

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592795

研究課題名(和文) 菌体外マトリックスを標的とした成熟バイオフィーム制御のための多角的アプローチ

研究課題名(英文) Diversified approaches for the control of mature oral biofilms targeting to the matrices

研究代表者

竹中 彰治 (Takenaka, Shoji)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：50313549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：口腔バイオフィームは他の生体バイオフィームと違い、生体の切除を伴わず機械的に除去できるため、ブラッシングを主体とした機械的コントロールを原則としている。洗口液に代表される化学的コントロールは、清掃器具が届かない部位のバイオフィームを殺菌するために有効な手段であるが、バイオフィームは厚みの増加とともに、殺菌成分が浸透しにくくなっており短時間で有効な効果が得られにくい。本研究は、口腔健康維持のための簡便かつ効果的な新しいバイオフィームコントロール法を開発するためにバイオフィームの特性に注目した多方面アプローチを試みた。その結果、化学的コントロールが具備すべきいくつかの要件を見出した。

研究成果の概要(英文)：Oral Biofilms, unlike those formed at most other sites in the human body, are unique because surgical intervention is usually unnecessary for their removal. The control of oral biofilms relies mainly on mechanical elimination. A wide range of antimicrobial agents have been formulated into oral care products in order to enhance the effect of the mechanical plaque control. It is proven that the chemical control using antimicrobial compounds provides some antimicrobial benefit and improves the clinical parameters.

However, some reports have demonstrated that antimicrobial compounds do not effect as they are intended because of physiological heterogeneity in biofilms.

This project aimed to develop new strategies for the control of mature oral biofilms targeting to the matrices.

研究分野：保存治療系歯学

科研費の分科・細目：保存修復学

キーワード：バイオフィーム 化学的コントロール 浸透 共焦点レーザー顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の歯科臨床における成熟バイオフィームへの対応は、「機械的コントロール」を第一選択として行われているが、「化学的コントロール」も「機械的コントロール」の限界を補完する重要な意義を有している(竹中ほか: Bacterial Adherence&Biofilm 22, 1-6, 2008)。従来、「化学的コントロール」に使用される抗菌成分の効果は、その殺菌力により評価されてきた。しかし、成熟バイオフィームでは、菌体外マトリックスに被覆されることから、物質輸送の制限や各種免疫機構への抵抗性が生じるため、強力な抗菌剤を用いても十分な効果が得られないことが問題となっている(Costerton JW et al.: Science 284: 1318-1322, 1999)。

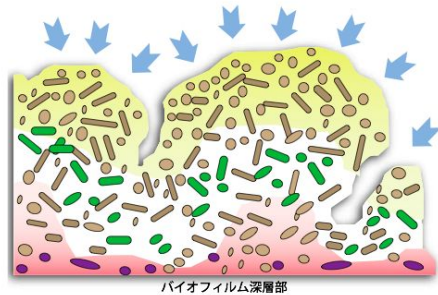


図1 バイオフィームの抗菌薬耐性メカニズム

殺菌成分はバイオフィームには浸透しづらく時間がかかる(黄色)。細菌が殺菌成分の浸透を感知して(緑)、遺伝子発現を調節し、内部の代謝を変えて対抗手段をとり(ピンク)、深層部細菌が生存する(紫)。抗菌薬(青矢印)。

(2) このため、これからの成熟バイオフィームに対する制御戦略は、菌体外マトリックスの特性を理解した上で、これをターゲットとした戦略の構築が必要である。菌体外マトリックスはその相互作用により、マトリックス間が結合するのみならず、抗菌成分を吸着する性質をも有している(Stewart PS: J Bacteriol 185: 1485-1491, 2003)。

## 2. 研究の目的

菌体外マトリックスを標的とした、成熟バイオフィームに対する新しい化学的制御戦略の確立を目的としている。

具体的には、以下の4つの制御戦略が考えられる。

- (1) 浸透・拡散性能に優れた抗菌成分の選定
- (2) バイオフィーム内部への抗菌成分の長期間保持および持続的徐放
- (3) マトリックス結合の分散
- (4) マトリックスの剥離

