

令和元年6月2日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17129

研究課題名(和文) 根尖孔外バイオフィームに対するアジスロマイシンの効果の検索

研究課題名(英文) Study for the effect of azithromycin on extraradicular biofilms.

研究代表者

呉本 勝隆 (Kuremoto, Katsutaka)

大阪大学・歯学研究科・特任研究員

研究者番号：40734306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroにおいて抗バイオフィーム効果をもつことが報告されているマクロライド系抗生物質アジスロマイシン(AZM)をラットに経口投与することで、in vivoにてAZMの根尖孔外バイオフィームに対する効果を検討した。微細形態学的観察の結果、AZM投与群では細菌様構造は散見されたものの、バイオフィームは認められなかった。すなわち、形成された根尖孔外バイオフィームは、AZMの経口投与によってバイオフィーム構造を失い、縮小・消失する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根尖孔外にバイオフィームが形成されると、根管外から除去することが不可能であるため外科的歯内療法や抜歯以外に治療の手段がなかった。しかし、本研究によって根尖孔外バイオフィームに対する薬剤の効果が認められれば、これまで治療困難であった難治性根尖性歯周炎の新たな制御法が確立されることとなる。小動物(ラット)のin vivoモデルで薬剤の効果を評価することが可能となれば、独創的かつ臨床的な方向性に示唆を与え、貴重な結果が得られると期待される。それだけでなく、その他機械的除去が困難なバイオフィームによる感染症に対しても制御戦略の確立に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The oral administration of the macrolide antibiotic azithromycin(AZM), which has been reported to have antibiofilm effects in vitro, to rats was used to investigate the effect of AZM on extraradicular biofilms in vivo. As a result of micromorphological observation, although bacterial-like structure was scattered in the AZM administration group, no biofilm was observed. It was suggested that the formed extraradicular biofilm may lose its biofilm structure and may reduce or disappear by oral administration of AZM.

研究分野：歯内療法

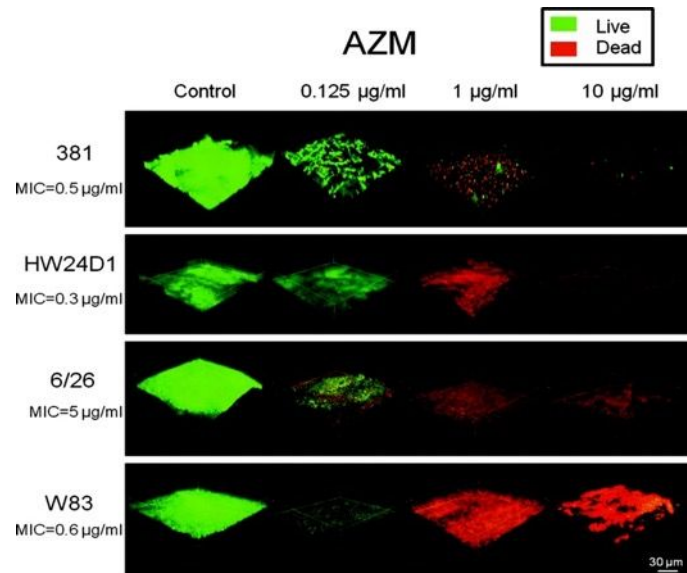
キーワード：根管治療 バイオフィーム アジスロマイシン ラット

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

1. 研究開始当初の背景

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などの口腔バイオフィーム感染症の主因であり、口腔領域の疾患と密接な関わりを持つ。また、申請者らのグループは、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、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 Endod*, 28: 679-83, 2002)。しかし、根尖孔外バイオフィームに関するこれまでの報告は、ほとんどが状況証拠であり、根尖孔外バイオフィームがどのような状況下で、どのようなメカニズムで形成されたかは未解明である。

一旦根尖孔外にバイオフィームが形成されると、根管からの機械的除去が不可能であるため、対処法としては、現状では外科的歯内療法以外になすすべがない。申請者らは他方で、根尖孔外など機械的除去が困難なバイオフィームに対する新たな戦略として、新規の化学的制御法の開発を目指した研究を精力的に行ってきた。そして、*in vitro* において、マクロライド系抗生物質であるアジスロマイシン (AZM) が抗バイオフィーム効果をもつことを報告した(図1)(Maezono *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 55:5887-92, 2011)。



