

機関番号： 11301

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2008～ 2010

課題番号： 20791381

研究課題名 (和文) 歯内疾患関連菌 *E. faecalis* の広範囲 pH 環境における生物学的特異性研究課題名 (英文) Biological specificity of endodontic pathogen *E. faecalis* in wide pH environment

研究代表者

中條 和子 (NAKAJO KAZUKO)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号： 40374946

研究成果の概要 (和文)：

歯内疾患関連菌である *Enterococcus faecalis* および *Bifidobacterium longum*、齶蝕病巣からの検出が多く報告されている *Bifidobacterium dentium* の広範囲 pH 環境における生物学的特異性について検討した。*E. faecalis* は広範囲な pH に調整したアルギニン含有複合培地で高い増殖を示したことから、糖が供給され難い歯内う蝕病巣や水酸化カルシウム製剤を貼薬してもなお難治性病巣を呈する環境では、*E. faecalis* が滲出液中のアルギニンなどのアミノ酸を利用して増殖可能であることが示唆された。他方、*B. dentium* および *B. longum* は、*S. mutans* と同等の酸性環境において高い生存率と菌体内 pH 維持能をもつことが明らかになった。このことが、酸性環境である歯内病巣、または齶蝕病巣から本菌種が *mutans streptococci* と共に分離される一因であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

The aim of this study was to evaluate the biological specificity in the wide pH environment of infected root canal-related bacteria: *Enterococcus faecalis* and *Bifidobacterium longum* and caries-related bacteria: *Bifidobacterium dentium*. *E. faecalis* grew well at wide pH range of arginine-containing complex medium, suggesting that this bacteria can grow using amino acid such as arginine in the exudates of persistent infected root canals where calcium hydroxide medicaments are ineffective or poor carbohydrate supply. Meanwhile, the high survival rate and intracellular pH maintenance ability of bifidobacteria comparable to *Streptococcus mutans* in the acidic environment may account for why bifidobacteria exist as stable species in acidic caries lesions together with *mutans streptococci*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：口腔細菌学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学、口腔細菌、腸内細菌、*E. faecalis*、bifidobacteria、感染根管、pH 耐性

## 1. 研究開始当初の背景

水酸化カルシウム製剤の歯内療法への利用は、国内外で広く一般的であり、同製剤貼薬後の予後不良症例に伴う、*E. faecalis* の特異的な検出に関する報告がある。しかし、これらの多くは病巣部位からの同菌種の検出率や薬剤感受性に関するもので、病原性そのものについて詳細に調べた報告は少なかった。元来、*E. faecalis* はアルカリ環境に耐性を有する腸内細菌種として注目されてきた。しかし、*E. faecalis* が「なぜ根管に残存するのか」、「なぜ病原性を発揮するのか」は未だ不明な部分が多かった。申請者はこれまでに、*E. faecalis* が難治例の根管から高頻度に分離されること (Oral Microbiology and Immunology 19: 390-394, 2004)、また感染根管と腸管から分離した同菌種の遺伝学的比較を報告した (新潟歯学会雑誌 33: 182-188, 2003)。さらに同菌種が pH 4.0 - 11.0 という広範囲 pH 環境において生息可能であり、その pH 耐性メカニズムは酸やアルカリに対する菌体膜の非浸透性と耐久性に大きく依存していることを報告した (Oral Microbiology and Immunology 21: 283-288, 2006)。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究を継続・発展させ、*E. faecalis* および *E. faecalis* 同様に腸内細菌であり、近年、感染根管からの分離が報告される bifidobacteria の持つ種々の生物学的性状を生化学的に分析し、さらに、その性状に即して病巣部位からの本菌の除去療法の考案を目的とするものである。

### (1) *E. faecalis* のアミノ酸含有培地での増殖能：

感染根管では糖質の供給は少なく、滲出液として血清および白血球や細菌由来タンパク質分解酵素による歯髓組織分解産物であるタンパク質、ペプチド、アミノ酸が供給される。そこで、酸性環境からアルカリ環境における *E. faecalis* のアミノ酸を基質とした増殖能について耐酸性が高い *Streptococcus mutans* と比較・検討した。

### (2) bifidobacteria の耐酸性：

感染根管からの検出が報告されている *Bifidobacterium longum*、および齶蝕病巣から *mutans streptococci* と共に検出が多く報告されている *Bifidobacterium dentium* の耐酸性については不明である。そこで *B. dentium* および *B. longum* の耐酸性について増殖能、生存能および菌体内 pH 維持能を *S. mutans* と比較・検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) *E. faecalis* のアミノ酸含有培地での増殖能：

