

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18961

研究課題名(和文)新規口腔バイオフィーム感染制御法の基盤となる鉄キレート抗菌作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of antibacterial action mechanism of iron chelator as a basis of controlling oral biofilm

研究代表者

伊東 有希(信田有希)(Ito-Shinoda, Yuki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80771162

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):スーパーポリフェノール(SP: SP1, 5, 6, 9, 10)はそれぞれ異なる構造式をもつ新規鉄キレート剤である。SPの口腔細菌に対する網羅的な抗菌効果の検討から, SP5, 6, 10にその効果が示唆された。中でも特に抗菌効果の高かったSP6とSP10に着眼したところ, 両者ともに齲蝕病原細菌であるStreptococcus mutans (Sm)のバイオフィーム形成を抑制した。さらに, SP作用時のSmの生存能試験の結果から, SPは静菌的に抗菌作用を発揮することが示唆された。一方でヒト歯肉線維芽細胞を用いたSPの細胞傷害性試験では, 抗菌作用を有する濃度での細胞傷害性を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた我が国で増加する要介護高齢者は, 自身での口腔清掃が困難なことが多く, 口腔衛生状態悪化により口腔内にバイオフィームが蓄積される。そこで医療従事者による衛生管理が必要であるが, 医療従事者が費やせる労力や時間は限られる。

SPはバイオフィーム形成初期に関与する齲蝕病原細菌であるStreptococcus mutansに対して静菌的な抗菌作用を認め, 口腔内の細菌叢を大きく変えることなく口腔感染症をコントロールできる新規薬剤としての可能性があるということが判明した。今後の実用化次第では口腔衛生管理における補助的薬剤として医療従事者の負担軽減および口腔衛生管理の効率化に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文): This study was aimed to evaluate the inhibitory effects of novel iron chelators, the super-polyphenols (SPs) which has different isoforms respectively, on oral bacteria. We found that SP5, 6 and SP10 inhibited oral bacterial growth and the further examination revealed SP6 and SP10 suppressed biofilm formation of cariogenic Streptococcus mutans (Sm). Viability test on Sm indicated their effects to be bacteriostatic. These results suggest that SP6 and SP10 have the potential to control oral bacterial infections. However, cytotoxicity to human gingival fibroblasts were observed even by the lowest effective concentration of SPs on bacteria.

研究分野: 歯周病態学, 歯科保存学

キーワード: 鉄キレート剤 口腔バイオフィーム 齲蝕病原菌 抗菌性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えたわが国において、増加傾向にある要介護高齢者は日常動作能力（ADL）が低下して、高齢者自身による歯磨きなどのセルフコントロールが難しくなる。そのため、ADLが低下した要介護高齢者の口腔内には多量のバイオフィームが蓄積して、口腔バイオフィーム感染に起因する誤嚥性肺炎などの全身疾患の発症数が増加する。

現在、このような要介護高齢者の口腔衛生管理は医療従事者（歯科医師、歯科衛生士、看護師、介護士など）が行っているが、歯磨きによる口腔バイオフィーム除去や、スケーリングによる歯石除去という物理的手法に頼っているのが現状で、大きな時間とマンパワーを要するため、医療現場は疲弊し悲鳴をあげている。そのため、抗菌剤などによる化学的手法も検討されてはいるが、菌交代現象や耐性菌出現などの問題があり、実際の臨床介護現場に応用できる化学的手法は限られる。

このような医療現場において、より簡単に口腔の清潔が保たれる新たな手法を開発することができれば、患者の健康寿命の延伸および Quality of Life の向上、医療費の削減、および医療従事者の負担軽減につながるはずと考える。

上記背景から、申請者は新たな口腔バイオフィーム感染制御手法として、生体における必須ミネラルの一つである「鉄」のコントロールに着目し、研究を進めてきた。鉄は生体にとって生命を維持するために必要不可欠な微量金属元素であり、細菌においても同様に鉄が不足するとその増殖は抑制される。

一方で、慢性鉄過剰症などに臨床応用されている Deferoxamine (DFO) や Deferasirox (DFX) に代表される経口鉄キレート剤は、鉄キレート効果が強い反面、下痢、嘔吐等の副作用の問題がある。そのため、DFO や DFX をそのまま介護現場での口腔感染コントロールに用いることは難しい。そこで、報告者は既存の鉄キレート剤ではなく、新規の生体低侵襲性鉄キレート剤・スーパーポリフェノール (SP) に着目し、これまで研究を遂行してきた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、SP の口腔細菌への抗菌効果の有無、口腔バイオフィーム形成に対する抑制効果の有無を検討するとともに、除鉄（鉄キレート）の抗菌メカニズムを解明することである。さらに、SP を実用化し、医療従事者による口腔衛生管理の負担軽減の一助となることを最終的な目的としている。

### 3. 研究の方法

新規鉄キレート剤 SP（株式会社 DASTec から供与）の口腔細菌への抗菌性を調べるため、齶蝕病原細菌である *Streptococcus mutans* ATCC25715 (Sm) および歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 (Aa) を用いて下記を検討した。Sm は Yeast 添加の tryptic soy broth (TSBY) 中で好気培養し、Aa は TSBY に 8% 重炭酸ナトリウムを添加した液体培地中で対数増殖期になるまで嫌気培養し用いた。また、SP は滅菌水に溶解させて 10 mg/mL の stock solution を作製し、濃度勾配を付与して各検討に用いた。陽性対象条件として 1% ポピドンヨードを使用し、陰性対象条件として薬剤無添加および滅菌水を使用した。

