

平成 21 年 12 月 2 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19592198

研究課題名 (和文) マクロライド系抗菌剤がポルフィロモナス ジンジバリスの
バイオフィームに及ぼす影響研究課題名 (英文) Effects of macrolides on *Porphyromonas gingivalis* biofilms

研究代表者

上田 未央 (UEDA MIO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90423136

研究成果の概要 (和文)：

マクロライド系抗生物質であるアジスロマイシン (AZM) とエリスロマイシン (EM) の *Porphyromonas gingivalis* バイオフィームに対する効果を、静置系とフローセル系で作製した 2 種のバイオフィームを用いて他の抗生物質と比較検討した。AZM は最小発育阻止濃度以下 (sub-MIC) で 2 種のバイオフィームを、EM を含めた他の抗菌剤に比べ有意に抑制した。そのメカニズムは殺菌的、すなわち抗菌効果ではなく、バイオフィームの構造やシグナル伝達等に影響したと推察され、AZM の抗バイオフィーム作用によることが示された。

研究成果の概要 (英文)：

The effect of azithromycin (AZM) and erythromycin (EM), which were macrolides, on *Porphyromonas gingivalis* biofilms produced by both static and flow-cell model was evaluated, and was compared with it against other antibiotics. AZM inhibited significantly both two biofilms in comparison with the other medicines at sub-minimum inhibitory concentration. It was guessed that the mechanism influenced three-dimensional structure or the signal transmission in the biofilm, but not was bactericidal namely an antibacterial action. And it was shown that its effect caused by the anti-biofilm action of AZM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,228,693	368,607	1,597,300
総計	4,628,693	1,388,607	6,017,300

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学，歯内療法学，細菌，バイオフィーム，歯周炎

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らのグループは、難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外に、バイオフィームを高頻度に検出し、根尖性歯周炎の難治化に

は根尖孔外バイオフィームが関与していることを世界に先駆け報告した (*J Endodon* 28, 679-683, 2002)。さらに、根尖孔外バイオフィームから、*Porphyromonas gingivalis*,

Fusobacterium nucleatum, *Tanarella forsythensis*等の歯肉縁下バイオフィルムから同定されるグラム陰性偏性嫌気性細菌の他、培養不可能で、未同定な細菌を高頻度に検出し、一部の細菌種について、根尖孔外バイオフィルムにおける局在を明らかにした (*Appl Environ Microbiol* 71, 8738-8745, 2005)。バイオフィルムに対しては、機械的除去がその抑制法の第一選択であるが、根尖孔外のように根管内から除去が困難な部位に形成されたバイオフィルムに対しては主に根尖周囲外科手術が適用されているが、抗菌剤等による化学的コントロールが著効を示せば、極めて有用である。我々のグループは、*in vitro*において *P. gingivalis* のバイオフィルムに対し、浮遊系 *P. gingivalis* に感受性を示す抗菌剤であるミノサイリンとメトロニダゾールは、ほとんど効果を示さないことを報告した (*J Periodontol* 74, 1647-1651, 2003)。バイオフィルムの抗生物質抵抗性の理由としては、1) 菌体外マトリックスの存在による薬剤の透過性の低下、2) バイオフィルム細菌の増殖速度の低下あるいは停止、3) クオラムセンシングによる遺伝子発現の変化、などが推察されている (*Lancet* 358, 135-138, 2001)。

緑膿菌を用いた一連の研究で、細胞間の密度依存的な遺伝子発現を制御するクオラムセンシング関連物質の発現に関与する遺伝子を変異させると、バイオフィルムの厚さや菌体外マトリックスの減少が観察されることから、バイオフィルムの成熟にはクオラムセンシングが関与していることが示された (*Science* 280, 295-298, 1998)。また、緑膿菌のクオラムセンシング関連物質 (ホモセリンラクトン) の発現および産生が、マクロライド系抗菌剤であるアジスロマイシンによって抑制されることが報告された (*Antimicrob Agents Chemother* 45, 1930-1933, 2001)。

根尖孔外バイオフィルムより高頻度に検出された *P. gingivalis* は、緑膿菌と同じグラム陰性細菌であり、アジスロマイシン等のマクロライド系抗菌剤が *P. gingivalis* のクオラムセンシング関連物質の発現を抑制したり、バイオフィルムの形成を阻害あるいは破壊することができるのではないかと考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点について検索することを目的とした。

- (1) 各種 *P. gingivalis* 株バイオフィルムに対するマクロライド系抗菌剤の影響
- (2) 各種抗菌剤が *P. gingivalis* バイオフィルムに及ぼす影響

