

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19022

研究課題名(和文) 抗生物質に頼らない口腔バイオフィーム制御戦略を用いた新規う蝕予防法の開発

研究課題名(英文) Development of a new caries prevention method using an antibiotic-free oral biofilm control strategy

研究代表者

大墨 竜也 (Ohsumi, Tatsuya)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30759725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：複合バイオフィームモデルを用いて、低濃度抗菌成分によるストレス応答時のバイオフィーム形成動態と、非抗菌剤による付着抑制メカニズムを解析した。バイオフィーム形成過程において、sub-MICのCHX作用によるストレス応答が、抗菌成分による制御法の限界を示唆した。また、非抗菌剤である、機能性糖脂質ビザンチン(Viz-S)は、バイオフィーム構造を不安定にし、*S. mutans*の菌体表層に結合し、表面性状を親水性に変化させた。これら2つの機序により、Viz-Sは、殺菌剤としてではなく、バイオフィームの構造的安定性を低下させることによって剥離促進剤として作用することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌成分に依存し、耐性菌の出現を惹起する、バイオフィーム制御の弊害を克服するべく、抗菌成分に対するストレス応答の検索と、バイオフィームの付着抑制効果を有し、非抗菌剤であるビザンチンの口腔内への臨床応用を目指した、新規制御法の確立に向けた検索を行った。本研究の成果は、現行の細菌を標的とした殺菌剤による成熟バイオフィーム制御から、抗菌成分に非依存的な制御戦略への転換につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Using a composite biofilm model, we analyzed the biofilm formation kinetics during stress response by low-concentration antibacterial components and the mechanism of adhesion suppression by non-antibacterial agents. In the biofilm formation process, the stress response due to the CHG action of sub-MIC suggested the limit of the control method by the antibacterial component. In addition, the non-antibacterial agent Sulfated vizantin (Viz-S) destabilized the biofilm structure, bound to the cell surface of *S. mutans*, and changed the surface texture to hydrophilic. By these two mechanisms, we found that Viz-S acts not as a fungicide but as a peeling accelerator by reducing the structural stability of biofilms.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：バイオフィーム制御 薬剤耐性 口腔バイオフィーム バイオフィーム形成関連遺伝子 sub-MIC ストレス応答

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

口腔バイオフィームは、う蝕と歯周病の二大疾患に深く関与している。口腔バイオフィームの形成過程ごとに制御戦略の開発が展開されている。その形成過程には、浮遊細菌の付着、定着、細菌凝集と粘性ポリマーマトリックスの産生、細菌間情報伝達によるマイクロコロニーの複雑化、バイオフィームの成熟、バイオフィームからの細菌遊離による細菌伝播という段階がある。その中で、とへの対応として、ブラッシングをはじめとする機械的清掃に加え、それらが行き届かない場所へ抗菌成分を含む歯磨剤や洗口液などによる化学的制御が補完的に用いられるようになった。申請者らは、抗菌剤による処理では、バイオフィーム中の細菌を完全に死滅させてもなお、その3次元構造が付着界面に残存すること(竹中彰治他, *Bacterial Adherence & Biofilm*, 2012)や、残存したグルカン等のマトリックスを基にバイオフィームが再形成しやすいことを報告した(Ohsumi T *et al.*, *PLoS One*, 2015)。また、グルコン酸クロルヘキシジン(CHK)を最小発育阻止濃度以下の濃度で作用させたところ、3菌種混合バイオフィームモデル上で、マトリックス量の増加によると推察されるバイオフィームの形成促進が明らかとなった。これまでの機械的除去を偏重する制御戦略が見直され、さまざまな化学的コントロール戦略が開発中であるが、化学的制御には弊害もあることが初めて示された。これに対し、申請者のグループは、非抗菌剤であるピザンチンにバイオフィーム付着抑制効果があることを発見した(Takenaka *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 480:173-179, 2016)。

