



Title	クオラムセンシング関連物質が <i>Porphyromonas gingivalis</i> のバイオフィルム形成に及ぼす影響の検索
Author(s)	朝日, 陽子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49236
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	朝日陽子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第21928号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	クオラムセンシング関連物質が <i>Porphyromonas gingivalis</i> のバイオフィルム形成に及ぼす影響の検索
論文審査委員	(主査) 教授 恵比須繁之 (副査) 教授 天野 敦雄 准教授 永田 英樹 講師 寺尾 豊

論文内容の要旨

<研究目的>

抗菌療法に抵抗するという特性をもつ細菌バイオフィルムの抑制法として、歯科臨床においては機械的除去が行われているが、除去が困難な部位に形成されたバイオフィルムには、有効な化学的コントロール法の開発が必要とされている。細菌には、クオラムセンシング (QS) と呼ばれる自己誘導因子 (AI) を介した細胞間コミュニケーションが存在し、毒素の産生やバイオフィルム形成等に関与している。緑膿菌の AI であるアシルホモセリンラクトン (AHL) はバイオフィルム形成に係わっているが、AHL 類似化合物の一部はアンタゴニストとして QS を攪乱し、バイオフィルム形成を抑制することが報告されている。一方、慢性歯周炎や難治性根尖性歯周炎に密接に関与している *Porphyromonas gingivalis* にも AI に関する遺伝子が存在するが、その詳細については未解明な部分が多い。そこで、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成機序の解明とその阻害物質の探索を最終的な目標として、本研究では、AHL とその類似化合物が *P. gingivalis* のバイオフィルム形成に及ぼす影響を検討した。

<材料および方法>

1. AHL および AHL 類似化合物 3種類の AHL および 20種類の AHL 類似化合物は、菅 裕明博士（東京大学）らが既に合成し、作成した化合物のライブラリより選択した。

2. AHL および AHL 類似化合物がバイオフィルム形成に及ぼす影響の検索

1) バイオフィルムの形成 *P. gingivalis* 381 株を用い、AHL および AHL 類似化合物（最終濃度：10あるいは 100 μ M）を添加した菌液を嫌気的条件下にて 14 日間灌流し、modified Robbins device (MRD) 内のハイドロキシアパタイト (HA) ディスク上にバイオフィルムを形成させた。化合物を添加しないで作製したバイオフィルムを対照群とした。

2) 定量的解析、微細形態学的および3次元的検索 バイオフィルム形成細菌の定量は、HA ディスクからバイオフィルムを剥離後、波長 550 nm で吸光度を測定することにより評価し、統計学的有意差の検討には Student *t* test を用いた ($P < 0.05$)。試料の一部は、走査型電子顕微鏡 (SEM) による微細形態学的観察に供した。3次元的観察には、セルロイドディスクを MRD に装着して、上記 1) 項と同一の方法で作製したバイオフィルムを Live/Dead® Kits にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察を行った。

3. AHL類似化合物が *P. gingivalis*に及ぼす影響の多面的解析 バイオフィルム形成実験で、添加することにより、バイオフィルム形成量が抑制傾向を示した AHL類似化合物について以下の実験をおこなった。

3-1) 赤血球凝集能に及ぼす影響の検索 96穴プレートに、赤血球と菌液、AHL類似化合物（10あるいは100 μ M）を播種し、1時間後、沈殿の有無により赤血球凝集能への影響を評価した。

3-2) 細胞外マトリックスへの付着能に及ぼす影響の検索 I型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのそれぞれをコーティングした96穴プレートに菌体およびAHL類似化合物を播種し、37°Cで3時間培養した後、クリスタルバイオレット溶液にて染色し、付着細菌量を吸光度（OD₅₇₀）測定し、評価した。

3-3) 既に形成したバイオフィルムに及ぼす影響の検索 MRDにて菌液を灌流しバイオフィルムを作製した後、AHL類似化合物を添加した培地を14日間灌流し作用させた。経時的にサンプルを取り出し、バイオフィルム形成量を吸光度（OD₅₅₀）測定し、その変化を評価した。