そして、得られた成果より根尖孔外だけでなく、オーラルバイオフィルムの抑制法として、マクロライド系抗菌剤の全身的あるいは局所

的投与の有用性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株、培地と培養条件

I - IV 型線毛を持つ *Porphyromonas gingivalis* 381 (Type I 線毛保有株), HW24D1 (Type II 線毛保有株), 6/26 (Type III 線毛保有株) および W83 (Type IV 線毛保有株) の 4 株を使用菌株とした。培地には 5 μ g/ml ヘミンと 1 μ g/ml メナジオンを添加した GAM 培地を用い、37°C、嫌気条件 (90%N₂, 5%CO₂, 5%H₂) 下で培養した。

(2) 抗生物質

抗生物質は、15 員環マクロライド系抗生物質のアジスロマイシン (AZM), 14 員環のエリスロマイシン (EM), アンピシリン (ABPC), オフロキサシン (OFX) およびゲンタマイシン (GM) を用いた。

(3) 薬剤感受性試験

96 穴マイクロプレートを用い、*P. gingivalis* 381 株に対する AZM, EM, ABPC, OFX および GM の最小発育阻止濃度 (MIC) を日本化学療法学会標準法に従い測定した。

(4) 抗生物質が静置系 *P. gingivalis* バイオフィルムに与える影響の検索

P. gingivalis の各種菌株を 96 穴マイクロプレートに播種し、37°C、3 日間、嫌気条件下にて培養し底面にバイオフィルムを形成した。その後、各種抗生物質を連続希釈法により最終濃度が 3.9 $\times 10^{-3}$ ~640 μ g/ml となるよう添加し、さらに 3 日間培養した。コントロールには培地のみを添加した。バイオフィルムの定量は 1% クリスタルバイオレットにて染色、エタノールにて溶出後、吸光度をプレートリーダー (Model 680, BIO-RAD, USA) を用い波長 595 nm にて測定した。

(5) 抗生物質がフローセル系 *P. gingivalis* バイオフィルムに及ぼす影響

① バイオフィルムの作製

バイオフィルムの作製は、modified Robbins device (MRD) を用い、唾液処理したハイドロキシアパタイト (HA) ディスクに *P. gingivalis* 381 株の菌液を 14 日間、37°C、嫌気条件下、流速 3.3 ml/分にて灌流し、バイオフィルムを形成した (n=10)。その後、各種抗生物質を 0.125, 1, 10 μ g/ml の濃度で 3 日間添加し、抗生物質がバイオフィルムに与える影響について検索した。フローセル系では抗生物質として AZM, EM および GM を供試し、コントロールは培地のみを灌流した。

② 生物学的検索

バイオフィルムの生物学的検索は、ATP kit (AF-3X2, DKK-TOA 株式会社, 東京) を用い、バイオフィルム細菌の生物発光量を測定することにより行った。MRD にて形成したバイオフィルムサンプルを 1 ml の蒸留水中で超

音波処理 (4°C, 30 分) を行い, バイオフィルム細菌を HA ディスク上から剥離した。その後, メーカー指示に従いサンプルを処理し, 生物発光量を ATP アナライザー (AF-100, DF-10, TOA, 東京) を用いて測定した。

③ 3次元観察

MRD を用い, セルロイドディスク上に形成したバイオフィルムサンプルを Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit を用い室温で 15 分染色後, 共焦点レーザー顕微鏡 (CSLM, LSM 510; Carl Zeiss, Germany) 観察に供した。得られた画像は画像解析ソフト (Imaris®; Bitplane AG, Switzerland) にて画像処理を行った。

④ 統計学的解析

得られた結果は Student's *t* test にて統計処理し, $p < 0.005$ で有意差判定を行った。

(6) マクロライド系抗菌剤が影響を与える遺伝子の同定及びタンパクの発現量に及ぼす効果の検討

P. gingivalis 菌株を MRD にて 14 日間培養し, マクロライド系抗菌剤をさらに 7 日間作用させ, 上清を除去後プレートに付着した細菌を回収し, total RNA を抽出した。クオラムセンシングにより制御されている既知の遺伝子について, 各々の特異的なプライマーを作製し, リアルタイム PCR にて定量し, 抗菌剤の影響を検索した。次に菌体および培養液からタンパク質を精製し, 二次元電気泳動システムを用いて分離後, マクロライド系抗菌剤の添加前後で発現量に差の認められたものについてゲルより切り出し, 抽出し同定を行った。

4. 研究成果

(1) 薬剤感受性試験

4 種の *P. gingivalis* 菌株に対する各種抗生物質 MIC を表 1 に示した。4 菌株の浮遊系菌体細胞は, AZM, EM, OFX には感受性を示したが, 一部の菌株は ABPC と GM には感受性を示さなかった。

表 1 各種抗菌剤の MICs ($\mu\text{g/ml}$)

