

令和元年5月27日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11554

研究課題名(和文)ポリフェノール・銀ナノ粒子複合体を応用した口腔バイオフィーム形成制御技術の開発

研究課題名(英文) Study of the effects of polyphenol-silver nanoparticles complex upon oral biofilm formation and antimicrobial activity

研究代表者

尾崎 和美 (OZAKI, Kazumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：90214121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、ナノサイズの銀粒子(SNP)にCurcuminなどのポリフェノール(Polyphenol)を担持させたPolyphenol(CCM/EGCG)-SNP複合体に着目し、この複合体の抗菌効果ならびに口腔バイオフィーム形成抑制効果を多面的に解析したところ、CCM-SNPおよびEGCG-SNPの両者において一定の抗菌活性およびバイオフィーム形成抑制効果を有することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔衛生管理の手段として患者に指導するブラッシングなど口腔バイオフィームの機械的除去に加え、本研究で着目したポリフェノール・銀ナノ粒子複合体のような化学的・生物学的原理など新たなコンセプトに基づく口腔バイオフィームの形成制御技術が応用されることで、機能障害の有無を問わず高度なブラッシングを要求しがたい高齢者や要介護者の口腔衛生管理の質が向上し、根面う蝕の発症予防や進行抑制に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effect of antibacterial activity and suppressing formation of oral biofilm of polyphenol-silver nanoparticles complex were analyzed using Biofilm formation assay and Electron Microscopy. Thus, it was shown that both CCM-SNP and EGCG-SNP were shown to have antibacterial activity and biofilm formation inhibitory effect.

研究分野：保存修復学

キーワード：バイオフィーム 銀ナノ粒子 ポリフェノール

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

フラボノイド系に分類されるカテキン類の一つであるエピガロカテキンガレート ((-)-Epigallocatechin Gallate, 以下 EGCG と略す) は、抗炎症作用や抗腫瘍効果といった生理活性だけでなく抗菌活性も有することが報告されている。また、クルクミノイド系の代表であるクルクミン (Curcumin, 以下 CCM と略す) も EGCG と同様、生理活性だけでなく抗菌活性も持つことが報告されている。さらに近年では EGCG による肺癌細胞の増殖抑制効果を CCM が増強することが報告されるなど、EGCG と CCM の併用効果が注目されている。一方、金属ナノ粒子、特に銀ナノ粒子 (Silver Nano Particles, 以下 SNP と略す) のグラム陽性菌に対する抗菌効果やバイオフィーム形成制御効果を期待した報告があり、さらに最近、EGCG や CCM を SNP に担持して複合体化する方法など Polyphenol (CCM/EGCG)-SNP 複合体の生物医学的応用への扉が開かれつつある。

2. 研究の目的

本研究では、ナノサイズの銀粒子に Curcumin などのポリフェノールを担持させた Polyphenol-SNP 複合体に着目し、この複合体の抗菌効果ならびに口腔バイオフィーム形成抑制効果を多面的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株および培養

本研究では *Streptococcus mutans* UA159 株および *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 を用いて各種の検討を行った。

(2) Polyphenol (CCM/EGCG)-SNP 複合体の調製

CCM-SNP は、最終濃度が $16.7\ \mu\text{M}$ または $3.3\ \mu\text{M}$ となるよう 5mM Curcumin 溶液 (0.2N 水酸化カリウム溶液) を硝酸銀溶液 (0.1M) に添加したものを出発材料として調製した。また、対照として Curcumin を添加しない SNP を併せて調製した。なお、以下の記述では Curcumin の最終濃度が $16.7\ \mu\text{M}$ あるいは $3.3\ \mu\text{M}$ の CCM-SNP をそれぞれ CS-H、CS-L とし、対照を S と略す。一方、EGCG-SNP についても同様に硝酸銀を用いて同様に調製した。

