

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862034

研究課題名(和文) 病原性口腔内バイオフィーム新規制御法の確立

研究課題名(英文) Establishment of pathogenic oral biofilm regulation approach

## 研究代表者

伊藤 龍朗 (Ito, Tatsuro)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：60635126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕は*S. mutans*のバイオフィーム(B.F.)に起因しており、ペリクルへの初期付着から始まる。本研究では初期付着の阻害に主眼を置き、SspBペプチドを用いた*S. mutans*のB.F.制御法の確立を目的とした。(1) ヒト唾液との反応性が最も高いSspBペプチド(A4K-A11K)による初期付着阻害効果は、*S. mutans*に特異的に認められた。(2) A4K-A11Kに殺菌作用は認められなかった。(3) A4K-A11Kを添加して*S. mutans*を培養すると、疑似ペリクル上のB.F.形成は抑制された。以上より、A4K-A11Kは新規 B.F.制御法に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The binding of *S. mutans* to the salivary pellicle is a key event in oral biofilm (B.F.) formation. In addition, B.F. is a reservoir of drug resistance genes. Hence, the establishment of a new biofilm control method, which differs from the conventional bactericidal or bacteriostatic approaches, has been desired.

(1) The binding activity of the SspB peptides to saliva was detected by ELISA. In the present study, SspB (A4K-A11K) peptide showed the highest level of binding to saliva. A4K-A11K inhibited adherence of *S. mutans* to saliva; however, the peptide did not affect oral commensal. (2) To determine if A4K-A11K has anti-microbial activity, A4K-A11K and 0.04% chlorhexidine (CHX) were applied into *S. mutans* cultures. CHX inhibited growth of *S. mutans*; whereas the A4K-A11K did not show growth inhibition. (3) A4K-A11K inhibited B.F. formation of *S. mutans* on the saliva-coated polystyrene plates. A4K-A11K is available to regulate dental biofilm-dependent diseases such as caries.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：小児歯科学 バイオフィーム SspBペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

小児歯科臨床において、う蝕は未だ主たる口腔疾患である。う蝕をはじめとする口腔内感染症は、口腔細菌より形成された生態系：バイオフィームに起因しており、細菌によるペリクルへの付着から始まる。また、口腔内バイオフィームは薬剤耐性遺伝子のリザーバーであり、従来の殺菌的・静菌的な制御法とは異なる新規バイオフィーム制御法の確立が望まれている。そこで申請者は、初期付着の阻害という新たなアプローチの着想に至った。

### 2. 研究の目的

*S. mutans* は表層タンパク質抗原 (Pac) を介して唾液ペリクル中の特定成分 (gp340) と結合し、歯面に付着する。*Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) の付着因子 SspB は *S. mutans* の付着因子 Pac と高い相同性をもち、同様に SspB を介して gp340 に結合する。この SspB のアミノ酸配列をもとに合成された SspB 相同ペプチドは、*S. mutans* の gp340 への結合を競合阻害する事が明らかとなっている[1]。そこで本研究は、SspB 相同ペプチドによる *S. mutans* の初期付着および B.F.形成抑制効果の評価を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) SspB 相同ペプチドの機能解析

##### 供試菌株および培養条件

*S. mutans* MT 8148 株および *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) ATCC 6249 株の over night culture 100  $\mu$ l を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地 5 ml に接種し、二代培養を行った。

##### SspB 相同ペプチド A4K-A11K の調製

合成した SspB 相同ペプチド (A4K-A11K) (DYQKKLAAYQKEL; 純度 95% <) を滅菌 PBS および 1 mM CaCl<sub>2</sub> PBS (Ca-PBS) でそれぞれ 650  $\mu$ M および 1,300  $\mu$ M に調製し、実験使用時まで -20 にて保存した。

##### ヒト唾液の採取

滅菌チューブに採取したヒト唾液を 4 にて 12,000  $\times$  g, 10 分間遠心し、得られた上清を 0.22  $\mu$ m のフィルターで滅菌した。滅菌した唾液は実験使用時まで -20 にて保存した。

