

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462801

研究課題名(和文) デンタルバイオフィルムにおける病原因子の分子遺伝学的解明に関する研究

研究課題名(英文) Study on the pathogenicity of dental biofilm by molecular genetic technics

研究代表者

浜田 信城 (Hamada, Nobushiro)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：20247315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：A. naeslundiiのペプチドグリカン、炎症性サイトカインの産生を誘導し、破骨細胞分化誘導と骨吸収が認められた。マクロファージからIL-1、IL-6、TNF- α の産生誘導が確認された。実験的歯周炎においてもA. naeslundii接種によるラット歯槽骨吸収が認められた。以上の結果から、A. naeslundiiのペプチドグリカンは歯周炎発症の重要な病原因子であることが示唆された。また、菌体からの線毛遺伝子の抽出は成功したものの遺伝子変異株の獲得までには至らなかった。酸化チタンの光触媒機能を用いることによりバイオフィルム除去効果が得られ、歯周病予防への有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A. naeslundii peptidoglycan induces the production of inflammatory cytokines and activates osteoclasts in alveolar bone resorption. Expressions of IL-1, IL-6, and TNF- α mRNA were apparent in BALB/c mouse peritoneal macrophages stimulated with A. naeslundii PGN. In experimental periodontitis, the oral challenge of A. naeslundii resulted in the induction of alveolar bone loss in rats. These results suggest that peptidoglycan of A. naeslundii is an important virulence factor in the development of periodontitis. We could not succeed in the mutation of A. naeslundii fimbriae, however titanium oxide photocatalytic properties contribute to the reduction of bacterial biofilms and aid in the prevention of periodontal diseases.

研究分野：口腔細菌

キーワード：グラム陽性桿菌 Actinomyces naeslundii バイオフィルム 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌の内毒素 (LPS) が歯槽骨吸収を誘発する細菌の構成要素であることは、多くの研究機関で証明されてきた。しかし、非 LPS 構成要素でもサイトカイン産生誘導能を保有している事が報告されている。*Actinomyces viscosus* の菌体成分であるリポタイコ酸や N-アセチルムラミルジペプチドが、骨吸収を誘発し、う蝕に関する動物実験で顕著な骨吸収像が確認されている。しかし、現段階までにこれらの歯槽骨吸収に関わる因子の詳細な解明には至っていない。このように、グラム陽性細菌の菌体成分でも骨吸収を誘発する報告が存在することから、グラム陰性菌の *Porphyromonas gingivalis* の LPS や線毛の破骨細胞活性化だけでなく、グラム陽性菌に目を向ける必要があると考えている。今回グラム陽性菌である *A. naeslundii* に着目した。バイオフィーム形成に *A. naeslundii* の果たす役割は大きく、本菌の口腔疾患に係わる役割と菌体成分についても検討する。

2. 研究の目的

バイオフィーム形成と歯周病における役割とその機序について明らかにし、歯周病へのグラム陽性菌菌体成分の解明を目的とする。また、歯周病予防法の確立を目指し、DNA レベルで解析を進めるため変異株を作製する。更に、本研究では、変異株と親株によるラット歯周炎モデルにより *Actinomyces naeslundii* の口腔内定着および歯槽骨吸収の機序について動物実験により検討を行うことでグラム陽性菌の歯周病に係わる重要性を明らかにして、歯周病予防の基礎的基盤を構築する。さらに口腔バイオフィームに対する新たな効果的な除去方法を探索することを目的として、太陽電池を付与した酸化チタン半導体の光触媒機能を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) *Actinomyces naeslundii* 菌体成分の破骨細胞の活性化

C3H/HeN マウスより採取した腹腔細胞から非付着細胞を除去した付着細胞を用いて IL-1 β , IL-1 α , IL-6, TNF- α について RT-PCR にて発現量を定量化する。すなわち、マウス腹腔マクロファージを *Actinomyces naeslundii* 菌体成分である、外膜タンパク質、ペプチドグリカン、線毛等で刺激後、経過時間と濃度の違いによる反応性を検討する。また、象牙質片を直径 6 mm、厚さ 0.3 mm に調整し、48 well culture plates に敷いた。骨髓細胞と MC3T3-G2/PA6 細胞との共培養後に回収した細胞を 10% FCS, M-CSF, RANKL, Dexamethasone, 1 μ M, 25(OH) $_2$ D $_3$ を含む α -MEM 培地に懸濁したのち、象牙質切片上に播種し 1 時間静置後、試料を添加して 5% CO $_2$ 条件下 37 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

