

## 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（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390508

研究課題名（和文）デンタルバイオフィームにおけるクオラムセンシング誘導物質の  
in situ 解析研究課題名（英文）Analysis of quorum sensing induced analogs in situ  
in human dental biofilms

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（和文）：本研究課題は、ヒトのデンタルバイオフィームに対する化学的制御・抑制法の確立を最終的な目標として行われた。クオラムセンシング(QS)誘導物質であるオートインデューサーの1種であるアシルホモセリンラクトン(AHL)の類似化合物をターゲットにしたが、10種のAHL類似化合物は検出限界(6.32～7.33 ng/ml)以上の濃度では検出されず、デンタルバイオフィーム中にはほとんど存在しないことが明らかとなった。一方、QSを攪乱し抗バイオフィーム作用を示していると推察されるAHL類似化合物や抗菌剤を発見し、これらによる化学的なバイオフィー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、バイオフィーム感染症の新たな治療戦略の開発に有意義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）：This study was carried out for the establishment of the chemical control and restraint method against human dental biofilm. *N*-Acyl homoserine lactone (AHL) analogs which was one kind of the autoinducer and was quorum sensing(QS) inducer were targeted. The 10 kinds of AHL analogs were not shown above detection limit (6.32-7.33 ng/ml), and it was clarified that AHL hardly existed in human dental biofilm. On the other hand, We discovered some AHL analogs and antibiotics indicating the anti-biofilm action that would affect QS and made the basics for the clinical application of the chemical biofilm control method by these chemotherapeutic agents.

I take pride in these results of the research giving a significant suggestion for the development of the new treatment strategy of the bacterial biofilm disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：デンタルバイオフィーム，クオラムセンシング，オートインデューサー，アシルホモセリンラクトン，感染根管，マクロライド，アジスロマイシン，*Porphyromonas gingivalis*

## 1. 研究開始当初の背景

代表者らは、ヒトのデンタルバイオフィル

ム研究から、未解明であった構成細菌叢の実態の一端を明らかにするとともに、デンタル

バイオフィルムを組織・形態学的、免疫組織化学的あるいは3次元的に *in situ* 解析する手技・手法を確立した。一方、現在の機械的除去に偏重したデンタルバイオフィルムに対して作用機序が明確な化学的制御・抑制法の確立を目指して、バイオフィル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 (QS) 誘導物質 (オートインデューサー: AI) の類似化合物をターゲットにした形成阻害物質の開発研究を *in vitro* で行ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究ではヒトのデンタルバイオフィルムで産生され、機能していると推察されている QS 誘導物質、すなわち AI の 1 種である *N*-アシルホモセリンラクトン (AHL) を *in situ* で追究した。一方、バイオフィルム形成を抑制する AHL 類似化合物や抗菌剤を *in vitro* でスクリーニングし、バイオフィルムに対する化学的抑制法の臨床応用を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒトのデンタルバイオフィルム中の AHL 類似化合物の解析

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科および歯学部付属病院の倫理委員会で承認(受付番号: H20-E5)後行われた。大阪大学歯学部付属病院保存科を来院した患者に本研究について説明を行い、同意が得られた 40 人の患者より口腔清掃指導時に、滅菌エキスカベータを用いて歯肉縁上のデンタルバイオフィルムを採取した。総湿重量 5.5g のバイオフィルムを約 7.2ml の精製水に溶解した。一方、標準品として、 $C_8H_{13}NO_3$  をはじめとする C4~C18-ホモセリンラクトン (HSL) 7 種、ならびに C8~C12-oxo-HSL を選定し、アセトニトリルにて溶解し混合標準溶液を作製した。バイオフィルム試料は試料 1.5ml とアセトニトリル 167  $\mu$ l を混和し、添加回収試料については混合標準溶液 100  $\mu$ l と試料 1.5ml およびアセトニトリル 67  $\mu$ l ずつ混和し、最終アセトニトリル濃度が 10% になるよう調整して固相抽出処理を行い、抽出溶液を LC/MS にて測定した。

### (2) アジスロマイシン (AZM) とエリスロマイシン (ERY) の抗バイオフィルム作用の検討

*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) の培養液を代表者らが開発した改良型ロビンスデバイス中で 14 日間還流し、ハイドロキシアパタイトディスク上にバイオフィルムを形成した。その後、マクロライド系抗生物質である AZM および ERY を最小発育阻止濃度以下 (sub-MIC) を含めた各種濃度で 7 日間作用させ、抗バイオフィルム

