

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592499

研究課題名（和文） 生体材料表面のバイオフィルムを構成する多糖ゲルの物性とクオラムセンシングの抑制

研究課題名（英文） Properties of polysaccharide gel as a component of biofilms on the biomaterial surfaces related to the suppression of quorum sensing

研究代表者

根津 尚史 (NEZU TAKASHI)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：40264056

研究成果の概要（和文）：バイオフィルム成分のヒアルロン酸ゲルの物性究明から、クオラムセンシングの抑制につながる物理化学的条件を見出すことを目的とした研究で、ヒアルロン酸ゲルの粘性を低下させることにより抗菌物質の拡散を促進することができた。粘性低下には塩基性の抗菌性界面活性剤が特に有効であることが示された。オートインデューサーの拡散阻害によるクオラムセンシングの攪乱を利用した感染防止に利用できる成果と考える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the properties of hyaluronic acid gel, which is an important component of biofilms, in order to find any physicochemical conditions leading to the suppression of the quorum sensing. An antimicrobial permeated more effectively through the hyaluronic acid gel when the gel viscosity was lowered. Addition of basic (cationic) antimicrobial surfactants was especially effective to lower the gel viscosity. Those findings would lead to the tactical inhibition of infection using a disturbance of the quorum sensing by interrupting the diffusion of autoinducers through the biofilm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：生体材料、バイオフィルム、微生物、情報伝達、高分子構造・物性

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科生体材料表面とバイオフィーム

口腔内で間断なく唾液と接触する歯質、歯冠修復材料、義歯床等の表面では、唾液や飲食物の成分の吸着や、口腔内微生物の付着によりバイオフィームが形成される。バイオフィームが成長すると菌集団は齶蝕や歯周病などの口腔疾患を進行させ、高齢者や免疫不全の患者のように宿主の免疫力が低下している場合には日和見感染の危険性も高まる(バイオフィーム感染症)。

(2) クオラムセンシング

バイオフィーム中で一部の細菌は自身の周囲に生息する「仲間」の数を探る能力を持っており、一定数(「定足数」、quorum)に達したことを感知すると大集団で有害性を発現し、宿主の防御系を突破して活動を展開すると説明される。この機構をクオラムセンシング(quorum sensing)という。周囲の菌数を把握する「コミュニケーション」手段は、菌が産生・分泌するオートインデューサーと呼ばれる化学物質の濃度である。菌の生息密度が高くなると細胞外のオートインデューサー濃度が高くなり、細胞内からの拡散が制限される。その結果、細胞内濃度も上昇し、これが閾値を越えると特定の病因物質産生が菌集団で一斉に起こり、宿主に害を加えることになる。クオラムセンシングによる生体情報伝達概念は新しい(Fuqua et al., *J Bacteriol*, **176**, 269-275, 1994)が、関連論文の発表数がこの1~2年で急増していることから(図1)、現在非常に注目度が上昇している研究対象といえる。

(3) 情報伝達経路としての多糖ゲルの物性究明

クオラムセンシングでは、菌体外多糖マトリックス中でのオートインデューサーの濃度変化およびこれをもたらす拡散挙動が重要である。これにはオートインデューサー自身の性質だけでなく、情報伝達の経路である多糖ゲルの物性(粘弾性、物質透過性)も大きく関与していると考えられる。従って、伝達物質自身の研究はもちろん、情報伝達環境である多糖マトリックスのゲル物性究明

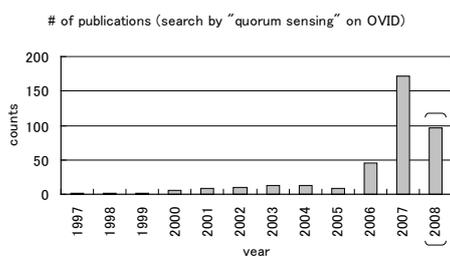


図1 クオラムセンシングに関連する学術論文数の推移

にも注力されるべきである。筆者は、本課題の申請時点で、歯科材料に関連した材質の固体表面に吸着した生体高分子(ゲル状態)の膨潤/収縮を、水晶発振子マイクロバランス(QCM)法により解明する研究を遂行しており(Nezu et al., *Dent Mater J* **27**, 573-580, 2008)、この手法は本課題にも利用でき、ゲル状態にある多糖吸着層の粘弾性の解明が見込まれた。

