

ポリマイクロバイアルバイオフィームの代謝活性に対する
新規抗菌剤の抗菌効果

富 山 潔

神奈川歯科大学大学院口腔機能修復学講座う蝕制御修復学分野・講師

Antibacterial effects of novel antimicrobial agents on the metabolic activity
of polymicrobial biofilms

Kiyoshi TOMIYAMA

Division of Cariology and Restorative Dentistry, Department of Oral Function and restoration,
Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University

Abstract

Pancil PS-M (Rilis Co., Ltd., Osaka, Japan) is a food additive containing condensed tannin extracted from astringent persimmon. The purpose of this study was to investigate the bacterial action of Pancil PS-M on the formation of polymicrobial biofilms by forming biofilms in a high-throughput active attachment biofilm system.

Pancil PS-M was dissolved in distilled water and serially diluted for the experiments. Polymicrobial biofilms were cultured on glass cover slips using dilution ($\times 50$) of stimulated saliva collected from one healthy adult in a high-throughput active attachment model. Experiments were performed anaerobically in McBain medium, which was refreshed twice daily on a schedule of 10 h and 14 h of growth.

Exp. 1: After biofilm formation for 48 h, single treatment was conducted as follows: The specimens (12 per group) were immersed for 5 min in: 0.2% chlorhexidine digluconate (CHX) (Corsodyl, GlaxoSmithKline) (group 0.2C); 0.05% CHX (group 0.05C); 0.5%, 0.7% and 1.0% Pancil PS-M (groups 0.5P, 0.7P and 1.0P); and deionized water (control group). After these treatments, specimens were harvested and CFU counts were analyzed statistically (One-way ANOVA, Tukey's, $p < 0.05$).

Exp. 2: After biofilm formation for 24 h, each treatment was conducted as above and then biofilm growth was conducted for 24 h. After the biofilm growth was arrested, the pH of the spent medium was measured at time points of 10 h, 24 h, 34 h and 48 h.

The results showed that all treatment groups had a significantly lower CFU than that of the control group. Pancil PS-M showed concentration-dependent inhibition of CFU. Groups 1.0P and 0.2C showed significantly lower CFU levels than those of the other groups. The pH of the spent medium in the 1.0P and 0.2C groups was suppressed compared with that of the control group.

These results indicated that Pancil PS-M has efficacy for reducing the risk of disease onset in the oral environment and lungs.

緒 言

渋柿由来の縮合型タンニンは、一般的に強力なタンパク質凝固作用を持つことで知られているが、ノロウイルスへの効果も謳われており¹⁾、舌や歯面上の口腔内細菌数を抑制し、細菌叢の改善に役立つ可能性がある。全体的に見て、植物由来のタンニンは縮合型と加水分解型に分けられ、まずこの両者はpHや成分が大きく異なる。また同じ縮合型の中でも、種類によって分子量などの構造が全く異なるため、柿タンニンの口腔内バイオフィルムへの効果は、お茶、ワイン、あるいは他の植物中に含まれるタンニンとは異なると考えられている。

近年、日本において、肺炎は、悪性新生物、心疾患に次いで死亡原因の第三位となった（厚生労働省平成26年“我が国の人口動態”より）。一般的に高齢者の肺炎の70%が誤嚥に関連していると、新たに分析されている²⁾。また今後、世界では、肺癌、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺炎が死因の上位を占めるようになると予測される。この20年以内に、日本は、1995年1月17日の阪神・淡路大震災、2011年3月11日の東日本大震災と、二つの巨大地震にみまわれ、人的、物的ともに、甚大な被害を被った。このような災害では、災害による直接的な被害と災害後しばらくしてから生じる関連被害、の両方を分析しなければならない。関連被害として口腔清掃不良を原因としたう蝕の発症が指摘されており、関係する医療従事者は、災害発生後、即座に口腔衛生状態を保つための対策を講じる必要がある³⁾。また注目すべき点として、災害後、月日の経過とともに、高齢者が誤嚥性肺炎で亡くなるケースが顕著に増加するというデータがある^{4,5)}。誤嚥性肺炎の問題点は、人口構成の高齢化により、誤嚥性肺炎による死亡率が上昇することと、反復治療により耐性菌が増加し、難治化することである。反復性誤嚥性肺炎を防ぐために、口腔内常在菌や病原菌に有効な薬剤を投与する抗菌療法が推奨されているが（日本呼吸器学会医療・介護関連肺炎診療ガイドライン）、秀でた抗菌療法はないのが現状である。

