

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 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890103

研究課題名（和文） ポルフィロモナス ジンジバリスに対するアジスロマイシンの抗バイオフィーム作用

研究課題名（英文） Anti-biofilm effects of azithromycin on *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

前 菌 葉月（MAEZONO HAZUKI）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：00613390

研究成果の概要（和文）：*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィームを作製し、作製されたバイオフィームにAZMをsub-MICを含む濃度で添加した。AZM添加群および非添加群について、菌体のタンパクの発現量について検討したところ、浮遊細菌とバイオフィーム遊離細胞の50および110kDa付近のタンパク発現量に差を認め、質量解析によりグルタミン酸脱水素酵素、ヘマグルチニンタンパクやRagAタンパクであることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Anti-biofilm effects of azithromycin (AZM) on *Porphyromonas gingivalis* were investigated using modified Robbins device. We examined protein expressions of AZM-treated/non-treated *Porphyromonas gingivalis* and found that protein expressions of sub-MIC AZM treated planktonic and biofilm-detached cells were different at 50 and 110 kDa. Proteins were turned out to be glutamate dehydrogenase, hemagglutinin protein and RagA protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

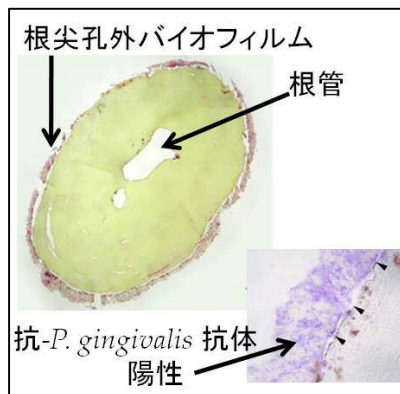
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、保存治療系歯学

キーワード：バイオフィーム、抗生物質、ポルフィロモナス ジンジバリス

1. 研究開始当初の背景

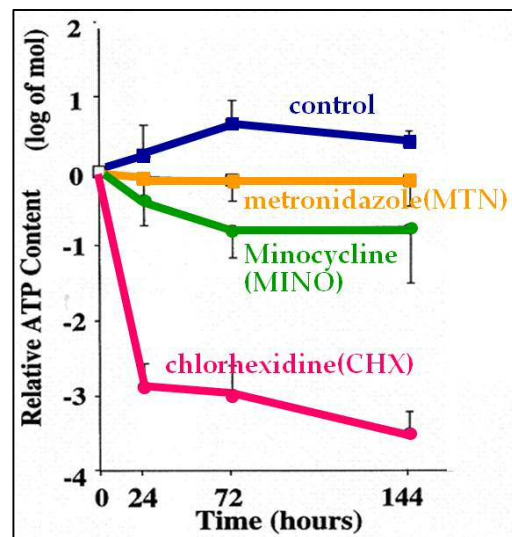
バイオフィームは微生物が産生する菌体外マトリックスで囲まれた微生物の集合体で、不活化された表面または生物活性を持つ表面に形成される。歯や口腔軟組織に形成されたバイオフィームはう蝕や歯周炎といった口腔バイオフィーム感染症の主因であり、歯科領域では密接な関わりを持つ。また、難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外からは頻りにバイオフィームが検出され、我々のグループは、根尖性歯周炎の難治化にはこの根尖孔外バイオフィームが関与していることを明らかにした(Noiri *et al*, *J Endodon* 28, 679-83, 2002)。続いて、この根尖孔外バイオフィームから高頻度に *Porphyromonas gingivalis* が検出されることを報告している (Noguchi *et al*, *Appl Environ Microbiol* 71, 8738-45, 2005)。(下図)



グラム陰性嫌気性桿菌である *P. gingivalis* は、*Treponema denticola* や *Fusobacterium nucleatum* といった他の歯周病原性細菌が歯周ポケット内で局在を示すのとは異なり、重度歯周炎患者の歯周ポケット全域より分離されることが報告されており(Noiri *et al*, *J Dent Res* 80, 1930-34, 2001, *J Dent Res* 83, 941-5, 2004)、辺縁性および根尖性歯周炎の主要病原性細菌として注目を集めている。

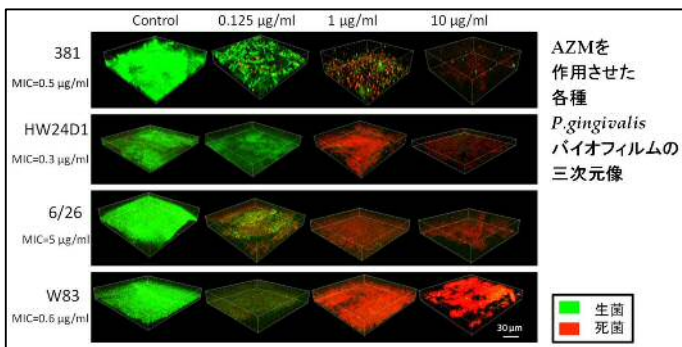
一般的に、バイオフィームは浮遊系細菌に

比べ抗菌薬に抵抗性を示すとされており、この薬剤抵抗性がバイオフィーム感染症の治療を困難にする大きな要因となっている。*P. gingivalis* においても、浮遊系細菌では抑制効果を示すミノサイクリンとメトロニダゾールがバイオフィーム細菌には著効を示さず、*P. gingivalis* バイオフィームが抗菌薬による化学的コントロールに抵抗性を示すことが報告されている (Noiri *et al*, *J Periodontol* 74, 1647-51, 2003)。(下図)



