

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462876

研究課題名(和文) バイオフィーム制御の概念転換の必要性の提示とマトリックスを標的とした制御戦略開発

研究課題名(英文) Paradigm shift of strategies for the control of oral biofilm and a novel antibiofilm chemotherapy targeting exopolysaccharide synthesis.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、これまでの細菌を標的とした殺菌効果に頼ったバイオフィーム(BF)制御から、マトリックスを標的とした抗菌成分に頼らない新しい制御法への戦略の転換の必要性を提言するとともに、BFの剥離・分散効果に主眼を置いた新しいBF制御法を開発することであった。

口腔内環境を再現した細菌培養システムと共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージング法により、殺菌効果に頼ったBF制御の弊害を明らかにした。

そして、新しいコンセプトに基づくバイオフィーム制御剤の開発を進めた結果、細菌増殖に影響を与えることなく、BFの分散・剥離効果ならびに付着抑制効果を有する機能性糖脂質を見出した。

研究成果の概要(英文)：Chemical complements such as toothpaste and mouthrinses that contain antimicrobial agents have proven to be effective for the control of oral biofilm. However, we have demonstrated some adverse effects of antimicrobial agents. One adverse effect is that most of the antimicrobial agents failed to remove the biofilm structure. The residual structure may serve as a scaffold for the redevelopment of biofilm. Another effect is that low-dose antibiotics may promote bacterial biofilm formation. Taken together, future strategies that promote the biofilm matrix detachment are expected, without affecting bacterial growth targeting to polymeric substances. We have developed a novel antibiofilm chemotherapy targeting exopolysaccharide synthesis. Vizantin, a recently developed immunostimulating compound, possessed antibiofilm activity against *Streptococcus mutans* without affecting bacterial growth. This compound causes *S. mutans* biofilm to detach by altering its internal architecture.

研究分野：歯科保存学

キーワード：バイオフィーム 化学的コントロール 分散 剥離 共焦点レーザー顕微鏡

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔バイオフィームは以下の特徴を持つ点で、完全な殺菌・除去が理想とされる生体内バイオフィームとは異なった特有の性質を持っている(Takenaka S et al.: J Oral Biosci 54, 173-179, 2012)。

(1) 常在菌が存在する

(2) 生体外から絶えず微生物の混入や伝播を受ける外界と通じた特殊な環境にある

(3) 生体内において外科的侵襲を伴わず機械的に除去することが可能

つまり、我々は例外なくバイオフィームと共存し、う蝕・歯周病の原因となる一方で外界からの新たな病原細菌の定着を防ぐ重要な役割を担っている。口腔内を無菌化することは危険な状態であり、口腔バイオフィームの量を制御しながらうまく付き合う、すなわち「バイオフィームとの共存」が重要であると考えられる(Marsh PD: J Dent 38, S11-15, 2010)。

しかし、これまで特に成熟バイオフィームに対する制御はいかに細菌を短時間で死滅させるかに焦点が当てられてきた。これは菌体外マトリックスが薬剤の浸透を妨げ各種免疫機構に抵抗する(Stewart PS et al.: Nat Rev Microbiol 6, 199-210, 2008)ためであり、より強力な殺菌効果を示し浸透性に優れる抗菌成分が注目されてきた。

ところが、申請者らは強力な抗菌成分を用いてバイオフィーム中のすべての細菌を死滅させてもバイオフィーム構造が付着界面に残ること、そして上述した特異な性質をもつ口腔内において、**残存構造がバイオフィーム再形成の起点となる**ことを明らかにした(図1; Ohsumi T et al.: PLoS ONE 10(1): e0116647, 2015)。

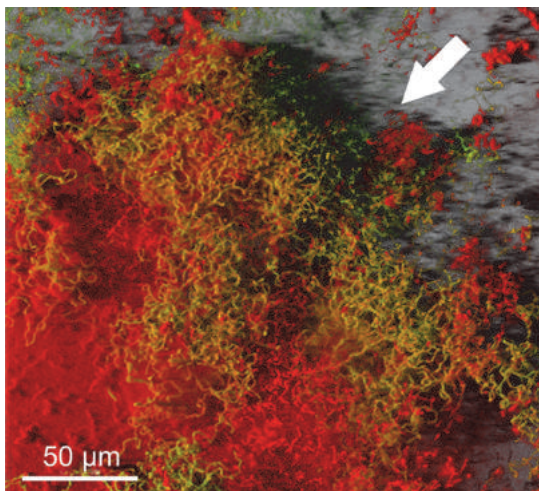


図1 *in vitro* バイオフィームの共焦点顕微鏡画像。殺菌処理したバイオフィーム構造

(赤)の上に新たな細菌の二次付着(緑)が観察できる(白矢印)。二次付着は、バイオフィームの残存構造があると促進される。緑: Calcein-AM、赤: Rhodamine-B

