原 著

ミュータンス連鎖球菌のホスファターゼ活性と モノフルオロリン酸ナトリウム (MFP) 分解の関連性

Relationship between the Phosphatase Activity of
Mutans Streptococci and Sodium Monofluoro-
phosphate (MFP) Decomposition

緒 方 出*

Izuru OGATA*

Received November 15, 1991 ; accepted December 20, 1991

Abstract: The interaction of sodium monofluorophosphate (MFP) with artificial plaque and the underlying enamel was investigated. *Streptococcus mutans* Ingbritt (serotype *c*) and *Streptococcus sobrinus* 6715 (serotype *g*) cells were grown on windowed human enamel blocks to form artificial plaque. Plaque-covered enamel and clean enamel samples were incubated anaerobically with 5 ppm (as F⁻) of MFP or sodium fluoride (NaF) for 48 hr.

Fluoride concentration in the enamel was significantly increased in plaque-covered enamel in the presence of both MFP and NaF. More than 60 % of the acquired fluoride from MFP in the enamel at a depth of 5 μ m was KOH-soluble fluoride. More fluoride was acquired from MFP in the enamel covered with the plaque of *S. sobrinus* 6715 than in that covered with the plaque of *S. mutans* Ingbritt.

Significant degradation of MFP was detected during the growth of *S. sobrinus* 6715 concomitant with the fall of broth pH around 5.4 within 48 hr incubation. Optimum MFP hydrolysis by *S. sobrinus* 6715 and *S. mutans* Ingbritt occurred at approximately pH 5.0, but no detectable MFP hydrolysis was found at alkaline pH. MFP hydrolyzing activity (MFPase) was sharply inhibited by low F⁻ concentration and was not activated by Mg²⁺. These data indicated that acid phosphatase, and not alkaline phosphatase, is responsible for MFP hydrolysis in mutans streptococci.

索引用語: エナメル質, フッ素取り込み, MFP, ホスファターゼ, ミュータンス連鎖球菌

Key words: Enamel, Fluoride uptake, MFP, Phosphatase, Mutans streptococci

* 岩手医科大学歯学部口腔衛生学講座 (指導: 片山 剛教授)

* Department of Preventive Dentistry, Iwate Medical University School of Dentistry (Director: Professor Tsuyoshi KATAYAMA)

特別掲載

緒 言

モノフルオロリン酸ナトリウム (MFP) 配合歯磨剤は、1960年代からアメリカやヨーロッパで広く用いられており、その齲蝕予防効果を評価した数多くの野外研究が報告されている¹⁾。しかしこのような MFP の齲蝕予防効果を実験室的に評価するための簡便な手法が確立されていないために、その作用機序が今日に至るまで十分に明らかにされてはいない²⁾。

MFP はフッ化物イオン (F⁻) に比較して健全エナメル質への取り込みが少なく、かつ取り込みのスピードも遅い³⁾。にもかかわらず、人工プラークに覆われたエナメル質には MFP 由来のフッ素が多量に取り込まれるという⁴⁾。このことは、MFP が人工プラークを形成するミュータンス連鎖球菌により加水分解を受けたためではないかと考えられ、事実、プラークや唾液沈渣によって MFP が加水分解を受けることが報告されている^{5,6)}。ちなみにミュータンス連鎖球菌が MFP を分解することは別の研究⁵⁾ですでに明らかにされている。一方、プラーク⁵⁾や唾液沈渣^{6,7)}そしてミュータンス連鎖球菌⁵⁾ のホスファターゼが MFP を分解することを示唆する研究が数多く報告されているが、十分な結論は得られないままに残されている。

なお、これらの研究とは別に、*p*-nitrophenylphosphate (PNPP) を基質とした研究から、ミュータンス連鎖球菌はアルカリホスファターゼ (ALP) および酸性ホスファターゼ (AcP) 活性を持つことが示されている⁸⁻¹⁰⁾。しかし、これらミュータンス連鎖球菌のホスファターゼ活性と MFP 分解酵素活性 (MFPase 活性) との間の関連性は未だ十分に明らかではない。

そこで著者は人工プラークで覆われた、ヒトエナメル質に MFP を作用させ、遊離する F⁻ のエナメル質への取り込み量を解析し、併せてミュータンス連鎖球菌のホスファターゼ活性と MFPase 活性との関連性を検索した。

材料及び方法

1. 使用菌株および培養条件

Streptococcus mutans Ingbritt (serotype c, 鹿児島大学歯学部 井上昌一教授より分与) および研究室保存 (-70°C) の *Streptococcus sobrinus* 6715 (serotype g) のそれぞれを, trypticase soy broth (BBL, Cokeysville, Md.) あるいは brain heart infusion broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) で2代継代培養後、以

下の実験に供試した。

2. 菌体のトルエン処理

2.25 % グルコース加 trypticase soy broth 中で 37°C, 18時間嫌気培養した *S. mutans* Ingbritt および *S. sobrinus* 6715 を遠心集菌 (10,000 × g 10分) 後, 50mM borate 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し, 菌浮遊液 (乾燥菌体 ca. 30 mg/ml) とした。この菌浮遊液の100μl に対し, 50mM borate 緩衝液 (pH 8.0) の150μl およびトルエンの4μl を加え Voltex type mixer で10秒間激しく振盪した後直ちに遠心 (16,000 × g 10分) し, 上清を除いた。次いで沈渣に50mM borate 緩衝液 (pH 8.0) を加え100μl とし, これをトルエン処理菌体とした。

