

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462900

研究課題名(和文) 抗菌剤がポリマイクロバイアルバイオフィルムの代謝および群集構造へ与える影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of antimicrobial effects on the metabolism and bacterial component of polymicrobial biofilms

研究代表者

富山 潔 (TOMIYAMA, KIYOSHI)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：90237131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：24時間培養したバイオフィルムを各処理液Pancil PS-M(P)，グルコン酸クロルヘキシジン(C)，緑茶抽出物(G)で5分間処理後，すべての処理群における生菌数(CFU/ml)は非処理群と比較して有意に低かった．その後48時間培養を継続した結果，渋柿由来のタンニンを含む食品・化粧品等の原料であるPancil PS-Mの持続的増殖抑制効果は他群と比較し有意に高かった($p < 0.05$)．

研究成果の概要(英文)：Pancil PS-M (Rilis Co., Ltd, Osaka, Japan) is a food additive containing condensed tannin extracted from astringent persimmon (Kaki). Polymicrobial biofilm were cultured on glass plates (diameter: 12 mm, thickness: 0.15 mm) using dilution of stimulated saliva of one healthy adult in a polymicrobial biofilm model. After biofilm formation for 24 h, treatment was conducted as follows: The specimens (12 per group) were immersed for 5 min in: 0.2% chlorhexidine digluconate (CHX) (Corsodyl, GlaxoSmithKline) (group 0.2C); 4.0% Pancil PS-M (PS-M) (group 4P); and deionized water (control group). After treatments, group 4P and 0.2C showed significantly lower CFU than that of control group (cont: 4.30×10^8 CFU/ml, 4P: 1.67×10^7 CFU/ml, 0.2C: 1.74×10^7 CFU/ml). Also, 4P suppressed remarkably regrowth of CFU in biofilms comparing 0.2C even after 48h-regrowth of biofilm (cont: 7.80×10^8 , 4P: 1.26×10^7 , 0.2C: 1.09×10^8).

研究分野：う蝕学

キーワード：biofilm tannin chlorhexidine persimmon

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

ミュータンス連鎖球菌を病原細菌とする特異的感染論は、多くの研究者によりその正当性が証明されており、齲蝕分野の発展に多大な貢献をしてきた。一方で口腔内ブラークは、多種多様な細菌種が固相表面に付着し、自らが産生したグリコカリックスに囲まれた多種細菌の集合体であり、バイオフィルムを形成することが知られている。口腔内は、菌にとって、体内でも特殊な環境であり、多彩な基質および密度の高い細菌叢（多様で膨大な微生物が共生している）を有している（Oral Ecosystem）。この細菌叢は、多様な細菌種で構成されていながら、一つの生物体のように機能する超個体（superorganism）として機能すると言われている（高橋信博，口腔感染フォーラム 2010）。加えて，バイオフィルムは，抗菌剤に対して浮遊細菌の数十倍～数百倍の耐性を示すことが報告されているため，現在までに行なわれてきた浮遊細菌についての研究のみならず，バイオフィルムの特性についての研究を行うことは，齲蝕が発症するまでのプロセスを解き明かす上で，非常に重要である。

(2) バイオフィルムモデル

海外研究協力者の Exterkate ら¹⁾は，ポリマイクロバイアル(PM)バイオフィルムモデルを開発し（Caries Res 2010; 44: 372 - 379），唾液から培養した多菌種入りの PM バイオフィルムが，ミュータンス連鎖球菌単一種から形成されたバイオフィルムと比較して，抗菌剤処理後に強い耐性を有することを明らかにした。この研究は，単一菌種のバイオフィルムのみならず，多菌種を含むバイオフィルムの研究が重要であることを示している。また，海外研究協力者の一人である ten Cate は，2010 年の IADR および 2013 年の ORCA（European Organization for Caries Research, Liverpool, UK, 2013）において，

PM バイオフィルムモデルを用いた齲蝕病変の新しい治療法および予防法の開発の有用性を示した。このように，PM バイオフィルムに対する抗菌療法の作用機序を解き明かす近道となる。