## 3. 研究の方法

(1) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する洗口液の浸透動態のリアルタイム解析

本研究の目的: 各種抗菌成分のバイオフィーム底面への到達をリアルタイムに観察することで、バイオフィーム内部への浸透・拡散能に影響を与える因子を推定する

*Streptococcus mutans* を用いた人工バイオフィームに対する各種洗口液の浸透速度、殺菌活性を calcein-AM (CAM) 染色法と共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いてリアルタイムに観察・解析した。この方法は、細菌内に浸透した CAM の蛍光が膜の完全性を有する細菌では保持されるが、膜が損傷された場合は菌体外に流出、消失することを利用するものである。さらに、洗口液 30 秒作用後の殺菌効果を生菌数測定法により、またバイオフィームの剥離能を CLSM により評価した。

(バイオフィーム形成) *Streptococcus mutans* ATCC 25175 株を、ガラスペースディッシュを用い 0.5% sucrose 含有 BHI 液体培地中で 24 時間嫌気培養することによりバイオフィームを形成させた (n=7)。

(洗口液) 国内外で販売されている4種類の洗口液で、主たる有効成分はクロロヘキシジン (CHX 群)、塩化セチルピリジニウム (CP 群)、イソプロピルメチルフェノール (IP 群)、エッセンシャルオイル (EO 群) である。

実験1: 洗口液のバイオフィーム深層部への膜傷害効果のリアルタイム解析

CAM を 2 時間作用させ生菌を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて断層像を採取したのち、焦点をバイオフィーム底面に固定し、各材料の作用直後から 15 秒間隔で 10 分間共焦点画像をリアルタイムに採取した。採取した共焦点画像から無作為に最もバイオフィームの厚みがある部位を含む 3 領域 (25  $\mu\text{m}$  四方) の厚みを算出し、同部の蛍光量の減少率および 50% 蛍光量減少までの時間 (T50) を算出した。

実験2: 洗口液 30 秒作用後の殺菌効果

各洗口液を 30 秒作用後、超音波振動 (20 秒) によりバイオフィームを回収した。バイオフィーム中の生菌数を Plate count 法、総菌数をインペーダー法により計測した (n=6)。

実験3: 洗口液 30 秒作用後のバイオフィームの剥離効果

SYTO9 を人工バイオフィームに作用させ核酸染色後、CLSM のステージに試料を乗せ焦点をバイオフィーム底面に固定した。各材料の作用前および 30 秒作用後の同一視野の共焦点画像を採取し、付着界面のバイオフィームの剥離効果を細菌密度の変化量により評価した。

(2) アルコールはバイオフィーム内部への浸透性を促進するか？

本研究の目的：これまでアルコールは物質を可溶化し浸透性を高めると考えられてきた。本実験では、アルコールの有無によるバイオフィーム内部への浸透性の差異を検証した。

*Streptococcus mutans* ATCC株をガラスベースディッシュを用いた静置系もしくはガラスキャピラリーを用いたフローセル系にてバイオフィーム形成後に、酵素活性により蛍光発現するCalcein-AMにて生菌染色を施した。試料を共焦点レーザー顕微鏡の観察ステージに固定し、0.12%アルコール含有/非含有グルコン酸クロルヘキシジン溶液もしくはアルコール含有/非含有リステリンを還流しながら、タイムラプス解析をおこなった。

(3) 殺菌処理後の残存バイオフィーム構造は浮遊細菌の二次付着とバイオフィーム再形成を促進するか？

本研究の目的：我々は(1)および(2)の実験において、口腔バイオフィームの成熟とともに抗菌物質の浸透率が低下し深層部では有効殺菌濃度に到達しないこと、またバイオフィームの殺菌処理後に付着界面にバイオフィーム構造物が残存することを報告した。本実験では残存バイオフィーム構造物が足場となり二次付着を促進するかどうかを検証した。

人工唾液処理を施した直径 6 mm, 厚み 1.5 mm のレジンディスク表面に *Streptococcus mutans* ATCC 25175 株を付着させた後、ディスクを Rotating Disc Reactor (RDR) に装填し、毎分 4.6 ml の速度で 0.05% スクロースを含む 1/10 濃度の BHI 液体培地を灌流させ 1 日または 3 日間好気培養することによりバイオフィームを形成させた。その後、70% イソプロピルアルコールに 120 分浸漬することにより死菌構造体とした。次いで、レジンディスクを再度 RDR に戻し、対数増殖期の同一株培養液を再度 15 分もしくは 4 時間灌流させた。バイオフィーム未形成のレジンディスクを対照群とした。

