

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792171

研究課題名（和文）ポルフィロモナス ジンジバリスバイオフィルムの抗菌剤作用後に残存する物質の解析

 研究課題名（英文）Analysis of residual *Porphyromonas gingivalis* biofilms *in vitro* after treatment with antibiotic.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：本研究より、辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎の病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルムに対して有効であると報告されているグルコン酸クロルヘキシジンが、バイオフィルムを形成している個々の菌体を破壊することはできるが、バイオフィルムの構造を破壊することは不可能であり、残存したバイオフィルム内には破壊された菌体から逸出した菌体成分が留まっていることを明らかにした。さらに、残存したバイオフィルムの構造維持には、主にタンパク成分が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study showed that chlorhexidine-gluconate disrupted individual biofilm-forming *Porphyromonas gingivalis* cells, which is a major pathogen in marginal periodontitis and refractory periapical periodontitis, but did not destroy the biofilms, and the constituents derived from disrupted cells were maintained in the biofilm. Moreover, it is suggested that proteins are the major contributors to the integrity of the residual biofilms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学・歯内治療学

キーワード：バイオフィルム、クロルヘキシジン、ポルフィロモナスジンジバリス

1. 研究開始当初の背景

辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎はバイオフィルム感染症であり、抗菌剤に抵抗性を有する。そのため、治療法の第一選択はバイオフィルムの機械的除去である。しかしながら、根尖性歯周炎の難治化の原因と考えられている根尖孔外バイオフィルムなどの機械的除去が困難な部位に形成されるバイオフィルムに対しては、機械的除去に頼らない新たな治療法・抑制法の開発が必要である。

申請者は、*P. gingivalis* ATCC 33277 株のバイオフィルムにグルコン酸クロルヘキシジン (CHX) を作用させた後のバイオフィルム

を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) および走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した結果、バイオフィルム中の DNA は CHX の濃度に依存して減少するが、菌体外マトリックスの主成分と考えられる菌体外多糖はコントロール群と比較して有意な差は認めず (図 1)、バイオフィルムの表層構造にも著明な変化が認められないことから (図 2)、CHX 作用後もバイオフィルムの構造が残存することを明らかにした。

さらに、残存したバイオフィルムは、コントロール群と比較して除去が困難であり、新たな細菌の付着の足場となることが示唆された。

しかしながら、CHX 作用後のバイオフィルムの性状および構成成分の詳細は不明である。

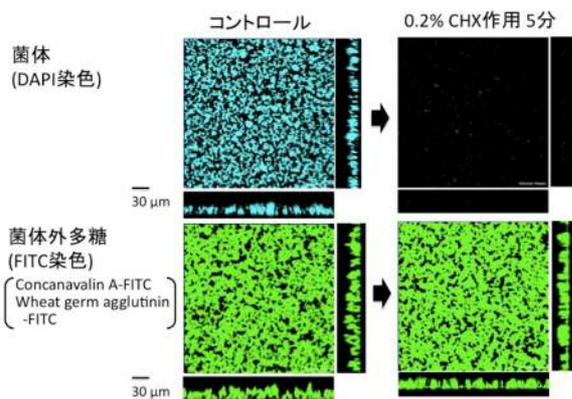


図 1 0.2% CHX 作用後の菌体および菌体外多糖の 3 次元的観察

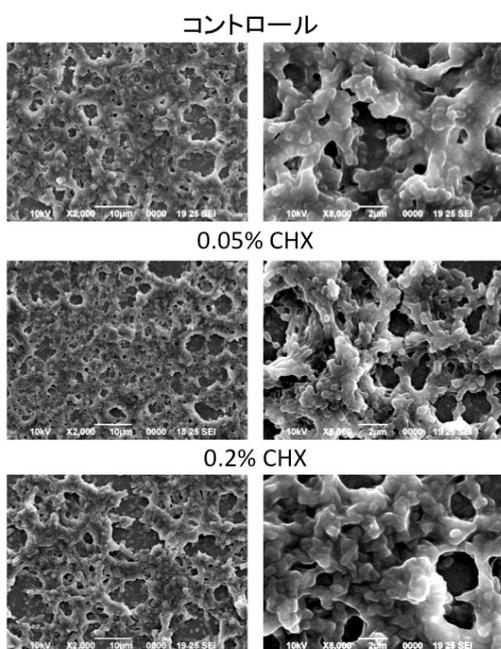


図 2 0.05% および 0.2% CHX 作用後のバイオフィルムの微細形態学的観察

2. 研究の目的

本研究では、*P. gingivalis* のバイオフィルムにおいて、CHX 作用後に残存するバイオフィルムの性状および構成成分を明らかにし、その結果に基づいたバイオフィルムの有効な排除法を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) バイオフィルムの形成および CHX 作用

