

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 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20249076

研究課題名（和文）難治性根尖性歯周炎に関わるバイオフィルムの遺伝子工学的制御法と科学的診断法の開発

研究課題名（英文）Development of control methods based on genetic engineering and scientific diagnosis against refractory periapical periodontitis-associated biofilm

研究代表者

恵比須 繁之 (EBISU SHIGEYUKI)

大阪大学・大学院歯学研究科・理事・副学長

研究者番号：50116000

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、根管内と根尖孔外のバイオフィルム構成細菌の遺伝子解析による同定結果と臨床症状の相関性を追究し、難治性根尖性歯周炎の科学的（細菌学的）診断法の開発を目指すとともに、細菌のバイオフィルム関連遺伝子に基づいた制御法やクオラムセンシング関連物質の阻害剤や抗菌剤等を用いた化学的抑制法の開発を目的として遂行した。

その結果、根尖孔外バイオフィルムの形成には特定細菌種が高頻度に関わり、いくつかの臨床症状と相関していることが明らかとなった。また、抗バイオフィルム作用を示すクオラムセンシング関連物質の阻害剤や抗菌剤およびバイオフィルム形成に関連する遺伝子を発見し、これらによる化学的あるいは遺伝子的バイオフィルム抑制法の臨床適用に向けた緒を築いた。この研究成果は、難治性根尖性歯周炎の新たな治療戦略の確立に有用な示唆を与えるものであると自負している。

研究成果の概要（英文）：We focused the biofilm-forming bacteria in the infected root canal and out of the apical foramen, and aimed at the development of the microbiological diagnostic method of refractory periapical periodontitis. The other purpose was the development of the anti-biofilm drugs possessed inhibition of biofilm growth and suppression of preexisting biofilm ability using the biofilm-related gene or the drug associated with the quorum sensing inhibitor and anti-microbial agent.

The specific bacterial species were frequently associated with the extraradicular biofilm formation, and they relate to some clinical symptoms. In addition, we have discovered the biofilm-associated gene, and the conventional antibiotics or the quorum sensing related material indicating the anti-biofilm action. And we built up the basis for the clinical application of the chemical and genetic biofilm control methods.

I take pride in these results of the research giving the suggestion that is useful for the establishment of a new treatment strategy of refractory periapical periodontitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2009年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2010年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
総計	36,200,000	10,860,000	47,060,000

研究分野：歯科保存学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学，細菌，バイオフィルム，難治性根尖性歯周炎，感染根管，遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

代表者らはこれまでの一連の研究から、難治性根尖性歯周炎の主な原因のひとつとして根尖孔外バイオフィームの存在を発見し、根尖孔外バイオフィームの実態解明を行うとともに、形成機序に関わる仮説を提唱した。しかし、根尖孔外バイオフィームの存在を確認する臨床診断基準は確立されていない。一方で、機械的除去が困難な細菌バイオフィームに対する化学的抑制法の開発研究を志し、バイオフィーム形成に関わる菌体外マトリックス形成遺伝子のクローニングやクオラムセンシング関連物質の阻害化合物の開発研究を行ってきた。そして、新しい概念に則った化学療法剤や遺伝子工学的手法を用いた抑制法の可能性を示唆してきた。

2. 研究の目的

難治性根尖性歯周炎症例を含む感染根管歯を対象として、根管内および根尖孔外バイオフィーム試料を、16S rRNA 遺伝子解析法とインバーダーPCR 法により分析し、各試料群を多重解析することにより、難治性根尖性歯周炎の診断基準を確立する。また、並行して、バイオフィーム形成に関連する遺伝子をマイクロアレイ法にて検索し、発現遺伝子をプロファイリングした後、得られた欠損株・相補株を用いてバイオフィームの形成阻害効果を検討することにより、バイオフィーム抑制活性の高い化学物質を見出すこと、さらに抗バイオフィーム作用を有する新規の化学的コントロール法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 難治性根尖性歯周炎の科学的診断法の開発

