

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11548

研究課題名(和文) 口腔内細菌叢と根尖性歯周炎の難治化との関係の検索

研究課題名(英文) Association of the onset of refractory periapical periodontitis with oral microbiota

研究代表者

山口 幹代 (Yamaguchi, Mikiyo)

大阪大学・歯学研究科・特任研究員

研究者番号：30523089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：根尖性歯周炎を難治化に導く細菌叢の構成を検索し、口腔内細菌叢との相関性を調べることを目的に、根管内および根尖孔外バイオフィーム構成細菌と、それぞれの患者の唾液中の細菌および歯肉縁下バイオフィーム構成細菌を遺伝子解析法により網羅的に同定した。その結果、根尖性歯周炎の難治化と唾液および歯肉縁下バイオフィーム構成細菌の細菌構成との間に明らかな相関性は認められなかったが、根尖性歯周炎および難治性根尖性歯周炎の根管内試料および根尖孔外試料では特徴的な細菌構成を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根尖性歯周炎が難治化・慢性化する主な原因は、根管内および根尖孔外の細菌であり、根管内および根尖孔外バイオフィームの細菌構成が根管治療の成否を決定する鍵になると考えられる。根尖性歯周炎を難治化に導く細菌構成および根管内および根尖孔外バイオフィームの細菌構成とそれぞれの患者の唾液および歯肉縁下バイオフィームの細菌構成の相関性を調べることで、成功率が80%程度と報告されている根管治療の予知性を高める一助となると考えられる。本研究より、根尖性歯周炎を難治化に導く細菌構成が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted sequencing analysis and comprehensive identification of the microbiota of root canal, extraradicular biofilm, saliva and subgingival biofilm to investigate the composition of microbiota leading refractory apical periodontitis. We showed that the distinctive composition of the microbiota was identified in apical periodontitis and refractory apical periodontitis.

研究分野：歯科保存学

キーワード：バイオフィーム 難治性根尖性歯周炎 口腔内細菌叢

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

根管治療の成功率は、80%程度と報告されており、根尖性歯周炎はしばしば難治化・慢性化する。根尖性歯周炎の原因は、根管の細菌感染であり、難治化・慢性化の主因は、根管内および根尖孔外における感染源の残存である。根管治療の目的は根管清掃・拡大により根管内に存在するバイオフィルムを可及的に除去し、緊密な根管充填により残存細菌の再増殖や再感染を阻止することであるが、上記のように約20%の根管治療歯でこの目的が果たせず、再治療が行われているのが現状である。

根管内および根尖孔外の細菌感染の由来はう蝕病巣、唾液、あるいはデンタルバイオフィルムであり、侵入した細菌は根管内でニッチを獲得し、バイオフィルムを形成する。また、根尖性歯周炎の難治化には歯周病原性細菌が関与しているという報告が多数存在する。しかしながら、難治性根尖性歯周炎罹患歯の根管内細菌と唾液やデンタルバイオフィルムなどの口腔内細菌叢の関連性について検索した研究はない。

### 2. 研究の目的

口腔内細菌叢に歯周病原性細菌を含む病原性の高い細菌を保菌しているものとそうでない者で、根尖性歯周炎が難治化するリスクに違いがあるのではないかと発想し、本研究では根尖性歯周炎を難治化に導く細菌種あるいは細菌叢を明らかにし、唾液中の細菌およびデンタルバイオフィルム構成細菌との相関性を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象患者の選択

大阪大学歯学部附属病院を受診し、根管治療が必要と判断された外来患者のうち、インフォームドコンセントを行い、同意の得られた患者36名を対象とした。

#### (2) 根尖性歯周炎および難治性根尖性歯周炎の診査

根管治療を実施する歯に対して、打診痛、根尖部圧痛、瘻孔、ならびに根管症状などの臨床症状および根尖部のエックス線の透過像の有無を診査し、臨床症状およびエックス線の透過像のない歯を非根尖性歯周炎症例、臨床症状あるいはエックス線の透過像はあるが、根管治療が奏功し根管充填に至った歯を根尖性歯周炎症例、根管治療で症状の改善が見られず、外科的処置が必要になった歯を難治性根尖性歯周炎症例とした。

#### (3) 臨床試料の採取

根管試料は、K file にてファイリング操作により採取した。根尖孔外バイオフィルム試料は、抜去歯または歯根端切除術あるいは再植術により切断された歯片より採取した。歯肉縁下バイオフィルム試料は歯肉縁上プラークを除去したのち、グレーシーキュレットにて採取した。

#### (4) 細菌 DNA の抽出

採取したサンプルから PowerSoil® DNA Isolation Kit を用いて細菌 DNA の抽出を行った。

#### (5) シーケンス解析による構成細菌の同定

MiSeq を用いて、16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域を対象にした抽出 DNA のシーケンス解析を行った。多様性解析は Qiime のスクリプトを用いて行った。