効果を検討した。

### (3) QS 関連物質と各種抗菌剤の併用がバイオフィルムに及ぼす影響

上記(2)項と同一の方法で *P. gingivalis* 381 バイオフィルムを形成中に、QS 関連物質として既に抑制作用を有することが確認されている AHL 類似化合物 ( $C_{10}H_{20}N_2O_2$ ) (図 1) やセフロキシサン、ミノサイクリンあるいはオフロキサシンを添加し、併用群と QS 関連物質あるいは抗菌剤の単独添加群のバイオフィルム形成に及ぼす影響を比較検討した。

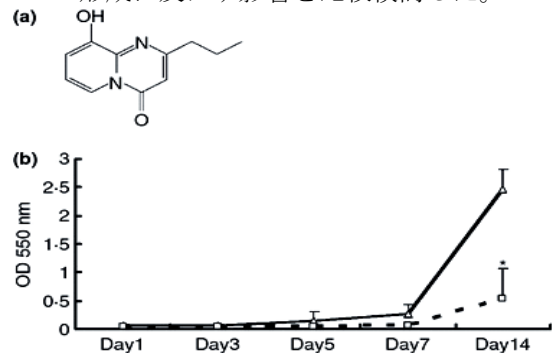


図 1. AHL 類似化合物の化学構造とバイオフィルム抑制作用

(発表雑誌論文 番号(1)より引用)

a.  $C_{10}H_{20}N_2O_2$  の化学構造。b. AHL 類似化合物添加群は 7 日目より顕著な *P. gingivalis* バイオフィルム抑制効果を示した。実線: コントロール群, 点線: AHL 添加群

## 4. 研究成果

### (1) ヒトのデンタルバイオフィルム中の AHL 類似化合物の解析

添加回収試料の MS 解析結果を表 1 と図 2 に示した。10 種の AHL の回収率は 50% 以上であった。しかしながら、供試したバイオフィルム試料から各 AHL 類似化合物のピークは検出されなかった(図 3)。添加回収試料ではピークが確認されており、試料中に AHL が存在していても検出限界 (6.32~7.33 ng/ml) 未満の濃度であることが明らかとなった。

表 1. 添加回収試料の MS 定量

ID#	保持時間	m/z	MS定量テーブル		化合物名
			面積	高さ	
1	3.93	172.0968	2540269	74046	C4-HSL MH+
2	12.21	200.1281	5863071	434489	C6-HSL MH+
3	15.06	242.1387	46605606	2305673	C8-O-HSL MH+
4	20.77	228.1594	24037828	2468242	C8-HSL MH+
5	23.04	270.1700	25222252	1354788	C10-O-HSL MH+
6	27.86	256.1907	41003332	3970338	C10-HSL MH+
7	29.65	298.2013	27550478	1419884	C12-O-HSL MH+
8	34.11	284.2220	46503476	4578223	C12-HSL MH+
9	39.92	312.2533	42084488	4055773	C14-HSL MH+
10	49.70	368.3159	47715799	4544591	C18-HSL MH+

