

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890133

研究課題名（和文）ポルフィロモナス ジンジバリスのバイオフィルムにおける抗菌剤抵抗性に関する研究

研究課題名（英文）A study on antibiotic resistance of *Porphyromonas gingivalis* biofilm

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、含嗽剤などに使用している抗菌剤であるグルコン酸クロルヘキシジン（CHX）および塩化セチルピリジニウム（CPC）は、辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎の病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム中の菌体そのものには効果を示すが、菌体とともにバイオフィルムを構成する菌体外マトリックスは、菌体が死滅した後も残存することを明らかにした。また、CHX を作用させた後に残存する菌体外マトリックスは機械的除去が困難であり、バイオフィルム再形成の足場となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, I showed that chlorhexidine gluconate (CHX) and cetylpyridinium chloride (CPC) were effective against *Porphyromonas gingivalis* cells in biofilm, but extracellular matrix remained in biofilm after CHX and CPC application. In addition, extracellular matrix remained after CHX application was difficult to eliminate mechanically, suggesting that remaining extracellular matrix provides a scaffold for biofilm reformation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,030,000	309,000	1,339,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,980,000	594,000	2,574,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：歯学、バイオフィルム、抗菌剤、ポルフィロモナス ジンジバリス、菌体外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

バイオフィルム中の細菌は抗菌剤に対して抵抗性を示し、その1つの要因として菌体外マトリックスの存在があげられる。辺縁性歯周炎および根尖性歯周炎の病原性細菌の一種である *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルムモデルにおいても菌体外マトリックス様構造物が形成されていることが

走査型電子顕微鏡（SEM）により観察されている。また、浮遊菌に感受性を示す抗菌剤のいくつかはバイオフィルム中の細菌に対しては抗菌効果を示さないことが報告されており、菌体外マトリックス形成と抗菌剤抵抗性との関連が示唆されている。しかしながら、*P. gingivalis* のバイオフィルムの菌体外マトリックスの成分や性状、および抗菌剤抵抗

性との関連については明らかではない。また、バイオフィームを形成した *P. gingivalis* 菌体に有効であることが報告されている陽イオン性抗菌剤であるグルコン酸クロルヘキシジン(CHX)などの抗菌剤の菌体外マトリックスへの影響についても不明である。

## 2. 研究の目的

CHX や同じ陽イオン性抗菌剤である CPC が *P. gingivalis* のバイオフィームにおいて菌体および菌体外マトリックスに及ぼす影響について検索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 3次元観察

diamidino-2-phenylindole(DAPI) (50  $\mu$ l/ml)にて蛍光染色した *P. gingivalis* を唾液処理を施したカバーガラスチャンバー上で24時間培養することにより形成したバイオフィームに、0.0005-0.2% CHX または CPC を5分間作用させた後、菌体外多糖を Concanavalin A-FITC(125  $\mu$ l/ml) および Wheat germ agglutinin-FITC(125  $\mu$ l/ml)にて30分間染色し、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)より得られた像から画像解析ソフトを用いて、バイオフィームの3次元構造の観察および定量的解析を行った。

### (2) 生物学的検索および微細形態学的観察

*P. gingivalis* を唾液処理を施したカバーガラスチャンバー上で24時間培養することにより形成したバイオフィームを0.05%および0.2% CHX で処理した後、PBSにて洗浄後ATP消去剤キットを用いて、ATP量を測定した。また試料の一部を0.1%カコジル酸ナトリウム緩衝液にて洗浄後、0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液-2.5%グルタルアルデヒドで30分間浸漬固定し、0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液にて3回洗浄した。そして、上昇エタノール系列で脱水後、*t*-ブタノールで置換し凍結乾燥後、プラズママルチコートにて白金蒸着を施し、調整した試料をSEM下の観察に供した。

### (3) 機械的除去に対する抵抗性および新たな細菌の付着の検索

カバーガラスチャンバー上に形成したバイオフィームに0.2% CHX を作用させた後、超音波処理を行い、分光光度計にて550nm(OD550)で残存物の吸光度を測定することにより、機械的除去に対する抵抗性を検索した。また、カバーガラスチャンバー上に形成したバイオフィームに0.2% CHX を作用させ、PBSにて洗浄後、DAPIにて染色した *P. gingivalis* を播種し、1時間後PBSにて洗浄した後 CLSM に供し、画像解析ソフトにて新たに付着した細菌の体積を定量した。

