

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09939

研究課題名（和文）アルカリ産生性アクチノマイセス属細菌を応用したう蝕管理法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a method for caries management using alkali-producing Actinomyces bacteria

研究代表者

大原 直子（OHARA, Naoko）

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：80301365

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：アクチノマイセス属の主要3菌種 *Actinomyces viscosus*、*A. naeslundii*、*A. israelii* のアルカリ産生について調べたところ、*A. israelii* が最も高く、アルギニン添加培地で培養すると培養上清pHはアルカリ側へ傾くことが明らかとなった。続いてアクチノマイセス菌と *Streptococcus mutans* と共培養の検討では、*S. mutans* の増殖が速いのに対し、アクチノマイセス菌の増殖は遅いため、*S. mutans* によるpH低下を抑止するには、アクチノマイセス菌の作用増強が必要であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に、プラークコントロールとは、プラーク形成や付着の抑制および除去などのプラークの量のコントロールを指している。本研究は、プラーク中の細菌叢の環境を変化させることにより、プラークの質をコントロールし、う蝕を予防・管理することをめざしている。う蝕は、細菌の糖代謝サイクルによる酸産生により生じる。本研究では、アクチノマイセス属細菌が酸性の環境を中和するための緩衝能力を備えもつ可能性を示すことができた。実現化までにはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：When the alkaline production of the three main Actinomyces species *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii*, and *A. israelii* was investigated, it was found that *A. israelii* had the highest alkaline production, and when cultured in arginine-added medium, the pH of the culture supernatant shifted to the alkaline side. Next, in a study of co-culture of Actinomyces with *Streptococcus mutans*, it was found that *S. mutans* grew quickly, whereas Actinomyces grew slowly, and therefore it was found that the effect of Actinomyces needed to be enhanced to suppress the pH drop caused by *S. mutans*.

研究分野：歯科保存学

キーワード：アクチノマイセス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

う蝕発症の直接的原因は、プラーク内細菌が産生する有機酸の反応である。本研究では、細菌側へのアプローチにより細菌叢の病原性を制御すること、具体的には、アルカリ性を呈し酸を中和させるプラーク環境を創り出し、病原性の低い細菌叢へ誘導し毒性を軽減させることによるう蝕予防・管理法を目指す。本研究では口腔内細菌の 10~20% を占める口腔内細菌であるアクチノマイセス属菌にアルカリ産生を誘導することについて検証する。酸産生菌との共培養により pH の中和反応を生じさせることができるか、細菌叢を変化させることができるかを検討する。

### 2. 研究の目的

アクチノマイセス属主要 3 菌種をターゲットとし、アルカリ産生の主要経路の 1 つであるアルギニンデヒミナーゼシステム (ADS) が機能し、アルカリ産生を生じさせることができるかどうかを確認する。また、アクチノマイセス菌と *S. mutans* との共培養による菌の相互作用を検討し、アクチノマイセス菌によるアルカリ産生が *S. mutans* による pH 低下に拮抗しう蝕リスクの低減に寄与することができるか、また、細菌叢の変化によりプラークの質のコントロールが可能かどうかの検討を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ADS の利用について

ADS では、アルギニンがオルニチン、アンモニアおよび CO<sub>2</sub> に異化され ATP を産生するので、この時生じるアンモニアによりアルカリ性となる。*A. viscosus*、*A. naeslundii*、*A. israelii* の培養環境中にアルギニンを添加することにより、それぞれの菌がもつアルギニン分解能およびアルカリ産生誘導について検討を行った。アルカリ産生は、フェノールレッドによる呈色および PH 測定を実施した。

#### (2) ウレアーゼによるアルカリ産生について

菌がウレアーゼ活性をもつ場合、ウレアーゼは尿素を二酸化炭素とアンモニアに加水分解し、アンモニアを生じるためにアルカリ産生誘導が可能となる。尿素添加培地での培養にて *A. naeslundii* のウレアーゼ活性を調べた。

#### (3) *S. mutans* との共培養による菌の相互作用について

アクチノマイセス菌と *S. mutans* との共培養により、*S. mutans* の増殖抑制が生じるか、培養液の pH 低下を防ぐことができるか、液体培養および寒天培地にて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) ADS の利用について

*A. viscosus*、*A. naeslundii*、*A. israelii* のアルギニン分解能およびアルカリ産生は *A. israelii* が最も高く、*A. israelii* をアルギニン添加培地で培養すると培養上清 pH はアルカリ側へ傾くことを明らかとなった。*A. israelii* について、培養の方法およびアルギニンの添加濃度にもなう、培養環境のアルカリ変化の動態について検討を行った結果、トリプトン・イーストブロスに、4% アルギニン塩酸を添加して嫌気培養すると、2 日間の培養で、培養上清 pH は 5.0 から 8.0 に上昇しアルカリ側へ傾くことが明らかとなった。アルギニン塩酸を培地に添加した場合のみに、アンモニアが培養上清中に検出されたため、菌がアルギニンを分解することによりアンモニアが産生され、アルカリ性の環境変化を誘導したことが示された。

#### (2) ウレアーゼ活性について

菌のもつウレアーゼ活性によるアルカリ産生の確認を目的として、尿素添加培地での培養にて反応を調べたが、明確な結果は得られなかった。

#### (3) *S. mutans* との共培養による菌の相互作用

*A. israelii* と *S. mutans* の共培養の結果、*S. mutans* の増殖が速いのに対し、*A. israelii* の増殖は遅く、共培養の影響を結論付けるための明確な結果は得られなかった。*A. israelii* および *S. mutans* とともにアルギニン添加の培地の方が増殖が良く、アルギニン添加の培地では、*S. mutans* の単培養でも pH が上昇した。このことは、*S. mutans* もアルギニンデヒミナーゼシステムを保有している可能性を示唆している。*S. mutans* はアルギニンの添加の有無と関係なく、*A.*

*israelii* との共培養することにより増殖率の低下を認めた。

*A. israelii* をアルギニン添加あるいは無添加の培地で培養し、それぞれ得られた培養上清に対し *S. mutans* の増殖反応を検討したところ、アルギニンを添加した培地での培養上清では、アルギニン無添加での培養上清に比べて増殖が抑制された。また、アルギニン無添加培地での培養上清の pH は、*S. mutans* の増殖により上昇した。*A. israelii* が増殖することにより放出される成分が *S. mutans* の代謝に影響を及ぼした可能性がある。

*A. naeslundii* と *S. mutans* との共培養による相互作用についての検討では、*S. mutans* の増殖が速く酸産生能も高いため、*S. mutans* の反応が上回る結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                                  | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 松崎 久美子 (田中久美子)<br><br>(MATSUZAKI Kumiko)<br><br>(50550802) | 岡山大学・医歯薬学域・助教<br><br><br><br>(15301)      |    |
| 研究分担者 | 大原 直也<br><br>(OHARA Naoya)<br><br>(70223930)               | 岡山大学・医歯薬総合研究科・特命教授<br><br><br><br>(15301) |    |
| 研究分担者 | 吉山 昌宏<br><br>(YOSHIYAMA Masahiro)<br><br>(10201071)        | 岡山大学・医歯薬学域・教授<br><br><br><br>(15301)      |    |
| 研究分担者 | 横山 章人<br><br>(YOKOYAMA Akihi to)<br><br>(90806069)         | 岡山大学・医歯薬学域・助教<br><br><br><br>(15301)      |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |