

平成21年 4月24日現在

研究種目：基盤研究 (B)	
研究期間：2006~2008	
課題番号：18390505	
研究課題名 (和文)	根尖性歯周炎を難治化・慢性化する根尖孔外バイオフィルムの抑制法の開発
研究課題名 (英文)	Development of inhibitory agents against extraradicular biofilm associated with chronic and refractory periapical periodontitis
研究代表者	
	野村 由一郎 (NOIRI YUICHIRO)
	大阪大学・歯学部附属病院・講師
	研究者番号：50218286

研究成果の概要：

本研究課題では根尖孔外バイオフィルムに対する抑制法の開発に関する研究を行った。そして、Er:YAG レーザーは根尖孔外バイオフィルムの形成抑制に応用可能であること、根尖孔外バイオフィルム中に生息する *Porphyromonas gingivalis* の PGN1251 の遺伝子発現が根尖病巣局所の病態形成と密接に関連していることを明らかにし、この発現を制御することは根尖孔外バイオフィルムの抑制を図るための緒となると考察した。

この研究成果は、難治性根尖性歯周炎における根尖孔外バイオフィルムの抑制法の新たな開発に向けて有用な示唆を与えるものであると自負している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

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，歯内療法学，細菌，バイオフィルム，歯周炎

1. 研究開始当初の背景

オーラルバイオフィルム感染症に対しては、急性期を除いて、その治療法・予防法の第1選択としてバイオフィルムの機械的除去が行われている。研究代表者らは、ヒトのオーラルバイオフィルムを検索する中で、根尖性歯周炎の難治化には根尖孔外バイオフィルムが関与し(*J Endodon* 28, 2002)、根尖孔外バ

イオフィルムからは *Porphyromonas gingivalis* などのグラム陰性細菌種とならんで培養不可能な未同定の細菌種が高頻度で検出されること(*Appl Environ Microbiol* 71, 2005)、*in vitro*ではバイオフィルムを形成する細菌種により歯科用レーザーの効果が異なること(日歯保存誌 47(秋季特別号):33, 2004)、*P. gingivalis*バイオフィルムの菌体

外マトリックス形成に関与する遺伝子 (*Infect Immun* 72, 2004), さらに塩酸ミノサイクリンは *P. gingivalis* バイオフィルムの菌体外マトリックスを破壊できず抗菌効果を示さないこと (*J Periodontol* 74, 2003) を明らかにした。

これら一連の研究から、根尖孔外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、従来とはコンセプトを異にする予防法・治療法の開発の必要性を痛感した。一方で、既に築き上げた申請者らの研究成果は、将来的に臨床応用が期待されるバイオフィルムの抑制法の緒となるもので、更に追究することにより、バイオフィルム形成を制御・排除する薬剤や技術の開発に展開できると予想された。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点について検索することを目的とした。

- (1) 難治性あるいは慢性根尖性歯周炎罹患歯に対する、歯科用 Er:YAG レーザーの効果
- (2) 各種のプラーク細菌が形成するバイオフィルムに対する Er:YAG レーザーの影響
- (3) バイオフィルムの菌体外マトリックス形成に関与する遺伝子 (PGN1251) を欠失した変異株が形成するバイオフィルムの検索
- (4) 根尖孔外バイオフィルム中の培養不可能な未同定細菌の遺伝子工学的解析

3. 研究の方法

- (1) 難治性あるいは慢性根尖性歯周炎罹患歯に対する、Er:YAG レーザーの効果

難治性根尖性歯周炎と診断された歯のうち、可及的にストレートでレーザーが根管深部に照射可能な42根管を検索対象とした。白色象牙質が検出されたファイル号数より2号上のサイズまで根管拡大を行った。最終拡大したファイルにて根尖部象牙質削片を採取し、細菌学的検索に供した。Er:YAG レーザーを可及的に根管深部に挿入して照射 (60 mJ, 10 pps, 15 s) した後、最終拡大に用いたファイルより1サイズ上のファイルにて根尖後部より象牙質削片を採取し同一の細菌学的検索に供した。経過不良の歯については、歯根尖切除術や抜歯の適応とし、外科処置の際に得られるバイオフィルムは、蛍光顕微鏡にて観察し細菌の生・死を検索した。

- (2) プラーク細菌が形成するバイオフィルムに対する Er:YAG レーザーの影響

供試細菌として、*Enterococcus faecalis*,

Streptococcus mutans, *Actinomyces viscosus*, *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. gingivalis*, *Prevotella nigrescens* を使用した。ハイドロキシアパタイト (HA) ディスク上に、直径 2 mm の穴を開けた粘着シールを貼付し、modified Robbins device (MRD) を用いて HA ディスク上に単一細菌種バイオフィルムを形成した。Er:YAG レーザー (波長 2,936 nm) は、出力を 20, 40 あるいは 80 mJ (10 pps, 10 s) (各 n=10) に設定し、焦点距離 3 mm で使用した。

照射群と非照射群の HA ディスクを取り出し、規定した範囲内のバイオフィルムを採取し、細菌培養法にてそれぞれの細菌種の生菌数を定量・定性分析した。統計学的有意差の検定には、Student's t-test (p<0.05) を用いた。

- (3) バイオフィルム関連遺伝子 (PGN1251) を欠失した変異株の機能解析

P. gingivalis ATCC 33277 株 (野生株) のバイオフィルム形成、すなわち菌体外マトリックス形成や己凝集能などに関与すると推察される遺伝子 PGN1251 の役割を解析するため、PGN1251 変異株のバイオフィルム形成能を、ATCC33277 株 (野生株) と比較検討した。嫌気性インキュベーター内でペリスタポンプにて 14 日間細菌培養液を灌流し、改良型 MRD 内の HA ディスク上にバイオフィルムを形成した後、超音波処理によりバイオフィルムを剥離し、マルチラベルカウンターや分光光度計にて定量解析した。バイオフィルムの 3 次元検索は、上記方法で、14 日間かけて作製したバイオフィルムを Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits L7007[®]にて染色後、共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察した。一方、プロテアーゼならびに LPS の発現量は、純培養した変異株と野生株を用いて、ウェスタンブロット法にて検索し、比較検討した。

- (4) 根尖孔外バイオフィルム中の培養不可能な未同定細菌の遺伝子工学的解析

難治性根尖性歯周炎と診断された症例を対象として、患者に十分な説明を行い同意が得られた方を対象として以下の実験を行った。歯根尖部歯牙断片や抜去歯、あるいは X 根尖病巣部に逸出した過剰根管充填材 (ガッタパーチャポイント) を採取した。対照試料として、根管バイオフィルムを採取した。バイオフィルムを剥離し、細菌由来のゲノム DNA を抽出する。DNA を増幅した後サーマルサイクラーにより PCR 法を行い、根尖部細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅する。PCR 産物は、大腸菌への形質転換を行い、プラスミドライブラリーを作製した。シークエンサーによりそれぞれのインサートの塩基配列を決定し配列解析ソフトにより系統樹を作成する。培

養不可能な未同定細菌の全ゲノム配列を決定し、DNA量により細菌を定量する。

4. 研究成果

(1) 難治性あるいは慢性根尖性歯周炎罹患歯に対する、Er:YAGレーザーの効果

レーザー照射群 42 試料において、照射前には 15 試料から細菌が同定されたが、照射後は 9 試料から細菌は検出されなかった。照射前・後の両試料からは、レンサ球菌やブドウ球菌などのグラム陽性細菌種が細菌培養法により同定された。照射前に細菌が検出されなかった 27 試料中 24 試料においては照射後も、細菌が検出されなかった。非照射のコントロール群では、拡大終了時 18 試料中 9 試料から細菌が検出されたが、さらに 1 号大きなサイズのファイルで採取した際は、9 試料中 6 試料からは細菌が検出されなかった。細菌定量の結果、照射前に細菌が検出され、測定が可能であった 3 試料の平均生菌数は、188.7 CFU で、12 試料は検出限界以下であった。レーザー照射後も細菌が検出された 6 試料のうち、5 試料は検出限界以下で残り 1 試料は 10 CFU であった。