(3) 抗菌活性の検証

前項で調製した 3 種の SNP (CS-H, CS-L, S) の最小発育阻止濃度 (以下 MIC) を、微量液体希釈法を用いて測定した。まず、組織培養用 96well プレートの各 well に、MHB で段階希釈した 3 種の SNP を $100\ \mu\text{l}$ ずつ分注した。次に、MHB で 5.0×10^5 CFU/ml に調製した *S. mutans* を $100\ \mu\text{l}$ ずつ接種し嫌気培養を行った後、各 well の吸光度を測定した。*S. mutans* の増殖の有無は、これを接種しなかった同濃度の溶液の吸光度と比較することで判断し、増殖を認めない最小の SNP 濃度を MIC と判定した。次に各 SNP について、MIC より数段階高濃度の溶液から $20\ \mu\text{l}$ ずつ血液寒天培地 (BD 社) へ滴下し嫌気培養を行い、最小殺菌濃度 (以下 MBC) を判定した。

(4) バイオフィーム形成量の測定

培養終了後、Biofilm formation assay にてバイオフィームの形成量を評価した。すなわち、滅菌超純水 ($200\ \mu\text{l}$) で 3 回洗浄したのち、メタノール ($200\ \mu\text{l}$) を用いてバイオフィームおよび *S. mutans* を固定した。続いてメタノールを吸引したのち放置することで well の内面を完全に乾燥させた。次に $100\ \mu\text{l}$ の 0.1% クリスタルバイオレット水溶液を各 well に添加し、1 分間の振盪に続いて 15 分間静置することでバイオフィームを染色した。染色後、水洗および乾燥を経て、最後にメタノール ($200\ \mu\text{l}$) を添加し 5 分間振盪することで、バイオフィームに結合していたクリスタルバイオレットを溶出し、吸光度 ($\text{OD}_{595.0\text{nm}}$) を測定した。

(5) ハイドロキシアパタイトペレットの調製および唾液処理

市販のハイドロキシアパタイトペレット ($10 \times 10 \times 2\text{mm}$, 純度・密度: 99%以上, 以下 HA ペレッ

ト)を歯面のエナメル質の代用として使用した。また、HAペレット表面に唾液処理を施した。すなわち、パラフィンワックスの咀嚼により分泌させた唾液を回収・加熱後、冷却遠心(13,300xg, 20分間)した上清を段階的に濾過することで滅菌し、実験に供するまで-80°Cに保管した。HAペレット表面への唾液の処理は、融解した約100 μ lの唾液をHAペレットに滴下し、ピペットチップによる唾液の吸引と風乾により行った。

4. 研究成果

(1) Polyphenol-SNP複合体の抗菌活性

*S. mutans*を添加して嫌気培養し終えた、段階希釈した各Polyphenol-SNP複合体の吸光度(OD_{595, 0nm})値を表1に示す。吸光度値から*S. mutans*の増殖の有無を判断した結果、CS-H、CS-LおよびSのMICは、それぞれ1.95 μ g/ml, 0.98 μ g/ml, 0.98 μ g/mlと判定された。また、MICおよびMICより数段階高濃度の各SNP溶液から血液寒天培地に20 μ lずつ滴下し嫌気培養を行いコロニー形成の有無を確認したところ、CS-H、CS-LおよびSのMBCは、それぞれ7.81 μ g/ml, 1.95 μ g/ml, 7.81 μ g/mlであった。なお、CCMのみを同濃度で調製し*S. mutans*を接種した溶液中では、いずれの濃度においても菌の増殖を認めた。

