

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 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890210

研究課題名（和文）小児口腔における歯周病原性細菌の伝播と定着にプラーク構成多糖が及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）Effect of a dental plaque constituent polysaccharide on transmission and establishment of periodontopathic bacteria in oral cavity of children

研究代表者

布施 晴香 (FUSE HARUKA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60611663

研究成果の概要（和文）：

小児口腔内での歯周病原性細菌の伝播や定着に、多糖（フルクタン）分解酵素が関与することを解明するためグラム陰性菌のフルクタン分解酵素の性状解析を行った。続いて、小児および母親の口腔内からの歯周病原性細菌の検出を PCR 法を用いて行った。

研究成果の概要（英文）：

In order to reveal the influence of polysaccharide(fructan) degradation enzymes on transmission and establishment of periodontopathic bacteria in oral cavity of children, we firstly identified and analyzed the fructan degradation enzyme. Secondly, we investigate the distribution and correlation of periodontopathic bacteria in saliva specimens taken from children and their mothers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯周病原性細菌・小児

1. 研究開始当初の背景

小児の歯周疾患は主に不潔性の歯肉炎や萌出性の歯肉炎であり、骨破壊を伴う歯周炎は稀である。しかしながら、成人の歯周疾患をもたらす歯周病原性細菌は炎症のない口腔内のプラークから、また小児の口腔内のプラーク中からも検出され、小児期に感染していることが報告されている。

歯周病は、歯周病原性をもつ偏性嫌気性グラム陰性菌が口腔内に定着後、プラーク成熟

に伴い、歯周病原性細菌の構成比率が増加し、歯肉の炎症を引き起こすことから始まり、不可逆的な歯周組織の破壊へと進行する。歯周病原性細菌は口腔内で嫌気度が高い歯周ポケット内に生息し、歯肉縁下では歯肉溝滲出液中のタンパク質や剥離上皮をタンパク質分解酵素で分解して栄養源としている。そこで、炎症のない口腔内や小児の口腔内のプラーク中に生息する歯周病原性細菌は増殖のための栄養源をどのように確保しているのかという疑問をもつに至った。

申請者は齶蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* において栄養源として利用されるプラーク構成多糖に着目した。そして、これまでに歯周病原性細菌の一つである *Prevotella intermedia* は多糖（フルクタン）分解酵素をもち、フルクタンを栄養源として利用できることを明らかにしている。エネルギー源が乏しいプラーク中で、プラーク構成多糖を分解してエネルギー源として利用することは、細菌自体の生存に有利であることが考えられる。そこで、歯周病原性細菌の口腔内への初期定着に、プラーク中の多糖を栄養源として利用するための多糖分解酵素が関与するのではないかと仮説を立て、妊娠期・出産後の母親とその子供を対象として、歯周病原性細菌の検出を行い、早期に定着した歯周病原性細菌とその多糖分解能との関連性を解明することにした。

2. 研究の目的

妊娠期・出産後の母親とその子供を対象として、歯周病原性細菌の口腔内への定着時期および初期定着における多糖分解酵素の関与を解明することを最終目標とした。本研究期間では以下を明らかにすることを目的とした。

- (1) 思春期に菌の検出比率が増加する *Prevotella loescheii* のフルクタン分解酵素の解析
- (2) 出産後の母親とその子供を対象とした歯周病原性細菌の定着時期の特定

3. 研究の方法

(1) *Prevotella loescheii* のフルクタン分解酵素の解析

既知の *Bacteroides fragilis* (MB3774), *Prevotella intermedia* (AB520933) のフルクタン分解酵素遺伝子 (*fruA*) のアライメントを行い、相同性の高い領域にプライマーを設計した。*P. loescheii* ATCC15930 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行い、増幅した断片のシーケンスを行った。続いてインバース PCR を行い、*P. loescheii* の *fruA* ホモログを含めた前後の塩基配列 (4475 bp) を決定した。*fruA* ホモログを PCR 増幅し、pET44c ベクターにクローニングした後、大腸菌内で発現させた組換えタンパク質を精製した。フルクタン分解活性は、基質から遊離した還元糖（フルクトース）量を Somogyi-Nelson 法で定量した。基質にはレバン (β -2, 6 フルクタン)、イヌリン (β -2, 1 フルクタン) および β -2 結合を有する 2 糖、3 糖を使用した。酵素の作用様式は反応分解産物を薄層クロマトグラフィーで解析した。