① バイオフィーム試料の採集

大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認(H20-E11)の後、本学歯学部附属病院保存科を受診し慢性根尖性歯周炎罹患歯を有する外来患者と、難治性根尖性歯周炎罹患歯として近隣より紹介された外来患者を対象とし、同意が得られた患者を対象として、患歯の診査を行い臨床症状に関する診査データを収集した。外科的歯内療法や抜歯が選択される症例から歯根部断片や抜去歯の根尖孔外バイオフィーム試料を、感染根管歯から根管バイオフィーム試料を採取し一部は凍結保存し以下の実験に供した。

② 感染根管関連バイオフィーム構成細菌の遺伝子工学的解析

バイオフィームを剥離し、細菌由来のゲノムDNAを抽出し、DNAを増幅した後PCR法を

行い、根尖部細菌の16S rRNA 遺伝子を増幅した。PCR産物は形質転換し、プラスミドライブラリーを作製後、シーケンサー(外注委託)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細菌を同定した。

(2) バイオフィーム形成に関連する遺伝子とバイオフィーム形成阻害物質の検索

① マイクロアレイによるバイオフィーム形成過程での発現遺伝子のプロファイリング

難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外バイオフィームより高頻度に検出される *Porphyromonas gingivalis* の33277株を、バイオフィームモデルに供試した。経時的な遺伝子発現の相違を検索するため、3, 6, 9, 14日目に試料を取り出した。得られたバイオフィームより細菌由来total RNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。得られた遺伝子群について、既知の遺伝子との相関性を解析し、選択した遺伝子をリアルタイムPCR法と2次元電気泳動法を用いてアレイの結果と比較検討し、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成に必須の遺伝子を決定した。

② 選定した遺伝子(PGN_0088)の欠損株・相補株の作製

PGN_0088 遺伝子の上流および下流領域をPCRにて増幅し、上流・下流域間にエリスロマイシンカセットを挿入して、エレクトロポレーション法により親株に導入後、ゲノムとの相同組換えの結果生じる欠損株をエリスロマイシン耐性により選択した。選定した遺伝子を増幅後シャトルベクターにクローニングし、これを欠損株に conjugation 法にて導入することで欠損遺伝子の相補株を作製した。

③ PGN_0088 の欠損がバイオフィーム形成に及ぼす影響

野性株、PGN_0088 の欠損株(ODP001)、ならびにその相補株(ODP002)を用いて、上記(2)の①項と同一の方法でバイオフィームを形成し、得られたバイオフィームを走査型電子顕微鏡(SEM)や共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)で観察するとともに、構成糖の定量解析を行った。

(3) クオラムセンシング(QS)関連物質や各種抗菌剤の抗バイオフィーム作用の検討

P. gingivalis の遺伝子型がI~IV型に属する、381株(I型)、HW24D1株(II型)、6/26株(III型)、W83株(IV型)のうちいくつかを用いて、上記(2)の①項と同一の方法でバイオフィームを形成した。QS関連物質としてアシルホモセリンラクトン(*N*-acyl HSL)類似化合

物(C₁₀H₂₀N₂O₂)とセフロキシサン、ミノサイクリンあるいはオフロキサシンを併用し、単独で用いた時と比較検討した。他方で、マクロライド系抗生物質であるアジスロマイシンおよびエリスロマイシンを最小発育阻止濃度以下(sub-MIC)を含めた各種濃度で作用させ、抗バイオフィーム効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 難治性根尖性歯周炎の科学的診断法の開発

難治性および慢性根尖性歯周炎罹患歯の感染根管や根尖孔外より得られた105のバイオフィーム試料中、臨床症状やX線写真等の全ての臨床パラメータが確認できた根管バイオフィーム27試料と、根尖孔外バイオフィーム30試料を解析対象とした。各部位から検出されたバイオフィーム構成細菌種上位10細菌種を表1, 2に示した。

P. gingivalis, *Tannerella forsythia*ならびに*Fusobacterium nucleatum*は各々11, 7,

表1 根管バイオフィームから検出された細菌種 (n=27)

細菌種	試料数
Uncultured bacterium	27
Prevotella sp.	13
Eubacteriaceae	12
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	11
<i>Slackia exigua</i>	11
Bacteroidetes	11
<i>Porphyromonas sp.</i>	10
<i>Oribacterium sp.</i>	9
<i>Atopobium rimae</i>	8
Lachnospiraceae	8

表2 根尖孔外バイオフィームから検出された細菌種 (n=30)

