

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 5 月 31 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592236

研究課題名（和文） 顎関節症の病因病態形成への細菌の関与：患者の滑液と滑膜における遺伝子解析

研究課題名（英文） Bacterial influence to the etiology of temporomandibular joint disorders:a cloning and sequencing analysis

研究代表者

瀬上 夏樹 (SEGAMI NATSUKI)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：40148721

研究成果の概要（和文）：

顎関節症患者からの採取試料（滑液および滑膜組織）を対象とした幅広い生化学的研究（滑液微量解析および免疫組織化学的解析：蛋白、炎症性サイトカイン、発痛物質、造骨破骨物質）の一環研究として下記について遂行した。40 例の患者滑液を希釈回収し PCR 法による細菌 DNA 研究を開始したが、20 関節（64.5%）において 11 種の細菌を検出し、とくに 90%の変形性顎関節症患者で細菌が検出同定され、45 歳以上の高齢者に多く同定される傾向を示した。また、滑液中蛋白およびサイトカイン濃度との正の相関が得られた。細菌陽性群と陰性群の滑液中サイトカインおよび蛋白を測定し比較検討したところ、細菌陽性群では、蛋白およびサイトカイン濃度が有意に高値であった。化膿性顎関節炎が示唆された 3 例では、菌検査が陰性であったが DNA 解析では炎症性サイトカインの著明上昇とともに細菌陽性が確認されたことから、通法の菌検査では同定困難なレベルの感染が顎関節症の増悪因子として存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Universal bacterial primers were used to amplify 16S rRNA genes in 31 synovial fluid samples from 31 patients with TMD (TMD group). Subsequently, PCR amplicons were purified and cloned. Partial 16S rRNA sequences of the cloned insert were used to determine the species identities or closest relative by comparison with known sequences using GeneBank. In results, 20 of 31 samples (64.5%) from patients in the TMD group were identified with the presence of bacterial DNA by PCR. The 5 control samples from the nonTMD group were all negative in this study. In conclusion, a wide variety of bacteria, including some not previously reported associated with TMD, were identified in the synovial fluids from patients with TMD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：顎関節症・細菌感染・滑液・遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

顎関節症は非感染性の慢性疾患と考えられてきた。しかし最近、この概念を覆す可能性のある報告が相次いでいる。まず 1996 年に整形外科領域では、反応性膝関節炎における潜在性細菌感染の存在を遺伝子レベルで示した報告 (Nikkari S ら, *Arthritis Rheum* 1996) から現在まで検討が進んでいるが、統一した見解に至る結論は得られていない。その後、顎関節症においても関節滑液中で細菌 DNA に関する報告が散見され、Henry らによる *Chlamydia* および *Mycoplasma* の同定 (JOMS 2000, Triple O 2001, JOMS 2002)、Kim らによる *Chlamydia* の同定 (JOMS 2003)、Paegle らの *Chlamydia* の同定 (JOMS 2004) が渉猟される。これらは、顎関節症と細菌感染の関連を示唆するものであるが、一部の細菌のみを標的とした検討にとどまり不十分である。一方、最近の ribosomal RNA primer を用いた Polymerase Chain Reaction 法の確立など研究手法の発展により、広範囲の DNA を標的とした検索を行うことで、より正確な結論を導くことが可能となった。この応用により、本年では PCR 法は動脈瘤や髄膜炎の細菌検索に応用されるなど広く適応されているが、顎関節症研究における応用報告は皆無である。

2. 研究の目的

顎関節症に関する数多くの基礎的臨床的研究により、疾病の詳細な病態、メカニズムに関する究明が進む一方で、病因に関する明確な解明には未だ至っていない。他の研究者による報告では、*Chlamydia* あるいは *Mycoplasma* などの同定を結論づけられているが、DNA 解析を基にする本予備研究結果では、上記以外の 11 種類の細菌が同定されており興味深い。また本研究は、顎関節内で検出される細菌と、顎関節症の病因あるいは病態進展プロセスの関連を明らかにすることを目的に、患者より採取した滑液および滑