二次付着菌の観察は共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて行った。すなわち、試料に蛍光染色 (calcein-AM および rhodamine B) を施した後、CLSM を用いて三次元構築画像を作成した。さらに、厚さ 8  $\mu\text{m}$  の凍結縦断切片を各試料 ( $n = 6$ ) について 10  $\mu\text{m}$  おきに 20 枚作製し、CLSM 像の画像解析により、死菌構造体に対する二次付着菌の割合 (%; calcein-AM/ rhodamine B) を算出した。

また、生菌数を colony count 法、総菌数を PCR-Invader 法により計測した後、両者の関連を線形回帰分析で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する洗口液の浸透動態のリアルタイム解析

実験 1：すべての洗口液において、作用時間の経過とともにバイオフィームの厚みの薄い部位から蛍光が消失したが、EO 群を除いて 10 分作用後も蛍光が残存する領域が観察された。EO 群は蛍光消失が最も速やかで (2 元配置分散分析, Dunnett test,  $p < 0.05$ )、最大 135 秒ですべての蛍光が消失した。しかし、洗口液の使用時間に相当する 30 秒後では EO 群の平均蛍光量の減少率は 13-82% であり、1 回の洗口液の使用では深層部まで十分な殺菌効果を与えないと思われた。T50 はバイオフィームの厚みと高い正の相関関係にあり、平均浸透速度 ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) は 30.12 (EO 群), 7.06 (IP 群), 6.00 (CX 群) および 4.17 (CP 群) であった。

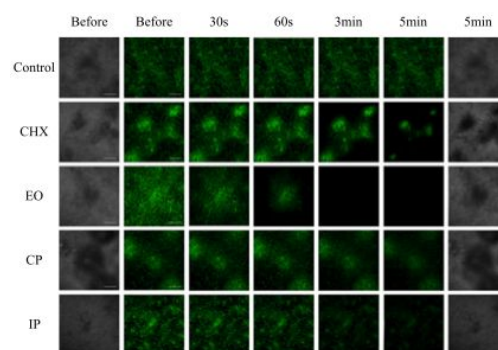


図2 *S. mutans* 人工バイオフィームに洗口液を作用させたときのバイオフィーム底面のリアルタイム観察像

実験 2：洗口液 30 秒作用後の生菌数は各洗口液ともコントロールと比較して有意に低下したが ( $p < 0.05$ )、最も減少率の大きい EO 群においても、 $7.71 \pm 0.58 \log\text{CFU}/\text{ml}$  (平均  $\pm$  SD) の細菌が寒天平板上に増殖可能であった。このことから、洗口液 30 秒の作用では、深層部の細菌へ十分な殺菌効果が及ばず増殖能が維持されることが示唆された。

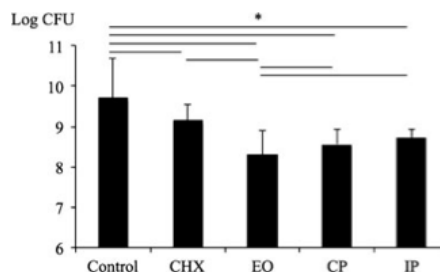


図3 洗口液 30 秒作用後の生菌数

実験3：洗口液 30 秒作用後の付着界面の細菌密度はコントロールと比較して有意に低下したが ( $p < 0.05$ )、その減少率はわずか 1.1-1.9%であった。また、総菌数には有意な減少は認められなかった ( $p > 0.05$ )。このことから、洗口液 30 秒の作用によるバイオフィルム剥離効果は微弱であることが示唆された。

結論：本実験に用いた洗口液に含まれる抗菌成分のうち、優れた浸透性を示した E0 の一成分であるチモールおよび IPMP は分子量が 150.22 の中性化合物、CHX および CP は陽イオン性化合物であり、分子量はそれぞれ 897.76 および 358.01 である。バイオフィルムが陰性に帯電していることから、抗菌成分の電荷および分子量がバイオフィルムへの溶質の浸透性に影響を与えている可能性が示唆された。

