

脂肪酸塩の口腔内細菌に対する殺菌効果と *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する影響

倉橋 絢子¹⁾ 渡辺 清子²⁾ 佐藤 武則³⁾
稲葉 啓太郎¹⁾ 藤岡 隼^{1,4)} 半田 慶介³⁾
浜田 信城^{*1)}

¹⁾ 神奈川歯科大学分子生物学講座口腔細菌学分野

²⁾ 神奈川歯科大学総合歯学教育学講座教養教育学分野

³⁾ 神奈川歯科大学分子生物学講座口腔生化学分野

⁴⁾ 東京理科大学大学院理学研究科 (化学)

(受付: 2021年3月4日, 受理: 2021年3月26日)

Bactericidal effects of fatty acid salts against oral bacteria and effects of *Streptococcus mutans* biofilm

Ayako KURAHASHI¹⁾, Kiyoko WATANABE²⁾, Takenori SATO³⁾, Keitaro INABA¹⁾,
Jun FUJIOKA^{1,4)}, Keisuke HANDA³⁾ and Nobushiro HAMADA^{*1)}

¹⁾Department of Oral Microbiology, Kanagawa Dental University

²⁾Department of Liberal Arts Education, Kanagawa Dental University

³⁾Department of Oral Biochemistry, Kanagawa Dental University, 82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan

⁴⁾Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo University of Science, 1-3 Kagurazaka, Shinjuku-ku,
Tokyo 162-8601, Japan

Abstract

Fatty acid salts, major components of soap, are widely used in cosmetics and cleaning products, and are also known as potential antibacterial agents. However, little is known about their antimicrobial activity against oral bacteria. In the present study, we evaluated the minimum bactericidal concentration of fatty acid salts against oral bacteria. We also examined their effects on *Streptococcus mutans* biofilm using a live/dead cell viability assay and scanning electron microscopy. Moreover, their cytotoxic activity in human gingival fibroblasts was examined. Eight bacteria (*A. naeslundii*, *L. casei*, *S. mutans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *E. coli* and *S. aureus*) and nine fatty acid salts (C4K, C6K, C8K, C10K, C12K, C14K, C18:1K, C18:2K and C18:3K) were used in this study. Marked bactericidal activity of C12K, C18:2K and C18:3K was observed against all oral bacteria. In addition, C10K and C14K were highly effective against obligate anaerobic Gram-negative bacteria. *S. mutans* biofilm formation was markedly inhibited by C12K, C14K, C18:1K, C18:2K and C18:3K at 0.7 mM. Treatment of the pre-formed *S. mutans* biofilms with 175 mM C12K, C14K, C18:1K, C18:2K, or C18:3K markedly reduced the number of viable bacterial cells and bacterial clumps, and disrupted bacterial cell morphology. No cytotoxic activity of fatty acid salts except C18:2K and C18:3K on human gingival fibroblasts was observed at 1 mM. This study suggested that C12K is a useful component to prevent dental caries and periodontal disease.

* 責任著者連絡先: 〒 238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町 82 番地

神奈川歯科大学分子生物学講座口腔細菌学分野

浜田信城

TEL&FAX: 046-822-8867 e-mail: hamada@kdu.ac.jp

緒言

口腔内には700種類以上の細菌が存在していることが知られている^{1,2)}。口腔内は細菌が増殖するのに適した栄養や発育環境が整っており、多様な細菌の集団が歯垢（プラーク）となって歯面や舌背などに定着して存在する。プラーク形成は、口腔内のレンサ球菌が主体となって唾液中の糖タンパク質由来のペリクルを介して歯面などに付着して開始される³⁾。それらの中でも *Streptococcus mutans* は、スクロースを基質として産生された不溶性グルカンが強固な固着性を示すプラーク形成に関与する。また、時間経過とともに *Actinomyces* 属や *Fusobacterium nucleatum* の増加やプラーク内の嫌気度が上昇することによって、他菌種と凝集して密度の高い細菌の複合体を形成して成熟する⁴⁾。成熟したプラークは口腔内の硬組織や軟組織の破壊を惹起し、う蝕や歯周病の主な原因となることから、プラークの形成抑制と可及的な除去が口腔内環境の改善に重要である⁵⁾。

歯面に付着したプラークの除去には、効率的なプラークコントロールが必要である。プラークコントロールは、歯ブラシや歯間ブラシ、デンタルフロスなどによる機械的清掃⁶⁾と歯磨剤や洗口液などを用いた化学的清掃⁷⁾に大別される。ブラッシングなどの機械的清掃はプラークの除去に対して最も効果的な手段であるが清掃器具の到達性に限界があるため、抗菌薬や酵素などを用いた化学的清掃を補助的に併用した方法が推奨されている^{8,9)}。しかしながら、化学的清掃に用いられる薬物にはアレルギー反応^{10,11)}や歯の着色¹²⁾、耐性菌の出現¹³⁾などの副作用を起こすものがあるため適用範囲や使用濃度が限られているものが多い。そこで、最近ではこれらの副作用を示すことなく口腔内の適用が広く可能な天然由来成分が注目されている¹⁴⁻¹⁶⁾。

脂肪酸塩は、せっけんの天然由来成分であり、構成する炭素数が6以下のものを短鎖脂肪酸塩、炭素数が8から12のものを中鎖脂肪酸塩、炭素数が14以上のものを長鎖脂肪酸塩に分類される¹⁷⁾。また、炭化水素鎖の結合様式によって、単結合のみで構成される飽和脂肪酸塩と二重結合または三重結合をもつ不飽和脂肪酸塩に分類される¹⁸⁾。本研究で使用した脂肪酸塩のうち、C4KおよびC6Kは単結合で構成される短鎖脂肪酸塩、C8K、C10KおよびC12Kは単結合で構成される中鎖脂肪酸塩、C14Kは単結合のみで構成される長鎖脂肪酸塩、C18:1K、C18:2KおよびC18:3Kは二重結合をもつ長鎖脂肪酸塩に分類される。脂肪酸塩は、長鎖炭化水素の末端にカルボキシ基 (-COOH) を結合

した1価のカルボン酸を呈する化学構造を持つ物質である。脂肪酸塩の化学的性質は、炭化水素鎖の部分は疎水性を示し、カルボキシ基 (-COOH) 部分は親水性を示すため両親媒性分子構造となっている^{17,19)}。脂肪酸塩は、陰イオン界面活性剤としてハンドソープやシャンプーなど洗浄効果を期待して日常生活に広く用いられており^{19,20)}、これまでに皮膚常在菌である *Staphylococcus aureus*^{17,21)} に対し殺菌効果を示すことが報告されている。しかしながら、口腔内細菌に対する報告はわずかであり²²⁾、各種脂肪酸塩の有効殺菌濃度や口腔内における為害作用についての詳細な検討はなされていない。本研究では、各種脂肪酸塩の口腔への効果的な応用を検討する目的で、各種脂肪酸塩の口腔内細菌に対する最小殺菌濃度および *S. mutans* および *Porphyromonas gingivalis* に対する経時的殺菌効果、*S. mutans* バイオフィルムの形成への影響と成熟 *S. mutans* バイオフィルムに与える影響を検討した。さらに、各種脂肪酸塩のヒト歯肉線維芽細胞に対する細胞傷害性について検討し、脂肪酸塩の有効性と安全性を評価した。

