

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792020

研究課題名(和文)新規 *in situ* バイオフィームモデルにおけるエピガロカテキンガレートの影響研究課題名(英文) The effects of epigallocatechin gallate on dental biofilm within a *in situ* biofilm model

研究代表者

朝日 陽子 (Asahi, Yoko)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：50456943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：複数菌種から成るデンタルバイオフィームを再現する *in situ* バイオフィームモデルを新規に作製し、形成されたデンタルバイオフィームの経時的な変化を検討した。バイオフィーム形成後、細菌数は24時間まで対数増殖を示し、その後、4日まで緩やかな増加を示した。また、抗菌作用を有するエピガロカテキンガレート(EGCg)が、口腔細菌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、EGCgがバイオフィームの抑制および形成阻害効果を有することが明らかとなったが、その作用機序は異なるものであると示唆された。

研究成果の概要(英文)：The new *in situ* biofilm model which can form the dental biofilm comprised of multiple bacterial species was made, and chronological changes of the dental biofilm were investigated. The bacterial count showed logarithmic growth till 24 hours after biofilm formation, and showed the gradual increase till 4 days. Moreover, the effects of epigallocatechin gallate (EGCg), which has an antibacterial activity, on oral bacterial biofilm were investigated. Significant decrease of ATP levels of bacteria was seen in EGCg-treated preformed biofilm. The inhibitory effect of EGCg on biofilm formation was also observed. It was suggested that the prevention mechanism of EGCg on biofilm formation differed from preformed biofilm inhibitory mechanism.

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：バイオフィーム エピガロカテキンガレート *in situ* バイオフィームモデル 歯肉縁上バイオフィーム

## 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。従って、オーラルバイオフィーム感染症に対して、治療法的第一選択は機械的除去であるが、除去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必要である。

申請者は、新たなバイオフィーム阻害実験として細菌の遺伝子発現調節機構であるクオラムセンシング(QS)をターゲットとした実験を行い、*Porphyromonas gingivalis*のバイオフィーム形成がQS関連物質によって抑制されることを報告した。

近年、大腸菌において、緑茶カテキンの主要成分であるエピガロカテキンガレート(EGCg)がQSを阻害することが報告された。また、いくつかの細菌種においてEGCgによるバイオフィームの形成阻害や破壊が報告されている。

一方、デンタルバイオフィームは500種類以上の細菌から構成されており、バイオフィーム感染症に対する化学的コントロール法を確立するためには、主要病原細菌に対する効果だけでなく、実際の環境を模した複数菌種バイオフィームモデルを用いた検討が有用である。

## 2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では、複数菌種から成るデンタルバイオフィームを再現する*in vivo*バイオフィームモデルを新規に作製し、デンタルバイオフィーム形成についての詳細な検討を行うとともに、EGCgがデンタルバイオフィームに及ぼす効果を解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)デンタルバイオフィーム形成の経時的観察

#### *in vivo*バイオフィーム形成

申請者らが開発した口腔内バイオフィーム形成装置(ナイトガードの材料を用いて作製)を用いて、バイオフィーム形成を行った。装置の頬側に付与したポケットにハイドロキシアパタイトディスク(HAディスク)を挿入し、HAディスク上にデンタルバイオフィームを形成させた。なお、装置については研究協力者である町博之に作製を依頼した。なお、実験開始1週間前に被験者の全顎的スケーリングを行い、実験期間中はブラッシングおよび飲食時以外は口腔内装置の装着を行った。装置のポケットより経時的にバイオフィームサンプルを取り出し、以下の定量的解析、形態学的観察および定性的解析を行った。

#### 定量的観察

装置のポケットより経時的に取り出したバイオフィームサンプルを、超音波水槽を用いて剥離後、DNA抽出を行った。その後、

universal primer (5'-TCCTACGGGAGGCAGCAT-3', 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3')およびprobe(5'-FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-TAMRA-3')を用いてreal-time PCRを行い、バイオフィーム形成細菌数の経時的变化を評価した。

