

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20451

研究課題名(和文) 抗菌成分のストレス応答による複合バイオフィルム形成亢進機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of promoting in vitro multispecies biofilm formation by stress response with antimicrobial component

研究代表者

大墨 竜也 (Ohsumi, Tatsuya)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30759725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：in vitro複合系バイオフィルムモデルを用いて、低濃度抗菌成分作用下におけるストレス応答によるバイオフィルム形成促進機構を検討した。最小発育阻止濃度以下(sub-MIC)のグルコン酸クロルヘキシジン(CHG)作用後では、バイオフィルム量の増加が観察されたが生菌数の増加はみられなかったことから、マトリックス量が増加したものと推察された。sub-MICのCHGは、バイオフィルム中の細菌増殖ではなく、細胞外マトリックスの産生に影響を与えることでBF形成を促進させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of biofilm formation promotion by stress response under the action of low concentration antimicrobial component using in vitro complex biofilm model. After the action of chlorhexidine gluconate (CHG) below the minimum inhibitory concentration (sub-MIC), an increase in the amount of biofilm was observed but no increase in viable count was observed, so that the amount of matrix increased. It was inferred that CHG of sub-MIC promotes biofilm formation by influencing the production of extracellular matrix, not bacterial growth in biofilm.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：バイオフィルム ストレス応答 Calgary Biofilm Device 共焦点レーザー顕微鏡 複合バイオフィルムモデル 化学的制御 バイオフィルム形成関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

口腔内のバイオフィームは、う蝕と歯周病の二大疾患に深く関与している。そのバイオフィームの制御法として、ブラッシングをはじめとする機械的清掃に加え、それらが行き届かない場所へ抗菌成分を含む歯磨剤や洗口液などによる化学的制御が補完的に用いられるようになった。その結果、バイオフィーム深層部において、抗菌剤の浸透の遅延による濃度低下が発生し、深層部に存在する細菌の抗菌剤へのストレス応答により、クオラムセンシング(QS)を誘導することが確認されている。QSの誘導物質であるオートインデュサーの発現量の増加が、バイオフィーム形成を促進させ、病原性の亢進などの弊害をもたらすことが報告されつつある。

医療領域において、低濃度の抗生物質存在下でバイオフィーム形成が促進されるという報告がある(Kaplan et al.:Mbio 3, e00198-12, doi: 10.1128/mBio.00198-12, 2012)。また、う蝕病原性細菌である *Streptococcus mutans* は、単一でのバイオフィーム形成時よりも複数菌混合培養において、バイオフィーム形成関連遺伝子発現量と、マトリックスが増加することが報告されている(Xiao J et al.: PLoS Pathog8(4):e1002623.doi:10.1371/journal.ppat.1002623)。複合系において単一系とは異なるバイオフィーム形成動態を示すことが明らかとなっている。さらに、異種細菌を共培養した複合バイオフィームモデルにおいて菌体外マトリックス成分の増加が起こることが報告されている。つまり、複合系バイオフィームモデルにおいて低濃度抗菌成分の作用時にはさらにバイオフィーム形成量が増加することが推察される。したがって、抗菌剤による化学的制御の弊害が示唆され、新しい化学的制御手法の確立が求められている。申請者らは、口腔洗浄液の抗菌成分がバイオフィーム深層部へ必要な濃度で浸透せず、バイオフィーム内の細菌がストレス応答を起こし、バイオフィーム形成を促進することと、口腔洗浄後に残存したバイオフィーム構造体が、二次的バイオフィーム形成のための土台となり、バイオフィーム形成が起こりやすくなることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口内環境に近い *in vitro* 複合系バイオフィームモデルを用いて、低濃度抗菌成分の暴露下におけるストレス応答下でのバイオフィーム形成促進機構を明らかにすることである。これにより、抗菌成分に頼ったバイオフィーム制御の弊害の詳細を明らかにし、バイオフィームの構造体を標的とした新たな化学的制御方法の意義を提示する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 複合系バイオフィームモデルの構築

96個のPegと呼ばれるポリスチレン製で加工された突起物がマイクロプレートカバーの内側に設置されている Calgary Biofilm Device (CBD)を用いた。

Tryptone-yeast extract(TYE)培地にて培養し調製した菌液(OD₆₀₀=0.6)を、1:1:10³ [*S. mutans*: *S. oralis*: *A. naeslundii*]の割合で混合した。調整した菌液をあらかじめ唾液処理を行ったCBDに200μl分注し、12時間嫌気培養(N₂85%, CO₂10%, O₂5%)することで初期付着させたのち、0.1% sucrose含有TYE培地に移し4日間嫌気培養しバイオフィームを形成させた。培地は12時間ごとに交換した。4日後、1/10 MIC (0.06μg/ml)のCHG添加TYE液体培地(0.1% sucrose含有)中に2日間作用させた(n=4)。CHG非添加TYE液体培地中に2日間作用させたものをコントロール群とした。