実験材料および方法

1. 供試菌株および培養条件

実験には、*Actinomyces naeslundii* T14V 株 (*A. naeslundii*)、*Lactobacillus casei* 393 株 (*L. casei*)、*Streptococcus mutans* Ingbritt 株 (*S. mutans*)、*Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株 (*F. nucleatum*)、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株 (*P. gingivalis*) および *Prevotella intermedia* ATCC 25561 株 (*P. intermedia*) を用い、比較対照に *Escherichia coli* HB 101 株 (*E. coli*) および *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 株 (*S. aureus*) を用いた。*A. naeslundii*、*L. casei*、*S. mutans*、*F. nucleatum*、*P. gingivalis* および *P. intermedia* の培養は Bacto™ Brain Heart Infusion (BHI: Becton Dickinson Co., NJ, USA) にイーストエキストラクト (5 mg/ml)、ヘミン (5 μg/ml)、ビタミン K₁ (1 μg/ml) を添加した BHI-YHK 液体培地と Bacto™ Agar (Becton Dickinson Co., NJ, USA) を含む BHI-YHK 寒天培地、5% ヒツジ脱繊維血 (日本バイオテスト、埼玉) を含む BHI-YHK 血液寒天培地を用いて行った。一方 *E. coli* と *S. aureus* の培養は BHI 液体培地と BHI 寒天培地を用いた。すべての口腔内細菌は 37℃ 18 時間嫌気培養し (N₂: 85%, H₂: 10%, CO₂: 5%), *E. coli* および *S. aureus* は 37℃ 18 時間好気培養して実験に供試した。

2. 脂肪酸塩の調整

脂肪酸塩は、シャボン玉石けん株式会社（福岡）より供与を受けた、酪酸カリウム（C4K）、カプロン酸カリウム（C6K）、カプリル酸カリウム（C8K）、カプリン酸カリウム（C10K）、ラウリン酸カリウム（C12K）、ミリスチン酸カリウム（C14K）、オレイン酸カリウム（C18:1K）、リノール酸カリウム（C18:2K）およびリノレン酸カリウム（C18:3K）を使用した。各種脂肪酸塩は、水酸化カリウム（KOH: pH 10.5）溶液を加えて50℃で溶解し350 mMに調整した。比較対照には、リン酸緩衝液（PBS: pH 7.4, 日水製薬, 東京）を用いた。

3. 最小殺菌濃度の測定

各種脂肪酸塩溶液をBHI液体培地で48穴プレート（住友ベークライト, 東京）中で2倍階段希釈を行い、最終濃度175 mMから1.4 mMまで調整した脂肪酸塩溶液500 μ lに対して 1.0×10^9 CFU/mlに調整した供試菌液10 μ lを接種し24-48時間37℃で培養した。培養終了後、各試料の100 μ lを採取し、*A. naeslundii*, *L. casei* および *S. mutans* はBHI-YHK寒天培地、*E. coli* および *S. aureus* はBHI寒天培地、*F. nucleatum*, *P. gingivalis* および *P. intermedia* はBHI-YHK血液寒天培地に塗抹し、口腔内細菌は37℃72時間嫌気培養し、*E. coli* および *S. aureus* は37℃, 24時間好気培養した。それぞれの細菌に対する各種脂肪酸塩の最小殺菌濃度（Minimum bactericidal concentration: MBC）は、培地上に細菌の発育が認められない最大希釈倍数を最小濃度とした。実験は、各濃度の脂肪酸塩溶液に対して3回行った。

4. *S. mutans* および *P. gingivalis* に対する経時的殺菌効果

脂肪酸塩の経時的殺菌効果は *S. mutans* および *P. gingivalis* の2菌種に対して行った。すなわち175 mMの各種脂肪酸塩溶液1 mlに対して、 1.0×10^7 CFU/mlの供試菌液を接種し5分、15分、60分作用後、10倍階段希釈した菌液を培地上に塗抹し37℃72時間嫌気培養した。比較対照には脂肪酸塩を含まないPBSを用い、培養終了後に培地上に発育した生菌数を算定した。

5. *S. mutans* バイオフィーム形成への影響

各種脂肪酸塩の *S. mutans* バイオフィームに対する形成への影響は、Kawarai²³⁾らの報告を参考にして実施した。すなわち、96ウェルプレート（Corning Inc., 東京）を用いて、0.25%スクロース添加BactoTM Tryptic Soy Broth without Dextrose（TSB: Becton Dickinson Co., NJ, USA）液体培地で175 mM, 43.8 mM, 10.9 mM, 2.7 mM, 0.7 mM および 0.2 mMの各種脂肪酸塩溶液200 μ lに 1.0×10^9 CFU/mlに

TSBを用いて調整した *S. mutans* 菌液10 μ lを播種後、24時間嫌気培養した。培養終了後、96ウェルプレートは、滅菌蒸留水を用いて3回洗浄し、50 μ lの0.25%サフラニン色素液を添加して室温で15分間染色した。余剰な色素液を滅菌蒸留水で3回洗浄除去後、*S. mutans* バイオフィームに吸着したサフラニン色素を100 μ lの70%エタノール30分間の作用により菌体から抽出した。バイオフィーム中に存在する細菌量は、サフラニン色素濃度をマイクロプレートリーダー（iMark: Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA）により492 nmの波長で測定した。バイオフィーム形成率は、PBS作用時の吸光度を100%として算出した。

6. 成熟 *S. mutans* バイオフィームに対する殺菌効果

口腔内を想定し、人口唾液（サリベート[®]エアゾール: 帝人ファーマ, 東京）でコートした円型カバーガラス（直径15 mm, 松浪硝子工業, 大阪）上に形成された *S. mutans* バイオフィームに対する各種脂肪酸塩の作用について検討した。実験は、24ウェルプレート（住友ベークライト, 東京）中に滅菌したカバーガラスを静置し、人工唾液で5分間コートして乾燥させたものを用いた。各ウェルに、0.25%スクロース添加TSB液体培地1 mlを添加し、 1.0×10^7 CFU/mlとなるように *S. mutans* 菌液を添加後、24時間嫌気培養して成熟バイオフィームを形成させた。次いで、カバーガラスに付着していない細菌をPBSで洗浄除去した。成熟バイオフィームに対して、175 mM濃度の各種脂肪酸塩溶液500 μ lを添加して15分間作用させた。各種脂肪酸塩によるバイオフィーム中の細菌に対する殺菌効果は、超音波発生装置（QSONICA: ワケンビエテック株式会社, 京都）を用いて125 W, 20 kHz, 40%の振幅で80秒間処理し、カバーガラス上の成熟バイオフィームを剥離した細菌を培地上に塗抹し72時間嫌気培養した生菌数から算定した。

