

## 1. はじめに

1980年代から始まったバイオフィルムの研究は、地味ですが微生物の研究を一変させるほどの衝撃を与えました<sup>(1,2)</sup>。本号ではバイオフィルムの普遍性と実験的なバイオフィルム感染症に対するラクトフェリン (LF) の効果および今春の日本歯周病学会で発表された LF の実験的歯周病に対する作用についてご紹介します。前号でご紹介したバイオフィルムは、次のような内容でした。

- (1) バイオフィルムは微生物がつくる粘質多糖類で、日常のいたるところにみられる「ネバネバ」あるいは「ヌルヌル」である。
- (2) 通常、微生物はバイオフィルムに閉じこもり集団生活している。
- (3) バイオフィルムは住み心地がよいアパートのようなもので、数種の微生物が共生している。
- (4) バイオフィルムはわれわれの身近いたるところにみられる。自然界では水辺の石をおおう「ツルツル」、カテーテル表面の「ヌルヌル」あるいは不潔な台所の「ネバネバ」はバイオフィルムである。
- (5) われわれの身体にもバイオフィルムが存在し、慢性感染症の原因になっている。典型的なバイオフィルム感染症は緑膿菌が感染した膿胞性肺線維症 (Cystic fibrosis)、歯周病と齲蝕 (ムシ歯) である。その他に副鼻腔炎、上気道感染症、尿路感染症等、枚挙にいとまないほど多くの慢性感染症がバイオフィルム感染症と考えられている。
- (6) 感染した病原菌がバイオフィルムを形成すると、抗生物質、抗菌剤に強い抵抗性を獲得し、免疫的にも排除されなくなる。バイオフィルム感染症の治療は非常に困難である。
- (7) 微生物がバイオフィルムを形成には、生育に必要とされる鉄の数倍が必要である。LF あるいは EDTA のような鉄キレーターにより細菌の鉄利用を妨害すると、バイオフィルムが形成されないので、抗菌物質あるいは免疫系が病原菌を死滅させることができる。

図1にバイオフィルムができあがる過程を示します。鞭毛を有する桿菌としてあらわした細菌は、1に示すように器物あるいは組織の表面に付着します。付着に際しては器物あるいは組織表面と微生物間の特異的な相互作用、例えば、受容体とリガンドのような関係が必要とされています。付着した微生物は増殖すると同時に粘質

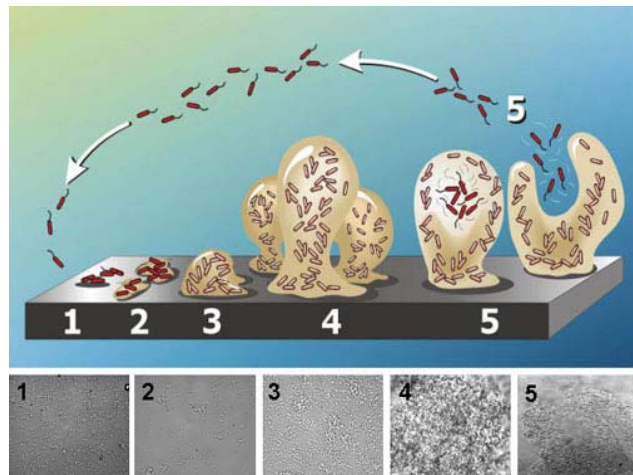


図1. バイオフィルムの成り立ち

多糖を分泌し、バイオフィームは次第に成長して行きます。これが2~3の過程です。成長の過程でフィルムに異種の微生物を呼び込み、共同生活を始めることもあります。その場合にも細胞間で接着因子がはたらき、後からバイオフィームに参加する微生物も先住民と相性がよいものが選択されます。バイオフィームが完成すると、5に示すように水路が形成され、水路から老廃物が排泄され、栄養が供給されるようになります。さらに、環境条件が好転すると内部の微生物は爆発的に増殖し、バイオフィームを離れて別の場所へ移動し定着してバイオフィームをつくります。つまり、1~5のサイクルが繰り返されることで、微生物は生活圏を拡大して行くのです。