この結果から、成熟バイオフィルムを浸透・拡散能の優れた抗菌成分で制御する場合には、物質の電荷と分子量を勘案する必要があるが、バイオフィルムの殺菌処理後も付着界面にバイオフィルム構造が残存していた。常在菌が存在する特殊な器官である口腔内において、殺菌処理後も残存したバイオフィルム構造は新たなバイオフィルム形成の足がかりとなる可能性がある。もし残存構造体が浮遊細菌の二次付着を促進するならば、殺菌効果に頼ったバイオフィルム制御は第一選択とはならないと考えられる。

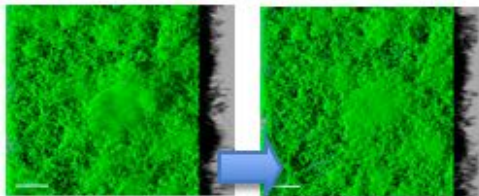


図4 洗口液処理前後 (30 秒) の *in vitro* バイオフィルムの三次元構築像。緑：SYT09 (核酸染色)。バイオフィルム構造に大きな変化がなく付着界面に残存している。

(2) アルコールはバイオフィルム内部への浸透性を促進するか？

バイオフィルムからの蛍光消失は同等の挙動を示し、蛍光量の減少率および浸透速度に有意な差は認められなかった。また、頻用されている Live/Dead 染色像においても同様の結果であった。Plate Count 法を用いた 30 秒作用後の生菌数も有意な差は認められなかった。さらに、いずれの群も迅速な殺菌効果を示したが、バイオフィルム構造の剥離効果は認められなかった。

結論：アルコールによるバイオフィルム内部への浸透性の向上は認められなかった。さらに、期待された付着界面からのバイオフィルム剥離能も観察できなかった。

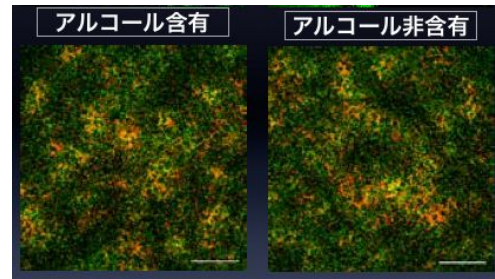


図5 0.12%アルコール含有/非含有ゲルコン酸クロルヘキシジン溶液30秒作用後のバイオフィルム底面の Live/Dead 染色像。両群に差は認められなかった。

(3) 殺菌処理後の残存バイオフィルム構造は浮遊細菌の二次付着とバイオフィルム再形成を促進するか？

三次元構築像では、殺菌処理後のバイオフィルム構造の上流側辺縁に沿って引っかかるように堆積する二次付着菌が観察された。凍結切片断層像の CLSM 解析から算出された二次付着菌の割合は、 $20.1 \pm 14.4\%$ であった。

一方、15 分灌流後の二次付着生菌数および総菌数は、3 日培養群が 1 日培養群および対照群と比較して有意に多かった ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test および Steel-Dwass test)。4 時間灌流後の生菌数および総菌数も、3 日培養群が対照群と比較して有意に多かった ( $p < 0.05$ )。対照群、実験群とも生菌数と総菌数との間には正の相関関係があり、回帰方程式と決定係数はそれぞれ  $y = 1.024x$ ,  $R^2 = 0.992$  (対照群) および  $y = 0.819x$ ,  $r^2 = 0.997$  (実験群) であった。

死菌構造体への二次付着が CLSM で明瞭に観察されたこと、および死菌構造体の増加とともに二次付着した生菌数が増加したことから、殺菌処理後も付着界面に残存したバイオフィルム構造体には細菌二次付着およびバイオフィルム再形成が生じやすいことが示唆された。このような二次付着は、*S. mutans* に限らず多種多様な細菌に見られる現象と考えられ、グルカン結合タンパクなどの *S. mutans* 特異的分子を介した凝集や非特異的結合が関与すると推定される。また、残存する死菌構造体はそれ自体がさまざまな病原性を示す可能性もある。さらに、今回の研究では完全に殺菌したバイオフィルムを用いたが、抗菌物質作用後にバイオフィルム内で生存する細菌の病原性や耐性にも注目すべきである。