*E. faecalis* JCM 8728、*S. mutans* NCTC 10449 を 0.5% アルギニン含有複合培地 (pH 3.0 - 12) にて嫌気培養し、48 時間後の増殖量 (濁度) を吸光分光光度計にて測定した。

### (2) bifidobacteria の耐酸性：

*B. dentium* DSM 20436、*B. longum* DSM 2705 および *S. mutans* NCTC 10449 を 0.5% グルコース含有複合培地 (pH 5.0 と 7.0) にて嫌気培養し、48 時間後の増殖量 (濁度) を吸光分光光度計にて測定した。次に上記 3 菌種を緩衝溶液 (pH 4.0) に曝し、3 時間後の菌液を連続希釈法にて寒天培地に播種し、48 時間培養後、得られたコロニー数から生存率を求めた。さらに、上記 3 菌種に菌体内 pH 蛍光指示薬を負荷し、pH < 5.0 緩衝液中において得られた蛍光強度から、菌体内 pH を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) *E. faecalis* のアミノ酸含有培地での増殖能：

*E. faecalis* は pH 4.0 - 11.0 の広範囲において高い増殖を示したが、*S. mutans* では pH 5.0 - 8.0 の狭い範囲かつ低い増殖を示した。以上のことから、う蝕病巣のように糖が多量に供給され低 pH が持続する環境では *S. mutans* が優勢であり、糖が供給され難い歯内う蝕病巣や水酸化カルシウム製剤を貼薬してもなお難治性病巣を呈する環境では、滲出液中のアルギニンなどのアミノ酸を利用しての増殖可能である *E. faecalis* が優勢となることが示唆された。

### (2) bifidobacteria の耐酸性：

pH 5.0 における *B. dentium* および *B. longum* の増殖量は、それぞれ  $16.7 \pm 8.2$  および  $35.6 \pm 6.1$  (pH 7.0=100) であり、*S. mutans* ( $19.4 \pm 4.6$ ) と同等またはそれ以上であった。pH 4.0 における 3 時間後の *B. dentium* および *B. longum* の生存率はそれぞれ  $21.9 \pm 23.6$  および  $13.7 \pm 4.5$  (0 時間=100) を保ち、*S. mutans* の生存率よりも高かった。pH < 5.0 における *B. dentium* および *B. longum* の菌体内 pH はそれぞれ 5.3-6.0 および 5.7-6.5 を示し、*S. mutans* の菌体内 pH (4.8-5.5) よりも高く、維持能は優れていた。以上のことから *B. dentium* および *B. longum* は、*S. mutans* と同等の酸性環境において高い生存率と pH 維持能をもつことが明らかになった。このことが、酸性環境である歯内病巣、または齶蝕病巣から本菌種が *mutans streptococci* と共に分離される一因であると考えられる。なお、本研究成果については論文発表を行った (Caries Res 44(5): 431-437, 2010)。

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 4 件)

1) **Izutani N, Imazato S, Nakajo K, Takahashi N, Takahashi Y, Ebisu S and Russell RRB**: Effects of antibacterial monomer

12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) on bacterial viability and metabolism. Eur J Oral Sci 119(2): 175-181 2011. 査読あり

2) **Nakajo K, Takahashi N and Beighton D**: Resistance to acidic environments of caries-associated bacteria: *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium longum*. Caries Res 44(5): 431-437, 2010. 査読あり

3) **Aizawa S, Miyasawa-Hori H, Nakajo K, Washio J, Mayanagi H, Fukumoto S and Takahashi N**: Effects of alpha-amylase and its inhibitors on acid production from cooked starch by oral streptococci. Caries Res 43(1): 17-24, 2009. 査読あり

4) **Nakajo K, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Ebisu S and Takahashi N**: Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. Dental Materials 25(6): 703-708, 2009. 査読あり

[学会発表] (計 32 件)

1) **Domon-Tawaraya H, Nakajo K, Washio J, Fukumoto S and Takahashi N**: Divalent cations enhance short-time fluoride exposure-induced inhibition on acid production by oral streptococci. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science 8 March, 2011, Sendai

2) **Kawashima J, Nakajo K, Washio J, Shimauchi H and Takahashi N**: *Actinomyces* acid production: Effects on bicarbonate and fluoride at neutral and acid pH. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