レーザー照射前に採取した 5 試料中、3 試料からは、生菌と死菌が検出された。照射後は、生菌が検出された 3 試料中 1 試料から生菌が観察されたが、この試料から死菌は観察されず、残り 2 試料は死菌のみが観察された。図 1 A は、根管拡大終了時（レーザー照射前）に採取した試料の染色像で、緑色に染色された生細菌と、赤色の死菌（矢印）が観察された。図 1 B は、レーザー照射後の試料の染色像で、緑色の生菌は観察されず、象牙質削片の塊の中には赤色の死菌がみられた。

根管内に残存したバイオフィームおよび細菌に対する Er:YAG レーザー照射は、臨床的に有用であることが示唆された。

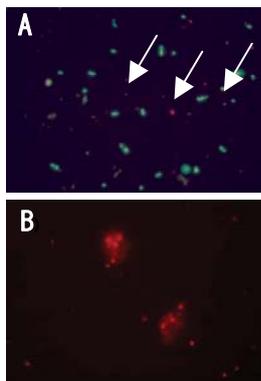


図 1 Er:YAG レーザー照射前・後の試料の蛍光染色像

(2) 各種のプラーク細菌が形成するバイオフィームに対する Er:YAG レーザーの影響

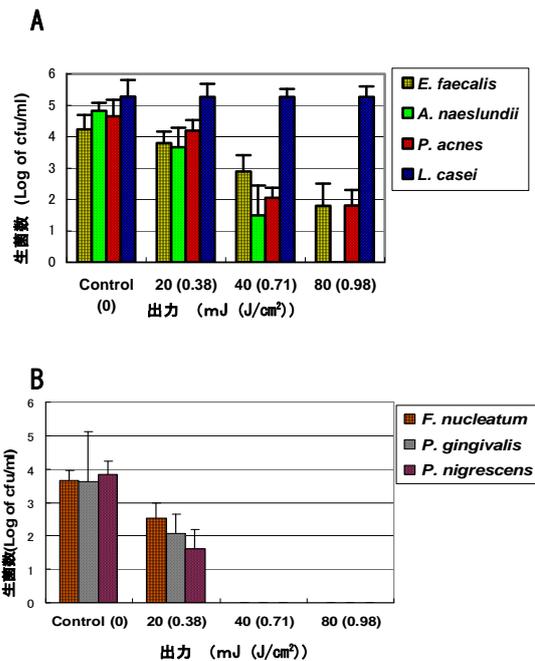


図 2 Er:YAG レーザーのバイオフィームへの影響

照射したレーザーの出力(mJ)と、生菌数(cfu/ml)との関係をグラム陽性細菌については図 2 A に、グラム陰性細菌は図 2 B に示した。*E. faecalis*と *P. acnes* の生菌数は、コントロール群と 20 mJ 照射群では有意な差はみられなかったが、コントロール群に比べ 40 および 80 mJ は有意に低下した ($p < 0.05$)。*A. viscosus*と *S. mutans* は、コントロール群に対し全ての照射群で有意差を認めた ($p < 0.05$)。一方、*P. gingivalis* の生菌数は、20 mJ 照射群ではコントロール群と比較して有意な差はみられなかったが、*F. nucleatum*と *P. nigrescens* においては有意に減少した ($p < 0.05$)。また、すべてのグラム陰性細菌種において、40 および 80 mJ 照射群では完全にバイオフィーム細菌は抑制された。*L. casei* バイオフィームは、いずれの照射エネルギーでも、影響を受けなかったが、これは *L. casei* の産出する乳酸によって HA ディスク表層が約 20 μm 程度脱灰され、脱灰層内に形成されたバイオフィームにレーザーが到達しなかったことが原因であった。