3. 総タンパク質量

S. mutans Ingbritt あるいは *S. sobrinus* 6715 の菌浮遊液に終末濃度で1M となるよう2M NaOH を加え, 100°C 30分間加熱処理した後, Lowry らの方法¹¹⁾により, 菌浮遊液中の総タンパク質量を求めた。なおウシ血清アルブミン (Sigma, St. Louis, Mo.) を標準とした。

4. ホスファターゼ活性および MFPase 活性の測定

Farley ら¹²⁾の記載を一部改変し, 以下の手順で *S. mutans* Ingbritt および *S. sobrinus* 6715 の ALP 活性, AcP 活性および MFPase 活性を測定した。

ALP 活性: 2 mM の *p*-nitrophenylphosphate (PNPP) を基質として2.5mM MgCl₂ を含む100mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) に *S. mutans* Ingbritt あるいは *S. sobrinus* 6715 のトルエン処理菌液を加え, 全量500μl の反応液中で 37°C, 10分間インキュベートした。2M NaOH の250μl を添加する事により反応を停止させ, 生成した *p*-nitrophenol (PNP) の吸光度を日立分光光度計 (124型, 日立製作所, 東京) を用い波長410nm で測定した。

AcP 活性: 2 mM の PNPP を含む100mM acetate 緩衝液 (pH 5.5) 中に前述のトルエン処理菌液を加え, 37°C, 10分間で生成する PNP 量を定量した。なお前述の ALP 活性および AcP 活性を含め, トルエン処理菌液のホスファターゼ活性を, acetate 緩衝液 (pH 4.0~6.0), 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES, pH 5.5~7.5), Tris-HCl (pH 7.0~9.0), および bicarbonate 緩衝液 (pH 8.5~10.0) 中でそれぞれ測定し, 比較した。

MFPase 活性: 2 mM の MFP を含む100mM acetate 緩衝液 (pH 5.5) 中に *S. mutans* Ingbritt あるいは

は *S. sobrinus* 6715 の菌体浮遊液 (50mM borate 緩衝液, pH 8.0) を加え, 37°C, 10分間インキュベートした。次いで反応液と等量の Total Ionic Strength Adjustment Buffer II (TISAB II) を加え, 遊離した F^- 量をフッ素イオン電極 (96-09, Orion Research Inc., Cambridge, Mass.) により測定した。なおホスファターゼ活性と同様, MFP 分解活性についても pH 4.0~10.0 の範囲でその活性の強さを比較した。

5. 酵素作用の検定

ホスファターゼ活性および MFPase 活性は, 1分間当りに生成あるいは遊離する PNP 又は F^- を 1mg タンパク質あたりの nmol に換算する事により求めた。

6. エナメルブロックの調製

ヒト健全智歯からおよそ 16mm² の面積を持つ鏡面研磨したエナメル片を作成し, Ni-Cr 線にエポキシ樹脂で貼付した。なお, エナメル質の表面以外は, nail varnish を塗布する事により被覆 (window 形成) した。

7. 人工プラークの被覆とエナメル質のフッ素の取り込み

1) エナメル質表面への人工プラークの形成

Klimek ら⁴⁾の記載を一部参考として, 以下の手順でエナメル質表面に人工プラークを付着させた。すなわち, 一夜前培養した *S. mutans* Ingbritt あるいは *S. sobrinus* 6715 を接種した 5% sucrose 加 brain heart infusion broth 中に, あらかじめオートクレープで滅菌したエナメルブロックを投入し, 37°C, 48時間嫌氣的に静置培養し, エナメル質表層に人工プラークを付着させた。

2) エナメル質表層とフッ化物の反応

フッ素濃度として 5 ppm となるように MFP あるいは NaF を添加した brain heart infusion broth 中に, 人工プラークを付着させたエナメルブロックを移し替えた後, 37°C で嫌氣的に静置培養した。

48時間の培養後エナメルブロックを取り出し, 1% NaClO 溶液中で十分に洗浄し, エナメル表層に付着した人工プラークを除去した。ついで, Caslavská ら¹³⁾の記載に従い, 20ml の 1M KOH 溶液にエナメルブロック 1個あて室温で24時間浸漬し, エナメル質表層に形成されたフッ素化合物を可溶化した。なお, アルカリ可溶性のフッ素濃度は, 前述の KOH 溶液を 1M HCl で中和し, 等量の TISAB II 液を加えた後, フッ素イオン電極法により定量し, Dijkman ら¹⁴⁾の記載した計算式に従い CaF_2 量を算出した。なお人工プラーク非付着のエナメルブロックも同様に培養後, アルカリ処理し, 比較