細菌種	試料数
Uncultured bacterium	30
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	18
<i>Prevotella sp.</i>	17
Bacteroidetes	17
<i>Tannerella forsythia</i>	16
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	14
<i>Peptostreptococcus sp.</i>	11
<i>Eubacterium sp.</i>	10
<i>Porphyromonas sp.</i>	9
<i>Capnocytophaga sp.</i>	9

3試料の根管および18, 16, 14試料の根尖孔外バイオフィームから検出された。*P. gingivalis*が根尖孔外から検出された難治症例では、打診痛と発赤・腫脹が平均より高率で出現し、*T. forsythia*では排膿、打診痛ならびに瘻孔が、*F. nucleatum*は発赤・腫脹が比較的高率でみられた。*Prevotella sp.*が根尖孔外から検出された症例では、自発痛の既往、発赤・腫脹の既往、打診痛が高頻度の症例で発現し、*Bacteroides sp.*は自発痛の既往が比較的高い頻度でみられた。

*P. gingivalis*と*T. forsythia*は各々検出された18および16症例中の13症例の根尖孔外から同時に検出され、この2細菌種の共存が、根尖性歯周炎の難治化に密接に関連していることが明らかとなった。従って、根管試料を対象に細菌の遺伝子学的同定を行い、その結果両細菌が検出された際には、本疾患の診断につながると考察される。さらに、いくつかの臨床パラメータとの相関性を統計的手法で解析すれば、難治性根尖性歯周炎に対する新規の臨床診断基準が確立するものと推察される。

(2) バイオフィーム形成に関連する遺伝子の選定とその役割解析

フローセル系で作製したバイオフィームを0-3日(付着期), 3-6日(成長期), 6-9日(停滞期), 9-14日(成熟期)の4つの過程に分類し、3日以降の細菌数の変化を図1に示した。また、各過程で1.5倍以上発現量が変化していた遺伝子の数(全2090遺伝子)を図2に示した。

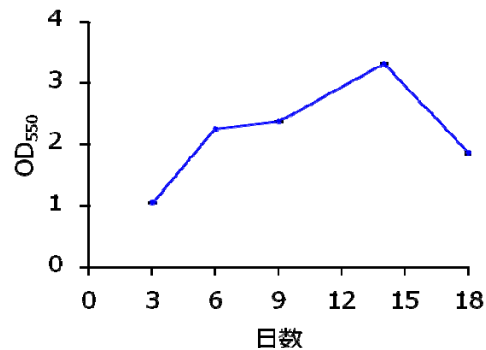


図1 バイオフィーム細菌数の経時的変化

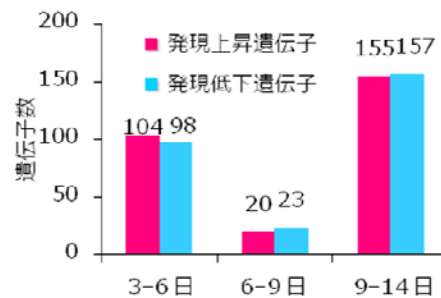


図2 各過程で1.5倍以上の発現変化がみられた遺伝子数

そして、データベースと4過程での発現量の変化の頻度により、最終的に9遺伝子(PGN0088, PGN0098, PGN0208, PGN0845, PGN973, PGN1092, PGN1131, PGN1287, PGN1309)を選定した。これらのうち、成熟期の発現量の変化が-3.59倍と全データ中で2番目に高く、データベースより*Bacillus*属においてバイオフィーム形成に関与している遺

伝子と相同性の高い、PGN0088を選択し、野性株 (ODP001株: PGN_0088::ermF) と相補株 (ODP002株: PGN_0088::ermF_{TCB}-PGN_0088) を作製した。SEM観察の結果、ODP001株のバイオフィルムは菌体外マトリックスが網目状構造を呈し、野性株とODP002株では菌体外マトリックスが積層し層状構造がみられた。CLSM観察では、DAPI染色では菌株間に著名な差はみられないが、ConA-FITC染色およびWGA-FITC染色像でODP001株のみに網目状構造が観察された。また、定量的にODP001株は菌体当たりの構成糖は他の菌株に比べて有意に増加していた。現在、PGN0088以外の遺伝子の役割解析を継続して行っている。