近年、マクロライド系抗菌薬アジスロマイシン (AZM) が *Pseudomonas aeruginosa* に対し最小発育阻止濃度 (MIC) 以下の濃度 (sub-MIC) でバイオフィーム形成を抑制する (Ichimiya *et al*, *Chemotherapy* 42, 186-91, 1996) ことや、*Haemophilus influenzae* では成熟したバイオフィームの減少作用を有する (Starner *et al*, *Antimicrob Agents Chemother* 52, 137-45, 2008) ことが報告されている。さらに、*P. gingivalis* においても sub-MIC の AZM が線毛の発現を抑制することが報告され (Lo Bue *et al*, *J Antimicrob Chemother* 52, 653-7, 1997)、sub-MIC の抗菌薬の効用に関する研究が進められている。

一方、申請者は、*P. gingivalis* バイオフィルムに対する各種抗菌薬の効果についての検討を行ってきた。その結果、AZM が成熟した *P. gingivalis* バイオフィルムに対しても優れた抑制作用を持ち、sub-MIC においても成熟バイオフィルムを抑制することを明らかにした(第 130 回日本歯科保存学会, 2009, IADR 89th General Session & Exhibition, 2011)。(次頁左上図)



しかしながら、その作用機序については、未だ全くもって未解明であり、将来的な臨床応用のためにも、遺伝子あるいはタンパクといった基礎研究レベルでの機序の解明が切望されている。

2. 研究の目的

(1) *P. gingivalis* バイオフィルムに対する sub-MIC の AZM 作用時の機序解明のため、申請者らが既に確立したバイオフィルム系モデルを用いて、AZM の抗菌効果発現に関与する遺伝子およびタンパクを明らかにする。

(2) *P. gingivalis* に対する sub-MIC AZM 作用時の薬剤抵抗性の影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) AZM の抗バイオフィルム作用に関与するタンパクの同定

①バイオフィルムの作製

嫌気性インキュベーター内で独自に改良を加えた modified Robbins device (MRD) およびペリスタポンプを用い、MRD 中に唾液処理を施したハイドロキシアパタイト (HA) ディスクを填入し、HA ディスク上にバイオフィルムを作製した。異なる線毛の遺伝子型を持つ *P. gingivalis* 381 (線毛の血清型: I 型), HW24D1 (II 型), 6/26 (III 型) W83 (IV 型) の培養液を使用し、各種 *P. gingivalis* 菌株の培養液を 37°C、流速 3.3ml/分で 14 日間灌流し、HA ディスク上にバイオフィルムを作製した (Noiri *et al*, *J Periodontol* 74, 1647-51, 2003)。菌液の交換は 2 日毎に行い、作製されたバイオフィルムに AZM を sub-MIC を含む濃度で添加し、以下の各種実験に使用した。

②AZM の抗バイオフィルム作用に関与するタンパクの同定

前記①項の方法を用いて *P. gingivalis* 381 株のバイオフィルムを作製し、AZM 添加群および非添加のコントロール群について、菌体よりタンパクを精製し、二次元電気泳動システムを用いて分離後、AZM 添加/非添加で発現量に差の認められるものについてゲルから切り出し、抽出した。同様に、sub-MIC 添加/非添加の *P. gingivalis* バイオフィルム遊離細胞および浮遊細菌からもタンパクを精製・抽出を行い、得られたタンパクについて、LC-MS/MS を用いた質量解析を行った (外注委託)。

(2) *P. gingivalis* に対する sub-MIC AZM 作用時の薬剤抵抗性の影響

前記①項の方法を用いて各種 *P. gingivalis* 菌株のバイオフィルムを作製し、sub-MIC の AZM 添加/非添加時のバイオフィルム細胞に対する薬剤抵抗性獲得の有無について、微量液体培地希釈法 (小酒井ら, *Chemotherapy* 27,

559-61, 1979) を用いて MIC 測定を行い確認した。その際、同じマクロライド系抗菌薬であるエリスロマイシン(EM) に対する MIC も測定し、交差耐性発現の有無についても検討した。

4. 研究成果

嫌気性インキュベーター内で独自に改良を加えたmodified Robbins device (MRD) およびペリスタポンプを用い、MRD中に唾液処理を行ったハイドロキシアパタイト (HA) ディスクを填入し、HAディスク上に各種