のための対照とした。

3) エナメル質表層のフッ素濃度分析

1M KOH 溶液に24時間浸漬し, エナメル質表層のアルカリ可溶性フッ素をあらかじめ除去したエナメルブロックを 0.5M HClO₄ 溶液の 1ml に順次 10, 10, 10, 30, 30, 30秒間, 連続的に浸漬・脱灰し, 合計 6層のエナメル脱灰試料溶液を得た。なおエナメル質表層に取り込まれた総フッ素量を測定する目的で, 1M KOH 未処理のエナメルブロックも別途 0.5M HClO₄ に浸漬・脱灰し, 前述と同様 6層のエナメル脱灰試料溶液を得た。

脱灰試料溶液中のフッ素濃度は, McCann の記載¹⁵⁾に従い脱灰試料液を 0.5M クエン酸ナトリウム溶液で5倍に希釈した後, フッ素イオン電極 (96-09, Orion) により測定した。一方カルシウム濃度は共存するリン酸イオンの妨害を除く目的で, Dijkman と Arends の記載¹⁶⁾を参考として終末 0.1% になるよう塩化ランタンを添加し, 原子吸光度計 (508A 型, 日立製作所, 東京) により測定した。なお脱灰した試料エナメル質の表層からの深さは, Aasenden と Moreno の記載¹⁷⁾に従いエナメル質のカルシウム含有量を 37 wt%, 比重 2.95 g/cm³ とし, $D = W / 2.95 \times S$ (D : 深さ μm , S : エナメル表面積 mm², W : 溶出カルシウム量 μg) の計算式により算出した。またエナメル表層から内層に向かうフッ素濃度分布は $F^- = K_F / D^\alpha$ (D : 表層からの深さ μm , K_F : 1 μm での F^- 濃度, α : 定数) の理論式で表わせる事が示されている¹⁸⁾ことから, 任意の深さに置けるエナメル質のフッ素濃度を算出し, 比較した。

8. 統計学的解析

エナメル質中のフッ素濃度の差の検定には ANOVA, さらに, 実験条件間の差を Newman-Keuls test¹⁹⁾ により比較した。また 2 群間の平均値の差は Mann-Whitney の U test により有意水準 5% で検定した。

結 果

1. エナメル質取り込みフッ素量の層別分析

S. mutans Ingbritt あるいは *S. sobrinus* 6715 による人工プラークで被覆したエナメル質に取り込まれるフッ素濃度を層別に分析し, 培養液中に添加した異なるフッ化物の影響を比較した。その結果 Table 1 に示す様に, *S. mutans* Ingbritt を人工プラークとした場合, エナメル質中に取り込まれるフッ素濃度は, 最表層の 5 μm 層でおおよそ 1,100~1,200ppm であり, F^- の供給源としての MFP と NaF の間には統計学的な有意差が認められなかった ($p > 0.05$)。この傾向は内層においても

Table 1 Comparison of uptaken fluoride concentration before and after KOH treatment in 4 successive enamel layers of plaque-covered enamel

Bacterial species	Enamel depth (μm)	Control	MEP		NaF	
			before	after	before	after
<i>S. mutans</i> Ingbritt	5	372.2 $\pm$ 38.1 ^a	1182.4 $\pm$ 234.1	685.7 $\pm$ 240.5	1076.8 $\pm$ 189.9	686.4 $\pm$ 115.9
	10	245.5 $\pm$ 22.9	901.9 $\pm$ 164.5	544.4 $\pm$ 75.1	887.3 $\pm$ 123.7	646.7 $\pm$ 23.7
	20	159.8 $\pm$ 19.2	693.5 $\pm$ 157.0	416.8 $\pm$ 18.5	734.7 $\pm$ 96.4	416.8 $\pm$ 18.5
	50	90.8 $\pm$ 15.2	498.1 $\pm$ 170.3	226.5 $\pm$ 50.0	577.5 $\pm$ 107.8	234.3 $\pm$ 27.5
<i>S. sobrinus</i> 6715	5	346.7 $\pm$ 86.5	1953.4 $\pm$ 677.2	785.7 $\pm$ 190.9	1234.7 $\pm$ 320.8	767.4 $\pm$ 156.4
	10	243.7 $\pm$ 54.8	1098.8 $\pm$ 283.3	557.8 $\pm$ 81.3	864.2 $\pm$ 147.5	551.3 $\pm$ 80.1
	20	140.2 $\pm$ 30.6	622.0 $\pm$ 113.4	374.0 $\pm$ 57.4	609.5 $\pm$ 45.7	369.0 $\pm$ 51.8
	50	108.6 $\pm$ 24.7	295.8 $\pm$ 37.6	233.6 $\pm$ 56.7	389.2 $\pm$ 27.0	218.4 $\pm$ 38.1

^a: mean $\pm$ SD (ppm), calculated from 5 different enamel specimens

同様であった。

一方 *S. sobrinus* 6715 を人工プラークとした時の MFP 及び NaF からの取り込みフッ素量は 5 μm 層でそれぞれおよそ 1,900ppm, 1,200ppm であり, 前者は *S. mutans* Ingbritt のそれと比較して有意 ($p < 0.05$) に大きかった。なお, *S. mutans* Ingbritt を人工プラークとした場合とは異なり, 5 μm 層における MFP と NaF との間の差は統計学的に高度に有意 ($p < 0.01$) であった。