近年、細菌が放出する外膜小胞が各種物質の“運び屋”としてバイオフィーム形成や薬剤耐性への関与が明らかとなってきている(Turnbull *et al.*, *Nature Communications*, 2016)。また、黄色ブドウ球菌は最小発育阻止濃度以下(sub-MIC)の抗菌剤含有下で培養すると、細胞溶解による細胞外DNAの放出によりバイオフィーム量の増加が見られる(Kaplan *et al.*, *mBio* 3(4): 10.1128/mBio.00198-12)。抗菌成分などによる各種環境ストレスに応答する遺伝子やシグナル伝達物質が大腸菌を始めとする細菌において明らかとなっている(Wang X & Wood TK. *Appl Environ Microbiol*, 2011)。

これらの結果を踏まえると、外膜小胞は、環境ストレスにより、細胞外DNAやシグナル伝達物質などを含み放出され、バイオフィーム形成と成熟に外膜小胞が深く関わっていることが推察される。そこで、抗菌成分のストレス応答によるバイオフィーム形成亢進に、外膜小胞が重要な役割を果たしているのではないかという学術的問いが生まれた。また、非抗菌剤であるピザンチンの付着抑制メカニズムを応用することで、新規制御戦略開発の緒が得られるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、外膜小胞の運び屋としての機能を追求することにより、耐性菌の出現を惹起する抗菌成分に依存したバイオフィーム制御の弊害を克服するべく、非抗菌剤に着目した新規制御法の確立を目指した。本研究では、(1)ストレス応答時の外膜小胞内容物の局在と(2)非抗菌剤による付着抑制メカニズムの解明と2つの課題を設定した。

3. 研究の方法

課題(1)については、Calgary Biofilm Device (CBD)を用いた複合バイオフィームモデルにより外膜小胞の機能解析を計画した。う蝕原性のバイオフィームモデルを基に、申請者が確立し、規格化した複合バイオフィームモデルを用いた。抗菌成分による環境ストレス条件下でバイオフィーム形成動態を解析した。

課題(2)について、本研究では、培養条件のうち、スクロース濃度を変化させたときの *S. mutans* の抗バイオフィーム効果、各種バイオフィーム形成関連遺伝子の転写量ならびにグルコシルトランスフェラーゼ(GTF)の発現について解析を行った。

4. 研究成果

課題(1)について CBD を利用した系での検証により、抗菌成分による環境ストレス条件下では、外膜小胞は微量なため検出困難であることが判明した。一方で、抗菌成分による制御法の限界を示すに十分なデータが、最小発育阻止濃度以下(sub-MIC)のグルコン酸クロルヘキシジン(CHG)作用時におけるバイオフィーム形成動態の分析により得られた。Sub-MICのCHG作用後、生菌数は増加せずバイオフィーム量と *Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成関連遺伝子の転写量が増加した。Sub-MICのCHGは *S. mutans* のバイオフィーム形成関連遺伝子に影響を与えBFを促進することが示唆された(Suzuki *et al.*: *Biofouling*, 2020)。

共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によるバイオフィルムの形態観察より、実験群ではより密なバイオフィルム構造が観察された (図 1)。コロニーカウント法 (CFU) とリアルタイム PCR 法より、生菌数と総菌数は、実験群と対照群では有意な差を認めなかった。また、*S. mutans* のバイオフィルム形成関連遺伝子の転写量は、複合バイオフィルムにおいて実験群で有意に増加した。しかし *S. mutans* の単一バイオフィルムでは実験群での有意な増加は認めなかった (図 2)。実験群では、マトリックスの増量により、バイオフィルム量が増加したと推察された。これは *S. mutans* の単一培養時よりも複数菌混合培養において、sub-MIC の CHG の作用でグルカン産生関連遺伝子の転写量が増加し、グルカンの産生が促進された結果によるものと推察された。

