

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20447

研究課題名(和文) 根面齲蝕関連菌Actinomycesの代謝様式とフッ化物作用機序の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the fluoride-effects on the metabolic mechanism of oral Actinomyces

研究代表者

川嶋 順子(Kawashima, Junko)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：50633707

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)：齲蝕はプラーク構成細菌の産生する酸により発症する。齲蝕予防を目的に世界中で広く利用されているフッ化物は酸産生を阻害することが知られているが、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。本研究では齲蝕関連菌に着目し、口腔内環境を模した嫌気グローブボックス内での検討を続けた。この結果により、酢酸産生菌であるBifidobacteriumが、他の齲蝕関連乳酸産生菌とは異なるメカニズムで虫歯を誘発および促進する可能性があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

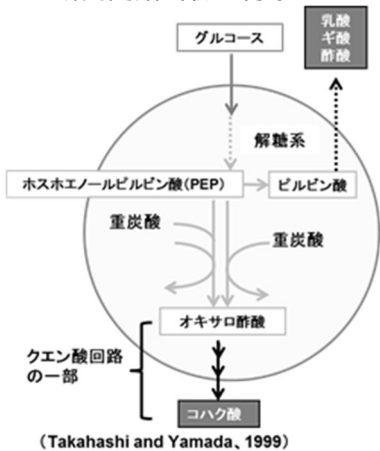
本研究では、齲蝕や白斑病変から検出されるBifidobacteriumが酸産生およびフッ化物耐性を持つことを明らかにした。Bifidobacteriumの高いフッ化物耐性は、ビフィドシャントと呼ばれる特殊な代謝経路に起因することが考えられ、この経路により産生される酢酸は弱酸ではあるが、乳酸産生細菌による齲蝕発生メカニズムとは異なる。酸産生を行う口腔内細菌は齲蝕に関連すると考えられているが、菌種により産生する酸もその代謝経路も異なる。今回検討した菌は、フッ化物による酸産生阻害が確認されたがその効果は一樣ではなく、効率的な齲蝕予防の観点からライフステージに合わせた対策が必要であると考えらる。

研究成果の概要(英文)：Dental-caries is caused by the acid produced by plaque-forming bacteria. Fluoride is widely used to prevent caries in various ways around the world. It has been reported that fluoride inhibits the acid production and growth of most oral bacteria, such as oral Streptococcus and Actinomyces. In this study we focused on the caries-associated bacteria, Actinomyces, Streptococcus and Bifidobacterium and examined their acid-producing activity and the suppression of carbohydrate metabolism by fluoride, while considering the physiological conditions of the oral cavity. Our result suggests that Bifidobacterium, which is an acetate-producing bacterium, might induce and promote dental caries through a different mechanism from lactate-producing bacteria.

研究分野：歯科保存学

キーワード：Streptococcus 酸産生 フッ化物 Actinomyces Bifidobacterium

1. 研究開始当初の背景



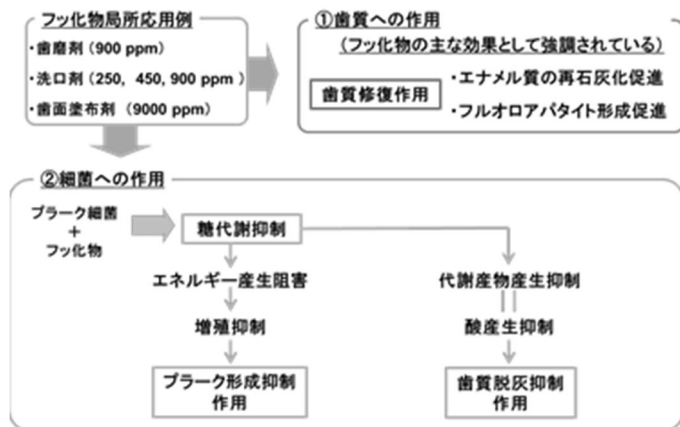
口腔 *Actinomyces* は、ヒトのプラーク細菌において口腔 *Streptococcus* に次いで多く、根面齲蝕病巣からも高頻度で検出されることから、根面齲蝕との関連が注目されている。現在の日本では、65 歳以上の高齢者が全人口の約 1/4 を占め、さらに 60 歳以上の高齢者の約 50% が根面齲蝕を有することから、根面齲蝕は今後ますます増加することが危惧される。