(2) *A. naeslundii* の線毛遺伝子の解析と遺

伝子変異株の作製

供試菌には *A. naeslundii* T14V 株を用い、イーストエキストラクトを添加したブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地を用いて 37 $^{\circ}$ C、18 時間嫌気培養したものを使用した。本研究室の DNA 解析システムを用いて、薬剤耐性遺伝子の挿入箇所を詳細に検討後、プラスミド pJRD215 上のストレプトマイシンとカナマイシンの薬剤耐性遺伝子を *A. naeslundii* T14V 株の線毛遺伝子内に挿入し、線毛遺伝子を不活化した。この線毛遺伝子不活化 DNA 断片を含むプラスミドを大腸菌へ形質転換し、プラスミド DNA の精製を行なった。次に、遺伝子不活化プラスミドを導入した大腸菌株と *A. naeslundii* T14V 株を共培養後、線毛遺伝子を不活化した DNA 断片をエレクトロポレーション法により、*A. naeslundii* に染色体 DNA 上の正常線毛遺伝子と相同的遺伝子組換えを行ない、遺伝子変異株を作製する。線毛遺伝子不活化の確認は、コロニードットハイブリダイゼーションによりスクリーニング後、サザンハイブリダイゼーション法を用いて、*A. naeslundii* の染色体 DNA 中に線毛遺伝子と薬剤耐性遺伝子の両方にハイブリダイズする断片の存在を確認するほか、菌体の電子顕微鏡による画像解析により線毛の欠失の確認を行なった。

(3) ラットにおける実験的歯周炎

生後 3 週齢の Sprague-Dawley 系の SPF 雄ラットを用いて実験を行う。健康状態を観察後、イオン交換水中に最終濃度 1 mg/ml のサルファメトキサゾールと 200 μ g/ml のトリメトプリムを混合したものを飲料水として 1 週間与えて口腔常在菌を減少させる。その後、3 日間抗生物質を含まないイオン交換水を与える。その後、ブレインハートインフュージョンブロスにイーストエキストラクト、ヘミン、ビタミン K $_1$ を添加した培地を用いて嫌気条件下 (5% CO $_2$, 10% H $_2$, 85% N $_2$) 37 $^{\circ}$ C で培養した *Actinomyces naeslundii* T14V 株を遠心集菌後、PBS で作製した 2% カルボキシメチルセルロース (CMC, Sigma) 溶液で調製した菌液 (10 9 CFU/ml) を一日毎に 5 回、ラット口腔内へ 0.5 ml 直接投与した。動物実験の申請を神奈川歯科大学 実験動物委員会に承認を得たのちに実施した。

(4) 酸化チタンの光触媒機能を用いたバイオフィーム除去効果

酸化チタン半導体と太陽電池を接続した電気回路によるバイオフィーム除去効果

本実験には *A. naeslundii* T14V 株に加えて、*Streptococcus mutans* Ingbritt 株、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株の計 3 菌株を、ヘミンとビタミン K $_1$ を含有した BHI 液体培地で 18 時間嫌気培養したものをを用いた。24 ウェルのプラスチックプレート内に供試菌のバイオフィームを形成した後、酸化チタン半導体に太陽電池を接続した電気回路をリン酸緩衝液中に作用させ、7 cm の距離から光照射を行なった。その後、経時的

に除去されたバイオフィルムを含んだ懸濁液の濃度を測定し、さらにプレート内に残留したバイオフィルムを走査型電子顕微鏡より解析した。またこの電気回路を流れる電流量についても種々の溶液を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 菌体成分の破骨細胞の活性化

A. naeslundii のペプチドグリカンを経製し、*E. coli* LPS をコントロールとして検討した結果、有意な破骨細胞分化誘導能と骨吸収能が認められ、さらにマクロファージを刺激して IL-1、IL-6、TNF- α の産生を誘導した。また実験的歯周炎においても *A. naeslundii* 接種群は *P. gingivalis* 接種群と同様に顕著な歯槽骨吸収量の増加が認められ、TRAP 染色像においても多数の破骨細胞とその直下に明瞭な骨吸収窩が確認された。以上の結果から、*A. naeslundii* のペプチドグリカンは歯槽骨吸収誘導を示す重要な病原因子であることが示唆された。

(2) *A. naeslundii* の線毛遺伝子の解析と遺伝子変異株の作製

A. naeslundii には 2 種類の線毛タンパク質が存在することが報告されている。本研究においても 2 種類の線毛遺伝子の抽出と遺伝子変異株の作製を試みた。その結果、菌体からの線毛遺伝子の抽出は成功したが、遺伝子変異株の獲得までには至ることができなかった。

(3) 酸化チタンの光触媒機能を用いたバイオフィルム除去効果

酸化チタン半導体と太陽電池を接続した電気回路を用いてバイオフィルム除去効果を検証した結果、太陽電池を付与した場合と付与しない場合で、除去効果に有意差が認められ、走査型電子顕微鏡により、太陽電池を付与した場合にはバイオフィルム形成した菌体の破壊像が認められた。半導体を流れる電流量は、唾液とリン酸緩衝液で近似した数値を示し、生体内を流れる微弱電流の範囲内であった。以上の結果から、酸化チタンの光触媒機能と太陽電池から流れる微弱電流により、効果的なバイオフィルム除去効果が得られる可能性が示唆された。

本研究結果をふまえ、今後 *A. naeslundii* 線毛遺伝子の変異株の作製については、細菌の培養条件や菌株間での遺伝子発現の比較した上で実験を継続する。また、酸化チタン光触媒機能におけるバイオフィルム除去効果については、光照射によりチタンから励起される電子のバイオフィルム内への浸透性について検討を加えるほか、さらなる口腔ケアへの応用性についても検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Funaki S, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Yoshino F, Yoshida A, Maehata Y,

Miyamoto C, Toyama T, Sato T, Hamada N, Lee MC, Takahashi SS: *Porphyromonas gingivalis* infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Microbial Pathogenesis*, 92: 36-42, 2016. doi: 10.1016/j.micpath.2015.12.009.