なお, 人工プラークを介してエナメル質に取り込まれたフッ素のうち, 5 μm 層でアルカリ可溶性のフッ素濃度は, MFP で 60~73 % と高く, 内層のそれも同様の傾向を示していた。これに対して, 5 μm 層における NaF 由来のアルカリ可溶性フッ素の占める割合は, MFP に比較して低い傾向にあった (Table 1)。

2. 人工プラーク被覆エナメル質の取り込みフッ素濃度

エナメル質表面に *S. mutans* Ingbritt あるいは *S. sobrinus* 6715 を付着させる事により形成した人工プラークが, エナメル質へのフッ素取り込み量にどのような影響をもたらすのかを評価した。エナメル質中のフッ素濃度は Fig. 1 に示す様に, 人工プラーク存在下では, *S. mutans* Ingbritt および *S. sobrinus* 6715 のいずれの菌種においても対照とした人工プラークを付着させていないエナメル質のフッ素取り込み量と比較して, 明瞭な差が認められた。エナメル質表層から内層に至る各深さでの Newman-Keuls test の結果, その差は統計学的に高度に有意 ($p < 0.01$) であった。

3. ミュータンス連鎖球菌による MFP の分解

S. sobrinus 6715 による人工プラークを付着させたエナメル質が *S. mutans* Ingbritt のそれと比較して MFP

を含む broth 中から高い濃度のフッ素を取り込んでいた (Table 1)。このことは *S. sobrinus* 6715 が *S. mutans* Ingbritt に比較して高い MFP 分解活性を保有する事を示唆している。フッ素濃度として 5 ppm の MFP を含む brain heart infusion broth に *S. mutans* Ingbritt あるいは *S. sobrinus* 6715 を接種し, 72 時間 37°C で嫌気培養した。その結果, 培地 pH の低下に伴い, ブロース中の遊離の F^- 濃度が上昇し, MFP がミュータンス連鎖球菌の増殖にともない酵素的に分解を受けた可能性のあることが示された (Fig. 2)。なお, *S. sobrinus* 6715 による MFP の分解は, *S. mutans* Ingbritt のそれと比較して著しく大きく, 添加した MFP のほぼ全部が水解を受けていた (Fig. 2)。

4. ミュータンス連鎖球菌のホスファターゼ活性とその至適 pH

MFP がミュータンス連鎖球菌などの口腔連鎖球菌の持つホスファターゼにより分解を受ける⁹⁾ ことから, *S. mutans* Ingbritt および *S. sobrinus* 6715 のトルエン処理菌体を酵素標品とし, PNPP を基質とするホスファターゼ活性を pH 4~10 の範囲で測定した。その結果, *S. mutans* Ingbritt は pH 5.5 および pH 8.8 付近に最大活性を示す 2 種類のホスファターゼを持つ事が示された (Fig. 3-a)。これに対して *S. sobrinus* 6715 のホスファターゼ活性は極めて弱く, *S. mutans* Ingbritt の 1/8~1/30 程度の活性を示すに過ぎなかった (Fig. 3-b)。

5. MFPase 活性とその至適 pH

2 mM の MFP を含む pH 4~10 の緩衝液中で *S. mutans* Ingbritt あるいは *S. sobrinus* 6715 菌体をインキュベートし, 遊離する F^- をフッ素イオン電極で

Fig. 1 Distribution of fluoride concentration from the enamel surface to interior with different fluoride treatment. Artificial plaque-covered enamel (open symbols) and clean enamel (closed symbols) were incubated anaerobically in the presence and absence of 5 ppm fluoride (as F^-) for 48hr. After incubation, each enamel was etched and then F^- and etching depth were analysed. The relationship of uptaken F^- and enamel depth are indicated in this figure. Artificial plaque a: *S. mutans* Ingbritt, b: *S. sobrinus* 6715. (●, ○): BHI broth only, (■, □): BHI broth with 5ppm NaF, (▲, △): BHI broth with 5ppm MFP.

Fig. 2 Time course changes of F^- concentration and pH in the culture supernatant during the growth of the mutans streptococci. F^- concentration of each culture supernatant was measured every 12hr. Mutans streptococci (a: *S. mutans* Ingbritt, b: *S. sobrinus* 6715) were incubated in (●, ○): BHI broth, (■, □): BHI broth with 5ppm NaF, (▲, △): BHI broth with 5ppm MFP. (—): pH change of each culture supernatant.

Fig. 3 Effect of pH on the phosphatase activity of the cells from mutants streptococci. Phosphatase activity of mutants streptococci (a: *S. mutans* Ingbritt, b: *S. sobrinus* 6715) were assayed in the reaction mixture with various buffers, (●, ○): acetate buffer, (■, □): MES, (▲, △): Tris-HCl, (▼, ▽): bicarbonate buffer. Buffer and substrate of phosphatase (*p*-nitrophenylphosphate) concentrations were 100mM and 2mM, respectively. 2.5mM of $MgCl_2$ was contained in the assay mixture. One unit of the enzyme activity was expressed as nmol PNPP hydrolysis/min/mg protein.