2. 研究の目的

真にクオラムセンシングの抑制要因を突き止めるためには、実際に微生物が形成するバイオフィームを用いた実験が必須であるが、本研究はその初段階に位置づけた。本研究期間内の当初計画としては、バイオフィームを構成している多糖のモデル物質として、キャラクター化の確立が進んでいるヒアルロン酸(微生物由来;以下 HyA と略す)を用い、以下の2点に絞った基礎的研究を遂行することとした。

- 1) HyA の吸着特性の解明: バイオフィームを形成しやすい固体(=歯科材料)表面および状態の検索
- 2) HyA ゲルの粘弾性、物質透過性の解明: 温度、pH、歯磨材や洗口剤に含まれる活性剤や極性有機溶媒の影響の評価(透過性評価実験には新規合成のプローブを使用)

バイオフィームを構成する多糖ゲルの物性究明から、クオラムセンシングの抑制につながる物理化学的条件を見出すことを、本研究期間内の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 固体表面の HyA 吸着層の粘弾性

本研究では市販 HyA を用いたが、微生物由来であることからバイオフィームを構成する多糖に非常に近いものとして扱うことにした。

① HyA の吸着条件の精査

吸着量と吸着物質の粘弾性を分析できるエネルギー消散測定型水晶発振子マイクロバランス(QCM-D)を用いて、典型的な歯科材料(アパタイト、チタン等)と同等の表面を持つ水晶発振子センサー(既製)への HyA の吸着挙動を、

- ・吸着過程に及ぼす、表面処理方法、温度、pH、共存する添加物の影響
- ・吸着層の粘弾性に及ぼす、温度変化、pH 変化、添加物の影響

の観点から調べた(この測定で得られる情報は、主として吸着量を反映する発振子センサーの周波数 f と、吸着層の「やわらかさ」を反映するエネルギー消散 D)。添加物としては、歯磨材や洗口剤に含まれる抗菌性界面活性剤などを選択した。

②HyA 吸着層の粘弾性解析

QCM-D で得られた周波数変化および消散変化のデータから粘弾性解析を行った。動的弾性率、動的粘性率、吸着層厚さのパラメトリック解析には、装置付属のソフトウェア (QTools) を用いた。

(2)HyA 粘稠溶液 (準ゲル) の粘度に及ぼす条件の検討

上記(1)①で測定対象とした固体表面上の HyA 吸着層は、非常に粘性の高い、ゲルに近い状態 (準ゲル; 以下、単にゲルと呼ぶ) として扱った。pH、溶媒、添加物等の条件によりゾル/ゲル変化温度 (粘性の温度依存性) が影響を受けると予想されたが、温度を変えながらの QCM-D 測定は装置の機構の制約から事実上不可能である。そこで、HyA 溶液 (バルク) について、粘性とその温度依存性を別途測定し、これらに pH、溶媒、添加物が及ぼす影響を調べた。測定には音叉型振動式粘度計を用いた。測定はプログラブル恒温槽を用いて、様々な温度変化パターンの下で行った。

(3)HyA ゲル中のオートインデューサー様蛍光色素、色素型抗菌物質の拡散

実際のオートインデューサーの作用濃度は極めて低いことを考慮し、低濃度での拡散が高感度に検出できる蛍光性プローブで標識したオートインデューサー類似化合物の新規合成 (図 2) と、上記(2)に基づき種々の粘性状態に調整した HyA ゲル中の拡散の蛍光モニター ($\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}/\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$) を試みた。

