

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～

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

塩田康祥

Oral Biofilm Infection Control Using Marine Algal Lectin

-Effectiveness and Safety -

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Yasuyoshi SHIOTA

(平成 27 年 12 月 15 日受付)

緒言

口腔内は消化管の入口であり、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。口腔内感染症の代表例である齲蝕・歯周病などの感染症は乳幼児から高齢者まで幅広い年代で発症し、歯を喪失する最たる原因となる。また、歯の喪失に伴う口腔機能低下は高齢者における認知症や寝たきりへ繋がる¹⁾。さらに、超高齢社会に突入した昨今では、口腔内常在細菌が原因で発症する誤嚥性肺炎が社会問題にまで発展している。^{2,3)}。その要因は、口腔内常在細菌の存在、高齢化に伴う摂食・嚥下機能の低下⁴⁾に加えて、医療・介護の現場で十分に口腔ケアが行き届いていないことなど、口腔領域に対する感染管理の欠如が一因である⁵⁻¹⁰⁾。さらなる要因として、残存歯に重点をおいた 8020 運動の結果、認知症や寝たきりにより手指の運動機能が低下した高齢者では自己管理し難い歯が多く存在する状況、すなわち清掃しづらい口腔内環境が構築されていることも挙げなくてはならない。社会的観点から捉えた場合、これは感染管理の危機と言える。

上記の危機に対して予防方法への期待が高まっている。口腔内感染への対応の第一選択はバイオフィルムの機械的除去である。しかし、日常的な刷掃によってバイオフィルムの形成を抑制することはできるが、専門的な口腔ケアを受けなければ、歯面

に付着したバイオフィルムを完全に除去することは困難である。また、時間と労力の問題から十分な対策が行き届かないのが現状である。そこで、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となる。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¹¹⁾。しかし、日本は過去にクロルヘキシジンによるアナフィラキシー様症状が報告されたことから¹²⁾、欧米諸国と比較して低濃度での販売が義務づけられている。よって、日本におけるクロルヘキシジン製品は、使用時に数十から数百倍に希釈して使用されるため、非常に低い濃度で使用せざるを得ないのが現状である。その他の口腔ケア材料には、チモール、塩化セチルピリジニウム (CPC)、塩化ベンゼトニウム等が主成分として用いられており、殺菌効果は有するが、唾液の自浄作用により歯面上で効果が持続しない欠点がある。また、局所で用いる抗生物質製剤は、耐性菌の出現が問題となっており、長期的な使用は適していない^{13,14)}。さらに、バイオフィルム中には口腔ケア材料が到達しにくい。上記の理由により、口腔内のバイオフィルム感染症に対して、ゴールドスタンダードとなる方策が日本には存在しないため、新規的な発想に基づいた材料の探索に加え、早期に実用化させる橋渡し研究が求められている。

そこで、バイオフィルム感染症の制御のために、バイオフィルムの形成を初期段階で抑制し、かつ生体に安全である材料に着目した。バイオフィルムの形成段階は、①

細菌が歯面に接近してくる段階, ② 細菌が歯面に不可逆的な付着を行う段階, ③ バイオフィーム形成の初期段階, ④ バイオフィームが厚みを増す段階, ⑤ バイオフィーム内部が過密になって細菌が放出される段階の 5 段階に分類される¹⁵⁾。そのうち細菌が歯面に不可逆的な付着を行う段階は, 細菌の初期付着の段階である。そして, 口腔内細菌において初期付着の対象は, 歯面のペリクルである¹⁶⁾。ペリクルとは, 有機的な無細胞性の被膜であり, 唾液中の分子が歯面に選択的に吸着することによって生じる¹⁷⁾。細菌は, ペリクルに存在する唾液成分由来の糖鎖を受容体として結合し, その結合はレクチン様結合と呼ばれている¹⁸⁾。この初期付着機構に対して, 類似する糖鎖やターゲットの糖鎖へ特異的に結合活性を示すレクチンが, 上述の細菌と歯面との結合に対する阻害剤として有効であることが想像できる。これは細菌の初期付着を阻害する方法, いわゆる抗接着療法に基づいている¹⁹⁾。

レクチンは, 糖鎖に対する結合の特異性や多様性により, 様々な生体活性を行うことが知られており, 口腔領域におけるレクチンの作用の一つとして, 陸生植物レクチンが連鎖球菌の初期付着を阻害することで, バイオフィームの形成阻害を行うという報告がある²⁰⁾。一方でこれまでに我々は, 初期付着に関与し, バイオフィームの形成能に優れた *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) を対象として, バイオフィーム形成阻害効果を有するレクチンを絞り込む目的で網羅的な解析を行った。その結果, 特定の糖

鎖構造，すなわち Gal β 1-3GalNAc (Core 1 構造，Gal：ガラクトース，GalNAc：N アセチルガラクトサミン) 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²¹⁾。他方で近年，技術の進歩によって，従来困難であった海藻レクチンの抽出・精製が簡便となり，研究しやすい対象となった²²⁾。海藻レクチンは陸生植物レクチンと比較して分子量が小さく，抗原性が小さいという利点があり，複数のジスルフィド結合によって安定した物性を持つ。さらに，唾液成分由来の糖質であるムチンに対しての特異性が高く²³⁻²⁵⁾，海藻レクチンが既知の陸生植物レクチンよりも *S. mutans* のバイオフィルム形成を阻害したという報告もある²⁰⁾。

そこで，我々はこれまでに得た知見をもとに，Gal β 1-3GalNAc を認識する海藻由来レクチンに対象を絞り，ミル（海松）という緑藻に注目した。ミルは日本近海の低潮線付近に自然生育する海藻で，一部の地域では養殖も可能であることから，安定した供給源が確保できる。また，古来より日本人にとって食経験のある海藻でもあるため，早期に実用化可能な材料として適している。本研究では，海藻由来レクチンであるミルレクチンが，安全かつ有効に口腔内細菌の初期付着を阻害するという仮説のもと，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，有効性および安全性を検討した。

材料と方法

レクチン

本研究で使用したレクチンを表 1 に示した。用いたレクチンはすべて天然物由来のレクチンであった。*Agaricus bisporus* agglutinin (ABA) のみ Phosphate buffer (PB : 10 mM, pH6.8) で希釈し, その他のレクチンは Phosphate buffered saline (PBS : pH7.2 ; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で希釈した。ミルレクチン以外は J オイルミルズ (東京) より購入した。ミルレクチンはグライエンス (愛知) より提供を受けたものを使用した。

細菌とその培養

S. mutans は ATCC25175 株, MT8148 株, GS-5 株を使用した。バイオフィーム形成阻害効果の検討においては, それぞれの菌株を, 37°C, 5 % CO₂ の条件下で嫌氣的に Todd-Hewitt Broth (THB : Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) を用いて培養した。細菌の増殖抑制効果の検討においては, ATCC25175 株を, 37°C, 5 % CO₂ の条件下で嫌氣的に Brain Heart Infusion (BHI : Becton) を用いて培養した。

Salmonella typhimurium (*S. typhimurium*) は TA100 株, TA1535 株, TA98 株, TA1537 株を使用した。それぞれの菌株を 42°C, 5 % CO₂ の条件下で嫌氣的に Rappaport-Vassiliadis Broth (日本製薬, 東京) を用いて培養した。

Escherichia coli (*E. coli*) は WP2uvrA 株を使用した。それぞれの菌株を 37°C, 5 % CO₂ の条件下で嫌氣的に Lysogeny Broth medium (和光純薬, 大阪) を用いて培養した。

ヒト唾液

3 人の健常な 20 代の男性から, パラフィンを咀嚼した際の刺激時唾液を 15 mL ずつ採取した。唾液の採取は, 起床後に 2 時間以内に飲食と口腔清掃をしていない状態で行った。その後, 4°C, 3,000 回転/分, 20 分間の遠心分離を行い, 上清のみを使用した。

ヒト由来細胞と培養

ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF : ScienCell, California, USA) は, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM : Life Technologies) に最終濃度が 10 % の Fetal bovine serum (FBS : Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と, 最終濃度が 100 unit/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシン (Life Technologies) および最終濃度が 0.05 % の Trypsin/EDTA を加えて培養したものを使用した。

ヒト歯肉上皮細胞 (HGE) は, 20 代の健常男性から採取した歯肉上皮細胞を, Simian virus 40 を用いて変異させ, Keratinocyte-SFM (Life Technologies) を用いて培養したものをを使用した (研究倫理審査専門委員会承認 No. 975)。

THP-1 細胞 (THP-1 : 急性単球性白血病由来, Manassas, VA, USA) は, Roswell Park

Memorial Institute medium (Life Technologies) に最終濃度が 10 %の FBS と最終濃度が 100 unit/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシンを加えて培養したものを使用した。

KB 細胞 (KB : ヒト類表皮癌細胞由来, Manassas, VA, USA) は, DMEM に最終濃度が 10 %の FBS と最終濃度が 100 unit/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシンおよび最終濃度が 0.05 % Trypsin/EDTA を加えて培養したものを使用した。