### (4) 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) 0.05%以上の CHX 作用群および 0.0005%以上の CPC 作用群で、菌体の体積がコントロール群と比較し有意に減少し ( $p < 0.001$ , Student *t*-test)、さらに、CHX および CPC の濃度に依存的な菌体の体積の減少が認められた。しかし、全ての群において、菌体外多糖の体積に有意差は認められなかった。

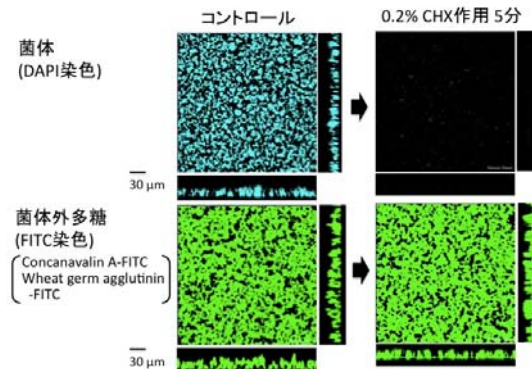


図1 0.2% CHX 作用後の菌体および菌体外多糖の3次元観察

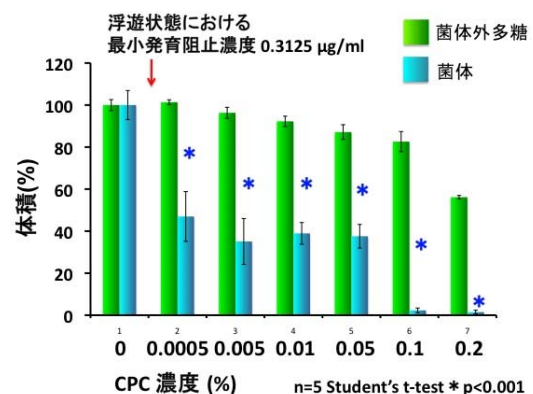
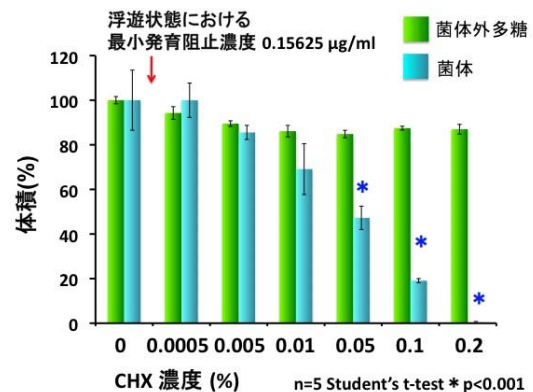


図2 CHX および CPC 作用後の菌体および菌体外多糖の定量的解析

(2) 0.05% および 0.2% CHX 作用群のバイオフィルムの ATP 量は コントロール群と比較し、有意に減少した ( $p < 0.001$ )。一方、0.05% および 0.2% CHX 作用群の SEM 像は、コントロール群と比較して明らかな相違は認められなかった。

