

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861783

研究課題名(和文)根面齲蝕原因菌Actinomycesへのフッ化物作用機序の解明とその応用法の確立

研究課題名(英文)Breakthrough of fluoride-functional mechanism and establishment of its utilization for 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔StreptococcusおよびActinomycesは主要な口腔細菌であり、両菌種とも糖を代謝して酸を産生し、齲蝕誘発因子の一つである酸産生活性を持つ。Streptococcusは糖代謝系として解糖系を主体として酸を産生する一方、Actinomycesは解糖系に加えクエン酸回路を利用して酸を産生する。本研究では、窒素源の糖代謝(酸産生)に対する影響を検討した。両菌種とも窒素源の添加によって酸産生量が増加した。本研究の結果から、窒素源はこれらの菌種の酸産生を促進するとともに、増殖を促進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Both Streptococcus and Actinomyces can produce acids from dietary sugars and are frequently found in caries lesions. In addition to glycolysis (EMP pathway), Actinomyces species have a pathway that utilizes part of the tricarboxylic acid cycle to combine PEP (a metabolic intermediate of the EMP pathway) with bicarbonate to produce succinate. This study aimed to elucidate the effects of nitrogenous compounds on acid production. Tryptone enhanced glucose-derived acid production. Addition of glutamate increased glucose-derived acid production. These results suggest that nitrogenous compounds in the oral cavity promote acid production by Streptococcus and Actinomyces in vivo.

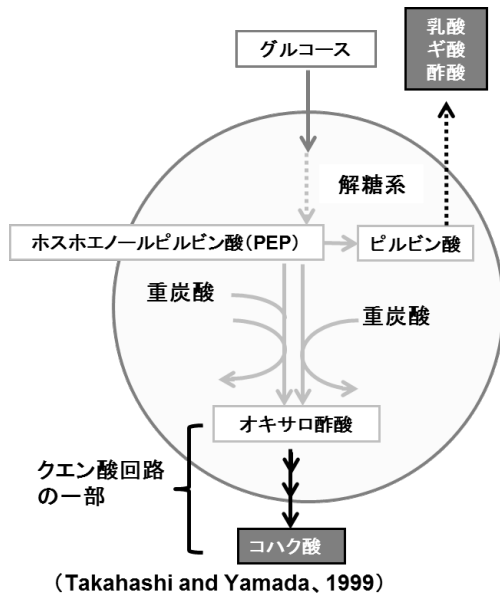
研究分野：口腔生化学

キーワード：Actinomyces Streptococcus 根面齲蝕 糖代謝 重炭酸 歯学

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。現在の日本で超高齢社会であり、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、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ものである。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、解糖系 (EMP pathway) 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ことが知られている。重炭酸は、*Actinomyces* の増殖と酸産生を促進させるため、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ている。その効果のひとつに、口腔内細菌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、フッ化物による糖代謝抑制による酸産生抑制が報告されているが、同じ実験条件下で口腔 *Streptococcus* と *Actinomyces* の糖代謝とそれに伴う酸産生のフッ化物感受性を比較した報告はなかった。根面齲蝕予防へのフッ化物応用法を検討する上で、*Actinomyces* のフッ化物耐性も考慮し、フッ化物利用法を開発すべきと考えられるが、同菌に対する酸産生抑制メカニズムは不明であり、同メカニズムの解明が必須である

2. 研究の目的

本研究では、口腔 *Actinomyces* の酸産生の様相とフッ化物による抑制効果に着目し、口腔 *Actinomyces* の酸産生メカニズムおよびフッ

化物による酸産生抑制メカニズムを解明する。さらに、代謝経路の解明が進んでいる *Streptococcus* との比較を行い、効果的なフッ化物応用法を検討し、提案する。

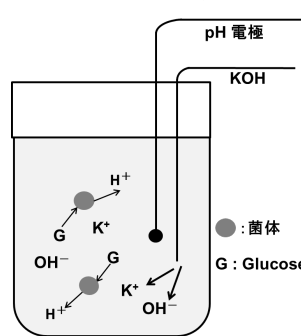
3. 研究の方法

齲蝕の発症する環境、すなわちプラークと歯面との界面は嫌気環境であり、*Actinomyces* は通性嫌気性菌でもあることから、高度嫌気条件を維持できる嫌気グローブボックス (N2 90% ; H2 10%, NH-Type, Hirasawa Works, Tokyo, Japan) を使用し、同装置内にて口腔 *Actinomyces* および *Streptococcus* の酸産生活性に対するフッ化物の影響を検討した。

