

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592126

研究課題名（和文）歯内治療における電気化学的な細菌由来プロテアーゼ活性および遺伝子検出法の開発

研究課題名（英文）Development of the bacteria origin protease activity and the genetic detection method using the electrochemical technique in endodontic treatment

研究代表者

西野 宇信（NISHINO TAKANOBU）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80364157

研究成果の概要（和文）：歯内治療の成功率を向上させるためには、根管や根尖病変に存在する細菌を高精度に検出する必要がある。そのため、無菌化に関する迅速・簡便・確実なチェアサイド診断システムの開発が強く望まれている。本研究では、蛍光染色剤による細菌の検出および細菌の産生物の電気化学的手法による測定の両面にわたり検討を行った。その結果、簡易に細菌検査を行うことができる診断システム実現の可能性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In order to raise the success rate of endodontic treatment, it is necessary to precisely detect the bacteria which exist in a root canal or a periapical lesion. Therefore, a quick, simple, and positive bacteriological detection system at a chair side is strongly desired. In this study, detection of the bacteria by a fluorescence staining agent, and measurement by the electrochemical technique, were examined. Our results suggest possibility of a device to detect bacteria easily and precisely.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：根管治療，細菌由来プロテアーゼ，電気化学的検出

## 1. 研究開始当初の背景

不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎は歯周病と並び歯科医療において頻繁に遭遇する疾患である。しかし、歯内治療後に再発する根尖性歯周炎も多く、歯内治療成功率を向上させるには、複雑な根管系および根尖病巣に存在する細菌を高精度に検出し適確な除去を確認することが必須である。根管・根尖病巣に存在する細菌の検出法として、現時点では根管内からサンプルを採取し嫌気培養

によって判断する手法がとられている。しかしながら嫌気培養法は操作が煩雑であり判定までに時間がかかることや経済的側面から臨床現場への普及度は低く、いまだに病態の変化を患者の自覚・他覚症状から歯科医師が主観的に判断しているのが現状である。

歯内治療における根管・根尖孔外歯周組織の無菌化に関する迅速・簡便・確実なチェアサイド診断システムの開発は強く望まれている。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は、癌をターゲットとした電気化学的遺伝子診断技術の開発を行ってきた(Sato *et al.*, *Anal Chim Acta*, 2006; Sato *et al.*, *J Organomet Chem*, 2008). 電気化学的手法は、サンプルが極微量であっても短時間(1時間以内)で検出可能であり非常に高感度な分析法である。我々は、根尖性歯周炎の原因菌から産生される病原因子であるプロテアーゼに着目し、電気化学的手法によりプロテアーゼの存在・量を検出することで病巣における原因菌の有無を測定する、歯髄・根尖歯周組織疾患の診断システム開発を着想するに至った。

本研究の最終目標は歯髄・根尖歯周組織疾患の原因となっている細菌が産生するプロテアーゼの検出装置および各細菌特異的遺伝子の検出装置を新たに開発することにある。細菌の有無を高精度に測定することで国民にとって有益な歯内治療システムを実現することができる。

## 3. 研究の方法

### (1) 根管細菌の定量化の検討

Propidium monoazide (PMA) を用いた Real-time PCR 法による根管細菌の定量化の可能性を検討する。原因菌ライブラリーの中から難治性根尖性歯周炎の原因菌の1つとされている *Enterococcus faecalis* を選択し、死菌、生菌を一定比率に調整し1)CFUcount法、2) Live/dead BacLight を用いて観察する方法、および3)PMAを作用させた菌液を real time PCR で分析する方法を用い、各測定法により得られた値の相関を比較検討する。

### (2) *in vitro*におけるプロテアーゼ検出システムの検証

口腔内細菌に関連する酵素である gingipain (gp) は、基質特異性の異なる Arg-gingipain (Rgp)と Lys-gingipain (Kgp) が存在することが知られており、口腔中の Rgp, Kgp の存在比を知ることは、口腔内の環境を診断する上で学術的に重要な知見を与えらる。存在比を測定するために電気化学的プロテアーゼアッセイ法を適用し、図1の原理に従って Rgp, Kgp の特異的な検出を行う。すなわち異なる Redox 電位を有するフェロセンプロピオン酸またはフェロセンカルボン酸と金電極上に固定するためのシステインを認識部位の異なる基質ペプチド(FRG, FKG) に導入し、得られたペプ

