

学位研究紹介

硫酸化体ビザンチンは *Streptococcus* 属の付着関連遺伝子群の発現を低下させることでバイオフィーム構造を剥離する Sulfated vizantin causes the detachment of biofilms composed mainly of the genus *Streptococcus* by modulating microbial adhesion

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
口腔健康科学講座 う蝕学分野
長谷川泰輔

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics,
Department of Oral Health Science Niigata University Graduate
School of Medical and Dental Sciences

Taisuke Hasegawa

【目 的】

デンタルバイオフィーム制御はブラッシングやフロッシングなどの機械的コントロールを基本として、歯磨剤に含まれる抗菌成分や洗口液などの化学的コントロールが補完的役割を果たしている¹⁾。しかし、近年、化学的コントロールは、様々な副反応が起こる可能性が指摘されている。すなわち、耐性菌の出現や常在細菌叢の攪乱のほか、殺菌してもバイオフィーム構造が付着界面に残ることや²⁾、subminimal inhibitory concentrations (sub-MIC) 量の抗菌剤によりバイオフィーム形成が促進すること³⁾が報告されている。これらのことから、我々は口腔常在

細菌叢を変動させずに、バイオフィームマトリックスを剥離させる制御法の開発に取り組んできた。機能性糖脂質であるビザンチン (Viz-S) には殺菌効果はないが、Viz-S 存在下で形成した *Streptococcus mutans* バイオフィームは、緩衝液での洗浄により、容易にバイオフィームの体積が減少する⁴⁾。一方で、抗バイオフィーム作用が菌種特異的であるか否か、およびその作用機序に関しては未解明である。

そこで本研究では、細菌叢の異なる *ex vivo* バイオフィームモデルを用いて、Viz-S のヒト唾液由来細菌に対する抗バイオフィーム効果を解析するとともに、その機序を解明することを目的とした。

【材料と方法】

1. 培養条件の異なる *ex vivo* バイオフィームの作製

全顎的にう蝕および歯周炎がない健常者より採取した無刺激唾液を等量混合し、0.2% スクロース添加 1/4 濃度 Brain Heart Infusion (BHI) (Cariogenic Biofilm; CB) および 10% ウシ胎児血清添加 1/4 濃度 BHI (Gingivitis Biofilm; GB) に培地容量の 2% を添加し、6 穴マイクロプレート中で 24 時間嫌気培養してバイオフィームを作製した。作製したバイオフィームを 500rpm で 15 秒間振盪し、残存したバイオフィームを共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

2. 付着関連遺伝子発現の解析

CB について細菌叢解析を行ったところ、90% 以上を *Streptococcus* 属が占めていた。そこで *Streptococcus* 属のうち、付着への関与が想定される遺伝子の発現動態を解析した。

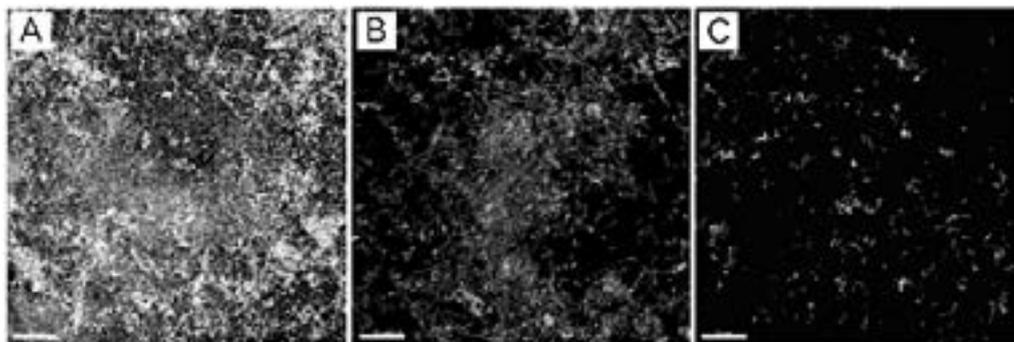


図1 Viz-S 存在下で 24 時間培養後の CB の共焦点画像 (Live/Dead 染色)
50 μ M (C) ではバイオフィーム量が減少したが、残存した付着菌は生菌であった。
A: Control, B: 10 μ M, C: 50 μ M. Scale bar=30 μ m

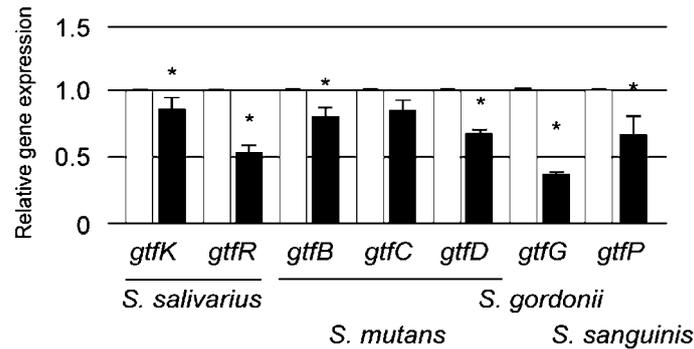


図2 CBF構成細菌のgtf群の遺伝子発現解析
CB培地中で4時間培養後のgtf群遺伝子発現量をReal-time PCR法で解析
(n = 6; *p < 0.05, t検定)

3. Viz-Sの細菌壁表層の性状に及ぼす影響

50 μ MのViz-Sを唾液由来細菌に10分間作用させた後、表面性状の変化をMicrobial Adhesion to Hydrocarbons (MATH) testにより評価した。さらに、Viz-S処理後の唾液由来細菌のハイドロキシアパタイトディスクへの付着抑制効果について、フローセルシステムを用いて解析した。

【結果および考察】

50 μ MのViz-S存在下において、CB群のバイオフィルムの体積が減少した(図1)。残存したバイオフィルム中の細菌の生死判定について蛍光プローブを用いて解析したところ、99%以上が生菌であった。また、50 μ MのViz-Sを作用させたCB群は、*Streptococcus*属のgtf群の発現が有意に減少した(図2)。このことから、Viz-Sは菌種特異的にスクロース依存性の付着に関与するgtf群の遺伝子発現に影響を与えることにより、*Streptococcus*属の付着を減弱させると推察された。MATH testの結果では、唾液由来細菌の菌体表層の疎水性は有意に減少していた。このことから、Viz-Sは菌体表面性状を親水性に変化させることで、菌種非特異的に細菌付着を減弱させた可能性が考えられた。

【結 論】

50 μ MのViz-Sは口腔細菌叢に影響を与えず、さらに、細菌の表面性状を変化させることで、菌種非特異的に付

着能を低下させると考えられた。バイオフィルムの初期形成に優位な*Streptococcus*属の付着関連遺伝子の発現を低下させることで、抗バイオフィルム効果を発揮すると考えられた。

【参考文献】

- 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), InTech, 2016.
- 2) Ohsumi T et al. Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm redevelopment. *PLoS One* 10: e0116647, 2015.
- 3) Dong L et al. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents*. 39: 390-395, 2012.
- 4) 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.