

氏名	佐藤 祐太郎
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位授与番号	博甲第 7260 号
学位授与の日付	令和 7 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科生体制御科学専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)
学位論文の題目	ビルベリー果実に含まれる抗菌周病原細菌物質の同定ならびに歯周病原細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> から単離した生理活性物質に関する研究

学位論文要約

【背景・目的】

歯周病はう蝕と並ぶ主たる口腔疾患の一つであり、同時に世界最大の細菌感染症の一つである。歯周病への罹患は歯を失うリスクが増大するだけでなく、糖尿病などといった systemic disease や感染性心内膜炎、アルツハイマー型認知症などの発症リスクを増大させる。口腔内にはおよそ 800 種の細菌が存在すると考えられているが、歯周病に関わる微生物は *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannellera forsythia*, *Treponema denticola* など具体的な数種類の歯肉縁下に存在する細菌を列挙することができる。とりわけ、*P. gingivalis* は歯肉縁下の細菌叢の dysbiosis を引き起こし、歯周病を発症させる Pathogenic keystone と現在は考えられている。したがって、この *P. gingivalis* に焦点を当てることで、歯周病の発病をコントロールし、あるいは治療を行うための創薬のシードとなる化合物を探索してきた。

これまでの研究で、ツツジ科の植物であるビルベリーの果実には、*P. gingivalis* に対する抗菌活性物質が含まれていることがわかっていたが、一方でその抗菌活性物質は同定されずにいた。本研究の目的は、ビルベリー果実のアセトン抽出物を段階的に精製することで抗菌活性物質を単離および同定し、さらにその類縁化合物との活性を比較することで新たな歯周病治療薬のシードとなる化合物を探索、およびその作用機序を解明することを目的とした。

【実験方法】

ビルベリーの抽出と精製

ビルベリー果実アセトン抽出物をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーを用いて精製し精製分画を得た。得られた分画に対して、*P. gingivalis* (ATCC 33277) に対する抗菌活性を測定し、活性を持つ分画に対して再度精製を行った。なお、抗 *P. gingivalis* 活性の測定方法は後ろに示す。これを繰り返し、抗 *P. gingivalis* 活性を有する白色粉末の精製物 (4-6-Xii-R) を得た。4-6-Xii-R に対して質量分析 (MS) と核磁気共鳴 (NMR)、および旋光度を測定し、4-6-Xii-R の主成分を五環性トリテルペン (PCT) の一種である ursolic acid (UA) と同定した。

抗 *P. gingivalis* 活性の測定

P. gingivalis は寒天培地上で維持し、測定の都度液体培地中で前培養した。液体培地中で前培養した *P. gingivalis* は、Optical Density 660 nm (OD₆₆₀) = 1.0 に調整した。精製分画および測定対象化合物を任意の質量を 10 μ L の dimethyl sulfoxide (DMSO) 中に溶解し、さらに 890 μ L の液体培地を用いて希釈した。180 μ L の測定対象物を含む培地を 96 well-plate 上加え、さらに同一 well 中に 20 μ L の OD₆₆₀ = 1.0 に調整された *P. gingivalis* を加えた後、2 日間 37°C 嫌気条件 (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) で培養した。培養後、増殖の有無は目視によって判定した。

PCTs の抗 *P.gingivalis* 活性の測定と比較

UA を含む asiatic acid (AA)、oleanolic acid (OA)、glycyrrhetic acid (GA)、betulinic acid (BA)、betulinol (B-ol)の六種類の PCTs に対して *P. gingivalis* に対する MIC を測定した。6 mM (100 × 最終濃度) の PCT の DMSO 溶液を、二倍段階希釈した。20 μ L の希釈された PCT 溶液を 180 μ L の液体培地を用いて希釈した。96-well plate 上に 160 μ L の新しい液体培地を加え、同一区画に 20 μ L の希釈された UA を含む液体培地溶液を加えた。さらに同一 well 中に 20 μ L の OD₆₆₀ = 1.0 に調整された *P. gingivalis* を加え、2 日間 37°C 嫌気条件で培養した。培養後、増殖の有無は目視によって判定した。