また、アクリフラビンなど可視部に強い吸収を持つ色素型抗菌物質についても、HyA ゲル中の拡散を、UV モニターにより計測した。

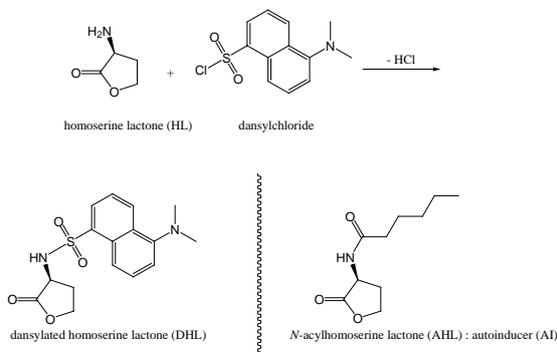


図 2 オートインデューサー様蛍光性化合物の合成

4. 研究成果

(1)HyA の固体表面への吸着と吸着層の粘弾性

Au、Ti(TiO₂)、アパタイト (以下 HAP) 各表面のセンサーを用いた QCM-D 測定の結果、中性 pH 付近では HyA はこれらの表面に直接は結合しにくかった。一方、TiO₂、HAP について、予めコラーゲン吸着層を形成させると (一次吸着)、HyA の吸着が認められた (二次吸着; 図 3)。吸着に伴うセンサー振動数の低下 Δf から、TiO₂ で吸着が顕著であった (約 5 倍)。TiO₂/コラーゲン表面では、HyA の吸着は即時平衡に到達したが、HAP/コラーゲン表面では数分から数十分の緩和を経て吸着平衡に達した。これらのことから、HyA の吸着には、固体表面の材質・荷電状態のほか、他の物質 (コラーゲンなど) の一次吸着層との相互作用 (疎水相互作用など) が重要であることがわかった。吸着に伴うエネルギー消散 ΔD の増加の程度から、同じ線状分子構造であっても、HyA の吸着層はコラーゲンの様なタンパク質に比べ比較的「硬い」ことが示唆された (図 4)。多糖である HyA は分子構造の特徴としてタンパク質に比べ持続長が長い

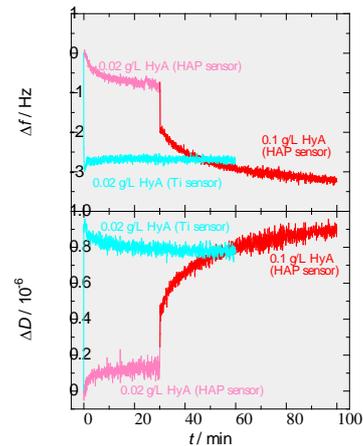


図 3 TiO₂, HAP 表面でのコラーゲン一次吸着層への HyA の吸着

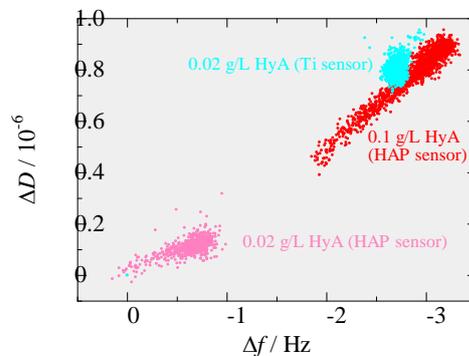


図 4 HyA 吸着層の形成過程と粘弾性の解析

ことから、吸着層が相対的に硬いと解釈される QCM-D の結果は合理的である。

ただし、吸着実験については、pH、一次吸着の有無等の条件の組合せにまだ網羅されていないところが多く、今後も引き続きデータ収集と解析を継続する必要がある。

(2) HyA ゲルの粘性

抗菌性を有する 2 種類の陽イオン性界面活性剤、塩化セチルピリジニウム (CPC) と塩化セチルトリメチルアンモニウム (CTAC) を、それぞれの臨界ミセル濃度 (CMC) 以上の濃度で 0.01% HyA 水溶液に添加すると、HyA は著しく凝集し溶液が白濁した。これに対応して溶液の粘度も低下した (図 5、6)。CPC、CTAC (正に帯電) と HyA (負に帯電) が静電的に結合した結果、

- ① HyA の電荷が中和され、分子内解離基間の反発が解消されることで HyA 分子の広がりが解消され、
- ② 逆ミセル状の会合体が形成され、外向きに伸びた炭化水素鎖が水中で疎水的に凝集した

ことによって HyA 分子鎖同士の絡まりが解消されて粘度の低下につながったと考えられた (図 7)。すなわち、CPC や CTAC はバイオフィルムを収縮させ、細菌の情報伝達物質