図2. ケフィア粒

## 2. バイオフィームの普遍性

自然界に棲息する微生物は、これまで考えていたように単独生活 (planktonic stage) を営んでいるのではなく、バイオフィームのなかで異種の微生物と共生しています。この事実は、これまでの微生物学に大きな反省を迫るものでした。微生物学は、栄養豊かな培地に微生物を増殖させて研究していたのですが、微生物は栄養的に貧弱な環境で他種の微生物



図3. カテーテル上のバイオフィーム

物とバイオフィームのなかで集団生活しているほうが一般的であることがわかってきたのです。一方、人類はバイオフィームを巧みに使いこなしていた例もあるのです<sup>(3)</sup>。コーカサスに伝わる発酵乳飲料のケフィアはその典型です。グルジアは長寿の里と云われ、グルジア人は「ケフィアを常用するから長寿なのだ」と自慢しています。ケフィアにはアルコール発酵する酵母が含まれているので、盛んに炭酸ガスを発生します<sup>(4)</sup>。日本人は衛生観念が発達しているため、食品の充填には密閉した容器が使われてきました。密閉容器に充填されたケフィアは、酵母が炭酸ガスを産生し続けるので、内部のガス圧が高まり爆発します。しかし、ヨーロッパではガスぬき容器に充填されスーパーマーケットで販売されている馴染みの健康飲料です。

ケフィアはケフィア粒 (図2) と呼ばれる乳白色のかたまりを乳に添加し、発酵させてつくります。ケフィア粒は酵母、乳酸桿菌、連鎖状の乳酸球菌等、数種の微生物が共生するバイオフィームです。

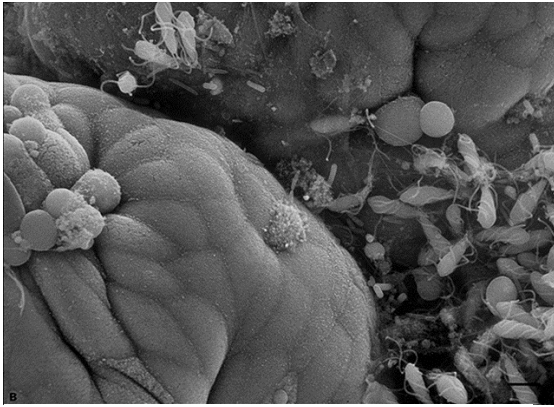


図4. 腸管表面のバイオフィーム

5) に至るまでカラダのいたるところにバイオフィームがみられます。前立腺肥大の中高年の男性には排尿障害が起こります。そのような方々が腸溶性 LF 製剤を摂取すると「楽に排尿できるようになった」と感謝されることがよくあります。筆者が疑っているのは“すべてではないにしても排尿障害の方々は、前立腺に日和見病原菌の感染から炎症が起こり、その結果、尿道が圧迫されて排尿障害が起こるのではないか”と云うことです。これまで前立腺肥大は老化にともなう現象と考えられてきました。しかし、ほぼ 30%の老齢男性には前立腺肥大は起こらないのですから、必ずしも老化が原因とは云えませんが。考えられるのは、弱毒の日和見病原菌が前立腺にバイオフィームをつくり、炎症を起こさせているのではないかと云うことです。類似の現象にバイオフィーム感染症である歯周病があります。歯周病が進行した 50 歳以上の男性は、歯と歯肉が健康な同年齢の男性より死亡率が 2.6 倍高く、心臓病による死亡率は 3 倍高いとされています<sup>(6)</sup>。歯周病を起こす病原菌がいろいろな臓器にバイオフィームをつくって感染し、免疫力が低下すると炎症を起こして増殖することが寿命に大きな影響を与えているのではないのでしょうか。

