

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19023

研究課題名(和文) 口腔細菌の各種抗菌成分に対する耐性化の網羅的検索

研究課題名(英文) Comprehensive research of oral bacterial adaptation to antimicrobial agents

研究代表者

廣瀬 奈々子 (HIROSE, NANAKO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10780819

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)：本研究では、*S. mutans*および*E. faecalis*を対象とし、クロルヘキシジン、塩化セチルピリジニウム、ホウ酸イオン、およびフッ素イオンの抗菌成分に対する耐性獲得の有無について検討を行った。その結果、*E. faecalis*はクロルヘキシジンへの連続暴露により耐性を獲得することが明らかとなった。さらに、*E. faecalis*のクロルヘキシジン耐性株では、DNA転写や細胞のストレス応答に関連する遺伝子の発現上昇、およびtRNAのアミノアシル化に関連する遺伝子の発現低下が認められ、それらの遺伝子発現の変化がクロルヘキシジンに対する耐性獲得に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新たな薬剤耐性菌の出現とその拡大が大きな問題となっているが、歯科領域で使用される抗菌成分に対する口腔細菌の薬剤耐性獲得に関しては、十分に検討されているとは言えないのが現状である。本研究では、クロルヘキシジンに連続暴露することで*E. faecalis*が耐性を獲得することが示されたが、*E. faecalis*の他の菌株や他菌種を対象としてクロルヘキシジンに対する耐性獲得の有無に関する更なる検証が必要であると考えている。これらの研究を通じて、口腔細菌の耐性獲得やそのメカニズムを解明することができれば、耐性菌克服の切り札となり得る新たな歯科用薬剤の開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the possibility of evolution of resistance to chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, borate and fluoride ions in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* was assessed. The result indicated that repeated exposure to chlorhexidine led to resistance of *E. faecalis*. In CHX-adapted *E. faecalis*, the gene expressions related to DNA transcription and cellular stress response were upregulated, whereas those related to synthesis of aminoacyl tRNA were downregulated. It is likely that these changes of gene expressions are related to the acquisition of resistance to chlorhexidine in *E. faecalis*.

研究分野：歯学

キーワード：薬剤耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、新たな薬剤耐性菌の出現とその拡大が医療上の大きな問題となっており、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌や多剤耐性緑膿菌など、医科領域では抗生剤の連続使用による薬剤耐性獲得に関する研究が数多く報告されている。これらの医科領域における主要な細菌種については、遺伝子解析を利用した薬剤耐性獲得機構の主因の解明が行われ、報告がなされている一方、歯科領域で使用される抗菌成分に対する口腔細菌の薬剤耐性獲得に関する検討が十分になされていないのが現状である。

現在我が国では、う蝕予防や歯周病予防のための洗口剤や歯磨剤等にクロルヘキシジンや塩化セチルピリジニウムが頻用されている。また、抗菌性・抗プラーク性の付与を目的として、抗菌性を示すイオンを徐放するフィラーを配合した修復材料が市販され、その使用頻度が年々増加しつつある。これらの薬剤や材料を長期間使用することを推奨する上で、配合されている各種抗菌成分に対する口腔細菌の耐性獲得に関する検討は必要不可欠なものであり、耐性獲得を示す細菌についてはその機構を詳細に解明し、口腔内での新たな薬剤耐性菌の出現を事前に予防する対策の構築が重要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、う蝕関連細菌である *Streptococcus mutans*、および感染根管関連細菌である *Enterococcus faecalis* を対象とし、グルコン酸クロルヘキシジン、塩化セチルピリジニウム、ホウ酸イオン、およびフッ素イオンの 4 種の抗菌成分に対する耐性獲得の有無について検討を行った。さらに、耐性獲得を示す口腔細菌については、対象となる細菌の遺伝子発現の変化を解析することで、その耐性獲得機構を検討した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定による各種口腔細菌の耐性獲得の評価

