象牙質齲蝕における *C. albicans* の役割について

福岡歯科大学口腔細菌学講座（指導：萩原義郷教授）
福岡歯科大学口腔外科学第1講座（指導：福岡徳也教授）

森 智 昌

昭和60年8月5日受付

An Investigation of *Candida Albicans*' Role in the Formation of Dentine Caries

Tomoyoshi Mori

Department of Oral Microbiology (Director: Prof. Yoshisato Hagihara)
First Department of Oral Surgery (Director: Prof. Tokuya Tomioka)
Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan

In order to further clarify *Candida albicans*' (*C. albicans*) role in the development of dentine caries, research was conducted in the following areas: population of the organism in oral cavities, the organism's ability to use dentine powder for its growth, and the degradation of dentine collagen by an enzyme prepared from culture media.

The results obtained are as follows:

1. One hundred and sixteen plaque samples and soft dentine samples were collected from caries carriers. One hundred and twenty-three plaque samples were collected from non-caries carriers. *C. albicans* was isolated from 37.9% of the soft dentine samples, and 26.7% from the dental plaque samples of caries carriers. It was also isolated from 14.6% of the dental plaque samples from non-caries carriers.

2. Growth of the *C. albicans* ATCC 1002 strain (1002 strain) was observed when the organisms were cultivated at 37°C for 5 days in media containing only dentine powder and distilled water. The maximum growth was 6.0×10^3 CFU/ml, and was ten times greater than that growth obtained in water only (the control). Under the candle method, the maximum growth in the dentine powder media was 4.5×10^4 CFU/ml, and was again greater than that growth obtained in the water-only media using the same method.

3. It was observed that the 1002 strain could also grow in water containing dentine powder that was demineralized with 3% EDTA. Growth was the same as that obtained in the water containing ordinary dentine powder.

4. In fermentation tests, the 1002 strain produced acid and gas from seven sugars including glucose. The strain produced acid only from arabinose, but did not ferment raffinose and lactose.

5. Under the candle method, in both the ordinary and the demineralized dentine

powder media, the growth of the 1002 strain was stimulated by the addition of glucose. The growth was about ten times greater than that obtained in the same media without the addition of glucose.

6. An enzyme which could degrade collagen was prepared from the supernate when the 1002 strain was cultivated in Yeast Carbon Base (YCB) containing demineralized dentine. It was shown that the enzyme degraded demineralized dentine, and released hydroxyproline into the solution. The enzyme also degraded Azocoll used as substrate.

7. The optimum pH in the lytic activity of the enzyme was 4.0, and the optimum temperature was 45°C.

Key words : *Candida albicans* / dentine caries / population / dentine collagen / collagen degrading enzyme

緒 言

口腔領域には細菌・真菌・ウィルスなど多くの微生物が存在し、口腔固有の微生物叢を形成しており、これらの微生物が口腔感染症と密接な関係を持っていることはよく知られている。特に重要な口腔疾患であり、歯牙の無機成分および有機成分の溶解を基本変化とする齲蝕症は、Orland ら (1954)¹⁾ が無菌動物を用いて細菌との関連性を報告して以来、これら微生物の作用に起因する疾患として研究されてきた¹⁻¹⁰⁾。

これらの齲蝕発生に関連するとされる微生物の中、特に *Streptococcus* や *Lactobacillus* については幾多の報告がなされ¹⁻¹⁰⁾ 枚挙に遑がない。一方、活動性齲蝕のあるグループからの検出頻度が高いとされている *Candida* については、齲蝕との関連性が疑われつつも未だ実態が明らかにされておらず、齲蝕病巣における本菌の存在意義、特に齲蝕進行過程における意義については賛否両論があり¹¹⁻²²⁾、結論が出されるに至っていない。*Candida* は酵母様真菌で、そのうち *Candida albicans* (以下 *C. albicans*) は自然界に広く分布し、ヒトおよび動物においては常在微生物叢を形成する一員として知られており、特に本菌による感染症は、本菌が化学療法剤に対する高度の自然耐性を有するために、難治性疾患の一つとして重要視されている。また近年、本菌が義歯性口内炎の病巣から高率に検出されるため、その病原微生物としての意義について関心がもたれている。ごく微量の物質の存在下で増殖可能な *Candida*²³⁾ が、特に軟化象牙質から高率に検出^{16, 18)} されることは、この微生物が歯牙成分、即ち、歯質中に存在するア

ミノ酸、蛋白質あるいは糖質などの有機成分を利用増殖し、齲蝕の進行を促進するのではないかと推測される。本研究では特に歯牙硬組織の中での有機成分を多量に含む象牙質に着目し、*Candida* と象牙質齲蝕との関連性を明らかにする目的で、ヒト歯牙象牙質粉末を唯一の基質とした *C. albicans* の増殖および象牙質 collagen の分解に関する実験を行い、新しい知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

1. 供試菌株

福岡歯科大学口腔細菌学講座で Sabouraud 寒天培地 (ニッスイ) に継代されている *C. albicans* ATCC 1002 株 (以下1002株) を使用した。使用に際して菌は Sabouraud 液体培地に 37°C, 48時間培養し遠心集菌後、滅菌蒸留水で3回洗浄し、滅菌蒸留水を用いて比濁法により 10³CFU/ml に調整したものを接種材料として、培地 5 ml に対し 0.1ml を接種した。

2. 生菌数測定

生菌数測定は、Sabouraud 寒天培地を使用し、混釈培養法により出現する集落数を測定し、colony forming unit (CFU) として算定した。

3. 供試象牙質粉末

福岡歯科大学附属病院第一口腔外科および院外歯科診療所で抜去した肉眼的に齲蝕のない智歯を水洗後、冷凍保存し、実験用に供した。象牙質の分離は、歯牙から歯石・歯根膜などの付着物を完全に除去し、歯牙を縦断し、エナメル質・セメント質および歯髓組織を機械的に削除して、象牙質のみとした。得られた象牙質を X-press (Biotec Sweden) にて粉碎し、さらに乳鉢

