

平成 22 年 3 月 30 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890121  
 研究課題名（和文） ポルフィロモナスジンジバリスのバイオフィルムに対する阻害物質の作用機序の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of mechanisms of substances which inhibit *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation

研究代表者 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

研究成果の概要（和文）：主要な歯周病原性細菌の一種である *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成阻害に効果のある細菌間情報伝達物質（オートインデューサー：AI）の類似化合物が、バイオフィルム形成のいずれの段階で作用するか検索を行った。バイオフィルム形成の経時的観察により、類似化合物はバイオフィルムの成長に作用することが明らかとなった。また、類似化合物は、初期付着や成熟したバイオフィルムには影響を及ぼさないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Inhibitory mechanisms of autoinducer (AI) analogues on *Porphyromonas gingivalis*, a major periodontal pathogen, were investigated. By chronological observation, AI analogues affected on *P. gingivalis* biofilm growth. There were no effects on initial attachment and matured biofilm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,280,000	384,000	1,664,000
2009 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,440,000	732,000	3,172,000

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：ポルフィロモナスジンジバリス, バイオフィルム, クオラムセンシング, 阻害薬  
オートインデューサー, modified Robbins device

## 1. 研究開始当初の背景

バイオフィルムは、宿主防御機構や抗生物質に抵抗性を示す。従って、オーラルバイオフィルム感染症に対する治療法の第一選択は、急性期を除いて、機械的除去が行われている。機械的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、新たな化学的コ

ントロール法が切望されている。

クオラムセンシングは、細菌密度依存性に遺伝子発現を調節する機構である。これは、細菌の産生するオートインデューサー (AI) と呼ばれるシグナル分子を介して起こり、バイオフィルム形成や病原因子の発現などもクオラムセンシングによって調節されてい

る。

医科を初めとして多くの領域で AI 類似化合物によりクオラムセンシングを攪乱し、病原性やバイオフィーム形成を調節することが試みられている。緑膿菌において、AI 類似化合物がバイオフィーム形成を阻害することが報告されている。一方で、歯科領域において AI 類似化合物に着目した研究はない。

申請者は、これまでに新たなバイオフィームの阻害実験としてクオラムセンシングをターゲットとした研究を行った。主要な歯周病原菌であり、難治性根尖性歯周炎に関与している *Porphyromonas gingivalis* バイオフィームに作用させた AI 類似化合物のうち 3 種が *P. gingivalis* のバイオフィーム形成を阻害することを明らかにした。

バイオフィーム形成は、付着・成長・成熟（剥離）の過程を経る。*P. gingivalis* のバイオフィーム形成を阻害した AI 類似化合物については、バイオフィーム形成のどの過程に作用しているのか未解明である。また、AI 類似化合物は緑膿菌のクオラムセンシングを阻害することが解明されているが、これが口腔内細菌のクオラムセンシングおよびクオラムセンシングに制御されている病原因子に及ぼす影響についても不明である。

## 2. 研究の目的

(1) *P. gingivalis* のバイオフィーム形成を阻害した AI 類似化合物がバイオフィーム形成に作用する時期を検索する。

(2) *P. gingivalis* のクオラムセンシングに制御されていることが報告されている病原因子である赤血球凝集能に及ぼす影響を検索する。

以上により、*P. gingivalis* における AI 類似化合物の作用機序を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) AI 類似化合物

