

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390391

研究課題名（和文） プラークエコシステムが齲蝕細菌遺伝子に及ぼす影響

研究課題名（英文）

Effect of dental-plaque eco-system to caries-related genes in cariogenic mutans streptococci

研究代表者

香西 克之 (KOZAI KATSUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：10178212

研究成果の概要（和文）：

小児口腔内より得たプラークおよび mutans streptococci (MS) 臨床株の性状を検討した結果、プラーク中の MS の比率が齲蝕重症度に関連し、高齲蝕群、低齲蝕群から得た MS の性状は、特に酸性環境下における齲蝕関連遺伝子の発現量に違いがあった。一方、ラット齲蝕実験モデルでの Aml 研究ではプラーク形成阻害の傾向が認められた。またオレアノール酸を多く含むブドウ粕エキスのパミス抽出物について MS に対するプラーク生成抑制効果を明らかにし（特許出願）臨床応用への基礎的成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

A result of examining the properties obtained from mutans streptococci (MS) and plaque in children showed that the ratio of MS in plaque related to caries severity nature of MS. Apparent difference was found in expression level of caries-related genes in the acidic environment in particular between high caries group and low-caries group. On the other hand, the tendency of plaque formation inhibition was observed in the Aml study of dental caries in the rat experimental model. The basic results of the (patent) clinical application was obtained revealed the plaque produce inhibitory effect on MS of Pamis extract from grape containing a large amount of oleanolic acid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2011 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：ミュータンスレンサ球菌，う蝕，プラークエコシステム，酸性環境，early childhood caries，酸産生菌

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでの研究で、齲蝕細菌である mutans streptococci (MS) の歯面付着能、酸産生能、耐酸性能について様々な角度で齲蝕

活性との関連を調べてきた。一方、プラークを構成する細菌は口腔内の環境（エコシステム）によって様々なストレスを受けている。すなわちこのプラークエコシステムにより

菌内外の齶蝕活性因子は、影響を強く受けている。これまで解明されてきた齶蝕細菌の機能はあくまで実験系の至適条件下で生じる事象であり、口腔内のプラークエコシステムを反映したものではなかった。

## 2. 研究の目的

今回の研究では、MSをはじめとした齶蝕細菌が有する遺伝子が口腔環境因子（pH 変化、スクロースなどの糖濃度や基質の変化）によって、どのように影響を受けるかを解明することを目的とする。特に以下の項目を検討した。

(1)人工プラークモデルを静地培養系（試験管内）もしくは動的培養系（フローセルシステムを使用）により作製する。(2)種々の条件下のプラークエコ状態での、齶蝕病原遺伝子や quorum sensing 関連遺伝子の発現を解析する。さらに、MS 臨床分離株を用いて各遺伝子の発現を測定し、齶蝕罹患性と遺伝子の発現状況との関連を明らかにする。(3)糖アルコール、フッ素、バクテリオシンおよび quorum sensing 機構の関連ペプチドの遺伝子発現(com 遺伝子, gtf 遺伝子)に対する効果を検討する。(4)プラーク中の MS 構成比率と各遺伝子の発現レベルの変化を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 小児のプラーク採取と MS 臨床分離株の単離

広島大学倫理委員会より研究承認済み。小児歯科外来の患者より口腔内の歯面を滅菌綿棒で拭い、綿棒を滅菌生理食塩水に浸漬し菌の懸濁液ならびに種々の濃度の希釈液を作製する。作製した希釈液をレンサ球菌用選択培地である Mitis-Salivarius 培地（改良 MS 培地）に播種し培養する。培養して得られたコロニーを観察し形態の異なるコロニーを複数分離し、再度 MS 培地にて培養を行う。これを 2-3 回繰り返してコロニーを単離する。16s rRNA をコードする遺伝子より個々の菌種に特異的なプライマーおよび他の領域での菌種特異的プライマーを個々の菌種において複数設計する。作製した複数のセットのプライマーを用いて分離した菌を鋳型に PCR を行い、菌種の同定を行う。基本的には患者一人につきそれぞれ 1 菌種ずつを分離し保存する。*S. mutans* および *S. sobrinus* は 2 菌種あわせて 50 株以上、その他の口腔レンサ球菌については 10 株以上を分離することを目標とする。