で磨砕後、100メッシュ・フィルターを通過した粉末を集めた。この粉末は Lowry 法²⁵⁾で、その上清中に蛋白成分が検出されなくなるまで、約7日間攪拌しながら水洗を行った。この間、洗浄用蒸留水は1日数回交換した。水洗終了後、凍結乾燥し、象牙質粉末として室温でデシケーター中に保存した。

また、脱灰象牙質の作製には前述の象牙質粉末に、3% EDTA (1N NaOH にて pH7.0に調整) を4°Cにおいて7日間作用させ脱灰処理を行った。この間、毎日脱灰液を交換し、脱灰終了後は4°Cにて、蒸留水を頻繁に交換しながら7日間水洗を行い EDTA を除いた。水洗終了後、凍結乾燥を行い脱灰象牙質粉末として室温にて、デシケーター中に保存した。

4. 供試水

水道水を脱イオン、蒸留し、更に、過マンガン酸カリを用いて再蒸留したものを使用した。

5. 供試ガラス器材

実験に用いた全てのガラス器材はクロム硫酸処理後、脱イオン蒸留水で洗浄することにより有機物および無機物の混入をさけた。

6. 口腔内からの *Candida* の検出

福岡歯科大学附属病院歯科および院外歯科診療所を受診した活動性齲蝕のあるグループ (齲蝕未処置者グループ) 116名と、福岡歯科大学学生で活動性齲蝕のないグループ (齲蝕処置済および齲蝕未経験者グループ) 123名を対象とした。

歯垢は、活動性齲蝕のあるグループおよび活動性齲蝕のないグループの上顎臼歯部歯頸部周辺から滅菌爪楊枝を用いて採取した。採取歯垢は滅菌生理食塩水 1ml に浮遊させ、これを検査材料とした。

軟化象牙質は患歯を清掃後、滅菌エキスカバーターで採取した。採取した軟化象牙質は滅菌生理食塩水 1ml を加え乳鉢で磨砕後、懸濁液とし検査材料とした。

それぞれの検査材料は滅菌生理食塩水で、10倍希釈法によって 10^{-4} まで希釈を行い、これらの各液を Sabouraud 寒天培地に 0.1ml 塗抹し 37°C、48時間好気的環境で培養を行った。培養後、出現した酵母様真菌は *Candida* check (ヤトロン) を用いて血清学的に同定した。

7. 象牙質粉末浮遊液での1002株の増殖

象牙質粉末を終濃度 2 mg/ml になるように水に加えた浮遊液 5 ml をワッセルマン試験管に分注し、オートクレーブ (121°C, 15分) にて滅菌後、菌を接種した。培養は 37°C、5日間行い生菌数を算定した。培養気相

としては空気下および CO₂ 環境下で行った。CO₂ 培養には嫌気ジャー (トミナガ, JK-1) を用いて candle 培養法を行った。

8. 象牙質粉末浮遊液での1002株の増殖におよぼす炭酸ガス濃度の影響

象牙質粉末を終濃度 2 mg/ml になるように水に加えた浮遊液 5 ml をワッセルマン試験管に分注し、オートクレーブにて滅菌後、菌を接種した。培養は 37°C、5日間行い生菌数を算定した。培養気相として空気および炭酸ガスをそれぞれ 5%, 10%, 15%, 20%, 含むよう調整した合成空気を使用し、同時に candle 培養法をも用いた。

9. 脱灰象牙質粉末浮遊液での1002株の増殖

3% EDTA 脱灰象牙質粉末を終濃度 2 mg/ml になるように水に加えた浮遊液 5 ml をワッセルマン試験管に分注し、オートクレーブにて滅菌後、菌を接種した。培養は空気下および candle 培養法にて 37°C、5日間行い生菌数を算定した。

10. 象牙質粉末または脱灰象牙質粉末浮遊液における1002株の増殖におよぼす glucose 添加の影響

象牙質粉末および脱灰象牙質粉末をそれぞれ終濃度 2 mg/ml になるように水に加えた浮遊液 4.5ml をワッセルマン試験管に分注し、オートクレーブにて滅菌後、濾過滅菌した10% glucose 0.5ml を加え、菌を接種した。培養は空気下および candle 培養法にて37°C、5日間行い生菌数を算定した。

11. 1002株の糖発酵試験

糖発酵試験は各種糖を2%含むペプトン水を用いて既報の方法²⁶⁾に従って行った。糖としては arabinose, glucose, fructose, galactose, sucrose, maltose, lactose (以上和光:特級), mannose, dextrin (Merck:特級), starch (Difco:特級), raffinose (米山化学:特級) を使用した。

12. 1002株由来の collagen 分解酵素の分離

酵素の分離は、次のようにして行った。濾過滅菌した Yeast Carbon Base (YCB, Difco) に EOG 滅菌した脱灰象牙質粉末を終濃度2%として無菌的に添加し、これに菌を終濃度 10^5 CFU/ml になるよう接種した。培養は好気的に 37°C、16日間行い培養後、遠心 (2,000 g, 30分) にて培養上清を集め Amicon PM 10X で約10倍に濃縮し、これを citrate buffer 20mM pH6.7 で透析し平衡化した。また、DEAE-Sephacel カラム (1.2 × 25cm) も同一 buffer で平衡化しておき、これに試料を吸着させた。吸着、平衡化後に用いた buffer (90

ml) でカラムを洗浄した後, citrate buffer pH 6.7 の直線濃度勾配 (20mM : 150ml, 500mM : 150ml) を用いて溶出を行った. 流速は 30ml/h で 3 ml ずつ分画し, 分光光度計 (日立ダブルビーム 200-20) にて各分画の 280nm の吸収を測定した. 溶出された画分の collagen 分解活性は, Azocoll (Sigma)²⁸⁻³⁰⁾ の分解によって調べ, 活性のある画分を集めた.

