

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870665

研究課題名(和文) 歯周炎発症機構における *A. naeslundii* 線毛の分子生物学的機能解析研究課題名(英文) The functional analysis of *A. naeslundii* fimbriae in periodontal diseases

研究代表者

佐藤 武則 (SATO, TAKENORI)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40638904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔バイオフィルム形成における *A. naeslundii* 線毛遺伝子を解析し、さらに酸化チタン半導体を用いたバイオフィルム除去法について評価した。その結果、我々は *A. naeslundii* 線毛遺伝子変異株の作製が成功に至らなかったが、酸化チタン光触媒機能と微弱電流が口腔バイオフィルムの除去に貢献し、歯周病予防への有用性が期待できることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was analyzed the genes of *A. naeslundii* fimbriae, and evaluated the biofilm removal of a titanium oxide semiconductor with an electric toothbrush. In these results, we couldn't succeed in the mutation of *A. naeslundii* fimbriae, but titanium oxide photocatalytic properties and electric current contribute to the reduction of oral biofilm and aid in the prevention of periodontal diseases.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：歯周炎 バイオフィルム *A. naeslundii* 線毛 遺伝子

1 . 研究開始当初の背景

歯周炎の主な原因は、多種類の口腔細菌が形成するバイオフィームである。バイオフィーム形成は歯面や唾液ペリクルなどに歯肉縁上プラーク中のグラム陽性菌が付着し、歯周病原細菌の定着の足場となっており、グラム陽性菌が歯周病発症と進行に大きな影響を与えているものと考えられている。*Actinomyces naeslundii* は歯周病原細菌である *Fusobacterium nucleatum* とともにバイオフィーム形成の中核的存在を担い、バイオフィームの成熟に伴う他菌種間との共凝集や、アドヘジンとレセプターによる特異的付着機構、静電氣的結合などにより、歯周病原細菌の口腔内定着を補助していることが報告されている。このような口腔内定着機構には、菌体構造物である線毛が関与していることが報告され、上皮細胞や歯面、およびペリクルへの定着にも関与することから、線毛がバイオフィーム形成の重要な病原因子であると考えられている。

一方、バイオフィームは菌体外多糖体で覆われているため、抗生物質や消毒剤などに対して強い抵抗性を示すほか、ブラッシングなどによる機械的除去方法だけでは十分な除去効果が得られないことが明らかになっている。

2 . 研究の目的

本研究は、口腔バイオフィーム形成における *A. naeslundii* 線毛の役割を解明することを目的として、遺伝子変異株作製を行ない、さらに口腔バイオフィームに対する新たな効果的な除去方法を探索することを目的として、太陽電池を付与した酸化チタン半導体の光触媒機能を用いて検討した。

3 . 研究の方法

(1) *A. naeslundii* の線毛遺伝子の解析と遺伝子変異株の作製

供試菌には *A. naeslundii* T14V 株を用い、イーストエキストラクトを添加したブレインハートインフュージョン (BHI) 液体培地を用いて 37°C、18 時間嫌気培養したものを使用した。本研究室の DNA 解析システムを用いて、薬剤耐性遺伝子の挿入箇所を詳細に検討後、プラスミド pJRD215 上のストレプトマイシンとカナマイシンの薬剤耐性遺伝子を *A. naeslundii* T14V 株の線毛遺伝子内に挿入し、線毛遺伝子を不活化した。この線毛遺伝子不活化 DNA 断片を含むプラスミドを大腸菌へ形質転換し、プラスミド DNA の精製を行なった。次に、遺伝子不活化プラスミドを導入した大腸菌株と *A. naeslundii* T14V 株を共培養後、線毛遺伝子を不活化した DNA 断片をエレクトロポレーション法により、*A. naeslundii* に染色体 DNA 上の正常線毛遺伝子と相同的遺伝子組換えを行ない、遺伝子変異株を作製した。線毛遺伝子不活化の確認は、コロニドットハイブリダイゼーション