この *in vitro* で得られた成果を臨床応用するための次のステップとして、*in vivo* で薬剤の有効性を検討する必要があると考え、申請者は、ラットにおける根尖孔外バイオフィームモデルの開発を試みた。そして、ラットの下顎第一臼歯近心根にガッタパーチャポイントを根尖孔外まで挿入することによって根尖孔外バイオフィームが形成されることを明らかにした(図2)(Kuremoto *et al.*, *Appl Environ Microbiol* 80:3804-10, 2014)。

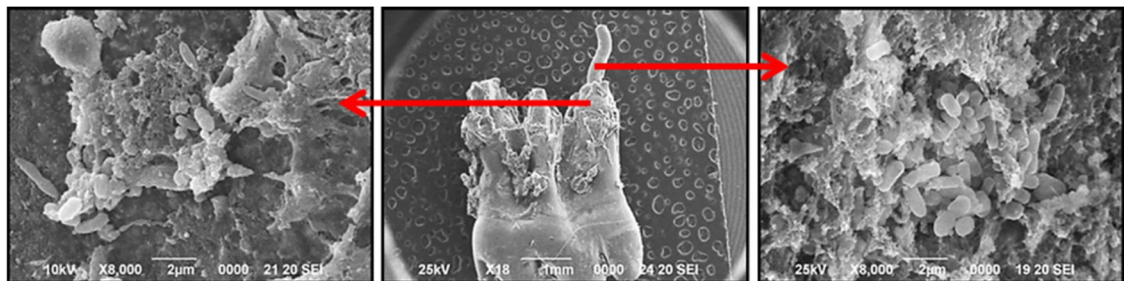


図2. ラットの下顎第一臼歯に形成された根尖孔外バイオフィーム (SEM 像)

2. 研究の目的

本研究では、*in vitro* において抗バイオフィーム効果をもつことが報告されているマクロライド系抗生物質アジスロマイシンを、実験的に根尖孔外バイオフィームを形成させたラットに経口投与することで、*in vivo* にてアジスロマイシンの根尖孔外バイオフィームに対する効果を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、まずラットの下顎第一臼歯に根尖孔外バイオフィームを形成させた。その後、AZM を経口投与し、一定期間経過後、下顎第一臼歯の根尖孔外バイオフィームの有無を微細形態学的に評価した。

実験は図3のスケジュールに則って実施した。

(1)根尖孔外バイオフィルムの形成と AZM の投与

5 週齢の雄性 Wistar 系ラットの下顎両側第一臼歯の咬合面近心小窩をラウンドバーにて露髄させ、根管を開放することによって根尖病変を形成した。露髄後 4 週に近心根にガッタパーチャポイントを根尖孔を越える位置まで挿入することにより根尖孔外バイオフィルムを形成させた (Kuremoto *et al.*, *Appl Environ Microbiol* 80:3804-10, 2014)。

その後、根尖孔外バイオフィルムが形成される露髄後 6 週に挿入したガッタパーチャポイントを除去した上で、AZM を 20 mg /kg /day 3 日間経口投与した。対照群に対しては同量の滅菌水を 3 日間経口投与した。実験に供したラットは、ガッタパーチャポイント挿入 / AZM 投与群、ガッタパーチャポイント挿入 / AZM 非投与群、ガッタパーチャポイント非挿入群の 3 群に分け、

両側の下顎第一臼歯を被験歯とした(各群 10 歯)。

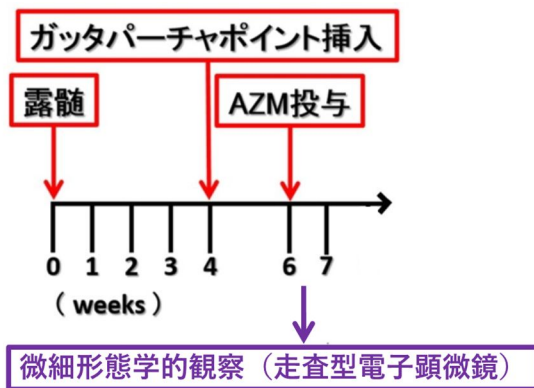


図3. 実験スケジュール

(2)根尖孔外バイオフィルムに対する AZM の効果の微細形態学的評価

上記(1)項の AZM 投与終了 1 日後、ラットを屠殺し、顎骨を摘出、下顎第一臼歯を抜歯した。得られた抜去歯試料を、固定、脱水、凍結乾燥、白金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡にて観察することにより根尖孔外バイオフィルムの形成状態を評価した。