#### 微細形態学的観察

バイオフィームサンプルの固定・脱水・t-ブチルアルコールを用いた凍結置換・白金蒸着を行った後、走査型電子顕微鏡観察に供し、形成されたバイオフィームを形態学的に評価した。

### (2)EGCgがデンタルバイオフィームに及ぼす影響

#### 形成されたバイオフィームに及ぼす影響の検索

96穴ポリスチレンマイクロプレートに*Porphyromonas gingivalis*の細菌培養液を播種後、24時間培養し、バイオフィームを形成した。その後、0-5g/lのEGCgを添加し、さらに24時間培養した後、ATP量の測定を行い、バイオフィーム細菌の定量を行った。また、同様にして作製したバイオフィームサンプルの一部を、固定・脱水・凍結置換・蒸着し、走査型電子顕微鏡にて観察し、他の一部は固定・脱水・エポキシレジンにて包埋した後、透過型電子顕微鏡観察に供した。一方、ポリスチレンプレートの代わりにガラスベースディッシュを用いて同様に作製したバイオフィームサンプルを、Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kitsにて染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、バイオフィーム細菌の生・死を解析することで、EGCgがバイオフィームに与える影響を評価した。また、共焦点レーザー顕微鏡観察で得られ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、EGCg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。

#### バイオフィーム形成に及ぼす影響の検索

96穴ポリスチレンマイクロプレートあるいはガラスベースディッシュに*P. gingivalis*の細菌培養液及びEGCg(0-100mg/l)を播種、48時間培養しバイオフィームを形成した。その後、上記と同様の方法でATP測定および3次元解析を行った。

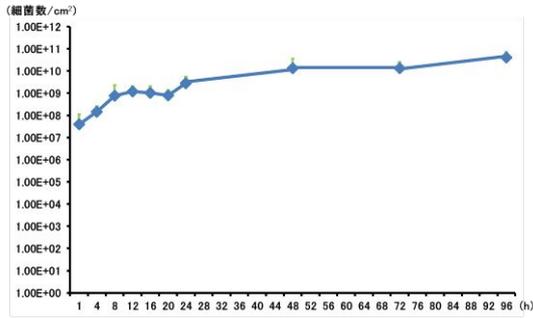
## 4. 研究成果

### (1)デンタルバイオフィーム形成の経時的観察

#### 定量的観察

Real-time PCRの結果、バイオフィーム形成後、細菌数は24時間まで対数増殖を示しその後、緩やかに増加した(図1)。

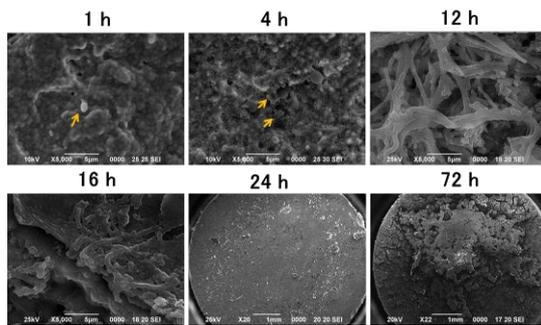
図1. *in vivo*バイオフィーム形成細菌数の経時的变化



### 微細形態学的観察

電子顕微鏡観察において、バイオフィーム形成 1 時間後に球菌の付着、4 時間後に球菌によるマイクロコロニーの形成、12 時間後には様々な大きさの球菌、桿菌、および線状菌からなるバイオフィームが観察された。16 時間後には、マトリックスに被覆されたバイオフィームが観察され、その後バイオフィーム形成領域の増加が認められた (図 2)。