1) pH スタット装置による口腔 *Actinomyces* の酸産生メカニズムの解明

口腔 *Actinomyces* と *Streptococcus* の酸産生量およびフッ化物による酸産生抑制効果を、嫌気グローブボックス内の高度嫌気条件下、同一条件で比較・検討する。多様な口腔内を反映するため、様々な培養条件で両細菌を培養し、酸産生活性とそのフッ化物耐性を比較・検討した。

使用菌株は、*Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces oris*, *Streptococcus mutans* および *Streptococcus sanguinis* 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。



さらに、クエン酸回路をもつなど口腔 *Streptococcus* に比べて代謝系が複雑な *Actinomyces* は、酸産生基質として糖だけではなくアミノ酸などの他の化合物を

利用している可能性が高い。そこで、アミノ酸を含む窒素源が *Actinomyces* の糖代謝・酸産生に及ぼす影響も検討した。

2) カルボン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の分析を行った。口腔 *Actinomyces* の最終糖代謝産物は「乳酸・ギ酸・酢酸」に加え、重炭酸に由来する「コハク酸」であることが知られている。同菌種の最終糖代謝産物の分析・定量には、カルボン酸分析計 (Eyela S-3000, Tokyo Rika Co. Ltd., Tokyo, Japan) および高速液体クロマトグラフ

イー (Shimadzu Prominence LC-20AD, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) を使用した。

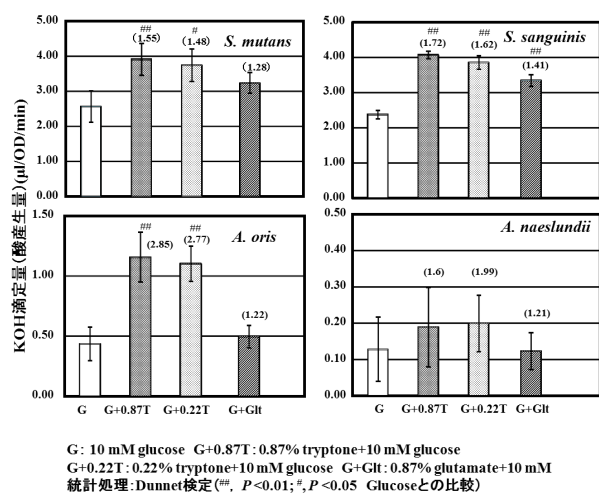
4. 研究成果

1) pH スタット装置による口腔 *Actinomyces* の酸産生メカニズムの解明

glucose のみを添加したときの酸産生量を比較すると、*Streptococcus* の方が *Actinomyces* よりも約 5 ~ 20 倍高いことが示された。

glucose のみを添加したときと glucose とともに tryptone を添加したときの酸産生量を比較すると、全ての細菌において酸産生量が 1.48 ~ 2.85 倍に増加した。また、glutamate を添加したときの酸産生量を比較すると、全ての細菌において酸産生量が 1.21 ~ 1.41 倍に増加した。

glutamate の添加でも酸産生量が増加したことから、glutamate から -ketoglutarate を経たクエン酸回路への流入が酸産生の促進に関与していることが示唆された。glutamate の添加による酸産生促進効果は限定的であったことから、glutamate 以外のアミノ酸、もしくは 2 種類以上のアミノ酸の共存、さらにはジペプチドやトリペプチド等のペプチドの必要性についても検討する必要があるものと考えられる。



2) カルボン酸分析計による最終糖代謝産物の評価

乳酸、ギ酸、酢酸は全ての菌種でみられ、コハク酸は *Actinomyces* 属にのみみられた。全菌種とも、どの代謝基質をいれても乳酸が一番高かった。さらに代謝基質として Tryptone を添加したとき、*S. mutans*、*S. sanguinis*、*A. oris* において各酸の値は高くなり、*S. sanguinis*、*A. oris* においては統計学的に優位に乳酸が高くなった。また、*S. mutans*、*S. sanguinis*、*A. oris* においてギ酸、酢酸が統計学的に優位に高くなり、*A. oris* においてはコハク酸も統計学的に優位に高くなった。

glutamate を添加したときは、*S. mutans*、*S. sanguinis*、*A. oris* において各酸の値は高くなり、*S. sanguinis* においてギ酸が統計学的に優