3) **Nakajo K, Beighton D and Takahashi N**: Acid-tolerance and endogenous acid-production of oral bifidobacteria. The 4th International Symposium for

Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

4) **Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K and Takahashi N**: Quantification and identification of bacteria in the maxillary obturator-prostheses. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science 8 March, 2011, Sendai

5) **中條和子**: フッ化物局所応用によるプラーク齲蝕原性制御効果を再考する-プラーク細菌の酸産生抑制機構と二価金属イオンの影響-第3回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会 2011年2月4日, 長崎

6) **Domon-Tawaraya H, Nakajo K, Washio J, Fukumoto S and Takahashi N**: Divalent cations enhance short-time fluoride exposure-induced inhibition on streptococcal acidogenicity. 第58回 JADR 学術大会 2010年11月20日, 北九州

7) **土門-俵谷ひと美, 中條和子, 鷲尾純平, 福本 敏, 高橋信博**: 短時間フッ化物曝露による *Streptococcus mutans* 酸産生抑制効果に与える二価イオンの影響, 第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月21日, 東京

8) **田代宗嗣, 北村 淳, 村岡 希, 中條和子, 高橋信博**: カルシウム・プレリンズはフッ化ナトリウム洗口によるプラーク酸産生抑制効果を増強する, 第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月22日, 東京

9) **中條和子, 高橋信博, Beighton D**: 齲蝕関連細菌 *Bifidobacterium dentium* と *Bifidobacterium longum* の耐酸性 - ミュータンスレンサ球菌、乳酸桿菌との比較, 第52回歯科基礎医学会学術大会 2010年9月22日, 東京

10) **Nakajo K, Yagishita Y, Takahashi N and Beighton D**: Acid-tolerance of oral bifidobacteria and its comparison with *Streptococcus mutans*. The 88th IADR, July 17, 2010, Barcelona, Spain

11) **泉谷尚美, 今里聡, 中條和子, 高橋信博, 高橋雄介, 恵比須繁之**: 種々の濃度での抗菌性モノマーMDPBの殺菌・静菌特性の解析. 日本歯科保存学会 2009年度秋季学術大会 (第131回). 2009年10月29日. 仙台

12) **Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K and Takahashi N**:

Detection of bacteria in closed hollow obturators of maxillary prostheses. The 2nd Meeting of IADR Pan Asian Pacific Federation (PAPF) and the 1st Meeting of IADR Asia/Pacific Region (APR), 24 September, 2009, Wuhan, China

13) **Nakajo K, Takahashi M, Sasaki K and Takahashi N:** Evaluation of inhibitory effect of biomaterials on oral biofilm: Ti-Ag alloys. Interdisciplinary Science of Nanomaterials (Japan-Korea Asian Core Program General Meeting in conjunction with Global COE Program International Conference 2009). 25 September, 2009. Sendai

14) **Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K and Takahashi N:** Detection of microorganisms from inside of acrylic resin prostheses. The 13<sup>th</sup> International College of Prosthodontists. September 10, 2009. Cape Town, South Africa

15) **川嶋順子、中條和子、鷲尾純平、島内英俊、高橋信博:** *Actinomyces* の糖代謝 — フッ化物耐性とその重炭酸による影響. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会. 2009 年 9 月 10 日. 新潟

16) **土門-俵谷ひと美、中條和子、鷲尾純平、宮澤-堀はるみ、福本敏、高橋信博:** 短時間フッ化物曝露による *Streptococcus mutans* のフッ素吸着及び酸産生能への影響. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会. 2009 年 9 月 10 日. 新潟

17) **中條和子、高橋正敏、高橋信博:** Ti-Ag 合金の口腔内細菌に対する付着抑制効果. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会. 2009 年 9 月 11 日. 新潟

18) **竹内裕尚、中條和子、佐藤拓一、佐久間陽子、小山重人、佐々木啓一、高橋信博:** アクリルレジン製補綴物内部の微生物の検出. 平成 21 年度先端歯学スクール 2009. 2009 年 8 月 27-28 日. 淡路島

19) **Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K and Takahashi N:** Detection of microorganisms from inside of acrylic resin prostheses. ナノ・アモルファス材料および高機能インターフェイス科学シンポジウム. 2009 年 8 月 7-8 日. 蔵王, 山形

20) **Takahashi N, Nakajo K, Asanoumi T, Shibata A, Yagishita Y and Washio J:** Short-term inhibition of plaque acidogenicity by NaF-mouthrinse and fluoride retention within dental plaque. ORCA 2009, 1-4 July, 2009. Budapest, Hungary