*S. mutans*、*E. faecalis* の各菌液を  $2 \times 10^7$  CFU/mL に調整し、クロルヘキシジン、塩化セチルピリジニウム、ホウ酸イオンおよびフッ素イオンの 4 種の各成分の MIC 値を micro dilution assay にて測定した。

続いて、MIC 判定時に増殖が認められたもののうち、最大濃度の抗菌成分を含む細菌懸濁液を用いて  $2 \times 10^7$  CFU/mL の菌液を再度調整し、MIC 測定を 10 回繰り返し行った。

本実験において耐性獲得を示した口腔細菌を対象に、5 回目 (P5) と 10 回目 (P10) の MIC 測定時に増殖が認められた最大濃度の各抗菌成分を含む菌懸濁液を保存用バイアルにストックした。

#### 2) 耐性獲得機構の検討

1) で耐性獲得を示した細菌の P10 の細菌懸濁液から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、野生株と比較して耐性株にどのような遺伝子発現の変化が生じているかについて網羅的な解析を行った。また、有意な発現変動を認めた遺伝子を抽出し、Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) MIC 測定による各種口腔細菌の耐性獲得の評価

クロルヘキシジンに 10 回連続暴露後の *E. faecalis* のクロルヘキシジンに対する MIC 値は、1 回目に比べて約 4 倍増加した。また、*E. faecalis* は、フッ素イオンに対しても MIC 値の上昇傾向が認められた。一方、*S. mutans* に関しては、いずれの抗菌成分に連続暴露しても、MIC 値の変化は認められなかった。

#### 2) 口腔細菌の耐性獲得メカニズムの解明

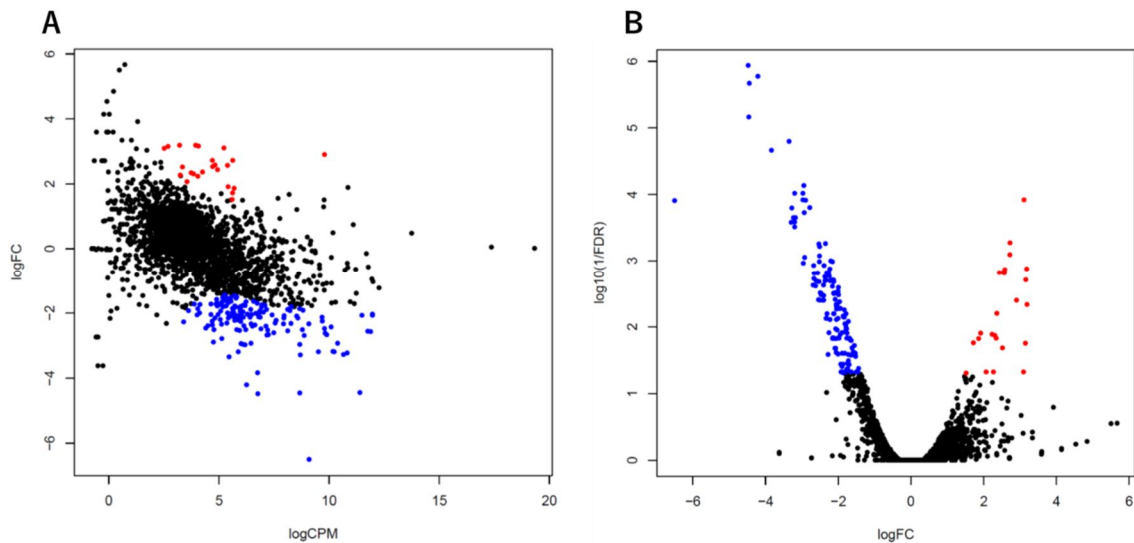
実験 1) より、10 回連続暴露により約 4 倍の MIC 値の上昇が認められた *E. faecalis* のクロルヘキシジン耐性株 (P10) 遺伝子発現を野生株と比較した。