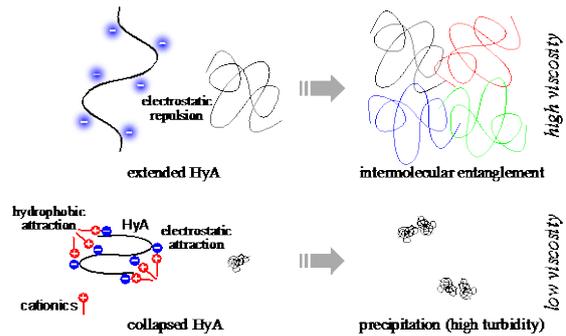


図 7 推定される相互作用の模式図

(オートインデューサー) の拡散を阻害する可能性が示唆された。

(3) HyA ゲル中の色素型抗菌物質の拡散

色素型抗菌物質 (アクリフラビン、AF; 最大吸収波長 451 nm) のヒアルロン酸ゲル中の拡散分析を、紫外可視分光法により実施した。すなわち、色素拡散進行中のセルにおいて固定位置での色素濃度の経時変化を計測し (図 8)、時間経過に伴う色素濃度の増加率 dC/dt を拡散能 (diffusion efficiency, DE) と名づけた。一方、拡散方程式 $dC/dt = D(d^2C/dx^2)$ において、位置 (ここではセルの深さ) を固定して観測した場合は右辺の二次微分の項を定数とみなすと、同方程式は $dC/dt = KD$ (K は定数) と簡略化される。これを実験系と対比すると、実験的に得られた DE は拡散係数と同等のものであることが示された。また、拡散物質であるアクリフラビンを半径 a の球に近似し Stokes-Einstein の式 $D = kT/6\pi\eta a$ と実験結果を対比すると、温度 T が高い場合、低 pH または界面活性剤添加 (HyA の凝集が促進される) により HyA 鎖の絡まりが解消された場合、そして HyA 濃度自体が低い場合のいずれにおいても、AF の拡散能が高くなったという実験結果は AF の媒質の HyA

