研 究 者：川野　亜希（所属：神戸常盤大学　保健科学部　口腔保健学科）

研究題目：う蝕および歯周病の原因菌に対するD-アミノ酸の作用機序の解明

目　的：

生体を構成するアミノ酸は、ほとんどがL体で構成されている。近年、L体の光学異性体であるD体（D-アミノ酸）が、生体において重要な生理機能を持つことが明らかになってきた。例えば、D-セリンは脳の記憶や学習機能に関与し、D-アスパラギン酸はテストステロン合成を促進することが報告されている。また、乳酸菌由来のD-トリプトファンは免疫細胞においてアレルギー関連サイトカインの分泌を抑制することが知られている。本研究は、歯科口腔領域の感染症に対する新たな予防法の確立を研究意義として掲げ、歯科の２大疾患であるう蝕と歯周病の原因菌に対して、D-アミノ酸が持つ生理的作用機序を解明することを目的とした。

対象および方法：

１．供試菌種およびD-アミノ酸

う蝕病原細菌として *Streptococcus mutans*（*S.mutans*）、歯周病原細菌として *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（*A.actinomycetemcomitans*）を研究に使用した。 D-アミノ酸として、D-セリン（S0033、TCI）、D-アラニン（A0177、TCI）、D-アスパラギン酸（A0545、TCI）を使用した。

２．最小発育阻止濃度の測定

単純培養した *S.mutans* および *A.actinomycetemcomitans* を、OD_{600}=0.5に調整し、96 well プレートに300 μL/well播種した。5% CO_2、37℃条件下で24時間培養した後、DWで３回洗浄した。洗浄後は、37℃条件下で20分間風乾した。各D-アミノ酸は、100 mMに調整した後、風乾した96 well プレートに1/2希釈倍率で希釈を繰り返しながら200 μL/well分注した。37℃で30分間静置した後、DWで１回洗浄を行い、新規培地を200 μL/well分注して、5% CO_2、37℃条件下で16時間培養した。培養後、分光光度計を用いて波長630 nmの吸光度を測定した。

３．最小殺菌濃度の測定

方法２で測定された最小発育阻止濃度の培養液を、寒天培地に10 μL/spot滴下して、5% CO_2、37℃条件下で24時間培養した。培養後、コロニーの発育状況を目視で確認し、最小殺菌濃度を測定した。

４．バイオフィルム形成能の測定

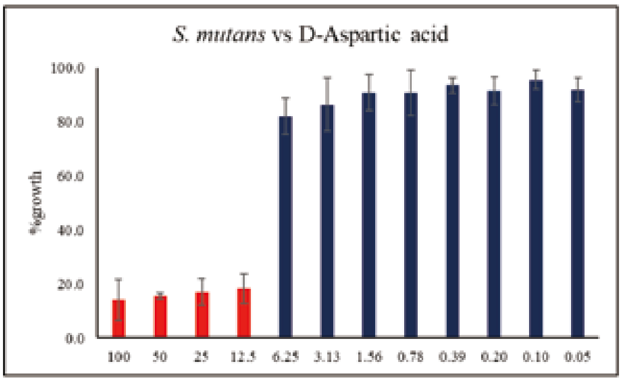
クリスタルバイオレット染色法を用いて、*S.mutans* および *A.actinomycetemcomitans* のバイオフィルム形成能およびD-アミノ酸のバイオフィルム形成阻害効果を測定した（Biofilm Formation

Assay Kit, DOJINDO）。*S.mutans* および *A.actinomycetemcomitans* を OD_{600}=0.5 に調整した後、96 well プレートに 180 µL/well 播種した。500 mM の D-アミノ酸溶液を調整し、1/2 希釈を繰り返しながら、細菌懸濁液に 180 µL/well 処理した。その後は、キットのプロトコルに従って実施した。クリスタルバイオレットの色素は、分光光度計を用いて波長 590 nm の吸光度を測定した。

結果および考察：

１．D- アミノ酸処理における最小発育阻止濃度および最小殺菌濃度

〈*S.mutans* に対する結果〉



D-Aspartic acid Conc. (mM)	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05
%growth	8.2	15.3	14.7	15.3	76.8	75.7	86.9	81.2	90.1	90.1	91.5	91.0
	22.7	16.9	22.7	24.6	89.5	95.2	98.7	96.2	95.0	97.1	97.1	96.6
	11.2	14.7	14.0	15.2	79.9	88.5	87.3	95.0	95.5	87.0	98.1	88.2
average	14.0	15.6	17.2	18.4	82.1	86.4	91.0	90.8	93.5	91.4	95.6	91.9