7. 蛍光二重染色法を用いた成熟 *S. mutans* バイオフィームの解析

成熟 *S. mutans* バイオフィームに175 mM濃度の各種脂肪酸塩溶液を15分間作用後、LIVE/DEAD[®] BacLightTM Bacterial Viability Kit（Molecular Probes, Inc., Eugene, OR）を用い、SYTO[®] 9 および Propidium iodide（PI）による蛍光二重染色を行った。バイオフィームの観察は、オールインワン蛍光顕微鏡（BZ-X800, KEYENCE, 大阪）を用いて行ない、生細胞を緑色蛍光色素 SYTO[®] 9（蛍光波長518 nm）、死細胞を赤色蛍光色素 PI（蛍光波長618 nm）で識別した。

表1 各種脂肪酸塩の供試菌に対する最小殺菌濃度

脂肪酸塩	供試菌に対する最小殺菌濃度 (mM)							
	<i>A. n.</i>	<i>L. c.</i>	<i>S. m.</i>	<i>F. n.</i>	<i>P. g.</i>	<i>P. i.</i>	<i>E. c.</i>	<i>S. a.</i>
C4K	>175	175	>175	175	175	175	>175	>175
C6K	>175	175	>175	175	175	43.8	>175	>175
C8K	43.8	87.5	87.5	2.7	43.8	10.9	43.8	175
C10K	5.5	10.9	21.9	<1.4	1.4	<1.4	87.5	21.9
C12K	<1.4	1.4	<1.4	<1.4	<1.4	<1.4	175	43.8
C14K	21.9	87.5	43.8	<1.4	<1.4	<1.4	175	43.8
C18:1K	<1.4	10.9	21.9	87.5	<1.4	10.9	>175	5.5
C18:2K	<1.4	1.4	<1.4	10.9	<1.4	<1.4	>175	<1.4
C18:3K	<1.4	1.4	<1.4	<1.4	<1.4	<1.4	>175	<1.4

A. n., *A. naeslundii*; *L. c.*, *L. casei*; *S. m.*, *S. mutans*; *F. n.*, *F. nucleatum*; *P. g.*, *P. gingivalis*; *P. i.*, *P. intermedia*; *E. c.*, *E. coli*; *S. a.*, *S. aureus*

8. 成熟 *S. mutans* バイオフィルムの走査型電子顕微鏡観察

成熟 *S. mutans* バイオフィルムに 175 mM 濃度の各種脂肪酸塩溶液で 15 分間作用後, 0.1 M カコジルサン緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し, 1% グルタルアルデヒドで 60 分間固定した。試料はエタノール脱水処理後, イオンスパッタ装置 (JFC-1300, AUTO FINE COATER, 日本電子, 東京) にて白金蒸着して作製した。各試料は走査型電子顕微鏡 (SEM; SUPRA™ 40, ZEISS, 東京) を用いて管電圧 10 kV で観察した。

9. ヒト歯肉線維芽細胞に対する影響

ヒト歯肉から樹立した歯肉線維芽細胞を使用し, 以下の方法で各種脂肪酸塩の細胞傷害性を評価した。本研究は, 神奈川歯科大学研究倫理審査委員会 (承認番号 455) の承認を受けて実施した。ヒト歯肉線維芽細胞は 10% fetal bovine serum (Bio West, Nuaille, France) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 日本製薬, 東京) を用いてそれぞれ培養した。1.0 × 10⁵ cells/ml に調整した歯肉線維芽細胞をそれぞれ 96 ウェルプレートに播種後, 48 時間コンフルエントになるまで培養して, 10 mM, 1 mM, 0.1 mM および 0.01 mM の各種脂肪酸塩溶液 100 μl を添加して 15 分間作用させた。その後, 10% fetal bovine serum 含有ダルベッコ変法イーグル培地で洗浄し, さらに 24 時間培養した。培養終了後, CellTiter 96® Aqueous non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Co., Madison, USA) を 100 μl 添加し, 37℃ で 3 時間 5% CO₂ 環境下で保温させ, マイクロプレートリーダーを用いて波長 490 nm で測定した。各種脂肪酸塩の細胞生存率は, PBS 作用時の吸光度を 100% として算出した。

10. 統計学的解析

S. mutans および *P. gingivalis* に対する経時的殺菌効果, *S. mutans* バイオフィルム形成への影響, 成熟 *S. mutans* バイオフィルムに対する殺菌効果, ヒト歯肉線維芽細胞に対する影響は, 3 回実施して平均値と標準偏差 (SD) を算出した。統計学的解析は EZR version 1.40 (自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉) を用いて一元配置分析を行ない, 有意差が認められた場合にはさらに Dunnett 検定による多重比較解析を行ない, 有意水準 5% および 1% 未満で検定した²⁴⁾。

結 果

1. 脂肪酸塩の MBC 値

口腔内細菌に対する各種脂肪酸塩の MBC の結果を表 1 に示した。中鎖脂肪酸塩である C12K と長鎖脂肪酸塩である C18:2K と C18:3K は, 口腔内細菌に対して優れた殺菌効果を示し, 特に C12K には, グラム染色性に関係なく, いずれの口腔内細菌に対しても MBC 値が 1.4 mM 以下で殺菌効果が認められた。また, C18:2K および C18:3K についても同様に口腔内細菌に対して 1.4 mM 以下で殺菌作用が認められた。各脂肪酸塩の殺菌効果は, 菌種間で違いが認められたが, 特に偏性嫌気性グラム陰性菌に対して強い殺菌効果が認められた。しかしながら C4K と C6K の MBC 値は 175 mM を超えるものが多く, 十分な殺菌効果は認められなかった。

2. 脂肪酸塩の経時的殺菌効果

S. mutans および *P. gingivalis* に対する脂肪酸塩の経時的殺菌効果を表 2, 3 に示した。*S. mutans* と *P. gingivalis* に対して, C8K, C10K, C12K, C14K, C18:1K, C18:2K および C18:3K を 5 分間作用させるこ

表2 各種脂肪酸塩の *S. mutans* に対する経時的な殺菌効果

試料	作用時間 (分)			
	0	5	15	60
PBS	1.05 ± 0.95	1.07 ± 0.08	0.95 ± 0.10	0.87 ± 0.15
C4K		0.98 ± 0.05	0.95 ± 0.07	0.90 ± 0.17
C6K		1.12 ± 0.02	0.97 ± 0.06	0.85 ± 0.01
C8K		0**	0**	0**
C10K		0**	0**	0**
C12K		0**	0**	0**
C14K		0**	0**	0**
C18:1K		0**	0**	0**
C18:2K		0**	0**	0**
C18:3K		0**	0**	0**

