

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10132

研究課題名（和文）口腔バイオフィルムの分散能と抗菌能を有する光触媒・ポリフェノール合剤の新規開発

研究課題名（英文）Study of the inhibitory effects of polyphenol loaded titania nanotubes on bacterial growth and biofilm formation

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、二酸化チタンとポリフェノールを出発材料として調製した合剤（以下、TNT-PolyP mixture）の抗菌活性やバイオフィルムの形成抑制を解析した。すなわち、Streptococcus mutansに TNT-PolyP mixtureを作用させ懸濁液の吸光度や電子顕微鏡を用いた超微細形態学変化を解析したところ、菌の増殖抑制や菌体内外多糖の合成抑制が確認された。また、アパタイトペレット表面の粗造化、すなわち脱灰作用についても減じる傾向を示した。以上のことから、本研究で調製したTNT-PolyP mixtureはう蝕の発症抑制に有用である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

う蝕や歯周病の発症要因となるだけでなく、誤嚥性肺炎など死に至る疾患の原因ともいわれる口腔バイオフィルムの駆逐技術を開発することは、歯科临床上非常に意義深い。とくに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ルムの機械的除去に加え、本研究で調製した合剤のような新たなコンセプトに基づく口腔バイオフィルム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）：The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of polyphenol loaded titania nanotubes (TNT-PolyP mixture) on bacterial growth and biofilm formation. After preparing a TNT-PolyP mixture, the Streptococcus mutans UA159 strain was cultured for 12 hours using a sucrose-added BHI medium and apatite pellets supplemented with the TNT-PolyP mixture.

As a result, a certain degree of antibacterial effect and biofilm formation inhibitory effect were observed. TEM observation revealed that the TNT-PolyP mixture suppresses the biofilm formation of S. mutans. In addition, it showed a tendency to reduce the roughening of the surface of apatite pellets, that is, the decalcification effect. From the above, it was shown that the TNT-PolyP mixture prepared in this study may be useful for suppressing the onset of caries.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：バイオフィルム 二酸化チタン チタニアナノチューブ ポリフェノール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科の二大疾患である齲蝕や歯周病の主因としてだけでなく、誤嚥性肺炎など死に至る疾患の原因としても口腔バイオフィームが重要視され、さらに近年では脳内微小出血や認知症と *Streptococcus mutans* との関連性も報告されている。齲蝕と歯周病の発症予防や進行抑制を目指すうえで、歯面などに形成されたバイオフィームの除去が何よりも優先され、基本的かつ必要不可欠な口腔衛生管理の手段として現在多くの場面で患者に指導しているのは、セルフケアとしてのブラッシングなど口腔バイオフィームの機械的除去方法である。しかしながら、歯列の状態によっては精緻な技術が必要であり、これを要求しがたい高齢者や要介護者が急増している現状を鑑みた場合、機械的除去ではなく、また抗菌薬の使用による耐性菌の蔓延を助長しない、例えば化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“中”からの破壊といった機構にもとづく口腔バイオフィームの形成制御や駆逐が有効かつ有用ではないかと着想した。

二酸化チタンは工業的に光触媒として大気や水の浄化、脱臭などに加え、その酸化力は施設や医療器具の抗菌にも応用されている。歯科医療では近年歯牙漂白剤に添加され、主材である過酸化水素を活性化する触媒として利用されている。一方、Epigallocatechin Gallate (EGCG) や Curcumin (CCM) などのポリフェノール (以下 PolyP) は抗炎症作用や抗腫瘍効果といった生理活性に加え、近年では抗菌効果も確認されており、口腔細菌を対象とした報告もされつつある。しかしながら、これらの報告は主にグラム陰性菌を対象としており、齲蝕原性の高いバイオフィームの形成初期に優勢なグラム陽性菌への抗菌効果に関する報告は極めて少ない。

2. 研究の目的

本研究では、二酸化チタンの酸化力を口腔バイオフィームの構成成分である菌体外マトリックスの歯面からの剥離や多糖の断裂に応用し、これによる PolyP のマトリックス深部への浸透性亢進とバイオフィーム構成菌への直接的な抗菌作用を期待し、二酸化チタンで構成されたナノチューブ (TiO₂ nanotubes, 以下 TNT) の内腔に PolyP (EGCG) を保持させた合剤 (以下 TNT-PolyP mixture) を調製し、とくに口腔バイオフィームの形成初期に深く関わるグラム陽性菌に対する抗菌効果ならびにバイオフィーム形成の阻止や成長の抑制に対する効果を多面的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株および培養