この結果は、たとえバイオフィーム中の細菌をすべて死滅させても付着界面に残存したバイオフィーム構造は更なるバイオフィーム形成の足場を提供することを意味している。また、残存構造は抗原として働くとともに、歯石形成を助長することも報告されている(Takenaka S et al.: InTech, 2016 [ISBN 978-953-51-2436-8])。

これらの知見から、これまでのバイオフィーム制御の概念を転換する必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、

(1) これまでの細菌を標的とした殺菌効果に頼ったバイオフィーム制御から、マトリックスを標的とした抗菌成分に頼らない新しい制御法への戦略の転換の必要性を提言すること

(2) バイオフィームの剥離・分散効果に主眼をおいた新しいバイオフィーム制御法を開発することであった。

(1)の目的達成の具体的方法として、抗菌成分を作用させたバイオフィームに起こる反応を解析し、殺菌に頼ったバイオフィーム制御の弊害を理解してもらうために知見を重ねることと、これまでの国内外の研究成果をまとめ、総説を出版し理解を含めることとした。

### 3. 研究の方法

(1) 殺菌処理前後の口腔バイオフィームの三次元構造の比較

直径0.9mm、厚み170 $\mu$ mのキャピラリーガラス中で24時間新鮮培地を灌流させることで *Streptococcus mutans* バイオフィームを形成させた。Calcein-AMをキャピラリーガラス内部に送り込み2時間静置することで、バイオフィーム中の細菌に蛍光染色を施した。2時間後、各種洗口液を五分間作用させバイオフィーム中の細菌を殺菌した。殺菌処理後のバイオフィームを、DAPIおよびRhodamine-Bで蛍光染色した。これら殺菌処理前後のバイオフィーム構造を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて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。

(2) sub-MIC量のグルコン酸クロルヘキシジン(CHG)が *S. mutans* バイオフィーム形成に与える影響

*S. mutans* UA159株をマイクロプレートを用いて、1/2-1/32MICのCHGを添加したBHI培地(0.5%スクロース添加)中で、24時間培養した。24時間後のバイオフィーム量、糖量および三次元構造等について比較検討した。

(3) 我々の研究グループは、口腔細菌叢を変動させずにバイオフィーム構造の分

散・効果が得られる物質の探索を重ね、その候補物質を見出した。

ビザンチン(Viz-S)は、結核菌やジフテリア菌の細胞表層糖脂質をリード化合物として創製した機能性糖脂質で、重篤な炎症性障害を引き起こすことなく免疫系を活性化する。今回、Viz-Sが、免疫活性化作用のほかに、*S. mutans* に対して増殖を抑制せずにバイオフィルムの形成抑制効果をも有することを見いだした。

主な解析方法を以下に示す。

- ① 24穴プレートを用いて1, 5, 10 および 50 $\mu$ M の Viz-S 添加 BHI 培地 (0.5%スクロース添加) 中でバイオフィルムを形成させた。形成したバイオフィルム量をクリスタルバイオレット法で測定するとともに、Live/Dead kit を用いて蛍光染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡で構造を観察した。
- ② 上記バイオフィルム中の *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *comD*, *LuxS* の遺伝子発現量を解析した。
- ③ ハイドロキシアパタイトディスクを5, 10, 50 $\mu$ M の Viz-S に1時間浸漬したのち、フローセルチャンバー(Convertible Flow Cell)に装着した。無刺激唾液に1時間浸漬後、*S. mutans* 懸濁液を送り込み、24時間培養することでバイオフィルムを形成させ、SEMにて観察した。
- ④ 付着に関与する遺伝子群への影響を解析するため、5, 10, 50 $\mu$ M の Viz-S 添加 BHI 中で *S. mutans* を4時間培養後の *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *Pac*, *GbpA*, *GbpB*, *GbpC*, *GbpD* の各種遺伝子の発現を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 殺菌処理前後の口腔バイオフィルムの三次元構造の比較