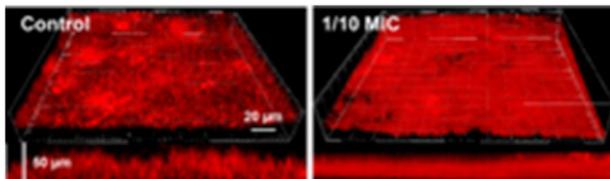


図 1. CLSM による 6 日培養後のバイオフィルムの形態観察。1/10 MIC (実験群) では、より密なバイオフィルム構造が観察された。

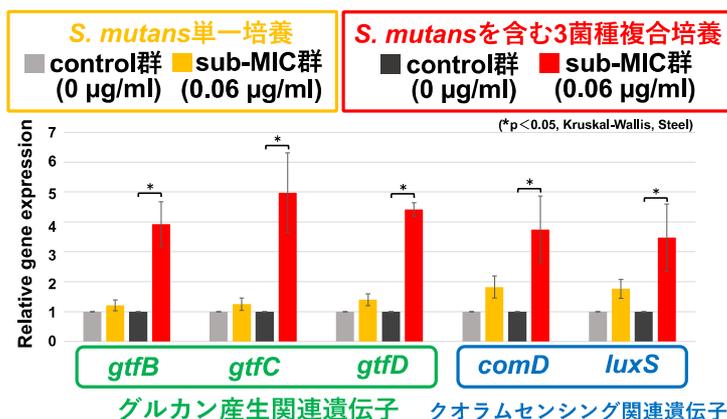


図 2. リアルタイム PCR 法による 6 日培養後の *S. mutans* のバイオフィルム形成関連遺伝子の転写量。 *S. mutans* は複合バイオフィルムにおいて、1/10 MIC (実験群) でバイオフィルム形成関連遺伝子の転写量の有意な増加を認める。

課題 (2) について、非抗菌剤である、機能性糖脂質ビザンチン (Viz-S) の付着抑制メカニズムの検証を行った。細胞抽出物と培養上清は、それぞれ抗 CA-GTF 抗体 (GTFA, GTFB を検出) と抗 CF-GTF 抗体 (GTFD を検出) を使用したウエスタンブロットングによって分析した。Viz-S は、GTFD のタンパク発現を低下させる (図 3) ことによるバイオフィルムの構造安定性の低下と、*S. mutans* の菌体表層に結合する (図 4) ことで表面性状を親水性に変化させることが明らかとなった。これら 2 つの機序により、*S. mutans* に対して付着抑制効果を示すと考えられた。この *in vitro* 研究の制限内で、Viz-S は、殺菌剤としてではなく、バイオフィルムの構造的安定性を低下させることによって剥離促進剤として作用する (図 5) ことを見出した。抗菌成分に依存することなく、さらに、耐性菌を出現させる心配のない、新規う蝕制御法の開発の一端となる可能性がある。

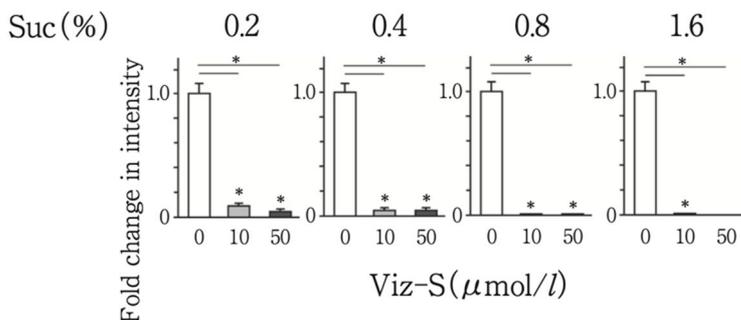


図 3. 抗 CF-GTF (遊離型 GTF) 抗体を使用したウエスタンブロットング解析。GTF のウエスタンブロットングシグナルの強度は、Image Studio Lite ソフトウェアによって定量化した。10 µmol/l Viz-S 群の GTFD の産生量は、すべてのスクロース含有条件で、コントロール群と比較して 1/17 以下に有意に減少した ($p < 0.01$)。50 µmol/l Viz-S 群の GTFD は、1/20 以下に有意に減少していた ($p < 0.01$)。