培養開始時の *P. gingivalis* 量と UA の MIC 値の比較

P. gingivalis の培養開始時の OD₆₆₀ の値の違いによる UA の MIC 値を比較する目的で、OD₆₆₀ = 0.1 から 0.003125 までの間で培養開始した際の MIC 値を測定した。前培養した *P. gingivalis* を希釈し OD₆₆₀ = 0.2 に調整した後、さらに培地を用いて二倍段階希釈を行い OD₆₆₀ = 0.2 から 0.00625 までの培養液を調製した (2 × 最終濃度)。また、UA を DMSO を用いて 5 mg/mL に調整し、さらに DMSO を用いて二倍段階希釈した (最終濃度 25 μ g/mL - 0.244 μ g/mL)。20 μ L の UA 溶液に対して 180 μ L の培地を加えて希釈した。20 μ L の UA 含有 TSB-HM を 96-well plate 上加え、さらに同一ウェルに 80 μ L の新しい TSB-HM を加えた。そしてさらに同一ウェルに 100 μ L の段階希釈された *P. gingivalis* を加えた。これ以後の測定方法は上に示した通りである。

P. gingivalis に含まれる UA 活性阻害物質の探索

OD₆₆₀ = 1.0 に調整された 100 mL *P. gingivalis* 培養液を遠心分離(10000 g, 10 min, 4°C)によって培養上清と菌体に分けた。菌体を 20 mL の Milli-Q 中で懸濁し、再度遠心分離(10000 g, 10 min, 4°C)によって培養上清と菌体に分け菌体を回収した (この行程は 2 回繰り返す)。得られた菌体を 10 mL の Milli-Q 中で懸濁し、超音波 (80 – 100 W, 30 min)によって破碎した。菌体破碎液を遠心分離(10000 g, 10 min, 4°C)により上清と残渣に分け、上清を回収した後、0.45 μ m および 0.22 μ m のフィルターによって濾過後、濾液を回収し *P. gingivalis* sonicates (P.g.S.) と名付けた。P.g.S.の抗 UA 活性測定をする目的で 5 mg/mL UA/DMSO 溶液を DMSO を用いて二倍段階希釈した。100 μ L の段階希釈された UA/DMSO 溶液を 900 μ L の液体培地を用いて希釈した。試験管中に 790 μ L の新しい液体培地をとり、100 μ L の UA を含む培地と 10 μ L の P.g.S. (対照区画として P.g.S.を含まない液体培地) を加えた。*P. gingivalis* は OD₆₆₀ = 0.1 に調整され (10 × 最終濃度)、100 μ L を試験管中の UA と P.g.S. を含む液体培地に加えた。これ以後の測定方法は上に示した通りである。

P. gingivalis 菌体の抽出と精製

OD₆₆₀ = 1.0 に調整された 1 L の *P. gingivalis* 培養液から 100 mL の P.g.S.を得た。P.g.S. を酢酸エチル (EtOAc) を用いて分液し、EtOAc 層を回収し乾固した (P.g.S.-E)。P.g.S.-E の抗 UA 活性測定をする目的で 0.2 mg の P.g.S.-E を 10 μ L の DMSO に溶解し、890 μ L の液体培地を用いて希釈したのち、DMSO を含む液体培地 (最終 DMSO 濃度 1%)を用いて二倍段階希釈し、90 μ L を 96 well-plate 上加えた。10 μ L の 0.4 mg/mL の UA/DMSO 溶液を 890 μ L の液体培地を加えて調整し、その 90 μ L を 96-well 上の P.g.S.-E を含む区画に加えた(最終濃度 2 μ g/mL)。*P. gingivalis* は OD₆₆₀ = 0.1 に調整され 20 μ L を UA と P.g.S.-E を含む区画に加えた。これ以後の測定方法は上に示した通りである。