本研究では、グラム陽性菌で齲蝕原性の高い *Streptococcus mutans* UA159 株を用いて各種の検討を行った。菌株の培養には Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA, 以下 BHI と略す) 液体培地を使用し、必要に応じて sucrose (終濃度 1% または 5%, 和光純薬, 大阪) を添加したうえ (以下, S-BHI), 37 °C にて嫌気培養 (アネロパック, 三菱化学, 東京) を行った。

(2) TNT-PolyP mixture の調製

二酸化チタン (P25) を、アルカリ処理 (10M NaOH, 110 °C), 酸処理 (0.1M HCl) および十分量の超純水を用いた洗浄を経てチタニアナノチューブ (TiO₂ nanotubes, 以下 TNT) とし、これにポリフェノール (PolyP) の一種である EGCG を混合することで合剤 (以下, TNT-PolyP mixture) を得た。対照として、EGCG の溶媒 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) のみを添加した TNT 溶液 (以下, TNT only) を実験に供した。

(3) 抗菌活性の検証

抗菌活性の評価として、種々濃度の TNT-PolyP mixture または TNT only を添加し一定時間培養した *S. mutans* 懸濁液の吸光度を測定した。すなわち、前培養した *S. mutans* を BHI にて一定濃度 (1×10⁶ CFU/ml) に希釈・調製後、500 μl ずつ 96 穴プレートに播種し、各ウェルに 0.01 μg/ml ~ 12.50 μg/ml の TNT-PolyP mixture または TNT only を添加し 12 時間後の吸光度 (OD, 波長 595.0nm) をマイクロプレートリーダー (iMark, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。また、通法にて最小発育阻止濃度を併せて測定した。

(4) バイオフィーム形成量の測定

TNT-PolyP mixture のバイオフィーム形成抑制効果を評価するために Biofilm formation assay¹⁾を行った。すなわち、前項(3)と同様に 96 穴プレートに播種した *S. mutans* 懸濁液に 0.01 μg/ml ~ 12.50 μg/ml の TNT-PolyP mixture または TNT only を添加し 12 時間嫌気培養した。こ

のとき、S-BHI を用いて菌濃度 (1×10^6 CFU/ml) の希釈・調製を行った。12 時間培養後、以下の方法で well を処理した。すなわち、滅菌超純水 (200 μ l) で 3 回洗浄したのち、メタノール (200 μ l) を用いてバイオフィームおよび *S. mutans* を固定した (室温, 15 分間)。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 (室温, 約 15 分間)。次に 100 μ 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、滅菌水 (200 μ l) で 4 回洗浄し、最後の洗浄に用いた滅菌水を吸引し放置することで well の内面を完全に乾燥させた (室温, 約 30 分間)。最後に、各ウェルにメタノール 200 μ l を添加し 5 分間振盪 (600rpm) 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、マイクロプレートリーダーで吸光度 (OD, 波長 595.0nm) を測定した。そして、対照群 (TNT 未添加) の吸光度に対する比として算出した。

(5) TNT-PolyP mixture によるバイオフィーム形成の超微変化の観察

無菌化した唾液で表面処理した滅菌済アパタイトペレットを 24 穴マイクロプレートに投入後、前項(4)と同様に S-BHI にて希釈・調製した *S. mutans* 懸濁液を 1ml ずつ播種し、12.50 μ g/ml の TNT-PolyP mixture または TNT only を添加し 12 時間嫌気培養した。培養後、ペレット表面に形成されたバイオフィームをペレットとともにエポキシレジンに包埋し、そこから作製した超薄切片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) を施したのち透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した。

