

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18485

研究課題名（和文）菌液上清による口腔バイオフィルムの分散・抑制

研究課題名（英文）Oral biofilm inhibition or dispersal by bacterial supernatant

研究代表者

山崎 亮太（Yamasaki, Ryota）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70841998

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）：う蝕や歯周病などの口腔疾患は誰しもが起こり得る疾患である。これらの口腔疾患は時として命にかかわる重篤な全身疾患を引き起こすことが近年で重要視されている。本研究では、細菌が分泌する物質に有効な成分がないかを探索し、口腔ケアの新たな薬剤開発へつなげることを目的とする。緑膿菌や枯草菌はそれぞれ特有のバイオサーファクタントを分泌しており、これらが口腔病原細菌に対して高い抗菌効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔病原細菌が引き起こす全身疾患に感染性心内膜炎や誤嚥性肺炎がある。これらは特に高齢者に多く、超高齢化社会を迎える我が国では軽視できない問題となっている。身体面や精神面の問題で十分な口腔ケアが行えず、口腔環境が悪化し口腔疾患や全身疾患を招いている。ゆえに簡便にかつ安全に口腔ケアが行える薬剤の開発が求められており、本研究はそれらをターゲットとした重要な意義を担っている。

研究成果の概要（英文）：Oral diseases such as dental caries and periodontal disease can affect anyone. These oral diseases have recently been recognized to cause serious and sometimes life-threatening systemic diseases. The purpose of this study is to search for effective components in substances secreted by bacteria, and to develop new oral care agents. *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* each secrete unique biosurfactants, which have been shown to exhibit high antibacterial activity against oral pathogenic bacteria.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：口腔疾患 口腔ケア 口腔病原細菌 バイオフィルム バイオサーファクタント

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

歯周病は、口腔内の細菌感染による歯周組織局所における炎症を主症状とする多因子性疾患であり、成人の約 8 割弱が罹患していると考えられている。また近年、歯周病が全身疾患の原因となっていることが明らかになり、臨床的大きな問題となっている。口腔細菌は、歯周ポケットや歯面でバイオフィルムを形成し、これが歯周病や齲蝕を惹起する。更に、歯周炎局所のプラーク中の細菌、特に歯周病原性細菌が血中に侵入し、菌血症を起こす[Roda et al., 2008]ことで、動脈硬化症[Sharma et al., 2016]、低体重児や早産[Davenport et al., 2010]、糖尿病[McBain et al., 2014]等の種々の全身疾患と関連する可能性が報告されている。我が国の肺炎による死亡者の 90%以上が高齢者であり、これらの多くが口腔細菌の誤嚥による「誤嚥性肺炎」であることが厚生労働省により報告され、高齢者医療の領域で喫緊の課題となっている。このようなヒト難治性細菌感染症の 80%以上にバイオフィルム形成細菌が関与していると言われている[Ishihara, 2006]。ゆえに歯周病原性細菌が形成するバイオフィルムの除去は、口腔疾患だけではなく全身疾患の予防に繋がる。しかし、ブラッシングによる口腔ケアは成人健常者でも十分であるとは言えず、幼児や高齢者、更には義歯装着者や歯列矯正を行っている人は特に口腔ケアが不十分であることが多い。口腔バイオフィルムを除去するためには物理的な機械的除去が基本ではあるが、そこに個人差は大きく生じてしまう。抗菌薬や消毒薬は浮遊細菌(液体に浮遊している状態の細菌)には効果があっても、バイオフィルムを形成した細菌には内部まで浸透せず、十分な効果を発揮できないことに加え、耐性菌の出現リスクが懸念される。よって簡便でより効果的な口腔ケア、すなわち口腔バイオフィルムを除去する方法が求められている。

2. 研究の目的

歯周病は慢性的に進行し、しばしば治療に抵抗性を示すが、その原因として、物理的・化学的障壁としてのバイオフィルム、そして個々の歯周病原性細菌が有する歯周組織局所での生体の免疫反応からの多種多様なエスケープ機構があり、それらにフォーカスした研究が展開されてきた。本申請研究では、重篤な感染症を惹起し、かつ、完全な除去が困難な口腔バイオフィルムを効果的に除去する方法を開発し、新規薬剤としての応用を目的とする。