によりスクリーニング後、サザンハイブリダイゼーション法を用いて、*A. naeslundii* の染色体 DNA 中に線毛遺伝子と薬剤耐性遺伝子の両方にハイブリダイズする断片の存在を確認するほか、菌体の電子顕微鏡による画像解析により線毛の欠失の確認を行なった。

(2) 酸化チタンの光触媒機能を用いたバイオフィーム除去効果の検討

酸化チタン半導体と太陽電池を接続した電気回路によるバイオフィーム除去効果

本実験には *A. naeslundii* T14V 株に加えて、*Streptococcus mutans* Ingbritt 株、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株の計 3 菌株を、ヘミンとビタミン K₁ を含有した BHI 液体培地で 18 時間嫌気培養したものをを用いた。24 ウェルのプラスチックプレート内に供試菌のバイオフィームを形成した後、酸化チタン半導体に太陽電池を接続した電気回路をリン酸緩衝液中に作用させ、7 cm の距離から光照射を行なった。その後、経時的に除去されたバイオフィームを含んだ懸濁液の濃度を測定し、さらにプレート内に残留したバイオフィームを走査型電子顕微鏡より解析した。またこの電気回路を流れる電流量についても種々の溶液を用いて測定した。

電動歯ブラシとの併用によるバイオフィーム除去効果

(2)- で用いた供試菌株を用いて、各々カバーガラス上でバイオフィーム形成させた後、太陽電池を付与し酸化チタン半導体を内蔵した電動歯ブラシを、7 cm の距離から光照射を行ないながら、各供試菌のバイオフィームに 1 分間機械的振動を加えた。その後、クリスタルバイオレット溶液で染色し、クリスタルバイオレット染色後のアルコール脱色操作により得られる機械的振動により除去されたバイオフィームを含む溶液の濃度によりバイオフィーム除去効果を評価した。

4 . 研究成果

(1) *A. naeslundii* の線毛遺伝子の解析と遺伝子変異株の作製

1999 年に Yeung により *A. naeslundii* には 2 種類の線毛タンパク質が存在することが報告されている。本研究においても 2 種類の線毛遺伝子の抽出と遺伝子変異株の作製を試みた。その結果、菌体からの線毛遺伝子の抽出は成功したが、遺伝子変異株の獲得までには至ることができなかった。

(2) 酸化チタンの光触媒機能を用いたバイオフィーム除去効果

酸化チタン半導体と太陽電池を接続した電気回路を用いてバイオフィーム除去効果を検証した結果、太陽電池を付与した場合と付与しない場合で、除去効果に有意差が認め

られ ($p < 0.01$)。走査型電子顕微鏡により、太陽電池を付与した場合にはバイオフィーム形成した菌体の破壊像が認められた。半導体を流れる電流量は、唾液とリン酸緩衝液で近似した数値を示し、生体内を流れる微弱電流の範囲内であった。

一方、太陽電池と酸化チタン半導体を付与した電動歯ブラシを用いてバイオフィーム除去効果を検討したところ、太陽電池と酸化チタン半導体を付与しない電動歯ブラシと比べて、有意なバイオフィーム除去効果が得られた ($p < 0.01$)。以上の結果から、酸化チタンの光触媒機能と太陽電池から流れる微弱電流を電動歯ブラシと併用することにより、効果的なバイオフィーム除去効果が得られることが示唆された。

本研究成果をふまえ、今後 *A. naeslundii* 線毛遺伝子の変異株の作製については、細菌の培養条件や菌株間での遺伝子発現の比較した上で実験を継続する。また、酸化チタン光触媒機能におけるバイオフィーム除去効果については、照射によりチタンから励起される電子のバイオフィーム内への浸透性について検討を加えるほか、さらなる口腔ケアへの応用性についても検討する。

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)

佐藤武則, 佐々木 悠, 渡辺清子, 浜田信城: *Actinomyces naeslundii* の歯槽骨吸収機構解明と歯周病予防法の探索, 神奈川歯学, 査読有, 50 (2), 89-93, 2015.