なお, FBS は, 56°C で 30 分間非働化したものを使用した。

バイオフィーム形成阻害効果の検討

Teixeira ら²⁶⁾の方法を一部改変して検討を行った。96 穴の平底マルチプレート (Nunc, Denmark) にヒト唾液を 100 µL ずつ播種し, 37 °C で嫌氣的に 2 時間静置した。PBS で緩やかに 2 回洗浄した後, 各レクチンを 100 µL ずつ添加し, 37°C で嫌氣的に 1 時間静置した。PBS で緩やかに 2 回洗浄した後, PBS で 5×10^7 cfu/mL に希釈した *S. mutans* 培養液を 100 µL ずつ播種し, 37°C で嫌氣的に 16 時間培養した。PBS で緩やかに 2 回洗浄した後, 25 %グルタラルアルデヒド (Sigma-Aldrich) を PBS で 1 : 100 に希釈したもので固定を行った。PBS で緩やかに 2 回洗浄した後, 通法に従ってクリスタルバイオレット液 (ナカライテスク, 京都) で染色を行った。その後, 99 %エタ

ノール（和光純薬）で抽出し，マイクロプレートリーダー（SH-1000 Lab：コロナ電機，茨城）を用いて吸光度（波長；570 nm）を測定した。

走査電子顕微鏡による細菌の観察

電界放射型走査電子顕微鏡（SEM：Field Emission-Scanning Electron Microscopy DS-720：Topcon，東京）を用いて，各ウェルにおける細菌の付着様相と形態を観察した。唾液に対して，レクチン非作用時，BSA作用時，ミルレクチン作用時のウェルを対象とした。各ウェルをテーブルトップカットオフマシン（Accutom-50：Struers，東京）を用いて切り出し，50 %エタノールから無水エタノールに浸漬して脱水した後，酢酸 3-メチルブチル（和光純薬）に1時間浸漬させ，臨界点乾燥器（JCPD-5：JEOL，東京）を用いて昇華させた。試料表面に真空蒸着器（Neoc ネオオスミウムコーター：メイワフォーシス，東京）を用いて真空蒸着を施し，加速電圧（10 kV）下で観察した。

細菌の増殖抑制効果の検討

96 穴の平底マルチプレートに，BHI で 1×10^7 cfu/mL に希釈した *S. mutans*（ATCC25175 株）培養液を 90 μ L ずつ播種した。同時にミルレクチン（100 μ g/mL，1,000 μ g/mL），陽性対照として CPC（Sigma-Aldrich，100 μ g/mL），陰性対照として PBS をそれぞれ 10 μ L ずつ添加し，プレート中で緩やかに攪拌した。37°C で嫌氣的に培養しながら，2 時間ごとに吸光度（波長：660 nm）を測定した。

ヒト由来の細胞に対する細胞傷害性の検討

96 穴の平底細胞培養用のプレート (Corning, NY, USA) に, HGF, HGE, THP-1, KB を播種し, それぞれの条件下で 24 時間培養した。さらに, レクチンと対照群を添加して 24 時間培養した。その後, 光学顕微鏡 (Olympus BX50 : オリンパス, 東京) 下で細胞の増殖と形態を観察した。さらに, 通法に従って 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) アッセイと, CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いた MTT アッセイを行い, 細胞への障害性を検討した。なお, 浮遊細胞である THP-1 のみ MTS アッセイを行い, 付着細胞である HGF, HGE, KB は MTT アッセイを行った。陽性対照群は, リンパ球の幼弱化を行うことで知られており, 細胞活性を変化させることが報告されている Concanavalin A (Con A) を使用した²⁷⁾。

復帰変異原性試験

「新規化学物質等に関わる試験の方法について」²⁸⁾および「OECD (経済協力開発機構) 化学物質試験法ガイドライン 471/細菌を用いる復帰変異試験」²⁹⁾を参考にして試験を行った。試験は直接法 (代謝活性化 S9 mix の非存在下) および代謝活性化法 (代謝活性化 S9 mix の存在下) で, プレインキュベーション法により実施した。S9 mix

は、S9（キッコーマン、千葉）、S9 mix 用 Cofactor（Cofactor-I，オリエンタル酵母工業、東京）および日本薬局方注射用水（大塚製薬、東京）を用いて用時調整した。用量設定試験では、直接法および代謝活性法ともに被験物質の最高用量を 5,000 µg/plate とし、以下公比約 3 で 6 段階の計 7 用量（5～5,000 µg/plate）を設定した。本試験では、用量設定試験の結果に基づき、直接法および代謝活性法ともに被験物質の最高用量を 5,000 µg/plate とし、以下公比 2 で 6 段階の計 7 用量（78.1～5,000 µg/plate）の試験群を設定した。陰性対照として、被験物質の調整媒体である日本薬局方注射用水の原液を使用した。使用した細菌に対する陽性対象物質は表 2 に示した。試験には、*S. typhimurium*（TA100 株、TA1535 株、TA98 株、TA1537 株）および *E. coli*（WP2uvrA 株）を用いた。これらの菌株は、遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として一般的に使用されている。前培養用のニュートリエントブロス培地として、OXOID NUTRIENT BROTH No.2（Thermo, MA, USA）を日本薬局方注射用水で 25 g/L に調整した。*S. typhimurium* TA98 株および TA100 株の培地には、アンピシリンナトリウム（25 µg/mL、ナカライテスク、京都）を添加した。試験用培地として最小グルコース寒天培地（バイタルメディア AMT-O 培地、極東製薬、東京）を使用した。重層用培地はソフトアガー（Bacto™ Agar, Becton）およびアミノ酸溶液（L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液、または L-トリプトファン溶液：和光純薬）を日本薬局方注射用

水で調整し、10:1の容量比で混合した。試験菌株は37℃、5% CO₂の条件下で嫌氣的に培養し、吸光度（波長；660 nm）を測定し、生菌数が1×10⁹ cfu/mLより多いことが確認された培養液を試験に使用した。被験物質および対照物質調整液の処理は、プレインキュベーション法で行った。すなわち、蓋付きのポリエチレン製チューブ（5 mL容量）を使用して、被験物質あるいは対照物質調整液0.1 mLに、直接法の場合は0.1 M PB（pH 7.4）0.5 mLを、代謝活性法の場合はS9 mix 0.5 mLをそれぞれ加えて混合し、さらに、菌培養液0.1 mLを加えて37℃、振幅40 mm、振盪速度100回/分に設定した振盪恒温槽（Personal-II-EX、タイテック、埼玉、）で20分間振盪培養した。振盪培養終了後、*S. typhimurium*はL-ヒスチジン（0.05 mM）およびD-ビオチン（0.05 mM）を含む重層用培地2 mLを、*E. coli*はL-トリプトファン（0.05 mM）を含む重層用培地2 mLを、それぞれ加えて混和してプレートに重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、被験物質処理群について、プレートでの被験物質の析出の有無を目視で確認した。その後、37℃、5% CO₂の条件下で45時間培養を行った。その後、コロニー数の計測を行い、コロニー数が陰性対照群の2倍以上の場合を復帰変異誘発性が陽性と判定した。

In vivo での安全性の検討

1. ラット

ラットは CrI : CD (SD) 系ラット (日本クレア, 東京) を使用し, 1 週間の馴化期間を設けた後に 6 週齢まで飼育した。動物実験は, 岡山大学動物実験委員会承認 (OKU-2014428 号) の下で実施し, ラットは室温 22~24 °C, 人工照明 6:00~18:00 に設定された岡山大学歯学部動物実験施設で飼育した。

2. 単回経口投与試験

「医薬品の製造 (輸入) 承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」³⁰⁾ に基づいて実施した。6 週齢のラットを雌 5 匹, 雄 5 匹を割合で 2 群 (計 20 匹) に分類し, 1.ミルレクチン (200 mg/mL) 投与群, 2.対照 (精製水) 群とした。ミルレクチンはヒト 1 日限界量である 2,000 mg/kg をラット体重換算で設定した。

投与開始を 0 日として 14 日間の単回経口投与を行った。0 日に, ディスポーザブル胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて, それぞれの試薬を強制的に 10 mL/kg 経口投与した。投与から 4 時間後までは 1 時間ごとに, ラットの異常行動と外観の変化の有無を観察した。

体重測定は投与後 0, 1, 3, 5, 7, 10 そして 14 日に実施した。電子式上皿天秤 (GX-2000, エー・アンド・デイ, 東京) を用いて測定し, 1 g 単位で測定した。

投与後 14 日にジエチルエーテル (ナカライテスク) 麻酔下にて腹大動脈を切断し, 放血により安楽死させた後, 剖検を行った。剖検時には全身の器官と組織を肉眼的に