##### A4K-A11K の唾液付着能解析

Nakai ら [2] の sandwich assay を参考にし、A4K-A11K の唾液への付着能を解析した。A4K-A11K (650  $\mu$ M および 1,300  $\mu$ M) を 96 穴 ELISA 用プレート (住友ベークライト) にそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ分注し、4 にて一晩静置した。Ca-PBS で洗浄後、1% BSA Ca-PBS を添加し、4 にて 2 時間ブロッキングした。(以下の各工程間においても Ca-PBS による洗浄を行った。) 滅菌済み唾液 100  $\mu$ l をウェルにコート後、4 にて 1 時間インキュベートした。ビオチン化 A4K-A11K (650  $\mu$ M および 1,300  $\mu$ M) をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ加え、4 にて 1 時間反応させた。1,000 倍希釈アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (Streptavidin-AP) を 100

$\mu$ l 加え、37 にて 1 時間インキュベートした。1 mg/ml p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 (p-NPP) を 100  $\mu$ l 添加し、37 にてインキュベートした。発色反応後、マイクロプレートリーダー (ChroMate® Microplate Reader) を用いて吸光度 ( $A_{405}$ ) を測定することで、唾液に付着した A4K-A11K を検出した。

#### (2) A4K-A11K による各供試菌への初期付着阻害効果の解析

##### 供試菌のビオチン化および菌量の調整

供試菌のビオチン化は、Ruhl ら [3] の方法を参考にして行った。二代培養した供試菌液を PBS にて洗浄し、5 ml の 1 mM MgCl<sub>2</sub> Ca-PBS に懸濁した。Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) を細菌懸濁液に加えて最終濃度 100  $\mu$ g/ml に調製し、室温にて 1 時間静置した。再度 PBS にて洗浄後、1% BSA in 1 mM MgCl<sub>2</sub> Ca-PBS で濁度を調整 ( $OD_{600} = 0.4$ ) し、実験に用いた。

##### A4K-A11K による各供試菌への初期付着阻害効果の解析

A4K-A11K による各供試菌の初期付着阻害効果を解析するため、Nakai ら [2] の方法を応用した。唾液を 96 穴 ELISA 用プレートに 100  $\mu$ l 添加し、4 にて一晩静置した。Ca-PBS で洗浄後、1% BSA Ca-PBS を添加し、4 にて 2 時間ブロッキングした。(以下の各工程間においても Ca-PBS による洗浄を行った。) A4K-A11K (650  $\mu$ M および 1,300  $\mu$ M) をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ分注し、37 にて 1 時間インキュベートした。方法 (2) にてビオチン化した供試菌液 (*S. mutans* および *S. mitis*) をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ加え、37 にて 1 時間反応させた。1,000 倍希釈 Streptavidin-AP を 100  $\mu$ l 添加し、37 にて 1 時間インキュベート後、1 mg/ml PNPP を 100  $\mu$ l 添加し、37 にてインキュベートした。発色反応後、吸光度 ( $A_{405}$ ) を測定することで、唾液に付着した *S. mutans* および *S. mitis* を検出した。

#### (3) *S. mutans* の濁度測定

A4K-A11K による *S. mutans* の生育への影響を検討するため、Okuda ら [4] の方法に則り *S. mutans* の濁度を測定した。*S. mutans* 菌液 100  $\mu$ l を 5 ml の BHI 液体培地に接種後、1,300  $\mu$ M A4K-A11K もしくは 0.04% クロロヘキシジン (CHX) を添加し、37 にて培養した。16 時間および 22 時間培養後、波長 600 nm での培養液濁度を測定した。

#### (4) A4K-A11K による *S. mutans* のバイオフィーム形成阻害効果の解析

Okuda ら [4] の方法を参考にし、A4K-A11K による *S. mutans* のバイオフィーム形成阻害効果を解析した。唾液を 96 穴接着細胞培養用マルチプレート (住友ベークライト) に 100  $\mu$ l 分注した。4 にて一晩静置することで、ウェルに唾液をコートした。ピペットにて唾液を吸い出した後、650  $\mu$ M A4K-A11K を 100  $\mu$ l 加え、37 にて 1 時間インキュベートした。滅菌 PBS にて