P. gingivalis ATCC 33277 株を唾液処理を行ったカバーガラスチャンバー内で 37°C、嫌気的条件下にて 24 時間培養し、バイオフィ

ルムを形成した。バイオフィルムを形成した各ウェルを PBS にて洗浄後 0.2% の CHX を 5 分間作用させ、その後、PBS にて 3 回洗浄した。

(2) CHX 作用後に残存したバイオフィルムの透過型電子顕微鏡 (TEM) による超微細形態学的観察

バイオフィルムを 0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝-2.5% グルタルアルデヒド-2% パラホルムアルデヒド (pH7.4) で 30 分間浸漬固定後、上昇エタノール系列 (50-100%) で脱水した。試料をエポキシレジンにて置換後同樹脂にて包埋した。調整した試料より、ウルトラミクロームにて超薄切片を作製し、酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛にて 2 重染色を行い、TEM 下の観察に供した。

(3) CHX 作用後に残存したバイオフィルムの構成成分の検索

① 糖およびタンパク成分の定量

バイオフィルムを回収し、糖成分の濃度についてはアンスロン硫酸法にて、タンパク成分の濃度については、BCA Protein Assay kit® を用いて定量した。

② 糖およびタンパク成分のプロファイリング解析

バイオフィルムを回収し、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法に供した後、糖成分を Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Gel Stain Kit® にて、タンパク成分を SYPRO Ruby Protein Gel Stain Kit® にて染色し、比較検討した。

(4) CHX 作用後のバイオフィルムの各成分の分解による構造維持への影響の検索

糖成分については、ジオールの開裂により糖を分解する薬剤である過ヨウ素酸ナトリウムを、タンパク成分については、Proteinase K® を、DNA 成分については DNase I® を CHX 作用後のバイオフィルムにそれぞれ、1 時間作用させ、550 nm (OD₅₅₀) で吸光度を測定した。

(5) 統計学的有意差の検定

すべての定量的解析において、Student *t*-test を用いた。

4. 研究成果

(1) TEM 観察

CHX 作用群では、空胞化した菌体や菌体外へ溢出した菌体内容物が観察された (図 3)。また、ベシクル様構造物がコントロール群と比較して多数観察された (図 3)。