(3) バイオフィルム形成阻害物質の検索

N-acyl HSL類似化合物とオフロキサシン併用群は、単独使用群と比較して有意に*P. gingivalis*バイオフィルムを抑制し、他の抗生物質との併用に比べて最も抑制率が高かった。本実験から、バイオフィルムの成長抑制をめざした新規の化学的コントロール法の臨床適応への礎を築いた。

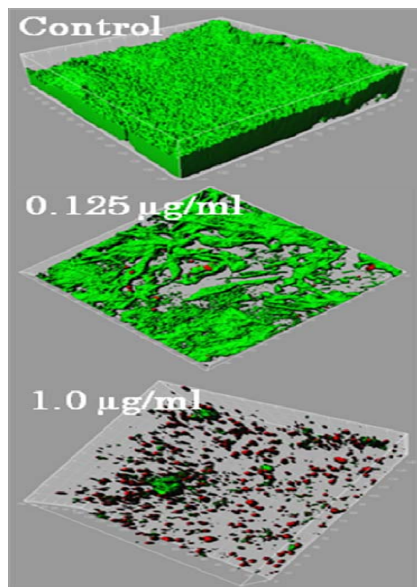


図3 アジスロマイシン作用時の

P. gingivalis バイオフィルム (CLSM 像) 一方、エリスロマイシンは MIC (0.5 μg/ml) 以上の 1 μg/ml で *P. gingivalis* バイオフィルムに対し抑制作用を示したが、アジスロマイシンは sub-MIC (0.125 μg/ml) でバイオフィルムを抑制し、浮遊細胞に対する抗菌効果の他に、抗バイオフィルム作用を有することが明らかとなった (図3)。

このメカニズムの詳細は不明であるが、CLSM像では sub-MIC で菌体細胞は死滅しておらず、バイオフィルムの一部を剥離したのではないかと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

- ①. Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Suga H, Azakami H, Ebisu S: Synergistic effects of antibiotics and an N-acyl homoserine lactone analogue on *Porphyromonas gingivalis* biofilm. *J Appl Microbiol* 112, 404-411, 2012 (査読有). DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.05194.x
- ②. Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Izutani N, Azakami H, Ebisu S: Anti-biofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 5887-5892, 2011 (査読有). DOI: 10.1128/AAC.05169-11
- ③. Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S: Time-course gene expression during *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 77, 6733-6736, 2011 (査読有). DOI: 10.1128/AEM.00746-11
- ④. Matsunaga M, Nakayuki A, Saito Y, Kato A, Noiri Y, Ebisu S, Azakami H. (2011): Genomic recombination through plasmid-encoded recombinase enhances hemolytic activity and adherence to epithelial cells in the periodontal pathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 748-751, 2011 (査読有). DOI:http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100866
- ⑤. 山本れいこ, 野杵由一郎, 山口幹代, 朝日陽子, 前菌葉月, 恵比須繁之 (2010): *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成における遺伝子の経時的変化. *Bacterial Adherence & Biofilm* 25, 51-56, 2011 (査読無).
- ⑥. 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* 45: 255-261, 2010 (査読有). DOI:10.1111/j.1600-0765.2009.01228.x
- ⑦. Yamaguchi Y, Sato K, Yukitake H, Noiri Y, Ebisu S, Nakayama K: Exopolysaccharide accumulation and antimicrobial effect in *Porphyromonas gingivalis* biofilm. *Infect Immun* 78, 3801-3812, 2010 (査読有). DOI:10.1128/IAI.00071-10
- ⑧. Matsunaga T, Nakahara A, Minnatul KM, Noiri Y, Ebisu S, Kato A, Azakami H: The inhibitory effects of catechins on biofilm formation by the periodonto-

pathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*. *Biosci Biotechnol Biochem* 74, 2445-2450, 2010 (査読有). DOI:http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100499

- ⑨. 前菌葉月, 野杵由一郎, 朝日陽子, 山口幹代, 山本れいこ, 藪根敏晃, 上田未央, **恵比須繁之**: 各種抗菌薬が *Porphyromonas gingivalis* の形成するバイオフィルムに及ぼす影響. *Bacterial Adherence & Biofilm* 24, 35-42, 2010(査読無).
- ⑩. 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: クオラムセンシング関連物質が *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成に及ぼす影響の検索. *Bacterial Adherence & Biofilm* 23, 109-114, 2009(査読無).
- ⑪. 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**, 阿座上弘行: 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ルム形成に関与する. *Bacterial Adherence & Biofilm* 22, 103-108, 2009(査読無).
- ⑫. 仲行あゆみ, 斎藤悠希, 松永哲郎, 加藤昭夫, 野杵由一郎, **恵比須繁之**, 阿座上弘行: 歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* はゲノム再編により上皮細胞への付着を高める. *Bacterial Adherence & Biofilm* 22, 81-86, 2009(査読無).