次いで、P.g.S.-E をシリカゲルオープンカラムを用いて精製し、精製分画に対して同様に抗 UA 活性を測定した。なお、精製分画の一つに *P. gingivalis* に対する抗菌活性を示す可能性があったため、当該分画に対しては抗 *P. gingivalis* 活性も測定した。

P. gingivalis 菌体由来生理活性物質の構造推定

OD₆₆₀ = 1.0 に調整した 5 L の *P. gingivalis* 培養液から 500 mL の P.g.S.を得た。上に示した手順で P.g.S.-E を得た後、シリカゲルオープンカラムを用いて精製分画を得た。精製分画に対して抗 UA 活性測定および抗 *P. gingivalis* 活性を測定した後、MS および NMR を測定することで構造推定を行なった。

【結果】

ビルベリー果実由来の抗 *P. gingivalis* 活性物質の同定

4-6-Xii-R の MS 測定の結果 m/z 455.3511 [M-H]⁺ (calcd for C₃₀H₄₇O₃, 455.3531)であった。さらに ¹³C NMR のスペクトルは同一条件で取得された UA のスペクトルと一致した。また、4-6-Xii-R の旋光度は[α]_D²⁸: +54.8° (c = 0.002, MeOH)であり、UA の旋光度は[α]_D²⁸: +55.2° (c = 0.002, MeOH)であった。4-6-Xii-R の *P. gingivalis* に対する MIC 値は 12.5 μg/mL であり、UA の MIC 値は 6.25 - 12.5 μg/mL であり、以上のことからビルベリー果実由来の抗 *P. gingivalis* 活性物質 4-6-Xii-R は UA であると同定した。

PCTs の抗 *P. gingivalis* 活性の比較

UA および OA の MIC 値はそれぞれ 30 μM であり、AA および GA の MIC 値はそれぞれ 60 μM であった。一方で BA および B-ol に関して実験を行った範囲で増殖阻害を確認できなかった (> 60 μM)。従ってウルサン型とオレアナン型の PCT には抗 *P. gingivalis* 活性を確認できたが、ルパン型の PCT には抗 *P. gingivalis* 活性を確認できなかった。また、培養開始時の OD₆₆₀ 値が減少するに従い、UA の MIC は減少した。OD₆₆₀ = 0.1 で培養開始した場合の UA の MIC は 12.5 μg/mL であり、培養開始時の OD₆₆₀ 値が段階的に減少するにつれて、UA の MIC も段階的に減少した。OD₆₆₀ = 0.013 で培養開始した場合の MIC は 1.563 μg/mL、OD₆₆₀ = 0.003 で培養開始した場合の MIC は 0.391 μg/mL であった。

P. gingivalis に含まれる抗 UA 活性物質の評価

対照区画である P.g.S.を含まない区画の MIC 値は 0.781 μg/mL であったのに対して、P.g.S.を含む区画では 6.25 μg/mL であった。また、2 μg/mL の UA に対する P.g.S.-E の最小活性阻止濃度 (Minimum concentration of cancelling UA activity; MCC) は 25 μg/mL であった。また、P.g.S.-E を精製して得られた 4 つの分画 E₄, E₅, E₆, E₇₋₁₄ に関する MCC はそれぞれ ≤3.125 μg/mL, ≤3.125 μg/mL, >25 μg/mL, 25 μg/mL であった。次いで測定した E₆ の抗 *P. gingivalis* 活性は 12.5 μg/mL であった。

P. gingivalis 菌体由来生理活性物質の推定

OD₆₆₀ = 1.0 に調整された 5 L の *P. gingivalis* 培養液から得られた 0.2 g の P.g.S.-E を得た。さらに精製によって得られた 3 つの分画 β と e を得た。β の MCC は 1.5625 μg/mL であり、e の抗 *P. gingivalis* 活性は 6.25 μg/mL であった。

