

口腔バイオフィル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

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

信田有希

Natural Products useful for Prevention of Oral Biofilm Infection:

Effects of Abietic Acid

Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Yuki SHINODA

(平成 27 年 6 月 15 日受付)

緒言

ヒトは、細菌などの微生物と共生しており、体表や体内には多数の常在菌がバランスを保って存在する。口腔内には700種を超える細菌が存在し、歯面ではデンタルプラークと呼ばれるバイオフィルムを形成して生存している^{1),2)}。このプラークの中には、歯科の2大疾患と呼ばれる齲蝕と歯周病を引き起こす病原性細菌が多く、低病原性あるいは非病原性の菌と共凝集して定着している³⁾。まさに国民病とも捉えられるこれらの疾患は、口腔バイオフィルム感染症として捉えることが可能である。

一方、近年の我が国では肺炎による死亡率が死亡原因の第3位となり、その中でも口腔細菌が大きく関与する誤嚥性肺炎が現在の医療における大きな問題となっている^{4),5)}。誤嚥性肺炎以外にも、口腔内細菌と細菌性心内膜炎との関連⁶⁾、*Porphyromonas gingivalis* と腸内細菌叢の変化との関連⁷⁾、*Fusobacterium* 属細菌と大腸癌との関連⁸⁾も示唆されている。これらの報告のように、齲蝕と歯周病の病原細菌を含む口腔内細菌は、口腔内の感染症を惹起するだけでなく、全身の種々の疾患にも関与している^{9),10)}。そのため、全身の健康維持のためにも口腔内感染症を制御することが求められる。しかし、口腔バイオフィルムの除去は基本的に歯磨きを主とする機械的な除去に頼って

いるのが現状である。その効果は、解剖学のおよび歯科治療によって変化した口腔形態の複雑性や人の歯磨き技術に影響する身体の運動性と認知度などに、大きく影響を受ける。たとえば、自立的に口腔内の衛生管理を行うことが困難な脳梗塞後遺症のある患者では、手指と口腔の運動性が低下したために、これまでの歯科治療で複雑化した口腔形態に合わせた歯磨きが困難である。さらに嚥下も困難となっていることが重なり、誤嚥性肺炎のリスクが増加する¹¹⁾。このような状況に対応するために歯科衛生士や看護師などの医療従事者による口腔衛生管理あるいは介護士や家族などの口腔ケアの実施が推奨されている。しかし、効果的な口腔衛生管理と口腔ケアを実施するためには経費的な問題と高頻度の介入が必要となることから、人的資源の高密度な投資は困難である。さらに今後の高齢化率が上昇する社会情勢に加えて、生産年齢人口が減少する人口動態から、現在の人的資源の投資状態を維持することさえ困難が予想される事態となっている。

そのため、機械的な口腔バイオフィル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勧められているが、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等の課題がある^{12), 13)}。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¹⁴⁾やメチ

シリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）感染症¹⁵⁾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、ハーブ精油やカテキンなどの天然物を、あるいはチモール、クロールヘキシジン、そして塩化セチルピリジウムなどの殺菌剤を低濃度で用いている^{16), 17)}。しかし、期待されるほどの効果が得られなかったり、味覚や刺激性の問題があったりするので、決定的な補助療法とはなっていない。

以上のような背景から、口腔バイオフィルム感染症の抑制を目指す制御システムの構築が社会的に喫緊の課題であり、正常細菌叢を維持しながらバイオフィルムの形成を制御することが重要であると考えられる。すなわち、根こそぎ細菌を死滅させるのではなくバイオフィルムの形成を阻害するような穏やかな抗菌剤が求められる。このような観点から情報の検索を行うと、幅広い天然物が緑膿菌や MRSA のような院内感染の原因菌、さらには *Streptococcus mutans* のような口腔バイオフィルム形成菌に及ぼす影響を調べたものがある^{18), 19), 20)}。カテキン（バイオフィルム形成阻害剤及び治療用器具:特許 5028605）、ピリミジノン化合物（クオラムセンシング阻害剤:特許 5649304、アミド化合物及びその塩、それを用いたバイオフィルム形成阻害剤、バイオフィルム剥離剤および殺菌剤:特許 5247459）、マトリックスポリマー領域へ各種の抗菌剤を固定する方法（特許 4846980）などが日本国内での特許として報告されている。また、

マツ科の植物に含まれるジテルペノイド化合物は有効なバイオフィルム形成阻害剤となりうること(バイオフィルム形成阻害剤: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、そして菌類などから精製される炭化水素で、イソプレンを構成単位としており、イソプレンの数により、モノテルペン、ジテルペン、セスキテルペンなどと呼ばれる^{21), 22)}。テルペンには抗菌作用²³⁻²⁵⁾、抗炎症作用²⁶⁻²⁸⁾、抗ウイルス作用^{29), 30)}、抗癌作用^{31), 32)}などの薬理作用を有するものが報告されている。