図 4. 左：位相差画像 右：蛍光画像
 蛍光標識したビザンチン（緑）が *S. mutans* 菌体
 表層に結合している。

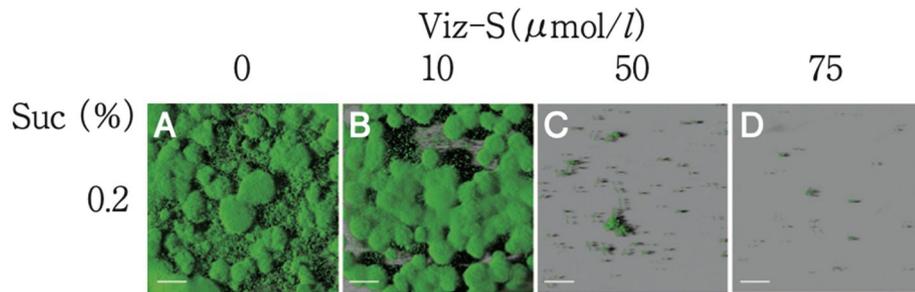


図 5. *S. mutans* バイオフィームは、0, 10, 50, および 75 $\mu\text{mol/l}$ の各濃度で Viz-S を含む 0.2% スクロースを添加した BHI で 24 時間嫌気培養し形成させた。PBS で 2 回洗浄後、残存バイオフィームを SYTO9（緑：生菌）と propidium iodide（赤：死菌）で蛍光染色し、3 次元構築画像を得た（A-D）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suzuki Yuki, Ohsumi Tatsuya, Isono Toshihito, Nagata Ryoko, Hasegawa Taisuke, Takenaka Shoji, Terao Yutaka, Noiri Yuichiro	4. 巻 36
2. 論文標題 Effects of a sub-minimum inhibitory concentration of chlorhexidine gluconate on the development of in vitro multi-species biofilms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biofouling	6. 最初と最後の頁 146 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08927014.2020.1739271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Taisuke, Takenaka Shoji, Ohsumi Tatsuya, Ida Takako, Ohshima Hayato, Terao Yutaka, Naksagoon Traithawit, Maeda Takeyasu, Noiri Yuichiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Effect of a novel glass ionomer cement containing fluoro-zinc-silicate fillers on biofilm formation and dentin ion incorporation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 963 ~ 970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-019-02991-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 竹中 彰治、長谷川 泰輔、小田 真隆、山本 博文、永田 量子、鈴木 裕希、大墨 竜也、野杵 由一郎	4. 巻 63
2. 論文標題 機能性糖脂質ピザンチンによる <i>Streptococcus mutans</i> の付着抑制効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 173 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shikahozon.63.173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Taisuke, Takenaka Shoji, Wakamatsu Rika, Ohsumi Tatsuya, Domon Hisanori, Ohshima Hayato, Terao Yutaka, Noiri Yuichiro	4. 巻 45
2. 論文標題 A Horizontal Sequential Cutting Method to Estimate the Effectiveness of Dentin Disinfection by Using Confocal Laser Scanning Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Endodontics	6. 最初と最後の頁 1142 ~ 1147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joen.2019.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohsumi Tatsuya, Takenaka Shoji, Sakaue Yusuki, Suzuki Yuki, Nagata Ryoko, Hasegawa Taisuke, Ohshima Hayato, Terao Yutaka, Noiri Yuichiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Adjunct use of mouth rinses with a sonic toothbrush accelerates the detachment of a Streptococcus mutans biofilm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-020-01144-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taisuke Hasegawa, Shoji Takenaka, Masataka Oda, Hisanori Doman, Takumi Hiyoshi, Karin Sasagawa, Tatsuya Ohsumi, Naoki Hayashi, Yasuko Okamoto, Hirofumi Yamamoto, Hayato Ohshima, Yutaka Terao, Yuichiro Noiri	4. 巻 20
