

氏名	塩田 康祥
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5309号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	海藻由来レクチンを用いた口腔バイオフィルム感染症の制御～有効性と安全性の検討～
論文審査委員	大原 直也 教授 仲野 道代 教授 高柴 正悟 教授

学位論文内容の要旨

緒言

口腔内は硬組織および軟組織が入り交じる複雑な環境下で数百種類もの細菌がバイオフィルムを形成して存在し、常に感染を成立させている。超高齢社会に突入した昨今、国の政策によって全年齢、特に高齢者の残存歯数は増えているが、感染管理の対応策が定まっていないという問題点が残存している。

バイオフィルム感染症への対応の第一選択は機械的除去である。さらに、機械的除去と併用して行う口腔ケア材料を用いた化学的な除去も対策の一つである。欧米諸国ではクロルヘキシジンが口腔ケア材料のゴールドスタンダードとして用いられているのに対して、日本では存在していない。新規的な発想に基づいた材料の探索、早期の実用化が求められている。

バイオフィルム感染制御のために、バイオフィルム形成の初期段階、すなわち細菌の初期付着を抑制する材料に注目した。細菌は歯面上の唾液成分由来の糖鎖を受容体として初期付着を行うため、その結合に対する阻害剤となり得る材料を模索し、レクチンに注目した。レクチンはあらゆる生命体中に存在し、様々な生理活性を有する。特に陸生植物レクチンは、連鎖球菌のバイオフィルムの形成を阻害するという報告があった。さらに、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) を対象とした我々の先駆研究では、特定の糖鎖構造、すなわちGalβ1-3GalNAc (Core 1構造) 認識レクチンがバイオフィルムの形成を阻害する傾向を得た。一方で、従来は採取、抽出、精製が困難であった海藻レクチンも、近年の技術の進歩により研究しやすい対象となった。海藻レクチンは分子量が小さく、抗原性が小さく、安定した物性を有するという利点をもつ。

以上の知見より、Galβ1-3GalNAc (Core 1構造) を認識する海藻レクチンに対象を絞り、ミル (海松) という緑藻に注目した。日本では馴染みの深い緑藻であり、継続的な材料採取も可能と考えた。ミルレクチンを早期に実用化することを目的として、橋渡し研究の一端を担った。すなわち、口腔内細菌の初期付着を阻害する、天然物由来の安全な材料という仮説を立て、有効性および安全性の検討を行った。

材料と方法

1. バイオフィルム形成阻害効果の検討と走査電子顕微鏡 (SEM) による細菌の観察

S. mutans は、ATCC25175 株、MT8148 株、GS-5 株を使用した。プレートにヒト唾液を播種し、2 時間静置して洗浄した。100 μg/mL に希釈したレクチンを播種し、1 時間静置して洗浄した。Todd-Hewitt Broth を用いて対数増殖期まで培養した後に、PBS で 5×10^7 cfu/mL に希釈した *S.*

mutans の培養液を播種し、さらに 16 時間培養した。形成されたバイオフィルムはクリスタルバイオレッド染色を行い、吸光度を測定した。また、プレートを試料として SEM で観察した。

2. 細菌の増殖抑制効果の検討

Brain Heart Infusion を用いて対数増殖期まで培養し、同培地で 1×10^7 cfu/mL に希釈した *S. mutans* ATCC25175 株の培養液をプレートに播種し、ミルレクチンを添加した。2 時間ごとに吸光度を測定しつつ、12 時間まで培養を行った。

3. ヒト由来の細胞に対する傷害性の検討

ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)、ヒト歯肉上皮細胞 (HGE)、THP-1 細胞、KB 細胞をミルレクチンで 24 時間処理後、テラゾリウム塩を用いた比色法で細胞傷害性を検討した。

4. 復帰変異原性試験

試験は直接法および代謝活性法 (代謝活性化 S9 mix 存在下) を行った。本試験で代表的に用いられる *Salmonella typhimurium* の 4 菌株と *Escherichia coli* の 1 菌株に対してミルレクチンを作用させ、試験用培地上で 45 時間培養し、コロニー数を測定した。コロニー数が陰性対照 (日本薬局方注射用水) の 2 倍以上であった時、復帰変異誘発性ありと判断した。

5. in vivo での安全性の検討

単回経口投与試験では、ラットに対しミルレクチン 200 mg/mL を 1 回投与し、その後 14 日間の動態観察と体重測定を行った。反復経口投与試験では、ラットに対しミルレクチン 400、および 1000 μ g/mL を 1 日 1 回、28 日間連続で投与した。試験期間中動態観察と体重測定を行い、期間終了後は血液生化学試験を行った。

結果

1. バイオフィルム形成阻害効果と SEM による細菌の観察

ミルレクチンと ABA は *S. mutans* の 3 菌株に対してバイオフィルム形成阻害効果を示した。SEM による観察では、ミルレクチンが細菌の外形を破壊せず、付着量を減少させている所見が得られた。