松樹脂由来のジテルペンの一種であるアビエチン酸(図1)は、比較的容易に入手可能なため、接着剤、インク材料、ニスなどの工業分野に応用されている。医療分野では絆創膏の基材(粘着付与剤、医療用または工業用の粘着付与剤、医療用または工業用の粘・接着剤、医療用または工業用の粘・接着シート、および医療用または工業用の粘着テープ:特願 2013-555335, 特開 WO2013-111883)として、歯科分野では封鎖性向上を目的に仮封材として応用されている製品(プラストシールクイック:日本歯科薬品, 下関, 山口, 日本)(歯科用レジン表面分離材:特許 4791638)として応用されている。アビエチン酸の薬理効果として、これまでに抗炎症作用^{33), 34)}、抗癌作用^{35), 36)}、抗ウイルス作用³⁷⁾などが報告されている。しかし、バイオフィルム形成阻害作用に関する報告は少ない状態である。

そこで本研究では、口腔バイオフィルムの形成時に高頻度に検出されるグラム陽性通性嫌気性球菌である *S. mutans* の浮遊細菌とバイオフィルム形成菌に対するアビエチン酸の抗菌作用を調べ、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することを目的とした。

材料と方法

1. 材料

1) 薬剤

アビエチン酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は, Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) に溶解させ, 25.6 mg/mL をストック溶液とした。使用時には, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 $\mu\text{g/mL}$ となるように, ストック溶液を各培養液あるいは Phosphate-buffered saline (PBS : Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で希釈した。

陰性対照として使用した際の DMSO は, 各実験系で使用した最高濃度のアビエチン酸溶液中の濃度 (2.5, 5, 10, あるいは 20 $\mu\text{L/mL}$) になるように, 各培養液あるいは PBS で希釈した。

陽性対照として使用したポピドンヨードは, 10^{w/v} % ポピドンヨード液 (ネグミン®液 10 % : マイラン製薬, 東京, 日本) を, 含嗽時の濃度 (0.2 %) を基準に, 各培養液および PBS で 0.01, 0.1, 1 % となるように希釈した。

また, 同じく陽性対照として用いた塩化セシルピリジニウム (CPC, Merck KGaA,

Darmstadt, Germany) は、蒸留水を膜孔径 0.2 μm のニューステラディスク (クラボウ, 東京, 日本) にて濾過滅菌したものに溶解させ, 0.5 % をストック溶液とし, 含嗽剤としての最高濃度を基準に, 培養液にて 0.05 % に希釈し使用した。

2) 細菌

細菌は *S. mutans* ATCC25175 株を使用し, 37 °C で 1 % Yeast extract 添加 Tryptic soy broth (TSBY : Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) を用いて培養した。各実験の際には, 対数増殖期まで培養した後に, 吸光度計 (miniphoto 518R : タイテック, 埼玉, 日本) を用いて波長 660 nm における濁度を測定して, 1×10^7 cfu/mL あるいは 1×10^9 cfu/mL となるように TSBY で希釈した。

3) ヒト由来細胞

本研究には, ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞, ヒト上皮系細胞株 HeLa 細胞, さらに初代培養を行ったヒト由来歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblast; HGF) を用いた。

HeLa 細胞の培養は, 10 % ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS, Life Technologies) と 100 unit/mL ペニシリン- 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン (Life Technologies) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle medium : DMEM, Life Technologies) を用いて, 37 °C, 5 % 炭酸ガス存在下で行った。

THP-1 細胞の培養は、56 °C で 30 分間非働化した 10 % FBS, 2 mM L-グルタミン酸, 100 unit/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシン, 1 mM ピルビン酸ナトリウム (以上, すべて Life Technologies), および 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich) を含む RPMI 1640 培地 (Life Technologies) を用いて, 37 °C, 5 % 炭酸ガス存在下で行った。

HGF は, Naruishi らの方法に従い³⁸⁾, 臨床的に健康なヒトの便宜抜歯時の非炎症性歯肉から分離・培養して使用した。培養は, 10 % FBS と 100 unit/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM を用いて, 37 °C, 5 % 炭酸ガス存在下で行った。細胞数の計測は, 血球計測板 (C-Chip : NanoEn Tek, Seoul, Korea) を用いて測定した。なお, HGF の採取および使用に関しては, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認を受け (承認番号 661 号), 規定に基づいてドナーに使用目的を十分に説明して了承を得て行った。

2. 浮遊細菌およびバイオフィルム形成菌への抗菌作用の検討

液体培地中の浮遊細菌に対するアビエチン酸の効果は以下の方法を用いて検討した。すなわち, アビエチン酸を溶解させた TSBY 培地に最終的に 1×10^5 cfu/mL となるように *S. mutans* を調整した。37 °C で 1 時間静置培養した後, 菌液を PBS で段階希