### 3. バイオフィーム感染症と LF

LF は表 1 に示すようにマウスのバイオフィーム感染症を防御する活性を示します。肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* 3K-25 は、グルコースが入ったブイヨン培地に培養すると大量の粘質多糖を生産するので、培地がネバネバになります。表のように  $1.5 \sim 2.0 \times 10^6$  の細胞を経鼻感染させると、上気道で増殖しマウスに肺炎を起こさせます<sup>(7)</sup>。表左のように経鼻感染の 3 日後に肺を摘出し、ホモジナイズして菌数を測定すると、対照群マウスではほぼ 1 万 4 千の生菌が検出されました。しかし、感染の 3 時間前に LF を経口投与すると、肺の菌数は用量依存性に減少しました。また、4 日間飼育して死亡率を比較したのが右の表です。

バイオフィームは難治性感染症の原因になっています。前号ではコンタクトレンズにはえた緑膿菌バイオフィームを示しましたが、図 3 の走査型電子顕微鏡写真に示すように、バイオフィームはカテーテル表面にも生えてトラブルの原因になります<sup>(5)</sup>。どれほど微生物汚染に注意しても、カテーテル挿入場所は無菌ではありません。微生物汚染を完全に排除することは困難だからです。驚くべきことに、腸管の表面 (図 4) から前立腺 (図



図5. 前立腺表面のバイオフィーム

対照群では4頭に1頭が死亡するのに対し、感染3時間前にLFを50 mg/kg経口投与した群は、1頭も死亡しませんでした。感染と同時にLFを投与した群の死亡率は7.3%、感染24時間後に投与した群は10.9%で、感染死を抑制する効果が認められました。

尿路感染症はバイオフィームをつくる大腸菌群に属する弱毒病原菌の侵入により起こり、しばしば慢性化する厄介な感染症です。つまり、バイオフィームに包まれた病原菌は免疫系により抑え込まれていますが、寒冷ストレスなどにより免疫能が低下すると暴れ出します。表2は大腸菌群に属する *Proteus mirrabilis* Ch 株をマウスに感染させて起こる上向性

表1. 肺炎桿菌の経鼻感染に対するラクトフェリンの防御効果

ラクトフェリン	肺の菌数 (CFU/lungs)	(%)	実験群	n	死亡	死亡(%)
対照群	14,125	100	対照	39	10	25.6
10 mg/kg	4,677	33	感染前 <sup>a</sup>	59	0	0
50 mg/kg	2,570	18*	同時 <sup>b</sup>	55	4	7.3
			感染後 <sup>c</sup>	55	6	10.9

*Klebsiella pneumoniae* 3K-25を2 x 10<sup>6</sup>経鼻感染し、4日目の死亡個体を数えた。  
a) 感染3時間前に投与  
b) 感染と同時に投与  
c) 感染24時間後に投与  
ラクトフェリン: 50 mg/kg経口投与

**Klebsiella pneumoniae 3K-25, 1.5 x 10<sup>6</sup> CFUを経鼻感染し、感染3日後に肺を摘出して、肺の菌数を測定した。\*P<0.05**

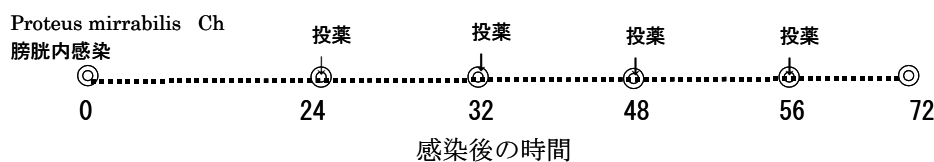
尿路感染症に対する LF の効果を示しました<sup>(8)</sup>。感染は生細胞約百万個をマウスの膀胱に注入して惹起しました。膀胱に感染したプロテウス菌は輸尿管の管壁にバイオフィームをつくりながら上昇し、腎臓に入って定着・増殖します。治療は感染24時間後から開始し、32, 48

および58時間後にアミノベンジルペニシリン(アンピシリン)とLF(2 mg/mouse)を経口投与し、感染72時間後に腎臓を摘出し、ホモジナイズして腎臓に定着・増殖した菌数を

表2. 上向性尿路感染モデルに対するラクトフェリンとアンピシリンの相乗的な防御効果

アミノベンジルペニシリン (mg/mouse)	細菌数 (PFU/腎臓)		減少率 (%)
	ラクトフェリン非投与	ラクトフェリン投与	
1.0	88	0	<1/88
0.1	83216	36	1/2312
0.01	100704	58	1/1736
非治療対照群	138,503		