13. 分離した collagen 分解酵素による Azocoll の分解

collagen 分解活性を調べる方法としては, ほとんどの実験において Azocoll の分解を調べた. Azocoll は基質として 0.1M acetate buffer (pH 4.0) に 2 mg/ml になるように加え, この 2 ml と酵素 50 μ l (25 μ g protein/ml) を混合し, 37°C, 18時間反応させた. 反応終了後, 2,000 g にて10分間遠心を行い未反応の Azocoll を除き, 分光光度計にて上清の 540nm における吸収を測定した.

14. 分離した collagen 分解酵素の至適 pH

buffer として 0.1M acetate buffer (pH : 3.0, 4.0, 5.0), 0.1M phosphate buffer (pH : 6.0, 7.0) および 0.1M Tris-HCl buffer (pH : 8.0) を用いて 3.0 ~ 8.0 までの異なる pH の buffer を調整し, これに Azocoll 2 mg/ml を加え, その 2 ml に, 更に, 酵素液 50 μ l を加えて 37°C, 18時間反応させた後, 遠心 (2,000 g, 30分) 後上清の 540nm における吸収を測定し, pH 4.0 acetate buffer を用いたものを 100% として相対活性を算出した.

15. 分離した collagen 分解酵素の至適温度

0.1M acetate buffer (pH 4.0) に Azocoll 2 mg/ml を加え, その 2 ml と酵素液 50 μ l (25 μ g protein/ml) を加えた試験管を, それぞれ 30°C から 70°C の各温度において 18時間反応させて遠心 (2,000 g, 20分) 後, 上清の 540nm における吸収を測定し, 37°C で反応させたものを 100% として相対活性を算出した.

16. 分離した collagen 分解酵素による象牙質 collagen の分解

象牙質粉末を基質として培養した上清から分離した酵素による象牙質 collagen の分解は, 次のようにして調べた.

0.1M acetate buffer (pH 4.0) 1 ml に酵素液 50 μ l (25 μ g protein/ml) および基質として脱灰象牙質粉末 5 mg を含む液を調製し, 9 時間反応を行った. 反応終了後, 等量の 20% トリクロロ酢酸 (TCA) を加え反応を停止させ, 145,000 g 3 時間超遠心を行い, その上清

を分離した. 酵素による象牙質 collagen の分解は, 反応物の超遠心上清から Prockop ら (1960)³⁰⁾ の方法に従い, hydroxyproline を定量することにより調べた. 対照として 100°C 10 分間加熱し, 不活化した酵素を基質に加えて同様な反応を行わせたものを使用した.

結 果

1. 口腔内からの *Candida* の検出

活動性齲蝕のあるグループで, 齲窩における真菌の検出率は 37.9%, 歯垢における真菌の検出率は 26.7% であった. 一方, 活動性齲蝕のないグループで歯垢における真菌の検出率は 14.6% であった (Table 1). 真菌の検出率は活動性齲蝕のあるグループでも, 齲窩において最も高かった. また検出された真菌は *Candida check* 同定因子血清により, 全て *Candida albicans* B. と同定された.

2. 象牙質粉末浮遊液での 1002 株の増殖

象牙質粉末を 2 mg/ml になるように水に加えた浮遊液で, 5 日間培養後 1002 株の増殖を CFU にて算定すると, その増殖率は空気下で 6.0×10^3 CFU/ml (約 50 倍), candle 培養法で 4.5×10^4 CFU/ml (約 300 倍) であった. 一方, 象牙質粉末を含まない水のみ (コントロール) における増殖率は, 空気下および candle 培養法においていずれも 8.0×10^2 CFU/ml (約 4 倍) であった (Fig. 1).

即ち, 象牙質粉末を唯一の基質とした浮遊液中での空気下における増殖限界は 6.0×10^3 CFU/ml で, 増殖率はコントロールに比較して約 10 倍と低いが, 1002 株は明らかに増殖し, 特に candle 培養法において増殖限界は 4.5×10^4 CFU/ml とやや高くコントロールに比較して約 60 倍であった.

3. 象牙質粉末浮遊液での 1002 株の増殖におよぼす炭酸ガス濃度の影響

candle 培養法において 1002 株の増殖率が高かったことから, 象牙質粉末を基質とした浮遊液での 1002 株の増殖におよぼす炭酸ガス濃度の影響を調べると, Fig. 2 に示す通り, 炭酸ガスが 5 % 以上存在する環境下では 20% まで, その増殖率は空気下におけるよりも約 10 倍高かった.

4. 脱灰象牙質粉末浮遊液での 1002 株の増殖

脱灰象牙質粉末を 2 mg/ml になるように水に浮遊した液体中での増殖は Fig. 3 に示す通りである. 空気下において 5.0×10^3 CFU/ml (約 40 倍), candle 環境下では 8.0×10^4 CFU/ml (約 500 倍) であった. 一方, 空

Table 1 Isolation of *C. albicans* from soft dentine and plaque samples obtained from two groups, caries carriers and non-caries carriers.