本研究では、口腔細菌が形成する口腔バイオフィルムを効率よく簡便に除去または防ぐ方法を開発するために、さまざまな菌種の“培養液の上清”に着目した。細菌は各々、多種多様な代謝産物を菌体外に分泌している。その分泌物が有効に利用されている例として、乳酸菌が人の腸に作用するバイオジェニクスがある[Uenishi, 2013]。さらに分泌物中の菌体外多糖(EPS)やリポタイコ酸(LTA)などによる免疫調節作用が見出されている[Lee et al., 2012]。また、緑膿菌や枯草菌が代謝活性によって分泌するバイオサーファクタントは両親媒性の界面活性剤で、水処理上の賦活化剤としてや石油の三次回収用としての利用が期待されている[Geetha, 2018]。バイオフィルムに対しての菌液上清の効果も報告されており、近年、緑膿菌の菌液上清が硫酸還元菌のバイオフィルムを効率的に分散除去できることが Nature グループ誌で報告された[Wood et al., 2018]。しかし未だ、口腔細菌が形成するバイオフィルムに対して菌液上清の効果を検証した報告はない。上述したように菌液の上清に含有されている様々な成分中には、口腔バイオフィルムに対して有効な物質が含まれている可能性が非常に高い。よって本申請研究では、口腔バイオフィルムに対して除去効果の高い菌液上清の発見、そしてその上清中で最も効果を示し、人体への害が極めて低い物質を特定することで、ブラッシングによる十分な口腔ケアが困難な高齢者や幼児、また、ブラッシングでの除去が困難な歯周ポケットや歯間部のバイオフィルムでも簡便に除去可能な薬剤開発を目指す。また、同研究は口腔内のみならず、カテーテルやペースメーカー、人工関節などバイオフィルム感染が問題となる医療用デバイスに対しても応用可能な汎用性の高い創薬に繋がる。

3. 研究の方法

(1) 種々の(緑膿菌や枯草菌、乳酸菌など)菌液上清による口腔内の病原性細菌バイオフィルムに対して分散除去や形成抑制効果の検討。

限局性侵襲性歯周炎の原因とされている *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* や齲蝕の原因とされている *Streptococcus mutans*、感染性心内膜炎の発症との関連が示唆されている *Streptococcus sanguinis* などによって形成される口腔バイオフィルムにさまざまな菌種の菌液上清を添加するだけで効率よく簡便に分散または抑制できるかを検証する。上清に用いる菌種としては、*Escherichia coli*(大腸菌)、*Pseudomonas aeruginosa*(緑膿菌)、*Bacillus subtilis*(枯草菌)、*Lactobacillus casei*(乳酸菌)など代謝産物に有用性が報告されているものを中心に検討を行っていく。実験方法は、プレート上に口腔細菌のバイオフィルムを形成させ、そこに分散・抑制に用いる菌液上清を添加し、除去を確認する。または、口腔細菌と分散・抑制に用いる菌液上清を混合させて培養することで、バイオフィルム形成の抑制も検証する。バイオフィルムの確認は染色法にて行い、形成状態の可視化や膜厚測定には共焦点顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用いる。

(2) 効果を示した上清中のどの含有物質がバイオフィーム除去に効果的なのかを特定する。細菌が分泌するバイオサーファクタントなど、バイオフィーム形成に関与する可能性のある物質に焦点を当て、その効果を検証する。

4. 研究成果

緑膿菌と枯草菌の菌液上清は口腔病原細菌のバイオフィーム形成を抑制する。

S. mutans UA159, *S. sanguinis* ATCC10556, *A. actinomycetemcomitans* Y4 に対して、緑膿菌 (*P. aeruginosa* PA14, *P. aeruginosa* PA01) と枯草菌 (*B. subtilis* ATCC6633) のバイオフィーム抑制効果を検証した。50%の菌液上清を混合した BHI 培地でバイオフィームの形成を行った結果、すべての菌種と菌液上清で 60~95%のバイオフィーム形成抑制が確認された。