積し、Mitis-Salivarius 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company : 直径 10 cm のプレート) に 50 μ L ずつ播種し、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養したのち、形成されたコロニー数を計測した。

バイオフィーム形成菌に対するアビエチン酸の効果は以下の方法を用いて検討した。すなわち、オートクレーブ滅菌後に乾燥させた表面未処理のガラス試験管内に、1% スクロース添加 TSBY 培地で 1×10^5 cfu/mL に調整した *S. mutans* を播種し、試験管を約 30 度傾斜させて 18 時間静置培養し、ガラス試験管内壁にバイオフィームを薄く形成させた。培養液を吸引・廃棄した後、PBS で希釈したアビエチン酸溶液を添加して、バイオフィームがアビエチン酸溶液に完全に浸漬するように試験管を水平にして、37 $^{\circ}$ C の好気条件下において 1 時間震盪培養した (120 rpm)。試験管中のアビエチン酸溶液を吸引・廃棄し、10 mL の PBS で 3 回洗浄後、再度 10 mL の PBS を添加し、氷上で約 10 秒間、約 15 kHz の超音波処理 (UR21-P : トミー精工, 東京, 日本) を行いバイオフィームを破壊した。この菌液を PBS で段階希釈した後、前述のように Mitis-Salivarius 寒天培地に 50 μ L ずつ播種し、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養したのち、形成された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

アビエチン酸を溶解させた TSBY 培地に 1×10^5 cfu/mL となるように調整した *S. mutans* を、滅菌したガラス試験管を用いて 37 °C で培養した。培養後 0, 1, 2, 4, 6, 12, 18 時間時に、吸光度計を用いて波長 660 nm における濁度を測定した。

アビエチン酸が細菌の細胞壁に与える影響は以下の方法を用いて検討した。すなわち、アビエチン酸を溶解させた TSBY 培地に 1×10^5 cfu/mL となるように調整した *S. mutans* を、100 μ L ずつ平底 96 穴マイクロプレート (Corning, New York, NY, USA) の各ウェルに分注した後、37 °C で培養した。培養 0, 1, 2, 4, 6, 12, 18 時間後に LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Life Technologies) を添加し、約 15 分間暗室で静置した。なお、染色液中の緑色蛍光核酸染色色素である SYTO[®]9 は全細菌の核酸を染色し、赤色蛍光核酸染色色素である propidium iodide は細胞壁が損傷した細菌のみの核酸を染色する性質を有する。染色した標品は蛍光光度計 (Gemini XPS : Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて、485 nm を中心とする励起波長で、530 nm および 630 nm を中心とする波長での蛍光強度を測定し、それを除算して細胞壁に傷害のある細菌数と細胞壁に傷害のない細菌数の割合を算出した。

また、アビエチン酸が細菌のアデノシン三リン酸 (ATP) の活性に与える影響を検

討した。上記の細菌細胞壁への影響を検討した条件により *S. mutans* をマイクロプレート上で培養した後に、ルシフェール HS キット（キッコーマン，東京，日本）を用いて，細菌の ATP 活性を測定した。

4. 走査型電子顕微鏡による細菌の形態の観察

アビエチン酸へ浸漬後の細菌の形態に及ぼす影響は，電界放射型走査電子顕微鏡（FE-SEM DS-720：Topcon，京都，日本）を用いて検討した。アビエチン酸を溶解させた TSBY 培地で調整した 1×10^5 cfu/mL の *S. mutans* 菌液 10 mL をポリプロピレン管内に入れ，37 °C で 1 時間静置培養した。その後，菌液を 1 mL ずつフィルター（ナノパーコレータ / SEM pore：JEOL，東京，日本）を用いて濾過した。フィルター上に回収した細菌を，1 mL の 0.25 %ホルムアルデヒド溶液（Sigma-Aldrich）で吸引しながら固定し，次に 3 mL の PBS で 3 回吸引しながら洗浄した。さらに，試料面に真空蒸着器（Eiko IB-3 Ion Coater：Eiko Engineering，茨城，日本）を用いて白金パラジウムによる真空蒸着を行い，加速電圧 10 kV の条件下で観察した。

5. 蛍光顕微鏡による核酸染色後の細菌の形態の観察

アビエチン酸を溶解させた TSBY 培地に 1×10^9 cfu/mL の *S. mutans* 懸濁液を 100 μ L マイクロプレート上に播種し、37 °C で 1 時間静置培養した。その後、LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit の試薬を 100 μ L 添加して約 15 分間、暗室に静置した。処理した菌液 5 μ L をガラスプレパラート（松浪硝子工業，大阪，日本）上に滴下し、カバーガラス（松浪硝子工業）で圧接後、蛍光顕微鏡（Olympus BX50：オリンパス，東京，日本）を用いて観察した。緑色蛍光色素（SYTO[®] 9）に対しては 545 nm から 580 nm の励起フィルターと 610 nm 以上の吸収フィルターを使用し、赤色蛍光色素（propidium iodide）に対しては 470 nm から 490 nm の励起フィルターと 515 nm から 550 nm の吸収フィルターを使用した。