図 2 . *in vivo* バイオフィームの経時的な微細形態学的観察結果

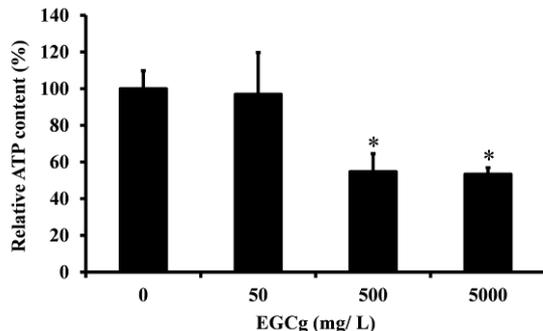


### (2) EGCg がデンタルバイオフィームに及ぼす影響

形成されたバイオフィームに及ぼす影響の検索

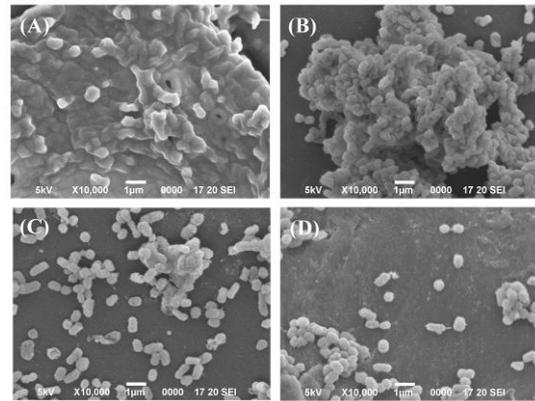
*P. gingivalis* バイオフィームにおいて、500 mg/l および 5g/l EGCg 作用群では対照群と比較し、有意に ATP 量の低下が認められた (図 3)。

図 3 . EGCg が *P. gingivalis* バイオフィームに与える影響の定量的解析結果



走査型電子顕微鏡観察において、対照群ではマトリックスに覆われたバイオフィームが観察されたのに対し、500 mg/l および 5g/l EGCg 作用群では、バイオフィーム細菌が散在している部位が認められた (図 4)。

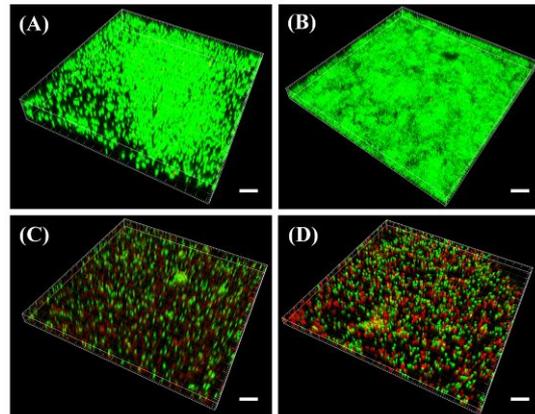
図 4 . EGCg が *P. gingivalis* バイオフィームに与える影響の走査型電子顕微鏡観察結果



(A)対照群 (B)50mg/l (C)500 mg/l (D) 5 g/l EGCg 添加群

また、共焦点レーザー顕微鏡観察より、500 mg/l および 5g/l EGCg 作用群では、対照群と比較し、バイオフィーム形成範囲の減少や死菌の割合の増加がみられた (図 5)。