(2) Polyphenol-SNP複合体のバイオフィーム形成抑制効果

種々の濃度で添加した各SNP溶液中のバイオフィーム形成量を図1に示す。CS-Lでは、添加濃度が高いほど*S. mutans*によるバイオフィーム形成量は低値を示し、MICのCS-Lにおけるバイオフィーム形成量は陽性対照より有意に少なかった。逆に、CS-Hでは濃度が高いほどバイオフィーム形成量が高値を示した。一方、EGCG-SNPの諸効果をBiofilm formation assayおよび形態学的解析にて行った。Biofilm formation assayから、種々のEGCG-SNP濃度で*S. mutans*の発育が阻害されることが確認され本複合体の抗菌効果が示唆されたが、その効果はCCM-SNPに比較して弱い傾向を示した。また、形態学的解析からバイオフィーム形成量は対照群(EGCG-SNP無添加)に比べ少なかったものの、その効果はBiofilm formation assayの結果と同様、CCM-SNPに比して弱い傾向を示した。

(3) 菌体内外多糖合成に対するPolyphenol-SNP複合体の影響

Biofilm formation assayで形成させたバイオフィームの超微構造を走査型電子顕微鏡にて観察した。さらに、菌体内外多糖特異的電子染色(過沃素酸-チオカルボヒドラジド-蛋白銀染色)を施し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、種々のPolyphenol-SNP複合体の濃度で*P. gingivalis*とともに、発育が阻害あるいは殺滅されることを確認し、本複合体の抗菌効果が示されたが、その効果は*S. mutans*に対してよりも弱かった。一方、バイオフィーム形成抑制効果は*S. mutans*と同様に確認することができ、MICの半量のCCM-SNPを添加した培地で形成された*P. gingivalis*両菌種のバイオフィームを走査型および透過型電子顕微鏡で観察したところ、CCM-SNP無添加の培地で形成させたバイオフィーム(対照群)よりも、菌体外多糖だけでなく菌体内多糖においても産生量が減じていることが観察された。

(4) 歯面上のバイオフィーム構成菌の態様に対するPolyphenol-SNP複合体の影響

一方、HAペレットを用いてCCM-SNPおよびEGCG-SNPの作用時期の違いによるバイオフィームの形成状態の変化を形態学的に解析した。いずれの複合体においても、予め試片に複合体を作用させた場合において、被検細菌と同時に添加した場合より試片に接して存在する細菌数や菌体外多糖の形成量が少ない傾向を示し、また対照群(複合体無添加)と比較して少ない傾向を示したことから、これら複合体のバイオフィーム形成に対する抑制効果に加え、付着抑制効果の可能性が示された。

表 1. *S. mutans* に対する各種 Polyphenol-SNP 複合体の抗菌活性

| 条件 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CS-H+Sm | 2.106 | 1.843 | 1.646 | 1.488 | 1.245 | 0.834 | 0.556 | 0.478 | 0.706 | 0.763 | 0.716 | 0.413 |
| | 2.090 | 1.810 | 1.664 | 1.453 | 1.168 | 0.836 | 0.533 | 0.474 | 0.751 | 0.741 | 0.726 | 0.417 |
| CS-H (Sm-) | 2.155 | 1.844 | 1.620 | 1.436 | 1.172 | 0.775 | 0.550 | 0.468 | 0.435 | 0.421 | 0.418 | 0.414 |
| CS-L+Sm | 2.190 | 1.895 | 1.657 | 1.485 | 1.237 | 0.915 | 0.611 | 0.496 | 0.436 | 0.723 | 0.714 | 0.422 |
| | 2.174 | 1.950 | 1.667 | 1.489 | 1.242 | 0.973 | 0.638 | 0.527 | 0.453 | 0.718 | 0.717 | 0.415 |
| CS-L (Sm-) | 2.224 | 1.942 | 1.712 | 1.541 | 1.282 | 0.963 | 0.681 | 0.529 | 0.458 | 0.427 | 0.419 | 0.415 |
| S+Sm | 2.219 | 1.909 | 1.691 | 1.513 | 1.283 | 1.044 | 0.671 | 0.531 | 0.453 | 0.737 | 0.729 | 0.419 |
| S (Sm-) | 2.207 | 1.942 | 1.699 | 1.546 | 1.331 | 1.071 | 0.717 | 0.558 | 0.469 | 0.449 | 0.423 | 0.413 |
| CS/Sの濃度 ($\mu\text{g/ml}$) | 250 | 125 | 62.5 | 31.25 | 15.63 | 7.81 | 3.91 | 1.95 | 0.98 | 0.49 | 0.24 | 0 |