定量した。その結果 Fig. 4 に示す様に、*S. sobrinus* 6715 では pH 5.0 付近にのみ明瞭な MFase 活性ピークが存在を認め、アルカリ側 pH では有意な活性を検出することができなかった。なお、この *S. sobrinus* 6715 のピーク画分は、同菌の PNPP を基質とするホスファターゼ活性が非常に微弱である事 (Fig. 3-b), および同菌に比較して10倍以上の高いホスファターゼ活性を持つ *S. mutans* Ingbritt の MFP 分解活性が逆に 1/3 程度であった事が特徴的であった。

6. 2価金属イオン, EDTA および F^- の影響

ホスファターゼ活性ならびに MFase 活性測定のための反応液中に種々の2価金属イオンを加えることによりホスファターゼと MFP 分解活性との間の異同を調べた。なお、pH 8.8 付近に至適 pH を持つ ALP の活性の発現には Mg^{2+} が必須であることから、反応系にあらかじめ Mg^{2+} を加えたうえで他の金属イオンの影響を調べた。その結果、Table 2 および Table 3 で示す様に *S. mutans* Ingbritt および *S. sobrinus* 6715 の両者において、pH 8.8 付近で最大活性を示す画分は、5mM の EDTA で完全に阻害された。このことから、pH 8.8に最大活性を持つホスファターゼは ALP であると考えられた。一方、pH 5.5に最大活性を示す画分は 2mM の F^- を添加する事によりほぼ完全に失活したことから、AcP である可能性が大きいと考えられた (Fig. 5)。なお MFP 分解活性に対する2価金属

Fig. 4 Effect of pH on MFase activity of the cells from mutants streptococci. Enzyme activity was assayed in the reaction mixture with various buffers, (●, ○): acetate buffer, (■, □): MES, (▲, △): Tris-HCl, (▼, ▽): bicarbonate buffer. Substrate of MFase was 2mM of MFP. Used whole cells (open symbols: *S. sobrinus* 6715) closed symbols: *S. mutans* Ingbritt, were not treated with toluene. One unit of enzyme activity was expressed as nmol MFP hydrolysis/min/mg protein.

イオン, EDTA および F^- の影響も類似の傾向を示していた。

Table 2 Effect of various additives on the ALP, AcP, and MFPase activity from the cells of *S. mutans* Ingbritt

Additive	Final concentration (mM)	Enzyme activity (% of control)		
		ALP	AcP	MFPase
Control ^a		100	100	100
Ca ²⁺ ^b	1.0	45	117	140
	10.0	23	140	220
Mg ²⁺	1.0	ND	137	210
	10.0	100	203	230
Hg ²⁺	1.0	40	24	30
	10.0	1	14	20
Zn ²⁺	1.0	21	93	110
	10.0	ND	ND	ND
Cu ²⁺	1.0	74	55	110
	10.0	54	41	80
EDTA	1.0	38	100	91
	5.0	0	65	86
F ⁻	1.0	114	35	0
	2.0	96	0	0

^a : ALP assay mixture contained 2.5mM MgCl₂, but AcP and MFPase were assayed in the absence of any metal ions.

^b : Metal ions added as chlorides.

ND : Not determined.

考 察

MFP は NaF に比べ毒性が低い²⁰⁾だけでなく、カルシウム塩の溶解度が大きく²¹⁾、かつ自然分解による F⁻ の遊出が少ないことから、歯磨剤に添加しても高い齲蝕抑制効果の得られることが知られている¹⁾。

MFP は溶液中や歯磨剤中で解離し、PO₃F²⁻ として存在していることからエナメル質との反応が F⁻ のそれとは異なるのではないかと考えられている。事実、PO₃F²⁻ そのものがアパタイト中に取り込まれて、結晶中の PO₄³⁻ あるいは HPO₄²⁻ と交換反応を行なうことを示唆する成績^{6,22)} が得られている。しかし、反面、PO₃F²⁻ がエナメル質アパタイト表面で加水分解を受ける²³⁾、あるいは唾液⁷⁾ やプラーク⁵⁾ のホスファターゼにより酵素的な分解を受けることにより遊離する F⁻ がやはりエナメル質と反応するのではないかと考える成績も集積されている。後者の想定は、例えばプラーク構成細菌であるミュータンス連鎖球菌のホスファターゼを検索することにより確認されつつある^{5,25)}が、現在に至るまでも Knuuttila ら¹⁰⁾ の研究は別として、ミュータンス連鎖球菌の菌体ホスファターゼの酵素学的性状が十分に

明らかにされているとは言い難い。かつ、また、菌体ホスファターゼと MFPase 活性との関連性も不明のまま残されている。

そこで著者は本論文において、ミュータンス連鎖球菌のうち *S. mutans* Ingbritt (serotype c) および *S. sobrinus* 6715 (serotype g) の2種を研究に供試し、両株のホスファターゼ活性と MFPase 活性の関連性を明らかにする目的で、PNPP を基質とするホスファターゼ活性の定量法について検討した。18時間培養の全菌体を酵素標品とし、100mM の緩衝液中で 2 mM の基質が 37°C、10 分間のインキュベーションで分解する量を 1 分間あたりの比活性として求めた。その結果、*S. mutans* Ingbritt および *S. sobrinus* 6715 とともに pH 5.5 および pH 8.8 付近に最大活性を示す2種類のホスファターゼを検出することができた (Fig. 3)。著者は本研究でこれら両画分のうち、後者の pH 8.8 に至適 pH をもつホスファターゼが、例えば Knuuttila¹⁰⁾ らの *S. mutans* Ingbritt から得た ALP とほぼ同等の活性を示すことを明らかにしたが、菌体をトルエン処理することにより同酵素の著しい活性上昇 (8~10倍) をみた。この傾向は、pH 5.5 に至適 pH