1) Caries carriers

Age	Male	Female	Total	% of isolation	
				Plaque	Soft dentine
10	7	5	12	25	41
11—20	7	18	25	20	32
21—30	17	25	42	26	38
31—40	5	7	12	16	25
41—50	5	5	10	40	50
51—60	3	7	10	10	20
61—	3	2	5	100	100
Total	47	69	116	26.7	37.9

2) Non-caries carriers

Age	Male	Female	Total	% of isolation
				Plaque
20—22	112	11	123	14.6

気下と candle 環境下における水のみ系（コントロール）では、それぞれ 8.0×10^2 CFU/ml（約4倍）であった（Fig. 3）。

即ち、脱灰象牙質を唯一の基質とした場合にも、未処理の象牙質粉末の場合とはほぼ同様で、増殖限界 5.0×10^3 CFU/ml，コントロールに対する増殖率約10倍と、明らかに増殖し、特に CO_2 環境では、増殖限界 8.0×10^4 CFU/ml，コントロールに対する増殖率約100倍と、その増殖はやや高かった。

5. 象牙質粉末浮遊液での 1002 株の増殖におよぼす glucose 添加の影響

結果は Fig. 4 に示す通りである。象牙質粉末を 2 mg/ml 水に浮遊し、これに 1% に glucose を加えた培地で、空気下および candle 培養法で 1002 株を培養した場合、空気下で 3.0×10^3 CFU/ml（約30倍），candle 培養法で 1.3×10^5 CFU/ml（約800倍）まで増殖した。しかし、これを glucose 無添加の場合（Fig. 1）と比較すると、空気下ではほとんど glucose の影響はみられず、candle 培養においても、glucose の影響は無添加に比較して増殖限界が約10倍高くなったのみであった。

Fig. 1 Growth of *C. albicans* ATCC 1002 in dentine-water (—) or water (···) under air or in candle jar at 37°C.

6. 脱灰象牙質粉末浮遊液での1002株の増殖におよぼす glucose 添加の影響

Fig. 5 に示すように, 脱灰象牙質を基質とし, 1%に glucose を添加した培地において, 空気下で 2.4×10^3 (約20倍), candle 培養法で 1.6×10^5 (約940倍) と glucose無添加の場合 (Fig. 3) に比較して大きな差は認められなかった。

7. 1002株の糖発酵試験

Guerra 法²⁶⁾ に従って行った糖発酵試験の結果は Table 2 に示すように, 本菌は raffinose, lactose を除き, glucose など使用した糖を全て分解し, 酸を生じた。また, arabinose 以外の糖ではガスの発生もみ

られた。

8. 1002株由来の collagen 分解酵素の分離
脱灰象牙質粉末を唯一のN源として用いた YCB 培地

Table 2 Sugar fermentation by
C. albicans ATCC 1002

Sugar	ATCC 1002	
	Acid	Gas
Arabinose	+	—
Glucose	+	+
Fructose	+	+
Mannose	+	+
Galactose	+	+
Sucrose	+	W
Maltose	+	+
Starch	+	W
Dextrin	+	W
Raffinose	—	—
Lactose	—	—

W : weak production

Fig. 2 Effect of CO₂ contents on the growth of *C. albicans* ATCC 1002 in dentine-water (—) or water (···).

Fig. 3 Growth of *C. albicans* ATCC 1002 in demineralized dentine-water (—) or water (···) under air or in candle jar at 37°C.

で、1002株を 37°C、16日間培養し、その培養上清を集めた。それを DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィを用い、citrate buffer の濃度勾配法で分画した時、Azocoll 分解活性を有する画分は、溶出に用いた citrate buffer 濃度が 0.1M から 0.2M の間（フラクション番号41から56）で溶出され、280nmの吸収を示す物質であることがわかった。以後、この画分を粗酵素として実験に用いた。

9. 分離した collagen 分解酵素の至適 pH

Fig. 6 に示すように、分離した collagen 分解酵素の Azocoll 分解における至適 pH を調べた結果、この酵素は pH 4.0 で最も活性が高く、また pH 5.0 以上における活性はきわめて低いことがわかった。

10. 分離した collagen 分解酵素の至適温度

37°Cでの活性を100とした時、この酵素の活性は45°Cで最も高かったが、30°C以下でも、また55°C以上でも活性の低下がみられ、60°Cでの活性はきわめて低かった (Fig. 7)。

11. 分離した collagen 分解酵素による象牙質 collagen の分解

脱灰象牙質粉末を基質として加え、37°C、9時間、酵素を作用させた後、TCA 処理上清を調べた結果、Fig. 8 に示すように上清中には明らかに超遠心で沈殿しない hydroxyproline を含む小ペプチドが基質から遊離され、経時的に増加していくことがわかった。

考 察

歯科領域における二大疾患のひとつは齲蝕であり、その罹患率は若年層においては95%前後であると言われている。1954年 Orland らが無菌動物を用いた実験から、齲蝕が細菌によって発生することを示して以来、齲蝕と細菌との関係について多くの報告がなされてきた¹⁻¹⁰⁾。このような実験的齲蝕を起し得る細菌の中で、最も注目されているものは *Streptococcus mutans* (以下 *Str. mutans*) である。*Str. mutans* は sucrose の存在下で菌体外に dextran および levan を産生し、その粘

Fig. 4 Growth of *C. albicans* ATCC 1002 in dentine-water (—) or water (···), supplemented with 1% glucose, under air or in candle jar at 37°C.

Fig. 5 Growth of *C. albicans* ATCC 1002 in demineralized dentine-water (—) or water (···), supplemented with 1% glucose, under air or in candle jar at 37°C.

着性のために **dental plaque** の形成を促進する。また、この菌は多量の乳酸を産生するが、これらのことで、この菌が齲蝕原性を有する主な原因とされている。このように齲蝕発生の条件および、その過程における *Str. mutans* との関係についての研究には目ざましい進展がみられる。

一方、口腔内常在微生物で活動性齲蝕のある口腔内から高率に分離されることが指摘されている真菌、特に *C. albicans* に関する研究も多数報告されている¹¹⁻²²⁾。林 (1958)¹¹⁾ は歯科外来患者666人の中から178株の *Candida* を血清学的に同定し、この中 *C. albicans* は82.6%で、その他 *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parakrusei*, *C. guilliermondi* など検出した。更

に、口腔疾患と *Candida* の検出率の関係では未処置齲蝕症患者の場合に最も高く (35.9%), 歯槽膿漏症 (33.9%), 有床義歯装着者 (31.3%), 処置済齲蝕症患者 (28.7%), 歯肉炎 (23.5%) の順に検出率は低下するが、急性化膿性疾患では最低率であったと報告している。また、田中 (1960)¹²⁾ は歯科患者と非患者を対象に舌部、歯頸部、主訴部位の歯垢、唾液、膿汁などより *Candida* を分離し生物学および血清学的方法を併用した同定を行い、*Candida* の検出率は歯科患者49.2%, 非患者17.8%で、歯科患者に *Candida* が多いと述べ、齲蝕と関係があるのではないかと推論している。他方、Young ら (1951)¹³⁾ は健康人の唾液より *Candida* を分離し生物学的方法により同定を行った結果、*Can-*

Fig. 6 Effect of pH on the enzyme activity. The reaction mixture was prepared with various pH of buffer as described in the text. The experiment was carried out by the Azocoll assay. The relative activity was expressed as a percentage against the control (cont. ; pH 4.0).