本研究に用いた 3 種の AI 類似化合物は、側鎖の炭素数が 6 および 12 のものである (図 1)。

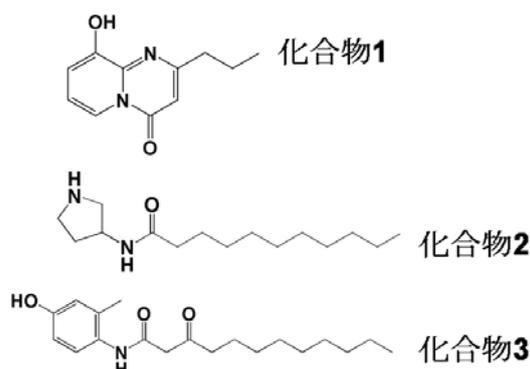


図 1. AI 類似化合物

(2) AI 類似化合物がバイオフィーム形成に作用する時期の検索

### ①バイオフィーム形成の経時的観察

バイオフィーム形成モデルである modified Robbins device (MRD) を用い、AI 類似化合物の作用下で *P. gingivalis* バイオフィームを作製した。経時的に (開始後 1, 3, 5, 7, および 14 日後) バイオフィームサンプルを取り出した。サンプルの一部は吸光度測定に供し、バイオフィーム形成量に及ぼす影響を検討した。他の一部は Live/Dead® Kits にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 3 次元的検索を行うとともにバイオフィーム内の細菌の生・死を解析した。

### ②初期付着に及ぼす影響の観察

*P. gingivalis* 培養液中に AI 類似化合物を添加したものを 96 穴プレートに播種し 30 分培養後、クリスタルバイオレット染色し吸光度測定を行った。同様に、24 穴プレートに細菌細胞および AI 類似化合物を播種し 30 分培養後、洗浄し位相差顕微鏡観察により評価した。

また、*P. gingivalis* は細胞外マトリックスへの付着能を有することが報告されている。細胞外マトリックスである、タイプ I コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチンがコーティングされた 96 穴プレートを用いて、これに菌液および AI 類似化合物を添加し 3 時間培養後、付着細胞をクリスタルバイオレット溶液にて染色を行った。洗浄後、吸光度測定を行い評価した。

### ③成熟したバイオフィームに及ぼす影響の検索

MRD を用い成熟した *P. gingivalis* バイオフィームを作製した。その後、AI 類似化合物を作用させた後、経時的にサンプルを採取し、ATP 活性を測定することにより影響を評価した。

### (3) AI 類似化合物が病原因子に及ぼす影響の検索

ヒツジ赤血球・AI 類似化合物・細菌菌液を 96 穴プレートに播種し、1 時間培養後沈殿の有無を肉眼にて評価し AI 類似化合物が *P. gingivalis* の赤血球凝集能に及ぼす影響を検索した。

## 4. 研究成果

(1) AI 類似化合物がバイオフィーム形成に作用する時期の検索

### ①バイオフィーム形成の経時的観察

吸光度測定の結果、5 日後までは化合物添加群と化合物無添加群 (以下、コントロール群) 間においてバイオフィーム形成量に有意

な差は認められなかった。7日あるいは14日後に化合物添加群はコントロール群と比較して、バイオフィーム形成量が有意に減少した。(図2)

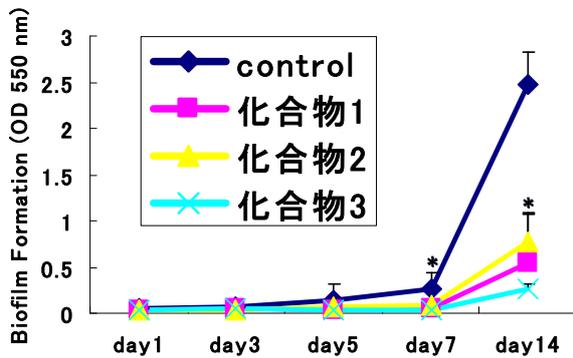


図2. 経時的観察結果

共焦点レーザー顕微鏡観察の結果、5日後までは化合物添加群およびコントロール群のいずれにおいてもマイクロコロニーの形成がみられた。14日後にはコントロール群と比較し、化合物添加群ではバイオフィームの厚みの減少が認められたが、死菌の割合は増加しなかった。(図3に化合物1の結果を示す。上段：7日後，下段：14日後，緑：生菌，赤：死菌)