膜組織を対象に PCR 法による細菌 DNA 解析を遂行するものである。本研究の特長は、これまでに報告されていない PCR 法による細菌 DNA 解析を行うもので、従来の一般細菌検査よりもはるかに精度の高い検出手法であることで、予備実験において多くの知見が既に得られている。また、患者の関節滑液と滑膜を対象とすることから、世界的にも類を見ない貴重な病因解明と新規治療法の開発をもたらす可能性を含んでいる。

3. 研究の方法

高い精度と信頼性をもつ PCR 法を用いて、顎関節症における局所の細菌の存在の有無を確定したうえで、細菌の病態形成への役割を明らかにする目的で以下の検討を行う。採取した滑液および滑膜組織から DNA を抽出し (DNA 抽出キット: DNA Reagent, Invitrogen)、16SrRNA 系統解析法により Universal bacterial primer を用いて PCR 法を行う。精製 DNA のクローニング、プラスミド DNA の抽出として、Positive band が検出されれば PCR 産物を精製し、精製された DNA を T-A クローニングキットを用いてクローニングする。臭化エチジウム染色を行い紫外線下で観察し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Japan) を用いてプラスミド DNA を抽出する。さらに DNA 配列の決定、細菌の同定を行うが、抽出された DNA を ABI 反応液 (Applied Biosystem USA) に作用させ、Genetyx-win(version3,2) ソフトを用いて配列データを分析し、ジーンバンクの 16S rRNA 遺伝子配列と比較し細菌の同定を行う。

当教室では既に 37 例 38 関節の顎関節症患者の上腔穿刺により無菌的に採取した希釈滑液をコントロール (習慣性顎関節脱臼患者 7 例 7 関節) と比較した結果、患者群では 25 関節 (65.8%) で 11 種の細菌 DNA を検出している。本研究では、症例を追加して病態比較

を詳細に行うとともに、内視鏡的に採取した滑膜組織より DNA 抽出のうえ、同様に組織内での細菌同定をはかる。これにより、整形外科領域でも未だ結論が得られていない関節疾患と細菌の関係を明確にすることが可能と考えられ、治療体系への貢献も可能である。

4. 研究成果

顎関節症患者（顎関節内障および変形性顎関節症）からの採取試料（滑液および滑膜組織）を対象とした幅広い生化学的研究（滑液微量解析および免疫組織化学的解析：蛋白、炎症性サイトカイン、発痛物質、造骨破骨物質）の一環研究として下記について遂行した。40例の患者滑液を希釈回収し PCR 法による細菌 DNA 研究を開始したが、23 関節（57.5%）において 11 種の細菌を検出し、とくに 90%の変形性顎関節症患者で細菌が検出同定され、45歳以上の高齢者に多く同定される傾向を示した。また、滑液中蛋白およびサイトカイン濃度との正の相関が得られた。細菌陽性群と細菌陰性群の滑液中における炎症性サイトカインおよび蛋白質分解酵素を測定し比較検討したところ、細菌陽性群では、蛋白およびサイトカイン濃度が有意に高値であり亢進した炎症反応の存在が示唆された。さらに化膿性顎関節炎が強く示唆された 3 例において、菌検査が陰性で否定されたが、同時に施行した滑液の DNA 解析では炎症性サイトカインの著明上昇とともに細菌陽性が確認されたことから、通法の菌検査では同定困難なレベルの感染が顎関節症の増悪因子として存在することが示唆された。また、耳前部の腫脹と離解、強度の運動通を呈し、咬合化膿性顎関節炎が強く疑われた他患者 3 例では、菌検査が陰性であったが DNA 解析では炎症性サイトカインの著明上昇とともに細菌陽性が確認されたことから、通法の菌検査では同定困難なレベルの感染が顎関節症の増悪因子として存在することが示唆された。とくに 100%の変形性顎関節症患者で細菌が検出され、45 歳以上の高齢者に多く同定される傾向を示した。また、滑液中蛋白およびサイトカイン濃度との正の相関が得られた。これらの結果は、関節内に存在する細菌が炎症反応を増幅させ、病態進行へ多大に