結論：殺菌処理後に残存するバイオフィルム構造体は、細菌の二次付着を促進した。このため、残存バイオフィルム構造がバイオフィルム再形成の足場となることが示唆された。

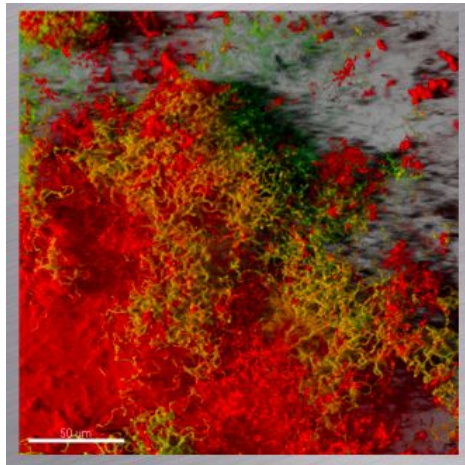


図6 4時間灌流後の共焦点画像（三次元構築画像）。緑：生菌、赤：死菌構造体。殺菌処理後のバイオフィーム構造の上流側辺縁に沿って引っかかるように堆積する二次付着菌が観察できる。

まとめ：これら一連の研究成果は抗菌物質による口腔バイオフィーム制御の限界を示すとともに、バイオフィームマトリックスを分散・剥離する戦略開発の必要性を示唆している。

新しい制御戦略として提示した

(3) マトリックス結合の分散

(4) マトリックスの剥離

における化学物質は現在数種類選定済みである。異なる細菌種の組み合わせによるバイオフィームモデル（マトリックス成分が異なるバイオフィームモデル）を用いて、非特異的に剥離・分散効果が得られるか検証中である。

## 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8件）

Wakamatsu R, Takenaka S, Ohsumi T, Terao Y, Ohshima H, Okiji T: Penetration kinetics of four mouthrinses into *Streptococcus mutans* biofilms analyzed by direct time-lapse visualization. Clin Oral Investig 18(2): 625-634, 2014. (査読有)

竹中彰治、大墨竜也、若松里佳、寺尾豊、大島勇人、興地隆史：アルコールフリー洗口液 Listerine Zero の *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する浸透・殺菌効果. 日歯保存誌 56(2): 105-112, 2013. (査読有)

小島千奈美、竹中彰治、大墨竜也、興地隆史：セルフケアにおける洗口液普及を目指したアンケート調査. 日歯誌 55(2): 148-155, 2013. (査読有)

竹中彰治、大墨竜也、興地隆史：新・臨床に役立つすぐれモノ リステリンナチュラルケア. デンタルダイヤモンド 38(13): 152-155, 2013. (査読無)

竹中彰治、渡邊美幸、興地隆史：洗口液なるほど活用術. DHstyle 7(4): 22-37, 2013. (査読無)

Takenaka S, Ohshima H, Ohsumi T, Okiji T: Current and future strategies for the control of mature oral biofilms—Shift from a bacteria-targeting to a matrix-targeting approach. J Oral Biosci 54(4): 173-179, 2012. (査読有)

大墨竜也、竹中彰治、若松里佳、大島勇人、興地隆史：殺菌処理後のバイオフィーム構造への *Streptococcus mutans* の二次付着について. Bacterial Adherence & Biofilm 26: 31-34, 2012. (査読無)

大墨竜也、竹中彰治、若松里佳、大島勇人、興地隆史：*Streptococcus mutans* バイオフィームに対する洗口液の膜傷害効果：Calcein-AM を用いたリアルタイム解析. Bacterial Adherence & Biofilm 25: 71-74, 2011. (査読無)

〔学会発表〕（計17件）

坂上雄樹、竹中彰治、大墨竜也、寺尾豊、興地隆史：*Streptococcus mutans* バイオフィームに対する高分子化合物の拡散性の検索. バイオフィームと複合系研究会, 宇都宮, 12/7-8, 2013.