観察した。各投与物質による影響と考えられる肉眼的異常所見を認めなかった。

3. 反復経口投与試験

6週齢のラットを雌3匹，雄3匹を割合で3群（計18匹）に分類し，1.ミルレクチン（400 µg/mL）投与群，2.ミルレクチン（1,000 µg/mL）投与群，3.対照（精製水）群とした。

長期に渡る持続的な経口摂取での各投与物質の生体毒性を検討するために，投与期間は28日間とした。ディスポーザブル胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて，1日に1回それぞれの試薬を強制的に2 mL/kg 経口投与した。投与から4時間後までは1時間ごとに，ラットの異常行動と外観の変化の有無を観察した。

体重測定は28日間毎日実施した。電子式上皿天秤を用いて測定し，1 g 単位で測定した。

投与後28日にジエチルエーテル麻酔下にて下大静脈からの穿刺によって静脈血を採取し，同時に放血により安楽死させた後，剖検を行った。剖検時には全身の器官と組織を肉眼的に観察した。各投与物質による影響と考えられる肉眼的異常所見を認めなかった。採取した血液から4°C，4,500回転/分，20分間の遠心分離によって血清を分離し，血液生化学試験を実施した。試験項目については表3に示した。

統計処理

各実験系における統計解析は、3 群間以上の差の検定には one-way analysis of variance (one-way ANOVA) を用い、さらに多重比較検定を Dunnet test で行った。各々の統計処理は、JMP ソフトウェア (version 12.0, SAS, Cary, North Carolina, USA) を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

バイオフィームおよび細菌の増殖に与える影響

バイオフィーム形成阻害効果の検討においては、BSA (Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) 添加群を陽性対照群と設定した。BSA はブロッキング剤として用いられるが、炭水化物の夾雑物を含み、細菌のバイオフィーム形成に有意に働くためである。ミルレクチン、ABA は *S. mutans* 全 3 菌株のバイオフィーム形成を有意に抑制した。PVL は全 3 菌株のバイオフィーム形成を有意に促進した。(図 1)。

この様相を電子顕微鏡で観察するために、陽性対照群 (レクチン非作用群、BSA 添加群) とミルレクチン添加群の所見を比較した (図 2)。1,000 倍拡大時にはプレート底面への *S. mutans* の付着様相が観察できた。BSA 添加群ではプレート一面に細菌の付着が観察できた一方、ミルレクチン添加群では細菌の付着がほとんどなかった。10,000 倍拡大時、レクチン非作用群では成熟したバイオフィームが観察できた。BSA 添加群では多数の細菌が密集している像が観察できた。一方、ミルレクチン添加群では細菌の付着がほとんどなかった。30,000 倍拡大時、レクチン非作用群では菌体が立体的に密集しており、一つの菌体が複数の菌体と結合している像が観察できた。BSA 添加群では細菌が多数連鎖している像が観察できた。一方、ミルレクチン添加群では細菌の連鎖がほとんど見られなかった。菌体の外観は他群と比較して明らかな差はな

かった。

S. mutans ATCC25175 株の増殖に対する影響をみると、バイオフィルム形成阻害試験の有効濃度であるミルレクチン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した際、対照の PBS との間では、増殖曲線の差はなかった。濃度を 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした際も 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した際と同様であった。陽性対照とした CPC 添加群は抗菌力を有するため、細菌の増殖はなかった (図 3)。

ミルレクチンのヒト由来の細胞に対する細胞傷害性試験

HGF, THP-1 に対しては、ミルレクチンは 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とともに細胞増殖活性を変化させなかった。HGE に対しては、ミルレクチンは細胞の活性を有意に増加させる傾向があった。KB に対しては、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞増殖活性に変化はなかったが、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では減少させた。一方で陽性対照として用いた Con A を細胞に作用させた場合、HGF については細胞の活性を有意に増加、HGE, THP-1 については細胞の活性を有意に減少させる傾向があった (図 4)。

ミルレクチンの復帰変異原性試験

直接法において、ミルレクチンは最小濃度 (78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$) から最大濃度 (5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$) の範囲において、陰性対照物質と変わらないコロニー数であった (図 5A)。代謝活性法においても直接法と同様の結果が得られた (図 5B)。

ラットに対する影響

単回経口投与試験では、雌雄ともに精製水投与群とミルレクチン投与群において、体重変動の差異はなかった（図 6）。試験期間中、飲水、摂餌が目立った変化、異常行動、活動量の減少といった動態の変化はなかった。剖検時、器官、組織の肉眼的な変化はなかった。

反復経口投与試験では、雌雄ともに精製水投与群とミルレクチン投与群において、体重変動の差異はなかった（図 7）。試験期間中、飲水、摂餌が目立った変化、異常行動、活動量の減少といった動態の変化はなかった。剖検時、器官、組織の肉眼的な変化は観察されなかった。血液生化学試験結果として、全個体において計測値は測定範囲内に収まり、ミルレクチン投与群と対照群との間に差はなかった。

考察

本研究では、安全かつ有効にバイオフィルムの形成を阻害する口腔ケア材料を開発することを目的として、海藻由来レクチンであるミルレクチンに着目し、その安全性と有効性を検討した。その結果、ミルレクチンがバイオフィルムの形成を阻害し、ヒト由来細胞と動物に対して安全であることが明らかになった。

最初のステップとして、ミルレクチンのバイオフィルム形成阻害効果を調べた。唾液をコーティングしたプレートに、ミルレクチンを含む8種類のレクチンを添加して、*S. mutans* ATCC25175 株、MT8148 株および GS-5 株の3菌株に対するバイオフィルム形成阻害効果を測定した結果、ミルレクチンは *S. mutans* における全ての菌株で、バイオフィルムの形成を阻害した。また、ABA はミルレクチンと同様に、*S. mutans* における全ての菌株で、バイオフィルムの形成を阻害した (図 1)。ミルレクチンと ABA は、いずれも Gal β 1-3GalNAc を認識するレクチンである。すなわち、本研究でのバイオフィルム形成阻害効果での結果は、これまでの研究で我々が明らかにした、陸生植物レクチン中の Gal β 1-3GalNAc 認識レクチンが *S. mutans* に対するバイオフィルム形成阻害効果を有した結果²¹⁾と整合性が取れた。よって、ミルレクチンは唾液成分中の Gal β 1-3GalNAc に結合し、*S. mutans* に対して競合的に拮抗していることが推察された。今後、唾液成分中の糖鎖に対して、*S. mutans* およびレクチンが結合するドメイン等、

分子レベルでの詳細な機構を検討していく必要がある。

さらに、ミルレクチンのバイオフィーム形成阻害効果による、細菌の付着量および形態的な変化を SEM にて観察した。ミルレクチンを作用させると、レクチン無添加のものおよび BSA を添加したものと比較して、細菌の付着量は著明に減少した。しかし、細菌の形態的な変化はみられず、もとの連鎖球菌の形態を維持していた(図 2)。

さらに、ミルレクチンと代表的な口腔ケア製品中の薬用成分である CPC を添加した際の、浮遊細菌の増殖率の変化を測定し、それぞれの抗菌性を比較した。ミルレクチンを添加した群での浮遊細菌の増殖率は、陰性対照群と比較して差はなかった。また、CPC を添加した群では浮遊細菌は増殖しなかった(図 3)。すなわち、CPC は細菌に対して殺菌作用を発揮するのに対して、ミルレクチンは殺菌作用を示さなかった。図 2, 3 の結果より、ミルレクチンの作用メカニズムが殺菌ではなく、付着能を阻害することによってバイオフィームの形成を阻害するという仮説が支持された。

以上のことから、ミルレクチンは現在日本で販売されている多くの口腔ケア材料に含まれる代表的な薬効成分である CPC とは異なり、*S. mutans* の初期付着を阻害することによって、バイオフィームの形成を阻害した。すなわち、感染の初期段階を制御することに加え、菌交代減少や耐性菌といった副作用に対する心配が無い材料とみなすことができた。ここまでのミルレクチンの有効性についての考察である。

次のステップとして、ミルレクチンの安全性を調べた。まず、ミルレクチンのヒト由来細胞に対する傷害性を調べた。100 µg/mL の濃度でのミルレクチンでは、すべてのヒト由来細胞において傷害性を示さなかったが、500 µg/mL の濃度では、KB 細胞に対してのみ傷害性を示した (図 4)。すなわち、ミルレクチンは 100 µg/mL の濃度では口腔ケア材料として安全に応用することができると考えた。さらに、遺伝毒性を調べる目的でミルレクチンの復帰変異原性試験を行った。*S. typhimurium* および *E. coli* を用いた復帰変異原性試験の結果、ミルレクチンは復帰変異誘発性を示さなかったことから、遺伝毒性を有さないことが分かった (図 5)。すなわち、本試験の性質からミルレクチンは機能性食品として使用可能な程度の安全性を有することが確認された。