佐藤武則, 佐々木 悠, 浜田信城: 文献と臨床の橋わたし 口腔細菌から読み取る歯周治療のエビデンス(第1回) 口腔細菌が形成するバイオフィームとは? 日本歯科評論, 査読無, 75(10): 145-148, 2015.

佐々木 悠, 佐藤武則, 浜田信城: 文献と臨床の橋わたし 口腔細菌から読み取る歯周治療のエビデンス(第2回) バイオフィーム除去に効果的な抗菌療法とは? 日本歯科評論, 査読無, 75(11): 143-146, 2015.

佐藤武則, 佐々木 悠, 浜田信城: 文献と臨床の橋わたし 口腔細菌から読み取る歯周治療のエビデンス(第3回) インプラント周囲炎の原因と対応とは? 日本歯科評論, 査読無, 75(12): 139-142, 2015.

Sato T, Hirai N, Oishi Y, Uswak G, Komiyama K, Hamada N: Efficacy of a solar-powered TiO_2 semiconductor electric toothbrush on *P.gingivalis* biofilm. American Journal of Dentistry, 査読有, 28

(2):81-84, 2015.

Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Sugiyama S, Toyama T, Sato T, Hamada N, Tsukinoki K, Takahashi SS, Lee MC. *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss is accelerated in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. Archives of oral biology, 査読有, 60(6): 911-918, 2015. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.02.012.

Takeda O, Toyama T, Watanabe K, Sato T, Sasaguri K, Akimoto S, Sato S, Kawata T, Hamada N. Ameliorating effects of Juzentaihoto on restraint stress and *P.gingivalis*-induced alveolar bone loss. Archives of oral biology, 査読有, 59(11):1130-1138, 2014. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.06.010.

井上吉登, 佐藤武則, 藤田茉依子, 大久保孝一郎, 熊田秀文, 浜田信城, 木本茂成: 重曹を添加した電解次亜塩素酸水の *Streptococcus mutans* に対する殺菌効果およびバイオフィーム除去効果, 査読有, 神奈川歯学, 49(2): 111-118, 2014.

熊田秀文, 佐藤武則, 遠藤 生, 藤岡 隼, 築山光一, 浜田信城, 藤本賢二: *Porphyromonas gingivalis* lipid A の合成戦略 光学活性 α -ヒドロキシ脂肪酸の新規光学分割法, 査読有, 神奈川歯学, 49(2): 134-140, 2014.

[学会発表](計 5 件)

Sato T, Hamada N: Efficacy of a toothpaste containing natural ingredient against oral bacteria. 93rd The IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition, Boston, MA, USA, 2015.3.11.

Sato T, Oishi Y, Hamada N: Efficacy of a solar-powered TiO_2 semiconductor electric toothbrush. 7th World Congress on Preventive & Regenerative Medicine, Taipei, Taiwan, 2014. 11.4-7.

Sato T, Toyama T, Takahashi S-S, Hamada N: Antimicrobial activity and inhibitory effect of alveolar bone resorption by a toothpaste containing Pycnogenol®. International Union of Microbiological Societies 2014, Montreal, Canada, 2014. 7.29.

佐藤武則, 早坂奈美, 遠山歳三, 高橋俊介,

浜田信城：歯磨剤の抗菌効果および歯槽骨吸収抑制効果の検討．第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会，福岡，2014．9.25-27.

佐藤武則，渡辺清子，浜田信城：太陽電池内臓電動歯ブラシの酸化チタン光触媒作用によるバイオフィルム除去効果．医学生物学電子顕微鏡技術学会第 30 回学術講演会および総会，大阪，2014．5.23-25.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 武則 (SATO TAKENORI)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・
特別研究員
研究者番号：40638904