最近、岡山大学と大阪大学の研究チームは、舌上に形成されたバイオフィルム量が多い人ほど、口腔内のアセトアルデヒド濃度が上昇し、食道癌や咽頭癌に罹患し易くなるという報告を行った^{6,7)}。これらの疾患への対策としては、安価で簡単、しかも多種菌が息息する口腔内で抗菌効果を発揮できる抗菌化学物質あるいは天然由来成分の応用が望まれるところである。副作用や耐性菌を避けるという意味合いからは、抗菌化学物質のみならず、天然由来成分も含めて検討するの

が良い選択であろうと考える。抗菌効果を判定する際には、口腔内の細菌叢をシミュレートした環境で抗菌剤の評価を行っているかどうかが重要である。以前より、嫌気性菌や口腔内常在菌の誤嚥性肺炎に対する関与は強く指摘されてきたが、従来法では多種にわたる細菌を含む、口腔内バイオフィルムの培養や同定が困難であったため、有効な抗菌療法の研究が進んでいなかった。多種種を含むバイオフィルムと、単一菌あるいは数種の菌を含有するのみのバイオフィルムでは、抗菌剤処理後のバイオフィルムの挙動が異なっていることが報告されている⁸⁾。今回、私達は、ポリマイクロバイアル（PM）バイオフィルムに対して優れた抗菌効果を発揮する天然由来の抗菌成分および、その有効な濃度を見つける目的で、有効成分渋柿由来の縮合型タンニンを含有し、食品添加剤（food additives）として用いられている Pancil PS-M[®]（PS-M; Rilis Co., Ltd, Osaka, Japan）、および0.2% chlorhexidine digluconate（CHX; Corsodyl, GlaxoSmithKline, Brentford, London, UK）を使用した。

実験材料および方法

1. 基質

基質には、ガラスディスク（直径12 mm、厚さ150 μm, Menzel, Germany）を使用した。

2. 唾液採取

唾液は、3か月間、抗生物質あるいは抗菌剤服用の履歴がなく、う蝕や歯周病に罹患していない天然歯列を有する健康成人1名から、パラフィルム（Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA）を咀嚼することにより、氷冷下で採取した。採取した唾液は直ちに壊死組織片除去のために、滅菌グラスウール（NRK GRW-10, Nippon Rikagaku Kikai CO. LTO., Tokyo）で濾過し、滅菌グリセリンにて70 vol%に希釈し、-80℃で凍結保管した。なお、ヒト唾液を使用するにあたり、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の承認を得て行った（承認番号：第206番）。また、被験者の人権擁護上の配慮研究遂行による不利採、インフォームド・コンセント等についてはヘルシンキ宣言を遵守した。

3. 処理剤

処理剤には0.2% グルコン酸クロルヘキシジン（Corsodyl, GlaxoSmithKline）およびPancil[®] PS-M（リリース科学工業株式会社）を使用し、使用する濃度により、滅菌脱イオン水で希釈して実験に使用した。0.05% グルコン酸クロルヘキシジンはCorsodylを4倍希釈することにより作製し、パンシル各群は、パンシル粉末を用いて3濃度（0.5 wt%, 0.7 wt%, 1.0 wt%）