2. 細菌の増殖抑制効果

ミルレクチンは殺菌効果を有さず、細菌の増殖に影響を与えなかった。

3. ヒト由来の細胞に対する傷害性

ミルレクチンは HGF、HGE、THP-1 細胞に対して傷害性を示さなかった。500 μ g/mL では KB 細胞の細胞活性を低下させたが、100 μ g/mL では低下させなかった。

4. 復帰変異誘発性

ミルレクチンは直接法および代謝活性法において、復帰変異誘発性を示さなかった。

5. in vivo での安全性

ミルレクチンは生体に投与した場合、動態や体重変動の異常を引き起こさなかった。

考察

ミルレクチンは *S. mutans* に対してバイオフィルム形成阻害効果を有した。SEM による観察、細菌の増殖抑制効果の検討より、作用メカニズムは殺菌ではなく、菌の付着阻害であることが示唆された。一方、ヒト由来細胞への傷害性を示さず、遺伝毒性を有さず、また生体に有害性を示さなかった。以上より、ミルレクチンの有効性のみならず安全性についても肯定的な結果を得ることができた。今後は実用化を目指すとともに、*S. mutans* およびレクチンの糖鎖に対する結合ドメインの追究等、分子レベルでの検討も行う必要がある。

結論

ミルレクチンは *S. mutans* に対してバイオフィルム形成阻害効果を有し、その機序は殺菌でなく、細菌の付着阻害であると示された。口腔ケア材料や機能性食品としての応用に際し、十分な安全性を有した材料であることが示された。

論文審査結果の要旨

超高齢社会に突入した昨今、国の政策によって全年齢、特に高齢者の残存歯数は増えているが、口腔感染管理の対応策が定まっていないという問題がある。よって、新規の発想に基づいた口腔ケアのゴールドスタンダードとなり得る材料の探索と早期の実用化が求められている。

本研究では、口腔感染管理のためにバイオフィーム形成の初期段階、すなわち細菌が歯面上の唾液成分由来の糖鎖を受容体として行う初期付着に注目し、その付着を阻害するレクチンに注目した。レクチンは、連鎖球菌のバイオフィーム形成を阻害するという報告があり、*Streptococcus mutans*を対象とした我々の先行研究では、Gal β 1-3GalNAc (Core 1構造)を認識する陸生植物レクチンがバイオフィーム形成を阻害する傾向を報告した。ところで、陸生植物レクチンに対して海藻レクチンは分子量が小さく、抗原性が低く、安定した物性をもつ。また近年では、採取、抽出、精製が容易となったことから、陸生植物レクチンと同様に口腔ケア材料として研究しやすい対象となった。

以上の知見に基づき、本研究ではGal β 1-3GalNAcを認識するレクチンを有する海藻のミル(海松)に注目し、ミルレクチンが口腔内細菌の初期付着を阻害する、天然物由来の安全な材料である、という仮説を立てた。そして、ミルレクチンを新規の口腔内感染制御材料として利用することを目的に、その有効性および安全性を検討した。研究結果は、以下の内容であった。

1) バイオフィーム形成阻害効果と走査電子顕微鏡 (SEM) による細菌の観察

ミルレクチンと*Agaricus bisporus* agglutinin (陸生植物レクチンの一種)は、*S. mutans*の3菌株に対してバイオフィーム形成阻害効果を示した。SEMによる観察では、ミルレクチンが細菌の形態を破壊せず、細菌の付着およびバイオフィームの形成を抑制している所見が得られた。

2) 細菌の増殖抑制効果

ミルレクチンは、殺菌効果を示さず、細菌の増殖に影響を与えなかった。

3) ヒト由来細胞に対する傷害性

ミルレクチンは、500 μ g/mLではヒト歯肉線維芽細胞、ヒト歯肉上皮細胞、そしてTHP-1細胞の細胞活性を低下させなかった。KB細胞に対しては500 μ g/mLでは細胞活性を低下させたが、100 μ g/mLでは低下させなかった。

4) 復帰変異誘発性

ミルレクチンは、直接法および代謝活性法において、復帰変異誘発性を示さなかった。

5) *in vivo*での安全性

ミルレクチンは、生体に投与した場合、1回投与においても反復投与においても動態や体重変動の異常を引き起こさなかった。

以上のことから、ミルレクチンは*S. mutans*の固相への付着を阻害することでバイオフィーム形成阻害効果を有し、また、口腔ケア材料や機能性食品としての応用に際し、十分な安全性を有した材料であることが示された。本研究は、有効かつ安全で新規の口腔ケア材料の開発における橋渡し研究の一端を担い、今後の口腔バイオフィーム感染制御の発展に貢献するものである。

よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。