齲蝕は、プラーク構成細菌の産生する酸により発症し、そのほとんどは糖代謝による。口腔 *Actinomyces* も糖を代謝し酸を産生することが知られているが、その糖代謝経路は、*S. mutans* などの口腔 *Streptococcus* とは大きく異なる。糖代謝は一般的に解糖系 (EMP pathway) から始まるが、*Actinomyces* ではこれに加え、唾液構成成分である重炭酸を固定してクエン酸回路の一部を利用し、コハク酸を産生する経路をもつ。重炭酸は、*Actinomyces* の増殖と酸産生を促進することが知られており、同菌の糖代謝と酸産生、齲蝕誘発能

を検討する上で重要な因子と考えられる。そのため、同菌の齲蝕誘発能の口腔内での様相を観察するには、重炭酸存在下で行う必要がある。

フッ化物は齲蝕予防を目的に世界中で広く利用され、その効果のひとつに脱灰歯質の修復促進作用があり、フッ化物局所応用の主な目的となっている。一方、*in vitro* では *S. mutans* を代表とする口腔 *Streptococcus* の糖代謝抑制による、酸産生抑制・増殖抑制が知られている。口腔 *Actinomyces* においても、フッ化物の糖代謝抑制による酸産生抑制、増殖抑制が報告されている。

唾液や歯肉溝滲出液には多くの窒素原(タンパク質、ペプチドおよびアミノ酸)が含まれ、窒素原が酸産生および増殖を促進されることは報告されており、クエン酸回路の一部を利用して効率的な代謝機構が存在することが示唆される。ただし、これまでの報告は現象を示したのみであり、詳細なメカニズムの解明には至っていない。



2. 研究の目的

本研究では、口腔内細菌に対するフッ化物および窒素源の酸産生および増殖に対する効果に着目し、酸産生および増殖メカニズムに関する包括的解析を行い、代謝経路の解明と効果的なフッ化物応用法を検討し、提案する。

3. 研究の方法

本研究では、口腔 *Actinomyces* と *Streptococcus* に着目し、嫌気条件下での酸産生および増殖に対する基質の違いやフッ化物による影響を調べ、その酸産生および増殖メカニズムの解明を目的としていたが、中間代謝産物の測定に使用する CE-TOFMS の不調等による研究の遅れが生じた。そのため、対象とする口腔内細菌として、齲蝕関連菌として注目され始めている口腔 *Bifidobacterium* も研究対象として加え、フッ化物の酸産生に対する影響を評価した。

(1) pH スタットによる酸産生能の評価

口腔内細菌に対するフッ化物による酸産生・増殖抑制効果を、嫌気グローブボックス (N<sub>2</sub> 90%; H<sub>2</sub> 10%, NH-Type, Hirasawa Works, Tokyo, Japan) 内の高度嫌気条件下、同一条件で比較・検討した。使用菌株は、*Actinomyces naeslundii*、*Actinomyces oris*、*Streptococcus mutans*、*Bifidobacterium dentium*、*Bifidobacterium longum* を用い、酸産生量の評価には、pH スタット装置 (AUTO pH stat; model AUT-701, TOA Electronics, Tokyo, Japan) を嫌気グローブボックス内の高度嫌気条件下にて使用し、基質 (グルコース、ラクトース) 共存フッ化物濃度を変えた条件下で 10 分間サンプリングし代謝産物の解析に使用した。同装置は、中和滴定の原理を用いており、酸産生により低下した pH を中和するのに加えられた水酸化カリウム (KOH) の量によって酸産生量を評価することが可能である。