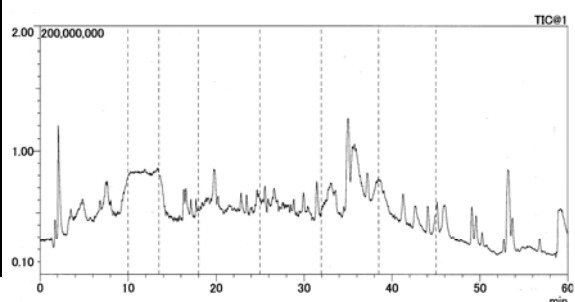


図2. 添加回収試料のトータルイオンカレン

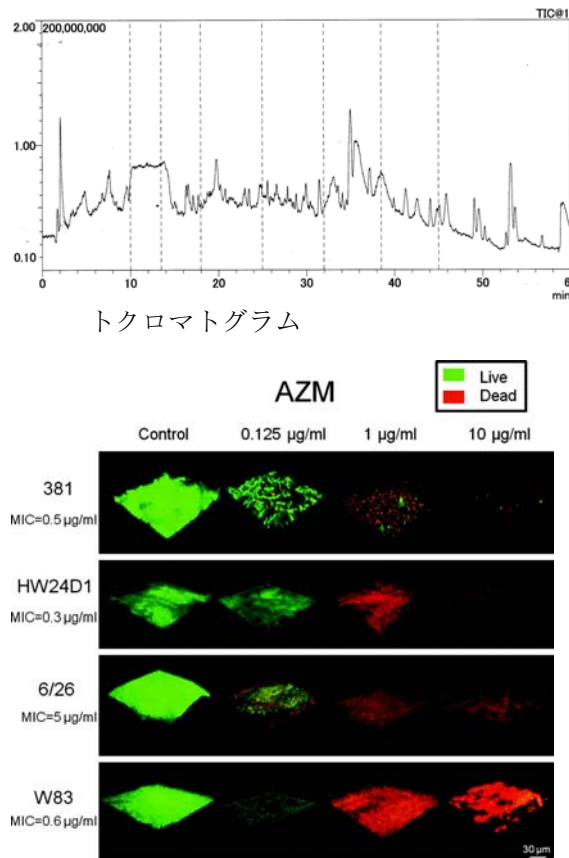


図3. バイオフィルム試料のトータルイオンカレントクロマトグラム

図4. AZM作用時の*P. gingivalis* バイオフィルム (CLSM像)

(発表論文 番号(2)より引用)

(2) AZM と ERY の抗バイオフィルム作用

ERY は MIC (0.5 µg/ml) 以上の 1 µg/ml で 4 菌株の *P. gingivalis* バイオフィルムに対し抑制作用を示したが, AZM は sub-MIC (0.125 µg/ml) で供した全菌株のバイオフィルムを抑制し, 浮遊細胞に対する抗菌作用とは異なり, 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4)。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, QS シグナルを攪乱すること等により, バイオフィルムの一部が剥離したことが推察された。一方, MIC 以上では赤く染色された死菌がみられることから, 菌体外マトリックスが消失し露出した細菌細胞に対しては, 抗菌効果を発揮していると考えられる。

(3) バイオフィルム形成阻害物質の検索

AHL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 ( $p < 0.05$ ), 他の抗菌剤との併用に比べて最も抑制率が高かつ

た(図5)。作用メカニズムについては不明であるが, 図6に示した, CLSM像と合わせて考察すると, 使用したAHL類似化合物が本来の抗菌剤の殺菌・静菌作用を発揮しやすいように, バイオフィルムの性状あるいは構造等を変化させている可能性が示唆された。

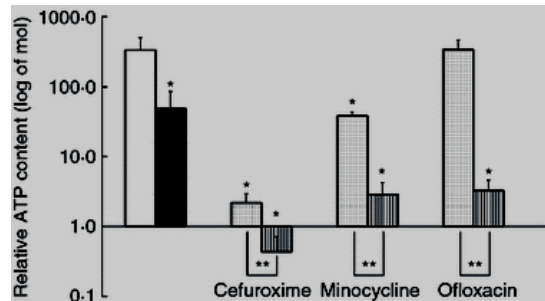


図5. AHL 類似化合物と各種抗菌剤の *P. gingivalis* バイオフィルムへの影響  
□: コントロール群, ■: 化合物添加群, 縦縞: 併用群, 点縞: 抗菌剤添加群  
(発表論文 番号(1)より引用)

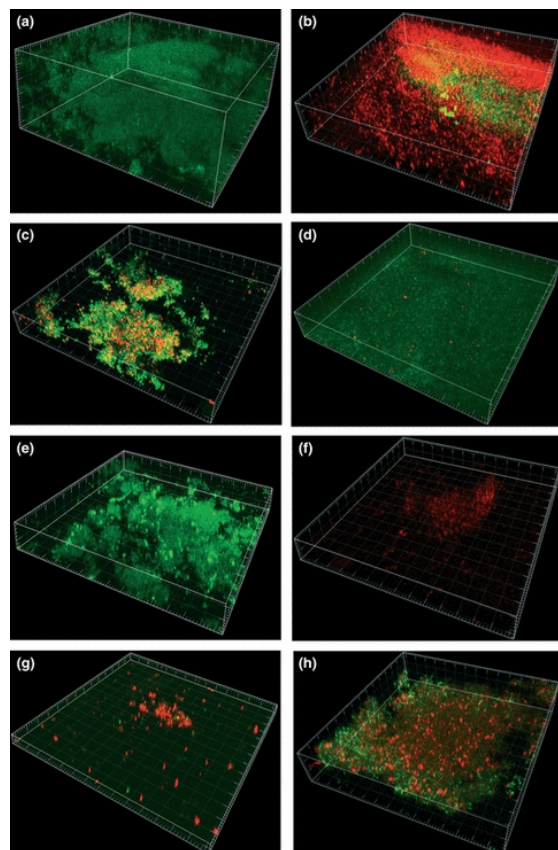


図6. AHL 類似化合物や各種抗菌剤作用時の *P. gingivalis* バイオフィルム  
(発表論文 番号(1)より引用)

a. コントロール群, b. セフロキサム添加群, c. ミノサイクリン添加群, d. オフロキサシン添加群, e. 類似化合物添加群, f. セ

フロキサム+化合物併用群, g. ミノサイクリン+化合物併用群, h. オフロキサシン+化合物併用群

本研究では、ヒトのデンタルバイオフィルム中からAHLは検出されず、ターゲットとした化合物以外のQS関連物質の検出を検討する必要が生じた。しかしながら、デンタルバイオフィルム中のQSシグナルの全貌を解明することは、細菌叢の複雑さ、環境の多様性、ならびにシグナル物質の微量解析にかかる経費等を考慮すると極めて困難であり、アプローチのアプローチの手法を再検討する必要があると考えられる。

