

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20696

研究課題名(和文)新規根面う蝕細菌種を標的とした高齢者QOL向上法の開発

研究課題名(英文)Development of a method to improve QOL of elderly people by targeting new root caries bacterial species

研究代表者

小幡 純子(Oyata, Junko)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：70759448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規象牙質う蝕細菌種であるPropionibacterium acidifaciens(以下P. acidifaciens)のう蝕誘発機序について検討した。P. acidifaciensの特性として、唾液による菌体凝集はほぼ生じないこと、ハイドロキシアパタイトへ付着すること、コラーゲンへ強く結合すること、過酸化水素産生菌への抵抗性は弱いこと、酸環境下ではバイオフィーム形成に影響を及ぼされることが明らかになった。これらのP. acidifaciensの特性は、本菌が象牙質う蝕病巣という特殊な環境下に存在することの根拠となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Propionibacterium acidifaciens (P. acidifaciens) has newly been isolated from carious dentin lesions, but the cariogenicity of the organism remains unclear. The purpose of this study was to investigate the characteristics of the organism and their relationship to initiation of dentinal caries. P. acidifaciens was not aggregated with saliva. It had ability to adhere to hydroxyapatite beads. It had high ability to bind to collagen. It showed low resistance to hydrogen peroxide-producing bacteria. Biofilm formation was affected in acid environment. The results suggest the reasons for existence of the organism under the specific environment of carious dentin lesions.

研究分野：予防歯科学

キーワード：P. acidifaciens 根面う蝕 象牙質う蝕 高齢者

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が進む中、高齢者の健康と QOL の向上は、現代社会の重要な課題である。高齢者が健康であるためには咀嚼・会話等の口腔機能の維持が不可欠である。これまで、歯科における二大疾患として、う蝕は若年者、歯周病は成人の問題として捉えられてきた。しかし、口腔衛生状態の改善により高齢者の残存歯数が増加し、歯肉退縮や歯根露出に伴う根面う蝕の増加が新たな問題として注目されるようになった。健康日本 21 の「歯の健康」においても、高齢者の根面う蝕への対策を講じていく必要があると明記されている。しかし、未だに具体的な対策はなく、訪問歯科診療をはじめとした高齢者歯科の現場から早急な対応方法を求める声もある。これまでの報告によると、60 歳以上の 53% は根面う蝕罹患経験があると言われており (Imazato *et al.*, 2005)、今後さらにこのニーズは高まることが予想される。根面う蝕に特異的な病原菌やその病原性については十分に解明されていないことは明白で、根面う蝕のメカニズムの解明が急がれている。

2. 研究の目的

研究代表者らは次世代シーケンス技術を応用して成人の象牙質う蝕から新たに *Propionibacterium acidifaciens* (以下 *P. acidifaciens*) を同定した。本研究は、高齢者の根面う蝕予防という観点から、*P. acidifaciens* のう蝕誘発機序を明らかにすることが目的である。

まず、*P. acidifaciens* の生化学的特徴を調べた後、歯根面への定着機序を明らかにした。また、他の口腔細菌への抵抗性を調べ、同菌が口腔内に留まる機序を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) *P. acidifaciens* の入手、生化学的特徴の解明

- ①微生物材料開発室(JCM、理化学研究所)より、*P. acidifaciens* を入手した。
- ② *P. acidifaciens* の増殖特性を調べた。
- ③ *P. acidifaciens* の酸産生能および耐酸性を調べた。

(2) *P. acidifaciens* の歯質構成ハイドロキシアパタイトへの付着能の検討

- ①あらかじめ同意を得た健常成人から安静時唾液を採取し、遠心して上清を得た。
- ②ハイドロキシアパタイトを唾液上清と反応させ、表面を唾液タンパク質で被覆した。
- ③ *P. acidifaciens* を蛍光 (BCECF) で標識した。
- ④標識した *P. acidifaciens* と唾液被覆ハイドロキシアパタイトを反応させた。
- ⑤反応後、ハイドロキシアパタイトをアルカリ処理して溶菌し、BCECF を遊離させた。
- ⑥遊離した BCECF の発する蛍光強度を測定し、あらかじめ作成した標準曲線より、ハイドロキシアパタイトに付着した菌数を定量した。