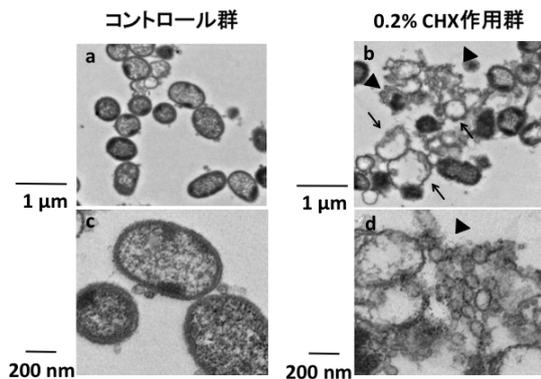


図3 CHX作用後の超微細形態学的観察

(2) 糖およびタンパク成分の定量

タンパク成分および糖成分の量は、CHX作用群とコントロール群との間に有意な差は認められなかった(図4)。

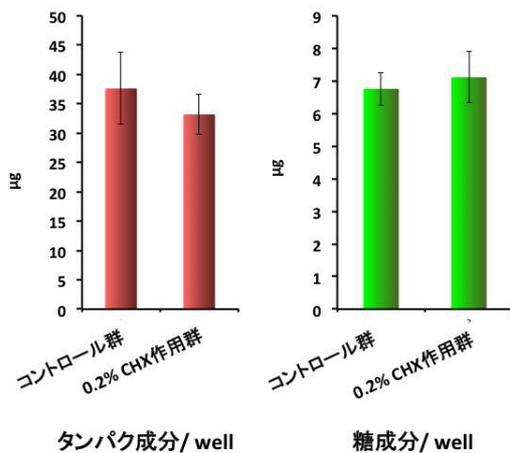


図4 糖およびタンパク成分の定量

(3) 糖およびタンパク成分のプロファイリング解析

タンパク成分および糖成分のプロファイルは、CHX作用群とコントロール群との間に顕著な相違は認められなかった(図5)。

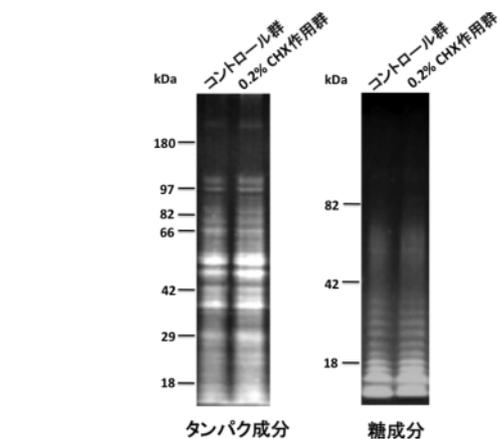


図5 糖およびタンパクのプロファイリング解析

(4) 各成分の分解による構造維持への影響の検索

過ヨウ素酸ナトリウム、ProteinaseK®ならびにDNase I®は、いずれもコントロール群と比較して有為にCHX作用後に残存したバイオフィルムを除去した(p<0.05, Student t-test)が、ProteinaseK®が最も除去効果が高かった(図6)。

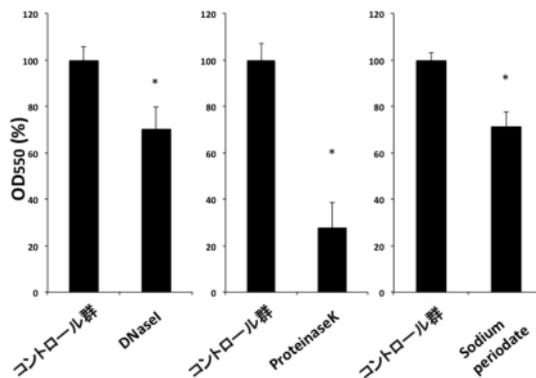


図6 各成分の分解による構造維持への影響

これらの結果より、CHX作用後のバイオフィルムでは、菌体が死滅し、破壊した後もバイオフィルムの構造が維持されることが明らかになった。さらに、破壊された菌体から逸出したタンパク成分や糖成分はバイオフィルム内に留まり、バイオフィルム再形成の足場や起炎物質となることが示唆された。また、残存したバイオフィルムの構造維持には主にタンパク成分が関与していることが明らかとなった。

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4件)

1. Mikiyo Yamaguchi, Yuichiro Noiri, Masae Kuboniwa, Reiko Yamamoto, Yoko Asahi, Hazuki Maezono, Mikako Hayashi, Shigeyuki Ebisu, *Porphyromonas gingivalis* biofilms persist after chlorhexidine treatment. European Journal of Oral Sciences. 121:162-168, 2013. 査読有
2. 山口幹代, 野杵由一郎, 根尖孔外バイオフィームと根尖性歯周炎の難治化. 日本歯科評論 72:41-50, 2012. 査読無
3. 山口幹代, 野杵由一郎, 久保庭雅恵, 山本れいこ, 前菌葉月, 朝日陽子, 呉本勝隆, 恵比須繁之. *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィームに対するクロルヘキシジンの影響. Bacterial Adherence & Biofilm 25:53-58, 2011. 査読無
4. 野杵由一郎, 山口幹代, 林美加子, 恵比須繁之. 根管治療を再考するーその成功と失敗の鍵ー. 日歯内療誌 32:87-96, 2011. 査読無

[学会発表] (計3件)

1. 山口幹代, *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成におけるプロテアーゼの役割. 第136回日本歯科保存学会, 2012. 6. 28, 沖縄コンベンションセンター(沖縄)
2. Yamaguchi Mikiyo, Remnant matrix of *Porphyromonas gingivalis* biofilms treated with chlorhexidine. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011. 9. 9, 札幌コンベンションセンター(札幌)
3. 山口幹代, *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィームに対するクロルヘキシジンの影響, 第25回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会, 2011. 7. 8, 東京慈恵会医科大学(東京)

[図書] (計1件)

1. 山口幹代, 野杵由一郎. ヒョーロン・パブリッシャーズ. 根尖病変 治療に向けた戦略を究める. 41-47, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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