6. ヒト由来細胞への細胞傷害性の検討

平底 96 穴マイクロプレート（Corning）に HeLa 細胞および HGF をそれぞれ 2×10^5 cells/well，また THP-1 細胞を 1×10^5 cells/well となるように播種し、「材料と方法「1. 材料-3」ヒト由来細胞」に記載の条件で 24 時間培養した。その後、各培養液で調整した各種濃度のアビエチン酸含有培地に置換した。さらに 24 時間および 48 時間後におけるミトコンドリア脱水素酵素活性は，

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

(MTS) アッセイにより測定した。このため CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用い、波長 490 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000 Lab : コロナ電機, 茨城, 日本) にて測定した。

7. 統計処理

統計処理は、Student's *t*-test にて行った。統計学的有意差の判定基準は、 $p < 0.05$ とした。

結果

1. アビエチン酸の浮遊細菌とバイオフィルム形成菌への抗菌効果

アビエチン酸で処理した浮遊状態の *S. mutans* の生菌数を図 2 に示す。アビエチン酸無添加の条件と比較して、アビエチン酸含有溶液では濃度依存的に生菌数は減少し、生菌数が 50 % 以下になる最小発育阻止濃度 (MIC) は 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、陽性対照群 (1 % ポピドンヨード溶液添加群) では生菌数は顕著に減少した。陰性対照群である DMSO のみ添加群では明確な差がなかった。

さらに、アビエチン酸で処理したバイオフィルム中の *S. mutans* の生菌数の変化を検討した (図 3)。アビエチン酸無添加の条件に対してアビエチン酸含有溶液では濃度依存的に生菌数が減少し、48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では生菌数が 50 % 以上であったが 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では生菌数が 20 % 未満にまで減少した。また、陽性対照条件では、含嗽濃度の 0.5 倍である 0.1 % では生菌数が 50 % 以上であったが、5 倍の 1 % では生菌数が顕著に減少した。陰性対照条件である DMSO 含有溶液のみでは明確な差はなかった。

2. 細菌の菌体および生物活性に与える影響の検討

アビエチン酸で処理した後の *S. mutans* の濁度を測定し、増殖の変化を観察した (図 4)。16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のアビエチン酸含有時ではアビエチン酸無添加の条件に対して増殖が抑制されていた。アビエチン酸 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では陽性対照条件 (1% ポピドンヨード) と同程度に増殖が抑制されていた。なお、溶媒である DMSO 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 含有時 (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアビエチン酸溶液中の濃度に相当) はアビエチン酸無添加の条件と類似した曲線であった。

さらに、アビエチン酸が *S. mutans* の細胞壁に与える影響を検討した (図 5A)。アビエチン酸 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含有時では、アビエチン酸無添加の条件と比較して、赤色蛍光強度の割合が大きく、アビエチン酸 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有時には、陽性対照条件 (1% ポピドンヨード) と同等に赤色蛍光強度の割合が大きかった。DMSO 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 含有時では、陰性対照条件と類似した推移を示した。なお、この時の染色像を蛍光顕微鏡で観察すると (図 5B), 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アビエチン酸含有時と陽性対照条件 (1% ポピドンヨード) で赤色蛍光強度が大きく、緑色蛍光強度が小さかった。それ以外の条件では、緑色蛍光強度が大きく、赤色蛍光強度は小さかった。

また、アビエチン酸で処理した後の *S. mutans* の ATP 活性を測定した (図 6)。アビ

エチン酸を 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下含有時およびアビエチン酸無添加の条件では活性が増大したのに対して、アビエチン酸 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有時では、浸漬直後から 18 時間後まで一定の活性を持続した。一方、陽性対照条件（1 % ポピドンヨード）では減少した。

3. アビエチン酸が細菌の形態に及ぼす影響

アビエチン酸処理 1 時間後の *S. mutans* の形態を、電子顕微鏡で観察した（図 7）。アビエチン酸無添加群では、菌体表面は滑沢だが、アビエチン酸浸漬後の菌体表面は粗造であった。また、陽性対照群の 1 つで、陽電荷を保持し、細胞壁を破壊させる作用を有する 0.05 % CPC 溶液処理菌体では、菌体表面が一部破壊されており、遊離ヨウ素がタンパクの合成を阻害する 1 % ポピドンヨード溶液処理でも菌体表面は粗造であった。2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ DMSO 含有時の菌体表面は滑沢で、アビエチン酸無添加の条件時の細菌の形態と大きな差異はなかった。