2. 研究の目的

(1) 渋柿タンニンを含む食品添加剤が PM バイオフィルムの代謝活性、形成能に及ぼす影響

PM バイオフィルムを異なった固相上に形成した後，様々な濃度，処理時間で抗菌剤処理を行い，代謝，生菌数へ与える影響について検討する。抗菌剤として，柿から抽出した縮合型タンニン（柿タンニン）について検討する。これら天然由来の抗菌剤は副作用が少ないと報告されている。

(2) 抗菌作用の違いが PM バイオフィルムの細菌叢に及ぼす影響とその後のバイオフィルム細菌叢の回復の検討

PM バイオフィルムをガラス試片上に 24 時間培養して形成し，5 分間の処理を行なった後，再度，48 時間の培養を行ない，バイオフィルムの再増殖をどの程度抑制できたかを走査型電子顕微鏡(SEM)および生菌数算定(CFU/ml)により評価した。嫌気培養を培養不可能なバイオフィルム中の細菌種も含む健全な細菌叢が，病的な細菌叢に移行する際，あるいは，逆に回復する場合において，細菌叢はどのように変化するのかを real time PCR 法により分析した。

3. 研究の方法

(1) ポリマイクロバイアルバイオフィルム形成用材料には直径12 mm厚さ150 μmの円盤状ガラス試片（Menzel, Braunschweig, Germany）を用いた。処理剤には，Pancil[®] PS-M および Corsodyl（0.2 vol% グルコン酸クロルヘキシジン: CHX, SmithKline）を滅菌脱イオン水により希釈した溶液を用いた。実験群は，非処理群（陰性対照，cont），0.5 vol% Pancil[®] PS-M群（0.5 P），0.7 vol% 同群（0.7 P），1.0 vol% 同群（1 P），2.0 vol%

同群 (2P), 3.0 vol% 同群 (3P), 4.0 vol% 同群 (4P), 0.05%グルコン酸クロルヘキシジン (陽性対照, 0.05 C), そして 0.2%グルコン酸クロルヘキシジン (陽性対照, 0.2C) の9群とした (n=6). ポリマイクロバイアルバイオフィルムの培養には, 1被験者から採取した刺激唾液を用いた. 培養液には buffered McBain 2005 (0.2%スクロース, 50 mM PIPES) を用い, 培養液の交換を10時間の時点で1回行なう嫌気培養 (CO₂:10.0%, H₂:10.0%, N₂:80.0%, 37 °C) を72時間行なった. 培養72時間の時点で各処理剤 (0.5 P, 0.7 P, 1 P, 2 P, 3 P, 4 P, 0.05 C, 0.2 C) あるいは滅菌脱イオン水 (cont) に5分間浸漬後, ポリマイクロバイアルバイオフィルムをCysteine Peptone Waterにて洗浄して血液寒天培地に4日間培養し, 実験終了時に生菌数の算定を行なった. 算出した生菌数はOne-way ANOVAおよびTukeyの検定により有意水準5%にて統計学的分析を行ない, 抗菌効果を比較検討した.

(2) ポリマイクロバイアルバイオフィルム形成用材料には直径 12 mm 厚さ 150 μm のカバーガラス (Menzel, Braunschweig, Germany) を用いた. 処理剤には, 4%Pancil PS-M, Corsodyl (0.2 vol%グルコン酸クロルヘキシジン, GlaxoSmithKline), およびタンニン含有量を 4%Pancil PS-M と同量に調整した緑茶抽出物 (リリース科学工業株式会社) を用いた. 実験群は, (1) 非処理群 (cont), (2) 4.0 vol% Pancil PS-M 群 (4P), (3) 0.2%グルコン酸クロルヘキシジン群 (0.2C), および (4) 緑茶抽出液 (G) の 4 群とした (n=6). ポリマイクロバイアルバイオフィルムの培養には一被験者から採取した刺激唾液を用いた. 培養液には unbuffered McBain 2005 (0.2%スクロース含有) 培養液を用い, 50 倍希釈となるように刺激唾液を混入した. 培養液の交換は 10 時間, 14 時間のサイクルで行ない 培養 24 時間の時点で各処理剤 (4P, 0.2C, G) あるいは滅菌脱イオン水 (cont)

に 5 分間浸漬後, 72 時間まで嫌気条件下 (CO₂:10.0%, H₂:10.0%, N₂:80.0%, 37 °C) で培養した. その後, 円盤状ガラス試片を除去し, 形成されたバイオフィルムを超音波で剥離, Cysteine Peptone Water で段階希釈後, 血液寒天培地に 4 日間培養し, 生菌数の算定を行なった. 算出した生菌数は One-way ANOVA および Tukey の検定により有意水準 5% にて統計学的分析を行ない, ポリマイクロバイアルバイオフィルムの増殖抑制効果を比較検討した.

