

氏名	信田 有希
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5219号
学位授与の日付	平成27年9月30日
学位授与の要件	医歯薬学総合学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	口腔バイオフィーム抑制に資する天然物質：松樹脂由来アビエチン酸の効果
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

ヒトは細菌などの微生物と共生しており、口腔内には700種を超える細菌が存在している。口腔内細菌はバイオフィームを形成して歯面に定着し、齲蝕や歯周病などの口腔内感染症を惹起する。また、口腔内細菌が大きく関与する誤嚥性肺炎は、現在の医療における大きな問題であり、その他にも細菌性心内膜炎と口腔内細菌との関連など、口腔内細菌は口腔内の感染症にとどまらず、全身の種々の疾患にも関与している。すなわち、口腔内感染症の制御は、全身の健康に寄与すると言える。しかし、口腔バイオフィームの除去は機械的除去に頼っているのが現状であり、特に自立的に口腔内清掃を行うことが困難な患者では、誤嚥性肺炎のリスクが増大する。また、機械的な口腔バイオフィーム除去の効果を維持するために、口腔内細菌に対する抗菌剤の応用が進められているが、強力な抗菌剤の長期間にわたる使用は、細菌の耐性獲得や人体への毒性の課題がある。特に、抗菌剤の長期連用は口腔細菌叢のバランスを崩壊させて菌交代現象を引き起こし、口腔カンジダ症やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症などを惹起する。一方で、医薬部外品や口腔化粧品に分類される洗口液等は未だ決定的な補助療法とはなっていない。

以上の背景から、口腔バイオフィーム感染症の抑制を目指す制御システムの構築は、社会的に喫緊の課題であり、それには正常細菌叢の維持が重要である。そのためには、細菌叢を維持しながら細菌量を減少させ、バイオフィームの形成を阻害する抗菌剤が求められる。このような観点から情報を検索すると、幅広い天然物が感染症およびバイオフィーム形成菌に影響を及ぼしていることがわかった。その中でも、マツ科に含まれるジテルペノイド化合物に関しては、常在細菌叢を乱したり薬剤耐性菌を誘導することなく有効にバイオフィーム形成に対して強い抑制効果を有し、バイオフィーム形成阻害剤となりうる技術（特願2011-509196、特開WO2010-11963）も見いだせた。

このテルペンは、植物、昆虫、菌類などから精製される炭化水素で、抗菌作用、抗炎症作用などの薬理作用を示すものが数多く報告されており、正常細菌叢のバランスを大きく崩壊させることなく、細菌量のみを抑制できる可能性がある。テルペンの中でもアビエチン酸は松樹脂由来のジテルペンの一種であり、工業分野、医療分野に応用されており、歯科分野では封鎖性向上を目的にアビエチン酸が含有されている製品が存在する。これまでに抗炎症作用、抗癌作用、抗ウイルス作用などが報告されており、上述のように、バイオフィーム形成阻害剤としても注目されている。

本研究では、このアビエチン酸に着目し、口腔バイオフィームの形成時に高頻度に検出される *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) を代表として、口腔微生物に対する抗菌作用、およびバイオフィームに対する抗菌作用を調べ、アビエチン酸が口腔バイオフィームの制御に有用であるかを検討することを目的とした。

材料と方法

1. 材料

細菌は口腔内主要細菌である*S. mutans* ATCC25175株を使用し、1% yeast添加のTryptic Soy Brothを用いて培養した。アビエチン酸は、dimetil sulfoxide (DMSO) を溶媒として溶解させた。

2. 浮遊細菌とバイオフィームに対する抗菌効果の検討

*S. mutans*の浮遊細菌およびバイオフィームを1時間アビエチン酸で処理した後、菌液を寒天培地に播種して培養し、コロニー数を計測した。

3. 細菌の菌体および生物活性に与える影響の検討

アビエチン酸処理後、*S. mutans*の浮遊細菌の濁度、異なる細胞壁透過性を持つ核酸染色試薬を用いた細胞壁への障害性、アデノシン三リン酸 (ATP) 活性の経時的变化を調べた。また、アビエチン酸処理1時間後の核酸染色時の菌体を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

4. 細菌形態に与える影響の検討

アビエチン酸溶液に1時間処理後の*S. mutans*の菌体形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

5. 生体由来細胞への細胞障害性の検討

ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF), ヒト上皮細胞株 HeLa, ヒト単球系細胞株 THP-1をアビエチン酸で24時間および48時間処理後、テラゾリウム塩を用いた比色法で細胞障害性を検討した。