竹中彰治：口腔バイオフィーム制御のための洗口液の意義と求められる諸性質は？日本歯科保存秋季学会（第139回）ランチオンセミナー, 秋田, 10/17-18, 2013（招待講演）

坂上雄樹、竹中彰治、大墨竜也、長谷川泰輔、若松里佳、寺尾豊、興地隆史：*Streptococcus mutans* バイオフィームに対する高分子化合物の拡散性の検索. 日本歯科保存秋季学会（第139回）, 秋田, 10/17-18, 2013.

長谷川泰輔、竹中彰治、大墨竜也、若松里佳、坂上雄樹、寺尾豊、興地隆史：バイオフィームを形成した *Streptococcus mutans* に対するリステリンナチュラルケアの膜傷害、殺菌効果. 日本歯科保存秋季学会（第139回）, 秋田, 10/17-18, 2013.

大墨竜也、竹中彰治、長谷川泰輔、若松里佳、坂上雄樹、寺尾豊、興地隆史：低濃度グルコン酸クロルヘキシジンが *Streptococcus mutans* バイオフィーム形成に与える影響. 日本歯科保存秋季学会（第139回）, 秋田, 10/17-18, 2013.

竹中彰治、興地隆史：リステリンナチュラルケアの *Streptococcus mutans* バイオフィルムに対する膜傷害効果。秋季日本歯周病学会学術大会（第 56 回），前橋，9/21-22，2013。

大墨竜也、竹中彰治、若松里佳、大島勇人、興地隆史： *Streptococcus mutans* バイオフィルムに対する洗口液の膜傷害・剥離効果。第 22 回日本歯科医学会総会，大阪，11/9-11，2012。

小島千奈美、竹中彰治、興地隆史：口腔ケア製品の使用状況および洗口液の使用感に関するアンケート調査。秋季日本歯周病学会学術大会（第 55 回），つくば，9/22-23，2012。

竹中彰治：バイオフィルム制御における洗口液の意義。日本歯科保存学会春季学術大会（第 136 回）ランチョンセミナー，宣野湾，6/28-29，2012。（招待講演）

大墨竜也、竹中彰治、若松里佳、興地隆史：殺菌処理後のバイオフィルム構造への *Streptococcus mutans* の初期付着について。日本歯科保存学会春季学術大会（第 136 回），宣野湾，6/28-29，2012。

Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Ohshima H, Okiji T: Secondary adhesion of *Streptococcus mutans* to disinfected biofilm structure. International Symposium on Oral Health Education and Research, Balikpapan, Indonesia, December 10-11, 2011.

大墨竜也、竹中彰治、若松里佳、興地隆史：殺菌処理後に残存したバイオフィルム構造への *Streptococcus mutans* の付着について。日本歯科保存学会秋季学術大会（第 135 回），大阪，10/20，2011。

若松里佳、竹中彰治、福島正義、興地隆史：光重合型コンポジットレジンの色調変化について。日本歯科審美学会学術大会（第 22 回），奈良，10/8-9，2011。

Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Ohshima H, Okiji T: Secondary adhesion of *Streptococcus mutans* to disinfected biofilm structure. 59th Annual Meeting of Japanese Association of Dental Research, Hiroshima, October 8, 2011.

Takenaka S: Matrix-targeting strategies for the control of mature oral biofilms. Leading edge of oral biofilm research —challenge for correct understanding of oral disease caused by biofilm—. 歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム（第 53 回），岐阜，9/30，2011。（招待講演）

大墨竜也、竹中彰治、若松里佳、興地隆史： *Streptococcus mutans* バイオフィルムに対する洗口液の膜傷害効果：Calcein-AMを用いたリアルタイム解析。第 25 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会，東京，7/8，2011。

竹中彰治、若松里佳、大墨竜也、福田敬、富田文仁、興地隆史： Listerine Zero の *Streptococcus mutans* バイオフィルムに対する膜傷害効果。日本歯科保存学会春季学術大会（第 134 回），浦安，6/9，2011。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹中 彰治 (TAKENAKA SHOJI)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：50313549

### (2) 研究分担者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA KUNIHICO)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：30220718

大島 勇人 (OHSHIMA HAYATO)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：70251824

興地 隆史 (OKIJI TAKASHI)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：80204098