3-4) プロテアーゼ（ジンジパイン）活性に及ぼす影響の検索 基質として、Boc-Leu-Gly-Arg-MCAおよびBoc-Val-Leu-Lys-MCAを用いた。菌液、AHL類似化合物（10あるいは100 μ M）および基質を37°Cで1時間反応後、分光蛍光光度計（励起380 nm、蛍光460 nm）にて測定した。

4. *P. gingivalis* の AHL産生能の検索 AHLのレポーター株である *Agrobacterium tumefaciens* および *Chromobacterium violaceum* を用いて、いざれかの菌株を封入した寒天培地上に *P. gingivalis* の培養上清を添加し、AHLによる寒天上の呈色反応により AHLの有無を測定した。

〈結果〉

1. 3種類のAHLのうち、C₄-HSL添加群は対照群と比べてバイオフィルム形成量が増加し、C₁₂-HSL添加群は低下した。20種類のAHL類似化合物のうち、3種類の化合物（C₁₁H₁₂N₂O₂、C₁₆H₃₂N₂O、C₁₉H₂₉NO₃）添加群は、対照群と比較して、バイオフィルム形成量が有意に減少し、9種類の化合物添加群はバイオフィルム形成量が有意に増加した。

2. *P. gingivalis*のバイオフィルム形成量を有意に低下させた3種の化合物添加群は、SEM観察ではバイオフィルムのマトリックス構造や菌体に形態的变化はみられなかったが、CLSM観察では、対照群より、バイオフィルムの厚みの減少が認められた。

3. 既に形成したバイオフィルムに対し AHL類似化合物を添加した群は、対照群と比較してバイオフィルムの経時的な変化量に有意差はみられなかった。バイオフィルム形成量を低下させた3種類の化合物添加群は、いざれの濃度においても、*P. gingivalis*の赤血球凝集能、ジンジパイン活性ならびに付着能について、対照群との間に有意差は認められなかった。

4. レポーターアッセイでは、*P. gingivalis*の上清を添加しても、*A. tumefaciens*あるいは*C. violaceum*が封入された寒天培地の色に変化は見られなかった。

〈考察〉

- ・3種類のAHL類似化合物は、*P. gingivalis*のバイオフィルム形成量を低下させ、オーラルバイオフィルムの阻害薬としての可能性が示唆された。
- ・バイオフィルム形成量を低下させた化合物間に、炭素数や置換基等についての構造活性相関は得られず、3種類の化合物全てが同じメカニズムで作用していない可能性が推察された。
- ・バイオフィルム形成を阻害した3種類の化合物は100 μ M添加群においては浮遊細菌に対しても増殖の抑制を認めたが、今回供試した化合物の中には浮遊細菌の増殖を抑制するがバイオフィルム形成量を増加させる化合物もみられ、浮遊細菌への影響とバイオフィルム形成への影響はそれぞれ異なるメカニズムである可能性が推察された。
- ・バイオフィルム形成を阻害した3種類の化合物は、*P. gingivalis*の赤血球凝集や細胞外マトリックスへの付着および既に形成したバイオフィルムに対して影響しなかったことより、バイオフィルムが成長する過程で作用することが示唆された。
- ・*P. gingivalis*は、AHL産生が認められなかったが、AHL類似化合物によりバイオフィルム形成量の変化がみられたことから、AHLを感知する機構を有することが示唆された。

〈結論〉

20種類の AHL 類似化合物のうち 3種類の化合物は、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成に対してアンタゴニストに作用することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、細菌の情報伝達機構であるクオラムセンシングに関連する物質、アシルホモセリンラクトン (AHL) およびその類似化合物が、慢性歯周炎や難治性根尖性歯周炎の主要な原因菌である *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成に及ぼす影響を検索したものである。

その結果、供試した 3種類の AHL 中の 2種類および 20種類の類似化合物中の 12種類の化合物は、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成量に影響した。そして、バイオフィルム形成量に影響を及ぼした 12種類の類似化合物中の 3種類の化合物は、バイオフィルム形成量を減少させたが、*P. gingivalis* の付着や形成されたバイオフィルムの剥離には影響せず、バイオフィルムの成長期に関与していることが明らかとなった。

以上の研究成果は、オーラルバイオフィルムの形成機序の解明とその阻害物質開発の一端を担うものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。