4. アビエチン酸が生体由来細胞の細胞傷害性に及ぼす影響

HeLa 細胞、THP-1 細胞、そして HGF に対するアビエチン酸の細胞傷害性を検討し

た。HeLa 細胞および HGF ではアビエチン酸無添加の条件と比較して、アビエチン酸を 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含有時の 24 時間および 48 時間の処理時間では、ともに有意に細胞傷害性を示した (図 8A, B)。一方 THP-1 細胞では、細胞傷害性に有意な差があったのは、24 時間および 48 時間の処理時ともにアビエチン酸を 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上含有した時であった (図 8C)。

考察

本研究にて、アビエチン酸が口腔バイオフィルムを形成し、齲蝕原性細菌である *S. mutans* に対して、浮遊細菌の増殖抑制作用およびバイオフィルム形成菌の増殖抑制作用を有することが示唆された。しかしながら、その作用機序は解明するに至っておらず、今後の課題として、その解明が求められる。

今回、走査電子顕微鏡での観察におけるアビエチン酸溶処理後の細菌は、アビエチン酸無添加の条件と比較して、溶菌はしていないものの細菌の表面形態が粗造になっていた（図7）。そこで、アビエチン酸が *S. mutans* の細胞壁に与える影響を、核酸染色色素を用いて検討した（図5）。この際、染色液中の緑色蛍光核酸染色色素（SYTO[®]9）は全細菌を標識するのに対し、赤色蛍光核酸染色色素（propidium iodide）は損傷した細胞壁を通過して核酸を標識するため、染色時に赤色蛍光強度の割合が大きいと細菌の細胞壁での損傷が大きい、あるいは形態的傷害はないが、ポンプ等の機能が停止するなど、機能的に障害をうけていることになる。64 µg/mL のアビエチン酸で処理した細菌では、細菌の核酸が強く染色されていたことから細胞壁の形態的あるいは機能的障害が疑われ、アビエチン酸が細胞壁に何らかの影響を与えたと推測された。一

方で、64 $\mu\text{g/mL}$ のアビエチン酸で処理した細菌においても、一定の ATP 活性が継続して測定された (図 6)。細菌の ATP 活性測定の際には、あらかじめ adenosine phosphate deaminase を含む ATP 消去試薬を用いて菌体外の ATP を失活させているので、ATP の活性が持続されたということは、ATP 消去試薬が生細菌体内へは浸透していないことを示している。すなわち、細菌の細胞壁の機能は維持されているものの細胞壁自体は傷害を受けているので propidium iodide などの物質が細胞壁を透過できるものと考えられた。

また、高濃度のアビエチン酸で処理した細菌でも ATP が一定の活性を持続していたことから、アビエチン酸は細菌を死滅させるのではなく、その増殖を抑制する静菌的作用を有する可能性が示唆された。今後、細菌のタンパク合成を阻害することで静菌的に抗菌作用を発揮するテトラサイクリンやマクロライド系の抗菌剤などの作用時と、ATP の活性を比較検討することが必要である。また、寒天培地上に菌液を播種し、経時的に生菌数を計測することも必要である。アビエチン酸処理後の菌液を液体培地中に再懸濁し、その後の生物活性を観察することも有用である。アビエチン酸が細菌に対して静菌的に抗菌作用を示すのであれば、継続的に使用した場合にも口腔内細菌叢の質的な変化は起こりにくく、正常細菌叢を保ちやすいことが予測される。そして、正常細菌叢を維持しつつ口腔内の病原性細菌の増殖を抑制することは、菌交代

現象などの副作用を抑えながら口腔バイオフィルム感染症の抑制に繋がる。

一方で、生体由来細胞への細胞傷害性の検討では、上皮系細胞および間葉系細胞ではアビエチン酸濃度 256 $\mu\text{g/mL}$ 以上で、単球系細胞においてはアビエチン酸濃度 64 $\mu\text{g/mL}$ 以上で、細胞傷害性を確認した (図 8)。そのため、アビエチン酸を臨床応用する際には、64 $\mu\text{g/mL}$ から 128 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で用い、かつ血中への移行がない義歯洗浄剤等の条件下に限定されると予測された。

本研究では、齧蝕原性細菌である通性嫌気性グラム陽性球菌である *S. mutans* に対するアビエチン酸の抗菌作用を検討したが、今後は口腔内に存在する通性嫌気性グラム陰性菌などの様々な細菌種に対するアビエチン酸の抗菌スペクトルを把握しなければならない。実用化に際しては、ラットなどの小動物に対してアビエチン酸を投与することで、口腔内細菌叢の質的および量的変化の有無を調べることも有用である。本研究では、バイオフィルム形成菌に対するアビエチン酸の増殖抑制効果の検討に関しては、成熟したバイオフィルムを標的にしたが、今後は形成初期段階におけるバイオフィルムの形成抑制効果を検討することも必要である。