さらに、動物に対する有害性を単回経口投与および反復経口投与試験によって調べた。ミルレクチンをヒトに対する 1 日限界投与量をラット体重換算した濃度で、単回経口投与あるいは反復経口投与したところ、肝機能、腎機能、体重変動全てで対照群との差はなかった。試験期間中の異常行動はなく、肉眼的には組織の形態においても異常所見はみられなかった (図 6, 7)。すなわち、ミルレクチンは高濃度で生体に投与した場合、または持続的に低濃度で投与した場合にも、有害性を示さなかった。

以上のことから、ミルレクチンは細胞に傷害性を示さず、生体においても有害性を示さないことが明らかとなった。ミルレクチンは海藻由来、天然物を用いた材料であ

り、生体に対して安全で、臨床応用に向けて優位な性質を備えていると考えた。ここまでがミルレクチンの安全性についての考察である。

本研究から、海藻由来レクチンは従来の口腔ケア材料とは異なり、*S. mutans* の初期付着を阻害することによって、バイオフィルムの形成を阻害する有効かつ新規的な口腔ケア材料となる可能性があると考えた。また、ヒト由来細胞および生体への有害性を示さない安全な材料であることが示唆された。すなわち、橋渡し研究の一端を担い、材料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ため、今後は早期の実用化を目指していく。一方で、様々な種由来のレクチンを使用した網羅的な解析を行い、細菌の初期付着阻害に関わる特異的な構造と、そのメカニズムを解明していくことが課題となった。さらに、今回使用した *S. mutans* に関わらず、口腔内には数多くの細菌種が存在しているため、他の細菌種に対する初期付着の阻害効果およびバイオフィルム形成阻害効果を検討していく必要があると考えている。

結論

ミルレクチンは, *S. mutans* のバイオフィルム形成阻害作用を有し, 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。

謝辞

稿を終えるにあたり, 終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また, 本研究の遂行に際し, 本研究の立案当初から終始懇切なるご指導を頂きました株式会社医学生物学研究所今村幸治様, 竹内英明様に深く感謝いたします。様々な面にわたり貴重な御助力とご協力をくださいました岡山大学病院新医療研究開発センター伊東孝助教, そして歯周病態学分野および歯周科の諸先生に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座

歯周病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

98th American Academy of Periodontology (2012年9月, LA)

10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (2013年9月, 奈良)

第20回未病システム学会学術総会 (2013年11月, 東京), 優秀演題賞受賞

第141回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2014年10月, 山形)

参考文献

1. Shimazaki, Y., Soh, I., Saito, T., Yamashita, Y., Koga, T. and Takehara, T.: Influence of dentition status on physical disability, mental impairment, and mortality in institutionalized elderly people. *J Dent Res.*, **80**, 340-345, 2001.
2. Kikutani, T., Tamura, F., Tashiro, H., Yoshida, M., Konishi, K., and Hamada, R.: Relationship between oral bacteria count and pneumonia onset in elderly nursing home residents. *Geriatr Gerontol Int.*, **15**, 417-421, 2015.
3. Sumi, Y., Miura, H., Nagaya, M., Michiwaki, Y., and Uematsu, H.: Colonisation on the tongue surface by respiratory pathogens in residents of a nursing home – a pilot study. *Gerodontology*, **23**, 55-59, 2006.
4. Yoneyama, T., Yoshida, M., Ohru, T., Mukaiyama, H., Okamoto, H., Hoshida, K., Ihara, S., Yanagisawa, S., Ariumi, S., Morita, T., Mizuno, Y., Ohsawa, T., Akagawa, Y., Hashimoto, K., and Sasaki H.: Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J Am Geriatr Soc.*, **50**, 430-433, 2002.
5. Hamada, S., and Slade H. D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.*, **44**, 331-384, 1980.
6. Loesche W. J.: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.*, **50**,

- 353-380, 1986.
7. Loo, C. Y., Corliss, D. A., and Ganeshkumar, N.: *Streptococcus gordonii* biofilm formation : Identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J Bacteriol.*, **182**, 1374-1382, 2000.
 8. Mayrand, D., and Holt S. C.: Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev.*, **52**, 134-152, 1988.
 9. Slots, J., Bragd, L., Wikstrom M., and Dahlen, M.: The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol.*, **13**, 570-577, 1986.
 10. Slots J., and Listgarten M. A.: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol.*, **15**, 85-93, 1988.
 11. Lang, N. P., and Brex, M. C.: Chlorhexidine digluconate-an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res.*, **21**, 74-89, 1986.
 12. 刑部 敦, 大久保 憲: わが国におけるクロルヘキシジングルコン酸塩によるアナフィラキシー発生についての文献的考察. 環境感染誌, **30**, 127-134, 2015.
 13. Fung-Tomc, J. C.: Correlation of *in vitro* and *in vivo* resistance development to

- antimicrobial agents. *Antimicrob Newslett.*, **7**, 17-24, 1990.
14. Pallasch, T. J., and Slots, J.: Antibiotic prophylaxis and the medically compromised patient. *Periodontol 2000.*, **10**, 107-138, 1996.
15. Monroe, D.: Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.*, **5**, 2458-2461, 2007.
16. Yao, Y., Grogan, J., Zehnder, M., Lendenmann, U., Nam, B., Wu, Z., Costello, C. E., and Oppenheim, F. G.: Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol.*, **46**, 293-303, 2001.
17. Yin, A., Margolis, H. C., Yao, Y., Grogan, J., and Oppenheim, F. G.: Multi-component adsorption model for pellicle formation: The influence of salivary proteins and non-salivary phospho proteins on the binding of histatin 5 onto hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.*, **51**, 102-110, 2006.
18. Hytonen, J., Haataja, S., Isomaki, P., and Finne, J.: Identification of a novel glycoprotein-binding activity in *Streptococcus pyogenes* regulated by the *mga* gene. *Microbiology*, **146**, 31-39, 2000.
19. Ofek, I., Hasty, D. L., and Sharon, N.: Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, **38**, 181-191, 2003.

20. Teixeira, E. H., Napimoga, M. H., Carneiro, V. A., Oliveira, T. M., Cunha, R. M. S., Havt, A., Martins, J. L., Pinto, V. P. T., Goncalves, R. B., and Cavada B. S.: *In vitro* inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. *J Appl Microbiol.*, **101**, 111-116, 2006.
21. 伊東 孝: *Streptococcus mutans* の初期付着に与えるレクチンの影響に関する研究. 岡山歯学会雑誌, **31**, 1-12, 2012.
22. Rogers, D. J., and Hori, K.: Marine algal lectins: new developments. *Hydrobiologia*, **260/261**, 589-593, 1993.
23. Ainouz, I. L., Sampaio, A. H., Freitas, A. L. P., Benevides, N. M. B., and Mapurunga, S.: Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. *R Bras Fisiol Veg.*, **7**, 15-19, 1995.
24. Sampaio, A. H., Rogers, D. J., Barwell, C. J., Saker-Sampaio, S., Costa, F. H. F., and Ramos, M. V.: A new isolation procedure and further characterisation of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. *J Appl Phycol.*, **10**, 1573-1576, 1998.
25. Nagano, C. S., Debray, H., Nascimento, K. S., Pinto, V. P., Cavada, B. S., Saker-Sampaio, S., Farias, W. R., Sampaio, A. H., and Calvete J. J.: HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family.

Protein Sci., **14**, 2167-2176, 2005.

26. Teixeira, E. H., Napimoga, M. H., Carneiro, V. A., de, Oliveira, T. M., Nascimento, K. S., Nagano, C. S., Souza, J. B., Havt, A., Pinto, V. P., Gonçalves, R. B., Farias, W. R., Saker-Sampaio, S., Sampaio, A. H., and Cavada, B. S.: *In vitro* inhibition of oral *streptococci* binding to the acquired pellicle by algal lectins. *J Appl Microbiol.*, **103**, 1001-1006, 2007.
27. Bonavida, B.: Concanavalin A-mediated activation of antigen-primed lymphocytes into secondary cytotoxic lymphocytes. *J Exp Med.*, **145**, 293-301, 1977.
28. 厚生労働省，経済産業省，環境省：新規化学物質等に関わる試験の方法について。2012.
29. OECD：OECD 化学物質試験法ガイドライン 471/細菌を用いる復帰変異試験。1997.
30. 厚生省：医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて。1988.