とにより、いずれの細菌も完全に死滅したが ($p < 0.01$), C4K では、60 分間作用させても有意な生菌数の減少は認められなかった。

3. *S. mutans* バイオフィーム形成への影響

各種脂肪酸塩溶液の *S. mutans* バイオフィーム形成に対する影響について検討する目的で、濃度の異なる各種脂肪酸塩溶液を *S. mutans* 培養液中に添加し 24 時間培養後のバイオフィーム形成率を評価した。C4K では全濃度において *S. mutans* バイオフィーム形成の抑制は認められなかった。C6K および C8K では、それぞれ 10.9 mM と 2.7 mM 未満ではバイオフィーム形成の抑制は認められなかった。一方、C10K, C12K, C14K, C18:1K, C18:2K および C18:3K では濃度依存的にバイオフィーム形成抑制効果が認められ、0.2 mM 以上で有意なバイオフィーム形成抑制効果が認められた ($p < 0.01$)。特に、C12K, C14K, C18:2K および C18:3K では、0.7 mM で 70% 以上の顕著なバイオフィーム形成抑制が認められた。さらに、0.2 mM 脂肪酸塩でのバイオフィーム形成率が、それぞれ 36.0%, 20.8%, 27.1% および 8.0% に減少し、バイオフィーム形成の抑制効果が認められた (図 1) ($p < 0.01$)。

4. 成熟 *S. mutans* バイオフィームに対する殺菌作用

カバーガラス上の成熟 *S. mutans* バイオフィームに 175 mM の各種脂肪酸塩溶液を 15 分間作用後の生菌数を測定した結果、中鎖脂肪酸塩および長鎖脂肪酸塩では、バイオフィーム細菌に対する有意な殺菌作用が認められた (図 2, $p < 0.01$)。特に、C12K, C14K, C18:1K, C18:2K および C18:3K では、生菌数が 10^{-5} 以下に減少しており、バイオフィーム細菌に対しても極めて強い殺菌作用を有することが示された。

表3 各種脂肪酸塩の *P. gingivalis* に対する経時的な殺菌効果

試料	作用時間 (分)			
	0	5	15	60
PBS	2.28 ± 0.01	2.28 ± 0.06	2.15 ± 0.01	2.22 ± 0.03
C4K		2.14 ± 0.02	2.03 ± 0.35	2.13 ± 0.06
C6K		2.07 ± 0.02	2.16 ± 0.53	2.10 ± 0.05*
C8K		0**	0**	0**
C10K		0**	0**	0**
C12K		0**	0**	0**
C14K		0**	0**	0**
C18:1K		0**	0**	0**
C18:2K		0**	0**	0**
C18:3K		0**	0**	0**

5. 蛍光二重染色法を用いた成熟 *S. mutans* バイオフィームの蛍光顕微鏡観察

各種脂肪酸塩を作用させた成熟 *S. mutans* バイオフィームの蛍光二重染色像を図 3 に示した。無傷の細胞膜を有する細菌は、緑色蛍光でのみ染色され、損傷した膜を有する細胞は赤色蛍光で染色されている。菌体が SYTO[®] 9 および PI で染色されることにより黄色から赤色に染色されている細菌は細胞膜に損傷を持つ死菌として判断した。成熟 *S. mutans* バイオフィームに対して PBS を作用させると赤色に観察される死菌がわずかに点在しているが、全体的に緑色を呈する生菌像が観察された (図 3 A)。C4K および C6K を作用させた場合でも、PBS と同様に生菌像が優勢な像が観察された (図 3 B, C)。また、C8K および C10K を作用では、菌体全体がそれぞれ黄緑色から黄色を呈しており、生菌と死菌が混在していることが示された (図 3 D, E)。しかしながら、C12K, C14K, C18:1K, C18:2K および C18:3K を作用させると、バイオフィーム全体に死菌が著しく増加している像が認められた (図 2, 図 3 F-J)。

6. 成熟 *S. mutans* バイオフィームの SEM 観察

成熟 *S. mutans* バイオフィームに各種脂肪酸塩溶液を 15 分間作用させた後、バイオフィームの形態変化を SEM で観察した。PBS 処理の *S. mutans* は、カバーガラス上に大きな菌塊を形成したバイオフィーム像が観察された (図 4a, A)。また、C4K および C6K においても PBS と同様に大きな菌塊が多数認められた (図 4a B, C)。しかしながら、C12K, C14K, C18:1K, C18:2K および C18:3K では *S. mutans* バイオフィームの菌塊縮小と菌塊数も減少した (図 4a, F-J)。また、拡大像で確認すると、*S. mutans* 菌体の形態変化が観察された (図 4b, F-J)。