- (2) 出産後の母親とその子供を対象とした歯

周病原性細菌の定着時期の特定

当科関連施設を受診した出産後の母親とその子供を対象としサンプルとして口腔内から唾液を採取した。対象者は本研究を行うにあたりインフォームドコンセントを得た小児 12 名 (1 か月-1 歳) とその母親 12 名とした。なお本研究は昭和大学歯学部医の倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 2011-040 号)。サンプル採取時期は、小児では①新生児期 (0 か月) ②離乳食開始前期 (3-4 か月) ③乳切歯萌出期 (6-8 か月) ④1 歳児期とした。継続してサンプル採取が行えない場合は、①~④に期間で 2 つの期間を継続して採取することを条件とした。小児でのサンプル採取方法はフロスをつけたロールワッテを口腔内に一定時間留置し唾液を浸透させたあと Oragene® DNA OG-500 (DNA Genotek Inc) キットの保存液に浸漬した。母親からのサンプル採取方法は Oragene® DNA キットに直接採取した。唾液サンプルからの DNA の抽出および精製は Oragene® DNA 付属の DNA 精製キットを用いて行った。PCR 反応による細菌の検出については、Amano (J Periodontal, 71:249-255, 2000 年) の報告に従って歯周病原性細菌の 16SrRNA 塩基配列に基づき菌種特異的な PCR プライマーを作製した。PCR の反応温度はおよびサイクル数は 95°C 15 分、さらに 95°C で 30 秒間の熱変性、60°C で 1 分間のアニーリング反応、68°C で 30 秒間の伸長反応を 1 サイクルとして 30 サイクル行い、最後に 68°C で 30 秒間の伸長反応をさせた。PCR 反応には Pfu-X Polymerase (Jena Bioscience) キットを使用した。得られた PCR 増幅断片は 2% アガロースゲルで電気泳動後臭化エチジウム染色し紫外線下で観察した。

標準菌株として *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC33238、*Tannerella forsythia* ATCC43037、*Treponema denticola* ATCC35405、*Prevotella intermedia* ATCC25611 を使用し、陽性のコントロールとした。

4. 研究成果

(1) 思春期に菌の検出比率が増加する *Prevotella loescheii* のフルクタン分解酵素の解析

P. loescheii ATCC15930 株の *fruA* ホモログは 1800bp で、599 アミノ酸残基からなる分子量 67 kDa のタンパク質をコードしていた (Accession No. AB520934)。

また、N 末端より 24 アミノ酸はシグナルペプチドと推測された。*P. loescheii* の *fruA*

ホモログは、*P. intermedia* のFruA と同様にN末端側に5-bladed β propeller 構造をとるglycosyl hydrolase family 32 (GHF32)のドメイン (25-452) とC末端側の β sandwich module構造をとる領域 (453-599) から構成されており、それぞれの領域のホモロジーを比較したところ、GHF32ドメインで46%、 β sandwich moduleで30%であった。*P. intermedia* のFruAのGHF32ドメイン中の必須の触媒アミノ酸残基 D115, D237, E288に対応する、*P. loescheii* のアミノ酸は、D158, D276, E327であった。

P. loescheii のfruAホモログの組換えタンパク質を精製し、SDS-PAGEの結果、約67kの組換えタンパク質が得られた (図1)。

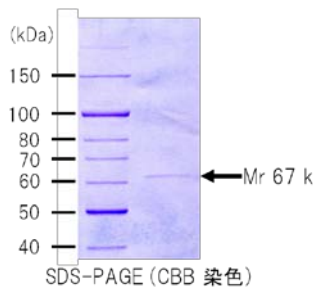


図1 *P. loescheii* 組換えFruAの精製

次にこの組換えタンパク質の分解活性を調べた。その結果、フルクトースの β -2結合を有するフルクタン (レバン、イヌリン) および3糖 (ケストース、ラフィノース)、2糖 (スクロース)を分解し、作用様式はexo型であった (図2) ことから、*P. loescheii* のfruAホモログは、exo- β -D-fructosidase であることが明らかとなった。また、本酵素のフルクタン分解における至適pHは5.5-6.0付近であり、フルクタンを基質にした際、イヌリンに対する基質特異性が高かった (図3)。*P. loescheii* の培養上清中に分泌されるフルクタン分解酵素は、レバンに対する基質特異性が高い (図4) ことから、*P. loescheii* は、今回解析した FruA のほかにもフルクタンを分解する酵素をもつことが示唆された。