また、本研究で使用した、ヒトの歯肉から分離・培養した細胞は線維芽細胞のみであったが、今後の口腔内への応用を鑑みると、ヒト由来歯肉上皮細胞に対するアビエ

チン酸の細胞傷害性の検討も必要である。さらに、赤血球、血小板などの血球系細胞に対する細胞傷害性の検討も有用である。加えて、アビエチン酸は酸化すると強い抗原性を示す³⁹⁾ため、応用には保管等の時にアビエチン酸が酸化しないような工夫が必要である。しかし、前述の様に歯科分野において医療機器クラスⅡである歯科用高分子系仮封材料としてすでにアビエチン酸を含有している製品が存在することから、口腔内細菌による感染を制御する材料として臨床への応用が可能ではないかと考える。

結論

アビエチン酸は、口腔内の浮遊細菌に対する増殖抑制作用およびバイオフィルム形成菌の増殖抑制作用を有し、口腔内細菌による感染の制御に有用である。

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黒田照夫准教授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の山城圭介助教，峯柴史博士研究員，岡山大学病院歯周科の大森一弘講師，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。

参考文献

1. Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., and Dewhirst, F. E.: The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*, **42**, 80-87, 2006.
2. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., and Dewhirst, F. E.: Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, **43**, 5721-5732, 2005.
3. Cisar, J. O., Kolenbrander, P. E., and McIntire, F. C.: Specificity of coaggregation reactions between human oral *Streptococci* and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun*, **24**, 742-752, 1979.
4. 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.
5. 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.
6. Nakano, K., Nomura, R., Matsumoto, M., and Ooshima, T.: Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases – from molecular mechanism to clinical cases: Cell-surface structures of novel serotype *k* *Streptococcus mutans* strains and their correlation to virulence. *J Pharmacol Sci*, **113**, 120-125, 2010.
7. Arimatsu, K., Yamada, H., Miyazawa, H., Minagawa, T., Nakajima, M., Ryder, M. I.,

- Gotoh, K., Motooka, D., Nakamura, S., Iida, T., and Yamazaki, K.: Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep*, **4**, 4828, 2014.
8. Kostic, A. G., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., Ojesina, A. I., Jung, J., Bass, A. J., Taberner, J., Baselga, J., Liu, C., Shivdasani, R. A., Ogino, S., and Meyerson, M.: Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res*, **22**, 292-298, 2012.
9. Kumar, P. S.: Oral microbiota and systemic disease. *Anaerobe*, **24**, 90-93, 2013.
10. He, J., Li, Y., Cao, Y., Xue, J., and Zhou, X.: The oral microbiome diversity and its relation to human disease. *Folia Microbiol*, **69**, 69-80, 2015.
11. 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.
12. Fung-Tomc, J.: Correlation of *in vitro* and *in vivo* resistance development to antimicrobial agents. *The Antimicrob Newslett*, **7**, 17-24, 1990.
13. Pallasch, T. J., and Slots, J.: Antibiotic prophylaxis and the medically compromised host. *Periodontol 2000*, **10**, 107-138, 1996.
14. El-Kabir, M., and Scully, C.: Candida and oral candidosis: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med*, **5**, 125-157, 1994.

15. Tacconelli, E., De Angelis, G., Cataldo M. A., Pozzi, E., and Cauda, R.: Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, **61**, 26-38, 2008.
16. Kato, T., Iijima, H., Ishihara, K., Kaneko, T., Hirai, K., Naito, Y., and Okuda, K.: Antibacterial effects of Listerine on oral bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll*, **31**, 301-307, 1990.
17. Schaeffer, L. M., Szewczyk, G., Nesta, J., Vandeven, M., Du-Thumm, L., Williams, M. I., and Arvanitidou, E.: *In vitro* antibacterial efficacy of cetylpyridinium chloride-containing mouthwashes. *J Clin Dent*, **22**, 183-186, 2011.
18. Perumal, S., and Mahmud, R.: Chemical analysis, inhibition of biofilm formation and biofilm eradication potential of *Euphorbia hirta* L. against clinical isolates and standard strains. *BMC Complement Altern Med*, **13**, 346, 2013.
19. Chung, P. Y., Toh, Y. S.: Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis*, **70**, 231-239, 2014.
20. Jung, J., E., Pndit, S., and Jeon, J., G.: Identification of linoleic acid, a main component of the n-hexane fraction from *Dryopteris crassirhizoma*, as an anti-*Streptococcus mutans* biofilm agent. *Biofouling*, **30**, 789-798, 2014.
21. Kitaoka, N., Lu, X., Yang, B., and Peters, R. J.: The application of synthetic biology to elucidation of Plant mono-, sesqui-, and diterpenoid metabolism. *Mol Plant*, **8**, 6-16, 2015.