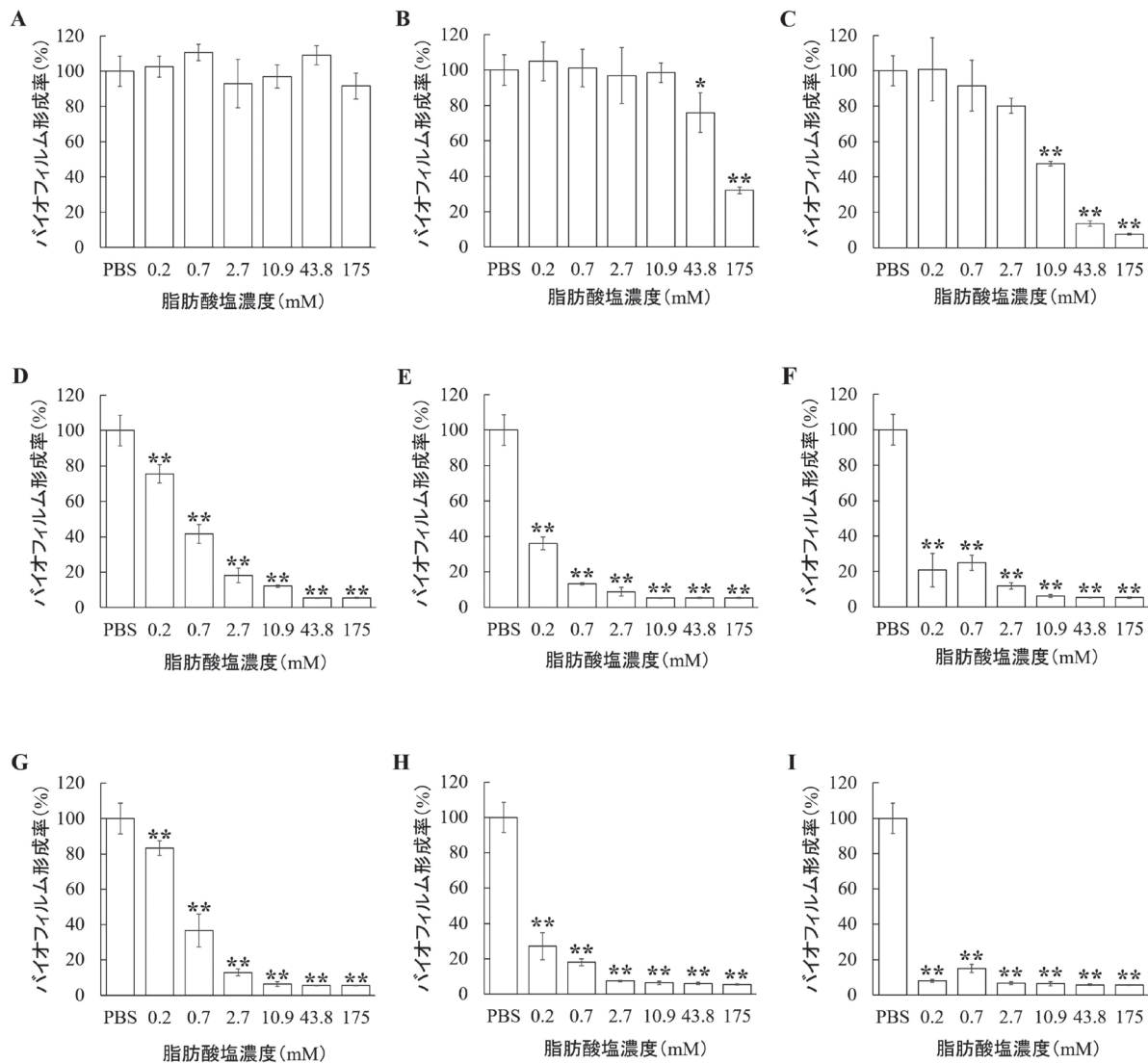


図1 各種脂肪酸塩の *S. mutans* バイオフィーム形成への影響
 比較対照に用いたPBSを100%とし、各種濃度の脂肪酸塩のバイオフィーム形成率を算出し、平均値 ± SDで表した (* $p < 0.05$) (** $p < 0.01$)。A, C4K; B, C6K; C, C8K; D, C10K; E, C12K; F, C14K; G, C18:1K; H, C18:2K; I, C18:3K

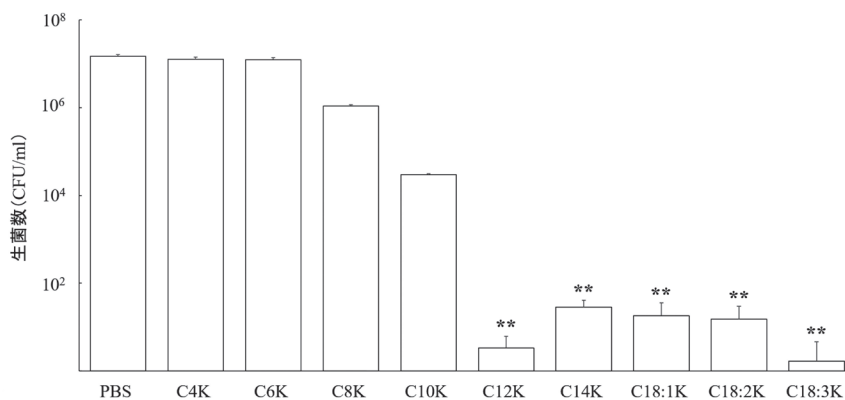


図2 各種脂肪酸塩の成熟 *S. mutans* バイオフィームに対する殺菌効果
 175 mMの各種脂肪酸塩溶液を15分間作用後の生菌数について平均値 ± SDで表した (** $p < 0.01$)

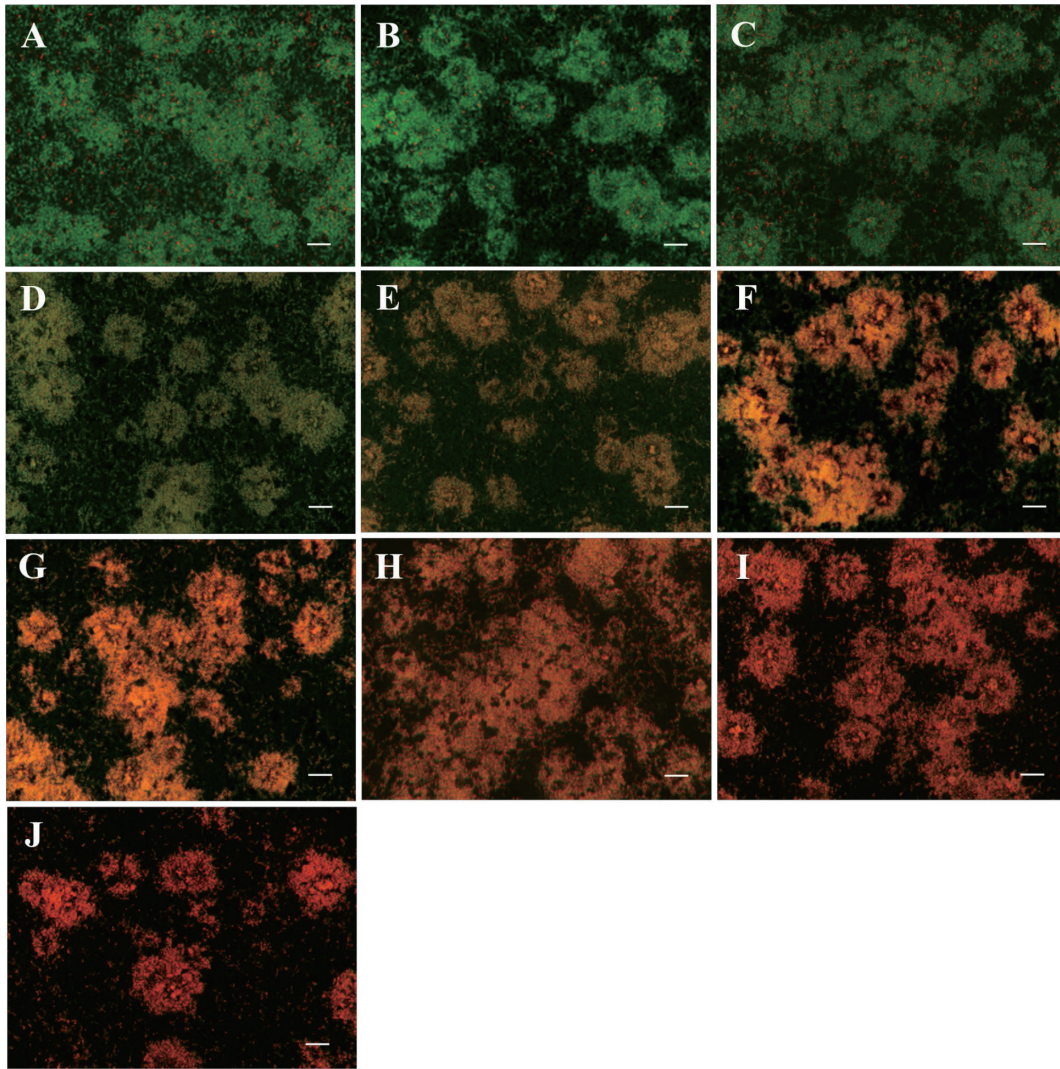


図3 各種脂肪酸塩の成熟*S. mutans* バイオフィルムの蛍光二重染色

成熟*S. mutans* バイオフィルムに175 mMの各種脂肪酸塩溶液を15分間作用後、LIVE/DEAD二重染色を行ない、蛍光顕微鏡を用いて観察した。A, PBS; B, C4K; C, C6K; D, C8K; E, C10K; F, C12K; G, C14K; H, C18:1K; I, C18:2K; J, C18:3K。Bars, 10 μ m