Porphyromonas gingivalis 菌株のバイオフィルムを作製し、作製されたバイオフィルムに AZMをsub-MICを含む濃度で添加した。

Sub-MICのAZM添加/非添加時のバイオフィルム遊離細胞に対する薬剤抵抗性獲得の有無について、微量液体培地希釈法 (小酒井ら、日本化学療法学会雑誌 27、559-61、1979) を用いてMIC測定を行い確認した。その結果、sub-MIC AZM曝露群のMICは非曝露群より上昇しておらず、sub-MIC の AZM 曝露により AZM に対し耐性の獲得を認めなかった。また、同様の手法を用いて同じマクロライド系抗菌薬であるエリスロマイシン(EM) に対するMICも測定し、交差耐性発現の有無についても検討を行った結果、AZM の結果同様、EMに対しても耐性の獲得は認めなかった。

(表 1)

表 1 バイオフィルム遊離細菌のMIC

菌株	AZM		EM	
	Sub-MIC AZM	非曝露群	曝露群	曝露群
381	1.56	0.39	0.19	0.09
HW24D1	0.39	0.09	0.09	< 0.02
6/26	6.25	6.25	0.78	0.78
W83	6.25	6.25	0.78	0.78

(µg/ml)

前項の方法を用いて*P. gingivalis* 381株のバイオフィルムを作製し、AZM添加群および非添加のコントロール群について、菌体よりタンパクを精製し、二次元電気泳動システムを用いて分離後、AZM添加/非添加でタンパクの発現量について検討したところ、主に浮遊細菌とバイオフィルム遊離細胞の50および110kDa付近のタンパク発現量に相違がみられた。(図 1)

これらのタンパクについてLC-MS/MSを用いた質量解析を行ったところ、分子量が約50kDaのタンパクはグルタミン酸脱水素酵素 (gdh) およびヘマグルチニンタンパク (HagE) であり、約110kDaのタンパクはRagAタンパクであることが明らかとなった。(表 2)

図 1 AZM添加/非添加時における*P. gingivalis*のタンパク発現の検討

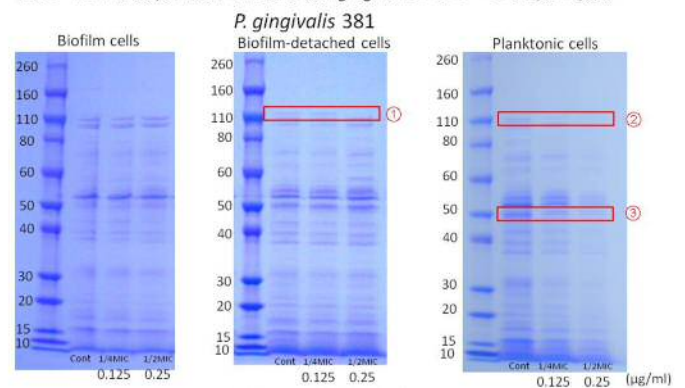


表 2 LC/MS-MSを用いたタンパク解析結果

Sample	Protein	Gene	MW
① <i>P. gingivalis</i> 381 biofilm-detached cells (110kDa)	1 RagA protein	<i>ragA</i>	114457
	2 zinc carboxypeptidase		91461
② <i>P. gingivalis</i> 381 planktonic cells (110kDa)	1 RagA protein	<i>ragA</i>	114457
	2 zinc carboxypeptidase		91461
③ <i>P. gingivalis</i> 381 planktonic cells (50kDa)	1 glutamate dehydrogenase	<i>gdh</i>	49167
	2 hemagglutinin/protease	<i>hagE</i>	183587

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 3 件)

① Yamaguchi M, Noiri Y, Kuboniwa M, Yamamoto R, Asahi Y, Maazono H, Hayashi M, Ebisu S, *Porphyromonas gingivalis* biofilms

persist after chlorhexidine treatment, Eur J Oral Sci, 査読有, Vol.121, 2013, 162-8
DOI: 10.1111/eos.12050.

② 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, Vol.8, No.2, 2013, e56017

DOI: 10.1371/journal.pone.0056017.

③ Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Izutani N, Azakami H, Ebisu S, Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*, Antimicrob Agents Chemother, 査読有, Vol.55, No.12, 2011, 5887-92

DOI: 10.1128/AAC.05169-11.

〔学会発表〕（計3件）

① H. MAEZONO, Y. NOIRI, Y. ASAH, M. YAMAGUCHI, R. YAMAMOTO, M. HAYASHI and S. EBISU, Azithromycin alters protein expressions in *Porphyromonas gingivalis* biofilm-detached cells, 第60回国際歯科研究学会日本部会（JADR）, 平成24年12月15日, 新潟県新潟市

② H. MAEZONO, Y. NOIRI, Y. ASAH, M. YAMAGUCHI, R. YAMAMOTO, K. KUREMOTO, M. HAYASHI and S. EBISU, Altered protein expressions by sub-minimum inhibitory concentrations of azithromycin on *Porphyromonas gingivalis* biofilms, ASM 6th conference on biofilms, 平成24年10月3日, Miami, USA

③ 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* バイオフィームに対する各種抗菌薬の抗バイオフィーム効果、第134回日本歯科保存学会、平成23年6月10日、千葉県浦安市

6. 研究組織

(1)研究代表者

前菌 葉月 (MAEZONO HAZUKI)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：00613390