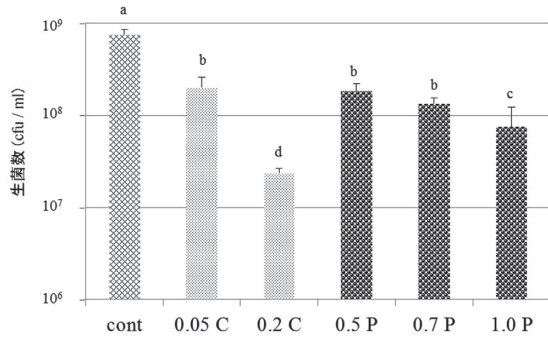


図1 各抗菌剤処理後の生菌数

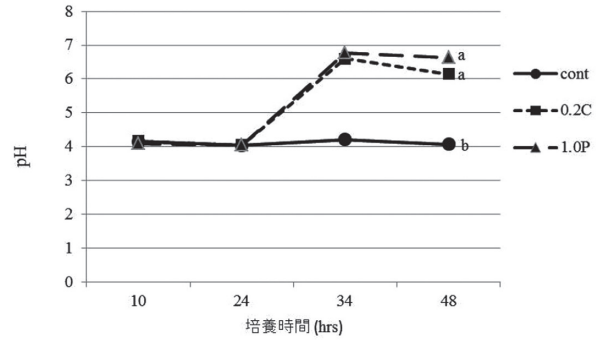


図2 使用済み培養液のpH

に調整した。

4. 実験群

実験1：非処理 (cont), 0.05% グルコン酸クロルヘキシジン (0.05 C), 0.2% グルコン酸クロルヘキシジン (0.2 C), 0.5 wt% Pancil PS-M (0.5 P), 0.7 wt% Pancil PS-M (0.7 P), 1.0 wt% Pancil PS-M (1.0 P) の6群とした。

実験2：cont, 0.2 C, 1.0 P の3群とした。

5. バイオフィルムの培養

24穴カルチャープレートのステンレス製の上蓋内面に取り付けられたクランプにガラスディスクを固定後、オートクレーブにて滅菌処理を行なった (121°C, 15分間)。凍結保存した刺激唾液を溶解し、Exterkateら⁸⁾の方法に従い50倍希釈になるように加えた unbuffered McBain semidefined medium (0.2 wt% sucrose, 50 mmol PIPES, mucin, bacto peptone, trypticase peptone, yeast extract, NaCl, KCl, CaCl₂, hemin, vitamin K1) 中にガラスディスクを懸架, 37°Cで10時間嫌気培養 (CO₂: 10%, H₂: 10%, N₂: 80%) し, その14時間後に新鮮培養液に交換後, 10時間, 14時間のサイクルで培養液を交換し, 培養を継続して48時間まで培養した。

試料数は各群12個とした。

6. 抗菌剤処理

実験1.

48時間培養を行なったポリマイクロバイアルバイオフィルムが付着したガラスディスクを各抗菌剤あるいは滅菌DWを2mlずつ分注したwell中に浸漬し, 22°Cで5分間, 静置した。その後, ガラスディスクを固定したLidを2mlずつ cysteine peptone water (CPW) を分注した24well上に設置し, 10回上下させて洗浄し, この過程を3回繰り返した。培養は, この時点で停止した。

実験2.

24時間培養したPMバイオフィルムに0.2% グルコン酸クロルヘキシジン, 1.0% パンシルあるいは滅菌DWを用いて上記と同様の過程で処理を行ない, その後, CPWによる洗浄を行なった。処理後のバイオフィルムは, 培養を継続し, 培養開始から48時間の時点で停止した。

7. 柿タンニン含有抗菌薬の効果判定

実験1. (生菌数の算定)

培養の停止後, 全ての試料を2ml CPWを分注したコンテナー中に移し, 超音波振動 (Transsonic T780, Elma electric GmbH, Stuttgart, Germany) にて試料からPMバイオフィルムを試料から剥離し, 試験管ミキサー (Vortex Tube mixer VTX-3500, BDL, Czech Republic) で分散した。その後, CPWにて段階希釈し, Tryptic soy agar blood plateに50μl播種し, 嫌気条件下37.0°Cで4日間培養してCFUを算定し, 生菌数平均値と標準偏差を算出した。

実験2. (使用済み培養液のpH測定)

pH測定実験では, 培養から10, 24, 34および48時間の時点における各群の培養液のpHを測定 (9618-10D, F-71, Horiba) した。

8. 統計学的分析

生菌数の算定値および使用済み培養液のpH値に対して, 平均値と標準偏差を算出し, One-way ANOVA, その後の検定としてTukeyの多重比較検定を行った。なお, 有意水準は5%とした。これらの統計分析にはIBM SPSS Ver. 20.0 (日本IBM, 東京) を使用した。

結 果

実験1.

48時間培養したPMバイオフィルムに対して各種抗菌剤処理を行なった結果, 生菌数は cont: 7.57×10⁸, 0.05 C: 2.02×10⁸, 0.2 C: 2.39×10⁷, 0.5 P: 1.83×10⁸, 0.7 P:

1.35×10^8 , 1.0 P: 7.55×10^7 であった(図1)。

実験2.