Fig. 7 Effect of temperature on the enzyme activity. The experiment was carried out by the Azocoll assay. Reaction mixture was incubated at various temperature for 18h. The relative activity was expressed as a percentage against the control (cont. ; 37°C).

did は48.6%の検出率で、そのうち *C. albicans* は93.8%を占めていたと報告しており、Howell ら(1962)¹⁵⁾ は唾液と歯垢では唾液に *Candida* が多いことを報告している。更に、小林(1973)¹⁶⁾ の報告によると、齦蝕者口腔材料と非齦蝕者口腔材料からの *Candida* の検出率は、齦蝕者(62.5%)の方が非齦蝕者(17.7%)より約3倍高率であったと述べ、この検出率は田中¹²⁾ および成田ら(1970)¹⁷⁾ の報告と同様であった。この *C. albicans* と齦蝕との関係について武井ら(1965)¹⁹⁾ は口腔内齦蝕環境には、常に *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Candida* が多く観察され、*Candida* を酸産生菌、特に、*Lactobacillus* と混合培養を行うと、共生現象が認められると報告し、成田ら(1971)¹⁸⁾ は *C. albicans* が齦窩より高率に検出されることなどから *Candida* は直接齦蝕の原因菌としてではないが、齦窩は *Candida* にとっ

て住みやすい環境で *Lactobacillus* と共生し、酸度を高め歯質の脱灰や齦蝕の進行をもたらす重要な因子となるのではないかと推論している。しかし、浅香(1971)²²⁾ は齦蝕歯数も少く、口腔清掃も良好な口腔の過半数より、常に *Candida* が検出されることから、*Candida* は齦蝕と関係ないと推論している。

以上のように *C. albicans* と齦蝕との関係については、これまで主に臨床的な立場から種々論議がなされてきた。今回、軟化象牙質、活動性齦蝕のあるグループの歯垢および活動性齦蝕のないグループの歯垢から真菌の検出を行ったが、検出された真菌は *Candida* check 同定因子血清により全て *C. albicans* B. と同定され、その検出率はそれぞれ、軟化象牙質37.9%、活動性齦蝕のあるグループの歯垢26.7%、活動性齦蝕のないグループの歯垢14.6%で、この結果も活動性齦蝕のあるグループからの *C. albicans* の検出率が高く、中でも齦窩からの検出率が高いことを示しており、*C. albicans* と齦蝕との関連性を示唆しているように思われた。

そこで本研究では *Candida* が歯牙成分、即ち、歯質中に存在するアミノ酸、蛋白質あるいは糖質などの有機成分を利用し増殖することが齦蝕の進展を促進しているのではないかと推論し、歯牙硬組織の中でも有機成分を多量に含有している象牙質を基質とした水中での *C. albicans* ATCC 1002株の増殖実験を行った。

その結果、1002株は象牙質粉末を唯一の基質として加えた水中で、空気下における増殖限界は 6.0×10^3 CFU/ml、水のみコントロールに比較して増殖率は約10倍と低いが、明らかに増殖し得ることが認められた。特に、炭酸ガス環境下において培養した場合、増殖限界は 4.5×10^4 CFU/ml、水のみコントロールに比較した増殖率で約60倍と、その増殖は高率であった。炭酸ガス濃度は5%~20%でほぼ同様であった。また、象牙質粉末を基質として用いた場合と、脱灰象牙質粉末を用いた場合との間に著明な増殖の差は認められなかった(Fig. 1, 3) が、脱灰象牙質粉末を用いた場合、やや高い増殖率を示した。この理由としては、脱灰象牙質は未処理象牙質に比較して、脱灰処理により象牙質 collagen が露出しているため、基質として *C. albicans* に利用され易いのではないかとということが想定される。

一方、炭素源として象牙質粉末中に含まれるもの以外に培地成分としてよく使用される glucose を1%に加えた液中での1002株の増殖を検討した。1002株による糖分解は Table 2 に示す通りで、本菌は glucose を分解して酸とガスを産生したにも拘らず、glucose を添加

Fig. 8 Hydrolysis of dentine collagen by the enzyme obtained from *C. albicans*. The reaction mixture contained 50 μ l of enzyme solution (25 μ g protein/ml), 1 ml of 0.1M acetate buffer (pH 4.0) and 5 mg of dentine collagen as a substrate (●). Heated (100°C, 10min) enzyme was used as a reference assay (○).