(6) TNT-PolyP mixture の脱灰抑制能 (歯質耐酸性) の検証

TNT-PolyP mixture の脱灰抑制能 (歯質耐酸性) について、前項(5)に準じて唾液処理したアパタイトペレット、*S. mutans* 懸濁液ならびに人工脱灰溶液 (0.1M 乳酸ゲル) を用いて評価した。一部のペレットの表面に TNT-PolyP mixture 溶液を作用させたのち (室温, 2 時間)、*S. mutans* 懸濁液 (S-BHI) 中に懸垂 (37 $^{\circ}$ C, 4 時間嫌気培養) することで実験群のペレットを、TNT-PolyP mixture 溶液を作用させないペレットを同菌懸濁液中に懸垂することで対照群を調製した。また、TNT-PolyP mixture 溶液を作用させた別のペレットに対しては、*S. mutans* 懸濁液の代わりに人工脱灰溶液を用いた。培養終了後、ペレット表面の懸濁液を超音波またはリゾチーム処理にて可及的に除去したのち、通法にしたがい固定、脱水および乾燥処理を経て走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。

4. 研究成果

(1) TNT-PolyP mixture の抗菌活性

TNT-PolyP mixture の抗菌活性を評価すべく、種々濃度の TNT-PolyP mixture または TNT only を添加し 12 時間培養した後の *S. mutans* 懸濁液の吸光度を測定した。その結果、*S. mutans* 懸濁液の吸光度はともに添加した TNT-PolyP mixture あるいは TNT only の濃度依存的に低下した (図 1)。また、TNT-PolyP mixture を添加した場合に TNT only よりも吸光度が低値になる傾向が示された。最小発育阻止濃度を確認したところ、TNT-PolyP mixture は 6.25 μ g/ml であったが、TNT only を添加した場合は検索対象とした濃度範囲で発育阻害を認めることはできなかった。これらの結果から、TNT-PolyP mixture には *S. mutans* に対し一定程度の抗菌あるいは制菌効果を有することが示された。

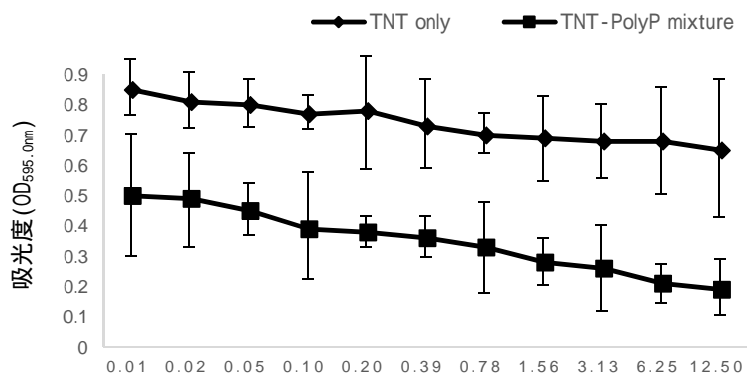


図 1. *S. mutans* の増殖への TNT-PolyP の影響

(2) TNT-PolyP mixture のバイオフィーム形成抑制効果

TNT-PolyP mixture のバイオフィーム形成抑制効果を Biofilm formation assay を用いて解析し、対照群 (TNT 未添加) の吸光度値に対する比として算出した (図 2)。その結果、TNT-PolyP mixture を添加した *S. mutans* 懸濁液中で形成されたバイオフィームは、対照群に比して濃度依存的に減少したことから、相応のバイオフィーム形成抑制効果を有することが明らかになった。一方、EGCG を担持しない TNT only では濃度依存的ではあるものの減少傾向は TNT-PolyP mixture に比して少なく、一定程度の制菌効果はあるもののバイオフィーム形成に対する抑制効果は極めて少ないことが明らかになった。