洗浄後、0.25%スクロースを添加したTryptic Soy Broth液体培地 (TSBS) 160  $\mu\text{l}$ に*S. mutans* 懸濁液 ( $\text{OD}_{600} = 0.4$ ) を20  $\mu\text{l}$  分注し、37  $^{\circ}\text{C}$  にて1時間培養した。滅菌PBSで洗浄後、TSBS培地を200  $\mu\text{l}$ 接種し、37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。滅菌PBSで洗浄後に乾燥させ、0.25%サフラニン液で15分間染色、70%エタノールにて30分間脱色した。脱色後、吸光度 ( $A_{492}$ ) を測定し、プレート上に形成されたバイオフィーム量 (8時間、11時間および14時間培養) を解析した。

#### (5)統計解析

SPSS Statistics 19 (IBM) を使用し、有意水準は5%とした。2群間の検定には、Student's *t*-test を用いた。多群間の検定には一元配置分散分析 (one-factor ANOVA) 後、多重比較検定 (Tukey法) を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)A4K-A11K の唾液付着能

Sandwich assay を応用した本実験系においても、A4K-A11K は 650  $\mu\text{M}$  (図 1 A) および 1,300  $\mu\text{M}$  (図 1 B) 共に唾液への付着能を有することが認められた ( $*p < 0.05$ )。

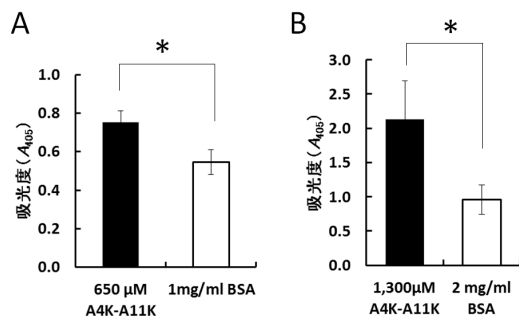
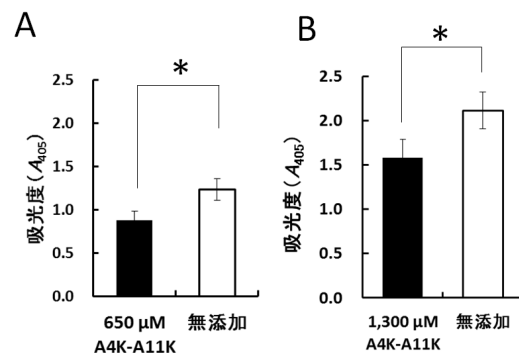


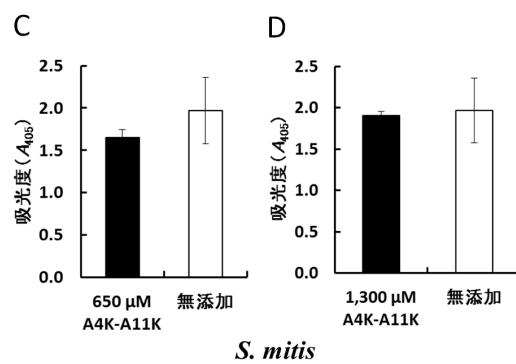
図 1 A4K-A11K の唾液付着能

#### (2)A4K-A11K による各供試菌への初期付着阻害効果

650  $\mu\text{M}$  および 1,300  $\mu\text{M}$  A4K-A11K により、*S. mutans* の唾液への付着が有意に減少した ( $*p < 0.05$ ) (図 2 A, B)。一方で *S. mitis* に対しては、650  $\mu\text{M}$  および 1,300  $\mu\text{M}$  A4K-A11K による唾液への付着阻害は認められなかった (図 2 C, D)。



*S. mutans*



*S. mitis*

図 2 A4K-A11K による各供試菌への初期付着阻害効果

#### (3)A4K-A11K による *S. mutans* の生育への影響

A4K-A11K を混入した培養液では、CHX 群にみられた生育の阻害は生じず、control (無添加) と同等であった ( $*p < 0.05$ ) (図 3)。