表 1. 使用したレクチン

レクチン名	単糖結合性
<i>Codium fragile</i> Hariot (ミルレクチン)	Gal/GalNAc
<i>Agaricus bisporus</i> agglutinin (ABA)	Gal/GalNAc
Concanavalin A (Con A)	Man
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin (DBA)	Gal/GalNAc
<i>Maackia amurensis</i> Lectin (MAM)	シアル酸
<i>Psathyrella velutina</i> Lectin (PVL)	GlcNAc
<i>Sambucus sieboldiana</i> agglutinin (SSA)	シアル酸
Wheat germ agglutinin (WGA)	GlcNAc or シアル酸

Man : Mannose

GlcNAc : N アセチルグルクトサミン

表 2. 復帰変異原性試験に用いた細菌の陽性対照物質

試験菌株	陽性対照物質	
	直接法	代謝活性法
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2(0.01)	2-AA(1)
<i>S. typhimurium</i> TA1535	NaN ₃ (0.5)	2-AA(2)
<i>E. coli</i> WP2uvrA	AF-2(0.01)	2-AA(10)
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2(0.1)	2-AA(0.5)
<i>S. typhimurium</i> TA1537	9-AA(80)	2-AA(2)

AF-2 : 2- (2-フリル) -3- (5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド

NaN₃ : アジ化ナトリウム

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

2-AA : 2-アミノアントラセン

表 3. 血液生化学試験項目

検査項目	対象臓器
glutamic pyruvic transaminase (GPT)	肝機能
glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)	肝機能
alkaline phosphatase (ALP)	肝機能
total bilirubin (T-BIL)	肝機能
creatinine (CRE)	腎機能
uric acid (UA)	腎機能
blood urea nitrogen (BUN)	腎機能

図の説明

図 1. ミルレクチンの *S. mutans* に対するバイオフィーム形成阻害試験

Streptococcus mutans ATCC25175 株, MT8148 株, GS-5 株により形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレット染色後, 波長 570 nm の吸光度を計測した。縦軸は吸光度を示し, 横軸は添加したレクチンの種類を示す。3 人から採取した唾液を用いて試験を行い, 独立した 3 回の実験系とした。グラフは 3 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。図中の横線は, 陽性対照である BSA 添加群の吸光度を示す。バイオフィーム形成度の違いは, BSA 添加群を基準にして, 対応のない 2 群間の Student's *t*-test を用いて検定した。** : $p < 0.01$

図 2. 走査電子顕微鏡による観察

実験 1 で用いたプレートを試料として, ATCC25175 株のプレート底面におけるバイオフィーム形成様相を走査型電子顕微鏡にて観察した。図は独立した 3 回の実験のうち, 代表的な像を示す。唾液で表面を処理した後に, レクチン非作用時, BSA 作用時, ミルレクチン作用時のウェル内のバイオフィームを観察した。各ウェルにつき, 1,000 倍拡大像, 10,000 倍拡大像, 30,000 倍拡大像を示す。

スケールバー : 1,000 倍拡大像 : 30 μm , 10,000 倍拡大像 : 3 μm , 30,000 倍拡大像 :

1 μm

図 3. ミルレクチンの *S. mutans* ATCC25175 株に対する増殖抑制効果の検討

ミルレクチンを細菌培養液に添加し、0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 時間後に波長 660 nm の吸光度を測定した。対照は、PBS と CPC とした。縦軸は細菌培養液の濁度を示し、横軸は測定した時間を示す。グラフは独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

◆, ミルレクチン 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ●, ミルレクチン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; □, PBS; △, CPC 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

図 4. ミルレクチンのヒト由来の細胞に対する細胞傷害性試験

ミルレクチンが HGF, HGE, THP-1, KB に与える影響を、生細胞中のミトコンドリアに存在するホルマザンを溶出させ、比色定量した。接着細胞に対しては MTT assay を行い、浮遊細胞に対しては MTS assay を行った。ホルマザン溶出後 4 時間で、吸光度計を用いて波長 490 nm の吸光度を測定した。対照は、PBS と CPC とした。縦軸は計測した吸光度を示し、添加している薬剤およびその濃度を横軸に示す。グラフは独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。細胞傷害性の違い

は、PBS 添加群を基準にして、対応のない 2 群間の Student's *t*-test を用いて検定した。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

図 5. ミルレクチンの復帰変異原性試験

A. 直接法, B. 代謝活性法

ミルレクチンが *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537, *E. coli* WR2uvrA, に対して引き起こす復帰変異誘発性を, 試験用培地に細菌を添加して 45 時間後のコロニー数を計測することによって検討した。陽性対照は表 2 に示し, 陰性対照は日本薬局方注射用水の原液とした。縦軸は計測されたコロニー数の陰性対照に対する比率を示し, 横軸には添加しているミルレクチンおよびその濃度を示す。図中の横線は陰性対照の 2 倍値, すなわち復帰変異誘発性を有すると判断する値を示す。グラフは独立した 2 回の実験の平均値を示す。

図 6. ミルレクチンのラットに対する単回経口投与試験

縦軸はラットの体重を示し, 横軸には試験開始からの日数 (投与日を 0 日とする) を示す。対照は精製水投与群とした。グラフはラット 5 匹の平均値を示した。

■, ミルレクチン 200 mg/mL 投与群 (雄); □, 精製水投与群 (雄); ●

， ミルレクチン 200 mg/mL 投与群（雌）；○， 精製水投与群（雌）

図 7. ミルレクチンのラットに対する反復経口投与試験

縦軸はラットの体重を示し，横軸には試験開始からの日数（投与開始日を 1 日とする）を示す。対照は精製水投与群とした。グラフはラット 3 匹の平均値を示す。

■， ミルレクチン 400 μ g/mL 投与群（雄）；■， ミルレクチン 1,000 μ g/mL 投与群（雄） □， 精製水投与群（雄）；●， ミルレクチン 400 μ g/mL 投与群（雌）；●， ミルレクチン 1,000 μ g/mL 投与群（雌） ○， 精製水投与群（雌）