[学会発表] (計 25 件)

- ①. 山本れいこ, 野杵由一郎, 山口幹代, 朝日陽子, 前菌葉月, 呉本勝隆, **恵比須繁之**: *Porphyromonas gingivalis* の PGN_0088 遺伝子のバイオフィルム形成における役割. 第 85 回日本細菌学会総会: 2012, 3, 29, ブリックホール (長崎).
- ②. 阿座上弘行, 山田和範, 野杵由一郎, **恵比須繁之**: 歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* はゲノム再編により高病原化する. 第 85 回日本細菌学会総会: 2012, 3, 28, ブリックホール (長崎).
- ③. **恵比須繁之**: バイオフィルム見聞録 プラークからバイオフィルムへ. 第 135 回日本歯科保存学会 (招待講演): 2011, 10, 20, 大阪国際交流センター (大阪).
- ④. 朝日陽子, 野杵由一郎, 前菌葉月, 山本れいこ, 山口幹代, **恵比須繁之**: Sub-MIC 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).
- ⑤. Yamaguchi M, **Noiri Y**, Kuboniwa M,

Maezono H, Yamamoto R, Asahi Y, Kuremoto K, **Ebisu S**: Remnant matrix of *Porphyromonas gingivalis* biofilm treated with chlorhexidine. International Union of Microbial Societies 2011 Congress: September 8, 2011, Sapporo, Japan.

- ⑥. 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* のバイオフィルムに対するクロルヘキシジンの影響. 第 25 回 Bacterial Adherence & Biofilm: 2011, 7, 8, 東京慈恵会医科大学 (東京).
- ⑦. 山本れいこ, 野杵由一郎, 山口幹代, 朝日陽子, 前菌葉月, **恵比須繁之**: *Porphyromonas gingivalis* バイオフィルム形成の経時的解析. 第 25 回 Bacterial Adherence & Biofilm: 2011, 7, 8, 東京慈恵会医科大学 (東京).
- ⑧. 前菌葉月, 野杵由一郎, 朝日陽子, 山口幹代, 山本れいこ, 藪根敏晃, **恵比須繁之**: *Porphyromonas gingivalis* バイオフィルムに対する各種抗菌剤の抗バイオフィルム効果. 第 134 回日本歯科保存学会: 2011, 6, 10, 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート (千葉).
- ⑨. Asahi Y, **Noiri Y**, Igarashi J, Maezono H, **Ebisu S**: Combination chemotherapy using autoinducer-analog and antibiotics for *Fusobacterium nucleatum* biofilm. The 89th International Association for Dental Research: March 19, 2011, San Diego, USA.
- ⑩. Maezono H, **Noiri Y**, **Ebisu S**: The anti-biofilm effects of macrolide antibiotics on *Porphyromonas gingivalis*. The 89th International Association for Dental Research: March 18, 2011, San Diego, USA.
- ⑪. Matsunaga T, Saito Y, Nakahara A, Kato A, **Ebisu S**, **Azakami H**: Effect of genomic recombination in periodontopathogenic bacterium on its lectin-dependent adhesion to epithelial cells. Pachichem 2010 Conference: December 14, 2010, Honolulu (USA).
- ⑫. Asahi Y, **Noiri Y**, Igarashi J, Maezono H, **Ebisu S**: Combination chemotherapy using autoinducer-analog and antibiotics for *Porphyromonas gingivalis* biofilm. The 58th Japanese Association for Dental Research: November 20, 2010, 九州歯科大学, 北九州.
- ⑬. 山口幹代, 野杵由一郎, 久保庭雅恵, 前

