

自己評価報告書

平成 23 年 3 月 30 日現在

機関番号： 14401
研究種目： 基盤研究（A）
研究期間： 2008～2011
課題番号： 20249076
研究課題名（和文） 難治性根尖性歯周炎に関わるバイオフィルムの遺伝子工学的制御法と科学的診断法の開発
研究課題名（英文） Development of control methods based on genetic engineering and scientific diagnosis against refractory periapical periodontitis-associated biofilm
研究代表者
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

研究代表者の専門分野： 歯科保存学

科研費の分科・細目： 歯学・保存治療系歯学

キーワード： 難治性根尖性歯周炎，根尖孔外，バイオフィルム，感染根管，16SrRNA 遺伝子解析，フローセルモデル，マイクロアレイ法，*Porphyromonas gingivalis*

1. 研究計画の概要

研究代表者らは、難治性根尖性歯周炎の主な原因の一つとして根尖孔外バイオフィルムの存在を発見し、そのバイオフィルムの形成機序に関わる仮説を提唱した。他方で、機械的除去が困難なバイオフィルムに対する化学的抑制法、すなわち抗バイオフィルム作用を有する薬物等に関する開発研究を行ってきた。本研究は、このような背景をもとに以下の2部のプロジェクトから構成されている。

(1) 根管内外と根尖孔外のバイオフィルム細菌の遺伝子をターゲットとして難治性根尖性歯周炎の科学的診断法の開発を目指す。

(2) バイオフィルムの形成阻害・抑制を目的として、遺伝子工学的手法あるいはクオラムセンシング関連物質の阻害剤を用いた化学的抑制法の開発を目的とする。

両プロジェクトは同時並行的に遂行している。

2. 研究の進捗状況

(1) クオラムセンシング関連物質の類似化合物、フラボノイドの一種であるカテキンならびに既存の抗菌物質を用いてバイオフィルムの形成阻害および抑制実験を *in vitro* で行った。そして、いくつかの物質が抗バイオフィルム作用を有することを既に明らかにし、J Periodont Res や Biosci Biotechnol Biochem などの国際雑誌に公表するとともに、国内・外の学会で発表した。さらに、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成に関与する9種の遺伝子をマイクロアレイ法にて同定し、現在その機能を解析中である。

(2) 難治性根尖性歯周炎の科学的診断法の開発については、根尖性歯周炎に罹患している105症例から根尖孔外あるいは根管内バイオフィルム試料を収集し、16SrRNA 遺伝子解析法にてバイオフィルム形成細菌を同定中である。

3. 現在までの達成度

(1) 遺伝子工学的制御法の開発

②概ね順調に進展している。

(理由)*P. gingivallis* のバイオフィルム関連遺伝子に関する研究は、その同定および欠失株の作製を終了し機能を解析中である。また、*in vitro* においてバイオフィルム阻害効果を有するクオラムセンシング関連物質を発見し、総じて順調な進行状況と考えられる。

(2) 科学的診断法の開発 ③やや遅れている。

(理由)16SrRNA 遺伝子解析の際、大腸菌へのトランスフォーメーションに問題が生じて遺伝子の導入効率が上がらず、全試料について再度やり直しを行った。現在、トラブルシューティングは完了している。

4. 今後の研究の推進方策

まずは、難治性根尖性歯周炎の科学的診断法の確立を目指す。すなわち、難治性根尖性歯周炎症例と、通常の根尖性歯周炎症例から得られたバイオフィルム試料の遺伝子解析結果と臨床所見を多重解析ソフトにより分析し、根管内外のバイオフィルム構成細菌に基づいた、根尖孔外バイオフィルムに起因する難治性根尖性歯周炎の科学的診断法を確立する。次いで、得られる診断に従いその治療法として感染根管治療に開発した抗バイオ

フィルム薬を併用するか、あるいは既に高度先進医療として認可された、コーンビームコンピュータ・トモグラフィーと歯科用マイクロスコプを用いた外科的歯内療法を適応し、科学的根拠に基づいて難治性根尖性歯周炎の攻略を目指す。

