

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 坂上 雄樹
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第366号
学位授与の日付 平成28年9月20日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Anti-biofilm and bactericidal effects of magnolia bark-derived magnolol and honokiol on *Streptococcus mutans*
(*Streptococcus mutans*に対する Magnolol および Honokiol の殺菌ならびに抗バイオフィルム効果)
論文審査委員 主査 教授 寺尾 豊
副査 教授 野杵 由一郎
副査 教授 吉江 弘正

博士論文の要旨

学位申請者 坂上雄樹氏より提出のあった主論文 (英語) の要旨 (和訳) は、以下の通りである。

【目的】 *Streptococcus mutans* はう蝕病原性のグラム陽性レンサ球菌であり、バイオフィルム形成能および酸産生能を示す。特に、歯面へ強固に付着するバイオフィルムが、ヒトう蝕発症における主要な病原因子とされる。現行のクロルヘキシジンに代表される化学的プラークコントロール剤は、*S. mutans* などの口腔内病原性細菌の活動を抑制するために用いられるが、生体への副反応が存在し、バイオフィルム形成菌に対する効果が低いことが報告されている。そこで、現行の化学的プラークコントロール剤に代わるものとして、抗菌性を有し、かつ生体為害性が低いという観点から植物由来抽出物に着目した。約 700 種の植物由来抽出物の口腔細菌に対する抗菌性についてスクリーニングを行った。その結果、生薬の一種である厚朴の抗菌成分である Magnolol と Honokiol が *S. mutans* に対して優れた抗菌性を示すという知見を得た。本研究では、Magnolol と Honokiol が化学的プラークコントロール剤として応用可能であることを検索するため、*S. mutans* バイオフィルムに対する作用および歯肉上皮細胞に対する細胞毒性について解析を行った。

【方法と結果】 *S. mutans* を 0.5% スクロース添加培地にて 24 時間培養し、形成したバイオフィルムに 50 µg/ml の Magnolol および Honokiol を 30 秒および 5 分間作用させた。対照として、1200 µg/ml のクロルヘキシジングルコン酸塩 (CHX) を作用させた。その後、生細胞・死細胞同時染色キットを用いて染色を行い、共焦点蛍光レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、30 秒作用群では Magnolol、Honokiol、および CHX 作用群のいずれも明確な殺菌作用は認められなかった。5 分作用群では、Honokiol および CHX 作用群において、バイオフィルム表層部で殺菌作用が認められた。しかしながら、バイオフィルム底面側では生菌混在が観察された。一方、Magnolol 5 分作用群では、バイオフィルム底面まで殺菌された。次に、Magnolol および Honokiol 作用後のバイオフィルム中 *S. mutans* 生存率をコロニーカウント法にて算定したところ、5 分作用群において、Magnolol 作用群が最も高い殺菌作用を示し、バイオフィルム中の *S. mutans* 生菌数を 99.9% 減少させた。続いて、口腔粘膜への為害性の有無を調べるため、Magnolol および Honokiol のヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 に対する細胞毒性を MTT 試験にて検索した。その結果、CHX は有効殺菌濃度以下の低濃度でも歯肉上皮細胞の細胞生存率を有意に減少させた。一方で、Magnolol および Honokiol は有効殺菌濃度において、細胞生存率を減少させなかった。

【考察】 Magnolol は、バイオフィルム底面まで殺菌効果を示したことから、バイオフィルムに対する高い浸透性を有することが示唆された。先行の関連研究において、分子量が小さく、電荷が中性のものがバイオフィルムへの浸透性が高いことを明らかにし、国内学会で報告している。Magnolol (分子量 = 266) は CHX (分子量 = 505) と比較して分子量が小さく、電荷が中性で

あることから、バイオフィルムへの浸透に有利であったと考えられる。一方、Magnolol と Honokiol は分子量および電荷が同一であるにも関わらず、Magnolol の方がバイオフィルム中の *S. mutans* に対して高い殺菌作用を示した。Magnolol と Honokiol は構造異性体であり、分子構造の違いにより浸透性に違いが生じたためではないかと推察される。これらの抗菌性物質を口腔内で応用するためには、口腔粘膜に対して為害性が低く、バイオフィルム内細菌に対して高い抗菌活性を有していることが望ましい。Magnolol は歯肉上皮細胞に対して細胞毒性を示さず、一方で *S. mutans* バイオフィルムに対する浸透殺菌効果を示したことから、化学的プラークコントロール剤として望ましい性質を有していることが示唆された。