(3) *P. acidifaciens* の歯質構成コラーゲンへの結合能の検討 (ELISA 法)

- ① *P. acidifaciens* をビオチンで標識した。
- ②各種コラーゲンで 96 ウェルマイクロプレートに被覆した。
- ③ブロッキングの後、ビオチン標識 *P. acidifaciens* を加え、反応させた。
- ④洗浄後、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビシンと反応させた。
- ⑤発色基質を加え、あらかじめ作成した標準曲線より、各コラーゲンに結合した菌数を定量した。

(4) *P. acidifaciens* の過酸化水素産生菌への抵抗性の検討 (Competition assay)

- ① *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* 等の口腔内に存在する過酸化水素産生菌を培養した。
- ②各種過酸化水素産生菌の培養液 10 μ l を BHI 寒天培地に接種し、16 時間培養した。
- ③ *P. acidifaciens* の培養液 10 μ l を過酸化水素産生菌の近傍に接種した。
- ④16 時間後、各菌の増殖状況を確認し、*P. acidifaciens* の他菌に対する抵抗性を評価した。

(5) *P. acidifaciens* のバイオフィルム形成能の検討

- ① *P. acidifaciens* が産生するプロピオン酸と酪酸の濃度により、バイオフィルム形成能が変化するかを調べた。
- ② *P. acidifaciens* のバイオフィルム形成に及ぼす *S. mutans* の影響について、トランスウ

エルシステムを用いた dual-species assay を行い、またI型コラーゲンで被覆したマイクロプレート上での *P. acidifaciens* のバイオフィーム形成を評価した。

(6)*P. acidifaciens* のマトリックスタンパクへの結合能の検討 (ELISA 法)

- ①ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンで96ウェルマイクロプレートを被覆した。
- ②③④と同様にビオチンで標識した *P. acidifaciens* を用いて、各成分への結合を調べた。

4. 研究成果

(1) 菌体凝集の検討

唾液による菌体凝集について、 A_{550} の低下は *S. mutans* の 0.55 に対して、*P. acidifaciens* は 0.12 であり、*P. acidifaciens* は唾液成分による凝集をほとんど生じないことが認められた。さらに、*Fusobacterium nucleatum* は数種類のレンサ球菌と共凝集をしたが、*P. acidifaciens* と他の口腔内常在菌 (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii*) との間に共凝集は認められなかった。

(2)*P. acidifaciens* のヒドロキシアパタイトへの付着能の検討

ヒドロキシアパタイトへの付着菌量は、*S. mutans* が 8.2×10^6 cells、*P. acidifaciens* が 3.4×10^6 cells であり、*P. acidifaciens* はヒドロキシアパタイトに付着することが認められた。

(3)*P. acidifaciens* のコラーゲンへの結合能の検討

コラーゲンへの結合菌量は、*S. mutans* の 7.9×10^4 cells に対して、*P. acidifaciens* は 5.0×10^5 cells であり、*P. acidifaciens* はコラーゲンに強く結合することが認められた。

(4)*P. acidifaciens* の過酸化水素産生菌への抵抗性の検討

過酸化水素 0.5%以上の濃度で *P. acidifaciens* の生育を阻害された。competition assay で、*P. acidifaciens* は

Streptococcus mutans、*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus oralis*、*Streptococcus gordonii* の4菌種にその生育を阻害された。*S. sanguinis*、*S. oralis*、*S. gordonii* の過酸化水素産生能が *P. acidifaciens* の生育阻害を起こしたことが推測された。(図1)しかし、過酸化水素非産生菌である *S. mutans* に関しては、過酸化水素以外の抑制因子が考えられた。