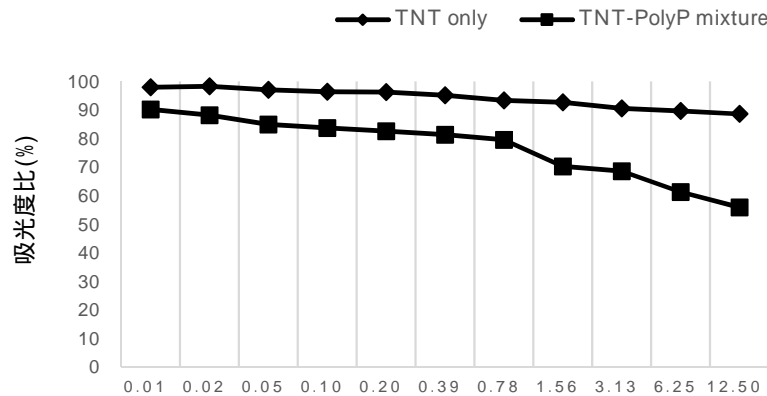


図 2. *S. mutans* のバイオフィーム形成への TNT 溶液の影響

TNT 未添加の *S. mutans* 懸濁液で形成されたバイオフィームを用いて得た吸光度値に対する各ウェルの吸光度値の比としてプロットした。

(3) TNT-PolyP mixture によるバイオフィーム形成の超微変化

12.50 μg/ml の TNT-PolyP mixture または TNT only を添加した S-BHI で培養した *S. mutans* が形成したバイオフィームを出発材料として作製した超薄切片に、過沃素酸-チオカルボヒドラジド-蛋白銀染色を施し TEM 観察したところ、TNT-PolyP mixture を添加した場合のバイオフィームにおいては、菌体外多糖ならびに菌体内多糖の産生量がともに対照群 (TNT 溶液未添加) あるいは TNT only に比して少ない傾向を示した (図 3)。

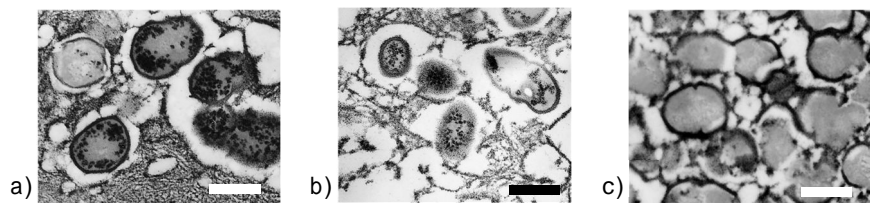


図 3. TNT 溶液を添加した場合の *S. mutans* のバイオフィームの様相

a) TNT 溶液未添加 (対照群), b) TNT only 添加, c) TNT-PolyP mixture 添加 bar: 1 μm

同様の方法で形成したバイオフィームから mRNA を精製し *gtfB/C/D* gene の遺伝子発現を解析したところ、TNT-PolyP mixture を添加した形成したバイオフィーム内の *S. mutans* の遺伝子発現は、*gtfB/C/D* gene いずれも対照群 (TNT 未添加) のそれらより弱い傾向を示した。

(4) TNT-PolyP mixture の脱灰抑制能の検証

TNT-PolyP mixture を作用させなかったペレット (対照群) の表面は、TNT-PolyP mixture を作用させたペレット (実験群) の表面に比して粗ざう化の傾向が大きいことが観察された。また、*S. mutans* 懸濁液の代わりに人工脱灰溶液を用いた場合も同様の傾向を認めた。これらの結果は TNT-PolyP mixture によるエナメル質の耐酸性獲得を期待できるものであるが、実験群においてもわずかではあるがペレット表面が粗ざう化していたことから、作用濃度や時間など臨床応用に向けてさらなる条件検討が今後必要であると考えられる。

