2 時間測定した。pH は、安静時の一般的な値である pH 7.0 および臨界 pH である pH 5.5 に設定した。またグルコースの有無で酸産生活性を測定する pH-fall 法も行った。

(2) 代謝産物の定量分析

酸産生活性測定後のサンプル中の代謝産物を分析するために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。乳酸、酢酸、ギ酸を対象として定量分析した。グルコース添加前および添加 120 分後の反応溶液 0.45 ml を回収後、糖代謝反応を停止させるため直ちに 6N 過塩素酸溶液 0.05 ml を加えて混合した。次いで、同反応溶液を嫌気条件下から大気下に移し、遠心分離後、濾過膜 (pore size 0.20 μm) を用いて菌体成分を除去し、上清に含まれる各種有機酸を HPLC を用いて定量分析した。

(3) 菌体内多糖の同定および合成・分解過程の解明

各種細菌は 5% グルコース含有複合液体培地で嫌気グローブボックスにて培養した。集菌・洗菌後、菌塊を 50% (w/v) KOH に懸濁し、100 °C で 3 時間加熱した。自然放冷後、エタノール沈殿し、菌体内多糖を得た。抽出した菌体内多糖は、40 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁後、2% (w/v) KI で溶解した 0.2% (w/v) I₂ と混合し、400-800 nm の吸収スペクトルで測定した。比較対照にカキグリコーゲンをを用いた。

菌体内多糖の分解・合成過程に関わる代謝中間体 Glucose 1-phosphate (G1P) の挙動については、キャピラリー電気泳動 (CE: G1600AX; Agilent Technologies, Waldobonn, Germany) を飛行時間型質量分析計 (TOFMS: G1969A; Agilent Technologies) に接続した CE-TOFMS メタボローム解析装置を用いて解析した。

4. 研究成果

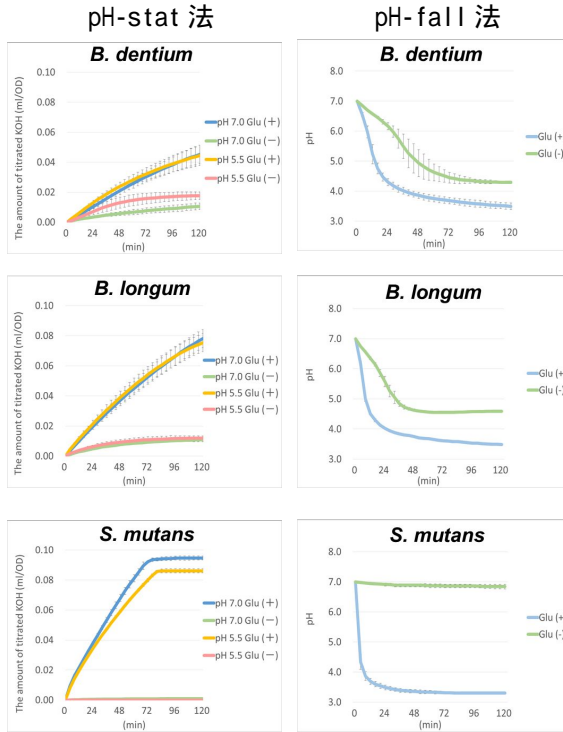
(1) 酸産生活性の測定

グルコース添加後 10 分間の酸産生活性は、*S. mutans* が *Bifidobacterium* よりも高かった。しかし、*S. mutans* はグルコースの添加が無いと酸を産生しなかったのに対し、*Bifidobacterium* はグルコース非添加でも酸産生活性が見られ、さらに 2 時間後もその活性が維持されたままだった。

また、*Bifidobacterium* は、pH 7.0 よりも pH 5.5 の方が酸産生活性が高かった。

Bifidobacterium は、グルコースが無い状態でも酸を産生したことから、予め菌体内に蓄えておいた糖を利用して代謝活動を行い、酸産生活性を維持するものと考えられ、それは歯の脱灰が起こる低い pH 環境の時に増強

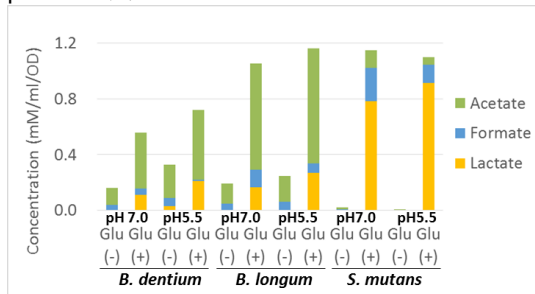
されることが推察された。



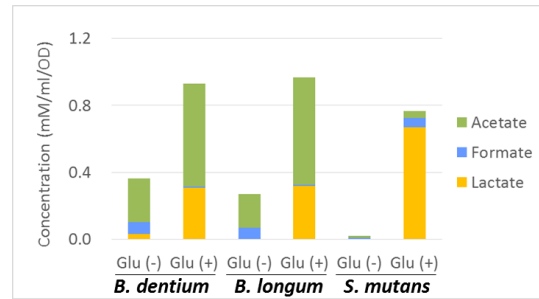
(2) 代謝産物の分析

S. mutans の主要な代謝産物は乳酸で、*Bifidobacterium* の主要な最終代謝産物は酢酸だった。また、*Bifidobacterium* では pH 7.0 よりも pH 5.5 で代謝産物の量が増加したのに対し、*S. mutans* では減少を示した。酢酸の酸解離定数 (pKa) は乳酸よりも高く、低い pH 環境下では乳酸よりも酢酸の方が非イオン型になりやすい。酸はイオン型よりも非イオン型の方がエナメル質に浸透しやすいという報告があるため、酢酸産生菌である *Bifidobacterium* は、*S. mutans* のような乳酸産生菌とは異なる機序で齲蝕の発症・促進に関与していることが考えられた。さらに、*Bifidobacterium* では pH 7.0 よりも pH 5.5 で代謝産物の量が増加しており、これは、*Bifidobacterium* はより pH の低い酸性環境下における代謝能の維持、すなわち、齲蝕誘発能の高さを示しているものと推察された。