22. Keeling, C. I., and Bohlmann, J.: Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, **170**, 657-675, 2006.
23. Da Silva, S. D. C., De Souza, M. G. M, Cardoso, M. J. O, Moraes, T. S., Ambrósio, S. R., Veneziani, R. C. S. G., and Martins, C. H.: Antibacterial activity of *Pinus elliottii* against anaerobic bacteria present in primary endodontic infections. *Anaerobe*, **30**, 146-152, 2014.
24. Souza, A. B., Martins, C. H. G., Souza, M. G. M., Furtado, N. A. J. C., Heleno, V. C. G., De Souza, J. P. B., Rocha, E. M. P., Bastos, J. K., Cunha, W. R., Veneziani, R. C. S., and Ambrósio, S. R.: Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother Res*, **25**, 215-220, 2011.
25. Sá, N. C., Cavalcante, T. T. A., Araújo, A. X., Dos Santos, H. S., Albuquerque, M. R. J. R., Bandeira, P. N., Da Cunha, R. M. S., Cavada, B. S., and Texeira, E. H.: Antimicrobial and antibiofilm action of casbane diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol*, **57**, 550-555, 2012.
26. Kapewangolo, P., Omolo, J. J., Bruwer, R., Fonteh, P., and Meyer, D.: Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Ocimum labiatum* extract and isolated labdane diterpenoid. *J Inflamm*, **12**, 4, 2015.
27. Wu, Z-Y., Zhang, Y-B., Zhu, K-K., Luo, C., Zhang, J-X., Cheng, C-R., Feng, R-H., Yang, W-Z., Zeng, F., Wang, Y., Xu, P-P., Guo, J-L., Liu, X., Guan, S- H., and Guo, D-A.: Anti-inflammatory diterpenoids from the root bark of *Acanthopanax gracilistylus*. *J Nat Prod*, **77**, 2342-2351, 2014.

28. McKinnon, R., Binder, M., Zupkó, I., Lajter, I., Vasas, A., de Martin, R., Unger, C., Dolznig, H., Diaz, R., Frisch, R., Passreiter, C. M., Krupitza, G., Hohmann, J., Kopp, B., and Bochkov, V. N.: Pharmacological insight into the anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. Ex Cass. *Phytomedicine*, **21**, 1695-1701, 2014.
29. Pawar, R., Das, T., Mishra, S., Nutan, Pancholi, B., Gupta, S. K., and Bhat, S. V.: Synthesis, anti-HIV activity, integrase enzyme inhibition and molecular modeling of catechol, hydroquinone and quinol labdane analogs. *Bioorg Med Chem Lett.*, **24**, 302-307, 2014.
30. Yu, F., Wang, Q., Zhang, Z., Peng, Y., Qiu, Y., Shi, Y., Zheng, Y., Xiao, S., Wang, H., Huang, X., Zhu, L., Chen, K., Zhao, C., Zhang, C., Yu, M., Sun, D., Zhang, L., and Zhou, D.: Development of oleanane-type triterpenes as a new class of HCV entry inhibitors. *J Med Chem*, **56**, 4300-4319, 2013.
31. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., and McPhail, A. T.: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J An Chem Soc*, **5**, 2325-2327, 1971.
32. Kowalski, R. J., Giannakakou, P., and Hamel, E.: Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol®). *J Biol Chem*, **272**, 2534-2541, 1997.
33. Kim, N-H., Son, Y., Jeong, S-O., Hur, J. M., Bang, H. S., Lee, K-N., Kim, E-C., Chung, H-T., and Pae, H-O.: Tetrahydroabietic acid, a reduced abietic acid, inhibits the production

of inflammatory mediators in RAW264.7 macrophages activated with lipopolysaccharide.

J Clin Biochem Nutr, **46**, 119-125, 2010.

34. Fernández, M. A., Tornos, M. P., García, M. D., de las Heras, B., Villar, A. M., and Sáenz, M. T.: Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta recemosa* var. *grisea*. *J Pharm Pharmacol*, **53**, 867-872, 2001.
35. Ukiya, M., Kawaguchi, T., Ishii, K., Ogihara, E., Tachi, Y., Kurita, M., Ezaki, Y., Fukatsu, M., Kushi, Y., and Akihisa, T.: Cytotoxic activities of amino acid-conjugate derivatives of abietane-type diterpenoids against human cancer cell lines. *Verlag Helvetica Chimica Acta AG*, **10**, 1260-1268, 2013.
36. Yoshida, N., Takada, T., Yamamura, Y., Adachi, I., Suzuki, H., and Kawakami, J.: Inhibitory effects of terpenoids on multidrug resistance-associated protein 2- and breast cancer resistance protein-mediated transport. *Drug Metab Dispos*, **36**, 1206-1211, 2008.
37. Ohtsu, H., Tanaka, R., In, Y., Matsunaga, S., Tokuda, H., and Nishino, H.: Abietane diterpenoids from the cones of *Larix kaempferi* and their inhibitory effects on Epstein-Barr Virus activation. *Planta Med*, **67**, 55-60, 2001.
38. Naruishi, K., Takashiba, S., Nishimura, F., Chou H. H., Arai, H., Yamada, H., and Murayama, Y.: Impairment of gingival fibroblast adherence by IL-6/sIL-6R. *J Dent Res*, **80**, 1421-1424, 2001.
39. Sadhra, S., Foulds, I. S., and Gray, C. N.: Identification of contact allergens in unmodified rosin using a combination of patch testing and analytical chemistry techniques. *Br J Dermatol*, **134**, 662-668, 1996.