図１　D-アスパラギン酸処理条件下の最小発育濃度

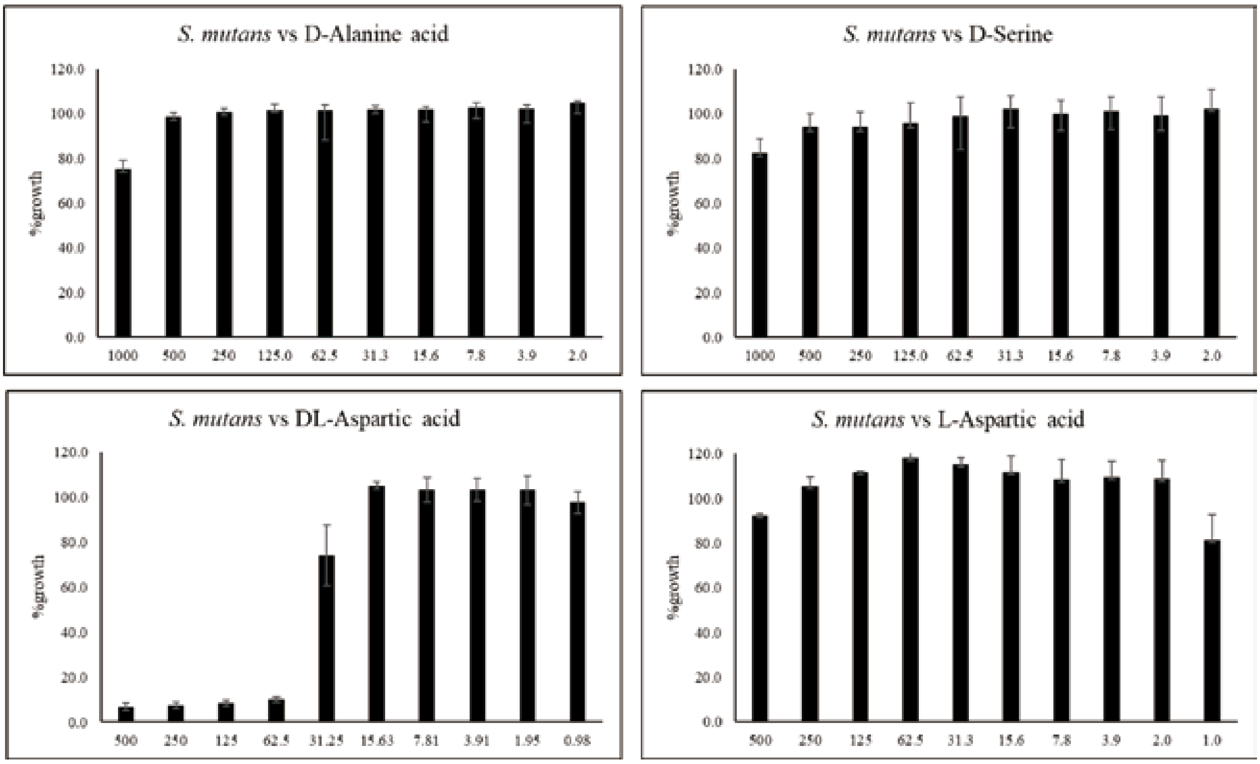


図２　D-アラニン、D-セリン、DL-アスパラギン酸、D-アスパラギン酸処理条件下の最小発育濃度

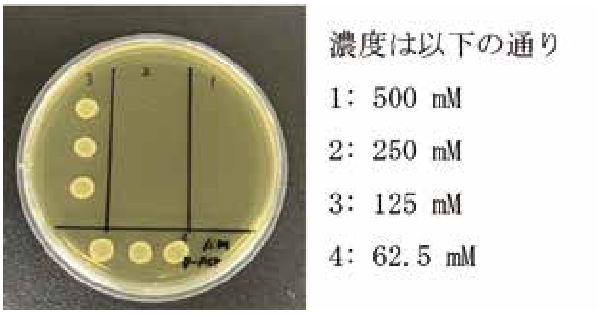


図３　D-アスパラギン酸処理プレート

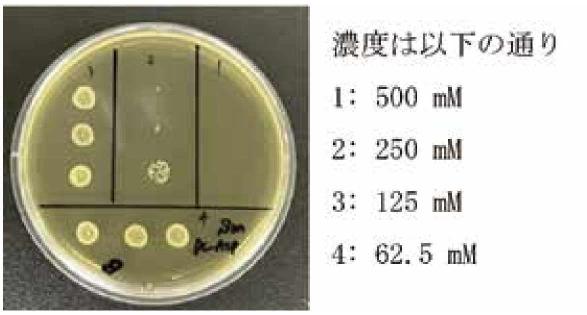


図４　DL-アスパラギン酸処理プレート

〈*A.actinomycetemcomitans* に対する結果〉

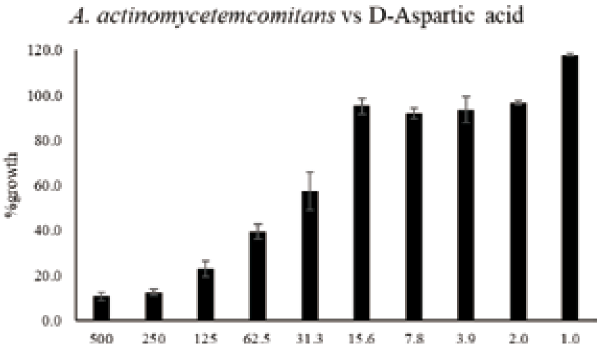


図５　D- アスパラギン酸処理条件下の最小発育濃度

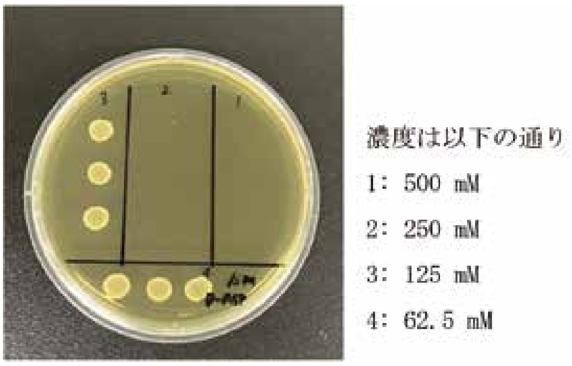
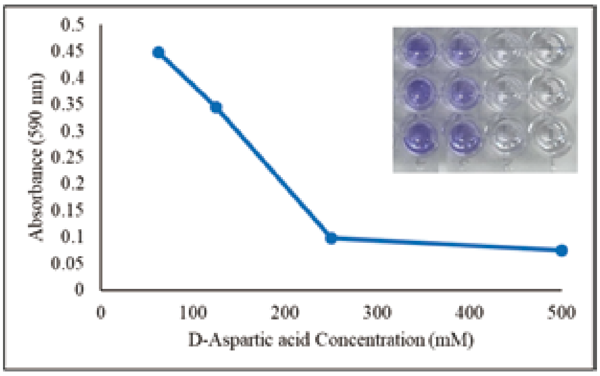


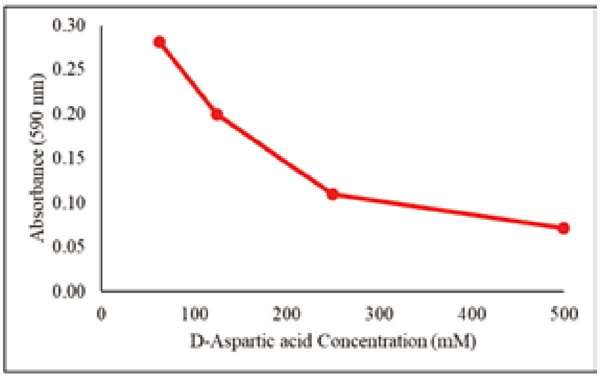
図６　D- アスパラギン酸処理プレート

２．バイオフィルム形成能に対する D-アミノ酸の効果



D-Aspartic acid Conc. (mM)	62.5	125	250	500
Absorbance (590 nm)	0.45	0.35	0.10	0.08

図７　*S.mutans* に対する形成阻害効果



D-Aspartic acid Conc. (mM)	62.5	125	250	500
Absorbance (590 nm)	0.28	0.20	0.11	0.07

図８　*A.actinomycetemcomitans* に対する阻害効果