(2) 有機酸分析計による最終糖代謝産物の評価

上記の、酸産生量の評価を行った反応液中の最終糖代謝産物 (乳酸・ギ酸・酢酸) の分析を行った。最終代謝産物の分析・定量に使用した有機酸分析計 (Shimadzu Prominence LC-20AD, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) は、有機酸分析に特化した高速液体クロマトグラフィーであり、高精度での最終糖代謝産物の定量が可能とされている。

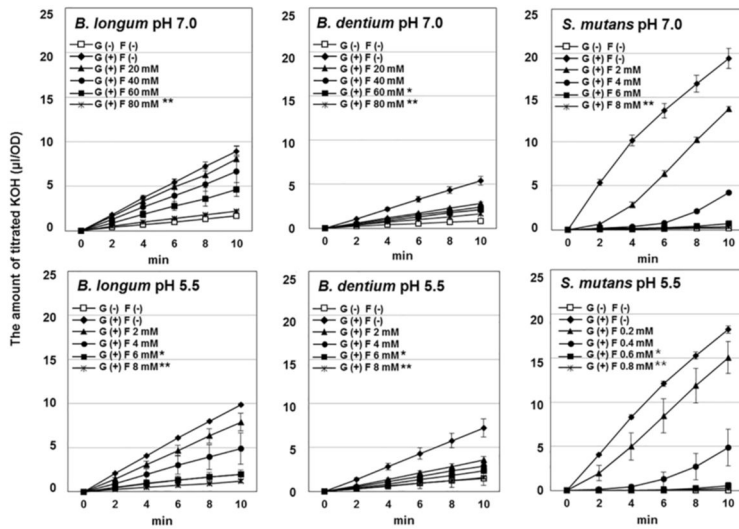
### (3) メタボローム解析 (糖代謝中間体の網羅的定量解析)

これまで、口腔内細菌の代謝活性における主な研究対象は、*Streptococcus*であった。特に、フッ化物は解糖系酵素の一つであるエノラーゼを直接阻害することが報告されているが、他の口腔細菌に対するフッ化物の解糖系阻害機構について解明した報告はない。

そこで、酸産生能を評価した際のサンプルを利用してメタボローム解析(代謝中間体の網羅的定量解析)を行い、フッ化物の代謝経路への影響を検討した。メタボローム解析にはCE-TOFMS (キャピラリー電気泳動 - 飛行時間測定型質量分析計)を使用した。同装置は既存の方法とは異なり、菌体内代謝活動の瞬間を代謝中間体の網羅的分析による「スナップショット」としてとらえることができる。そのため、詳細に菌体内での代謝の様相を検討することが可能である。