以上より、40 mJ (0.71 J/cm²) 以上の Er:YAG レーザー照射は多くのデンタルバイオフィーム構成細菌種に有用であることが示唆された。

(3) バイオフィーム関連遺伝子 (PGN1251) を欠失した変異株の特徴、バイオフィーム形成能および毒素産生能

P. gingivalis のバイオフィーム形成、特に菌体外マトリックス形成に関与すると推察されている遺伝子、PGN1251 の変異株 (KDP360 株) および相補株 (KDP361 株) を *P.*

gingivalis ATCC 33277 株(野生株)を用いて改良型 MRD にて作製し, PGN1251 の変異が自己凝集能, 赤血球凝集能, プロテアーゼ(ジンジパイン)活性, リポ多糖(LPS)と陰イオン性多糖(APS)の発現, ならびにバイオフィーム形成能について検索した。KDP360 株は野生株に比べて, 自己凝集能の亢進, 赤血球凝集能の欠損, ジンジパイン活性の低下, LPS の O 抗原と APS の欠損がみられた。一方, 相補株である KDP361 株では, それらは野生株と比べて有意な差はなかった。これらの結果より, PGN1251 が LPS の O 抗原や APS の発現ならびにジンジパインの活性化に必須の遺伝子であることが示唆された。また, KDP360 株のバイオフィーム形成量は野生株と比較して有意に増加しており, その厚みは共焦点レーザー顕微鏡下で約 2 倍であった。微細形態学的には, KDP360 株の菌体表層のマトリックス構造は, 野生株とは異なり粘液様のマトリックス構造物が観察された(図 3)。グリコシルトランスフェラーゼのモチーフを持つ PGN1251 は, 本菌のバイオフィーム形成においてマトリックス合成に関与していることが明らかとなった。バイオフィーム形成は大別すると, 付着, 成長, 成熟, 剥離の 4 つの過程から構成される。KDP360 株においては, 自己凝集能が亢進していたことを合わせて考察すると, PGN1251 遺伝子は *P. gingivalis* バイオフィームの成長~成熟過程で作用し, バイオフィーム形成には抑制的に作用すると考えられる。これらの成果は, PGN1251 遺伝子を用いたバイオフィーム形成阻害薬の開発に向け, 礎となる有用な知見である。

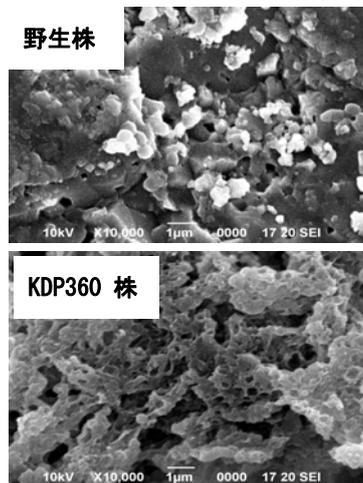


図 3 KDP360 株と野生株のバイオフィーム像

(4) 根尖孔外バイオフィーム中の培養不可な未同定細菌の遺伝子工学的解析

数症例のバイオフィームサンプルより, 16S rRNA 遺伝子を増幅し, プラスミドライブラリーを作製した。現在, 追加した試料のプラスミドライブラリーを作製し, 既に作成し