Table 3 Effect of various additives on the ALP, AcP and MFPase activity from the cells of *S. sobrinus* 6715

Additive	Final concentration (mM)	Enzyme activity (% of control)		
		ALP	AcP	MFPase
Control ^a		100	100	100
Ca ²⁺ ^b	1.0	76	117	97
	10.0	50	139	111
Mg ²⁺	1.0	ND	100	105
	10.0	100	100	76
Hg ²⁺	1.0	116	6	27
	10.0	40	6	10
Zn ²⁺	1.0	101	33	43
	10.0	ND	ND	ND
Cu ²⁺	1.0	95	17	27
	10.0	48	11	3
EDTA	1.0	3	99	99
	5.0	1	74	92
F ⁻	1.0	105	32	0
	2.0	116	13	0

^a : ALP assay mixture contained 2.5mM MgCl₂, but AcP and MFPase were assayed in the absence of any metal ions.

^b : Metal ions added as chlorides

ND : Not determined

Fig. 5 Effect of F⁻ on the ALP, AcP and MFPase activity of the mutans streptococci. Enzyme activity was assayed in the reaction mixture containing various concentrations of F⁻. Used whole cells (a: *S. mutans* Ingbritt b: *S. sobrinus* 6715) were treated with toluene, 2.5mM of MgCl₂, 2mM of PNPP and 100mM of Tris-HCl buffer pH 8.8 were included in the reaction mixture for the assay of ALP activity (●, ○). 2mM of PNPP and 100mM of acetate buffer pH 5.5 were included for AcP activity (▲, △). One unit of the enzyme activity was expressed as nmol PNPP hydrolysis/min/mg protein. MFPase was inhibited completely with less than 1mM F⁻, as shown in the figure (c). Open symbols: *S. sobrinus* 6715. closed symbols: *S. mutans* Ingbritt 2mM of MFP and 100mM of acetate buffer pH 5.5 were contained in the reaction mixture for MFPase assay. On unit of the enzyme activity was expressed as nmol MFP hydrolysis/min/mg protein.

を示す AcP についても同様 (5.5~6.5 倍の活性上昇) に観察された。一方 *S. sobrinus* 6715 の両ホスファターゼは, *S. mutans* Ingbritt の 1/8~1/30 の活性を示したにすぎず (Fig. 3), 従ってトルエン処理による影響は小さかった。しかし pH 5.5 に至適 pH を持つ AcP 活性は有意に抑制される傾向を示し²⁴⁾, *S. mutans* Ingbritt のそれとは異なる性状を持つことが伺われた。しかしいずれにしても, 著者の本研究によりミュータンス連鎖球菌のホスファターゼ活性が, トルエン処理した全菌体を酵素標品として供試することにより, 安定して測定されることが示されたことは, MFPase 活性との関連性⁷⁾を明らかにするうえで重要な知見であると考えられる。

本研究で, 前述のホスファターゼ活性の測定条件をそのままにし, 基質のみを PNPP から MFP に変更することにより得られた MFPase 活性は, Jackson⁵⁾ の測定した *S. sobrinus* K1R (serotype g) の pH 7.0 における MFPase 活性と比較して *S. mutans* Ingbritt でおよそ 7 倍, *S. sobrinus* 6715 と比較した場合, およそ 40 倍もの高い活性が検出されることとなった。一方 Saotome ら²⁵⁾ の pH 5.0 付近に最大活性を示す *S. rattus* BHT の MFPase と比較した場合, 本研究の *S. mutans* Ingbritt ではほぼ同等の活性を, *S. sobrinus* 6715 ではおよそ 40 倍であったが *S. mutans* NCTC 10449 と比較した場合では実に 100 倍もの高い活性を検出する結果となった。

なお本研究で著者が検出した MFPase 活性 (至適 pH 5.5) はトルエン処理菌体を酵素標品とした場合, トルエン非処理の標品のそれに比較して, *S. mutans* Ingbritt で 30%, *S. sobrinus* 6715 では 50% もの活性抑制がもたらされた²⁴⁾。とりわけ後者の *S. sobrinus* 6715 の活性抑制は, 前述の pH 5.5 に至適 pH を持つ AcP がトルエン処理により有意に抑制されることと一致しており, このことは本菌株の pH 5.5 に至適 pH を持つ AcP が MFPase 活性の本体であると見なしても良いのではないかと考えられた。また, 本研究で用いた *S. mutans* Ingbritt および *S. sobrinus* 6715 の MFPase は, 1 mM の F^- で完全に失活する (Fig. 5) が, このことは先に Luoma²⁶⁾ の示した *S. mutans* K1R 株の AcP (至適 pH 4.8) が 20ppm の F^- で完全に失活する事実と符合している。