数えました。非治療対照群の生菌数は約14万個ですが、アンピシリンを1 mg/mouseを連続4回経口投与すると、腎臓の菌数は88個に減少しました。しかし、投与量を1/10~1/100に減少させるにつれて効力が低下し、特に、0.01 mg/mouseの投与では腎臓の生菌は対照群



と同じレベルで無効でした。一方、LF をアンピシリンと併用すると、アンピシリンが 1 mg/mouse の群では生菌が検出されず、0.01 mg/mouse を投与した群でも 58 個の生菌が検出されただけでした。つまり、LF はアンピシリンの活性を百倍以上増強したことになります。活性増強は他の  $\beta$  ラクタム系抗生物質の場合でも認められました。表 3 はセファロスポリン系抗生物質セフポドキシムについて行った実験の結果を示します。アンピシリンと同様に LF はセフポドキシムの感染防御効果を 10 倍以上増強しました。

表 3. 上向き尿路感染モデルに対する LF とセフポドキシムの相乗的な感染防御効果

セフポドキシム (mg/mouse)	菌数 (CFU/kidneys)		減少率(%)
	対照群	LF 群	
0.1	774	84	1/94
0.01	23,004	76	1/3303
0.001	25,230	6,328	1/4
0	44,960		-

実験条件は表 2 と同じ。LF は 2 mg/mouse を経口投与

なぜ LF が  $\beta$  ラクタム系抗生物質の作用を増強するのかについては、未だよくわかっていません。最有力なのは、生体に取り込まれた LF により遊離の鉄イオンがキレートとして取り込まれ、病原菌による利用が制限されるためだろうと思われます。鉄利用が制限されると病原菌はバイオフィームをつくれなくなり、抗生物質に対する感受性が高まると同時に免疫系により排除されやすくなるためでしょう。

#### 4. LF は歯周病を抑制する

これまで LF はオーラルケアの世界ではまったく注目されていませんでした。ところが、驚いたことに今春の歯周病学会で LF 関連の演題が六つも発表されました。特に目を引いたのは、わが国における歯磨きの二大メーカーであるライオン（株）とサンスター（株）による 3 題の発表でした。両社は大学歯学部との共同研究によりラットおよびビーグル犬の実験的歯周病に対し LF が有効であることを明らかにしたのです（表 3）。

表 3. ウシ・LF (b-LF) の実験的な歯周病に対する効果の要約

	材料および方法	結 論
ライオン（株） と東京医科歯 科大歯学部	8 頭のビーグル犬を使用。b-LF をカルボキシ・メチルセルローズ製剤として口腔内に局所適用 <sup>(9)</sup> 。	ウシ・LF はビーグル犬の自然発症歯肉炎に対して濃度依存的に有意な抑制効果を持つ。つまり、LF は局所的に適用しても歯周病を抑制する。
	ヒト歯肉繊維芽細胞に歯周病の病原菌の一つ、 <i>Porphyromonas gingivalis</i> のリポ多糖を作用させた場合の変化 <sup>(10)</sup> 。	b-LF はリポ多糖刺激で低下する matrix-metaloprotein と I 型コラーゲン量を正常レベルに改善する。しかし、b-LF はリポ多糖と細胞のリポ多糖結合蛋白との結合を阻害しない。
サンスター（株）と広島大学	大腸菌由来リポ多糖によるラット歯周組織における破骨細胞の変動、炎症性サイトカインの変動。リポソーム化ウシ・LF を使って実験を行った <sup>(11)</sup> 。	歯周組織でリポソーム化 LF は非リポソーム化 LF より破骨細胞の増加を強く抑制。リポソーム化 LF は、歯周炎の発症、進展・増悪を制御する可能性がある。

LF はもともと細菌のリポ多糖（LPS）と結合して無毒化する性質があり、外因性 LF が自然免疫（innate immunity）を修飾する可能性はつとに指摘されてきました。そのような観点から今回の発表をみると、特別に独創性があるとは云えません。しかし、歯周病は風邪に次いで大きな経済的損失を与える疾患です。そのような疾患を治療・予防できる可能性を示唆したのですから、一定の評価をすべきでしょう。