一方、抗菌剤やAHL類似化合物の一部は、抗バイオフィルム作用を示すことを明らかにし、QSシグナルの制御・抑制によると推察されるバイオフィルムの成長抑制あるいは排除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。

#### 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 14 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 periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 748-751, 2011(査読有). DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100866>
- ⑤ 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—その成功と失敗の鍵—. *日歯歯内誌* 50, 87-96, 2011(査読有).
- ⑥ 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* 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).
- ⑦ Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Asai H, Suga H, Ebisu S: Effects of *N*-acryl homoserin lacton analogs on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodont Res* 45: 255-261, 2010 DOI:10.1111/j.1600-0765.2009.01228.x (査読有)
- ⑧ Izutani N, Imazato S, Noiri Y, Ebisu S: Antibacterial effects of MDPB against anaerobes associated with endodontic infections. *Int Endod J* 43: 637-645, 2010(査読有). DOI: 10.1111/j.1365-2591.2010.01716.x
- ⑨ 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
- ⑩ Matsunaga T, Nakahara A, Minnatul KM, Noiri Y, Ebisu S, Kato A, Azakami H: The inhibitory effects of catechins on biofilm formation by the periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*. *Biosci Biotechnol Biochem* 74, 2445-2450, 2010(査読有). DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100499>
- ⑪ 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).
- ⑫ 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).
- ⑬ 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).

- ⑭ 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 20 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 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).
- ④ 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.
- ⑤ 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).
- ⑥ 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).
- ⑦ 前菌葉月, 野杵由一郎, 朝日陽子, 山口幹代, 山本れいこ, 薮根敏晃, 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).

- ⑧ 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.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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.
- ⑪ 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).
- ⑫ 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生療法の実施研究. 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).
- ⑬ 野杵由一郎: 健康、機能を回復する歯内療法 感染根管を科学するーその実態と根管治療の役割ー. 第 31 回日本歯内療法学会学術大会(シンポジウム), 2010, 7, 25, 東京商工会議所(東京).
- ⑭ 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.
- ⑮ 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).



- ①⑥ 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).
- ①⑦ 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.
- ①⑧ 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).
- ①⑨ 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).
- ②⑩ **野杵由一郎**: 歯周病を予防して健やかな  
生活を—厄介なデンタルプラークとそ  
のコントロール法—. 大和証券ヘルス財  
団平成 21 年度健康の保持増進に関する  
セミナー(招待講演), 2009, 4, 9, 大和  
証券神戸支店, (兵庫).

[図書] (計 4 件)

- ① **野杵由一郎** (2011): 2 章 機能を回復  
する歯内療法 4. 感染根管を科学する  
その実態と根管治療の役割; ENDO で臨床  
を大きく変えよう! 歯科治療の根幹  
ENDO で天然歯を守る (日本歯内療法学  
会編). 初版, クインテッセンス出版,  
東京, 64-70.
- ② **野杵由一郎** (2010): 第 4 章 歯髄・根尖  
性歯周組織疾患と細菌学; エンドドント  
イックス (須田英明, 中村 洋編集主  
幹, 恵比須繁之, 興地隆史, 勝海一郎,  
斎藤 隆, 中川寛一, 中村幸生, 林  
善彦). 第 3 版, 永末書店, 東京, 44-50.
- ③ **野杵由一郎** (2010): 2. 感染根管の  
update; 口腔感染症の update. 歯科医療  
(秋号), 第一歯科出版, 東京, 10-16.
- ④ **野杵由一郎** (2009): Chapter 1 エンド難  
症例の現状と実態, Chapter 2 エンド難  
症例の原因分析と対応 根尖部にみられ  
る吸収像と根尖孔外バイオフィルム; エ  
ンド難症例 メカニズムと臨床対応 (歯  
界展望別冊: 恵比須繁之編). 初版, 医歯  
薬出版, 東京, 8-19, 46-51.

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・理事・副学長  
研究者番号: 50116000  
藪根 敏晃 (YABUNE TOSHIKI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 90423144  
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

(3) 連携研究者

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