### 4. 研究成果

シーケンス解析で細菌構成が解析可能であった非根尖性歯周炎症例9症例、根尖性歯周炎症例8症例、難治性根尖性歯周炎症例16症例の根管試料(難治性根尖性歯周炎症例の根管試料は3症例)、根尖孔外試料(難治性根尖性歯周炎症例のみ)、唾液試料、ならびに歯肉縁下バイオフィルム試料の細菌構成にはそれぞれ個体差が認められたが、それらの平均値を算出することにより一定の傾向が認められた(図1、2)。門レベルでは、非根尖性歯周炎の根管試料に

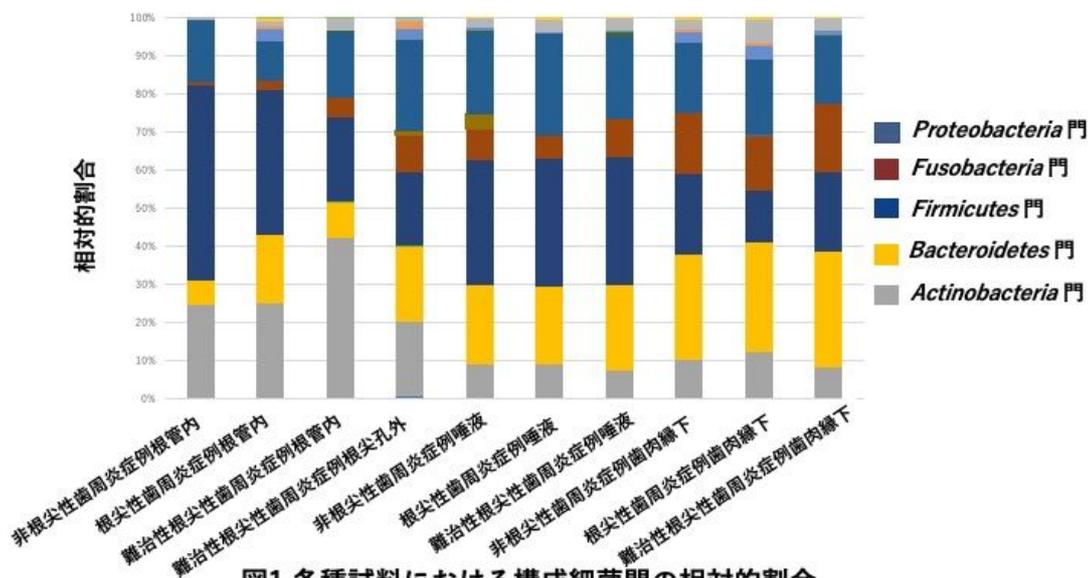


図1 各種試料における構成細菌門の相対的割合

において、*Firmicutes*門が約51%で優勢である一方で、*Bacteroidetes*門は約6%であり、他の群の根管内試料や難治性根尖性歯周炎症例の根尖孔外試料と比較し、少ない傾向がみられた(図1)。難治性根尖性歯周炎症例の根尖孔外試料では、根管内試料と比較し、*Proteobacteria*門が多く(約25%)、*Firmicutes*門は少ない傾向(約20%)がみられた(図1)。一方、唾液および歯肉縁下バイオフィルム試料では、すべての群で類似した傾向がみられた(図1)。属レベルでは、非根尖性歯周炎の根管内試料において、*Lactobacillus*属が約17%を占め、他の群の根管内試料や難治性根尖性歯周炎症例の根尖孔外試料と比較し、多い傾向がみられ、*Porphyromonas*属は少ない傾向(約0.34%)がみられた(図2)。難治性根尖性歯周炎症例の根尖孔外試料では、根管内試料と比較して、*Fusobacterium*属(約8%)および*Tannerella*属(約7%)は多い傾向がみられた(図2)。一方、門レベルでの解析と同様に、唾液および歯肉縁下バイオフィルム試料では、すべての群で類似した傾向がみられた(図2)。