(2) 形態学的観察

CBDからPegを回収し、固定、脱水、蒸着処理後、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

Calcein-AM および Rhodamine-Bにて蛍光染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いてXYZ連続断層像を撮影し、Imarisソフトウェアを用いて三次元構築した。

(3) 定量的分析

バイオフィームをLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kitにて染色したのち共焦点レーザー顕微鏡で連続断層像を撮影し、得られた画像から生菌死菌の割合をMetaMorph画像解析ソフトを用いて算出した。

生菌数を、バイオフィームをPegから剥離、回収したのち、BHI寒天平板上で嫌気培養をおこない、コロニーカウント法により算出した。

バイオフィーム中の各種細菌の構成比を解析するため、GenElute Bacterial Genomic DNA Kitsを用いて回収したバイオフィームからDNAを抽出し、リアルタイムPCRにて算出した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 複合系バイオフィームモデルの構築

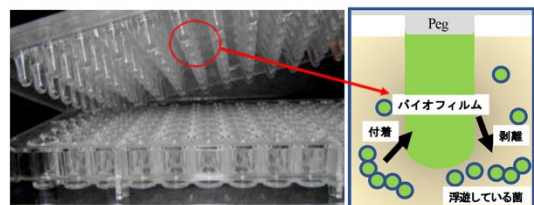


図1. バイオフィーム形成に用いた Calgary Biofilm Device

Pegは、マイクロプレートカバーから切断し、

直接観察可能のため、そのまま各種解析にかけることができる(図1)。

(2) 形態学的観察
走査型電子顕微鏡画像

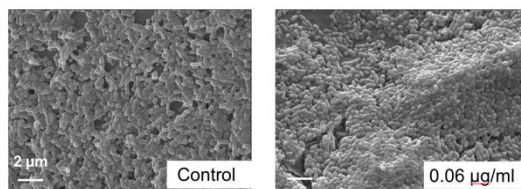


図2 . 複合バイオフィーム形成における sub-MIC の CHG 作用群と対照群との走査型電子顕微鏡画像の比較

両群ともに、球菌主体とするバイオフィームが観察された。また、コントロール群ではモノレイヤーのバイオフィーム構造が観察されたのに対し、作用群ではマルチレイヤーからなる厚みをもったバイオフィーム構造が観察された(図2)。

CLSM 三次元構築画像

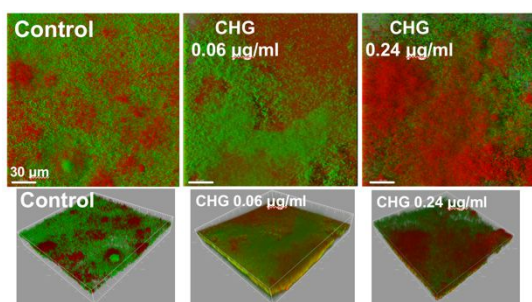


図3 . Calcein-AM および Rhodamine-B にて蛍光染色を施した CLSM 三次元構築画像

緑が生菌、赤がバイオフィーム構造を示す。各スライス画像における、赤色で示すバイオフィーム構造の平均割合は、Control 群 53%、CHG 0.06 μg/ml 群 77%、CHG 0.24 μg/ml 群 80%であり、CHG 0.24 μg/ml 作用群では、Control 群と比較してバイオフィーム構造の有意な増加を認めた(図3)。

(3) 定量的分析
CLSM 蛍光イメージング画像による解析

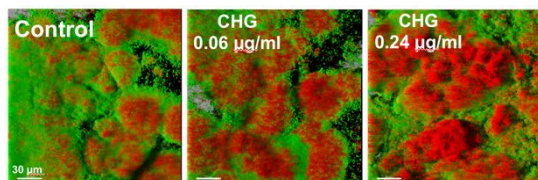


図4 . LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit による染色後の蛍光イメージング画像

緑が生菌、赤が死菌構造を示す。連続断層像の各スライス画像から死菌の割合を算出した。Control 群 44%、CHG 0.06 μg/ml 群 46%、CHG 0.24 μg/ml 群 51%で、各群間で作用群に