した象牙質粉末浮遊液中で期待されたほど著明な増殖を示さなかった。しかし、**candle** 培養法を用いた場合、**glucose** 無添加の場合と比較して約10倍の増殖率を示した。萩原ら (1977)²³⁾ は本実験に使用した1002株がきわめて乏しい栄養状態、即ち、水に含まれている他の物については不明であるが、2種の無機塩 (KCl-MgCl_2 , $\text{NH}_4\text{Cl-MgCl}_2$, $\text{CaCl}_2\text{-MgCl}_2$, $\text{MgCl}_2\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) を加えただけの水溶液中で、炭酸ガス環境下に 10^4 CFU/ml までを限度として増殖し得ることを **ATP** の増加によって確かめており²⁴⁾、今回の象牙質粉末を基質とした実験でも、その増殖限界は $10^4\text{--}10^5$ CFU/ml と一般の培地を用いた場合と比較して非常に低い、明らかに増殖することが確かめられた。尚、その際、炭酸ガスの存在や **glucose** の添加が1002株の増殖に、やや有利な条件を与えることが分った。これは炭酸ガスの影響や1002株の **glucose** 分解による酸の産生で、水溶液中の酸性化が起こり象牙質粉末が脱灰され、更に、脱灰により露出した象牙質 **collagen** を分解することによって生ずる有機成分を利用しているのではないかと考えられた。

そこで、*C. albicans* が象牙質の高分子有機質を分解する酵素、即ち、象牙質有機質の大部分を占める **collagen** を分解する **collagen** 分解酵素を産生するか否かについて検討した。

一般に **collagen** は結合組織の主要有機成分をなす線維性蛋白質で、物理的な強度の他に化学的にも、希酸、希アルカリ、また、**trypsin** のような蛋白分解酵素に対する抵抗性が比較的強く、電子顕微鏡で特徴のある 640 Å の一定の周期を持った横紋構造が観察される。また、**collagen** を構成しているアミノ酸の組成は、他の蛋白質にみられない特徴をもっており、即ち、**hydroxylysine** と **hydroxyproline** の2種の **collagen** 特有なアミノ酸が含まれるが、量的には **glycine** と **proline** が多く、そのうち **glycine** はアミノ酸2個おきに配列しており、**polypeptide** は他の蛋白質にみられないラセン構造を形成している^{32,33)}。**hydroxylysine** と **hydroxyproline** の2種のアミノ酸は **collagen** 以外の蛋白質にはほとんど存在しないことから **hydroxyproline** 量を測定することにより組織の **collagen** 量の定量に用いられている^{34,35)}。

この比較的安定した **collagen** を分解する酵素 **collagenase** には組織 **collagenase** および細菌の産生する **collagenase** が知られている^{35,36)}。この細菌性 **collagenase** に関しては、*Bacteroides melaninogenicus*³⁶⁾

⁴⁰⁾、*Clostridium histolyticum*^{36,41)}、*Staphylococcus aureus*^{36,42)}、*Pseudomonas aeruginosa*^{36,43)}、などに由来するものが報告されている。しかし、*Candida* に由来する **collagenase** に関する報告はみあたらない。*Candida* の産生する **proteinase** については、わずかに、**acid proteinase** に関して Remold ら (1968)⁴⁴⁾、松田ら (1983)⁴⁵⁾ の報告をみるのみであった。

collagen 分解酵素活性検出法として、よく用いられている方法は、不溶性 **collagen** を基質として用い、酵素と反応させた後、未反応の残った不溶性 **collagen** の重量を測定する方法、不溶性 **collagen** から酵素で分解されて溶出してきたものについて窒素量を測定するか **collagen** に特異的な **hydroxyproline** 量を測定するという方法、また、**azo** 色素を **collagen** に付けた **Azocoll** の分解により溶出する色素を測定する方法、可溶性 **collagen** を酵素反応の基質として用いた場合には、**collagen** が分解される分子の大きさが小さくなるにつれて減少する粘度を測定する方法などが用いられてきた^{35,36)}。

本実験において **collagen** 分解の確認のためには、脱灰象牙質粉末に分離した酵素を作用させ、分解産物中に **collagen** のアミノ酸組成に特有な **hydroxyproline** が含まれていることを証明する方法を用いたが、結果は、明らかに本酵素が象牙質粉末中の **collagen** を分解して **hydroxyproline** を遊離できる、即ち、本酵素が **collagen** 分解活性を有するという、きわめて興味ある成績を得た (Fig. 8)。また、本酵素は **Azocoll** も分解し得ることから、その他の酵素活性の測定には基質として **Azocoll** を用いた。

分離された酵素の至適 pH は 4.0 とかなり低く、この成績は牛血清アルブミンを基質として得られた Remold らの **proteolytic enzymes**、皮膚角化層を基質として得られた松田らの **proteinase** に類似するものであった。松田らは酵素を産生する条件として、菌のおかれている環境が菌にとって好ましくない状況が必要であると述べており、また、徳永 (1981)²⁷⁾ は、ある種の真菌は適当な基質に適応する酵素を形成することができると述べている。今回の著者の一連の実験において用いた培地は **routine** に使用される人工培地とは大きく異なり、象牙質粉末を唯一の基質とした水溶液で、培地としては栄養源に非常に乏しい状態であったために、*C. albicans* はこの基質に適応するような酵素を産生したものと考えられる。

象牙質に直接酵素を作用させる実験は、既に、関野

(1958)⁴⁶⁾によって報告されている。関野はウシまたはウマの象牙質粉末をベロナール buffer (pH 7.5) に浮遊し、直接 protease (trypsin, 放線菌からの protease), hyaluronidase, phosphatase を作用させる実験を行い、象牙質粉末から protease によって著しい含N成分の溶出が見られ、特に放線菌からの protease が強い作用を示すことを報告している。今回の実験では脱灰象牙質が *C. albicans* から得られた酵素によって直接作用を受け、しかも hydroxyproline が上清中に溶出されていることが明らかにされた。

C. albicans は日和見感染症、菌交代症などの起炎菌として重要な一員であると同時に薬剤耐性度が著しく高いために本菌による感染症は、治療困難な場合が多く、近年、大きな問題とされているにも拘らず、その病原性の詳細については明らかでない。歯学領域においても、前述したように本菌は活動性齲蝕のあるグループにおける口腔内からの検出率が高いにも拘らず、本菌と齲蝕との関係は明らかにされていない。