4. 研究成果

(1) 長期培養ポリマイクロバイアルバイオフィルムへの抗菌効果

長期培養したポリマイクロバイアルバイオフィルムに Pancil[®] PS-M 各群および CHX 各群の薬液を用いて薬液処理を行った結果, すべての薬液処理群におけるポリマイクロバイアルバイオフィルムの生菌数 (CFU/ml) は非処理群と比較して有意に低かった (cont: 7.57×10^8 , 0.5 P: 1.98×10^8 , 0.7 P: 1.85×10^8 , 1 P: 1.36×10^8 , 2 P: 1.25×10^8 , 3 P: 5.53×10^7 , 4 P: 1.53×10^7 , 0.05 C: 2.02×10^8 , 0.2 C: 2.03×10^7 , $p < 0.05$). とりわけ Pancil[®] PS-M による, 長期培養 (72 時間) により成熟したポリマイクロバイアルバイオフィルム形成に対する抑制効果は, 濃度依存的に上昇し, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0% Pancil[®] PS-M は, 0.05% CHX と同等かそれ以上, 4.0%Pancil[®] PS-M は, 0.2% CHX と同等の抗菌効果を示した (Fig 1).

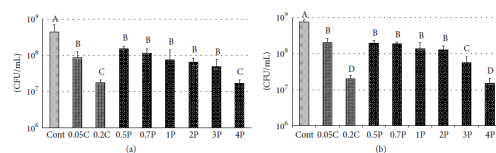


FIGURE 1. Total CFU counts of 24-hour (a) and 72-hour (b) PM biofilm after treatment. The CFU of 4P and 0.2C showed identical number of viable cells. Values with the same superscript letters are not significantly different between the groups at a p value of < 0.05 . One-way ANOVA, Tukey's test ($n = 12$).

SEM 観察の結果は, 短期および長期培養バイオフィルムに対して, 4%Pancil[®] PS-M が 0.2%グルコン酸クロルヘキシジンと同等の抗菌効果を有することを示した (Fig 2).

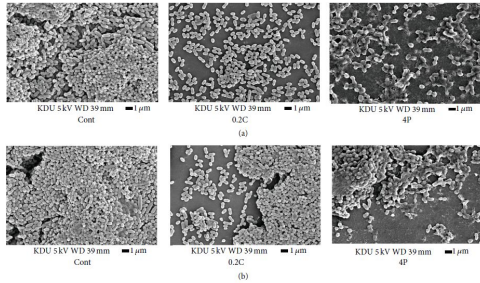


FIGURE 2: SEM images of 24-hour (a) and 72-hour (b) PM biofilms after treatment. 4P and 0.2C indicated suppression of bacterial aggregation comparing Cont.

(2) 24時間培養したポリマイクロバイアルバイオフィルムに Pancil PS-M, グルコン酸クロールヘキシジンおよび緑茶抽出物を用いて薬液処理を行い,その後,48時間,バイオフィルム培養を継続して行った結果,すべての処理群における生菌数(CFU/ml)は非処理群と比較して有意に低かった(cont = 7.80×10^8 , 4P = 1.26×10^7 , 0.2C = 1.09×10^8 , G = 1.10×10^8 , $p < 0.05$). グルコン酸クロールヘキシジンと緑茶抽出物は,同等のポリマイクロバイアルバイオフィルムの増殖抑制効果を示したが,Pancil PS-M 処理のポリマイクロバイアルバイオフィルムの増殖抑制効果はグルコン酸クロールヘキシジンおよび緑茶抽出物に比較し有意に高かった($p < 0.05$).