##### 2-1a) 遺伝子発現解析

次世代シーケンサーを用いて得られた結果に対し、ソフトウェア EdgeR<sup>1,2)</sup> を用いてクロルヘキシジン耐性株と野生株間における遺伝子発現の統計解析を行い、発現変動遺伝子を抽出したところ、クロルヘキシジン耐性株では野生株と比較して 25 の遺伝子の発現が上昇し、151 の遺伝子の発現が低下していることが分かった。なお、野生株に対して 2 倍以上発現量が変化し、かつ  $p$  値が 0.05 以下となる遺伝子を発現変動遺伝子と定義した。

##### 2-1b) 統計結果の可視化

各遺伝子の発現量と発現変動比を俯瞰する MA プロット (A) および各遺伝子の発現変動比と統計値を俯瞰する Volcano プロット (B) を示し、統計結果を可視化した。クロルヘキシジン耐性株において、野生株に比べて発現が 2 倍以上上昇し、かつ  $p$  値が 0.05 以下となる遺伝子を赤色、野生株に比べて発現が 0.5 倍以下、かつ  $p$  値が 0.05 以下となる遺伝子を青色で示す。



A: MA プロット

FC: クロルヘキシジン耐性株の野生株に対する発現変化量

CPM: 野生株の各遺伝子について 100 万リードあたりのマップされたリード数

B: Volcano プロット

FDR: 多重補正済みの統計値

FC: クロルヘキシジン耐性株の野生株に対する発現変化量

2-2) GO エンリッチメント解析

2-1) において抽出された発現変動遺伝子の特徴を推定するため、それぞれ上昇遺伝子群・減少遺伝子群に分け、GO エンリッチメント解析を行ったところ、DNA の転写頻度や割合、範囲の減少に関連する遺伝子、およびリン酸塩の不足に対する細胞のストレス応答に関連する遺伝子の発現上昇が認められた。一方、翻訳の過程における non-coding RNA (ncRNA) 特に tRNA のアミノアシル化に関連する遺伝子の発現低下が認められた。

以上より、*E. faecalis* は、クロルヘキシジンおよびフッ素イオンに連続暴露すると感受性が低下し、順応を示すことが明らかとなった。一方、*S. mutans* は、いずれの抗菌成分に対しても、連続暴露による感受性の変化が認められなかった。また、耐性獲得を示した *E. faecalis* のクロルヘキシジン耐性株では、DNA の転写阻害に関連する遺伝子およびリン酸塩不足に対する細胞のストレス応答に関連する遺伝子の発現上昇、および tRNA のアミノアシル化に関連する遺伝子の発現低下が認められ、それらが *E. faecalis* のクロルヘキシジンに対する耐性獲得に關与している可能性が示された。

参考文献

1. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140 (2010).
2. McCarthy, D. J., Chen, Y. & Smyth, G. K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* 40, 4288–4297 (2012).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Thongthai Pasiree, Kitagawa Haruaki, Kitagawa Ranna, Hirose Nanako, Noree Susita, Iwasaki Yasuhiko, Imazato Satoshi	4. 巻 108
2. 論文標題 Development of novel surface coating composed of MDPB and MPC with dual functionality of antibacterial activity and protein repellency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 3241 ~ 3249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34661	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 Suzaki Naoko, Yamaguchi Satoshi, Hirose Nanako, Tanaka Ryouyuke, Takahashi Yusuke, Imazato Satoshi, Hayashi Mikako	4. 巻 36
2. 論文標題 Evaluation of physical properties of fiber-reinforced composite resin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 987 ~ 996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dental.2020.04.012	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hirose Nanako, Kitagawa Ranna, Kitagawa Haruaki, Pasiree Thongthai, Hayashi Mikako, Haapasalo Markus, Imazato Satoshi.
2. 発表標題 Influence of a MDPB-containing disinfectant on bonding of universal adhesives
3. 学会等名 2019 IADR General Session (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ranna Kitagawa, Haruaki Kitagawa, Nanako Hirose, Ririko Tsuboi, Tomoki Kohno, Mikako Hayashi, Satoshi Imazato.
2. 発表標題 Antibacterial effects and bonding abilities of chlorhexidine-containing self-adhesive resin cement
3. 学会等名 4th meeting of the IADR APR (Asia Pacific Region) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------