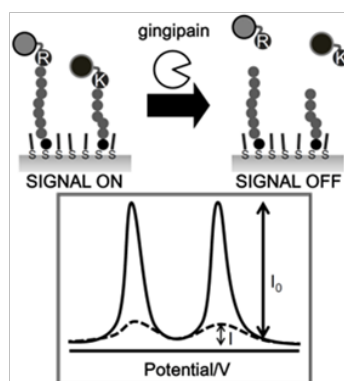


図1.口腔内細菌関連酵素 Rgp, Kgp の電気化学的同時検出の概念。

チドの金電極への同時固定化を行い実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 根管細菌の定量化の検討

70%エタノールを *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)に作用させ、死菌と生菌を一定の割合に調整した菌液を PMA 作用後に real-time PCR を行った。その結果、PMA は real-time PCR による検出過程にほぼ影響を与えないことが示された。また、本法では短時間で死菌と生菌を明確に区別できることが示された。また、real-time PCR より得られた Ct 値と CFU count 法で得られたコロニー数は高い相関を示していた。次に、次亜塩素酸ナトリウム溶液および EDTA 溶液を *E. faecalis* に作用させ、同様の実験を行った。その結果、Live/dead BacLight を用いた染色法では、次亜塩素酸ナトリウム溶液の *E. faecalis* に対する高い殺菌効果と EDTA 溶液の低い殺菌効果が短時間で示されたが、菌数定量化は困難であった。一方、PMA を用いた real-time PCR 法による分析では、各サンプルの Ct 値は明確な違いを示し CFU count 法のコロニー数も高い相関を示した。

以上の結果より、PMA は *E. faecalis* の死菌のみを染色してその PCR 法での増幅を阻害する一方、生菌の染色体 DNA の増幅にほぼ影響を与えないことが示され、PMA による染色と real-time PCR 法を併用することで、短時間で生菌のみの定量的検出が可能になることが示唆された。この方法を本研究で目指している電気化学的検出法と相関させることで、より精度の高い細菌検出が期待できる。

### (2) *in vitro*におけるプロテアーゼ検出システムの検証

Fmoc 固相合成法により FRG, FKG のフェロセン化基質ペプチドを合成した。これらのペプチドを金電極上に固定化し、Rgp, Kgp で処

理することにより、異なる電位によって Rgp, Kgp の酵素活性を観察した。電極上に 1:1 で FRG と FKG を固定化するために、この 2 つの基質ペプチドの混合比を変化させて、固定化を行い、CV 測定を行った。基質ペプチドの混合比が FRG :FKG =20 : 230 のとき、それぞれの固定化量が 1:1 となった。次に、得られた電極において、*gingivalis* 菌培養液 90  $\mu$  l で酵素反応を行ったところ、異なった Redox ピークにおいて、65 %、45 % の電流値の減少が見られた (図 2)。

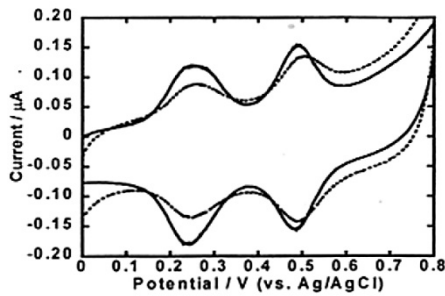


図 2. 菌培養液で処理を行う前 (実線) 後 (破線) におけるサイクリックボルタモグラム。

この値は *gingivalis* 菌培養液中の Rgp および Kgp の存在量を反映していると考えられる。また、この結果は蛍光測定により算出した存在比とほぼ一致しており、本手法が口腔内細菌の簡易検査手法へ発展できる可能性を示している。

以上より、Propidium monoazide (PMA) を用いた Real-time PCR 法および電気化学的プロテアーゼアッセイ法により、従来から行われている細菌学的検査法に比べ迅速・簡便・確実なチェアサイド診断システムが構築できる可能性が示唆された。

#### 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 6 件)

- ① 北村知昭, 永吉雅人, 西野宇信, 鷺尾絢子, 平田-土屋志津, 市丸-末松美希, 吉居慎二, 西藤法子, 廉 晃勲, 中川愛加, 中山皓平:教科書にみる歯内治療の科学的根拠と経験. 九州歯科学会雑誌, 査読有, 67(1), 2013, 1-4.
- ② Kitamura C, Nishihara T, Terashita M, Tabata Y, Washio A, Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of FGF-2 and naturally derived sponge-like scaffolds.: International Journal of Dentistry, 査読有,

volume2012, 2012, 8pages.