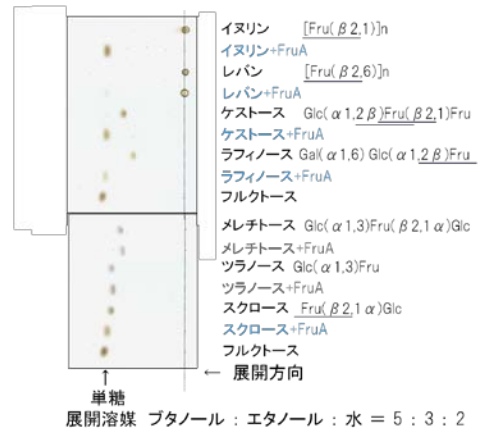


図2 *P. loescheii* 組換えFruAの基質分解様式

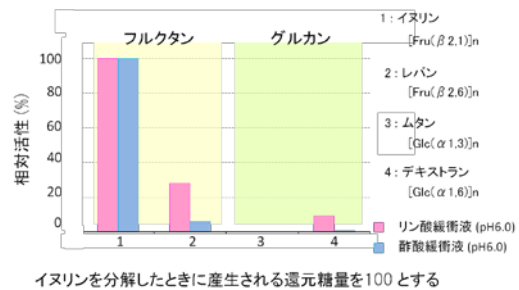


図3 *P. loescheii* 組換えFruAの基質特異性

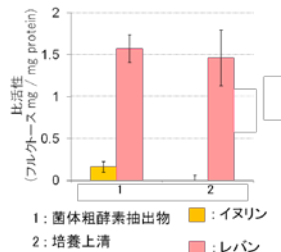


図4 *P. loescheii* のフルクタン (イヌリン、レバン) 分解能

(2) 出産後の母親とその子供を対象とした歯周病原性細菌の検出時期の特定

侵襲性歯周炎の関連細菌であることが明らかになっている *A. actinomycetemcomitans* は、小児の唾液からは12名中10名で検出された。このうち最少年齢は3か月の無歯顎の乳児であった。また、母子ともに検出されたのは12組中10組であった。小児での菌検出は無歯顎での場合と下顎乳前歯部が萌出している場合と様々であり口腔内の歯牙萌出状態や年齢での統一性が見られなかった。また母親のみの検出は12名中2名であった。*T. forsythia* は小児の唾液からは12名中1名検出されその年齢は5か月であった。母子ともに検出されたのは12組中1組であった。

また、母親のみの検出は 2 名であった。*T. denticola* は小児の唾液からは検出されなかった。また、母親のみの検出もみられなかった。*P. gingivalis* は小児の唾液からは 12 名中 3 名で検出された。このうち最少年齢は 4 か月の無歯顎の乳児であった。また、母子ともに検出されたのは 12 組中 3 組であった。また、母親のみの検出は 5 名であった。この菌が検出された小児に中では、無歯顎の時期から継続的に確認できる者や下顎乳前歯部が萌出した後から継続的に検出される者と様々であった。今回調べた母子においては *A. actinomycetemcomitans* の検出率が高く母子間の伝播の可能性が示唆された。しかしながら、本研究は対象者が少ないため今後は対象者を増やすこと、また乳臼歯萌出以降も継続して唾液サンプルを採取し菌の検出結果から母子間の歯周病原性細菌の伝播時期を特定することを課題としている。

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) Haruka Fuse, Haruka Fukamachi, Mitsuko Inoue, Takeshi Igarashi
Identification and functional analysis of the gene cluster for fructan utilization in *Prevotella intermedia*
Gene, 査読有, 515, 291-297, 2013
DOI:10.1016/j.gene.2012.12.023. Epub 2012 Dec 22.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山下一恵、浅川剛吉、船津敬弘、布施晴香、佐藤昌史、井上美津子、横塚あゆ子、草間里織、鈴木恵美、日山邦枝
Marshall 症候群患者の一例—混合歯列期の特徴—、第 29 回日本障害者歯科学会学術大会、2012 年 9 月 28 日、札幌コンベンションセンター
- ② 布施晴香、深町はるか、五十嵐武、井上美津子
Prevotella intermedia のフルクタン代謝関連遺伝子群の解析、第 49 回日本小児歯科学会大会、2011 年 11 月 28 日、いわて県民情報交流センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布施 晴香 (FUSE HARUKA)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：60611663