増加傾向はみられるものの有意な差は認められなかった(図4)。

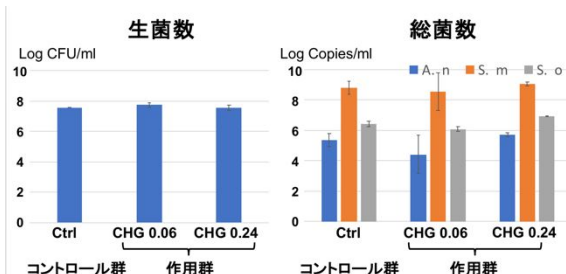


図5 . コロニーカウント法による生菌数測定とリアルタイム PCR によるバイオフィーム中の3菌種の構成比

コロニーカウント法による生菌数
生菌数は、各群間で有意な差は認めなかった(図5)。

バイオフィーム中の各種細菌の構成比の算出結果

バイオフィームを構成する各菌の割合も、各群間で有意差を認めなかった(図5)。

sub-MIC の CHG 作用後では、バイオフィーム量の増加が観察されたが生菌数の増加はみられなかったことより、マトリックス量が増加したものと推察された。

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 3件)
1. Nagai K, Domon H, Oda M, Shirai T, Ohsumi T, Terao Y, Arai Y: Antimicrobial activity of ethylene-vinyl acetate containing bioactive filler against oral bacteria. Dent Mater J. doi: 10.4012/dmj.2016-321, 2017. (査読有)
 2. Takenaka S, Oda M, Domon H, Ohsumi T, Suzuki Y, Ohshima H, Yamamoto H, Terao Y, Noiri Y: Vizantin inhibits bacterial adhesion without affecting bacterial growth and causes *Streptococcus mutans* biofilm to detach by altering its internal architecture. Biochem Biophys Res Commun 480(2): 173-179, 2016. (査読有)
 3. Takenaka S, Oda M, Domon H, Ohsumi T, Suzuki Y, Ohshima H, Yamamoto H, Terao Y, Noiri Y: Vizantin inhibits bacterial adhesion without affecting bacterial growth and causes *Streptococcus mutans* biofilm to detach by altering its internal architecture. Biochem Biophys Res Commun 480(2): 173-179, 2016. (査読有)

〔学会発表〕(計 7件)

1. Hasegawa T, Takenaka S, Oda M, Suzuki Y, Sakaue Y, Ohsumi T, Noiri Y: Sulfated vizantin inhibits bacterial adhesion without affecting bacterial growth and causes *ex vivo* oral biofilm to detach by hydrophilic surface property. Niigata-Taiwan University Dental Research Symposium, November 18-19,2017, Taipei, Taiwan.
2. 鈴木裕希, 大墨竜也, 長谷川泰輔, 竹中彰治, 野杵由一郎: Sub-MIC のグルコン酸クロルヘキシジンが *in vitro* 複合バイオフィーム形成に与える影響. 日本歯科保存学会 2017 年秋季学術大会 (第 147 回), 盛岡, 2017 年 10 月 26-27 日
3. 永田量子, 大墨竜也, 鈴木裕希, 長谷川泰輔, 竹中彰治, 野杵由一郎: *in vitro* バイオフィームモデルを用いた *Helicobacter pylori* の形態学的検索. 日本歯科保存学会 2017 年秋季学術大会 (第 147 回), 盛岡, 2017 年 10 月 26-27 日
4. 長谷川泰輔, 竹中彰治, 小田真隆, 鈴木裕希, 坂上雄樹, 大墨竜也, 野杵由一郎: 結核菌表層糖脂質誘導体の口腔バイオフィーム形成に与える影響. 第 31 回日本バイオフィーム学会学術集会, 筑波, 2017 年 7 月 7-8 日.
5. 長谷川泰輔, 竹中彰治, 小田真隆, 鈴木裕希, 坂上雄樹, 大墨竜也, 野杵由一郎: *Ex vivo* モデルを用いた結核菌表層糖脂質誘導体 (ピザンチン) のバイオフィーム形成への影響. 日本歯科保存学会 2017 年春季学術大会 (第 146 回), 盛岡, 2017 年 6 月 8-9 日
6. 竹中彰治, 小田真隆, 黒澤美絵, 土門久哲, 大墨竜也, 寺尾豊, 野杵由一郎: 結核菌表層糖脂質誘導体の *Streptococcus mutans* バイオフィーム形成に与える影響. 日本歯科保存学会 2016 年秋季学術大会 (第 145 回), 松本, 2016 年 10 月 27-28 日
7. 坂上雄樹, 土門久哲, 小田真隆, 竹中彰治, 大墨竜也, 寺尾豊, 野杵由一郎: *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する厚朴由来抽出物の殺菌効果. 第 30 回日本バイオフィーム研究学会学術集会, 東京, 2016 年 7 月 2 日, 同集会抄録集: 44 頁, 2016 .

〔図書〕(計 2件)

1. Takenaka, S., Oda, M., Domon, H., Wakamatsu, R., Ohsumi, T., Terao, Y., & Noiri, Y. Adverse Influences of Antimicrobial Strategy against Mature Oral Biofilm. In Microbial Biofilms-Importance and Applications (Chapter 18), 425-439, InTech, 2016, ISBN 978-953-51-2436-8.
2. 大墨竜也, 野杵由一郎: 根管治療時に考慮すべき上顎前歯の解剖. 歯内療法のレベルアップ&ヒント, 北村和夫 編著

デンタルダイヤモンド社, 東京, 20-21 頁, 2017.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大墨 竜也 (Ohsumi Tatsuya)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 30759725