関与する事を示す極めて有意義なものであるが、一方で病因論については、顎関節症が感染症である可能性に関して、断定的な結論には程遠く、さらに詳細な検討が必要である。以上より、本研究が顎関節症研究の新たな展開をもたらすと同時に、病態解明と治療法開発に多大に貢献するものと考えられる。

顎関節症の病態形成は、メカニカルストレスによって起こる滑膜炎を主座とした炎症性の免疫反応により発生するとの報告がなされているが、整形外科領域におけるリウマチ性膝関節炎を主体とした細菌同定に関する研究を参照しても、顎関節症が細菌による感染性疾患とは考えにくい。しかしながら、本講座での予備研究結果における滑液中の細菌同定や蛋白濃度の上昇、MR 画像における浸出液像の抽出度との相関から、顎関節内の細菌の存在が炎症反応をさらに増幅し病態形成に関与する可能性が示唆される。

これらの結果は、関節内に存在する細菌が炎症反応を増幅させ、病態進行へ多大に関与する事を示す極めて有意義なものであるが、以上より、本研究が顎関節症研究の新たな展開をもたらすと同時に、病態解明と治療法開発に多大に貢献するものと考えられた。今後継続すべき研究項目として下記が挙げられる。

今後、症例を追加して滑液解析を継続するが、保存療法無効で顎関節円板切除術を施行した 10 例の顎関節症患者から滑膜組織を採取し、精製 DNA のクローニング、プラスミド DNA を抽出検討中である。なお習慣性顎関節脱臼患者 5 例の滑液滑膜をコントロール群とする。

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 3 件）

① kaneyama K., Segami N., Nishiura R., Yoshimura H. Internal derangement of the temporomandibular joint with mouth-closing disturbance caused by a thickness of retrodiscal tissue: a case report. J Oral Maxillofac Surg. 査読有. 69 卷. 2011. 1052-1055

②Segami N. High condylectomy and/or eminectomy under local anesthesia for medically compromised patients with habitual dislocation of the temporomandibular joint. European Association of Cranio-Maxillofacial surgery. 査読無. 2010. 353-356

③Kaneyama K. Segami N. Yoshimura H. Honjo M. Demura N. Increased levels of soluble cytokine receptors in the synovial fluid of temporomandibular joint disorders in relation to joint effusion on magnetic resonance images. J Oral Maxillofac Surg 査読有. 68 卷. 2010.1088-1093

〔学会発表〕(計3件)

①Segami N. Surgical reduction for TMJ dislocation via simplified direct approach technique-A survey 40 patients. 21th Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery. 2012, Sep. Croatia

②瀬上夏樹、ミニレクチャー：局麻鎮静下の直達アプローチによる顎関節脱臼手術法－30例の経験から－、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、2011、10月、大阪

③Segami N. Eminectomy with/without high condylectomy under local anesthesia for habitual dislocation of the TMJ. 20th Congress of the european association for cranio-maxillofacial surgery2010. Sep. Belgium

〔図書〕(計2件)

①瀬上夏樹、他、今日の治療指針 2012 (歯科・口腔外科疾患「顎関節症(顎関節脱臼を含む)」)、医学書院、2012、1955

〔産業財産権〕

②瀬上夏樹、他、よくわかる歯科医学・口腔ケア、「顎関節脱臼」、医学情報社、2011、54-55

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬上 夏樹 (SEGAMI NATSUKI)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：40148721

(2) 研究分担者

金山 景錫(KANEYAMA KEISEKI)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：50329380

本庄 美穂 (HONJO MIHO)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：70424900

小野 徹(ONO TORU)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：60297968
(H22→H23)