段階希釈した各種 SNP に対する *S. mutans* の増殖の様相を吸光度 ($\text{OD}_{595.0}$ 値) で評価した。

CS-H : Curcumin の終濃度を $16.7 \mu\text{M}$ として調製した CCM-SNP 溶液

CS-L : Curcumin の終濃度を $3.3 \mu\text{M}$ として調製した CCM-SNP 溶液

S : Curcumin を添加していない SNP 溶液

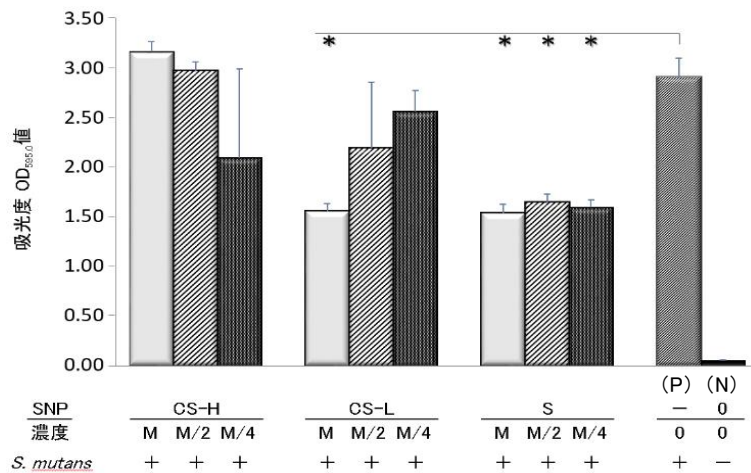


図 1. 各種 SNP 存在下での *S. mutans* UA159 株のバイオフィルム形成量

CS-H : 調製時の Curcumin 終濃度 $16.7 \mu\text{M}$, CS-L : 調製時の Curcumin 終濃度 $3.3 \mu\text{M}$

S : Curcumin 無添加, M : 各 SNP の MIC, P : positive control, N : negative control

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Hosokawa I., Hosokawa Y., Ozaki K., Matsuo T. : Carnosic acid inhibits CXCR3 ligands production in IL-27-stimulated human oral epithelial cells. *Inflammation*, 査読有, 2019., [Epub ahead of print] DOI : 10.1007/s10753-019-00991-6.
- ② Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Matsuo T. : Honokiol and magnolol inhibit CXCL10 and CXCL11 production in IL-27-stimulated human oral epithelial cells. *Inflammation*, 査読有, Vol. 41, 2018, pp. 2110-2115. DOI : 10.1007/s10753-018-0854-z.
- ③ Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Matsuo T. : Transforming growth factor- β 1 increases C-C chemokine ligand 11 production in interleukin 4-stimulated human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int*, 査読有, Vol. 42, 2018, pp. 1395-1400. DOI : 10.1002/cbin.11030.
- ④ 細川義隆, 細川育子, 尾崎和美, 松尾敬志 : テアフラビンが口腔上皮細胞のケモカイン産生に与える影響の解析. *日本歯科保存学雑誌*, 査読有, 第 61 巻, 2018, pp. 10-16. DOI: <https://doi.org/10.11471/shikahozon.61.10>
- ⑤ Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Matsuo T. : IL-27 modulates chemokine production in TNF- α -stimulated human oral epithelial cells. *Cell Physiol Biochem*, 査読有, Vol. 43, 2017, pp. 1198-1206. DOI : 10.1159/000481760.