## 4. 研究成果

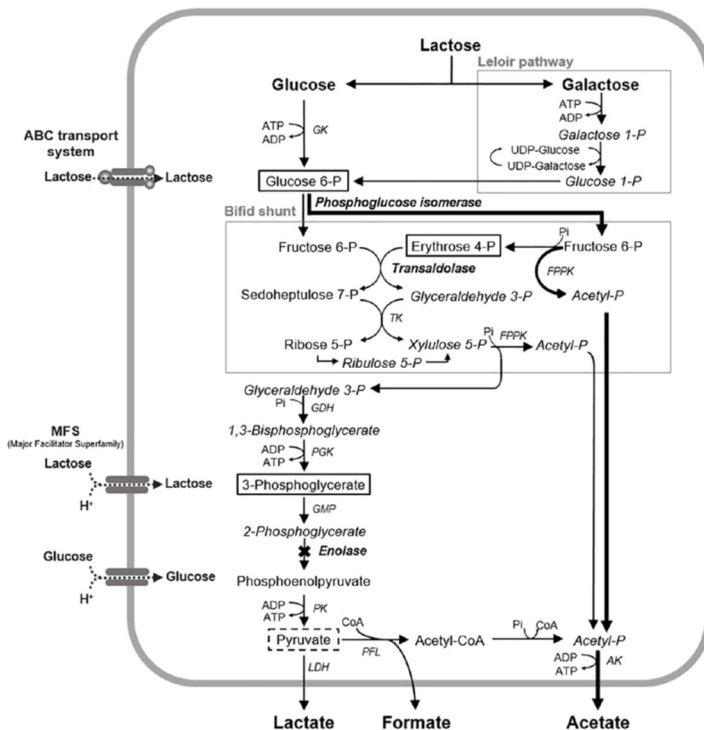
### (1) pH スタットによる酸産生能の評価



*Bifidobacterium* においてグルコースから生成される酸の量は、pH 7.0 よりも pH 5.5 で高かったことから、齲蝕原生を持つことが示唆される。一方で、*S. mutans* が生成する酸の量は pH 7.0 の場合よりも pH 5.5 の場合の方が低かったが、どちらの条件においても *S. mutans* では、*Bifidobacterium* よりも酸産生量は多かった。フッ化物の影響については、どの菌もフッ化物の濃度依存的に酸産生量は減少した。酸産生量の 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を比較すると、*Bifidobacterium* では *S. mutans* よりも 6.0~14.2 倍高く、*Bifidobacterium* のフッ化物耐性が示唆された。

### (2) 代謝産物の評価

*Bifidobacterium* ではグルコースから酢酸を、*A. naeslundii*、*A. oris*、*S. mutans* では乳酸が主に産生されていた。乳酸の割合は、どの菌でも pH 5.5 で増加していた。中間代謝産物および酵素活性の測定からどの菌でもフッ化物によるエノラーゼの阻害が起こっていたことが分かった。ただし、*Bifidobacterium* は“ビフィドシャント”と呼ばれるアセチルリン酸を介してフルクトース 6-リン酸から酢酸へのバイパス経路があるため、フッ化物による代謝阻害を回避し、酢酸と ATP を生成し続けることができる。



酢酸は乳酸よりも弱酸であり、乳酸 (pKa = 3.8) よりも酸解離定数 (pKa = 4.8) が高く、低 pH 環境では酢酸の解離平衡方程式はさらに左にシフトする (AH ⇌ A<sup>-</sup> + H<sup>+</sup>)。非イオン化の酸 (AH) は、イオン化状態 (A<sup>-</sup>) よりもエナメル質に浸透する可能性が高く、酸がエナメル質に浸透すると、水素イオンが放出され、エナメル質内で脱灰を引き起こす。これは、酢酸産生菌である *Bifidobacterium* が、他の齲蝕関連乳酸産生菌とは異なるメカニズムで虫歯を誘発および促進する可能性があることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Manome Ayumi, Abiko Yuki, Kawashima Junko, Washio Jumpei, Fukumoto Satoshi, Takahashi Nobuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Acidogenic Potential of Oral Bifidobacterium and Its High Fluoride Tolerance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.01099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土門ひと美, 鷲尾 純平, 安彦 友希, 川嶋 順子, 高橋 信博
2. 発表標題 フッ化物による歯周病関連菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> の増殖・代謝の抑制効果
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Abiko, Atsunobu Sugahara, Kazuhiro Murakami, Junko Kawashima, Nobuhiro Takahashi
2. 発表標題 Dental caries-associated glucose metabolism of oral Bifidobacterium
3. 学会等名 The 13th International Workshop on Biomaterials in Interface Science（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新たな蝕関連細菌ビフィドバクテリウム菌の糖代謝機構の解明  
<http://www.dent.tohoku.ac.jp/news/view.html#!507>  
川嶋助教らが執筆したビフィドバクテリウム菌の蝕誘発機能についての論文が国際学術誌に掲載されました  
<https://www.megabank.tohoku.ac.jp/news/33886>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----