<引用文献>

1) Exterkate R.A.M., Crielaard W, ten cate JM, Different Response to Amine Fluoride by *Streptococcus mutans* and Polymicrobial Biofilms in a Novel High-Throughput Active Attachment Model, Caries Res 2010; 44: 372 – 379.

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5件)

1) Tomiyama K, Mukai Y, Kumada H, Watanabe K, Hamada N, Teranaka T, Formation of subsurface dentin lesions using a polymicrobial biofilm model. Am J Dent 2015; 28: 13 – 17.

2) Tomiyama K, Mukai Y, Saito M, Watanabe K,

Kumada H, Nihei T, Hamada N, Teranaka T. Antibacterial action of a condensed tannin extracted from astringent persimmon as a component of food additive Pancil PS-M on oral polymicrobial biofilms. BioMed Res Int 2016; Article ID 5730748, 7 pages.

3) Hasegawa H, Tomiyama K, Kumada H, Kawata A, Higashi K, Takahashi O, Hamada N, Mukai Y. Antimicrobial effects of carbamide peroxide against a polymicrobial biofilm model. Model. Am J Dent 2015; 28: 57 – 60.

4) Shiiya T, Tomiyama K, Iizuka J, Hasegawa H, Kuramochi E, Fujino F, Ohashi K, Nihei T, Teranaka T, Mukai Y. Effect of the coating material on root dentin remineralization in vitro. Am J Dent 2014; 27: 258 – 262.

5) 倉持江里香, 富山 潔, 熊田秀文, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 渡邊清子, 浜田信城, 寺中敏夫, 向井義晴. S-PRG溶出液のポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する抗菌効果. 日本歯科保存学会誌 2014; 57: 414–420.

〔学会発表〕(計17件)

1) 富山 潔, 石澤将人, 長谷川晴彦, 渡邊清子, 河田 亮, 二瓶智太郎, 齋藤正寛, 高橋 理, 浜田信城, Exterkate RAM, 向井義晴. カキタンニン処理を行ったポリマイクロバイアルバイオフィルム細菌叢の網羅的解析. 第145回日本歯科保存学会, キッセイ文化ホール, 松本, 2016

2) 石澤将人, 富山 潔, 長谷川晴彦, 浜田信城, 向井義晴. S-PRG フィラー溶出液がポリマイクロバイアルバイオフィルムの群集構造に与える影響 - 次世代型シーケンスによるバイオフィルム菌叢の網羅的解

析 - . 第 145 回 日本歯科保存学会, キッセイ文化ホール, 松本, 2016

3) 富山 潔, 石澤将人, 渡辺清子, 河田 亮, 齋藤正寛, 高橋 理, 浜田信城, Exterkate RAM, 向井義晴. 柿タンニンがポリマイクロバイアルバイオフィルムの Regrowth に与える影響, 第 58 回 歯科基礎医学学会学術大会, 札幌コンベンションセンター - , 札幌, 2016

5) Tomiyama K, Kawata A, Higashi A, Watanabe K, Kumada H, Hasegawa H, Saito M, Takahashi O, Hamada N, Mukai Y. Effects of tannin extracted from persimmon on recovery of biofilms. 94th General Session & Exhibition of the IADR, Coex, Convention center, Seoul, Republic of Korea, 2016

6) 富山 潔, 長谷川晴彦, 石澤将人, 椎谷 亨, 渡辺清子, 河田 亮, 二瓶智太郎, 齋藤正寛, 高橋 理, 浜田信城, Exterkate RAM, 向井義晴. カキタンニンがポリマイクロバイアルバイオフィルムの群集構造に与える影響, 第 144 回 日本歯科保存学会

7) 石澤将人, 富山 潔, 長谷川晴彦, 浜田信城, 向井義晴. S-PRG フィラー溶出液がポリマイクロバイアルバイオフィルムの群集構造に与える影響 - リアルタイム定量 PCR 法による解析 - . 第 144 回 日本歯科保存学会, 2016

8) 富山 潔, 長谷川晴彦, 椎谷 亨, 渡辺清子, 河田 亮, 東 一善, 齋藤正寛, 高橋 理, 浜田信城, Exterkate RAM, 向井義晴. カキタンニンのポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する酸産生抑制効果, 第 143 回 日本歯科保存学会, 2015