pH-stat 法



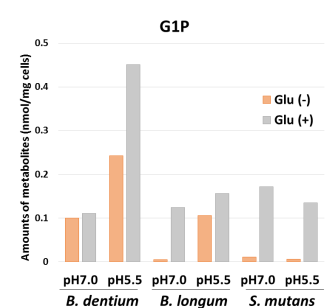
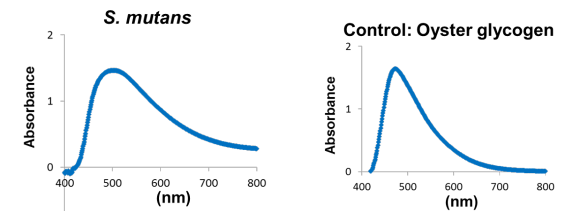
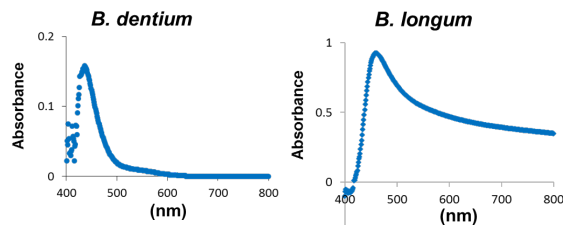
pH-fall 法



(3) 菌体内多糖の同定および合成・分解過程の解明

Bifidobacterium と *S. mutans* の菌体内多糖は、カキ由来のグリコーゲンとピークが一致していたため、グリコーゲンタイプであると考えられた。このことを確かめるために、CE-TOFMS メタボローム解析装置を用いて、グリコーゲンの合成・分解に関わる代謝中間体 Glucose 1-phosphate (G1P) の挙動について解析したところ、*Bifidobacterium* ではグルコースの有無に関わらず G1P が検出された。以上のことから、*Bifidobacterium* は、グルコースの存在下で多量の菌体内多糖 (グリコーゲン) を蓄積し、グルコースの非存在下でも酸を産生する能力を持つことが明らかになった。

これらの結果は、口腔 *Bifidobacterium* は、糖を供給しなくても酸性環境を維持し、促進できることを示唆しており、*S. mutans* とは異なる齲蝕誘発性を有するものと考えられた。



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2件)

Kitagawa H, Miki-Oka S, Mayanagi G, Abiko Y, Takahashi N, Imazato S: Inhibitory effect of resin composite containing S-PRG filler on *Streptococcus mutans* glucose metabolism. *J Dent.* 70:92-96. 2018. 査読有り
doi: 10.1016/j.jdent.2017.12.017.

Kawashita M, Endo N, Watanabe T, Miyazaki T, Furuya M, Yokota K, Abiko Y, Kanetaka H, Takahashi N: Formation of bioactive N-doped TiO₂ on Ti with visible light-induced antibacterial activity using NaOH, hot water, and subsequent ammonia atmospheric heat treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016 May 9;145:285-290. 査読有り
doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.

[学会発表](計8件)

Abiko Y, Kameda M, Nagai K, Sugahara A, Murakami K, Kawashima J, Washio J, Takahashi N: Carbohydrate metabolism related to cariogenicity of oral *Bifidobacterium*. International Symposium for Multimodal research and Education in IOHS-Liaison 2018, 2018.

Kameda M, Abiko Y, Washio J, Takahashi N: Acid production and its fluoride tolerance of a novel caries-associated bacterium *Scardovia wiggisiae*. International Symposium for Multimodal research and Education in IOHS-Liaison 2018, 2018.

Kameda M, Abiko Y, Washio J, Takahashi N: Carbohydrate metabolism of a novel caries-associated bacterium *Scardovia wiggisiae* A possible role of acetic acid bacteria in the dental caries etiology 第59回歯科基礎医学会学術大会アップデートシンポジウム、2017年.

Manome A, Abiko Y, Kawashima J, Fukumoto S, Takahashi N: Lactose and glucose metabolism of oral *Bifidobacterium* and its fluoride-inhibition. The 95th IADR General Session & Exhibition, 2017.

馬目歩実、安彦友希、川嶋順子、福本敏、高橋信博：口腔 *Bifidobacterium* 属のグルコースおよびラクトース代謝とフッ化物による抑制効果、第6回口腔保健用機能性食

品研究会・総会、2017年.

Manome A, Abiko Y, Kawashima J, Fukumoto S, Takahashi N: Inhibitory effects of fluoride on the carbohydrate metabolism of oral *Bifidobacterium*. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2016.

安彦 友希, 菅原 敦信, 村上 和弘, 川嶋順子, 高橋 信博：糖代謝の生化学的性質からみる *Bifidobacterium* の齲蝕関連性. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016年.

馬目 歩実, 安彦 友希, 川嶋 順子, 福本敏, 高橋 信博：齲蝕関連 *Bifidobacterium* の酸産生活性とそのフッ化物による抑制効果. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安彦 友希 (ABIKO, Yuki)
東北大学大学院・歯学研究科・助教
研究者番号：00470170

(2) 研究協力者

馬目 歩実 (MANOME, Ayumi)
亀田 真衣 (KAMEDA, Mai)
川嶋 順子 (KAWASHIMA, Junko)
鷲尾 純平 (WASHIO, Jumpei)