本研究で AcP が MFPase を担うと結論した場合, MFP が, ALP により分解されるとした Pearce と Jenkins の研究成績⁷⁾ および Jackson⁵⁾ のプラークを用

いた成績と異なる傾向を示すこととなる。しかしながら複数の口腔微生物に由来すると考えられるホスファターゼで生じる MFP 分解と, 純培養菌によるそれとが異なる傾向を示したとしても不自然ではない。事実, 小麦胚芽由来の AcP (E. C. 3.1.3.2) が MFP を分解することを示した成績⁶⁾も報告されている。

本研究で著者は *S. mutans* Ingbritt ならびに *S. sobrinus* 6715 の両者が MFP を加水分解する事実を明らかにしたが, このことは両菌により構成された人工プラークで覆われたエナメル質中のフッ素量が, プラーク非付着のエナメル質のそれと比較して著しく高い事実とよく符合している。そして著者の成績は, Klimek ら⁴⁾ の成績および *in vivo* での Hellwig ら²⁷⁾ のプラーク下でのエナメルへのフッ素取り込み結果とよく一致している。なお, 今回の実験で, NaF と MFP が, ほぼ同程度のエナメルへのフッ素取り込み量を示していたが, Klimek⁴⁾ らは, プラークに覆われホワイトスポットの発生したエナメルでは MFP からのフッ素取り込みが, プラークに覆われない健全エナメルより多いと述べ, このことは, 多孔質となったエナメルは, フッ素との反応部を多く持つためであるとしている。この反応部の面積拡大については Grön ら²⁸⁾ も同様に指摘しており, 人工プラークの存在下での MFP からのフッ素取り込み増大の一要因であると考えられた。

フッ化物溶液とエナメル質を反応させることにより生じた反応生成物が, 1M KOH 可溶性であるか, 不溶性であるかを区別することは, フッ化物応用後のエナメル表面に形成されるフッ素化合物の本態を推定する上で重要である。ちなみに, アルカリ (1M KOH) 可溶性であれば反応生成物は CaF_2 である可能性が高く, アルカリ不溶性であればフルオロアパタイトであるという¹⁸⁾。

CaF_2 の生成量はフッ素濃度のみに依存するのではなく, ハイドロキシアパタイトとの反応時間, 環境 pH, Ca^{2+} の存在によって変動することが既に明らかにされている²⁸⁾。著者の行った本研究において, 人工プラークで覆われたエナメル質表層の反応生成物の本体を推定する目的で, 試料エナメル質を 1M KOH 浸漬による処理を行ったところ, アルカリ可溶性の反応生成物が存在する可能性のあることが示唆された。このことは, 低フッ素の環境にありながらエナメル質が長時間, 低 pH 環境に保持され, かつエナメル質の脱灰により遊離する Ca^{2+} が持続的に供給されることにより CaF_2 の生成が促進されたのではないかと考えられた。

一方、歯面に生成した CaF_2 は、唾液中に徐々に溶出し^{29,30)} 低濃度フッ素の供給源となっているが、 CaF_2 の溶解度は、 HPO_4^{2-} によって抑制されることが示されている³¹⁾。このことは、MFP の分解により遊離する HPO_4^{2-} もエナメル質表層に形成された CaF_2 の溶出に抑制的に働く要因ではないかと考えられる。事実 *S. mutans* Ingbritt に比較して、MFPase 活性の高い *S. sobrinus* 6715 による人工プラークに覆われたエナメル質表層のフッ素濃度が、統計学的に有意に ($P < 0.05$) 高かった。

結 論

S. mutans Ingbritt および *S. sobrinus* 6715 の MFPase は、PNPP を基質とする AcP (至適 pH 5.5) であり、同酵素の作用により遊離した F^- がエナメル質表層の高いフッ素濃度の獲得に関与しているものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ終始懇篤なる御指導と御校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔衛生学講座 片山 剛教授に深甚なる謝意を表します。また、貴重な御助言を頂きました花田信弘助教授をはじめ、研究の遂行にあたり御協力頂いた、口腔衛生学講座の皆様へ感謝致します。さらに貴重な菌株を快く分与下さいました 鹿児島大学歯学部予防歯科学教室 井上昌一教授に深謝致します。