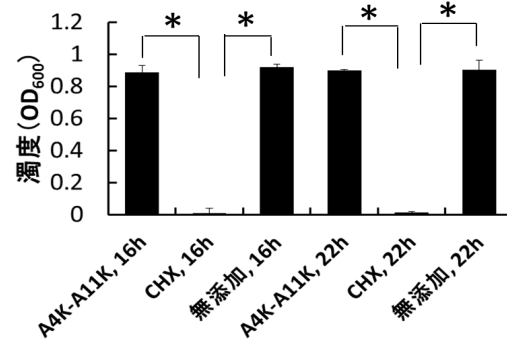


図 3 A4K-A11K による *S. mutans* の生育への影響

#### (4)A4K-A11K による *S. mutans* バイオフィーム形成阻害効果

650  $\mu\text{M}$  A4K-A11K により、唾液コートしたウェル上の *S. mutans* のバイオフィーム形成量は、有意に減少した ( $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ) (図 4)。

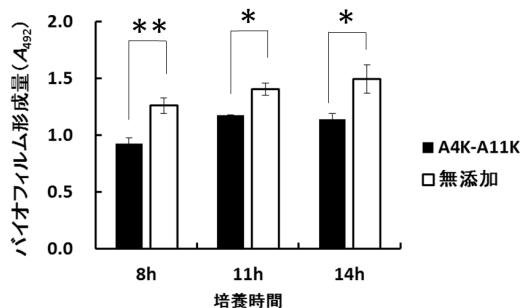


図 4 A4K-A11K による *S. mutans* バイオフィーム形成阻害効果

#### (5)考察

実験結果 (図 1 および図 2) より、SspB 由来のペプチドである A4K-A11K は、コートされた唾液成分中のレセプターを *S. mutans* と競

合することで、結果的に *S. mutans* の初期付着を阻害したと考えられる。650  $\mu$ M および 1,300  $\mu$ M の A4K-A11K で *S. mutans* の付着阻害が認められた (図 2 A, B) ことから、本実験系における A4K-A11K の至適濃度が得られた。口腔内常在菌である *S. mitis* への付着阻害は認められなかった (図 2 C, D) ことから、A4K-A11K による初期付着阻害は *S. mutans* に対して特異的なものであり、口腔常在菌に影響しない可能性が示唆された。図 3 より、A4K-A11K は *S. mutans* の生育に影響を及ぼさないことが認められた。口腔細菌叢構成比率の崩壊が口腔疾患の発症と関連していることが示唆されていることから、本研究の成果はこれらの懸念事項をクリアするものであると考えられる。さらに A4K-A11K による *S. mutans* のバイオフィーム形成阻害が認められた (図 4) ことから、従来の殺菌的・静菌的な方法とは異なったバイオフィーム形成制御法として応用可能であることが示唆された。

今後の展望として、ヒト口腔内に近い環境を再現するため、ハイドロキシアパタイト製ディスクを用いた静止系バイオフィーム実験モデルにて、A4K-A11K による *S. mutans* のバイオフィーム制御法を解析していく。また口腔内のように唾液が常に流動している状況を考慮し、唾液の流れを再現できるフローセルシステム[5]でのバイオフィーム動態評価も計画している。さらにヒト口腔内を再現した動物モデル[6]を用いて、*in vivo* での評価を行う予定である。

#### <引用文献>

Tomoyuki Hamada, Masatsugu Kawashima, Haruo Watanabe, Junji Tagami, Hidenobu Senpuku, Molecular interactions of surface protein peptides of *Streptococcus gordonii* with human salivary components. *Infection and Immunity*. 72 (8): 4819-26, 2004.

Motoyuki Nakai, Nobuo Okahashi, Hiroataka Ohota, Toshihiko Koga, Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. *Infection and Immunity*. 61 (10): 4344-4349, 1993.

Stefan Ruhl, John O. Cisar, Ann L. Sanberg, Identification of Polymorphonuclear Leukocyte and HL-60 Cell Receptors for Adhesins of *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces naeslundii*. *Infection and Immunity*. 68: 6346-6354, 2000.

Kentaro Okuda, Nobuhiro Hanada, Yoshie Usui, Hiroaki Takeuchi, Hidehiko Koba, Ryoma Nakao, Haruo Watanabe, Hidenobu Senpuku, Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation using analogues of the SspB peptide. *Archives of*

*Oral Biology*. 55: 754-762, 2010.