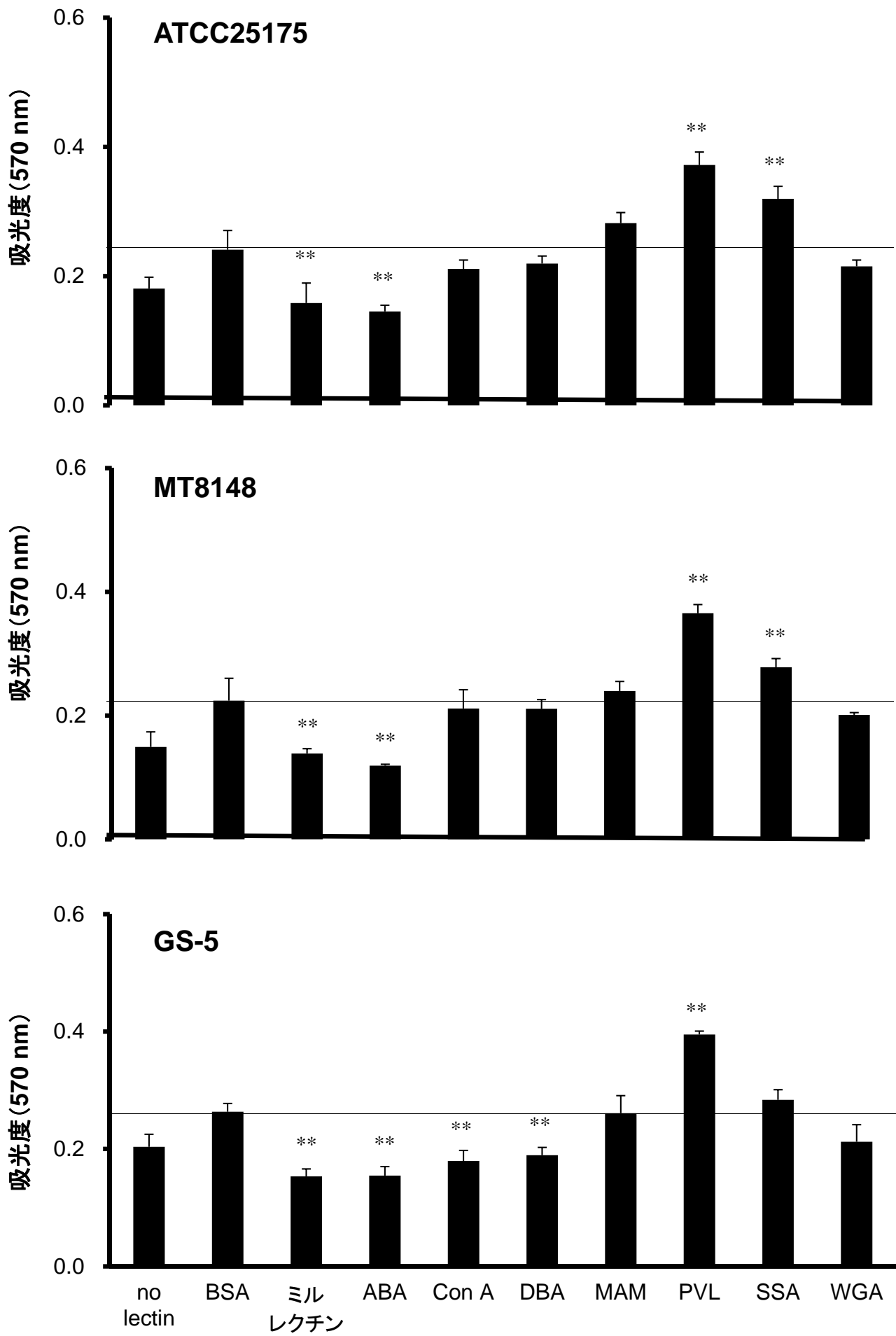


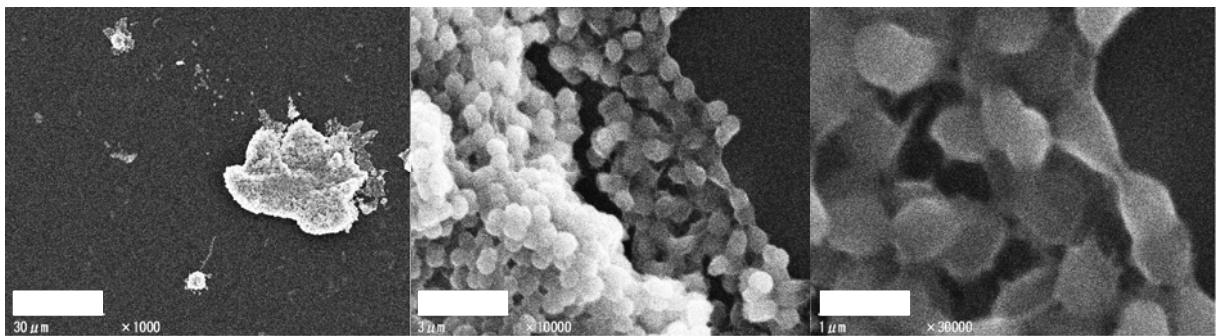
Fig.1

× 1,000

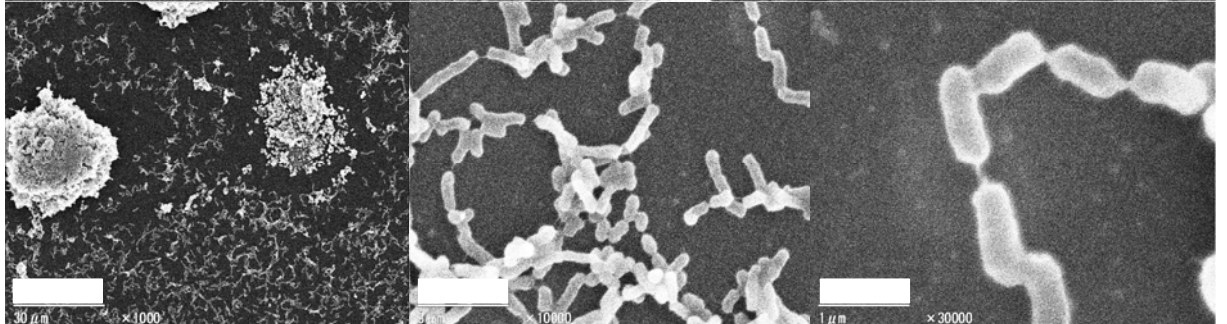
× 10,000

× 30,000

唾液のみ



唾液+BSA



唾液+
ミルレクチン

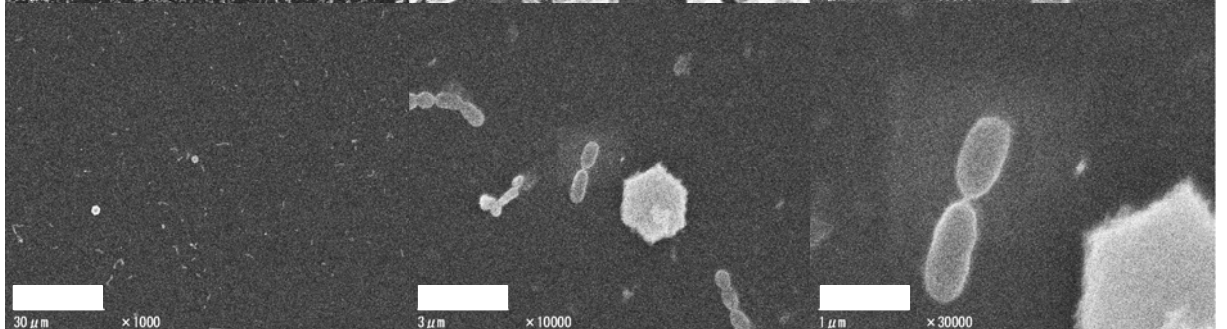


Fig.2

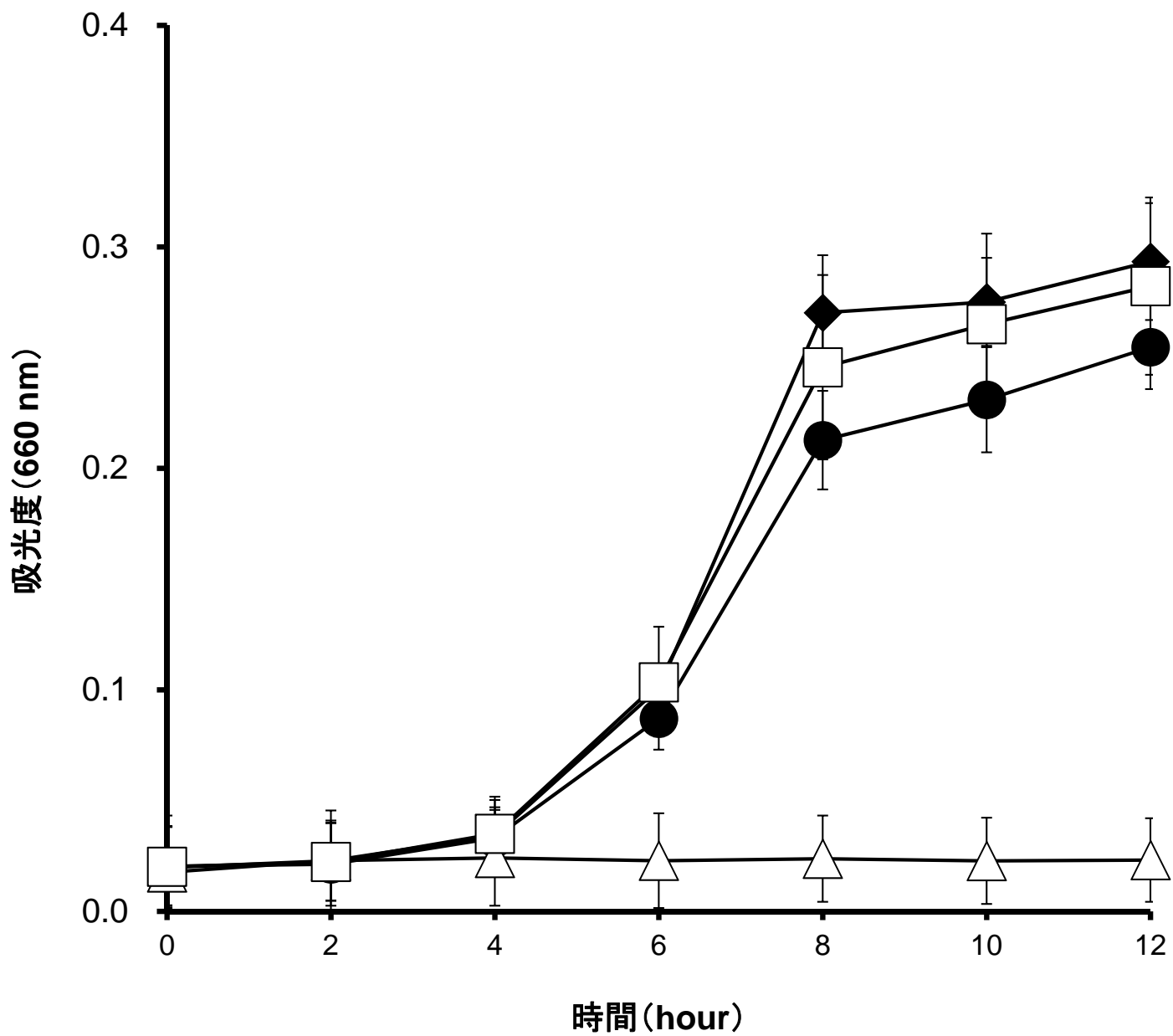


Fig.3

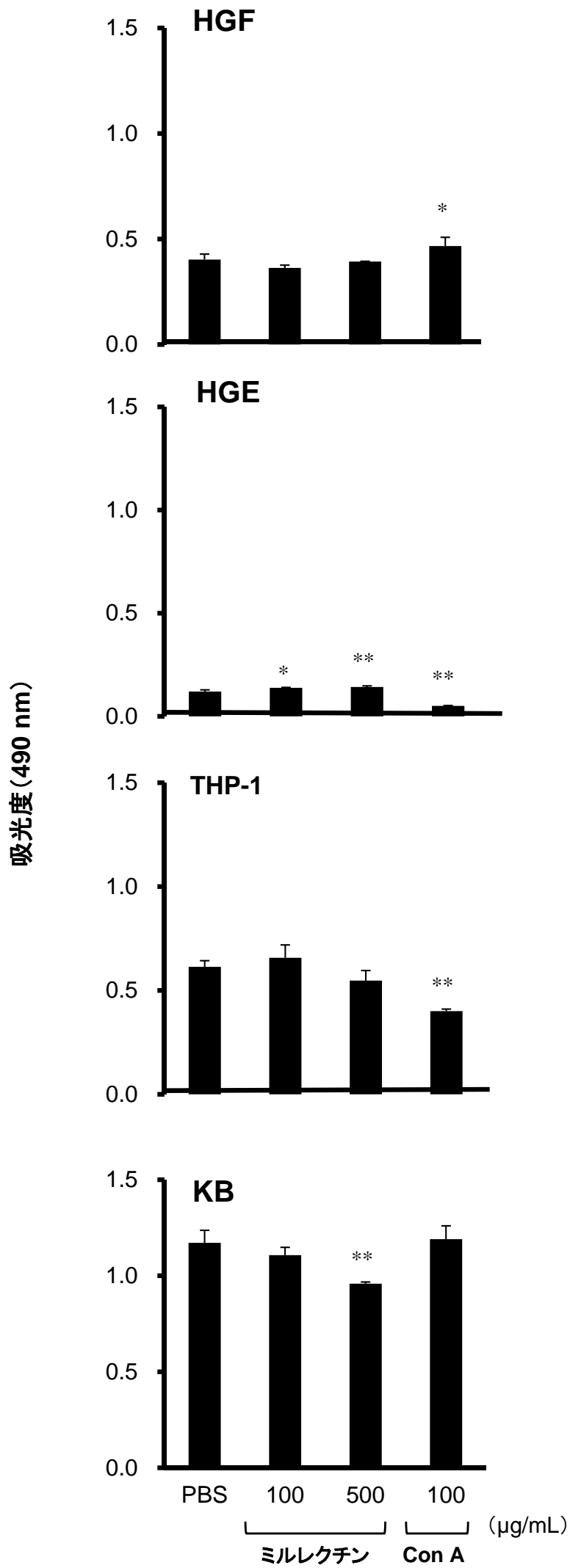
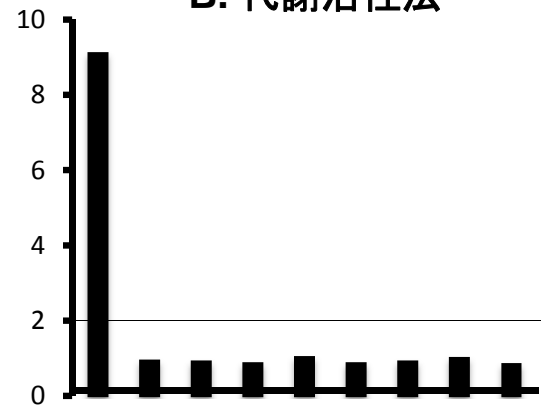