9) 富山 潔, 長谷川晴彦, 椎谷 亨, 渡辺清子, 河田 亮, 東 一善, 齋藤正寛, 高橋 理, 浜田信城, Exterkate RAM, 向井義晴. High through put screening が可能なポリマイクロバイアルバイオフィルムモデルによる新規抗菌療法の検討, 第 8 回日本口腔検査学会, 2015

10) 富山 潔, 長谷川晴彦, 椎谷 亨, 渡辺清子, 河田 亮, 東 一善, 二瓶智太郎, 中村健一, 奥原正國, 邊見篤史, 齋藤正寛, 高橋 理, 浜田信城, 寺中敏夫, 向井義晴. カキタンニンのポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する増殖抑制効果. 第 142 回日本歯科保存学会, 2015

11) 長谷川晴彦, 富山 潔, 熊田秀文, 飯塚純子, 倉持江里香, 國松雄一, 椎谷 亨, 寺中敏夫, 浜田信城, 向井義晴. 過酸化尿素処理がバイオフィルムの象牙質脱灰病巣形成に及ぼす影響. 第 142 回日本歯科保存学会, 2015

12) 富山 潔, 向井義晴, 齋藤正寛, 渡辺清子, 熊田秀文, 河田 亮, 東 一善, 二瓶智太郎, 椎谷 亨, 長谷川晴彦, 倉持江里香, 寺中文子, 三宅 香, 中村健一, 奥原正國, 邊見篤史, 高橋 理, 浜田信城, 寺中敏夫. カキタンニンのポリマイクロバイアルバイオフィルム形成象牙質の脱灰抑制効果. 第 141 回日本歯科保存学会, 2014

13) Tomiyama K, Kawata A, Higashi A, Watanabe K, Kumada H, Nihei T, Shiiya T, Hasegawa H, Kuramochi E, Teranaka A, Miyake K, Saito M, Takahashi O, Hamada N, Teranaka T, Mukai Y. Antibacterial effect of tannin from astringent persimmon on polymicrobial biofilm. Antibacterial effect of tannin from astringent persimmon on polymicrobial biofilm. The 6th International

Association of Dental Research Pan-European
Region Meeting, Dubrovnik Croatia

14) 富山 潔, 河田 亮, 東 一善,
渡辺清子, 熊田秀文, 二瓶智太郎,
椎谷 亨, 長谷川晴彦, 倉持江里香,
寺中文字子, 三宅 香, 中村 健, 奥原正國,
邊見篤史, 齋藤正寛, 高橋 理, 浜田信城,
寺中敏夫, 向井義晴. カキタンニンのポリマ
イクロバイアルバイオフィルムに対する抗
菌効果 - 共焦点レーザー顕微鏡による観
察 - . 第 140 回日本歯科保存学会, 2014.

15) 長谷川晴彦, 富山 潔, 熊田秀文,
河田 亮, 飯塚純子, 倉持江里香, 椎谷 亨,
東 一善, 寺中敏夫, 高橋 理, 浜田信城,
向井義晴. ポリマイクロバイアルバイオフ
ィルムモデルを利用した過酸化尿素の殺菌効
果 . 第 140 回日本歯科保存学会, 2014.

16) 寺中文字子, 富山 潔, 熊田秀文, 三宅 香,
長谷川晴彦, 倉持江里香, 大橋 桂,
清水統太, 向井義晴, 浜田信城, 二瓶智太郎.
各種修復材料におけるポリマイクロバイ
アルバイオフィルムの付着性 . 第 140 回日本
歯科保存学会, 2014.

17) 向井義晴, 倉持江里香, 富山 潔,
熊田秀文, 椎谷 亨, 飯塚純子, 長谷川晴彦,
二瓶智太郎, 渡辺清子, 浜田信城. 口腔ケア
が困難な災害時における口腔内バイオフ
ィルム形成抑制および抗齲蝕効果のある歯磨
材ならびに洗口剤の検討 . 第二回災害医療歯
科学研究報告会, 2014.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富山 潔 (TOMIYAMA Kiyoshi)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号 : 90237131

(2) 研究分担者

向井義晴 (MUKAI Yoshiharu)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号 : 40247317

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者