

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年～2011 年

課題番号：22791830

研究課題名（和文）菌体外マトリックスをターゲットとした成熟バイオフィルムの制御戦略の確立と臨床応用

研究課題名（英文）Establishment of the control strategy of mature biofilm and clinical application which targeted the exopolysaccharide matrix

研究代表者 若松里佳（WAKAMATSU RIKA）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：80422616

研究成果の概要（和文）：本研究は、*Streptococcus mutans* を用いた人工バイオフィルムに対する各種洗口液の浸透動態を calcein-AM (CAM) 染色法と共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いたリアルタイム観察にて解析した。この方法では、細菌内に浸透した CAM の蛍光が膜損傷により消失する過程を経時的に観察することが可能である。さらに、洗口液の殺菌効果を生死分別染色法や生菌数測定法で検証するとともに、洗口液のバイオフィルム剥離能も併せて検索した。

その結果、CAM 染色法を用いた CLSM によるリアルタイム解析により、*S. mutans* バイオフィルムに対して四種の洗口液が異なる浸透動態を呈することが明確となった。中でもチモールは浸透が最も迅速で、高い膜傷害効果を有することが示された。一方、膜傷害が細菌の死滅や剥離を必ずしも意味しないことも併せて示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to analyze the penetration kinetics of a variety of mouthrinses containing different active ingredients into in vitro *Streptococcus mutans* biofilms using calcein-AM (CAM) and time-lapse confocal laser scanning microscopy. This technique is possible to observe temporally the process in which the fluorescence of CAM which permeated in bacteria disappears by membrane disruptive. Furthermore, verify the bactericidal effect of mouthrinse used fluorescent bacterial viability stain and viable cell counts, the biofilm detachment ability of mouthrinse was searched together with them.

In conclusion, time-lapse microscopic analysis with CAM fluorescent labeling demonstrated that the four mouthrinses showed different penetration kinetics in *S. mutans* biofilm. Thymol showed the greatest penetration velocity, indicating its high membrane disruption ability.

Meanwhile, suggesting that membrane disruption does not always indicate death and/or detachment of bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：保存修復学

## 1. 研究開始当初の背景

バイオフィルムの概念は歯科界においても定着した。口腔内バイオフィルムの制御戦略は、バイオフィルムの各形成ステージごとに提示される。これらの形成ステージのうち、成熟バイオフィルムに対する制御を考える場合には菌体外マトリックス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だけでなく抗菌成分をも吸着する性質を持っている。菌体外マトリックスをターゲットとした戦略は、(1)浸透性の良い抗菌成分を送り込む(2)粘着性の結合を分散させる(3)マトリックスの剥離の3つの可能性が考えられるが、申請者らの研究グループは既に(1)について検討を重ね、抗菌成分を用いる場合には、物質の分子量、電荷(チャージ)、親水疎水性のバランス、菌体外マトリックスへの感受性などがバイオフィルム深層部への浸透への影響を与えることを明らかにするとともに、これらの各因子のなかで物質の持つ「電荷(チャージ)」が重要であることを報告している。

本プロジェクトは、これまでの研究成果を発展させ、臨床応用可能な浸透性に優れた抗菌成分を検証するとともに、上記(2)および(3)のマトリックスの分散、剥離により成熟バイオフィルムの制御法を模索するものである。

## 2. 研究の目的

齶蝕は歯面上に形成されて細菌バイオフィルム(歯垢)を発端とするプロセスである。歯質と微生物堆積の間の平衡障害の結果、細菌の酸性代謝産物の作用によって歯のミネラルが失われる。したがって、歯のバイオフィルムのコントロールが、齶蝕病変の発生および進行を防止するために不可欠である。機械的除去に加えて、歯のバイオフィルムのコントロールを目的として各種の抗菌有効成分が使用されている。しかしながら、他のバイオフィルムと同様に、抗菌剤の浸透を阻止して細菌を保護する細胞外マトリックスの存在により、歯垢も抗菌剤に対して抵抗性を発揮する。このため、塗布時間が短い(約30秒)、唾液により希釈される等、使用上の限界を有する洗口剤をはじめとする抗バイオフィルム剤には高度の浸透性が要求される。

バイオフィルム内での抗菌作用を測定および描出するためのほとんどの方法では、生菌数測定またはエンドポイント染色が行われている。しかしながら、複数の時点における特異的局在を観察することができないため、これらの方法では有効成分の浸透性を評価することは難しい。リアルタイム解析でバイオフィルムを観察することにより、空間と時間の両方に関する情報を入手することが

可能である。空間に関する情報は、バイオフィルムにおいて、抗菌剤との接触で各種反応を示している限局されたニッチの検出を容易にする。時間に関する情報から、抗菌剤がバイオフィルム内部に浸透するための時間スケールと保護機序が得られる。このアプローチにより、例えば、細菌分散、多形核好中球によるバイオフィルムの貪食、遺伝子発現の一時的パターン、溶質のバイオフィルム内部への拡散浸透が明らかにされる。しかしながら、口腔バイオフィルム内部への有効成分の浸透に関する時間スケールをとり上げた研究はほとんど報告されていない。