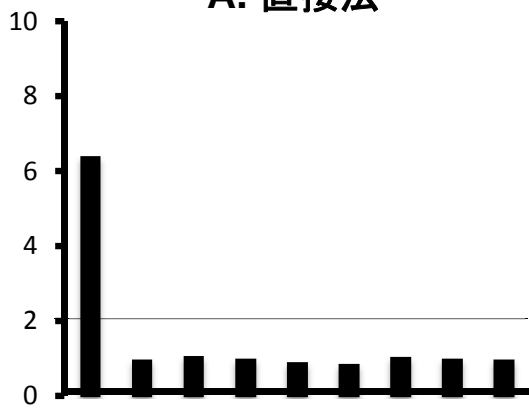


Fig.4

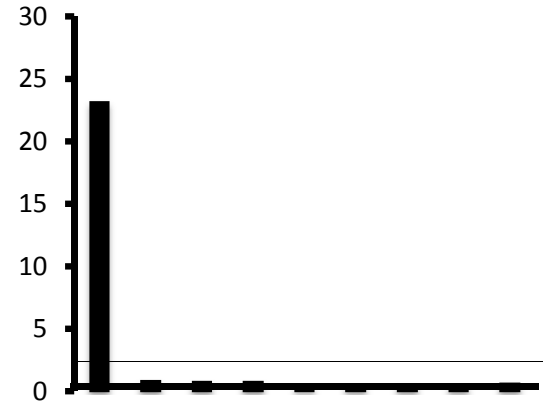
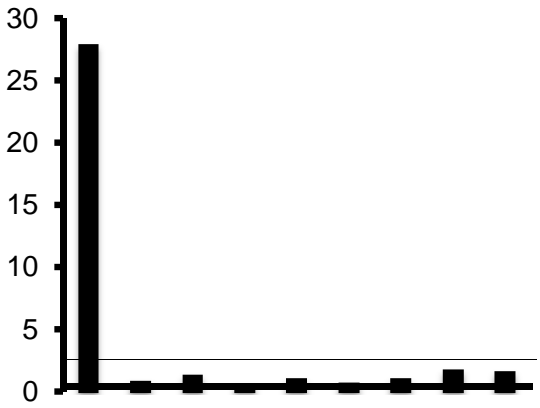
A. 直接法

B. 代謝活性法

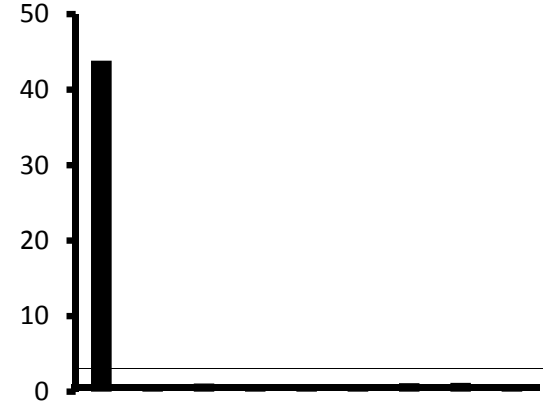
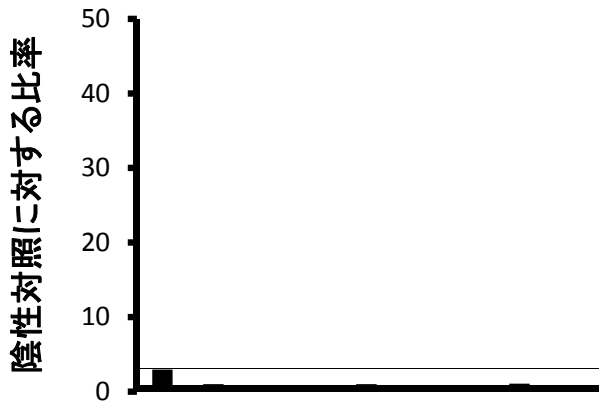
TA100



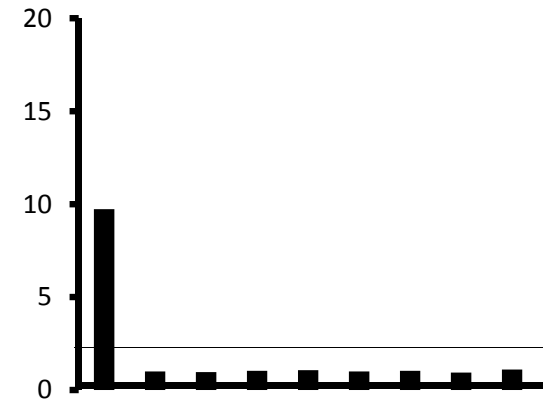
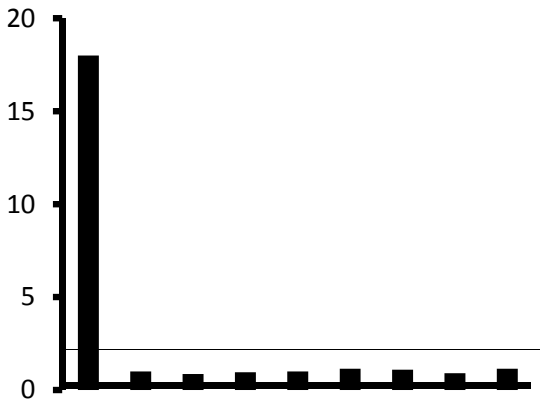
TA1535