茂木 瑞穂. *Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成における推定遺伝子の評価. *口腔病学会雑誌*. 73: 8-19, 2006.

Tatsuro Ito, Takahide Maeda, Hidenobu Senpuku. Roles of salivary components in *Streptococcus mutans* colonization in a new animal model using NOD/SCID.*e2f1*<sup>-/-</sup> mice. *PLoS one*. 7 (2): e32063, 2012.

#### 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1件)

Keitaro Satoh, Takanori Narita, Miwako Matsuki-Fukushima, Ken Okabayashi, Fumie Yamazaki, Toshiaki Arai, Tatsuro Ito, Hidenobu Senpuku, Hiroshi Sugiyama. A novel animal model for dry mouth, E2f1-deficient NOD/SCID mice. *Journal of Oral Biosciences*. 56: 18-22, 2014. (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2013.08.004>

##### [学会発表](計9件)

Tatsuro Ito, Takahiro Ichinosawa, Nana Ikematsu-Ito, Takehiko Shimizu. Establishment of SspB peptide binding assay for *Porphyromonas gingivalis* colonization processes. IAPD 2015 Conference, Glasgow, United Kingdom, 2015年7月1日~7月4日(発表確定)

Nana Ikematsu-Ito, Tatsuro Ito, Kanako Sawamoto, Rina Shimada, Takehiko Shimizu. Treatment of eruption disturbance of permanent successor after trauma to primary tooth: 2 cases reports. IAPD 2015 Conference, Glasgow, United Kingdom, 2015年7月1日~7月4日(発表確定)

伊藤 龍朗, 市野澤 隆宏, 荒井 延子, 伊藤 (池松) 奈々, 清水 武彦, 歯周病リスク診断用ペプチド結合アッセイの確立, 第53回日本小児歯科学会大会, 広島国際会議場(広島県広島市), 2015年5月21日~22日(発表確定)

市野澤 隆宏, 倉田 香, 倉田 康弘, 伊藤 龍朗, 清水 武彦, SspB ペプチドによる *Streptococcus mutans* 初期付着阻害効果の検討, 第53回日本小児歯科学会大会, 広島国際会議場(広島県広島市), 2015年5月21日~22日(発表確定)

岩井 聡, 伊藤 耕, 高橋 康輔, 青木 暁宣, 伊藤 奈々, 伊藤 龍朗, 清水 武彦, 近藤 壽郎, 下顎に生じたエナメ

ル上皮腫に対して架橋プレートを適用し顎骨切除を回避した1例, 第26回日本小児口腔外科学会総会・学術大会, 栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市), 2014年11月7日~11月8日

Tatsuro Ito, Hidenobu Senpuku, Takahiro Ichinosawa, Takehiko Shimizu, Takahide Maeda. Contribution of analogous SspB peptide to saliva-mediated *Porphyromonas gingivalis* attachment. 92nd IADR GENERAL SESSION, Cape Town, South Africa, 2014年6月25日~6月28日

伊藤 龍朗, 市野澤 隆宏, 清水 武彦, 前田 隆秀, SspB 由来ペプチドによる *Porphyromonas gingivalis* 定着メカニズムの検討, 第52回日本小児歯科学会大会, きゅりあん(東京都品川区), 2014年5月16日~17日

佐藤 慶太郎, 成田 貴則, 岡林 堅, 福島美和子, 荒井 俊明, 伊藤 龍朗, 泉福 英信, 杉谷 博士. 唾液分泌低下を呈する *E2f1* 欠損型 NOD/SCID マウスにおける AQP5 の発現レベル低下, 第58回日本唾液腺学会総会並びに学術集会, 文京学院大学本郷キャンパス(東京都文京区), 2013年12月14日

伊藤 龍朗, 前田 隆秀, *Porphyromonas gingivalis* の定着メカニズムに関する基礎的検討, 第28回日本小児歯科学会関東地方会大会および総会, 神奈川歯科大学(神奈川県横須賀市), 2013年10月27日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 龍朗 (ITO, Tatsuro)  
日本大学・松戸歯学部・助教  
研究者番号: 60635126

### (2) 研究協力者

泉福 英信 (SENPUKU, Hidenobu)