図１および図２は、各濃度のD-アミノ酸を30分処理した結果である。*S.mutans* に対して、D-アスパラギン酸12.5 mM以上の濃度で、濃度依存的にバイオフィルム抑制効果を認めた。しかしながら、D-アラニンおよびD-セリンに関しては、バイオフィルム抑制効果は認められなかった。D体とL体の等量混合物であるDL体の効果を確認したところ、D-アスパラギン酸処理と同様のバイオフィルム抑制効果が認められた。一方、L-アスパラギン酸ではバイオフィルム抑制効果が認められなかったことから、*S.mutans* 由来のバイオフィルムに対する抑制効果は、D-アスパラギン酸特有であることが示唆された。また、D-アスパラギン酸の最小殺菌濃度は250 mM, DL-アスパラギン酸の最小殺菌濃度は500 mMと推定された（図３、４）。また、*A.actinomycetemcomitans* に対しても、アスパラギン酸処理において同様の効果が認められ、最小発育濃度は31.3 mM, 最小殺菌濃度は250 mMと推定された（図５、６）。さらに、クリスタルバイオレット染色法を用いて、D-アスパラギン酸のバイオフィルム形成阻害効果を測定したところ、*S.mutans* および *A.actinomycetemcomitans* ともに、D-アスパラギン酸250 mM以上の濃度でバイオフィルム形成能阻害効果を認めた（図７、８）。これらの結果から、う蝕病原菌および歯周病原細菌に対して、アスパラギン酸が抗菌的な効果を有することが明らかとなった。

成果発表：（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）

・研究結果について、現在特許出願中である（特願2024-196805）。

・第67回　歯科基礎医学会学術大会　発表予定