

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791833

研究課題名（和文） オートインデューサー類似化合物が難治性根尖性歯周炎関連細菌に及ぼす影響の検策

研究課題名（英文） The effects of autoinducer analog on bacterium related to refractory apical periodontitis.

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）：難治性根尖性歯周炎の一種である *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィー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）の類似化合物と各種抗菌剤の併用が *P. gingivalis* のバイオフィームに及ぼす影響の検索を行った。その結果、併用群でバイオフィーム抑制効果が最も高かった。また、AI 類似化合物が、難治性根尖性歯周炎に関与する *Fusobacterium nucleatum* のバイオフィームに及ぼす影響の検索を行った。*F. nucleatum* においても、バイオフィーム抑制効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：The effects of combined application of an autoinducer analog and antibiotics on *Porphyromonas gingivalis* were investigated. The combined application of the N-acyl HSL analog and antibiotics was effective at reducing the viability of *P. gingivalis* cells in biofilms. The effects of the analog on *Fusobacterium nucleatum* was also investigated. The analog inhibited *F. nucleatum* biofilm formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：歯学, バイオフィーム, 阻害薬, クオラムセンシング, 難治性根尖性歯周炎

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは、宿主防御機構や抗生物質に抵抗性を示す。これは、菌体外マトリックスの存在による薬剤透過性の減少、バイオフィーム細菌の増殖低下、クオラムセンシングによる遺伝子発現の変化によるものと推察されている。難治性根尖性歯周炎に関与する *P. gingivalis* のバイオフィームにおいても抗菌剤が著効しないことが報告されている。従って、オーラルバイオフィーム感染

症に対しては、急性期を除いて、その治療法の第一選択として機械的除去が行われている。難治性根尖性歯周炎の原因と考えられている根尖孔外バイオフィームのように機械的除去が困難な部位に形成されたバイオフィームに対しては、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る。バイオフィーム形成や病原因子の発現などが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 類似化合物を利用して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、歯科領域においては AI 類似化合物に着目した研究はない。

申請者は、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実験を行い、難治性根尖性歯周炎に関与している *P. gingivalis* のバイオフィーム形成が AI 類似化合物によって抑制されることを報告した。そしてその抑制は、バイオフィームの成長期に作用することを明らかとした。

難治性根尖性歯周炎には *P. gingivalis* 以外に複数の細菌種が強く関与していることが報告されている。しかし、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成を抑制した AI 類似化合物が他の難治性根尖性歯周炎関連細菌のバイオフィーム形成に及ぼす影響については不明である。

一方、緑膿菌のバイオフィームはトブラマイシンに感受性を示さないが、AI 類似化合物を作用させたバイオフィームはトブラマイシンに感受性を示すことが報告された。これは AI 類似化合物が緑膿菌バイオフィームの構造に影響を及ぼし、トブラマイシンのバイオフィームへの浸透性が亢進したためと考察されている。申請者が供試した AI 類似化合物を作用させた場合においても、*P. gingivalis* バイオフィームの厚さが減少し立体構造に変化が認められたため、*P. gingivalis* バイオフィームにおいても AI 類似化合物を作用させると抗菌剤の感受性が亢進する可能性がある。

2. 研究の目的

AI 類似化合物が複数菌種の難治性根尖性歯周炎関連細菌に及ぼす影響を以下に挙げるいくつかの点から検討する。

(1) AI 類似化合物が、難治性根尖性歯周炎関連細菌のバイオフィーム形成に及ぼす影響

(2) AI 類似化合物と抗菌剤の併用がバイオフィーム形成に及ぼす影響

これにより、根尖孔外バイオフィームに対する AI 類似化合物の臨床における有用性を検討する。

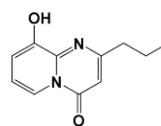
3. 研究の方法

(1) AI 類似化合物

本研究に用いた AI 類似化合物は、側鎖の炭

素数が 6 のものである (図 1)。

図 1. AI 類似化合物



(2) AI 類似化合物が、難治性根尖性歯周炎関連細菌のバイオフィーム形成に及ぼす影響の検索

①定量的解析

バイオフィーム形成モデルである Modified Robbins device (MRD) を用いて嫌気性インキュベーター内でペリスタポンプにて 14 日間、難治性根尖性歯周炎関連細菌である *Fusobacterium nucleatum* の細菌培養液および AI 類似化合物を灌流し、唾液処理をしたハイドロキシアパタイトディスク (HA ディスク) 上にバイオフィームを形成した。その後、バイオフィームを、超音波水槽を用いて剝離し、ATP 量の測定を行いバイオフィームの定量を行った。

