The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Porphyromonas gingivalis バイオフィルムに対する各種抗菌薬の影響に関する研究
Author(s)	前薗, 葉月
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58460
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

【35】

氏　　名	前園葉月（まえぞのはづき）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２４４９２　号
学位授与年月日	平成23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	*Porphyromonas gingivalis* バイオフィルムに対する各種抗菌薬の影響に関する研究
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　　准教授　寺尾　豊

論文内容の要旨

＜研究目的＞

Porphyromonas gingivalis は、ヒトの歯肉縁下バイオフィルム全域に分布し辺縁性歯周炎の進行に強く関わるほか、根尖孔外バイオフィルムからも高い頻度で検出され根尖性歯周炎の難治化にも関与するとされている。一般的にバイオフィルム細菌は抗菌薬に抵抗性を示すが、マクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシン (AZM) は、インフルエンザ菌や緑膿菌に対し最小発育阻止濃度 (MIC) 以下の濃度 (sub-MIC) でそれらのバイオフィルム形成を阻害・抑制することが報告されている。本研究では、AZM を含む 5 種類の抗菌薬が 4 種類の *P. gingivalis* 菌株のバイオフィルムに及ぼす影響を、sub-MIC を含めた各種濃度において検討した。

＜材料及び方法＞

1. 供試菌株および抗菌薬　供試菌株として、線毛のタンパクをコードする遺伝子である *fimA* の遺伝子型が異なる*P. gingivalis* 381 株、HW24D1 株、6/26 株、ならびに W83 株を用いた。抗菌薬は、15 員環マクロライド系抗菌薬の AZM、14 員環マクロライド系のエリスロマイシン (EM) 、ペニシリン系のアンピシリン (ABPC) 、ニューキノロン系のオフロキサシン (OFX) 、アミノグリコシド系のゲンタマイシン (GM) を用いた。そして、4 菌株に対するこれら抗菌薬の薬剤感受性を検討するため、日本化学療法学会標準法に準じ、連続希釈法を用いて MIC を測定した。

2. 静置系 *P. gingivalis* バイオフィルムに対する抗菌薬の影響の検討　96 穴マイクロプレートにて各種 *P. gingivalis* 菌株を 3 日間嫌気条件下にて培養後、各種抗菌薬 (0-640 μg/ml) を添加し、さらに 3 日間培養した。バイオフィルムに対する抗菌薬の影響は、1% クリスタルバイオレットで染色し、洗浄後、エタノール溶出し、吸光度 (OD_{595}) を測定することにより評価した。

3.　フローセル系 *P. gingivalis* バイオフィルムに対する抗菌薬の影響の検討

1)　バイオフィルムの作製　各種 *P. gingivalis* 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。その後、各種抗菌薬を最終濃度がそれぞれ 0.125、1 ならびに 10 μg/ml に調整した培養液を 3 日間灌流した。一方、対照群では培地のみを 3 日間灌流した。

2)　バイオフィルムの生物学的解析と 3 次元的観察　バイオフィルム細菌の生物学的活性は、HA ディスクからバイオフィルムを剥離後、ATP アナライザーにより評価し、統計学的有意差の検討には Student's *t*-test を用いた。また、3 次元的観察には、セルタイトディスクを MRD に装着し、14 日間菌液を灌流し、上記 3-1) 項と同一の方法で抗菌薬を作用させたバイオフィルムを供試した。ディスク上のバイオフィルムは Live/Dead® (BacLight™Bacterial Viability Kits) にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて 3 次元的観察を行った。

4.　Sub-MIC 抗菌薬添加が薬剤耐性およびタンパク発現に及ぼす影響の検討

上記 3-1) 項で使用した sub-MIC (0.125 μg/ml) の AZM を添加した培養液を用いて上記 1 項と同一の方法で MIC の測定を行い、バイオフィルム遊離細胞の AZM あるいは EM に対する薬剤耐性について検討した。また、*P. gingivalis* 381 株の sub-MIC の AZM あるいは EM を添加した培養液を用いてSDS-PAGEを行い、バイオフィルム遊離細胞のタンパク発現の相異について検討した。

＜結果＞

1.　供試した全 4 菌株の *P. gingivalis* 浮遊系細胞は、AZM、EM、OFX に対し感受性を示したが、ABPC および GM に対する感受性は菌株特異的であった。

2.　静置系バイオフィルムに対する各種抗菌薬の影響について検索した結果、AZM は供試した全ての菌株において、また EM は W83 株を除く 3 菌株において、sub-MIC でバイオフィルムの有意な抑制を認めた。ABPC および OFX は、一部の菌株において静置系バイオフィルムの抑制効果を示したが、いずれも MIC 以上の濃度であった。また GM は全菌株において抑制効果を示さなかった。

3.　フローセル系バイオフィルムでは、供試した全菌株に対し、AZM のみが sub-MIC で有意に抑制効果を示した。EM は 2 菌株のフローセル系バイオフィルムに対し抑制効果を認めたが、その抑制濃度はいずれも MIC 以上であった。3 次元的観察において、対照群は大部分が生菌で構成された 20-60 μm 程度の厚みを示すバイオフィルムが観察された。一方、AZM 添加群のバイオフィルムは、その厚みが減少し、1 および 10 μg/ml 添加群ではバイオフィルム中の生菌がほぼ消失している像が観察された。

4.　Sub-MIC の AZM 添加により、抗菌薬非添加の対照群と比較し、*P. gingivalis* バイオフィルム遊離細胞に耐性の獲得は認められなかった。また、sub-MIC の AZM 添加群では、EM あるいは非添加群と比べ、バイオフィルム遊離細胞の異なるタンパク発現が認められた。

＜考察＞

本研究では、4 種の *P. gingivalis* 菌株に対する各種抗菌薬の影響を浮遊系、静置系ならびにフローセル系の 3 系統を用いて検討を行った。その結果、静置系およびフローセル系で得られた結果にはある程度の相関性を認め、またフローセル系において抑制したものは静置系においても全て抑制効果を認めたため、静置系はフローセル系のような成熟したバイオフィルムのスクリーニングモデルとして有用であると推察される。

また、AZM は調べた全ての *P. gingivalis* 菌株が形成する静置系およびフローセル系バイオフィルムを sub-MIC で有意に抑制し、*P. gingivalis* が関与する辺縁性ならびに根尖性歯周炎の治療武器のひとつになる可能性が示唆された。この sub-MIC での AZM によるバイオフィルムの抑制は、AZM がバイオフィルム細菌のタンパク発現に影響を及ぼすことにより *P. gingivalis* バイオフィルムを抑制した可能性が推察された。

＜結論＞

AZM は、静置系およびフローセル系で作製した 4 菌株の *P. gingivalis* バイオフィルムを sub-MIC で抑制し、*P. gingivalis* が関与するバイオフィルム疾患の抑制法のひとつとなり得る可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，アジスロマイシンをはじめとする 5 種類の抗菌薬が慢性歯周炎や難治性根尖性歯周炎の主要な病原性細菌の１種である*Porphyromonas gingivalis*のバイオフィルムに及ぼす影響を検索したものである。

その結果，アジスロマイシンは供試した４菌株の*P. gingivalis*バイオフィルムを浮遊細菌に対する最小発育阻止濃度以下の濃度 (sub-MIC) で抑制し，抗バイオフィルム効果を有することが明らかとなった。さらに，sub-MICのアジスロマイシンに曝露した*P. gingivalis*は，耐性を獲得しないことが示唆された。

以上のことから，本研究はアジスロマイシンによるオーラルバイオフィルムの抑制法を確立する上で重要な知見を与えるものであり，博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。