21) **竹内裕尚、中條和子、佐藤拓一、佐久間陽子、小山重人、佐々木啓一、高橋信博:** 顎義歯の中空型オブチュレーター (塞栓部) 内部の細菌叢の解析. 第 6 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム. 2009 年 6 月 16 日. 仙台

22) **Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Sasaki K and Takahashi N:** Detection of viable bacterial cells in acrylic resin denture bases. The 3<sup>rd</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science, 15-16 January, 2009. Sendai

23) **Nakajo K, Asanoumi T, Shibata A, Yagishita Y, Kato K and Takahashi N:** Short-term effect of single NaF-mouthrinse on glucose-induced pH fall in dental plaque. The 3<sup>rd</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science, 15-16 January, 2009. Sendai

24) **Domon H, Nakajo K, Washo J, Miyasawa-Hori H, Fukumoto S and Takahashi N:** Short-term effect of fluoride on acid production by *Streptococcus mutans*. The 3<sup>rd</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science, 15-16 January, 2009. Sendai

25) **Takahashi M, Nakajo K, Takahashi N, Sasaki K and Okuno O:** Experimental Ti-Ag alloys inhibit biofilm adhesion. The 3<sup>rd</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science, 15-16, January 2009. Sendai

26) **中條和子、土門ひと美、川嶋順子、柳下陽子、高橋信博:** 細菌代謝コントロールによる口腔疾患予防戦略—フッ化物が有する静菌作用とその生化学的メカニズム—第 50 回歯科基礎医学会学術大会, サテライトシンポジウム「基礎と臨床を繋ぐ研究を求めて—口腔細菌研究の未来を見据えて—」2008 年 9 月 23 日 東京

27) **土門ひと美、中條和子、宮澤-堀はるみ、福本 敏、高橋信博:** 短時間フッ化物応用に

よる齶蝕関連菌 *Streptococcus mutans* の酸産生抑制効果 第50回歯科基礎医学会学術大会 2008年9月23日 東京

28) **柳下陽子、柴田哲伸、浅海友文、中條和子、高橋信博**：フッ化物洗口はプラークの酸産生を短時間において抑制する 第50回歯科基礎医学会学術大会，2008年9月23日 東京

29) **Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Sasaki K and Takahashi N**: Quantification and identification of bacteria within acrylic resin denture bases. The 86 th IADR, 3 July, 2008, Toronto, Canada

30) **Nakajo K, Asanoumi T, Shibata A, Yagishita Y, Kato K and Takahashi N**: Short-term effect of NaF-mouthrinse on glucose-induced pH fall in plaque. The 86 th IADR, 3 July, 2008, Toronto, Canada

31) **竹内裕尚、中條和子、佐藤拓一、佐久間陽子、佐々木啓一、高橋信博**：アクリルレジンの入れ歯（レジン床義歯）の内部に潜む細菌の解析第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム，2008年5月19日，仙台

32) **中條和子、高橋雄介、騎馬和歌子、今里聡、高橋信博**：歯科用充填材料・ガラスアイオノマーセメントは齶蝕の原因となる酸産生を抑制する第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム，2008年5月19日，仙台

[図書] (計 4 件)

1) **Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Sasaki K and Takahashi N**: Detection of viable bacterial cells in acrylic resin denture bases. *In*: T. Sasano and O. Suzuki (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 230-231, 2010. 査読あり

2) **Nakajo K, Asanoumi T, Shibata A, Yagishita Y, Kato K and Takahashi N**: Short-term effect of single NaF-mouthrinse on glucose-induced pH fall in dental plaque. *In*: T. Sasano and O. Suzuki (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 267-268, 2010. 査読あり

3) **Domon H, Nakajo K, Washo J, Miyasawa-Hori H, Fukumoto S and Takahashi N**: Short-term effect of fluoride on acid production by *Streptococcus mutans*. *In*: T. Sasano and O. Suzuki (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York,

269-270, 2010. 査読あり

4) **Takahashi M, Nakajo K, Takahashi N, Sasaki K and Okuno O**: Experimental Ti-Ag alloys inhibit biofilm adhesion. *In*: T. Sasano and O. Suzuki (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 283-285, 2010. 査読あり

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：バイオフィルム抑制型抗菌性チタン合金

発明者：高橋正敏、中條和子、奥野攻、高橋信博、菊池聖史、高田雄京、佐々木啓一

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2008-294012

出願年月日：2008年11月18日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中條 和子 (NAKAJO KAZUKO)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40374946