今回の実験は、活動性齲蝕のないグループと比較して、軟化象牙質から高率に *C. albicans* が分離されることから、本菌が proteinase 特に象牙質蛋白の主成分である collagen を分解する酵素を産生し得るのではないかと想定して始められたものであったが、結果は確かに *C. albicans* が脱灰象牙質から hydroxyproline を遊離させ得る酵素を産生していることを証明するものであった。

このことは、*C. albicans* が糖を分解して酸を産生することと考え合わせると、本菌が象牙質から無機質の溶出、即ち、脱灰を行うと同時に象牙質蛋白の主成分である collagen をも分解して自ら増殖すると同時に、齲窩の形成拡大、即ち、象牙質齲蝕に大きく関わっていることを示唆するもので、不明な点が多いとされている象牙質齲蝕解明の一助になり得るものと思われる。

今後、更に、*C. albicans* の collagen 分解酵素について産生の条件、精製、性質について検討すると共に、象牙質齲蝕の解明に努力する予定である。

結 論

C. albicans と象牙質齲蝕との関連性を明らかにする目的で口腔内より *Candida* の検出を試み、更に、ヒト象牙質粉末を基質とした *C. albicans* の増殖と *C. albicans* 由来の酵素による象牙質 collagen の分解について実験を行い、以下の結果を得た。

1. 今回、検査の対象とした口腔内より検出された真

菌は、*C. albicans* 同定因子血清により全て *C. albicans* B. と同定され、検出率は活動性齲蝕のあるグループの齲窩において37.9%と最も高く、次に同グループの歯垢(26.7%)。活動性齲蝕のないグループの歯垢(14.9%)であった。

2. 象牙質粉末を唯一の基質とした液中での1002株の増殖限界は、空気下において 6.0×10^3 CFU/ml で、その増殖率はコントロールの約10倍と低いが、明らかに増殖を示した。また、炭酸ガス環境下にては、増殖限界が 4.5×10^4 CFU/ml、その増殖率はコントロールと比較し約60倍と高かった。

3. 3%EDTAにて脱灰処理した象牙質粉末を唯一の基質とした液中での1002株の増殖限界は空気下において 5.0×10^3 CFU/ml、コントロールに対する増殖率は約10倍、candle 培養した場合には、増殖限界 8.0×10^4 CFU/ml、コントロールに対する増殖率は約100倍で、未処理の象牙質粉末を用いた場合とあまり変らなかった。

4. 1002株は glucose の他7種類の糖を分解し、酸とガスを産生した。arabinose では酸のみを産生し、raffinose, lactose は分解しなかった。

5. 象牙質粉末を唯一の基質とした液に1%に glucose を添加すると、無添加液に比較して、その中で *C. albicans* の増殖率は空気下では、ほとんど変わらないが candle 培養時には約10倍高かった。

6. 象牙質 collagen を基質として1002株を培養した上清から collagen 分解活性を有する酵素が得られた。この酵素は Azocoll を分解し、更に、象牙質 collagen を分解して、その分解産物中には azo 色素の放出や hydroxyproline が証明された。

7. この酵素の至適 pH は4.0、至適温度は45°C であった。

以上の成績は *C. albicans* が象牙質を脱灰すると共に象牙質 collagen を分解利用して増殖できることを示唆するものであり、象牙質齲蝕の解明の一助になり得るものと考ええる。

(本論文の一部は、昭和60年5月24日第39回日本口腔科学総会において発表した。)

謝 辞

稿を終るにのぞみ、本研究の機会を与えて下さり、終始御指導下さった福岡歯科大学口腔細菌学講座・萩原義郷教授ならびに同大学口腔外科学第1講座・富岡徳也教授に心から感謝いたします。また懇切な御指導と御校閲