筆者等のグループも既に本誌にミニレビューを 2 回にわたり連載し、LF が臨床的な歯周病に有効と考えられること、広く歯科臨床家の方々がこの研究に参加され推進するよう呼び掛けてきました。歯周病学会における発表は、これまで筆者が所属するグループが行ってきた研究が正しかったことを裏付ける何よりの証拠です。つまり、LF は局所的に適用しても、リポソーム製剤として経口投与しても有意に歯周病を抑制するのです。さらに、歯周病は虚血性心疾患と低体重児出産に強い相関を示します。筆者は結婚して 6~10 年経過しても子宝に恵まれなかった女性が、腸溶性 LF 製剤を内服して愛児に恵まれた例を幾つか

知っています。これらは、子宮に形成された歯周病菌バイオフィルムが LF により無力化されたためではないかと考えています。

## 5. おわりに

歯周病はバイオフィルムが関与する慢性感染症です。歯周病以外にも慢性化するバイオフィルム感染症は数多く存在し、繰り返し炎症を起こして宿主を痛めつけます。これまでマクロライド系抗生物質が、典型的なバイオフィルム感染症である肺の緑膿菌感染症あるいは副鼻腔炎の治療に使われてきました。しかし、抗生物質は副作用と無縁ではありません。長期投与が難しいことは明らかです。LF が歯周病に有効であるということは、単に歯周病に留まらず全般的なバイオフィルム感染症治療への有用性を示唆しているのです。しかも、LF は長期投与しても副作用とは無縁です。

50 年前、駆け出しの研究者だった筆者は「免疫学のドグマに従えば感染は二度ないはずなのに、慢性感染症はなぜ増悪と寛快を繰り返すのだろうか。抗生物質は日和見病原菌に対し *in vitro* で圧倒的な抗菌活性を示すが、なぜ現場の感染症に対し期待するほどの効果がないのだろう」と常々疑問に思っていました。それに対する回答が得られるようとしています。LF が広くバイオフィルム感染症の治療・予防に使われる日が早く来ることを願って本章の結びといたします。

## 引用文献

- 1) Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;27(4):619-24.
- 2) Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* 2003 Nov;112(9):1300-7.
- 3) Morikawa M. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *J Biosci Bioeng.* 2006 Jan;101(1):1-8.
- 4) Sherman JM. The Gas Production of *Streptococcus Kefir*. *J Bacteriol.* 1921 Jan;6(1):127-31.
- 5) Nicolle LE. Catheter-related urinary tract infection. *Drugs Aging.* 2005; 22(8):627-39.
- 6) Mattila KJ. Dental infections as a risk factor for acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 1993 Dec;14 Suppl K:51-3.
- 7) 澤田直登 ; 未発表
- 8) 安藤邦雄 ; 未発表
- 9) 関谷 大輔、小野 知二、鈴木 苗穂、木川 博光、大寺 基靖、村越 倫明、氏家 高志 : ラクトフェリンのビーグル犬自然発症歯肉炎抑制効果 : C-31, 第 49 回春季日本歯周病学会学術大会

- 10) 鈴木 苗穂, 木川 博光, 小野 知二, 関谷 大輔, 村越 倫明, 川上 明子, 尾川 直樹, 小林 宏明, 福井 朋恵, 大寺 基靖, 氏家 高志, 石川 烈 : ラクトフェリンの歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来 lipopolysaccharide に対する有効性の検討 : P-25, 第 49 回春季日本歯周病学会学術大会
- 11) 山野 栄三, 宮内 睦美, 岡 広子, 坂本 宜也子, 田中 栄二, 石角 篤, 今中 宏真, 水道 裕久, 牧野 武利, 丹根 一夫, 高田 隆 : リポソーム化ラクトフェリン経口投与がリポポリサッカライド誘導歯周組織破壊に及ぼす抑制効果 : P-24, 第 49 回春季日本歯周病学会学術大会