引用文献

1) Li YF *et al.*: Inhibited biofilm formation and improved antibacterial activity of a novel nanoemulsion against cariogenic *Streptococcus mutans* *in vitro* and *in vivo*, *Int. J. Nanomedicine*, 10:447-462, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yoshida K., Yoshida K., Fujiwara N., Seyama M., Ono K., Kawai H., Guo J., Wang Z., Weng Y., Yu Y., Uchida-Fukuhara Y., Ikegame M., Sasaki A., Nagatsuka H., Kamioka H., Okamura H., Ozaki K.	4. 巻 1867
2. 論文標題 Extracellular vesicles of <i>P. gingivalis</i> -infected macrophages induce lung injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease	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) 10.1016/j.bbadis.2021.166236	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 Shao W., Fujiwara N., Mouri, Y., Kisoda S., Yoshida K., Yoshida K., Yumoto H., Ozaki K., Ishimaru N., Kudo Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by <i>Fusobacterium nucleatum</i> infection promotes invasion of oral cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-94384-1	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 Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K.	4. 巻 2021
2. 論文標題 Nobiletin decreases inflammatory mediator expression in tumor necrosis factor-stimulated human periodontal ligament cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mediators of Inflammation	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) 10.1155/2021/5535844	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 Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Matsuo T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Nobiletin inhibits inflammatory reaction in interleukin-1 α -stimulated human periodontal ligament cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	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) 10.3390/pharmaceutics13050667.	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 Fujiwara N., Kitamura N., Yoshida K., Yamamoto T., Ozaki K., Kudo Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Involvement of Fusobacterium species in oral cancer progression: A literature review including other types of cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6207-6216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176207	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 Hosokawa I., Hosokawa Y., Ozaki K., Matsuo T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Carnosic acid inhibits inflammatory cytokines production in human periodontal ligament cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunopharmacology and Immunotoxicology	6. 最初と最後の頁 373-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08923973.2020.1782427.	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 Yoshida K., Yoshida K., Seyama M., Ozaki K., Okamura H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Extracellular Vesicles in Periodontal Medicine: The Candidates Linking Oral Health to General Health.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20738/johb.33.1_15	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 Fujiwara N., Murakami K., Yoshida K., Sakurai S., Kudo Y., Ozaki K., Hirota K., Fujii H., Suzuki M., Miyake Y. and Yumoto H.	4. 巻 6
2. 論文標題 Suppressive effects of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-polymer on the adherence of Candida species and MRSA to acrylic denture resin.,	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	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) 10.1016/j.heliyon.2020.e04211	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 Seyama M, Yoshida K, Yoshida K, Fujiwara N, Ono K, Eguchi T, Kawai H, Guo J, Weng Y, Haoze Y, Uchibe K, Ikegame M, Sasaki A, Nagatsuka H, Okamoto K, Okamura H, Ozaki K.	4. 巻 1866
2. 論文標題 Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis attenuate insulin sensitivity by delivering gingipains to the liver.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2020.165731.	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 Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Matsuo T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Sudachitin inhibits matrix metalloproteinase-1 and -3 production in tumor necrosis factor- α -stimulated human periodontal ligament cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1456-1462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-019-01007-z.	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 Hosokawa I., Hosokawa Y., Ozaki K., Matsuo T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Carnosic acid inhibits CXCR3 ligands production in IL-27-stimulated human oral epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1311-1316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-019-00991-6.	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 細川 義隆, 細川 育子, 尾崎 和美
2. 発表標題 Nobiletinはヒト歯根膜由来細胞のIL-1 誘導炎症性メディエーター産生を抑制する
3. 学会等名 日本歯科保存学会2021年度春季学術大会(第154回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 佳世, 吉田 賀弥, 瀨山 真莉子, 尾崎 和美
2. 発表標題 歯周病原菌感染マクロファージの細胞外小胞が肺に線維化を誘導する可能性の検証
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会(オンライン学術大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 佳世, 吉田 賀弥, 瀨山 真莉子, 尾崎 和美
2. 発表標題 歯周病原菌感染マクロファージの細胞外小胞が肺炎を誘導する可能性の検証
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会(オンライン学術大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 賀弥, 吉田 佳世, 藤原 奈津美, 尾崎 和美, 岡村 裕彦
2. 発表標題 感染マクロファージの膜小胞は歯周病関連疾患発症に関与するか?
3. 学会等名 第38回 分子病理学研究会 淡路島シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 奈津美, Shao Wenhua, 吉田 賀弥, 新垣 理恵子, 尾崎 和美, 石丸 直澄, 工藤 保誠
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatumが与える口腔癌細胞への影響
3. 学会等名 第38回 分子病理学研究会 淡路島シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木戸 理恵, 廣島 佑香, 生田 貴久, 吉田 賀弥, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 尾崎 和美, 木戸 淳一, 湯本 浩通
2. 発表標題 最終糖化産物はヒト口腔上皮細胞のリボカイン2発現を増加する
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
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
研究分担者	湯本 浩通 (YUMOTO Hiromichi) (60284303)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	
研究分担者	細川 義隆 (HOSOKAWA Yoshitaka) (90346601)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	細川 育子 (HOSOKAWA Ikuko) (50707908)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	

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
---------	---------