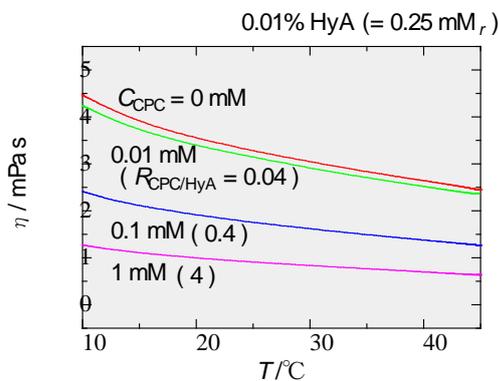


図 5 HyA 粘度の温度依存性と CPC 添加の影響

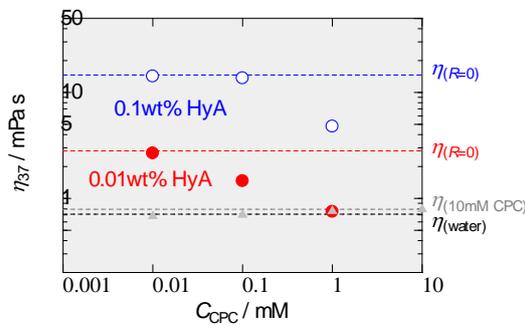


図 6 CPC 添加に伴う HyA 溶液の粘度の低下

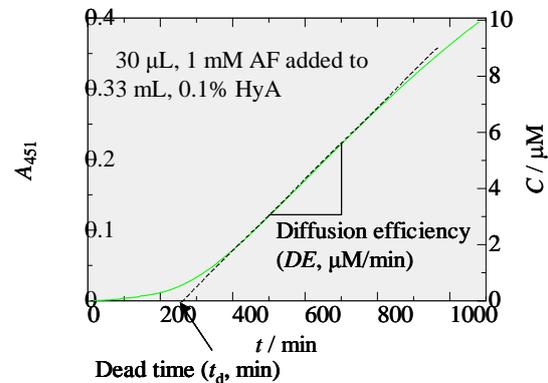


図 8 HyA 溶液 (準ゲル) 中の AF の拡散と拡散能 DE の定義

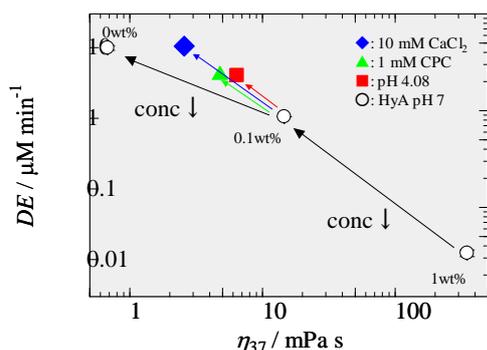


図9 拡散能の粘度依存性

ゲルの粘度 η が低下したことで一元的に説明できた (図9)。

(4) オートインデューサー様蛍光化合物の合成

計画期間内には合成物の精製が成功せず、この合成物質の HyA ゲル内拡散の蛍光トレースの実験は完了することができなかった。ただし、これは技術的な問題ではなく時間の制約によるものであったので、今後も遂行を継続し、是非完結させたいと考える。

アクリフラビンの代わりに蛍光性の合成オートインデューサーを用いて蛍光強度モニターを行うと、格段に微量(低濃度)での拡散の計測が可能である。その場合は濃度変化率が小さくなるため拡散係数も低くなること、粘性の拡散への影響が一層強くなることが予想される。オートインデューサーはホルモンの微量でクオラムセンシングに働くとされており、微量蛍光分析で得られた拡散挙動はクオラムセンシングの実態を反映したものになると考えられる。

(5) 総括

バイオフィーム成分のヒアルロン酸ゲルの物性究明から、クオラムセンシングの抑制につながる物理化学的条件を見出すことを目的とした研究で、ヒアルロン酸ゲルの粘性を低下させることにより抗菌物質の拡散を促進することができた。粘性低下には塩基性の抗菌性界面活性剤が特に有効であることが示された。オートインデューサーの拡散阻害によるクオラムセンシングの攪乱を利用した感染防止に利用できる成果と考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nezu T, Taira M, Saitoh S, Sasaki K, Araki Y; Viscoelastic adlayers of collagen and lysozyme studied using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Int J Biol Macromol* **46** (4), 396-403 (2010) [DOI 10.1016/j.ijbiomac.2010.02.005]. [査読有]
- ② 根津尚史, 荒木吉馬; BTC (Bench to Clinic) 研究室から臨床へ 歯科生体材料の表面インテリジェント化を目指す研究. *DE* **169**, 24-26 (2009). [査読有]

[学会発表] (計 10 件)

国際学会

- ① Nezu T, Sasaki K, Saitoh S, Taira M; Diffusion of an antimicrobial acriflavine through a concentrated solution of hyaluronic acid as a matrix component of biofilms. International Dental Materials Congress 2011, Seoul (2011).
- ② Nezu T; Viscoelastic adlayers formed by nano-bodies of similar shape and size but different internal fluidity. International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science 2010, Chiba (2010).

国内学会

- ③ 根津尚史, 佐々木かおり, 齋藤設雄; バイオフィルム関連高分子マトリックス中の薬剤透過性の定量評価の試み. 第 58 回日本歯科理工学会学術講演会, 郡山(2011).
- ④ 根津尚史, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 平 雅之; バイオフィルム構成多糖の粘弾性に及ぼす抗菌性界面活性剤の影響. 第 56 回日本歯科理工学会学術講演会, 岐阜(2010).
- ⑤ 根津尚史, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 平 雅之; 酸化物材料表面への抗菌性界面活性剤の吸着と吸着層の粘弾性. 第 55 回日本歯科理工学会学術講演会, 東京(2010).
- ⑥ 根津尚史, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 平 雅之, 荒木吉馬; バイオフィルム類似多糖吸着層の粘弾性 ― 菌体外多糖層の壊れにくさの背景 ―. 第 54 回日本歯科理工学会学術講演会, 鹿児島(2009).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根津 尚史 (NEZU TAKASHI)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号: 40264056

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

荒木 吉馬 (ARAKI YOSHIMA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20005036
(2009 年度末で退職)
平 雅之 (TAIRA MASAYUKI)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 60179398