ラムノリピッドとサーファクチンは、細菌の増殖に対して阻害効果を示す。

初めに、ラムノリピッドとサーファクチンによる口腔病原細菌の増殖抑制効果を検証した。結果は、ラムノリピッドが 1.59×10^{-3} w/v% を超える濃度で、*S. mutans* UA159 および *S. sanguinis* ATCC10556 の増殖を有意に阻害し、3.25 w/v%の濃度で *A. actinomycetemcomitans* Y4 の増殖を完全に阻害した。サーファクチンは *S. sanguinis* ATCC10556 に対して最も高い阻害効果を示したが (1.26×10^{-3} w/v%以上) *A. actinomycetemcomitans* Y4 および *S. mutans* UA159 に対しては効果が観察されなかった。さらに、高濃度のサーファクチンは、*A. actinomycetemcomitans* Y4 および *S. mutans* UA159 の増殖を阻害するのではなく促進する結果となった。

バイオサーファクタントは、バイオフィーム形成に対して抑制効果を示す。

ラムノリピッドは 3.17×10^{-3} w/v%以上で、*A. actinomycetemcomitans* Y4 バイオフィーム形成に対して阻害効果を示し、0.013 w/v% で 93% 阻害された。興味深いことに、*A. actinomycetemcomitans* Y4 の増殖は、ラムノリピッド濃度 0.81 w/v%以下では阻害されなかったが、バイオフィーム形成は 0.81 w/v%から 3.17×10^{-3} w/v%で阻害された。したがって、低濃度のラムノリピッドは、細菌の増殖に影響を与えることなく、バイオフィーム形成を阻害する。*S. mutans* UA159 に対しては、 6.35×10^{-3} w/v%の濃度のラムノリピッドはバイオフィーム形成を阻害し、0.1 w/v%でほぼ完全に阻害した。また、*S. sanguinis* ATCC10556 では、ラムノリピッドは 6.35×10^{-3} w/v%の濃度でバイオフィーム形成を完全に阻害した。一方でサーファクチンは、10.36 w/v%で *A. actinomycetemcomitans* Y4 バイオフィーム形成の約 90%を阻害した。しかし、 2.53×10^{-3} w/v%から 2.59 w/v%の濃度では *A. actinomycetemcomitans* のバイオフィーム形成を促進した。*S. mutans* UA159 をサーファクチンで処理すると、バイオフィームの形成が促進され、どの濃度でも阻害効果は観察されなかった。*S. sanguinis* ATCC10556 バイオフィームに対しては、サーファクチンの濃度が 2.53×10^{-3} w/v%を超えると、形成がほぼ完全に阻害された。