(2) フローセルシステムによるプラークモデルを構築

齶蝕原生の低いプラークと同様に、*S. mutans* あるいは *S. sobrinus* の比率を 1% 以

下、非齶蝕原生菌である *S. sanguinis*, *S. salivarius* を 99% に混合比率を調整したサンプルを作成し、Brain Heart Infusion (BHI) 培地を用いて培養する。そして、定常期まで増殖させたところで菌液を一部採取して菌体を回収し、菌種によって生存率が異なる条件に調整した緩衝液中でインキュベートする。変動させる条件は、酸 (pH)、温度、酸素濃度、添加する糖の種類、各種のイオンとする。そして、各条件の中で生き残った菌を新たな培養液中で増殖させる。以上のようなサイクルを数回繰り返した後、*S. mutans* の比率をリアルタイム PCR を用いて定量的に測定することにより、プラークの組成に最も影響を与える因子を明らかにする。また併せて、同様の条件で流体での実験系を組み、バイオフィルムを形成させて実験を行う。

(3) プラークエコシステムの変化における MS の病原因子活性の検出

齶蝕の病原因子であり、かつ実験系が確立している酸産生能、細菌の増殖能、不溶性グルカン合成、また活性の向上が予想される Aml の細胞壁溶解活性 (Yoshimura ら, 2004) について、培地もしくは緩衝液中に飲料成分を加え、タンパク機能の活性化を検討する。

① MS の耐酸性システムの検討および F-ATPase の定量

各株を酸性環境 (pH4.0), 37°C, リン酸緩衝液中で 1hr インキュベートした後、BHI 培地に播種し CFUcount により酸性下での生存率を測定する。

F-ATPase の定量は Jiangyun Sheng らの方法に準じる。すなわち、得られた菌体を加熱粉碎しルシフェラーゼ試薬を添加し発光量を測定する。

② insoluble glucan (不溶性グルカン) 合成能の検出と定量

glucose 添加 THB 培地を用いて 24hrs 培養後、硫酸アンモニウムで塩析し、タンパク電気泳動し 10% sucrose, Dextran T-10 を含む緩衝液中で活性バンドを検出し、不溶性グルカン合成能を比較する。分離菌株の培養上清を塩析、透析したものを粗 GTase とし、P buffer, 放射性スクロース とともに 37°C, 1 時間反応させる。生成した不溶性および水溶性グルカンの放射活性を調べることにによってその菌株の不溶性グルカン合成能を数値評価する。

③ Aml の合成能

Yoshimura (分担研究者) らの方法に準じ、臨床分離株の培養液より 10% SDS を用いて Aml タンパクを抽出し、現有している特異抗体を使った Cross-Dot 分析法により、以下の方法

で Aml タンパク産生量を比較する。すなわち分離した *S. mutans* および *S. sobrinus* の Aml の保有状況を調べるため、Aml 特異的プライマーを2セット作製し、PCRを行い遺伝子保有状況について検討を行う。また、臨床分離株を Brain Heart Infusion 培地で培養し集菌後、菌体を 8M Urea で抽出を行う。得られたサンプルを *S. mutans* 加熱死菌体を封入したポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、溶菌酵素活性の検出を行いタンパクレベルでの Aml の発現状況について検討する。

得られた *S. mutans* および *S. sobrinus* 分離株について CAT21(TM, モリタ社)を用いた齲蝕誘発能の強さについて検討を行う。また、あわせて種々の化学療法剤に対する感受性を測定する。

Aml に対する溶菌酵素活性は以下の方法で確かめる。分離菌を前培養した培養液を少量 96 ウェルプレートに添加した新しい培地に接種し吸光度 660nm で約 1.0 まで培養する。その後菌体を遠心し生理食塩水で洗浄後、50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に懸濁する。その懸濁液を一部 96 ウェルプレートにとり濁度が 0.5 になるように調整する。そこに、Aml を添加し 37°C で培養し経時的に濁度の変化を測定することによって活性の検討を行う。