(抗菌剤)	381	HW24D1	6/26	W83(菌株)
AZM	0.5	0.3	5.0	0.6
EM	0.5	0.16	1.25	0.16
OFX	0.5	0.6	1.25	0.3
ABPC	0.08	2.5	0.08	640
GM	2000	320	10.0	640

(2) 抗生物質が静置系 *P. gingivalis* バイオフィルムに与える影響

結果のまとめを表 2 に示した。AZM と EM は

いずれの *P. gingivalis* 菌株の静置系バイオフィルムに対しても, Sub-MIC 以上で抑制効果を示した。しかし, 他の 3 種の抗生物質 OFX, ABPC, GM は, 抑制効果がないかあるいは MIC 以上でバイオフィルム抑制がみられ, 顕著な抗バイオフィルム作用はみられなかった。

表 2 静置系バイオフィルムに対する各種抗生物質の効果

菌株	sub-MIC以上で抑制効果あり	MIC以上で抑制効果あり	抑制効果なし
381	AZM, EM	ABPC, OFX	GM
HW24D1	AZM, EM	OFX	ABPC, GM
6/26	AZM, EM	ABPC	OFX, GM
W83	AZM, EM	OFX	ABPC, GM

(3) 抗生物質がフローセル系 *P. gingivalis* バイオフィルムに与える影響 ($p < 0.005$)

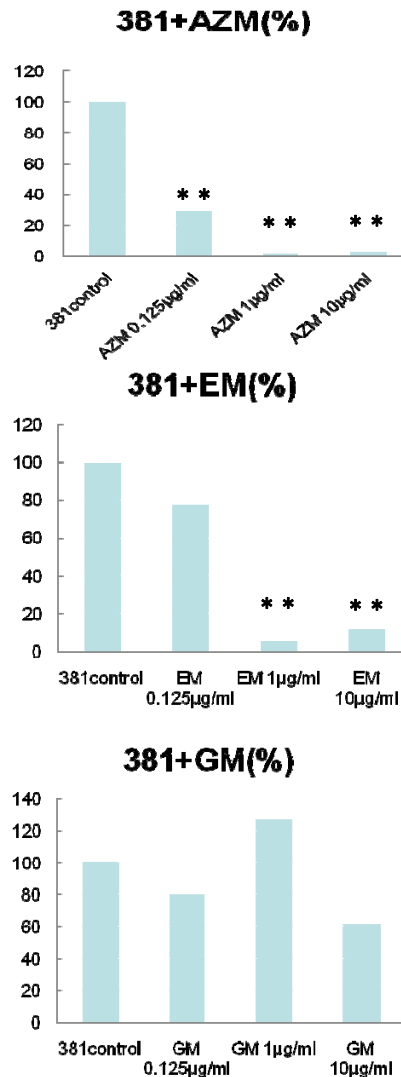


図 1 AZM, EM, GM の静置系 *P. gingivalis* バイオフィルムへの影響

静置系バイオフィルムに対し、効果がみられた AZM と EM, およびほとんど効果がみられなかった GM を用いて本実験を行った。AZM は sub-MIC である $0.125 \mu\text{g/ml}$ においてもフローセル系 *P. gingivalis* バイオフィルムを有意に抑制し、EM と比較してより有用であることが明らかとなった (図 1)。GM は *P. gingivalis* バイオフィルムを抑制しなかった (図 1)。3 次元像においても、AZM は顕著なバイオフィルム抑制効果が確認されたが、 $0.125 \mu\text{g/ml}$ では死菌 (赤色) はほとんど確認されなかった (図 2)。したがって、この抑制作用は殺菌的ではなく、バイオフィルムの構造自体や、シグナル伝達機構等に影響したものと推察された。MIC 以下で臨床応用可能であれば、耐性菌の出現が抑制可能であり、極めて有意義な薬剤としての地位が確立されると考えられる。一方、これら 2 種のマクロライド系薬剤のバイオフィルムに対する作用機序は不明であり、この効果がクオラムセンシング阻害であるか、菌体外マトリックス破壊によるか等、抗バイオフィルム薬としての作用機序を明確にすることが必要である。