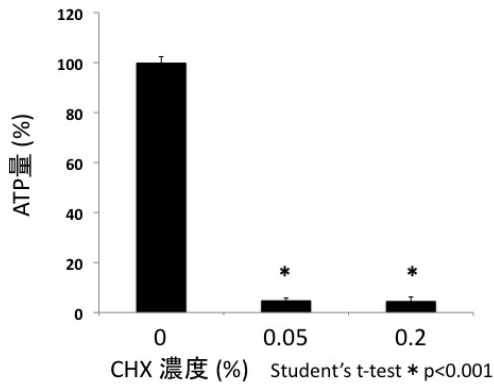


図3 0.05% および 0.2% CHX 作用後のバイオフィルムの生物学的検索

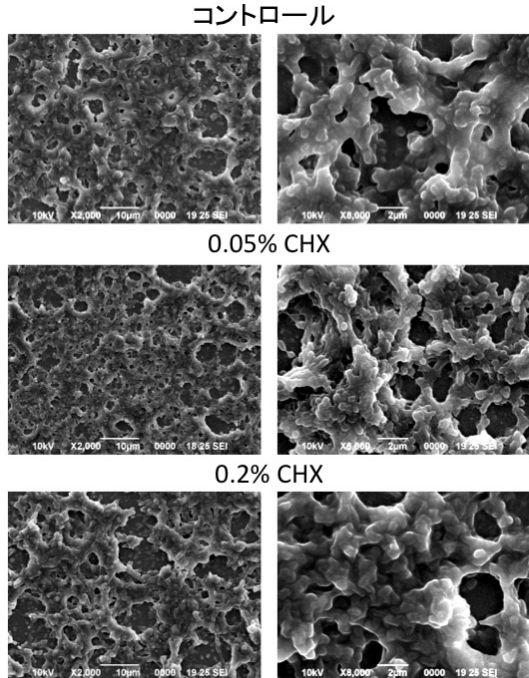


図4 0.05% および 0.2% CHX 作用後のバイオフィルムの微細形態学的観察

(3) CHX 作用後に残存したバイオフィルムは、

コントロール群のバイオフィルムと比較して、超音波処理による剥離に対して抵抗性を示した ( $p < 0.001$ )。また、CHX 作用後に残存したバイオフィルムへの菌の付着量は、唾液処理を施したプレートへの付着量と比較し、有意に増加した ( $p < 0.001$ )。

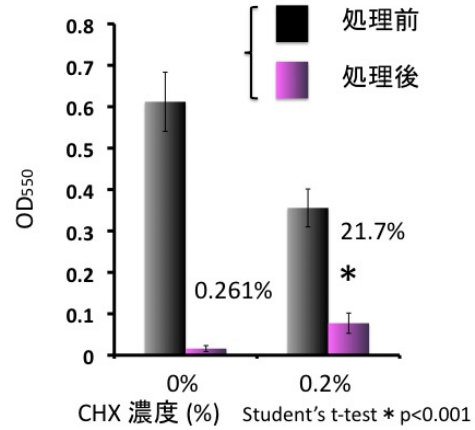


図5 0.2% CHX 作用後のバイオフィルムの剥離に対する抵抗性

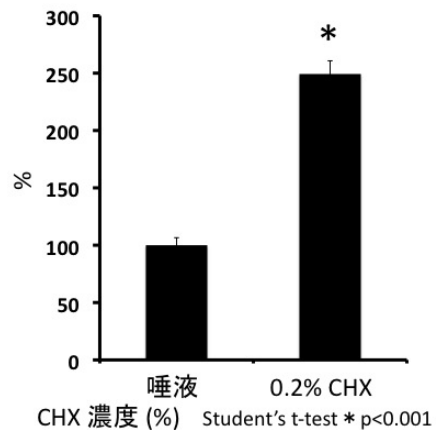


図6 0.2% CHX 作用後のバイオフィルムへの菌体の付着

これらの結果より、CHX や CPC は *P. gingivalis* バイオフィルム中の菌体には有効であるが、菌体外マトリックスの主成分である菌体外多糖を含む菌体外マトリックス成分を除去できないだけでなく、残存したバイオフィルムは除去が困難であり、新たな細菌の付着、すなわちバイオフィルム再形成の足場となることが示唆された。

## 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2件)

- ① Mikiyo Yamaguchi, Keiko Sato, Hideharu Yukitake, Yuichiro Noiri, Shigeyuki Ebisu, and Koji Nakayama, A *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of the polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation, and increased biofilm formation. *Infection and Immunity*. 78:3801-3812, 2010. 査読有
- ② 恵比須繁之、山口幹代、特集・口腔管理と全身疾患ー歯科と医科の連携ー1. 口腔内のメイン感染源 医薬ジャーナル 45:2749-2754, 2009. 査読無

[学会発表] (計3件)

- ① 山口幹代、*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)
- ② Yamaguchi Mikiyo, Exopolysaccharide accumulation and antimicrobial effect in *Porphyromonas gingivalis* biofilm. IADR 88<sup>th</sup> General Session and Exhibition, 2010. 7. 15, バルセロナ
- ③ 山口幹代、*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、熊本市国際交流会館 (熊本)

[図書] (計1件)

山口幹代、恵比須繁之、医薬ジャーナル社、高齢者の肺炎ー治療・リハビリテーション・予防ーII、61-67、2011

## 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