#### (4) 齲蝕病原遺伝子の発現レベルの測定

各臨床分離株を目的環境条件に応じて作製した培地でプラークモデルを使用して培養する。検討項目は、F-ATPase, gtf, Aml の各齲蝕関連遺伝子に加え、環境センサーの役割を果たしている quorum sensing 関連遺伝子 (ComC および G protein) の発現を測定する。まず、得られた菌体からトリゾール試薬を用いて RNA を抽出する。RNA の量及び品質については、吸光度計にて (A260/280 ratio) を測定して確認する (吸光度測定器: 現有)。各種の遺伝子の発現にはリアルタイム RT-PCR を用いて、mRNA の発現レベルを測定する。実施に当たってはそれぞれに特異的なプライマーを用い、定量的リアルタイム PCR 装置・Chromo4™ を使用する。対照としては 16s リボソーム RNA の発現量を用いて比較する。(Chromo4™: 現有, 特異的プライマーが必要) また、抗体を有する Aml 蛋白等については Western Blotting 法を用いてタンパク発現量を比較する。

#### 4. 研究成果

1~6 歳の小児を対象とし, caries free (CF) 及び early childhood caries (ECC) を低齲蝕群, sever early childhood caries (SECC) を高齲蝕群とした。小児より採取したプラーク中の口腔レンサ球菌に占める *S. mutans* の

比率を Real-time PCR 法により算出した結果、同菌の比率が齲蝕重症度と正の相関関係にあることが示された。

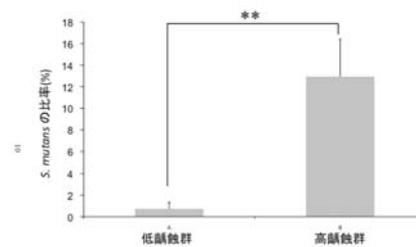
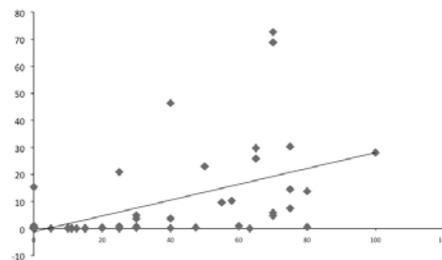


図1. 齲蝕重症度と *S. mutans* の比率

縦軸はプラーク内の口腔レンサ球菌に占める *S. mutans* の比率を示す (Welch's t-test, mean ± SD, \*\*p < 0.01, n=57)

続いて、酸性環境下において高齲蝕群から得た株では mRNA 発現量が有意に増加したのに対して低齲蝕群では有意に減少した。また glucose, sucrose などの糖を添加した酸性環境下では、高齲蝕群から得た株は中性で糖を添加した時と比較して mRNA 発現量は増加したが、低齲蝕群では増加しなかった。



さらに、酸産生能と齲蝕重症度との間に関連性は見いだせなかった。耐酸性能について、高齲蝕群から得た株の生存率は、低齲蝕群と比較して有意に高かった。また、臨床分離株を gtfB の mRNA 発現量を測定したときと同じ条件で培養後、耐酸性能に関与する F-ATPase の  $\beta$ -subunit である atpD の mRNA 発現量を Real-time RT-PCR 法で測定した。高齲蝕群から得た株では、酸性環境および glucose を添加した条件下で mRNA 発現量に増加傾向が認められた。低齲蝕群でも酸性環境下で mRNA 発現量に増加傾向が認められたが、発現量は少なく、glucose 添加条件下で高齲蝕群は有意に多く mRNA を発現していた。

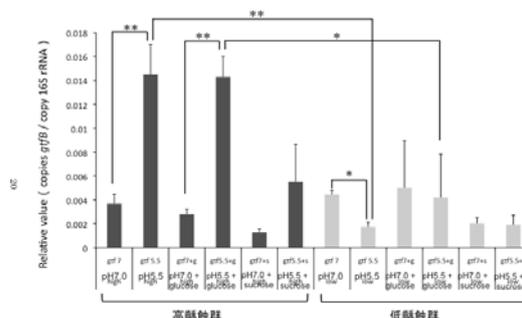
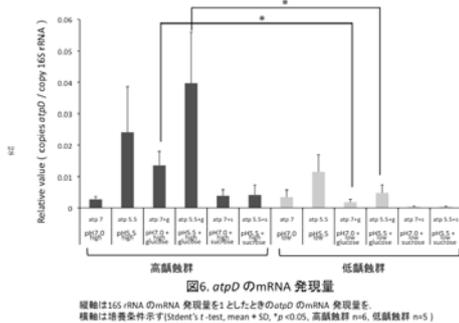