2. 論文標題 Sulfated vizantin causes detachment of biofilms composed mainly of the genus Streptococcus without affecting bacterial growth and viability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC microbiology	6. 最初と最後の頁 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12866-020-02033-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ryoko Nagata, Tatsuya Ohsumi, Shoji Takenaka, Yuichiro Noiri	4. 巻 10
2. 論文標題 Current prevalence of oral Helicobacter pylori among Japanese adults determined using a nested polymerase chain reaction assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10010010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Traithawit Naksagoon, Tatsuya Ohsumi, Shoji Takenaka, Ryoko Nagata, Taisuke Hasegawa, Takeyasu Maeda, Yuichiro Noiri	4. 巻 36
2. 論文標題 Effect of water aging on the anti-biofilm properties of glass ionomer cement containing fluoro-zinc-silicate fillers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biofouling	6. 最初と最後の頁 1090-1099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08927014.2020.1856371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masataka Oda, Mie Kurosawa, Hirofumi Yamamoto, Hisanori Domon, Shoji Takenaka, Tatsuya Ohsumi, Tomoki Maekawa, Naoto Yamasaki, Yui Furue, Yutaka Terao	4. 巻 64
2. 論文標題 Sulfated vizantin inhibits biofilm maturation by Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 493-501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Suzuki Y, Ohsumi T, Nagata R, Takenaka S, Noiri Y
2. 発表標題 Effects of sub-minimum inhibitory concentration of chlorhexidine gluconate on development of in vitro novel multispecies biofilm
3. 学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naksagoon T, Ohsumi T, Takenaka S, Hasegawa T, Noiri Y
2. 発表標題 Anti-cariogenic Biofilm Effect of Zinc Glass-containing Glass Ionomer Cement After Long-term Water Immersion Using In Vitro MRD Flow Cell Study
3. 学会等名 The 1st General Meeting of ConsAsia 2019, the Asian-Oceanian Federation of Conservative Dentistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川泰輔, 竹中彰治, 小田真隆, 磯野俊仁, Naksagoon Traithawit, 永田量子, 鈴木裕希, 大墨竜也, 野杵由一郎
2. 発表標題 抗バイオフィルム効果を有する結核菌細胞表層糖脂質誘導体ビザンチン(Viz-S)の初期定着菌群に対する付着減弱効果
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会2019年度秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木裕希, 大墨竜也, 磯野俊仁, Naksagoon Traithawit, 永田量子, 長谷川泰輔, 竹中彰治, 野杵由一郎
2. 発表標題 Sub-MICのグルコン酸クロールヘキシジンがin vitro複合バイオフィルムに及ぼす影響
3. 学会等名 第33回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川泰輔, 竹中彰治, 永田量子, 大墨竜也, 野杵由一郎
2. 発表標題 In situデンタルバイオフィルムモデルを用いた歯科修復材料の抗バイオフィルム効果の検討
3. 学会等名 第34回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naksagoon Traithawit, 大墨竜也, 永田量子, 長谷川泰輔, 竹中彰治, 野杵由一郎
2. 発表標題 フルオロジंकシリケートガラス配合グラスアイオノマーセメントの長期水浸後の抗う蝕原性バイオフィルム効果
3. 学会等名 152回日本歯科保存学会2020年度春季学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹中彰治, 長谷川泰輔, Naksagoon Traithawit, 永田量子, 大墨竜也, 野杵由一郎
2. 発表標題 機能性糖脂質ピザンチンのStreptococcus mutansに対する抗バイオフィルム作用の機序の解明
3. 学会等名 152回日本歯科保存学会2020年度春季学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------