結果

1. 浮遊細菌とバイオフィームに対する抗菌効果

浮遊細菌に対する50%発育阻止濃度は16 µg/ml以上、バイオフィームに対しては64 µg/ml以上であった。

2. 細菌の菌体および生物活性に与える影響

16 µg/ml以上のアビエチン酸処理時では、細菌の増殖は抑制されており、赤色蛍光強度は大きかった。一方で、16 µg/ml以上でもATPの活性は維持もしくは増大していた。また、蛍光顕微鏡を用いた菌体の観察では、64 µg/ml以上のアビエチン酸は処理後1時間でも赤色蛍光強度が大きかった。

3. 細菌形態に与える影響

アビエチン酸溶液処理後の細菌は溶菌していないが、菌体表面は粗造であった。

4. 生体由来細胞への細胞障害性

アビエチン酸は、HGF, HeLaに対しては256 µg/ml以上で、THP-1に対しては64 µg/ml以上で細胞障害性を有した。

考察

アビエチン酸が口腔主要細菌である*S. mutans*に対して、浮遊菌の増殖抑制作用およびバイオフィーム形成抑制作用を持つことが示唆された。SEMによる観察像、核酸染色およびATP活性の測定の結果から、アビエチン酸処理後、細菌の細胞壁の構造は維持されているものの、細胞壁自体は高度に損傷を受けていたと考えられた。また、高濃度のアビエチン酸処理時でもATPの活性は維持されていたことから、アビエチン酸は細菌を死滅させるのではなく、静菌的に細菌の増殖を抑制する可能性が示唆された。今後は、より多菌種に対する抗菌作用を検討し、アビエチン酸の抗菌スペクトルを把握すること、また小動物に投与することで、口腔内細菌叢の変化を検討することが必要である。

結論

アビエチン酸は、口腔内細菌に対する抗菌作用およびバイオフィーム形成抑制作用を有し、口腔内細菌による感染の制御に有用である。

論文審査結果の要旨

口腔内細菌は、バイオフィルムを形成して歯面に定着し、齲蝕や歯周病などの口腔内感染症を惹起するだけでなく、誤嚥性肺炎や細菌性心内膜炎など、全身の種々の疾患にも関与する。そのため、口腔内感染症の制御は、全身の健康に寄与する。しかし、口腔バイオフィルムの除去は機械的除去に頼っているのが現状である。口腔内細菌に対する抗菌剤の応用も進められているが、強力な抗菌剤の長期間にわたる使用は、細菌の薬剤耐性化や人体への毒性の懸念があるほか、口腔細菌叢のバランスを崩壊させて菌交代現象を引き起こし、日和見感染症などを惹起する可能性がある。さらに、医薬部外品や口腔化粧品に分類される洗口液等が使用されているものの、未だ決定的な補助療法とはなっていない。以上の背景から、口腔内の正常細菌叢を維持した状態で口腔バイオフィルム感染症を抑制する制御システムの構築は、社会的に喫緊の課題である。

アビエチン酸は松樹脂由来のジテルペン的一种であり、工業分野や医療分野に応用されている。これまでに抗炎症作用、抗癌作用、そして抗ウイルス作用などの薬理作用が報告されており、バイオフィルム形成阻害剤としても注目されている。

本研究では、アビエチン酸の *Streptococcus mutans* 浮遊細菌およびバイオフィルム形成菌に対する効果と宿主細胞への影響を調べ、アビエチン酸が口腔バイオフィルムの制御に有用であるかを検討した。研究結果は、以下の内容であった。

- 1) 浮遊細菌とバイオフィルム形成菌に対する抗菌効果
浮遊細菌に対する50%発育阻止濃度は16 µg/mL、バイオフィルム形成菌に対しては64 µg/mLであった。
- 2) 細菌の菌体および生物活性に与える影響
16 µg/mL以上のアビエチン酸処理では、アビエチン酸非存在下と比較して、細菌の増殖は抑制されており、菌体損傷の指標に用いた赤色蛍光染色色素の発光強度の比率は高かった。一方で、16 µg/mL以上のアビエチン酸処理群におけるATPの活性は、アビエチン酸非処理群と同等もしくは上昇していた。また、蛍光顕微鏡を用いた菌体の観察では、64 µg/mL以上のアビエチン酸で処理した場合には処理1時間後においても赤色蛍光の発光強度の比率が高かった。
- 3) 細菌の形態に与える影響
アビエチン酸溶液処理後の細菌に溶菌は認められなかったが、菌体表面はアビエチン酸非存在下に比べて粗造であった。
- 4) 宿主細胞への細胞傷害性
アビエチン酸は、ヒト由来歯肉線維芽細胞とHeLa細胞に対しては256 µg/mL以上で、THP-1細胞に対しては64 µg/mL以上で、細胞傷害性を示した。

以上のことから、アビエチン酸は *S. mutans* の浮遊細菌とバイオフィルム形成菌に対して増殖抑制作用を有し、口腔内細菌の制御に有用であることが示唆された。本研究で得られた結果は、口腔バイオフィルム感染症に対する新たな制御システムを構築するための一助となり、全身の健康維持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。