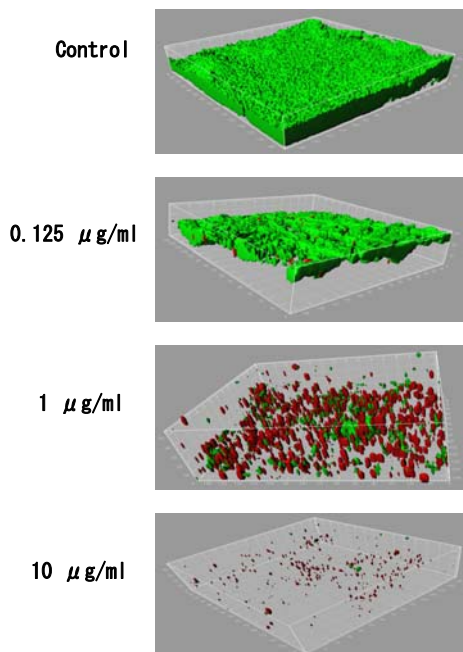


図 2 AZM 作用時の *P. gingivalis* バイオフィルムの 3 次元像

(4) マクロライド系抗菌剤が影響を与える遺伝子の同定及びタンパクの発現量に及ぼす効果の検討

クオラムセンシング制御遺伝子に対するプライマーを作製し、AZM あるいは EM を作用させ *P. gingivalis* バイオフィルム中でのリアルタイム PCR により遺伝子の発現量について定量解析を行っている。研究期間内に発現量に有意差がみられた遺伝子を同定することはできなかったが、継続して検索中であり

マクロライド系薬剤のクオラムセンシングへの作用は近い将来明らかになると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 前菌葉月, 野杵由一郎, 朝日陽子, 山口幹代, 山本れいこ, 薮根敏晃, 上田未央, 恵比須繁之: 各種抗菌剤が *Porphyromonas gingivalis* の形成するバイオフィルムに及ぼす影響. *Bacterial Adherence & Biofilm* 23, 2009, 査読無 in press.
- ② Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Asai H, Suga H, Ebisu S: Effects of N-acetyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodont Res* 44: 2009, 査読有 in press.
- ③ 野杵由一郎: 「口腔バイオフィルム対策」クオラムセンシング阻害による口腔バイオフィルム破壊. *Bacterial Adherence & Biofilms*, 22: 13-18, 2008, 査読無.
- ④ 恵比須繁之, 野杵由一郎: 難治性エンドとバイオフィルム (2) 根尖孔内・外側のバイオフィルムの特徴とその対処法. *歯界展望* 110: 1029-1035, 2007, 査読無.
- ⑤ 恵比須繁之, 野杵由一郎: 難治性エンドとバイオフィルム (1) バイオフィルムは根尖孔内・外に存在! *歯界展望* 110: 854-860, 2007, 査読無.
- ⑥ 野杵由一郎, 野口展生, 朝日陽子, 山口幹代, 恵比須繁之: 各種の *Porphyromonas gingivalis* 菌株が形成するバイオフィルムに対し Azithromycin の影響. *Bacterial Adherence & Biofilms* 20: 104-109, 2007, 査読無.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 前菌葉月, 野杵由一郎, 朝日陽子, 薮根敏晃, 上田未央, 恵比須繁之: 種々の *Porphyromonas gingivalis* 菌株が形成するバイオフィルムに対する抗生物質の影響. 第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2009, 6, 12, 北海道.
- ② Asahi Y, Noiri Y, Igarashi G, Asai H, Suga H, Ebisu S: Homoserine lactone analogs inhibited *Porphyromonas gingivalis* biofilm growth. 87th International Association for Dental Research, 2009, 4, 3, Miami, USA.
- ③ Maezono H, Noiri Y, Ueda M, Noguchi N, Yabune T, Ebisu S: Effects of various antibiotics on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. 86th International Association

for Dental Research, 2008, 7, 5, Toronto, Canada.

- ④ **野杵由一郎**：～口腔バイオフィルムの制御戦略を考える～根尖性歯周炎の難治化とバイオフィルム—その臨床像と対策—。第128回日本歯科保存学会春季学術大会(シンポジウム), 2008, 6, 6, 新潟。
- ⑤ **朝日陽子, 野杵由一郎, 恵比須繁之**, 五十嵐潤, 浅井洋明, 菅裕明: クオラムセンシング関連物質が *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成に及ぼす影響の検索。第128回日本歯科保存学会春季学術大会, 2008, 6, 5, 新潟。
- ⑥ **Noiri Y**: Oral biofilm-The actual state and controls. The 15th World Congress on Dental Traumatology (Symposium), 2008, 1, 14, Nagoya, Japan.
- ⑦ **前薮葉月, 野杵由一郎, 上田未央, 野口展生, 藪根敏晃, 恵比須繁之**: Sub-MIC濃度のアジスロマイシンが *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルムに及ぼす影響。日本歯周病学会50周年記念大会, 2007, 9, 27, 東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 未央 (UEDA MIO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：90423136

(2) 研究分担者

野杵 由一郎 (NOIRI YUICHIRO)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：50218286

恵比須 繁之 (EBISU SHIGEYUKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：50116000

吉武 史郎 (YOSHITAKE FUMIO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：10452450
(期間：交付日～2008年3月31日)

朝日 陽子 (ASAHI YOKO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：50456943
(期間：2008年4月1日～2010年3月31日)

(4) 研究協力者

前薮 葉月 (MAEZONO HAZUKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生

山口幹代 (YAMAGUCHI MIKIYO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：30523089