4. 研究成果

微細形態学的観察の結果、ガッタパーチャポイント非挿入群では根尖孔外バイオフィルムは観察されなかったが、ガッタパーチャポイント挿入 / AZM 非経口投与群では根尖孔の周囲に多量の細菌様構造、バイオフィルム様構造が観察された。一方、ガッタパーチャポイント挿入 / AZM 投与群では細菌様構造 (図 4 矢印) は散見されたものの、バイオフィルムは認められなかった。すなわち、形成された根尖孔外バイオフィルムは、AZM の経口投与によってバイオフィルム構造を失い、縮小・消失する可能性が示唆された。

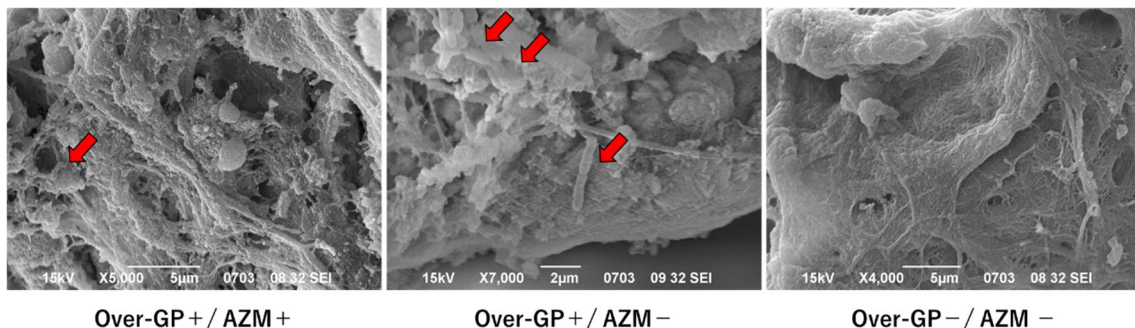


図4. AZM 投与後の根尖孔周囲の SEM 像

本研究では AZM 投与直後の根尖孔周囲を観察したものであるため、AZM 投与終了後に根管内の細菌が再度根尖孔外にバイオフィルムを形成する可能性は否定できない。したがって、AZM の経口投与のみではなく通法の感染根管治療を併用し、長期的予後についても引き続き検討していくことが必要である。それによって、根尖孔外バイオフィルムに対する新規治療法のラットを用いた評価系が確立され、AZM に限らず、他の治療薬・治療法が根尖孔外バイオフィルムに及ぼす影響を検討することが可能となり、根尖孔外バイオフィルムを原因とする難治性の根尖性歯周炎の治癒率の向上につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoneda N, Noiri Y, Matsui S, Kuremoto K, Maezono H, Ishimoto T, Nakano T, Ebisu S, Hayashi M. Development of a root canal treatment model in the rat. *Sci Rep*. 2017 Jun 12; 7(1): 3315. doi: 10.1038/s41598-017-03628-6. 査読有り。

〔学会発表〕(計 2 件)

Matsui S, Maezono H, Kuremoto K, Yoneda N, Ebisu S, Yumoto H, Ishimoto T, Nakano T,

Noiri Y, Hayashi M. High-frequency waves promote periapical healing by inducing cell growth factors, 96th IADR General Session & Exhibition, London, UK, 2018

松井沙織、前園葉月、呉本勝隆、米田直道、恵比須繁之、湯本浩通、的場一成、石本卓也、中野貴由、野杓由一郎、林 美加子：ラット根管治療モデルを用いた高周波根尖療法の評価。第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2018 年 11 月 2 日、京都

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。