DOI: 10.1155/2012/190561

- ③ Shinichiro Nagata, Takeshi Ohshima, Keiichi Ohtsuka, Shinobu Sato, Masato Nagayoshi, Chiaki Kitamura, Tatsuji Nishihara, & Shigeori Takenaka, Electrochemical Detection of Periodontal Disease Using Protease Assay: Peptide Science 2011, 査読有, 1, 2012, 407-408.

- ④ Chiaki Kitamura, Tatsuji Nishihara, Masamichi Terashita, Yasuhiko Tabata, Eijiro Jimi, Ayako Washio and Shizu Hirata, Regeneration approach for dental pulp and periapical tissues with growth factors, biomaterials, and laser irradiation.: Polymers, 査読有, 3, 2011, 1776-1793.

DOI: 10.3390/polym3041776

- ⑤ Masato Nagayoshi, Tatsuji Nishihara, Keisuke Nakashima, Shigetsugu Iwaki, Ker-Kong Chen, Masamichi Terashita, and Chiaki Kitamura, Bactericidal effects of diode laser irradiation on Enterococcus faecalis using periapical lesion defect model. ISRN Dentistry, 査読有, 2011, 6 pages.

DOI: 10.5402/2011/870364

- ⑥ 北村知昭, 西野宇信, 矢野淳也, 永吉雅人, 鷺尾絢子, 平田志津, 吉居慎二, 西藤法子, 歯科保存学の現状と先端科学, 九州歯科学会雑誌, 査読有, 64, 2010, 66-73.

[学会発表] (計 18 件)

- ① Nishino T, 3D FEA of fiber post-core construction for endodontically treated teeth, The Fifth Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, 2012年10月26日, 北九州.
- ② 島本隼平, フェロセン化ペプチド修飾電極を用いた歯周病関連酵素ジンジパインの活性検出, 日本分析化学会第 61 年会, 2012年9月21日, 金沢.
- ③ 永吉雅人, 歯内治療における術後疼痛の分析—感染根管治療における術後疼痛の発生頻度に影響を与える因子の解析, 第 33 回日本歯内療法学会学術大会, 2012年6月16, 17日, 東京.
- ④ 永吉雅人, 歯内治療における術後疼痛の分析 — (1) 根管治療中の術後疼痛の発生頻度と根尖孔穿通が術後疼痛出現に与える影響の解析, 第 72 回九州歯科学会総会, 2012年5月19, 20日, 北九州.
- ⑤ 永吉雅人, 感染根管治療時の意図的根尖狭窄部拡大が術後疼痛発生に与える影響と非歯原性疼痛との関連の検討, 日本歯科

保存学会秋季学術大会, 2011年10月20, 21日, 大阪.

⑥ NAGAYOSHI Masato, Quantification of Endodontic bacteria using Propidium Monoazide (PMA), with Real-time PCR., Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2010年11月20, 21日, 北九州.

⑦ 永吉雅人, Propidium monoazide (PMA) を用いた Real-time PCR 法による根管内細菌の定量化の試み, 日本歯科保存学会秋季学術大会, 2010年10月28, 29日, 岐阜.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西野 宇信 (NISHINO TAKANOBU)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 80364157

### (2) 研究分担者

永吉 雅人 (NAGAYOSHI MASATO)  
九州歯科大学・歯学部・特別研修員  
研究者番号: 30382419

佐藤 しのぶ (SATOU SHINOBU)  
九州工業大学・工学部・准教授  
研究者番号: 80510677

北村 知昭 (KITAMURA CHIAKI)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 50265005

西原 達次 (NISHIHARA TATSUJI)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 80192251