たライブラリーとともに, シークエンシングを行い, 未同定細菌の解析を続行中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Asahi Y, **Noiri Y**, Igarashi J, Asai H, Suga H, **Ebisu S**: Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodont Res*, 2009 in press.
2. **野杵由一郎**:「口腔バイオフィーム対策」クオラムセンシング阻害による口腔バイオフィーム破壊. *Bacterial Adherence & Biofilms*, 22: 2009, 査読無, 印刷中.
4. **阿座上弘行**, 久本達格, 赤壁善彦, 松永哲郎, 加藤昭夫, **野杵由一郎**, **恵比須繁之**: 歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサーがバイオフィーム形成に関与する. *Bacterial Adherence & Biofilms*, 22: 2009, 査読無, 印刷中.
4. **Noiri Y**, Katsumoto T, **Azakami H**, **Ebisu S**: Effects of Er:YAG laser irradiation on biofilm-forming bacteria associated with endodontic pathogens. *J Endodontics*, 34: 826-829, 2008, 査読有.
5. 山口幹代, **野杵由一郎**, **恵比須繁之**, 佐藤啓子, 吉村文信: *Porphyromonas gingivalis* の *gtfA* 遺伝子が Lys-gingipain の発現に及ぼす影響. *Bacterial Adherence & Biofilms*, 21: 75-80, 2008, 査読無.
6. **恵比須繁之**, **野杵由一郎**: 難治性エンドとバイオフィーム(2) 根尖孔内・外側のバイオフィームの特徴とその対処法. *歯界展望*, 110: 1029-1035, 2007, 査読無.
7. **恵比須繁之**, **野杵由一郎**: 難治性エンドとバイオフィーム(1) バイオフィームは根尖孔内・外に存在! *歯界展望*, 110: 854-860, 2007, 査読無.
8. **野杵由一郎**: 根尖性および辺縁性歯周炎に関連するバイオフィームの実態とその抑制法. *日歯科保誌*, 50: 648-650, 2007, 査読有.
9. **恵比須繁之**, **野杵由一郎**: 特集 歯科と骨粗鬆症—骨代謝と歯科医学の融合点— オーラルバイオフィームと骨吸収. *CLINICAL CALCIUM*, 17: 179-184, 2007. 査読有.
10. **野杵由一郎**, **野口展生**, 朝日陽子, 山口幹代, **恵比須繁之**: 各種の *Porphyromonas gingivalis* 菌株が形成するバイオフィームに対し Azithromycin の影響. *Bacterial Adherence & Biofilms*, 20: 104-109, 2007, 査読無.
11. **Azakami H**, Teramura I, Matsunaga T, Akimichi H, **Noiri Y**, **Ebisu S**, Kato A: Characterization of autoinducer 2 signal