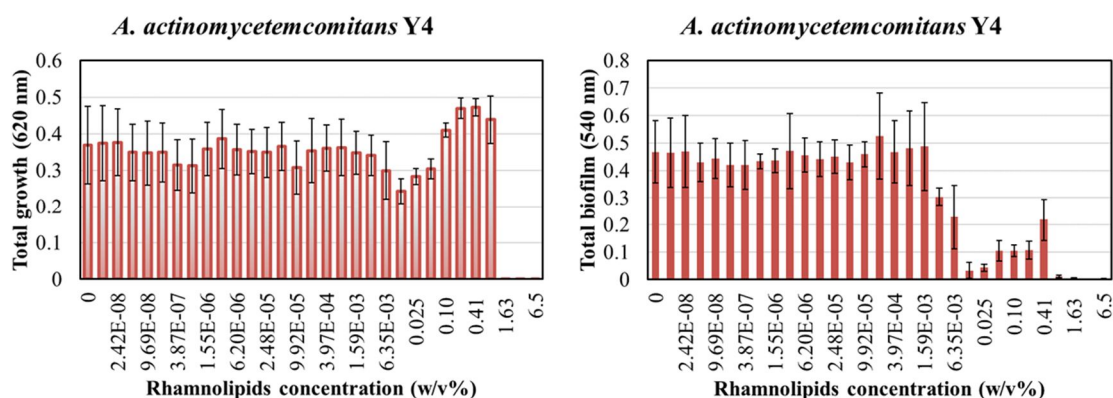


図. *A. actinomycetemcomitans* Y4 に対するラムノリピッドの増殖抑制 (左) とバイオフィーム形成抑制 (右) 効果

この研究にはいくつかの制限がある。第一に、バイオサーファクタントによる成長とバイオフィーム形成の阻害のメカニズムは解明されていない。*A. actinomycetemcomitans* Y4 に対するラムノリピッドの阻害活性を示唆したが、バイオフィーム形成の付着または成熟など、どの過程で抑制されているか不明なままである。この制限を克服するために、バイオフィーム関連遺伝子の変異体を使用して、バイオフィーム阻害のメカニズムを調査する必要がある。さらに、クオラムセンシングシステムはバイオフィーム形成と密接に関連しているため、クオラムセンシング分子とバイオサーファクタントの関係を推測することができる。第二に、口腔は複雑な環境であり、浮遊性細胞として、またはバイオフィームに組み込まれた多種多様な細菌種で構成されている。本研究では、齧蝕原性および歯周病性細菌の単一株に対するバイオサーファクタントの効果を実証した。この領域に存在する細菌叢の複合効果を検証するために、口腔に近い環境で実験を行う

ことも重要である。安全性プロファイルを検証するには、臨床試験を含む、口腔内でのバイオセーフファクタントの使用に関連するリスクに関する詳細な分析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Nakamura Yohei, Okita Kaede, Kudo Daisuke, Phuong Dao Nguyen Duy, Iwamoto Yoshihito, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru, Yamasaki Ryota	4. 巻 11
2. 論文標題 Magnesium Hydroxide Nanoparticles Kill Exponentially Growing and Persister Escherichia coli Cells by Causing Physical Damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1584 ~ 1584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano11061584	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 Okita Kaede, Yamasaki Ryota, Nakamura Yohei, Sakakura Tatsuya, Kawano Aki, Takatsuji Yoshiyuki, Haruyama Tetsuya, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru	4. 巻 113
2. 論文標題 Quick and environmentally friendly sterilization process of dental instruments by radical vapor reactor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Process Biochemistry	6. 最初と最後の頁 22 ~ 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.procbio.2021.12.014	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 Yamasaki Ryota, Kawano Aki, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru	4. 巻 20
2. 論文標題 Rhamnolipids and surfactin inhibit the growth or formation of oral bacterial biofilm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12866-020-02034-9	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 Kawano Aki, Yamasaki Ryota, Sakakura Tatsuya, Takatsuji Yoshiyuki, Haruyama Tetsuya, Yoshioka Yoshie, Ariyoshi Wataru	4. 巻 10
2. 論文標題 Reactive Oxygen Species Penetrate Persister Cell Membranes of Escherichia coli for Effective Cell Killing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.00496	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryota Yamasaki, Yohei Nakamura, Kaede Okita, Daisuke Kudo, Dao Nguyen Duy Phuong, Yoshihito Iwamoto, Yoshie Yoshioka, Wataru Ariyoshi
2. 発表標題 Magnesium hydroxide nanoparticles kill Escherichia coli exponential or persister cells physically
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kaede Okita, Yohei Nakamura, Ryota Yamasaki, Tatsuya Sakakura, Aki Kawano, Yoshiyuki Takatsuji, Tetsuya Haruyama, Yoshie Yoshioka, Wataru Ariyoshi
2. 発表標題 Short-time sterilization of the dental instruments by radical vapor reactor
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 亮太
2. 発表標題 メタン微生物燃料電池の開発と高効率化
3. 学会等名 電気化学会トークショー in九州 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 鷹平, 山崎 亮太, 有吉 渉, 吉岡 香絵
2. 発表標題 過酸化水素処理によって生じる <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> persiterの形成メカニズムとその排除
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀 絢雅, 吉岡 香絵, 山崎 亮太, 藤井 航, 有吉 渉
2. 発表標題 -glucan による破骨細胞における NFATc1 の発現抑制の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会
4. 発表年 2021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