図3. gtfB の mRNA 発現量

縦軸は 16S rRNA の mRNA 発現量を 1 としたときの gtfB の mRNA 発現量を示す。横軸は培養条件を示す (Student's t-test, mean ± SD, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05, 高齲蝕群 n=6, 低齲蝕群 n=5)



本研究より、プラーク中の *S. mutans* の比率が齧蝕重症度に関与しており、高齧蝕群、低齧蝕群から得た *S. mutans* の性状は、特に酸性環境下における齧蝕関連遺伝子の mRNA 発現量に大きな違いが認められることが明らかとなった。

一方、ラット齧蝕実験モデルでの Aml 研究ではプラーク形成阻害の傾向が認められた。またオレアノール酸を多く含むブドウ粕エキスのパミス抽出物について MS に対するプラーク生成抑制効果を明らかにし（特許出願）臨床応用への基礎的成果が得られた

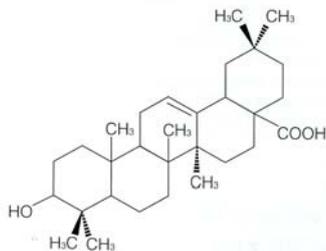


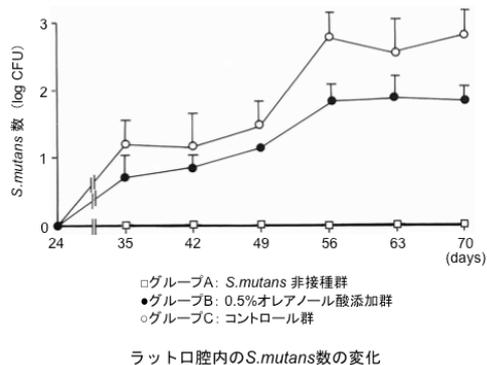
図2 オレアノール酸の構造式

### オレアノール酸のう蝕予防効果

*S. mutans* に対するニップンパミスエキスGRの最小発育阻止濃度

	<i>S. mutans</i>	
	C67-1	MT8148R
オレアノール酸	6.3	6.3
ニップンパミスエキスGR (オレアノール酸換算)	125.0 (3.7)	125.0 (3.7)

(μg/ml)



### 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)

①大原 紫, 吉村 剛, 小西俊成, 光畑智恵子, 香西克之: *Streptococcus mutans* に対するブドウ酒絞り粕抽出成分の抑制効果小児歯科学雑誌 査読有 49:251-258, 2011.

[学会発表] (計4件)

①大原 紫: 小児の齧蝕重症度と臨床分離 *Streptococcus mutans* の性状の検討, 第50回日本小児歯科学会大会, 2012.5.12-13 東京国際フォーラム.

②大原 紫: 口腔内環境因子が *Streptococcus mutans* の齧蝕関連遺伝子に及ぼす影響第6回学位請求論文学内発表会 2011.12.14, 広島大学歯学部大講義室.

③小西俊成: ワイン圧搾粕(パミス)抽出物のプラーク形成阻害効果およびう蝕原因菌に及ぼす影響日本食品科学工学会, 2011.9.9-11, 東北大学.

④大原紫, 吉村剛, 香西克之: 小児のデンタルプラークより検出される *S. mutans* の分布および性状の検討平成22年度日本小児歯科学会秋季大会2010年12月2日福島(郡山).

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: う蝕予防剤, 歯周病予防剤及び口腔用組成物

発明者: 香西克之, 吉村 剛, 小西俊成, 間和彦

権利者: 広島大学, 日本製粉(株)

種類: 特願

番号: 2011-144421

出願年月日: 2011.6.29

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

香西 克之 (KOZAI KATSUYUKI)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
教授  
研究者番号：10178212

### (2) 研究分担者

吉村 剛 (YOSHIMURA GO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：50403530  
(H22→H23)

林 文子 (HAYASHI FUMIKO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：50325180  
(H22のみ)

光畑智恵子 (MITSUHATA CHIEKO)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
助教  
研究者番号：10335664  
(H23→)

大原 紫 (OHARA YUKARI)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
助教  
研究者番号：80634469  
(H24→)