- 菌葉月, 山本れいこ, **恵比須繁之**: *Porphyromonas gingivalis* バイオフィルムの菌体外マトリックスに対する陽イオン性抗菌剤の影響. 第133回日本歯科保存学会: 2010, 10, 28, 長良川国際会議場(岐阜).
- ⑭. 新田 浩, **野杵由一郎**, **恵比須繁之**, 他7名: アジスロマイシンを用いた歯周抗菌療法が多施設研究. 第53回日本歯周病学会: 2010, 9, 19, 高松コンベンション・ビューロー(香川).
- ⑮. Yamaguchi M, **Noiri Y**, Kuboniwa M, Maezono H, Yamamoto R, Asahi Y, **Ebisu S**: Exopolysaccharide accumulation and antimicrobial effect in *Porphyromonas gingivalis* biofilm. The 88th International Association for Dental Research: July 15, 2010, Barcelona, Spain.
- ⑯. 山本れいこ, **野杵由一郎**, 山口幹代, 朝日陽子, 前菌葉月, **恵比須繁之**: フローセル系と静置系の2つのバイオフィルムモデルにおける *Porphyromonas gingivalis* の遺伝子発現の経時的変化. 第132回日本歯科保存学会: 2010, 6, 4, 崇城大学市民ホール(熊本).
- ⑰. 山口幹代, **野杵由一郎**, 久保庭雅恵, 前菌葉月, 山本れいこ, **恵比須繁之**: *Porphyromonas gingivalis* バイオフィルムにおける菌体外マトリックス産生と抗菌剤の影響. 第132回日本歯科保存学会: 2010, 6, 4, 崇城大学市民ホール(熊本).
- ⑱. Maezono H, **Noiri Y**, Asahi Y, **Ebisu S**: Effects of Antibiotics on various *Porphyromonas gingivalis* biofilms. Kyungpook-Osaka University International Symposium in Dentistry: December 11, 2009, Kyungpook, Korea.
- ⑲. 大山秀樹, **野杵由一郎**, **恵比須繁之**, 他8名: 歯周病細菌感染に起因したと考えられる化膿性肺膿瘍の1剖検例. 第130回日本歯科保存学会: 2009, 6, 12, 札幌コンベンションセンター(北海道).
- ⑳. 山口幹代, **野杵由一郎**, 山本れいこ, **恵比須繁之**: *Porphyromonas gingivalis* バイオフィルムのグリコシルトランスフェラーゼのモチーフをもつ遺伝子PGN1251はバイオフィルム形成に関与する. 第130回日本歯科保存学会: 2009, 6, 11, 札幌コンベンションセンター(北海道).
- ㉑. **阿座上弘行**, **恵比須繁之**: クオラムセンシングをターゲットとしたバイオフィルム阻害薬の開発. 日本農芸化学会2009年度大会(シンポジウム): 2009, 3, 28, 福岡国際会議場(福岡).
- ㉒. 松永哲郎, **恵比須繁之**, **阿座上弘行**: 歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* のデンタルプラークからの高病原化株の検出. 第82回日本細菌学会総会: 2009, 3, 12, 名古屋国際会議場(愛知).
- ㉓. **恵比須繁之**: オーラルバイオフィルムの制御をめざして. 第27回日本小児歯科学会近畿地方大会(特別講演): 2008, 10, 19, 大阪国際会議場(大阪).
- ㉔. **Ebisu S**: Refractory periapical periodontitis and biofilm-essential strategy for treatment of refractory endodontic pathogen. 2008 SINO-JAPANESE CONFERENCE ON STOMATOLOGY(特別講演): 2008, 9, 28, 西安(中国).
- ㉕. Maezono H, **Noiri Y**, Ueda U, Noguchi N, Yabune Y, **Ebisu S**: Effects of various antibiotics on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. The 86th International Association for Dental Research: July 5, 2008, Tronto, Canada.

〔図書〕(計1件)

- ①山口幹代, **恵比須繁之**(2011): 口腔内細菌と誤嚥性肺炎; 高齢者の肺炎 治療・リハビリテーション・予防(山谷陸雄編, 松本慶蔵総監修). 初版, 医歯薬ジャーナル, 61-67.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恵比須 繁之 (EBISU SHIGEYUKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・理事・副学長
研究者番号: 50116000

(2) 研究分担者

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