培養から10, 24, 34および48時間の時点において, cont, 0.2 Cおよび1.0 P群の使用済み培養液のpHを測定した結果, 各群それぞれ, cont: (4.15, 4.04, 4.21, 4.07), 0.2 C: (4.16, 4.05, 6.60, 6.15), 1.0 P: (4.10, 4.05, 6.78, 6.64)であった(図2)。

まとめと今後の展望

タンニンは植物に含まれ、ベンゼン環上に複数のフェノール性水酸基をもつポリフェノールの一種で、蛋白質や塩基性化合物などと難溶性の結合体を生じるものの総称である。タンニンの分布は極めて広く、植物中では未熟な果実や種子、生長の盛んな部位や虫喫等に多量に蓄積されているが、その化学構造はそれぞれ異なっており、異なる効果が見込まれることから、異なった植物種から得られたタンニンはその効果も異なると考えなければならない⁹⁻¹¹⁾。一方でグルコン酸クロルヘキシジンは、細菌から真菌におよぶ幅広い抗菌スペクトル、皮膚・粘膜に対する低刺激性など優れた安全性、血液、体液などの生体成分による薬効低下の小ささ、組織残留性に基づく生体消毒後の薬効持続性など、殺菌消毒剤としての優れた特長を数多く有しており、開発から約50年を経た今日においても世界各国の臨床現場において幅広く使用されている。一方近年では*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. marcescens*などの菌種において、グルコン酸クロルヘキシジンに対して抵抗性を示す菌株の分離が報告されており、他の消毒剤に対する耐性菌の出現と同様に、院内感染の防止対策上の問題とされている。0.2%グルコン酸クロルヘキシジンは、欧州および米国において、洗口剤の上限の濃度として一般の消費者に販売されている。

今回の研究では、渋柿タンニンの、口腔内多菌叢からなるバイオフィルムに対する効果を検討した。実験1で使用した48時間培養したバイオフィルムは比較的、成熟していると言われるレベルであるとともに、ポリマイクロバイアルバイオフィルムは口腔内プラーク中に存在しているすべての菌種を含んでいる。また実験2では24時間培養したバイオフィルムに対して処理を行ない、その後、24時間の培養を継続したが、これは抗菌効果の持続性を分析する目的の実験設定であった。実験1で、0.5および0.7 Pは、日本国内で許容されている濃度の0.05 Cと同等の生菌数の抑制を示し、1.0 Pは0.05 Cを上回っていた。グルコン酸クロルヘキシジンは国内でI型アレルギーを発症した事例があることから^{12,13)}、これと同等あるいはそれ以

上の効果を有する天然由来抗菌剤が見出されることは有用である。我々は、パンシルに含まれるタンニンの効果は、バイオフィルムの構造破壊による、多菌種を含むバイオフィルムへの抗菌作用に由来する可能性があることをすでに報告している¹⁴⁾。

実験2では、1.0 wt%パンシルが0.2 wt%グルコン酸クロルヘキシジンを上回る持続的なpH下降の抑制効果を有することがわかった。初期齲蝕の再石灰化療法を開発する上で、フッ化物の応用に加えて、抗菌剤の応用が有効であると言われており¹⁵⁾、初期齲蝕病巣に有効である、フッ化物と新規抗菌剤を併用した新規治療法の開発が期待されている。それは、さらなる齲蝕発生率の減少を実現させるかもしれないからである。初期齲蝕(表層下脱灰病巣)の再石灰化療法に関する研究は、主に口腔外で化学溶液を用いた再現下で検討されることが多いが、唾液成分や菌の混入が再石灰化を妨げる可能性があり、本研究で使用しているバイオフィルムモデルを用いて表層下脱灰病巣を作成できれば、より口腔内に近い環境下で表層下脱灰病巣を再石灰化させるための研究を行なうことができるようになると思われる。今回、渋柿から抽出したタンニンは、バイオフィルムのpH dropおよび生菌数を顕著に抑制することがわかった。私たちは、バイオフィルムを用いて作成した表層下脱灰病巣に対するフッ化物の効果を反映できる表層下脱灰病巣モデルをすでに作成した¹⁶⁾。このモデルを用いてさらに、柿タンニンの初期齲蝕病巣への効果を検討することが可能である。

高齢化社会の到来に伴い、局所的に見れば、根面齲蝕の予防や治療への対策が進歩すること、また全身的に見れば、誤嚥性肺炎の抑制、食道癌および咽頭癌のリスクを下げることは、国民の健康増進に深く貢献できる成果となり得るであろうと考える。私達歯科医師は、直接、この課題と向き合うことができる現場の最前線にいる。