- ⑥Hosokawa Y., Hosokawa I., Shindo S., Ozaki K., Matsuo T. : IL-29 enhances CXCL10 production in TNF- α -stimulated human oral epithelial cells. Immunol Invest, 査読有, Vol. 46, 2017, pp. 615-624. DOI : 10.1080/08820139.2017.1336176.
- ⑦Fujiwara N., Murakami K., Nakao M., Toguchi M., Yumoto H., Hirota K., Matsuo T., Sano S., Ozaki K., Miyake Y. : Antibacterial and antibiofilm effects of reuterin-related compounds to periodontopathic bacteria. Journal of Oral Health and Biosciences, 査読有, Vol. 30, 2017, pp. 8-17. DOI : org/10.20738/johb.30.1_8.
- ⑧Fujiwara N., Murakami K., Nakao M., Toguchi M., Yumoto H., Amoh T., Hirota K., Matsuo T., Sano S., Ozaki K., Miyake Y. : Novel reuterin-related compounds suppress odour by periodontopathic bacteria. Oral Dis, 査読有, Vol. 23, 2017, pp. 492-497. DOI : 10.1111/odi.12638.
- ⑨Yoshida K., Okamura H., Hiroshima Y., Abe K., Kido J., Shinohara Y., Ozaki K. : PKR induces the expression of NLRP3 by regulating the NF- κ B pathway in *Porphyromonas gingivalis*-infected osteoblasts. Exp Cell Res, 査読有, Vol. 354, 2017, pp. 57-64. DOI : 10.1016/j.yexcr.2017.03.028.
- ⑩Hosokawa Y., Hosokawa I., Shindo S., Ozaki K., Matsuo T. : Gomisin N decreases inflammatory cytokine production in human periodontal ligament cells. Inflammation, 査読有, Vol. 40, 2017, pp. 360-365. DOI : 10.1007/s10753-016-0482-4.
- ⑪Hosokawa Y., Hosokawa I., Shindo S., Ohta Y., Ozaki K., Matsuo T. : Alkannin inhibits CCL3 and CCL5 production in human periodontal ligament cells. Cell Biol Int, 査読有, Vol. 40, 2016, pp. 1380-1385. DOI : 10.1002/cbin.10692.
- ⑫Hosokawa I., Hosokawa Y., Shindo S., Ozaki K., Matsuo T. : Melatonin inhibits CXCL10 and MMP-1 production in IL-1 β -stimulated human periodontal ligament cells. Inflammation, 査読有, Vol. 39, 2016, pp. 1520-1526. DOI : 10.1007/s10753-016-0386-3.
- ⑬Takamura H., Yoshida K., Okamura H., Fujiwara N., Ozaki K. : *Porphyromonas gingivalis* attenuates the insulin-induced phosphorylation and translocation of forkhead box protein O1 in human hepatocytes. Archives of Oral Biology, 査読有, Vol. 69, 2016, pp. 19-24. DOI : 10.1016/j.archoralbio.2016.05.010.
- ⑭Shindo S., Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Matsuo T. : Shikonin inhibits inflammatory cytokine production in human periodontal ligament cells. Inflammation, 査読有, Vol. 39, 2016, pp. 1124-1129. DOI : 10.1007/s10753-016-0344-0.
- [学会発表] (計 15 件)
- ①細川 育子, 細川 義隆, 尾崎 和美, 松尾 敬志 : Carnosic acid はヒト口腔上皮細胞の IL-27 誘導 CXCR3 リガンド産生を抑制する, 第 149 回日本歯科保存学会 2018 年度秋季学術大会, 2018.
- ②吉田 賀弥, 瀬山 真莉子, 藤原 奈津美, 尾崎 和美 : *Porphyromonas gingivalis* 感染マクロファージ由来の膜小胞が肝臓糖代謝に及ぼす影響, 第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2018.
- ③吉田 賀弥, 藤原 奈津美, 尾崎 和美, 内部 健太, 池亀 美華, 岡村 裕彦 : *Porphyromonas gingivalis* 感染したマクロファージが産生する膜小胞が肝臓糖代謝に及ぼす影響, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018.
- ④吉田 賀弥, 藤原 奈津美, 尾崎 和美, 内部 健太, 池亀 美華, 岡村 裕彦 : 歯周病原菌感染マクロファージ由来の膜小胞はヒストンを含み肝臓に移行する, 第 5 回日本細胞外小胞学会/第 10 回日本 RNA i 研究会, 2018.
- ⑤瀬山 真莉子, 吉田 賀弥, 藤原 奈津美, 尾崎 和美 : *Porphyromonas gingivalis* の分泌小胞は肝臓の糖代謝に影響を与える, 第 61 回春季日本歯周病学会学術大会, 2018.
- ⑥細川 義隆, 細川 育子, 尾崎 和美, 松尾 敬志 : IL-27 はヒト口腔上皮細胞の CXCR3 リガンド産生を誘導する, 第 61 回春季日本歯周病学会学術大会, 2018.