他方で、バイオフィーム形成に関わる遺伝子の欠損株のその他の病原性に関する評価を行うとともに、その株が複数菌種バイオフィーム形成に及ぼす影響を検討する予定である。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計4件)

- ① Matsunaga T, Nakahara A, Minnatul KM, **Noiri Y**, **Ebisu S**, Kato A, **Azakami H**: The inhibitory effects of catechins on biofilm formation by the periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 2445-2450, 2010 (査読有).
- ② Yamaguchi Y, Sato K, Yukitake H, **Noiri Y**, **Ebisu S**, Nakayama K: Exopolysaccharide accumulation and antimicrobial effect in *Porphyromonas gingivalis* biofilm. *Infect Immun* 78: 3801-3812, 2010 (査読有).
- ③ Asahi Y, **Noiri Y**, Igarashi J, Asai H, Suga H, **Ebisu S**: Effects of N-acetyl homoserin lacton analogs on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodont Res* 45: 255-261, 2010 (査読有).
- ④ **恵比須 繁之**, 山口幹代: 口腔内のメイン感染源ーオーラルバイオフィームー. *医薬ジャーナル* 45: 71-76, 2009 (査読無).

[学会発表] (計9件)

- ① Asahi Y, **Noiri Y**, Igarashi J, Maezono H, **Ebisu S**: Combination chemotherapy using autoinducer-analog and antibiotics for *Fusobacterium nucleatum* biofilm. 89th International Association for Dental Research: 2011, 3, 19, San Diego (USA).
- ② Maezono H, **Noiri Y**, **Ebisu S**: The anti-biofilm effects of macrolide antibiotics on *Porphyromonas gingivalis*. 89th International Association for Dental Research: 2011, 3, 18, San Diego (USA).
- ③ Matsunaga T, Saito Y, Nakahara A, Kato A, **Ebisu S**, **Azakami H**: Effect of genomic recombination in periodontopathogenic bacterium on its lectin-dependent adhesion to epithelial cells.

Pachichem 2010 Conference: 2010, 12, 14, Honolulu (USA).

- ④ Yamaguchi M, **Noiri Y**, Kuboniwa H, Maezono H, Asahi Y, **Ebisu S**: Exopolysaccharide accumulation and antimicrobial effect in *Porphyromonas gingivalis* biofilm. 88th International Association for Dental Research: 2010, 7, 15, Barcelona (Spain).
- ⑤ 山本れいこ, **野杵由一郎**, 山口幹代, 朝日陽子, 前菌葉月, **恵比須 繁之**: フローセル系と静置系の2つのバイオフィームモデルにおける *Porphyromonas gingivalis* の遺伝子発現の経時的変化. 第132回日本歯科保存学会: 2009, 6, 4, 崇城大学市民ホール(熊本).
- ⑥ **阿座上弘行**, **恵比須 繁之**: クオラムセンシングをターゲットとしたバイオフィーム阻害剤の開発. 日本農芸化学会2009年度大会(シンポジウム): 2009, 3, 28, 福岡マリンメッセ(福岡).
- ⑦ **恵比須 繁之**: オーラルバイオフィームの制御を目指して. 第27回日本小児歯科学会近畿地方大会(特別講演): 2008, 10, 19, 大阪大学中ノ島センター(大阪).
- ⑧ **Ebisu S**: Refractory periapical periodontitis and biofilm—essential strategy for treatment of refractory endodontic pathogen. 2008 SINO-JAPANESE CONFERENCE ON STOMATOLOGY (特別講演): 2008, 9, 28, 西安(中国).
- ⑨ **恵比須 繁之**: バイオフィーム感染症の治療法としてのクオラムセンシング阻害戦略. 国際歯周内科学会研究会第6回総会(特別講演): 2008, 4, 20, 福岡県中小企業振興センター(福岡).

[図書] (計1件)

- ① 山口幹代, **恵比須 繁之** (医薬ジャーナル社): 高齢者の肺炎 治療・リハビリテーション・予防: 各論 1-1) 口腔内細菌と誤嚥製肺炎 2011: 61-67.

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

なし