WP2uvrA



TA98



TA1537

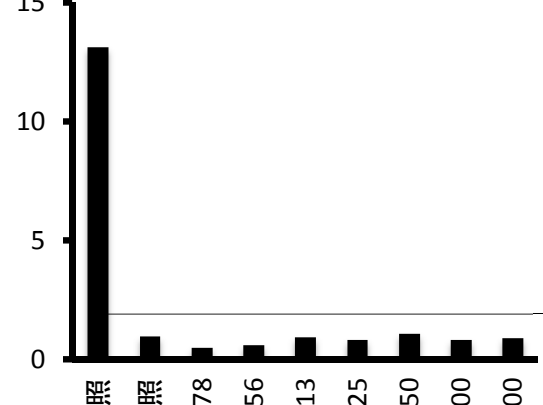
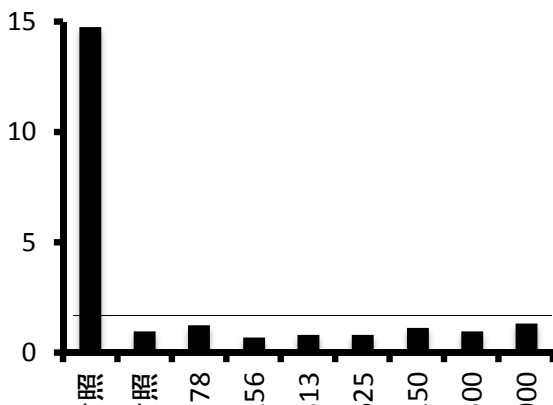


Fig.5

陽性対照 陰性対照 78 156 313 625 1,250 2,500 5,000
ミルレクチン(µg/plate)

陽性対照 陰性対照 78 156 313 625 1,250 2,500 5,000
ミルレクチン(µg/plate)

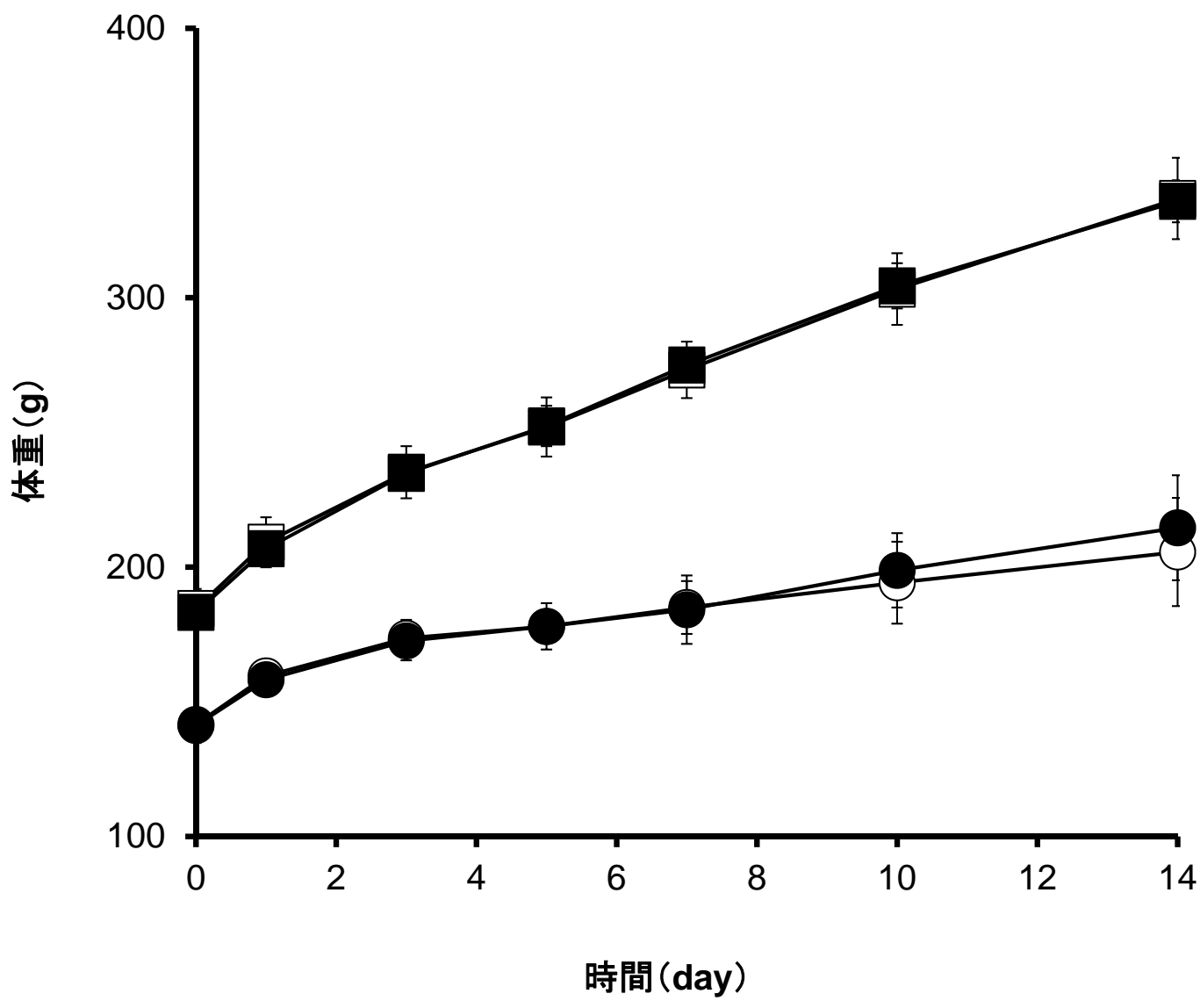


Fig.6

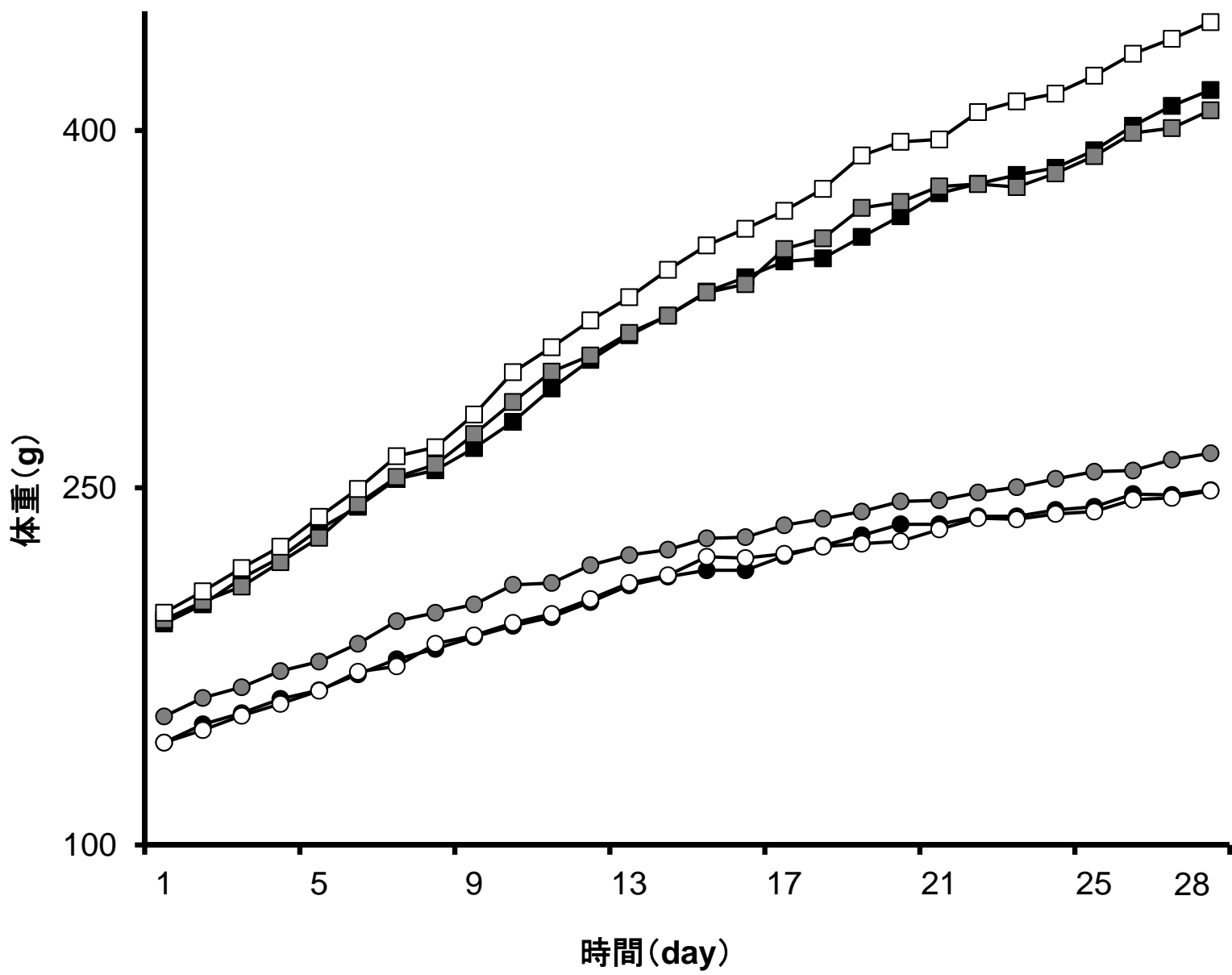


Fig.7