佐藤武則, 佐々木 悠, 渡辺清子, 浜田信城: *Actinomyces naeslundii* の歯槽骨吸収機構解明と歯周病予防法の探索, 神奈川歯学, 査読有, 50(2), 89-93, 2015.

佐藤武則, 佐々木 悠, 浜田信城: 文献と臨床の橋わたし 口腔細菌から読み取る歯周治療のエビデンス(第 1 回) 口腔細菌が形成するバイオフィルムとは? 日本歯科評論, 査読無, 75(10): 145-148, 2015.

佐々木 悠, 佐藤武則, 浜田信城: 文献と臨床の橋わたし 口腔細菌から読み取る歯周治療のエビデンス(第 2 回) バイオフィルム除去に効果的な抗菌療法とは? 日本歯科評論, 査読無, 75(11): 143-146, 2015.

佐藤武則, 佐々木 悠, 浜田信城: 文献と臨床の橋わたし 口腔細菌から読み取る歯周治療のエビデンス(第 3 回) インプラント周囲炎の原因と対応とは? 日本歯科評論, 査読無, 75(12): 139-142, 2015.

Sato T, Hirai N, Oishi Y, Uswak G, Komiyama K, Hamada N: Efficacy of a solar-powered TiO₂ semiconductor electric toothbrush on *P.gingivalis* biofilm. *American Journal of Dentistry*, 査読有, 28 (2):81-84, 2015.

Tomiyama K, Mukai Y, Kumada H, Watanabe K, Hamada N, Teranaka T: Formation of subsurface dentin lesions using a polymicrobial biofilm model. *American Journal of Dentistry*, 28(1): 13-17, 2015.

Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Sugiyama S, Toyama T, Sato T, Hamada N, Tsukinoki K, Takahashi SS, Lee MC. *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss is accelerated in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Archives of oral biology*, 査読有, 60(6): 911-918, 2015. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.02.012.

Sugimoto H, Watanabe K, Toyama T, Takahashi SS, Sugiyama S, Lee MC, Hamada N: Inhibitory effects of French pine bark extract, Pycnogenol®, on alveolar bone resorption and on the osteoclast differentiation. *Phytotherapy Research*, 29(2): 251-259, 2015. doi: 10.1002/ptr.5245.

Sasaki H, Watanabe K, Toyama T, Koyata Y, Hamada N: *Porphyromonas gulae* 41-kDa fimbriae induced osteoclast differentiation and cytokine production. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 77(3):265-271, 2015. doi: 10.1292/jvms.14-0463.

Takeda O, Toyama T, Watanabe K, Sato T, Sasaguri K, Akimoto S, Sato S, Kawata T, Hamada N. Ameliorating effects of Juzentaihoto on restraint stress and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss. *Archives of oral biology*, 査読有, 59(11):1130-1138, 2014. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.06.010.

井上吉登, 佐藤武則, 藤田茉依子, 大久保孝一郎, 熊田秀文, 浜田信城, 木本茂成: 重曹を添加した電解次亜塩素酸水の *Streptococcus mutans* に対する殺菌効果およびバイオフィルム除去効果, 査読有, 神奈川歯学, 49(2): 111-118, 2014.

〔学会発表〕(計5件)

Sato T, Hamada N: Efficacy of a toothpaste containing natural ingredient against oral bacteria. 93rd The IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition, Boston, MA, USA, 2015.3.11.

Sato T, Oishi Y, Hamada N: Efficacy of a solar-powered TiO₂ semiconductor electric toothbrush. 7th World Congress on Preventive & Regenerative Medicine, Taipei, Taiwan, 2014. 11.4-7.

Sato T, Toyama T, Takahashi S-S, Hamada N: Antimicrobial activity and inhibitory effect of alveolar bone resorption by a toothpaste containing Pycnogenol®. International Union of Microbiological Societies 2014, Montreal, Canada, 2014. 7.29.

佐藤武則, 早坂奈美, 遠山歳三, 高橋俊介, 浜田信城: 歯磨剤の抗菌効果および歯槽骨吸収抑制効果の検討. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡, 2014. 9.25-27.

佐藤武則, 渡辺清子, 浜田信城: 太陽電池内臓電動歯ブラシの酸化チタン光触

媒作用によるバイオフィルム除去効果. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第30回学術講演会および総会, 大阪, 2014. 5.23-25.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田信城 (HAMADA, Nobushiro)
神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 20247315

(2) 研究分担者

高橋 俊介 (TAKAHASHI, Shunnsuke)
神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 60206810

渡辺清子 (WATANABE, Kiyoko)
神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・講師
研究者番号: 70148021