位に高い値を示した。

Streptococcus、*Actinomyces*、両菌種とも、解糖系を経て乳酸、ギ酸、酢酸などの酸を産生することが知られている。また、*Actinomyces* は解糖系からの経路の他、重炭酸存在下においては、ホスホエノールピルビン酸に重炭酸が結合し、クエン酸回路の一部を利用してコハク酸を産生する。コハク酸が *Actinomyces* 属にのみみられたのはこのためと考えられる。

代謝基質である trypton を添加したとき、*S. mutans*、*S. sanguinis*、*A. oris* において酸の値が高くなり、また glutamate を添加したときはわずかではあるが、同様の効果が見られた。これらのことから、クエン酸回路を逆行する過程で生ずる各種代謝中間体がクエン酸回路、もしくは直接解糖系に作用し、糖代謝促進作用を持つ可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Norimatsu Y, Kawashima J, Takano-Yamamoto T, Takahashi N: Nitrogenous compounds stimulate glucose-derived acid production by oral *Streptococcus* and *Actinomyces*. *Microbiol Immunol* 2015; 59(9); 501-506
DOI: 10.1111/1348-0421.12283. (査読有)

Kawashima J, Nakajo K, Washio J, Mayanagi G, Shimauchi H and Takahashi N: Fluoride-sensitivity of growth and acid production of oral *Actinomyces*: comparison with oral *Streptococcus*. *Microbiol Immunol* 2013; 57(12); 797-804
DOI: 10.1111/1348-0421.12098. (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

Manome A, Abiko Y, Kawashima J, Fukumoto S, Takahashi N: Lactose and glucose metabolism of oral *Bifidobacterium* and its fluoride-inhibition., The 95h IADR General Session & Exhibition, 23-25 March, 2017, San Francisco, USA

馬目歩実、安彦友希、川嶋順子、福本敏、高橋信博: 口腔 *Bifidobacterium* 属のグルコースおよびラクトース代謝とフッ化物による抑制効果, 第6回 口腔保健用機能性食品研究会・総会, 2017年1月29日, 鶴見大会館(横浜)

安彦友希、菅原敦信、村上和弘、川嶋順子、高橋信博: 糖代謝の生化学的性質からみる *Bifidobacterium* の齲蝕関連性, 第58回 歯科基礎医学会学術大会, 2016年8月24-26日, 札幌コンベンションセンター(札幌)

馬目歩実、安彦友希、川嶋順子、福本

敏, 高橋 信博: 齲蝕関連
Bifidobacterium の酸産生活性とそのフッ化物
による抑制効果, 第 58 回歯科基礎医学会学
術大会, 2016 年 8 月 24-26 日, 札幌コンベンシ
ョンセンター (札幌)

Manome A, Abiko Y, Kawashima J, Fukumoto
S, Takahashi N: Inhibitory effects of fluoride on
the carbohydrate metabolism of oral
Bifidobacterium. Innovative Research for
Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium:
The 6th International Symposium for Interface
Oral Health Science, 18-19 January, 2016,
Gonryo hall (sendai)

Kawashima J, Norimatsu Y,
Takano-Yamamoto T, Shimauchi H, Tsuboi A and
Takahashi N: Nitrogenous compounds stimulate
the growth and acid-production of oral
Actinomyces, The 62th Annual Meeting of
Japanese Association for Dental Research, 4-5
December, 2014, KKR Hotel (Osaka)

Norimatsu Y, Kawashima J, Takano-Yamamoto
T, Takahashi N: Stimulatory effects of
nitrogenous compounds on the acid production of
oral *Streptococcus* and *Actinomyces*, The 5th
International Symposium for Interface Oral
Health Science, 20-21 January, 2014, Katahira
Sakura Hall at Tohoku University (Sendai)

則松佑佳、川嶋順子、山本照子、高橋 信
博: 口腔 *Actinomyces* の酸産生能および増殖
能に対する窒素源の効果, 第 55 回歯科基礎
医学会学術大会・総会, 2013 年 9 月 20 日
22 日, 岡山コンベンションホール (岡山)

6. 研究組織

(1) 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