- ⑦細川 義隆, 細川 育子, 尾崎 和美, 松尾 敬志: IL-29 は TNF- α が誘導するヒト口腔上皮細胞の CXCL10 産生を増強する, 第 60 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2017.
- ⑧進藤 智, 細川 義隆, 細川 育子, 尾崎 和美, 柴 秀樹, 松尾 敬志: IL-35 は TNF- α が誘導するヒト歯根膜細胞の IL-6 および CXCL10 産生を抑制する, 第 147 回日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会, 2017.
- ⑨細川 義隆, 細川 育子, 尾崎 和美, 松尾 敬志: IL-29 はヒト口腔上皮細胞の CXCL10 産生を増強する, 第 147 回日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会, 2017.
- ⑩藤原 奈津美, 湯本 浩通, 弘田 克彦, 村上 圭史, 尾崎 和美: MPC ポリマーによる口腔細菌の抑制効果, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017.
- ⑪細川 義隆, 細川 育子, 進藤 智, 尾崎 和美, 松尾 敬志: Gomisin N はヒト歯根膜由来細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制する, 第 145 回日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会, 2016.
- ⑫進藤 智, 池田 淳史, 細川 義隆, 細川 育子, 尾崎 和美, 松尾 敬志: シトルリン化ビメンチンは破骨細胞分化を促進する, 第 145 回日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会, 2016.
- ⑬進藤 智, 池田 淳史, 細川 義隆, 細川 育子, 尾崎 和美, 松尾 敬志: シトルリン化ビメンチンは破骨細胞活性化とマウス歯周炎による骨吸収を促進する, 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2016.
- ⑭吉田 賀弥, 藤原 奈津美, 廣島 佑香, 阿部 佳織, 木戸 淳一, 尾崎 和美: *Porphyromonas gingivalis* は SOCS3 や IRS-1 を制御して肝臓におけるインスリンシグナルを抑制する, 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 2016.
- ⑮細川 義隆, 細川 育子, 進藤 智, 尾崎 和美, 松尾 敬志: Alkannin はヒト歯根膜由来細胞の IL-6 および CCL20 産生を抑制する, 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 2016.

[図書] (計 1 件)

- ①太田 敏子 他 編集, 近代出版, メディカルサイエンス 微生物検査学 第 2 版, 2016,
分担: 片岡 佳子, 尾崎 和美 「IV 感染症の検体検査 口腔感染症」, pp. 353-363.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 湯本 浩通
ローマ字氏名: (YUMOTO, Hiromichi)
所属研究機関名: 徳島大学
部局名: 大学院医歯薬学研究部 (歯学域)
職名: 教授
研究者番号 (8 桁): 6 0 2 8 4 3 0 3

研究分担者氏名: 細川 義隆
ローマ字氏名: (HOSOKAWA, Yoshitaka)
所属研究機関名: 徳島大学
部局名: 病院
職名: 講師
研究者番号 (8 桁): 9 0 3 4 6 6 0 1

(2) 研究協力者

なし

※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、研究者個人に帰属されます。