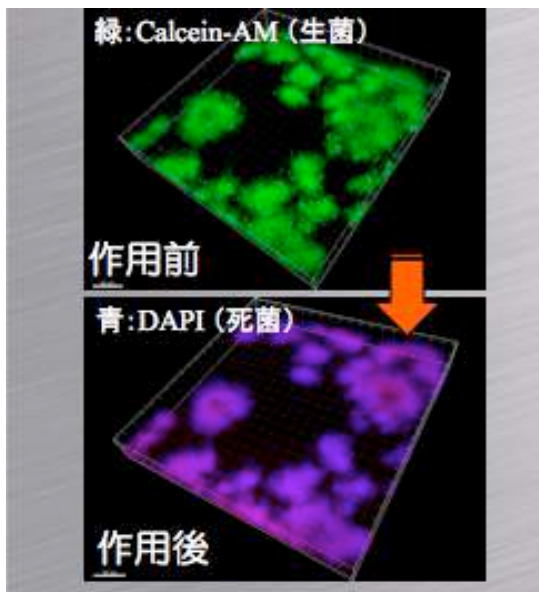


図2 洗口液作用前後のバイオフィルムの共焦点画像(三次元構築像)。

バイオフィルム中の細菌をすべて殺菌させてもバイオフィルム構造は剥離せず、付着界面に残存していた。

実験に使用した6種類の洗口液すべてにおいて分散・剥離効果はなかった。

(2) sub-MIC量のグルコン酸クロルヘキシジン(CHG)が*S. mutans* バイオフィルム形成に与える影響

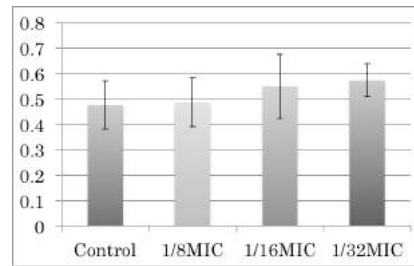


図3 バイオフィルム量(クリスタルバイオレット法)

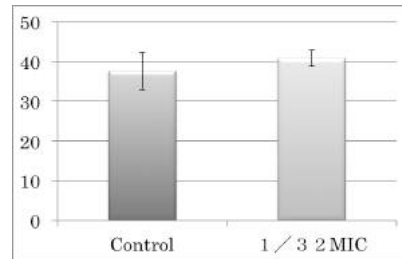


図4 バイオフィルム中の糖量(μg/ml)

sub-MIC量のCHG存在下でバイオフィルム形成が亢進した。

(3) ビザンチンのバイオフィルム形成抑制効果

①

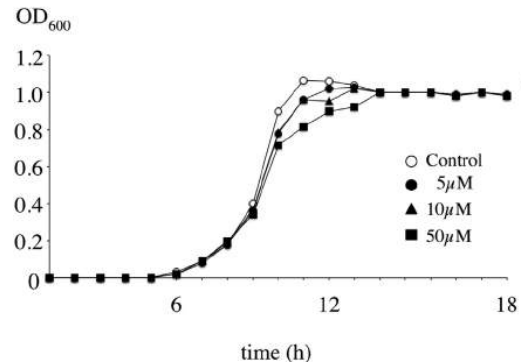


図5 増殖曲線。Viz-Sは*S. mutans*の増殖に影響を与えない

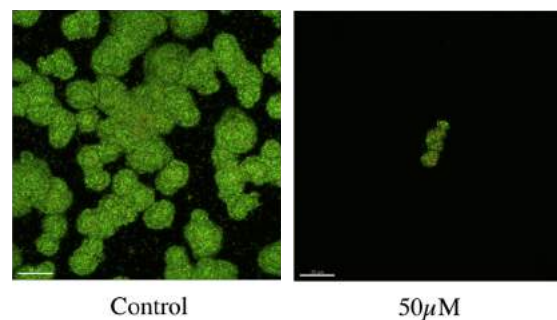


図6 50 $\mu$ MのViz-S存在下で形成したバイオフィルムは洗浄により構造が剥離した。

②

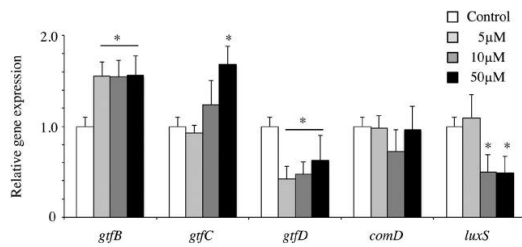
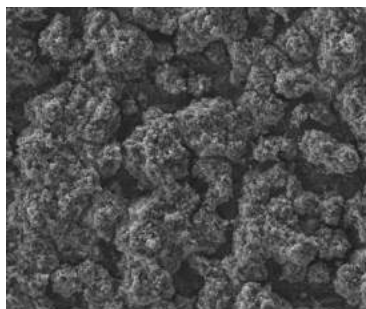
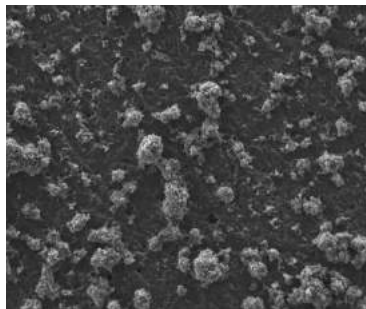