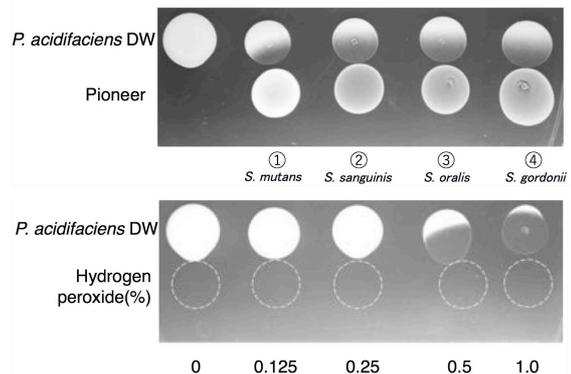


図 1

(5) バイオフィーム形成能の検討

① *P. acidifaciens* が産生する主な酸 (プロピオン酸と酢酸) の濃度に応じたバイオフィーム形成に及ぼす影響は、25mM 以上のプロピオン酸、50mM 以上の酢酸でその生育が抑制された。

② *P. acidifaciens* は *S. mutans* 2 菌株によりその生育が抑制された。一方、*P. acidifaciens* は I 型コラーゲン被覆マイクロプレート上では、非被覆マイクロプレート上と比較して約 4.5 倍のバイオフィームを形成することも認められた。(図 2)

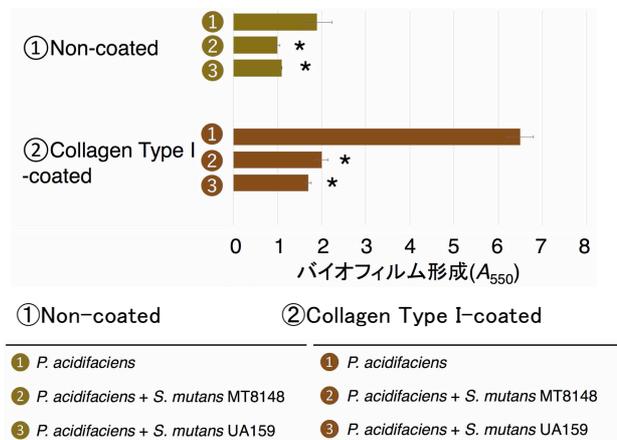


図 2

以上の結果より、*P. acidifaciens* は、他の口腔常在菌によりその生育が阻害され、それらの菌との共存は困難であることが明らかになった。また、I型コラーゲンの存在下では厚いバイオフィルムを形成したことから、象牙質内の有機質であるI型コラーゲンが*P. acidifaciens*の定着に関わることが推測された。さらに*P. acidifaciens*自らが産生する酸では、ある程度の濃度を超えるとその生育が阻害されることから、生育に適した濃度の酸を産生していることが推測された。これらの*P. acidifaciens*の特性は、同菌が象牙質う蝕病巣という特殊な環境下に存在することの根拠となる可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計4件)

①小幡純子、於保孝彦、象牙質う蝕関連細菌*Propionibacterium acidifaciens*のう蝕原性の解明、第67回日本口腔衛生学会総会、2018年

②小幡純子、於保孝彦、新規象牙質う蝕細菌*Propionibacterium acidifaciens*のう蝕原性の解明、第147回日本歯科保存学会2017年度秋季学術大会、2017年

③Junko Obata, Takahiko Oho, Cariogenicity of *Propionibacterium acidifaciens* isolated from carious dentin lesions, 94th General Session & Exhibition of the IADR, 2016

④小幡純子、於保孝彦、新たな象牙質う蝕関連細菌*Propionibacterium acidifaciens*のう蝕原性の解明、第65回日本口腔衛生学会総会、2016年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小幡 純子 (OBATA, Junko)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：70759448