②微細形態学的観察

上記①項と同様に形成したバイオフィームサンプルを固定・脱水・凍結置換・蒸着を行った後、走査型電子顕微鏡にて観察した。

③3 次元的検索

共焦点レーザー顕微鏡のレーザー透過性を考慮し、上記(2)-①項の方法にて、HA ディスクの代わりにセルロイドディスクを用い、*F. nucleatum* バイオフィームを形成した。サンプルを Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kits にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィーム内の細菌の生・死を解析することで AI 類似化合物が、バイオフィーム形成に与える影響を評価した。また、共焦点レーザー顕微鏡で得た画像を立体構築ソフト (Imaris) にて処理し、バイオフィームの 3 次元的画像を構築し、AI 類似化合物がバイオフィームの厚みや密度等の立体構造に及ぼす影響について検索を行った。

(3) AI 類似化合物と抗菌剤の併用がバイオフィームに及ぼす影響の検索

①定量的解析

難治性根尖性歯周炎関連細菌である *P. gingivalis*, *F. nucleatum* を用いて、上記(2)-①項に示した MRD 中でそれぞれを加えた培養液を 14 日間灌流し、HA ディスク上にバイオフィームを形成させた。さらに抗菌剤を添加し 3 日間灌流を行い、抗菌剤がバイオフィームに及ぼす影響を検索した。抗菌剤を添加した培地は毎日交換した。抗菌剤としては、オフロキサシン (ニューキノロン系, OFLX), セフロキシム (セフェム系, CXM) およびミ

ノサイクリン（テトラサイクリン系，MINO）を用いた。評価方法としては，ATP 量の測定を行った。

②微細形態学的検索

上記(3)-①項と同様に形成したバイオフィルムサンプルを固定・脱水・凍結置換・蒸着を行った後，走査型電子顕微鏡にて観察し，抗菌剤がバイオフィルムに及ぼす影響を形態学的に評価した。

③ 3 次元的検索

(2)-②項に示した方法と同様にしてセルロイドディスク上にバイオフィルムを形成させた後，共焦点レーザー顕微鏡観察を行い，抗菌剤がバイオフィルムの立体構造に及ぼす影響について検索を行った。

④ AI 類似化合物と抗菌剤の併用がバイオフィルムに及ぼす影響

上記(2)-①項と同様に，実験開始と同時に AI 類似化合物を添加した培養液を 14 日間灌流しバイオフィルムを形成した。その後抗菌剤を 3 日間作用させた。抗菌剤添加開始直前および 3 日後に試料を採取し，試料の一部は ATP 測定による定量解析を行い，他の一部は微細形態学的観察および 3 次元的観察に供した。AI 類似化合物あるいは抗菌剤単独作用群と比較検討することで，AI 類似化合物と抗菌剤の併用がバイオフィルムに及ぼす影響について検討した。

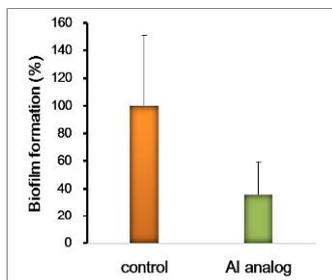
4. 研究成果

(1) AI 類似化合物が，難治性根尖性歯周炎関連細菌のバイオフィルム形成に及ぼす影響の検索

①定量的解析

ATP 測定の結果，*F. nucleatum* バイオフィルムにおいて，AI 類似化合物添加群において対照群と比較し，バイオフィルム形成量の有意な低下が認められた（図 2）。

図 2. AI 類似化合物が *F. nucleatum* バイオフィルムに与える影響の定量的解析結果



②微細形態学的観察結果

走査型電子顕微鏡での観察の結果，対照群と AI 類似化合物添加群において形態学的に大きな違いを認めなかった（図 4 B）。

③ 3 次元的検索

共焦点レーザー顕微鏡観察の結果，対照群と比較し，AI 類似化合物添加群においてバイオフィルムの厚みの減少が認められた。また，両群においてほぼ生菌から成るバイオフィルムが観察された（図 5 B）。

(2) AI 類似化合物と抗菌剤の併用がバイオフィルムに及ぼす影響の検索

①定量的解析結果

P. gingivalis バイオフィルムにおいて，CXM および MINO 添加群では対照群と比較し，有意に ATP 量の低下が認められた。一方，OFLX 添加群では，対照群と比較し ATP 量に有意差を認めなかった（図 3 A）。

F. nucleatum バイオフィルムにおいて，CXM および MINO 添加群で対照群と比較し，ATP 量に有意差を認めなかった（図 3 B）。

②微細形態学的検索結果

P. gingivalis バイオフィルムにおいて，CXM および MINO 添加群では対照群と比較し，マトリックス様構造物の減少が認められた。一方，OFLX 添加群では，対照群と同様にマトリックス様構造物で覆われた像が観察された（図 4 A）。