β の MS スペクトルおよび ¹H NMR、¹³C NMR スペクトルから UA 活性阻害物質はジアシルグリセロールである化合物 X であると推定した。一方で e の MS スペクトルおよび ¹H NMR、¹³C NMR スペクトルから脂肪酸である化合物 Y であると推定した。

【考察】

UA はビルベリーから単離報告のある化合物であり、ブルームに含まれていると考えられている。また、UA は *P. gingivalis* に対して vesicle 誘導能を持つという報告がなされている。しかしながら、ウルソール酸の抗 *P. gingivalis* 活性の作用機序は解明されていなかった。

PCT のうち、ウルサン型およびオレアナン型 PCT に抗 *P. gingivalis* 活性が認められた一方でルパン型 PCT には活性が認められなかった。このことから抗 *P. gingivalis* 活性を有するためには、PCT の五環構造全てが六員環構造である必要があることが示唆された。

UA の MIC 値は培養開始時の *P. gingivalis* 量によって変化することから、UA は *P. gingivalis* 中の特定の構造物に作用することで抗 *P. gingivalis* 活性を発揮すると考えた。*P. gingivalis* の菌体破碎液を用いて UA の MIC 値の変化を測定したところ、菌体破碎液は UA の MIC 値を有意に増大させることがわかった。今回用いられた菌体破碎液は膜成分が主体であり、UA の抗 *P. gingivalis* 活性と膜成分の関連性が示唆された。

今回 *P. gingivalis* 中に存在すると推定された2つの化合物のうち化合物 Y は *P. gingivalis* の LPS の構成脂肪酸の一つであり、細菌のクオラムセンシングに関わる因子であることが報告されている。従って、化合物 Y はオートインデューサーとして *P. gingivalis* の増殖や自己溶菌に関わるシグナル因子として作用している可能性が考えられる。

一方で化合物 X は天然からの単離報告はない。また、構成する脂肪酸が化合物 Y であることから、LPS 等の前駆物質の一つとして存在しており、UA によってこの合成が阻害されることで *P. gingivalis* は死滅し、また添加されることでカスケード下流の化合物が合成され *P. gingivalis* の増殖能力が回復した可能性が考えられる。しかしながら、*P. gingivalis* の代謝経路は未だ不明な点が多く、脂質合成経路の解明を含めて今後の研究課題である。

口腔は消化器官の一つであるが外からのアクセスが容易な器官であり、歯科臨床において使用される薬剤の制限は他の消化器官と比較しても軽い。実際、ホルムアルデヒド、次亜塩素酸や水酸化カルシウムといった薬剤も応用される。また、現在洗口剤として用いられている cetylpyridinium chloride の MIC は 156.25 µg/mL であり、UA はこれと比較しても強い活性を持つと考えられる。このことから鑑みるに、今回活性物質として同定された UA は作用機序に関してさらなる研究が必要ではあるものの、食品由来であることも勘案して応用実現性の高い化合物であると言える。

【結論】

ビルベリー果実に含まれる抗 *P. gingivalis* 活性物質は UA であり、また UA が属する PCT のうち、ウルサン型とオレアナン型 PCT には同様に抗 *P. gingivalis* 活性を認めた。抗 *P. gingivalis* 活性を有するためには PCT の五環の全てが六員環である必要があった。さらに、*P. gingivalis* は UA の抗 *P. gingivalis* 活性に拮抗する物質を有しており、その化合物はジアシルグリセロールである化合物 X であると推定した。また、*P. gingivalis* 自身が抗 *P. gingivalis* 活性物質を産生していることが明らかになり、その化合物は脂肪酸である化合物 Y であると推定した。

3 参考論文および関連文献

【参考論文】※参考論文は、accepted されていないものも含めてすべて記載する。

表題: Identification and observation of the anti-*Porphyromonas gingivalis* compound in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and comparison with its analogs.

著者名: Yutaroh Satoh, Kazuyuki Ishihara, and Takaaki Kubota

雑誌名: Journal of Oral Biosciences (IF: 2.6)

【関連文献】※関連文献がない場合は「なし」と記載する。

なし