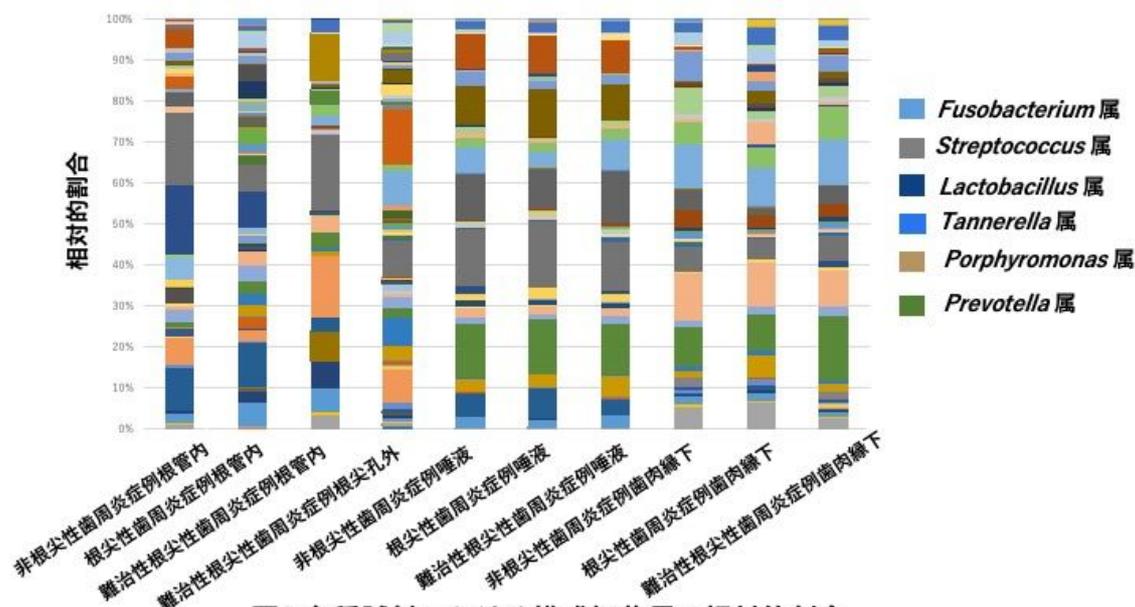


図2 各種試料における構成細菌属の相対的割合

Shannon 指数は、図3に示すように唾液試料および歯肉縁下バイオフィルム試料では、根管内試料および根尖孔外試料より高く、多様性が高いことが明らかとなった。

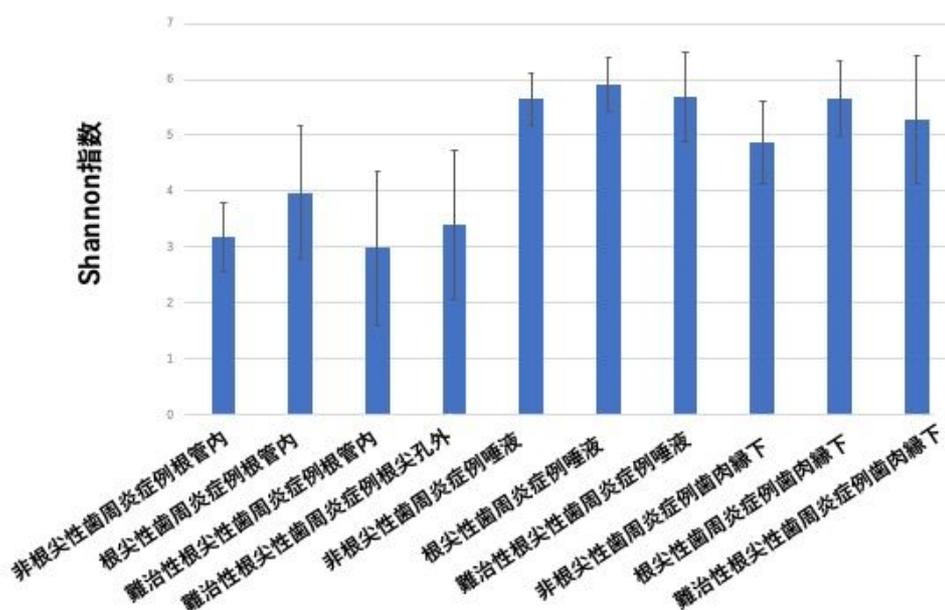


図3 各種試料のShannon 指数

以上の結果より、根尖性歯周炎の難治化と口腔内細菌叢の細菌構成との間に明らかな相関性は認められなかったが、根尖性歯周炎および難治性根尖性歯周炎の根管内試料および根尖孔外試料では特徴的な細菌構成を示すことが明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. 山口幹代, 野杵由一郎. 難治性根尖性歯周炎の原因分析. 日本歯科評論. 79:59-70, 2019. 査読無.
2. Yamaguchi M, Noiri Y, Itoh Y, Komichi S, Yagi K, Uemura R, Naruse H, Matsui S, Kuriki N, Hayashi M, Ebisu S. Factors that cause endodontic failures in general practices in Japan. BMC Oral Health. DOI: 10.1186/s12903-018-0530-6, 2018. 査読有.
3. 山口幹代, 伊藤勇紀, 須崎尚子, 堅田千裕, 外園真規, 川西雄三, 増田晃一, 伊藤善博, 米田直道, 岡本基岐, 朝日陽子, 山田朋美, 伊藤祥作, 林美加子. ニッケルチタンファイル FKG レイスによる彎曲根管形成実習の教育効果. 日本歯科保存学雑誌. 60:255-261, 2017. 査読有.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：恵比須 繁之

ローマ字氏名：Ebisu Shigeyuki

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学研究科

職名：特任教授

研究者番号(8桁)：50116000

研究分担者氏名：久保庭 雅恵

ローマ字氏名：Kuboniwa Masae

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00303983

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。