7. ヒト歯肉線維芽細胞に対する影響

ヒト歯肉線維芽細胞に対する細胞傷害性を確認した結果、C4K, C6KおよびC8Kは、10 mM濃度でも細胞生存率に変化がなく細胞傷害性が認められなかった。一方、C10K, C12K, C14KおよびC18:1Kは、1 mMでは細胞生存率に変化が認められず、10 mMで作用させると細胞生存率が顕著に減少した ($p < 0.01$)。またC18:2Kは1 mM, C18:3Kは0.1 mMを超える濃度で作用させると細胞生存率に顕著な減少が認められた (図5) ($p < 0.01$)。

考 察

本研究では、脂肪酸塩の口腔内細菌に対するMBCについて検討するとともに*S. mutans* および*P. gingi-*

valis に対する経時的な殺菌効果について検討した。*S. mutans* は、う蝕原因菌であり²⁵⁾、*P. gingivalis* は歯周病原細菌である²⁶⁾。これらの口腔疾患に関わる代表的な細菌に対する脂肪酸塩の効果を評価することは脂肪酸塩の臨床的有用性を検討するうえで重要と考えられる。

脂肪酸塩の細菌に対する殺菌効果は、細菌細胞膜に作用して複数の機序により効果を示すと考えられている。すなわち、細胞膜の性状を変化させて細胞膜流動性や透過性を亢進させ細胞質内容物を流出させる細胞膜の破壊を生じること^{27,28)}や細胞膜内で行われる電子伝達系および酸化的リン酸化経路におけるエネルギー産生阻害^{29,30)}、細胞膜内の酵素活性阻害^{21,31)}、細菌の代謝機構抑制による発育阻害³²⁾等が報告されて

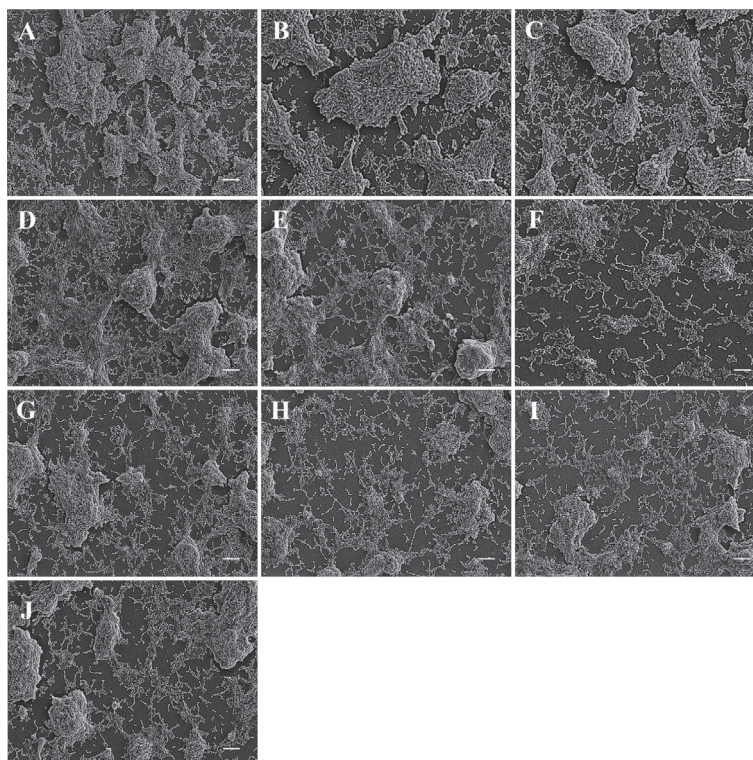


図4a 各種脂肪酸塩の成熟*S. mutans*バイオフィルムのSEM観察

成熟*S. mutans*バイオフィルムに175 mMの各種脂肪酸塩溶液を15分間作用後、SEMを用いて観察した。A, PBS; B, C4K; C, C6K; D, C8K; E, C10K; F, C12K; G, C14K; H, C18:1K; I, C18:2K; J, C18:3K。Bars, 20 μm (倍率: $\times 1000$)

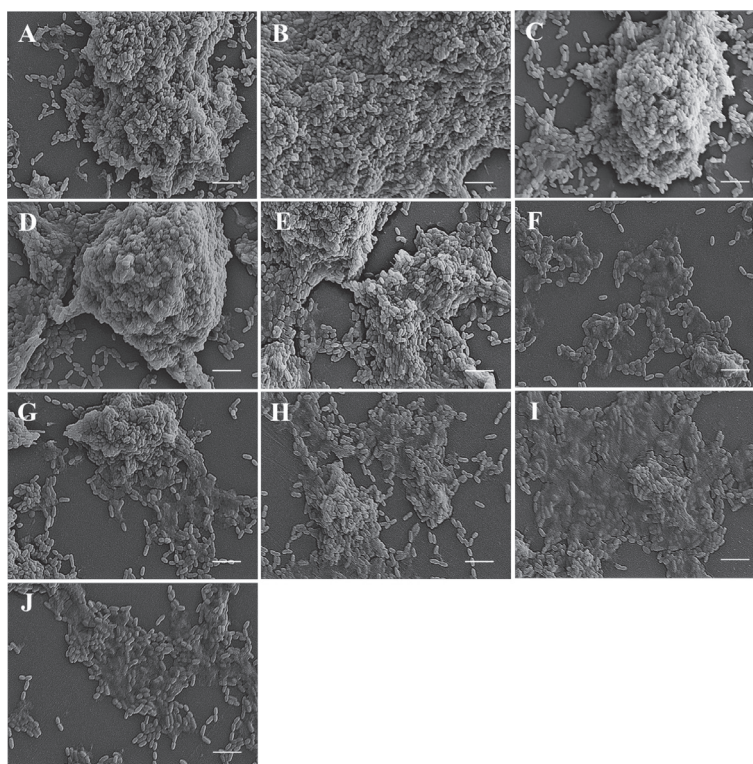


図4b 各種脂肪酸塩の成熟*S. mutans*バイオフィルムのSEM観察

成熟*S. mutans*バイオフィルムに175 mMの各種脂肪酸塩溶液を15分間作用後、SEMを用いて観察した。A, PBS; B, C4K; C, C6K; D, C8K; E, C10K; F, C12K; G, C14K; H, C18:1K; I, C18:2K; J, C18:3K。Bars, 10 μm (倍率: $\times 4000$)