結 論

渋柿から抽出した縮合型タンニンを含有する食品添加剤であるパンシルは、口腔レンサ球菌の付着阻害活性あるいはバイオフィルムの構造破壊によると思われる、多菌種を含むバイオフィルムへの抗菌作用を有することが示された。

謝 辞

本研究の一部は、平成26, 27, 28年度科学研究費補助金(C)26462900, ならびに神奈川県歯科大学学会平成27年度宿題報告の補助により行われた。

また本研究は神奈川歯科大学倫理審査委員会の承認を得て遂行された。[研究倫理審査番号 206]。

References

1. Ueda K, Kawabata R, Irie T, Nakai Y, Tohya Y, Sakaguchi T. Inactivation of Pathogenic Viruses by Plant-Derived Tannins: Strong Effects of Extracts from Persimmon (*Diospyros kaki*) on a Broad Range of Viruses. *PLoS ONE* **8**: e55343, 2013.
2. Vital, Health and Social Statistics, Japanese Ministry of health, Labor and Welfare, Japan, 2013.
3. Hosokawa R, Taura K, Ito E, Koseki T. Roles of dentists and dental hygienists in two major earthquakes. *Int Dent J* **62**: 315-319, 2012.
4. Ohkouchi S, Shibuya R, Kikuchi Y, Ichinose M, Nukiwa T. Deterioration in regional health status after the acute phase of a great disaster: Respiratory physicians' experiences of the Great East Japan Earthquake. *Respiratory Investigation* **51**: 50-55, 2013.
5. Ota H, Kawai H. An unusual case of pleural empyema in a tsunami survivor. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals* **20**: 344-346, 2012.
6. Yokoi A, Maruyama T, Yamanaka R, Ekuni D, Tomofuji T, Kashiwazaki H, Yamazaki Y, Morita M. Relationship between acetaldehyde concentration in mouth air and tongue coating volume. *J Appl Oral Sci* **23**: 64-70, 2015.
7. Yamasaki K, Kawanami T, Yatera K, Fukuda K, Noguchi S, Nagata S, Nishida C, Kido T, Taniguchi H, Mukae H. Significance of Anaerobes and Oral Bacteria in Community-Acquired Pneumonia. *PLoS ONE* **8**: e63103, 2013.
8. Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM: Different Response to Amine Fluoride by *Streptococcus mutans* and Polymicrobial Biofilms in a Novel High-Throughput Active Attachment Model. *Caries Res* **44**: 372-379, 2010.
9. Taffetani S, Ueno Y, Meng F, Venter J, Francis H, Glaser S, Alpini G, Patel T. Tannic Acid Inhibits Cholangiocyte Proliferation after Bile Duct Ligation via a Cyclic Adenosine 5', 3'-Monophosphate-Dependent Pathway. *Am J Pathol* **166**: 1671-1679, 2005.
10. Tanimura S, Kadomoto R, Tanaka T, Zhang YJ, Kouno I, Kohno M. Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **330**: 1306-1313, 2005.
11. Luo C, Zhang QL, Luo Z. Genome-wide transcriptome analysis of Chinese pollination-constant nonastringent persimmon fruit treated with ethanol. *BMC Genomics* **15**: 112, 2014.
12. Ohtoshi T, Tamauchi N, Tadokoro K, Miyachi S, Suzuki S, Miyamoto T, Muranaka M. IgE antibody-mediated shock reaction caused by topical application of chlorhexidine. *Clin Allergy* **16**: 155-161, 1986.
13. Okano M, Nokura M, Hata S, Okada N, Sato K, Kitano Y, Tashiro M, Yoshimoto Y, Hama R, Aoki T: Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. *Arch Dermatol* **125**: 50-52, 1989.
14. Tomiyama K, Mukai Y, Saito M, Watanabe K, Kumada H, Nihei T, Hamada N, Teranaka T: Antibacterial action of a condensed tannin extracted from astringent persimmon as a component of food additive Pancil PS-M on oral polymicrobial biofilms. *BioMed Res Int*, Article ID 5730748, 7 pages, 2016.
15. Ten Cate JM. The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Adv Dent Res* **21**: 8-12, 2009.
16. Tomiyama K, Mukai Y, Kumada H, Watanabe K, Hamada N, Teranaka T. Formation of subsurface dentin lesions using a polymicrobial biofilm model. *Am J Dent* **28**: 13-17, 2015.