本研究における我々の目的は、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を使用し、異なる有効成分を含む4種類の洗口剤の*in vitro*培養 *Streptococcus mutans* バイオフィルム内への浸透動態をリアルタイム解析することである。蛍光量の減少につれて細菌細胞の非侵襲的蛍光標識および細胞膜浸透化を描出することを可能にする Calcein-AM(CAM)を使用した。このテクニックにより、抗菌剤がバイオフィルム内部に浸透するための時間スケール、抗菌剤の攻撃に対する細菌細胞の相対的感受性における空間的相違、バイオフィルムからのバイオマスの除去に関する情報が得られる。リアルタイム解析の際に役立つように、一般に使用されている Live/Dead 染色法、生細胞数測定および剥離試験を用いて、洗口剤の抗バイオフィルム作用について評価した。

## 3. 研究の方法

主要有効成分をクロルヘキシジン(CHX)、塩化セチルピリジニウム(CP)、イソプロピルメチルフェノール(IP)、およびチモール(TH)とする4種の洗口液を検索対象とした。また、リン酸緩衝液をコントロールとした。

*Streptococcus mutans* ATCC 25175株を、ガラスベ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ルムを形成させた。

### 1. 洗口液のバイオフィルム深層部への浸透動態のリアルタイム解析

CAMで生菌を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて断層像を採取したのち、焦点をバイオフィルム底面に固定し、15秒間隔で10分間共焦点画像を採取した。これらの画像から無作為に最もバイオフィルムの厚みがある部位を含む3領域(25  $\mu$ m<sup>4</sup>)を選び、同部における厚み、蛍光量減少率および50%蛍光量減少までの時間(T50)を算出した。

### 2. 洗口液の殺菌効果の検証

各洗口液を30秒作用後、SYTO9/propidium

iodideによる生死分別蛍光染色を施し、CLSM像の画像解析により死菌率を求めた。また、洗口液を30秒間作用させたバイオフィルムを超音波振動により回収し、生菌数をPlate count法で求めた。

### 3. 洗口液のバイオフィルム剥離効果

バイオフィルムを SYTO9 で核酸染色後、シャーレ底面部の同一視野での共焦点画像を洗口液作用前および 30 秒間作用後に採取し、画像解析により細菌密度減少率を算出した。また、洗口液作用前後の総菌数をインベーター法で求めた。

### 4. 研究成果

リアルタイム解析の結果、すべての洗口液で作用時間の経過とともにバイオフィルムの厚みの薄い部位から蛍光が消失した(図1)。T50はバイオフィル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 (TH)、7.06 (IP)、6.00 (CX)および4.17 (CP)であった。TH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(図2)。しかし、洗口液の使用時間に相当する30秒後ではTHにおいても蛍光量減少率は13-82%であり、深層部まで必ずしも十分な浸透を示さないものと思われた。

生死分別蛍光染色の結果はリアルタイム解析と同様の傾向を示しており、洗口液30秒作用後の死菌率はTHでは平均99.8%と最も高率であった(表1)。一方、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THにおいても  $7.71 \pm 0.58 \log\text{CFU}/\text{ml}$ (平均  $\pm$  SD)の細菌が増殖可能であった。従って、膜損傷を指標として死菌と判定された細菌の一部が増殖能を保持していることが示唆された(図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1.1-1.9%であった(表2)。また、総菌数に有意な減少は認められなかった( $p > 0.05$ )(図4)。従って、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と思われた。

以上のことから、CAM 染色法を用いた CLSM によるリアルタイム解析により、*S. mutans* バイオフィルムに対して四種の洗口液が異なる浸透動態を呈することが明確となった。中でも TH は浸透が最も迅速で、高い膜傷害効果を有することが示された。一方、膜傷害が細菌の死滅や剥離を必ずしも意味しないことも併せて示唆された。

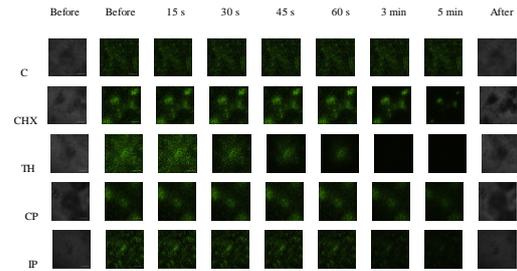


図 1. グルコン酸クロロヘキシジン(CHX)、チモール(TH)、塩化セチルピリジニウム(CP)、イソプロピルメチルフェノール(IP)を含む洗口剤が CAM(緑色)で染色した *S. mutans* バイオフィルムに及ぼす抗菌作用を示している代表的画像。緑色の減少は、細胞の浸透化を示している。左右の列は、それぞれ処理前後のバイオフィルム構造を示している透過像である。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  である。