を賜った九州歯科大学口腔細菌学講座・内山長司教授に
深く感謝いたします。さらに、本研究の遂行に際し、御
教示を頂いた福岡歯科大学口腔細菌学講座・上西秀則助

教授に厚く御礼を申し上げるとともに、終始暖かい御協
力を頂いた研究室各位に感謝いたします。

引用文献

- 1) Orland, F.J., Blayer, J.R., Harrison, R.W., Reyniers, J. A., Trexier, P.C., Wagner, M., Gordon, H.A. and Luckey, T.D.: Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J. Dent. Res.* **33**: 149—174, 1954.
- 2) Fitzgerald, R.J. and Keyes, P.H.: Demonstration of the etiologic role of *Streptococci* in experimental caries in the hamster. *J. Amer. Dent. Assoc.* **61**: 9—31, 1960.
- 3) Edwardsson, S.: Characteristic of caries-inducing human *Streptococci* resembling *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **13**: 637—646, 1968.
- 4) 高添一郎: 細菌学的にみた齲蝕. 日歯医師会誌 **20**: 91—98, 1967.
- 5) 三代幸彦: 齲蝕の起因—砂糖と齲蝕—. 歯学 **58**: 127—144, 1970.
- 6) 須賀昭一: 齲蝕の病理. 歯学 **58**: 145—151, 1970.
- 7) 大西正男: 齲蝕の病原菌. *Streptococcus mutans* とその感染機構. 口病誌 **38**: 217—234, 1971.
- 8) 浜田茂幸・小谷尚三: 齲蝕と細菌 (上). 歯界展望 **41**: 56—62, 1973.
- 9) 浜田茂幸・小谷尚三: 齲蝕と細菌 (下). 歯界展望 **41**: 227—234, 1973.
- 10) 池田 正: 医学歯学微生物学. 齲蝕 (岩田和夫・他編). 医歯薬出版, 東京, 1984, 402—406.
- 11) 林 栄: 口腔内 *Candida* 属の研究. II, 歯科疾患と *Candida*. 口病誌 **25**: 8—13, 1958.
- 12) 田中俊三: 口腔内 *Candida* 属の研究 II, *Candida* の検出率と歯科疾患. 横浜医学 **11**: 1194—1199, 1960.
- 13) Young, G., Resca, H. G. and Sullivan, M.T.: The yeast of the normal mouth and their relation to salivary acidity. *J. Dent. Res.* **30**: 426—430, 1951.
- 14) Krasse, B.: The relationship between *Lactobacilli*, *Candida*, *Streptococci* and dental caries. *Odontology Revy.* **5**: 241—261, 1954.
- 15) Howell, A., Robert, J.R., Stephan, M. and Paul, F.: Prevalence of *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Bacterionema matruchotii* and *Candida albicans* in selected areas of the oral cavity and saliva. *J. Dent. Res.* **41**: 1050—1057, 1962.
- 16) 小林やす子: 酵母様真菌の口腔内分布. 愛院大歯誌 **11**: 142—151, 1973.
- 17) 成田令博・国本法雄: 齲蝕における真菌の存在意義について. 口科誌 **19**: 463—466, 1970.
- 18) 成田令博: 口腔内における真菌の動態とその意義. 口科誌 **20**: 246—251, 1971.
- 19) 武井 盈・鈴木 武・小林やす子: *Candida* と乳酸桿菌の混合培養に関する研究. I, 培養初期にみられる相互関係. 愛院大歯誌 **2**: 109—115, 1965.
- 20) 武井 盈・小林やす子・近藤英三・岩崎庄司: 口腔内微生物の動態に関する基礎的研究. 4, 齲蝕環境のブドウ糖利用菌群. 愛院大歯誌 **5**: 306—311, 1968.
- 21) 武井 盈: 齲蝕と口腔微生物叢. 虫歯のシンポジウム—病因論— (荒谷真平編) 口腔保健協会, 東京, 1978, 17—25.
- 22) 浅香次夫: 口腔内 *Candida* の生態学的研究. 口腔衛生会誌 **21**: 90—104, 1971.
- 23) 萩原義郷・上西秀則・宇佐川志郎・坂田美千代・浜田多美子・山中俊彦・中島幸一・松下亀久: *Candida albicans* の増殖に関する研究. 1. 無機塩水中における *Candida albicans* の増殖. 福歯大誌 **4**: 411—419, 1977.
- 24) 上西秀則・川崎邦夫・福岡隆俊・佐喜間盛雄・萩原義郷: *Candida albicans* の形態におよぼす酸素の影響

- (会). 福歯大誌 7 : 178—179, 1980.
- 25) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265—275, 1951.
 - 26) 武谷健二・小池聖淳・神中 寛・森 良一・天児和暢・野木亀久雄・萩原義郷 : 戸田細菌学 (戸田忠雄・他編), 南山堂, 東京, 1981, 751.
 - 27) 徳永純一 : 戸田細菌学 (戸田忠雄・他編), 南山堂, 東京, 1981, 672—673.
 - 28) Roth, G.D. and Myers, H.I. : Hide powder and collagenlysis by organisms from the oral cavity. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path.* 9 : 1172—1183, 1956.
 - 29) 有加重則 : 膠原に対する口腔内微生物の影響. 口科誌 10 : 117—124, 1961.
 - 30) Moore, G.L. : Use of azo-dye bound collagen to measure reaction velocities of proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 32 : 122—127, 1969.
 - 31) Prockop, D.J. and Udenfriend, S. : A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. *Anal. Biochem.* 1 : 228—239, 1960.
 - 32) 垣内欣二 : コラーゲン構造の化学的基礎, コラーゲン—生化学・生物学・医学 (野田春彦・他編). 南江堂, 東京, 1975, 15—19.
 - 33) 伊藤 隆 : 組織学. 南山堂, 東京, 1979, 58—59.
 - 34) 藤本大三郎 : コラーゲンの分析. コラーゲン実験法 (永井 裕・他編). 講談社, 東京, 1985, 58—59.
 - 35) 堀 久枝・永井裕 : コラゲナーゼと組織破壊, コラーゲン代謝と疾患 (永井 裕・他編). 講談社サイエンティフィック, 東京, 1982, 86—109.
 - 36) 永井 裕・鶴 大典 : 酵素ハンドブック (田宮倍雄・他編). 朝倉書店, 東京, 1982, 570—572.
 - 37) Ronald J. Gibsons and John B. Macdonald : Degradation of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Dent. Res.* 39 : 614—621, 1960.
 - 38) Hausmann E., Courant P.R. and Arnold D.S. : Conditions for the demonstration of collagenolytic activity in *Bacteroides melaninogenicus*. *Arch. Oral Biol.* 12 : 317—319, 1967.
 - 39) 山本綾子 : 口腔内 *Bacteroides melaninogenicus* の collagenase 活性に関する研究. 歯科学報 73 : 1155—1171, 1973.
 - 40) Francis A. Waldvogel and Morton N. Swartz : Collagenolytic activity of bacteria. *J. Bacteriol.* 98 : 662—667, 1969.
 - 41) Mergenhagen S. E. and Scherp H. W. : Lysis of reconstituted collagen and catabolism of products of collagenolysis by the oral microbiota. *Arch. Oral Biol.* 1 : 333—338, 1960.
 - 42) 神田善行 : 二次う蝕象牙質病巣から分離された *Staphylococci* の collagenolytic activity について. 日歯保誌 23 : 8—23, 1980.
 - 43) Guenther S. and Earl Fisher, Jr. : A collagenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta.* 122 : 557—559, 1966.
 - 44) Remold H., Fasold H. and Staib F. : Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 167 : 399—406, 1968.
 - 45) 松田和子・服部道廣・鈴木佳子・佐藤壮彦・小川秀興 : *Candida albicans* の産生する角質溶解性タンパク分解酵素の 2, 3 の生化学的性状について. 日皮会誌 93 : 463—466, 1983.
 - 46) 関野格郎 : 歯牙の構造に関する生化学的研究 (第 1 報) 歯牙粉末に対する諸酵素の作用. 口病誌 25 : 286—292, 1958.