#### (1) SP が細菌増殖に与える影響の検討

マイクロプレート上で上記口腔細菌  $1 \times 10^6$  CFU/mL を SP1, 5, 6, 9, 10 添加の液体培地中で培養し、18 時間後に濁度を測定した。

#### (2) SP が口腔バイオフィーム形成に与える影響の検討

上記 (1) での検討で特に抗菌効果の高かった SP6 および SP10 の Sm バイオフィーム形成における阻害効果を調べた。すなわち、SP6 および SP10 を TSBY に 1% sucrose を添加した液体培地 (TSBYs) 中で Sm  $1 \times 10^6$  CFU/mL を 37°C で 18 時間培養した後、クリスタルバイオレット溶液を用いてバイオフィームを染色し、99.5% エタノール中に溶出した同染色剤の吸光度を測定し定量化した。

#### (3) SP が細菌の鉄取り込みに与える影響の検討

SP が Sm の鉄取り込みに与える影響を検討するため、2 価の遊離鉄イオン検出キット (Ferro Orange : 同仁化学研究所, 熊本) を用いて SP6 および SP10 存在下での細菌内の遊離鉄を測定した。すなわち、TSBY 中で Sm  $1 \times 10^9$  CFU/mL を 6 時間培養後、回転数 3000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去後リン酸緩衝食塩水 (PBS) での 3 回洗浄し、再度 PBS に溶解させ、前述の遊離鉄イオン検出キットで染色後、蛍光度を測定し定量化した。

#### (4) SP が細菌形態に与える影響の検討

SP が Sm の細菌形態に与える影響を調べるため、SP6 および SP10 存在下で Sm  $1 \times 10^9$  CFU/mL を培養し、グラム染色後の細菌形態を位相差顕微鏡下で観察した。

#### (5) SP が細菌の生存能に与える影響の検討

SP が Sm の生存能に与える影響を検討するため、SP6 および SP10 存在下で Sm  $1 \times 10^9$  CFU/mL を培養し、LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit (Life Technologies, USA) を用いて染色し、蛍光顕微鏡を用いて細菌形態を観察した。

#### (6) SP がヒト由来細胞に与える影響の検討

SP6 のヒト由来細胞への細胞障害性の有無を検討するため、ヒト歯肉から初代培養したヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) (岡山大学病院 倫理委員会承認番号 661) を SP 含有の 10% fetal bovine serum (FBS) 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中で培養し、24 時間後に MTS アッセイ (CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay: Promega, USA) を実施し、吸光度測定により定量化した。

### 4. 研究成果

#### (1) SP が細菌増殖に与える影響の検討

まず、スクリーニングとして SP1, 5, 6, 9 における口腔細菌への抗菌性について検討したところ、1,000  $\mu$ g/mL 以上の SP5 および 300  $\mu$ g/mL 以上の SP6 が抗菌性を持つことがわかった。一方で、SP1 の基本構造である chitosan は抗菌性を示さなかった。次に、SP6 と異なる基本構造式に同様のキレート部を持つ SP10 の抗菌性を調べたところ、SP10 は 300  $\mu$ g/mL 以上の濃度で Sm を、1000  $\mu$ g/mL 以上で Aa の増殖を抑制することがわかった。

#### (2) SP が口腔バイオフィルム形成に与える影響の検討

上記研究成果 (1) の結果より、これ以降は抗菌性の高かった SP6 および SP10 に着目して検討した。クリスタルバイオレット染色液を用いた比色法による検討結果から、SP6 は 300  $\mu$ g/mL 以上で、SP10 は 500  $\mu$ g/mL 以上で有意に Sm バイオフィルム形成を抑制した。

#### (3) SP が細菌の鉄取り込みに与える影響の検討

1,000  $\mu$ g/mL の SP6 および SP10 は、SP 非存在下での Sm と比較して細菌内への鉄取り込み量が減少していた。1%ポピドンヨード添加群の Sm でも鉄取り込み量は減少していたが、その減少量は SP と比較すると小さかった。

#### (4) SP が細菌形態に与える影響の検討

低濃度 (100  $\mu$ g/mL) および高濃度 (1,000  $\mu$ g/mL) いずれの SP 存在下でも、陽性対象条件である 1%ポピドンヨード添加群、陰性対象条件である薬剤無添加群と比較して、Sm の連鎖形態に変化はなかった。

#### (5) SP が細菌の生存能に与える影響の検討

低濃度 (100  $\mu$ g/mL) および高濃度 (1,000  $\mu$ g/mL) いずれの SP 存在下でも、細菌は生存していたが、陽性対象条件である 1%ポピドンヨード添加群では細菌は損傷していた。

#### (6) SP がヒト由来細胞に与える影響の検討

SP6 では HGF に対して 300  $\mu$ g/mL 以上、SP10 では 100  $\mu$ g/mL 以上で陽性対象条件である 1%ポピドンヨードと同等に細胞傷害性があることがわかった。

上記の研究成果から、SP は口腔細菌に対して抗菌効果を持つこと、齲蝕病原細菌が形成するバイオフィルム形成を抑制することがわかった。また、その効果は細菌内への鉄取り込みを阻害することにより生じている可能性、および静菌的な作用様式である可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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