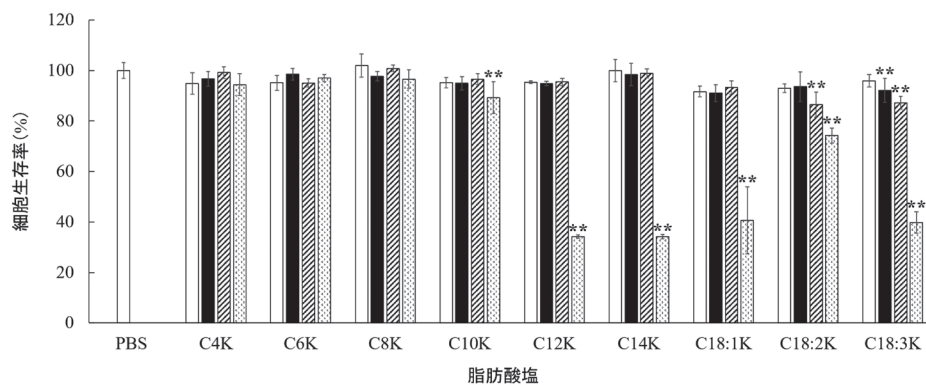


図5 各種脂肪酸塩のヒト歯肉線維芽細胞に対する影響

ヒト歯肉線維芽細胞に10 mM, 1 mM, 0.1 mMおよび0.01 mMの各種脂肪酸塩溶液を15分間作用後の細胞生存率を比較対照に用いたPBSを100%とし、平均値±SDで表した (** $p < 0.01$)。□, 0.01 mM; ■, 0.1 mM; ▨, 1 mM; ▩, 10 mM

いる。細菌の細胞膜は、リン脂質二重層構造であり、疎水性である脂肪酸に親水性であるリン酸が結合してリン酸部分が外側に存在し、脂肪酸部分が内側に存在する構造である³³⁾。

本研究では、中鎖脂肪酸塩 C12K と長鎖脂肪酸塩 C18:2K および C18:3K は、口腔内細菌に対して優れた殺菌効果を示した (表 1-3)。脂肪酸塩の構成炭素数の増加は、疎水度が増加して脂肪酸塩が細菌の細胞膜に吸着、浸透しやすくなり、殺菌作用を示すことが示唆されている^{34,35)}。本研究の結果、C12K はいずれの口腔内細菌に対しても 1.4 mM 以下の低濃度で優れた殺菌作用を示した (表 1)。C12K は、最適な溶解度および疎水性を有する殺菌効果を示す脂肪酸塩であることが理由として考えられた。また、C18:2K および C18:3K は、*F. nucleatum* を除く口腔内細菌に対して顕著な殺菌作用を示した。C18:2K および C18:3K は炭化水素鎖の二重結合がねじれた構造を呈するため、細菌の細胞膜に浸透すると細胞膜の流動性や透過性を亢進させて細胞膜を溶解することにより殺菌作用を示すと考えられている^{28,32)}。各種脂肪酸塩の殺菌効果において、供試口腔内細菌の菌種により有効濃度が異なっていたが、通性嫌気性グラム陽性菌に比較して偏性嫌気性グラム陰性菌が低い濃度で殺菌効果を示すことが認められた。その理由として、グラム陰性菌の細胞壁の構成成分であるペプチドグリカン層がグラム陽性菌に比較して薄く³⁶⁾、脂肪酸塩が細胞膜に透過しやすいためと考えられた。さらに、C4K および C6K がすべての口腔内細菌に対して十分な殺菌効果が認められなかった理由として、C4K および C6K は炭化水素鎖が短く、疎水度が低いため、細菌の細胞膜に吸着、浸透せず、殺菌効果を示さないことが考えられた。

S. mutans バイオフィーム形成に対する影響を検討した結果においても C4K と C6K は抑制効果が確認されなかった (図 1)。C10K, C12K, C14K, C18:1K, C18:2K および C18:3K では濃度依存的にバイオフィーム形成抑制が認められた (図 1)。*S. mutans* バイオフィーム形成の抑制には、菌体に対する脂肪酸塩の殺菌作用に加えてバイオフィーム形成に関わるグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) の合成阻害を抑制することが考えられた。実際、C18:1K, C18:2K および C18:3K は *S. mutans* の GTF の合成阻害とともに殺菌効果が認められるという報告がある^{37,38)}。

次に、*S. mutans* 成熟バイオフィームへの影響を蛍光二重染色像で評価した。カバーガラス上に形成された成熟バイオフィームに C12K, C14K, C18:1K, C18:2K および C18:3K を作用させると顕著な殺菌作用が確認された (図 2, 3 F-J)。C12K, C14K, C18:1K, C18:2K および C18:3K は、細菌の細胞膜に浸透しやすいため³⁴⁾、成熟バイオフィーム内部の細菌に対しても殺菌作用を示すと考えられた。実際、C12K は、成熟バイオフィームに殺菌作用を示すことが報告されている³⁹⁾。しかし、C4K と C6K は炭化水素鎖が短く、疎水度が低く²²⁾、成熟バイオフィーム内においても浮遊細菌と同様に十分な殺菌効果が認められなかったと考えられた (図 2, 3 A, B)。また、SEM による成熟バイオフィームの形態観察において、C4K および C6K は、菌塊縮小や細菌形態の変化が観察されなかったが、C12K, C14K, C18:1K, C18:2K および C18:3K では、菌塊縮小と細菌形態の変化が確認された (図 4a, b)。脂肪酸塩は、陰イオン界面活性剤で固体表面に付着した汚染物質に吸着し、乳化作用がある。すなわち、界面活性剤の分子中の疎水性部分が汚染物質に

吸着し、親水基を外側にしたミセルを形成することにより、汚染物質の剥離効果が生じることが報告されている¹⁹⁾。そのため、成熟バイオフィームに中鎖および長鎖脂肪酸塩を作用させることにより、バイオフィームの菌塊縮小や細菌形態の変化とともに剥離作用の効果があるのではないかと考えている。

脂肪酸塩の細胞傷害性について検討したところ、C4K、C6K および C8K では全く認められなかったが、炭素数の増加に伴いヒト歯肉線維芽細胞の生存率が減少傾向を示した(図5)。C10K、C12K、C14K および C18:1K は 1 mM 濃度まで細胞生存率の減少は認められなかったが、C18:2K と C18:3K は 1 mM と 0.01 mM 濃度で細胞生存率の減少が認められた。ヒトの細胞膜は細菌の細胞膜と同様にリン脂質二重層で構成されており、疎水性物質が浸透しやすい性質である⁴⁰⁾。したがって、細菌に対し強い殺菌作用を示した脂肪酸塩はヒトの細胞膜にも浸透して細胞傷害性を起こす⁴¹⁾と考えられることから、生体への応用には脂肪酸塩を構成する炭化水素鎖数や結合様式の違いと濃度を十分に考慮する必要があることが示唆された。