図の説明

図 1. アビエチン酸の生成

テルペンは 5 個の炭素からなるイソプレンを構成単位とする。アビエチン酸は 4 つのイソプレン単位からなる分子量 302.44 の物質で、カルボニル基であるカルボン酸基を持つジテルペンである。

図 2. アビエチン酸の *S. mutans* 浮遊細菌に対する抗菌効果

アビエチン酸で処理して 1 時間後の *S. mutans* 浮遊細菌を、平板塗布法を用いて培養して、生菌数を計測した。縦軸は、アビエチン酸無添加時を基準 (=1) とした生菌数の比を示し、横軸は各薬剤の濃度を表す。図中の横点線は相対コロニー数が 50 % であることを表す。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。

図 3. アビエチン酸の *S. mutans* バイオフィーム形成菌に対する抗菌効果

アビエチン酸で処理して 1 時間後の *S. mutans* バイオフィーム中の細菌を、平板塗布法を用いて培養して、生菌数を計測した。縦軸は、アビエチン酸無添加時を基準 (=1)

とした生菌数の比を示し、横軸は各薬剤の濃度を表す。図中の横点線は相対コロニー数が 50 %であることを表す。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。

図 4. アビエチン酸が *S. mutans* の増殖に与える影響

アビエチン酸で処理して 0, 1, 2, 4, 6, 12, 18 時間後に吸光度計を用いて 660 nm における細菌培養液の濁度を測定した。縦軸は細菌の濁度を、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。

□ : アビエチン酸無添加, ● : 2.5 μ L/mL DMSO, Δ : 4 μ g/ml アビエチン酸, ○ : 16 μ g/mL アビエチン酸, ▲ : 64 μ g/mL アビエチン酸, ■ : 1 % ポピドンヨード

図 5. アビエチン酸が *S. mutans* の細胞壁に与える影響

A. 蛍光強度の経時的観察

アビエチン酸処理して 0, 1, 2, 4, 6, 12, 18 時間後に、全細菌の核酸を緑色蛍光核酸染色色素 (SYTO[®] 9) で、細胞壁を損傷している核酸を赤色蛍光核酸染色色素 (propidium iodide) で染色し、分光蛍光光度計を用いて、蛍光強度を測定した。485 nm を中心とする励起波長で、530 nm および 630 nm を中心とする波長での蛍光強度を測

定し、それを除算して細胞壁に障害のある細菌と障害のない細菌の割合とした。縦軸は細胞壁に障害のある細菌と障害のない細菌の割合を、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。

□ : アビエチン酸無添加, ● : 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ DMSO, Δ : 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アビエチン酸, ○ : 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アビエチン酸, ▲ : 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アビエチン酸, ■ : 1% ポピドンヨード

B. 蛍光顕微鏡による観察像

アビエチン酸処理して1時間後の細菌の核酸を全細菌の核酸を緑色蛍光核酸染色色素 (SYTO[®]9) で、細胞壁を損傷している核酸を赤色蛍光核酸染色色素 (propidium iodide) で染色し、蛍光顕微鏡を用いて細菌形態を観察した。図は独立した3回の実験のうち、代表的な像を示す (SYTO[®]9 : 緑, propidium iodide : 赤, merge : 重ね合わせ)。

スケールバー : 10 μm

図 6. アビエチン酸が *S. mutans* の ATP 活性に与える影響

アビエチン酸処理して 0, 1, 2, 4, 6, 12, 18 時間後に細菌の ATP の活性を測定した。縦軸は ATP の活性を、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。

□ : アビエチン酸無添加, ● : 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ DMSO, Δ : 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アビエチン酸, ○ :

16 $\mu\text{g/mL}$ アビエチン酸, ▲ : 64 $\mu\text{g/mL}$ アビエチン酸, ■ : 1% ポピドンヨード

図 7. アビエチン酸が *S. mutans* の形態に与える影響

アビエチン酸処理して1時間後の細菌形態を, 走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

図は独立した3回の実験のうち, 代表的な像を示す。

スケールバー : 1 μm

図 8. アビエチン酸がヒト由来細胞の細胞障害性に及ぼす影響

アビエチン酸が (A) HGF, (B) HeLa 細胞, (C) THP-1 細胞に与える影響を, 生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性を MTS アッセイにて検討した。490 nm における陰性対照条件 (アビエチン酸無添加) での吸光度を基準 (=1) とした比を縦軸に, 添加している薬剤およびその濃度を横軸に示す。それぞれの棒グラフの左側は薬剤浸漬後 24 時間後の, 右側は 48 時間後の細胞障害性を表す。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。

■ : 24 時間後, □ : 48 時間後

* : $p < 0.05$