文 献

- 1) DePaola, P. F.: Clinical studies of monofluorophosphate dentifrices, *Caries Res.*, **17** (Suppl. 1): 119-135, 1983.
- 2) Rølla, G.: Interaction of monofluorophosphate with plaque and saliva, *Caries Res.*, **17** (Suppl. 1): 91-101, 1983.
- 3) de Rooij, J. F., Arends, J. and Kolar, Z.: Diffusion of monofluorophosphate in whole bovine enamel at pH 7, *Caries Res.*, **15**: 363-368, 1981.
- 4) Klimek, J., Hellwing, E. and Ahrens, G.: Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro, *Caries Res.*, **16**: 156-161, 1982.
- 5) Jackson, L. R.: *In vitro* hydrolysis of monofluorophosphate by dental plaque microorganisms, *J. Dent. Res.*, **61**: 953-956, 1982.
- 6) Ericsson, Y.: Biologic splitting of PO_3F ions, *Caries Res.*, **1**: 144-152, 1967.
- 7) Pearce, E. I. F. and Jenkins, G. N.: The decomposition of monofluorophosphate by enzymes in whole human saliva, *Archs oral Biol.*, **22**: 405-407, 1977.
- 8) Greenman, J. and Melville, T. H.: Phosphatase activity in strains of *Streptococcus mutans*, *Archs oral Biol.*, **23**: 965-970, 1978.
- 9) Greenman, J., Melville, T. H. and Appleton, J.: The localization of phosphatase activity in two oral strains of *Streptococcus*, *Archs oral Biol.*, **25**: 759-765, 1980.
- 10) Knuuttila, M. L. E. and Mäkinen, K. K.: Purification and characterization of a phosphatase specifically hydrolyzing *p*-nitrophenyl phosphate from an oral strain of *Streptococcus mutans*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**: 685-701, 1972.
- 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
- 12) Farley, J. R., Tarbaux, N. M., William Lau, K. -H. and Baylink, D. J.: Monofluorophosphate is hydrolyzed by alkaline phosphatase and mimics the actions of NaF on skeletal tissues, *in vitro*, *Calcif. Tissue Int.*, **40**: 35-42, 1987.
- 13) Caslavská, V., Moreno, E. C. and Brudevold, F.: Determination of the calcium fluoride formed from *in vitro* exposure of human enamel to fluoride solutions, *Archs oral Biol.*, **20**: 333-339, 1975.
- 14) Dijkman, A. G., Tak, J. and Arends, J.: Fluoride deposited by topical applications in enamel, *Caries Res.*, **16**: 147-155, 1982.
- 15) McCann, H. G.: Determination of fluoride in mineralized tissues using the fluoride ion electrode, *Archs oral Biol.*, **13**: 475-477, 1968.
- 16) Dijkman, A. G. and Arends, J.: Thickness of enamel layers removed by HClO_4 etching, *Caries Res.*, **16**: 129-137, 1982.
- 17) Aasenden, R. and Moreno, E. C.: Evaluation of biopsy data in human enamel fluoride studies, *Archs oral Biol.*, **16**: 1413-1426, 1971.
- 18) Athanassoulis, T. M., Papastathopoulos, D. S. and Hadjiioannou, T. P.: Fluoride concentrations in surface enamel of some teeth in Athens, *Caries Res.*, **7**: 368-373, 1973.
- 19) Winer, B. J.: Statistical principles in experimental design, 2nd ed. McGraw Hill

- Kogakusha, Ltd., New York, 1971, p. 185.
- 20) Shourie, K. L., Hein, J. W. and Hodge, H. C.: Preliminary studies of the caries inhibiting potential and acute toxicity of sodium monofluorophosphate, *J. Dent. Res.*, **29**; 529-533, 1950.
 - 21) White, W. E.: Monofluorophosphate its beginning, *Caries Res.*, **17**(Suppl. 1); 2-8, 1983.
 - 22) Ingram, G. S.: Some factors affecting the interaction of hydroxyapatite with sodium monofluorophosphate, *Caries Res.*, **7**; 315-323, 1973.
 - 23) Grøn, P., Brudevold, F. and Aasenden, R.: Monofluorophosphate interaction with hydroxyapatite and intact enamel, *Caries Res.*, **5**; 202-214, 1971.
 - 24) Ogata, I., Hanada, N. and Katayama, T.: Alkaline phosphatase of mutans streptococci is not responsible for monofluorophosphate hydrolysis, *Proceeding of the Third World Congress on Preventive Dentistry*, in press.
 - 25) Saotome, T., Gerencser, V. F. and Lim, J. K.: Sodium monofluorophosphate degradation by oral streptococci, plaque and saliva, *Caries Res.*, **21**; 97-103, 1987.
 - 26) Luoma, H.: Phosphorus translocation between enamel and *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose and fluoride with observations on the acid phosphatase of *S. mutans*, *Caries Res.*, **14**; 248-257, 1980.
 - 27) Hellwig, E., Klimek, J. and Wagner, H.: The influence of plaque on reaction mechanism of MFP and NaF *in vivo*, *J. Dent. Res.*, **66**(1): 46-49, 1987.
 - 28) Saxegaard, E. and Rølla, G.: Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro, *Scand. J. Dent. Res.*, **96**; 523-535, 1988.
 - 29) Mellberg, J. R., Laakso, P. V. and Nicholson, C. R.: The acquisition and loss of fluoride by topically fluoridated human tooth enamel, *Archs oral Biol.*, **11**; 1213-1220, 1966.
 - 30) Margalit, D. and Gedalia, I.: Release of fluoride into saliva after topical fluoride application, *J. Dent. Res.*, **48**; 93-96, 1969.
 - 31) Lagerlöf, F., Saxegaard, E., Barkvoll, P. and Rølla, G.: Effects of inorganic orthophosphate and pyrophosphate on dissolution of calcium fluoride in water, *J. Dent. Res.*, **67**; 447-449, 1988.