F. nucleatum バイオフィルムにおいて，対照群，CXM および MINO 添加群のいずれにおいてもマトリックス様構造物は認められなかった。また，細菌の形態に大きな違いはなかった（図 4 B）。

③ 3 次元的検索結果

P. gingivalis バイオフィルムにおいて，CXM および MINO 添加群では対照群と比較し，バイオフィルムの厚みの低下およびバイオフィルム形成範囲の減少がみられた。また，バイオフィルム上層では死菌が観察された。一方，OFLX 添加群では，対照群と同程度の厚みのバイオフィルムが認められた（図 5 A）。

F. nucleatum バイオフィルムにおいて，CXM および MINO 添加群で対照群と比較し，バイオフィルムの厚みに大きな変化は認めなかったが，バイオフィルム上層部に死菌を多く認めた（図 5 B）。

(4) AI 類似化合物と抗菌剤の併用がバイオフィルムに及ぼす影響

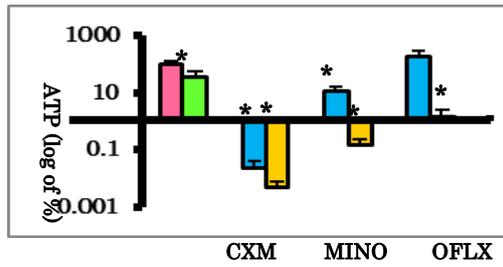
P. gingivalis バイオフィルムで，CXM，MINO および OFLX のいずれの実験群においても，併用群で ATP 量は最少値を示した（ $p < 0.05$ ）（図 3 A）。

走査型電子顕微鏡での微細形態学的観察の結果，併用群ではマトリックス様構造物の減少を認めた（図 4 A）。3 次元的検索の結果，併用群において死菌が多くみられた（図 5 A）。

F. nucleatum バイオフィルムにおいて，CXM および MINO のいずれの実験群においても，

他群と比較し、併用群でATP量は有意に減少した(図3B)。微細形態学的観察の結果、バイオフィーム形成細菌の形態に大きな違いを認めなかった(図4B)。3次元元的検索の結果、併用群において他群と比較し、バイオフィームの厚みの低下がみられた。また、併用群の大部分で死菌が観察された(図5B)。

図3. AI類似化合物と抗菌剤の併用がバイオフィームに及ぼす影響の定量的解析結果
(A) *P. gingivalis* バイオフィーム



ピンク：対照群
緑：類似化合物添加群
青：抗菌剤添加群，黄：併用群

(B) *F. nucleatum* バイオフィーム

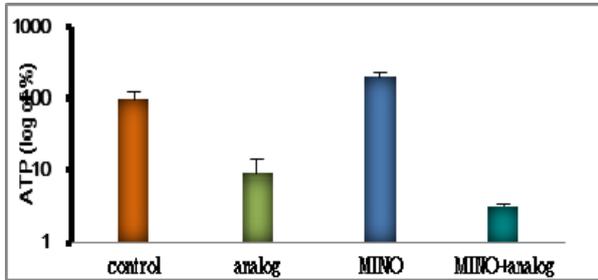
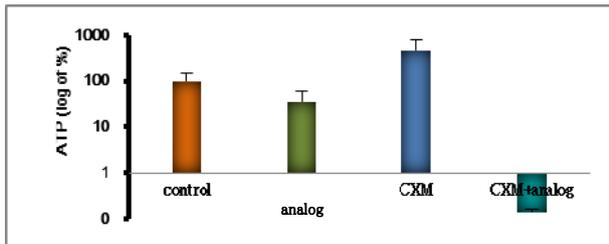
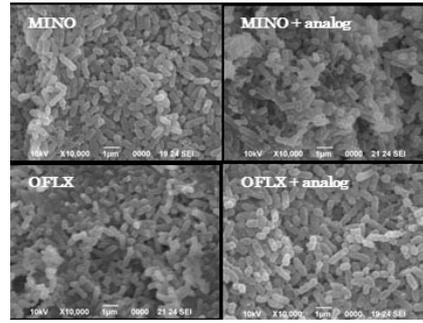
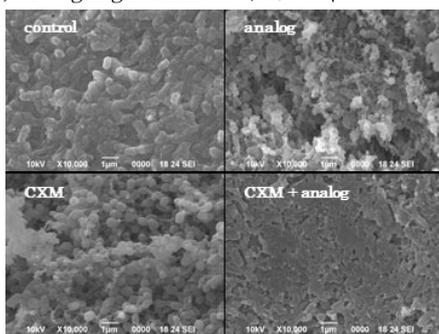