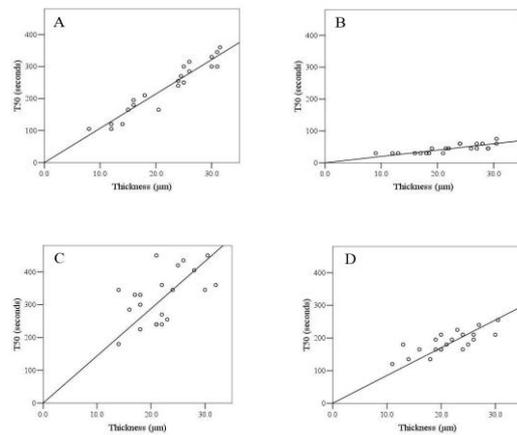


図 2. CHX(A)、TH(B)、CP(C)、IP(D)を含む洗口剤による処理期間中における *S. mutans* バイオフィルムへの抗菌作用の浸透。T50 は初期蛍光強度の 50%に到達するのに要する時間である。

表 1. グルコン酸クロロヘキシジン(CHX)、チモール(TH)、塩化セチルピリジニウム(CP)、イソプロピルメチルフェノール(IP)を含む洗口剤と 30 秒間接触した後に Live/Dead で染色した *S. mutans* バイオフィルムにおけるヨウ化プロピジウム(PI)陽性ピクセルの割合

	Active	PI-positive % (SD)
Control		11.7 (3.2)
CHX		28.3 (6.2) <sup>a</sup>
TH		99.8 (0.1)
CP		39.5 (7.2) <sup>a</sup>
IP		80.3 (8.2)

同一の上付き文字が付与されている数値に有意差はみられなかった( $p > 0.05$ )。

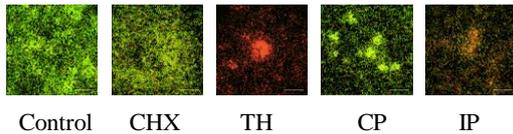


図 3. グルコン酸クロルヘキシジン(CHX)、チモール(TH)、塩化セチルピリジニウム(CP)、イソプロピルメチルフェノール(IP)を含む洗口剤と 30 秒間接触した後、Live/Dead 染色された *S. mutans* バイオフィーム底面を撮影した代表的な画像。緑色は CYTO9(全細胞)、赤色はヨウ化プロピジウムピクセル(膜浸透化細胞)をそれぞれ示している。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  である。

表 2. グルコン酸クロルヘキシジン(CHX)、チモール(TH)、塩化セチルピリジニウム(CP)、イソプロピルメチルフェノール(IP)を含む洗口剤を 30 秒間塗布した後の *S. mutans* バイオフィーム底面における細胞密度の減少率

Active	Reduction ratio of cell density % (SD)
Control	0.1 (0.5)
CHX	1.8 (0.7) <sup>a</sup>
TH	1.2 (0.5) <sup>a</sup>
CP	2.0 (0.3) <sup>a</sup>
IP	2.0 (2.1) <sup>a</sup>

同一の上付き文字が付与されている数値に有意差はみられなかった( $p>0.05$ )。

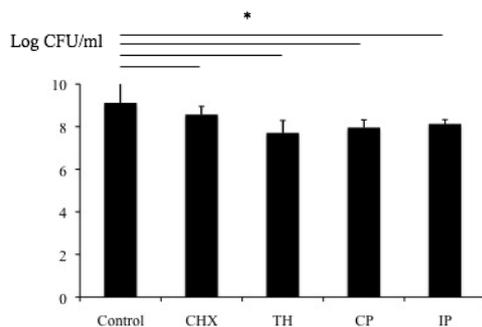


図 4. グルコン酸クロルヘキシジン(CHX)、チモール(TH)、塩化セチルピリジニウム(CP)、イソプロピルメチルフェノール(IP)を含む洗口剤と 30 秒間接触した後の *S. mutans* バイオフィームにおける生菌数。\* $p<0.05$ 。

#### 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 2 件)

① Wakamatsu R, Takenaka S, Ohsumi T, Ohshima H, Okiji T Direct time-lapse visualization of antimicrobial action of four mouthrinses against *Streptococcus mutans* biofilms Caries Research 査読無 Vol.46 2012 in press

②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剤の膜傷害効果: Calcein-AM を用いたリアルタイム解析 Bacterial Adherence & Biofilm 査読無 Vol.25 2012 in press

[学会発表] (計 9 件)

① 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 第 22 回日本歯科審美学会学術大会 2011 年 10 月 8-9 日 奈良

② 若松里佳, 竹中彰治, 大島勇人, 興地隆史 洗口剤および液状歯磨剤の *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する膜傷害・剥離効果 平成 23 年度新潟歯学会第 1 回例会 2011 年 7 月 9 日 新潟

③ 若松里佳, 竹中彰治, 大墨竜也, 興地隆史 洗口剤および液状歯磨剤の *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する膜傷害・剥離効果 日本保存学会 2011 年春季学術大会(第 134 回) 2011 年 6 月 9-10 日 千葉

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://t-planet.jp/restend2/fig/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若松 里佳(WAKAMATSU RIKA)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：80422616

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：