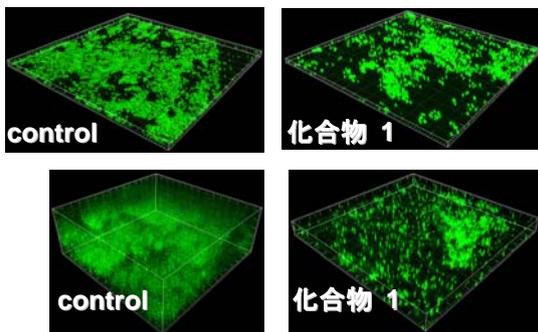


図3. 経時的観察における3次元像

## ②初期付着に及ぼす影響

吸光度測定の結果、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成を抑制した化合物添加群とコントロール群間に有意差は認められなかった

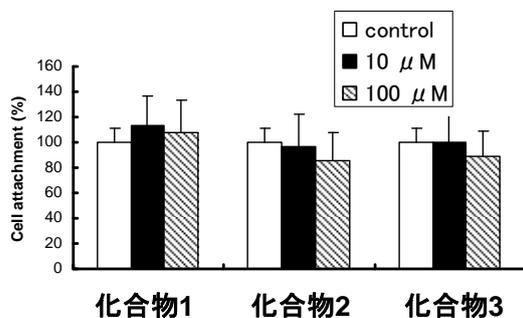


図4. 初期付着に及ぼす影響

た。(図4)

位相差顕微鏡による形態学的観察の結果、化合物添加群およびコントロール群には同程度の *P. gingivalis* 細胞の付着やマイクロコロニーを認めた。

バイオフィーム形成を有意に抑制した3種の化合物添加群とコントロール群との間で、*P. gingivalis* のタイプIコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンへの付着に関して、いずれの濃度においても有意差がみられなかった。

## ③成熟したバイオフィームに及ぼす影響

化合物添加7日および14日経過後において、化合物添加群はコントロール群と比較してバイオフィーム形成量に統計学的有意差はなかった。

以上より今回供試した化合物はバイオフィームの初期付着および成熟したバイオフィームに影響を与えず、バイオフィームの成長期に作用することが示唆された。

また、AI類似化合物はバイオフィームの成長を抑制するものであり、バイオフィームに対して殺菌的に作用するものではないと考えられた。今までの抗バイオフィーム剤は既に形成されたバイオフィームを殺菌することを目的としたものであるが、AI類似化合物はバイオフィームの形成を阻害するという点で、新たなバイオフィーム阻害剤として有用であると考えられる。

## (2) AI類似化合物が病原因子に及ぼす影響の検索

10および100 μMにおいて、供試した化合物添加群とコントロール群との間で赤血球凝集能に有意差は認められなかった。しかし、一部の化合物において100 μM添加群では赤血球の溶血が観察された。

AI類似化合物はバイオフィーム抑制法として有用であるが、臨床応用にあたっては化合物の濃度について検討が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

①Yoko Asahi, Yuichiro Noiri, Jun Igarashi, Hiroaki Asai, Hiroaki Suga, Shigeyuki Ebisu. Effects of *N*-acyl homoserine lactone analogs on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. Journal of Periodontal Research, 査読有, Vol. 45, 2010, 255-261.

②朝日陽子, 野杵由一郎, 恵比須繁之, 五十嵐潤, 朝井洋明, 菅裕明, Quorum sensing シグナル物質の類似化合物が *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす影響の検索, Bacterial Adherence& Biofilm, 査読無, Vol.22, 2009, 109-114.

〔学会発表〕(計4件)

①朝日陽子ら, クオラムセンシング関連物質と抗菌剤の併用が *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす影響, 第131回日本歯科保存学会, 2009年10月29日, 仙台国際センター(宮城県).

②Asahi Y. et al. Homoserine lactone analogs inhibited *Porphyromonas gingivalis* biofilm growth. 87<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2009. 4. 3, Miami, USA.

③朝日陽子ら, Quorum sensing シグナル物質の類似化合物が *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす影響の検索, Bacterial Adherence & Biofilm 第22回学術集会, 2008年7月5日, 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場(兵庫県).

④朝日陽子ら, クオラムセンシング関連物質が *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす影響の検索, 第128回日本歯科保存学会, 2008年6月5日, 朱鷺メッセ(新潟県).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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