図4. AI類似化合物と抗菌剤の併用がバイオフィームに及ぼす影響の微細形態学的観察結果
(A) *P. gingivalis* バイオフィーム



(B) *F. nucleatum* バイオフィーム

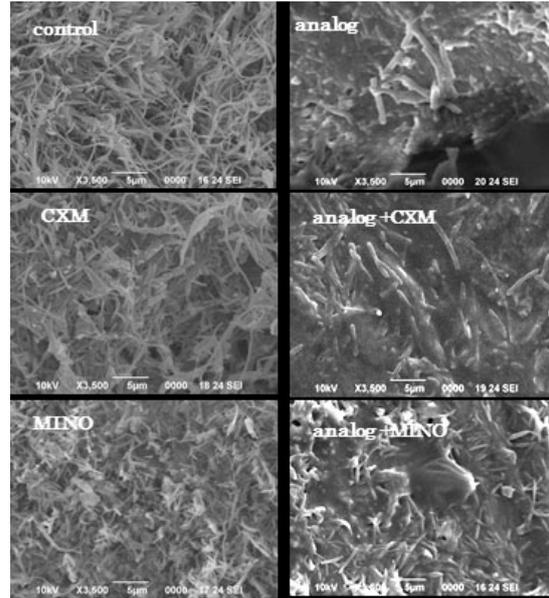
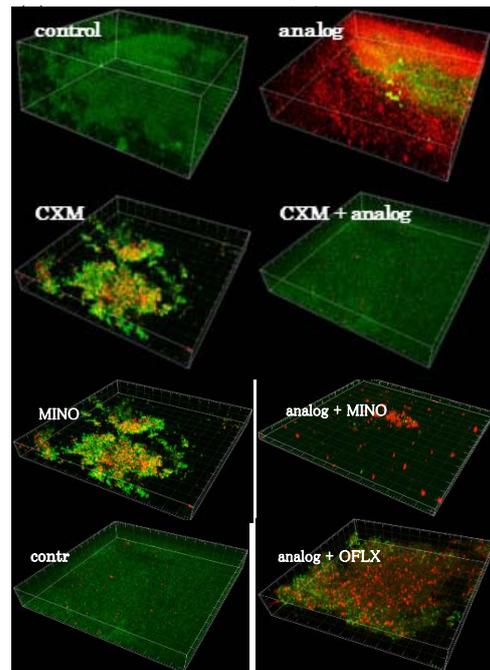
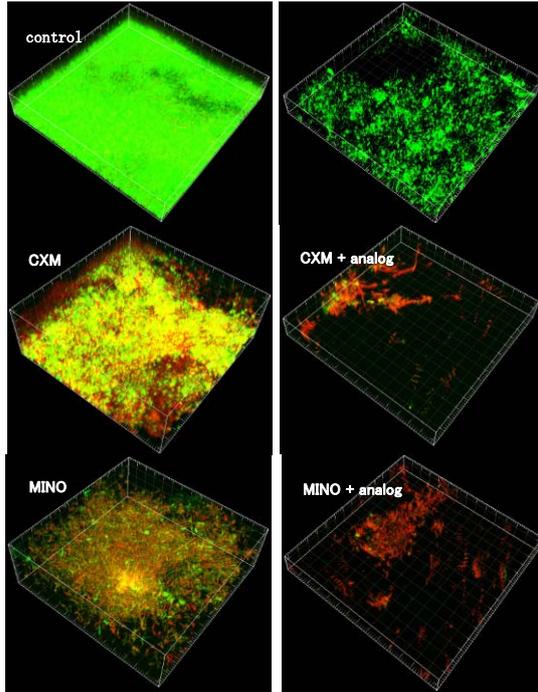


図5. AI類似化合物と抗菌剤の併用がバイオフィームに及ぼす影響の3次元像



(B) *F. nucleatum* バイオフィルム



(赤：死菌，緑：生菌)

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1件)

- ① Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Suga H, Azakami H, Ebisu S. Synergistic effects of antibiotics and an N-acyl homoserine lactone analog on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. J Appl Microbiol. 査読有 112(2). 404-11. 2012.
DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05194.x.

[学会発表] (計3件)

- ① 朝日陽子，野村由一郎，前菌葉月，山本れいこ，山口幹代， 恵比須繁之. Sub-MIC の緑茶カテキンが *Porphyromonas gingivalis* バイオフィルムに及ぼす影響の検索. 第135回日本歯科保存学会. 2011/10/20. 大阪国際交流センター (大阪市) .
- ② Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Maezono H, Ebisu S. Combination chemotherapy using Autoinducer-analog and Antibiotics for *Fusobacterium nucleatum* Biofilm. 89th General Session & Exhibition of the IADR. 2011/3/19. San Diego, USA.
- ③ Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Maezono H, Ebisu S. Combination chemotherapy using Autoinducer-analog and Antibiotics for *Porphyromonas gingivalis* Biofilm. 第58

回 JADR. 2010/11/20. 九州歯科大学 (北九州市) .

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