図7 24時間培養後のバイオフィーム形成関連遺伝子の発現量。gtf群の遺伝子発現のバランスが崩れることでバイオフィーム構造の分散が起こる。

③



Control



50µM

図8 Viz-S 処理したハイドロキシアパタイト表面へのバイオフィーム形成。Viz-S 処理した界面上でのバイオフィーム形成は抑制された。

④ 4時間培養後の付着関連遺伝子は、gtfB および gtfC の発現上昇と、gtfD、GbpA および GbpC の発現低下がみられた。gtf群の発現バランスの変化とともに付着関連遺伝子の発現低下により、細菌付着が抑制されたと考えられる。

#### 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9件)

- ①  Takenaka S, Noiri Y: Limitations and adverse influences of antimicrobial strategy for the control of oral biofilm. *Journal of dentistry and oral biology* 2(3): 1-5, 2017 (査読有)

<http://remedypublications.com/dentistry-and-oral-biology/articles/articles.php>

- 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) doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.021.

- ③  Sakaue Y, Domon H, Oda M, Takenaka S, Kubo M, Fukuyama Y, Okiji T, Terao Y: Anti-biofilm and bactericidal effects of Magnolia bark-derived magnolol and honokiol on *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol* 60(1): 10-16, 2016 (査読有) doi: 10.1111/1348-0421.12343.

- ④  竹中彰治: 洗口液の使用状況および使用感に関するアンケート調査-継続使用に影響する要因の分析-. 66(4): 361-370, 2016. (査読有) [http://doi.org/10.5834/jdh.66.4\\_361](http://doi.org/10.5834/jdh.66.4_361)

- ⑤  Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Sakaue Y, Narisawa N, Senpuku H, Ohshima H, Terao Y, Okiji T: Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. *PLoS One* 10(1): e0116647, 2015. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0116647.

- ⑥  竹中彰治: 難治性根尖性歯周炎の細菌学. *季刊歯科医療* 29(2): 21-29, 2015. (査読無)

- ⑦  竹中彰治, 興地隆史: 術後感染予防のための含嗽剤を再考する. *デンタルダイヤモンド* 40(12): 56-63, 2015. (査読無)

- ⑧  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) doi: 10.1007/s00784-013-1002-7.

- ⑨  大墨竜也, 竹中彰治, 坂上雄樹, 寺尾豊, 大島勇人, 興地隆史: *Streptococcus mutans* バイオフィームに対するリステリンナチュラルケアの浸透性と殺菌効果の評価. *日歯周誌* 56: 291-301, 2014.

(査読有)

<http://doi.org/10.2329/perio.56.291>

[学会発表] (計7件)

- ① 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. 第145回日本歯科保存学会, 長野県松本市, 10/27-28, 2016.
- ② 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学会, 東京都中央区, 7/2, 2016.
- ③ 坂上雄樹、土門久哲、小田真隆、竹中彰治、興地隆史、寺尾豊：  
*Streptococcus mutans* に対する植物由来抽出物の殺菌ならびに抗バイオフィーム効果の検討. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡県福岡市, 9/25-27, 2014.
- ④ 竹中彰治、大墨竜也、坂上雄樹、若松里佳、寺尾豊、興地隆史：  
Listerine に添加された成分が *Streptococcus mutans* バイオフィームへの浸透性に与える影響-キャピラリーフローセルを用いた経時的観察-. 第141回日本歯科保存学会, 山形県山形市, 10/30-31, 2014.
- ⑤ 坂上雄樹、土門久哲、小田真隆、竹中彰治、興地隆史、寺尾豊：  
*Streptococcus mutans* に対する厚朴由来抽出物の殺菌ならびに抗バイオフィーム効果の検討. 第141回日本歯科保存学会, 山形県山形市, 10/30-31, 2014.
- ⑥ 山本成美、竹中彰治、大墨竜也、坂上雄樹、若松里佳、寺尾豊、興地隆史：  
洗口液に含まれるエタノールが *Streptococcus mutans* バイオフィーム内部への浸透性に与える影響について. 第141回日本歯科保存学会, 山形県山形市, 10/30-31, 2014.
- ⑦ 坂上雄樹、土門久哲、小田真隆、竹中彰治、興地隆史、寺尾豊：  
*Streptococcus mutans* バイオフィームに対する植物由来抽出物の検索. 第51回日本細菌学会中部支部総会. 石川県金沢市, 10/17-18, 2014.

[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. Microbial Biofilms-Importance and applications (Chapter 18), 425-439, InTech, 2016, ISBN 978-953-51-2436-8.
- ② 竹中彰治: 洗口液なるほど活用術, デンタルダイヤモンド社, 2016. 総ページ数160ページ

## 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：研究者番号：50313549

### (2) 研究分担者

大島 勇人 (OHSIMA, Hayato)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：70251824

寺尾 豊 (TERAO, Yutaka)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：50397717

小田 真隆 (ODA, Masataka)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：00412403