図 5 . EGCg が *P. gingivalis* バイオフィーム

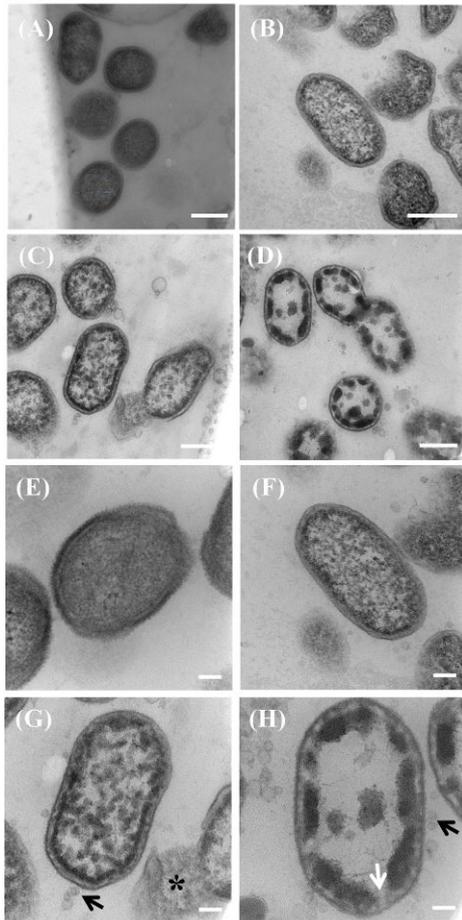


に与える影響の 3 次元像

(A)対照群 (B)50mg/l (C)500 mg/l (D) 5 g/l EGCg 添加群

さらに、透過型電子顕微鏡観察において、500 mg/l および 5g/l EGCg 作用群では、細胞膜の損傷、細胞質の変性および内容物の流出が顕著に認められた (図 6)。

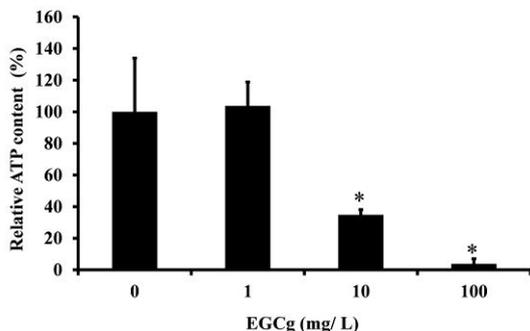
図 6 . EGCg が *P. gingivalis* バイオフィームに与える影響の透過型電子顕微鏡観察結果



弱拡大像：(A) 対照群 (B) 50mg/l (C) 500 mg/l (D) 5 g/l EGCg 添加群  
 強拡大像：(E) 対照群 (F) 50mg/l (G) 500 mg/l (H) 5 g/l EGCg 添加群  
 細胞膜の損傷（白矢印）により内容物の流出（\*）が認められた。  
 また、ベシクル（黒矢印）の産生が顕著である。

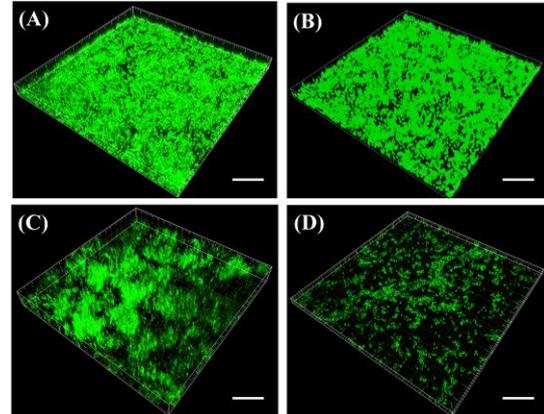
バイオフィーム形成に及ぼす影響の検索  
 EGCg が、*P. gingivalis* バイオフィーム形成に及ぼす影響の定量的解析結果を図7に示す。最小発育阻止濃度未満の濃度（sub-MIC）である 10 mg/l および 100 mg/l EGCg 作用群では対照群と比較し、有意に ATP 量の低下が認められた。

図7 . EGCg が *P. gingivalis* バイオフィーム形成に及ぼす影響の定量的解析結果



また、共焦点レーザー顕微鏡観察の結果、10 mg/l および 100 mg/l EGCg 作用群では、対照群と比較し、バイオフィーム形成範囲の減少が認められた（図8）。

図8 . EGCg が *P. gingivalis* バイオフィーム形成に及ぼす影響の3次元像



高濃度 EGCg 作用群において細胞膜損傷が認められたが、sub-MIC EGCg 作用群では細胞膜損傷は認められなかったことから、EGCg のバイオフィーム形成抑制と形成されたバイオフィームへの作用機序は異なるものであると示唆された。

## 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 5 件)

Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, Azakami H, Hayashi M, Ebisu S, Effects of the tea catechin Epigallocatechin Gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms, J Appl Microbiol, 査読有, 2014, 116(5), 1164-71.  
 DOI:10.1111/jam.12458.

Yamaguchi M, Noiri Y, Kuboniwa M, Yamamoto R, Asahi Y, Maezono H, Hayashi M, Ebisu S, *Porphyromonas gingivalis* biofilms persist after chlorhexidine treatment, Eur J Oral Sci, 査読有, 2013, 121, 162-8.  
 DOI: 10.1111/eos.12050.

Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Kuboniwa M, Hayashi M, Ebisu S, The sinR ortholog PGN\_0088 encodes a transcriptional regulator that inhibits polysaccharide synthesis in *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 biofilms, PLoS One, 査読有, 2013, 8(2), e56017.  
 DOI: 10.1371/journal.pone.0056017.

高橋雄介, 吉岡靖介, 朝日陽子, 永山智崇, 野村由一郎, 林 美加子. う蝕象牙

質除去後の残存細菌に Er: YAG レーザーが与える影響 .日歯保存誌 ,査読有 ,2013, 56(1), 1-8.

山本れいこ, 野杵由一郎, 山口幹代, 朝日陽子, 前園葉月, 呉本勝隆, 林美加子, 恵比須繁之 . *Porphyromonas gingivalis* の PGN\_0088 遺伝子の役割解析 バイオフィルム形成とマクロライド系抗生物質の抗バイオフィルム作用について - .

Bacterial Adherence & Biofilm, 査読無, 2012, 26, 65-71.

[学会発表](計 8 件)

朝日陽子, 栗木菜々子, 三浦治郎, 町博之, 野杵由一郎, 林 美加子, 恵比須繁之, デンタルバイオフィルム形成に関する in situ 解析 ~ 微細形態学的観察 ~, 第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2013 年 10 月 18 日, 秋田市

栗木菜々子, 朝日陽子, 永井真澄, 町博之, 野杵 由一郎, 林美加子, 恵比須繁之, デンタルバイオフィルム形成に関する in situ 解析 ~ 定量的 3 次元的検索 ~, 第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2013 年 10 月 18 日, 秋田市

山本 れいこ, 野杵 由一郎, 山口 幹代, 朝日 陽子, 前園 葉月, 林 美加子, 恵比須 繁之, *Porphyromonas gingivalis* の PGN\_0088 遺伝子はバイオフィルム形成に関与する, 第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2013 年 10 月 18 日, 秋田市

Asahi Y, Noiri Y, Maezono H, Yamaguchi M, Sakiyama R, Hayashi M, Ebisu S, Effects of sub-MIC green tea catechin on *Porphyromonas gingivalis* biofilm, 91th General Session & Exhibition of the IADR, 2013/3/22, Seattle, USA

Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Hayashi M, Ebisu S. Azithromycin alters protein expressions in *Porphyromonas gingivalis* biofilm-detached cells, 60th JADR, 2012 年 12 月 15 日, 新潟市

朝日陽子, 野杵由一郎, 五十嵐 潤, 前園葉月, 山口幹代, 山本れいこ, 林 美加子, 恵比須繁之, クオラムセンシング関連物質と抗菌剤の併用が *Fusobacterium nucleatum* のバイオフィルム形成に及ぼす影響, バイオフィルムと複合系研究会, 2012 年 10 月 13 日, 土浦市

山本 れいこ, 野杵 由一郎, 山口 幹代, 朝日 陽子, 前園 葉月, 呉本 勝隆, 林 美加子, 恵比須 繁之, *Porphyromonas gingivalis* の PGN\_0088 遺伝子の役割解析 - バイオフィルム形成とマクロライド系抗生物質の抗バイオフィルム作用について - , 第 26 回 Bacterial Adherence & Biofilm 2012 年 7 月 13 日,

大阪市

吉岡 靖介, 野杵 由一郎, 高橋 雄介, 藪根 敏晃, 朝日 陽子, 永山 智崇, 古谷 優, 栗本 絵里子, 北川 蘭奈, 武田 侑子, 大嶋 淳, 山本 由美子, 住岡 龍一, 永井 真澄, 板東 秀典, 林 美加子, 軟化象牙質除去後の残存細菌に対して Er:YAG レーザーが与える影響, 第 136 回日本歯科保存学会, 2012 年 6 月 29 日, 宜野湾市

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・助教

研究者番号: 50456943