結 論

脂肪酸塩の口腔内細菌に対する最小殺菌濃度の決定と経時的な殺菌効果、*S. mutans* バイオフィーム形成抑制効果、成熟 *S. mutans* バイオフィームへの作用、およびヒト歯肉線維芽細胞に対する影響を検討した結果、供試した脂肪酸塩のうち C12K が持続かつ優れた殺菌効果を示し、1 mM 濃度までヒト歯肉線維芽細胞への傷害性が低いことが明らかになった。したがって、C12K は歯磨剤や洗口液への添加に最適な脂肪酸塩であり、う蝕や歯周病予防を目的とした臨床有用性が高いと示唆された。

利益相反

本研究に供試した脂肪酸塩はシャボン玉石けん株式会社より提供を受けたが、開示すべき利益相反関係はない。

引用文献

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN *et al.*: Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* **43**(11): 5721-5732, 2005.
- Paster BJ, Olsen I, Aas JA *et al.*: The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000.* **42**: 80-87, 2006.
- Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE: New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* **91**(12): 1110-1118, 2012.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S *et al.*: Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* **8**(7): 471-480, 2010.
- Marsh PD: Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J.* **212**(12): 601-606, 2012.
- Claydon NC: Current concepts in toothbrushing and interdental cleaning. *Periodontol 2000.* **48**: 10-22, 2008.
- Brading MG, Marsh PD: The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *Int Dent J.* **53**(6 Suppl 1): 353-362, 2003.
- Santos A: Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol.* **30**(Suppl 5): 13-16, 2003.
- Matesanz-Pérez P, García-Gargallo M, Figuero E *et al.*: A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* **40**(3): 227-241, 2013.
- Cabral CT, Fernandes MH: *In vitro* comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig.* **11**(2): 155-164, 2007.
- Karpiniński TM, Szkaradkiewicz AK: Chlorhexidine-pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **19**(7): 1321-1326, 2015.
- Kouadio AA, Struillou X, Bories C *et al.*: An *in vitro* analysis model for investigating the staining effect of various chlorhexidine-based mouthwashes. *J Clin Exp Dent.* **9**(3): e410-e416, 2017.
- Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W *et al.*: Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria - Is there cause for concern? *Front Microbiol.* **10**: 587, 2019.
- Taylor PW, Hamilton-Miller JM, Stapleton PD: Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technol Bull.* **2**: 71-81, 2005.
- Li Y, Jiang X, Hao J *et al.*: Tea polyphenols: application in the control of oral microorganism infectious diseases. *Arch Oral Biol.* **102**: 74-82, 2019.
- Tomiyama K, Mukai Y, Saito M *et al.*: 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.* **2016**: 5730748, 2016.
- Yoon BK, Jackman JA, Valle-González ER *et al.*: Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *Int J Mol Sci.* **19**(4):1114, 2018.
- Osborn HT, Akoh CC: Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **1**(3): 110-120, 2002.
- Coiffard L, Couteau C: Soap and syndets: differences

- and analogies, sources of great confusion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **24**(21): 11432-11439, 2020.
20. Burton M, Cobb E, Donachie P *et al.*: The effect of handwashing with water or soap on bacterial contamination of hands. *Int J Environ Res Public Health.* **8**(1): 97-104, 2011.
 21. Sado-Kamdem SL, Vannini L, Guerzoni ME: Effect of alpha-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol.* **129**(3): 288-294, 2009.
 22. Masuda M, Era M, Kawahara T *et al.*: Antibacterial effect of fatty acid salts on oral bacteria. *Biocontrol Sci.* **20**(3): 209-213, 2015.
 23. Kawarai T, Narisawa N, Yoneda S *et al.*: Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation using extracts from Assam tea compared to green tea. *Arch Oral Biol.* **10**: 73-82, 2016.
 24. Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* **48**(3): 452-458, 2013.
 25. Selwitz RH, Ismail AL, Pittis NB: Dental caries. *Lancet.* **369**(9555): 51-59, 2007.
 26. Socransky SS, Haffajee AD: Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* **28**: 12-55, 2002.
 27. Skrivanová E, Marounek M, Dlouhá G *et al.*: Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C-C fatty acids. *Lett Appl Microbiol.* **41**(1): 77-81, 2005.
 28. Shin SY, Bajpai VK, Kim HR *et al.*: Antibacterial activity of bioconverted eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) against foodborne pathogenic bacteria. *Int J Food Microbiol.* **113**(2): 233-236, 2007.
 29. Stulnig TM, Huber J, Leitinger N *et al.*: Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J Biol Chem.* **276**(40): 37335-37340, 2001.
 30. Peters J, Chin CK: Inhibition of photosynthetic electron transport by palmitoleic acid is partially correlated to loss of thylakoid membrane proteins. *Plant Physiol Biochem.* **41**(2): 117-124, 2003.
 31. Zheng CJ, Yoo JS, Lee TG *et al.*: Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* **579**(23): 5157-5162, 2005.
 32. Desbois AP, Smith VJ: Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* **85**(6): 1629-1642, 2010.
 33. Paracini N, Clifton LA, Skoda MWA *et al.*: Liquid crystalline bacterial outer membranes are critical for antibiotic susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **115**(32): E7587-E7594, 2018.
 34. Huang CB, Ebersole JL: A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. *Mol Oral Microbiol.* **25**(1): 75-80, 2010.
 35. Ababouch L, Chaibi A, Busta FF: Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. *J Food Prot.* **55**(12): 980-984, 1992.
 36. Radkov AD, Hsu YP, Booher G *et al.*: Imaging bacterial cell wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem.* **87**: 991-1014, 2018.
 37. Kurihara H, Goto Y, Aida M *et al.*: Antibacterial activity against cariogenic bacteria and inhibition of insoluble glucan production by free fatty acids obtained from dried *Gloiopeltis furcata*. *Fish Sci.* **65**(1): 129-132, 1999.
 38. Won SR, Hong MJ, Kim YM *et al.*: Oleic acid: An efficient inhibitor of glucosyltransferase. *FEBS Lett.* **581**(25): 4999-5002, 2007.
 39. Nobmann P, Bourke P, Dunne J *et al.*: *In vitro* antimicrobial activity and mechanism of action of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *J Appl Microbiol.* **108**(6): 2152-2161, 2010.
 40. Liu H, Zhang H, Luo J *et al.*: Highly efficient cell membrane tracker based on a solvatochromic dye with near-infrared emission. *ACS Omega.* **5**(20): 11829-11835, 2020.
 41. Arouri A, Lauritsen KE, Nielsen HL *et al.*: Effect of fatty acids on the permeability barrier of model and biological membranes. *Chem Phys Lipids.* **200**: 139-146, 2016.
-