【結論】Magnolol はバイオフィルムを形成した *S. mutans* に対する優れた浸透殺菌作用を有し、口腔粘膜への為害性が低いことが示唆された。

審査結果の要旨

バイオフィルムの定義ならびに研究の背景、バイオフィルム制御の現行の問題点を試問し、以下の回答を得た。バイオフィルムは「水流環境下および低栄養価で、基層、表層、および菌体同士で不可逆的に付着し、自身が産生した細胞外高分子マトリックスに囲まれ、かつ増殖率や遺伝子発現が浮遊状態と異なる表現型を示す微生物由来の固着性の集団」と定義されている。まず、1978年に付着細菌の集合体が糖衣に覆われていることが報告され、バイオフィルムという概念が提唱された。続いて、尿路感染症患者から採取された *Pseudomonas aeruginosa* が、糖衣に被覆され、バイオフィルムとして報告された。これがヒト病原性のバイオフィルムの最初の報告である。口腔内で形成されるバイオフィルムには、歯面に付着するデンタルプラークとそれ以外の部位に付着するものに分類される。デンタルプラークは、一般に歯面に形成されたバイオフィルム、いわゆる歯垢をさす。1965年、「デンタルプラークは、十分な清掃のされていない歯面や補綴物表面に形成される柔らかい非石灰性の細菌性沈着物である」と定義された。形成部位により歯肉縁上プラークと歯肉縁下プラークに分類され、その構成細菌は大きく異なる。歯肉縁上プラークは、嫌気度が低い歯肉縁上に形成されるため、通性嫌気性菌の割合が高く、レンサ球菌が全体の40%を占める。歯肉縁上プラークは、う蝕や歯肉炎の原因となるとされる。一方、歯肉縁下プラークは、歯周ポケット内に形成され、偏性嫌気性菌の割合が高い。*Porphyromonas gingivalis* や *Prevotella intermedia* などの歯周病原性細菌が存在し、歯周炎発症の原因となる。舌苔は舌の表面（舌背）に形成されるバイオフィルムである。舌背の乳頭状構造は、細菌の付着および定着に有利に働く。舌の表面の口腔細菌叢は、*Bacteroides*、*Fusobacterium*、および *Peptococcus* などの嫌気性細菌が観察されることを報告されている。口臭の原因の一つとして舌苔があげられるが、これらの嫌気性細菌がその原因であるとされる。デンチャープラークは、清掃不良が原因で義歯の表面に形成されるバイオフィルムであり、*Candida albicans* が主体をなす。根尖性歯周炎患者の根尖孔外バイオフィルムは、*Actinomyces* 属と *Propionibacterium* 属が多く観察されている。歯面へ強固に付着するバイオフィルムが、ヒトう蝕発症における主要な病原因子とされているが、現行のクロルヘキシジンに代表される化学的プラークコントロール剤は、生体への副反応に加え、バイオフィルム形成菌に対する効果が低いことが報告されている。

そこで、新たなバイオフィルム制御方法について、申請者が実施した研究内容について審査を行い、以下の回答を得た。マグノロールおよびホノキオールは、複数の細菌および真菌に対する抗菌作用、および一部のウイルスに対する抗ウイルス作用がある。口腔細菌に対しても抗菌効果が示されており、たとえば、*Porphyromonas gingivalis* および *Prevotella intermedia* に対する、マグノロールおよびホノキオールの最小発育阻止濃度はともに 25 µg/ml であると報告されている。しかしながら、その殺菌機序については明らかになっていない。本研究では、*Streptococcus mutans* 人工バイオフィルムに対する、マグノロールおよびホノキオールの殺菌効果を検討するため、生菌数測定法とともに Live/Dead BacLight bacterial viability kit による蛍光イメージング法を用いた。この蛍光染色キットは、膜の透過性により生死分別をするものである。蛍光イメージング法による殺菌効果の判定結果は生菌数測定法の結果と近似しており、細胞膜を傷害された菌が死菌であることが示唆された。このことから、マグノロールおよびホノキオールは細菌細胞膜に傷害を与え、細菌内に浸透することで殺菌的に働いているものと推察される。

学位申請者 坂上雄樹氏より提出のあった主論文をもとに上記事項のように審査を実施し、合格と判定した。

以上