- in *Eikenella corrodens* and its role in biofilm formation. *J Biosci and Bioeng*, 102: 110-117, 2006, 査読有.
12. Azakami H, Nakashima H, Akimichi H, Noiri Y, Ebisu S, Kato A: Involvement of N-Acetyl-D-galactosamine-specific lectin in biofilm formation by the periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, 441-446, 2006, 査読有.
 13. 野杵由一郎, 川上克子, 勝本哲史, 野口展生, 朝日陽子, 山口幹代, 恵比須繁之: Er:YAG レーザーが根尖部の感染根管に残留細菌に及ぼす影響. *日歯科保誌*, 49: 537-544, 2006, 査読有.
 14. 恵比須繁之, 野杵由一郎, 特集 歯科および口腔内の感染症の診断と治療 1. 口腔のバイオフィーム, *化学療法の領域*, 22: 545-551, 2006, 査読無.
- [学会発表] (計 17 件)
1. 野杵由一郎: 「歯周炎症の局所・全身への影響とその対策」 歯周病関連細菌の棲み家デンタルバイオフィーム. 臨床歯周病学会第2回 関西支部例会(シンポジウム), 2008, 11, 30, 大阪.
 2. 蕨根敏晃, 野杵由一郎, 林 美帆, 田中章平, 伊藤宗倫, 吉岡靖介, 恵比須繁之: 感染歯質除去後の象牙質内残留細菌に対し Er:YAG レーザーを用いた修復処置. 第129回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2008, 11, 7, 富山.
 3. Maezono H, Noiri Y, Ueda M, Noguchi N, Yabune T, Ebisu S: Effects of various antibiotics on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. 86th International Association for Dental Research, 2008, 7, 5, Toronto, Canada.
 4. 野杵由一郎: ~口腔バイオフィームの制御戦略を考える~根尖性歯周炎の難治化とバイオフィーム—その臨床像と対策—. 第128回日本歯科保存学会春季学術大会(シンポジウム), 2008, 6, 6, 新潟.
 5. 朝日陽子, 野杵由一郎, 恵比須繁之, 五十嵐 潤, 浅井洋明, 菅 裕明: 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春季学術大会, 2008, 6, 5, 新潟.
 6. 山口幹代, 佐藤啓子, 野杵由一郎, 雪竹栄治, 恵比須繁之, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* の病原因子ジジパインの発現に関連する遺伝子の解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3, 26, 京都.
 7. Noiri Y: Oral biofilm-The actual state and controls. The 15th World Congress on Dental Traumatology (Symposium), 2008, 1, 14, Nagoya, Japan.
 8. 山口幹代, 野杵由一郎, 恵比須繁之: 根尖孔外バイオフィーム構成細菌, *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成に関連する遺伝子 (*gtfA*) の役割解析. 第127回日本歯科保存学会秋季学会, 2007, 11, 8, 岡山.
 9. 前歯葉月, 野杵由一郎, 上田未央, 野口展生, 蕨根敏晃, 恵比須繁之: Sub-MIC濃度のアジスロマイシンが *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィームに及ぼす影響. 日本歯周病学会50周年記念大会, 2007, 9, 27, 東京.
 10. 田中章平, 野杵由一郎, 伊藤宗倫, 林 美帆, 吉岡靖介, 恵比須繁之: Er:YAG レーザーがう蝕病巣深部の残留細菌に及ぼす影響. 第10回 Er:YAG レーザー臨床研究会, 2007, 7, 28, 京都.
 11. Azakami H, Matsunaga T, Katsumoto T, Noiri Y, Kato A, Ebisu S: Type 2 quorum sensing in *Eikenella corrodens* and relationship with biofilm formation. Gordon Research Conference, 2007, 7, 23, Newport, USA.
 12. 勝本哲史, 野杵由一郎, 阿座上弘行, 朝日陽子, 恵比須繁之: *Eikenella corrodens* のオートインデューサー-2分子がバイオフィーム形成に及ぼす影響. 第126回日本歯科保存学会春季学術大会, 2007, 6, 7, 埼玉.
 13. 野口展生, 野杵由一郎, 山口幹代, 恵比須繁之: 各種の *Porphyromonas gingivalis* バイオフィームに対するアジスロマイシンの影響. 第49回日本歯周病学会秋季学術大会, 2006, 10, 21, 大阪.
 14. 朝日陽子, 野杵由一郎, 恵比須繁之, 五十嵐 順, 笹岡三千雄, 菅 裕明: クオラムセンシング関連物質の *Porphyromonas gingivalis* バイオフィームに対する抑制効果の検討. 第124回日本歯科保存学会春季学術大会, 2006, 11, 10, 鹿児島.
 15. Asahi Y, Noiri Y, Ebisu S, Igarashi J, Sasaoka M, Suga H: Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation by synthetic autoinducer analogs. The 85th International Association for Dental Research, March 23, 2007, New Orleans, USA.
 16. Yamaguchi M, Noiri Y, Asahi Y, Ebisu S: Putative glycosyltransferase gene regulates Lys-gingipain (Kgp) in *Porphyromonas gingivalis*. The 85th International Association for Dental Research, March 23, 2006, New Orleans, USA.
 17. 勝本哲史, 野杵由一郎, 川上克子, 野口展生, 朝日陽子, 恵比須繁之: 種々の口腔

細菌を用いて形成したバイオフィルムに対する Er:YAG レーザーの影響. 第 124 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2006, 5, 26, 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野杵 由一郎 (NOIRI YUICHIRO)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 50218286

(2) 研究分担者

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

阿座上 弘行 (AZAKAMI HIROYUKI)
山口大学・農学部・准教授
研究者番号: 40263850

野口 展生 (NOGUCHI NOBUO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号: 80423143

(期間: 交付日~2007年3月31日)

藪根 敏晃 (YABUNE TOSHIAKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 90423144

(期間: 2007年4月1日~2009年3月31日)

(3) 研究協力者

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

山口 幹代 (YAMAGUCHI MIKIYO)
大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生
(期間: 2008年4月1日~2009年3月31日)