

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号： 14401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2011 ～ 2012
 課題番号： 23792172
 研究課題名（和文） 歯内療法における術中感染に関する遺伝子工学的解析
 研究課題名（英文） Analysis of infection control on endodontic treatment using genetic engineering method
 研究代表者
 永山 智崇 （NAGAYAMA TOMOTAKA）
 大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員
 研究者番号： 60456944

研究成果の概要（和文）：歯内療法における術中感染の実態を明らかにする目的で、抜髄と感染根管治療、ラバーダム防湿の有無で分類した 4 群について、根管治療開始時ならびに最終拡大時の根管内バイオフィーム構成細菌を、さらに一部の症例では、患者の唾液や患歯歯頸部のデンタルバイオフィーム中、あるいは術者のグローブ表面の細菌についても 16S rRNA 遺伝子解析法により解析した。その結果、感染経路については完全な特定は困難であったものの、ラバーダム防湿が術中感染の制御に効果的であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To clarify the precise condition of infection control on endodontic treatment, bacterial biofilm in root canal before or after treatment, which was classified into 4 groups (pulpectomy or infected root canal treatment, with or without rubber dam isolation technique), was analyzed by PCR-based 16S rRNA gene assay. Furthermore, patient's saliva, dental plaque and glove was analyzed similarly. Although it was difficult to clarify the route of infection completely, we demonstrated the usefulness of rubber dam isolation technique for infection control on endodontic treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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： 歯学、歯内療法学、細菌、バイオフィーム、術中感染、ラバーダム防湿、16S rRNA 遺伝子解析法

1. 研究開始当初の背景

根尖病変が成立する原因は細菌感染であることが示されている（Kakehashi S et al, Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965）。その細菌の多くはう蝕から歯髄腔に侵入し、歯髄炎を惹起するか、あるいは無症状のまま歯髄壊死を起こし根尖性歯周炎を誘発する。そして、根尖性歯周疾患罹患歯の根管には、う蝕病巣由来の細菌種や、いわゆる歯周病原性細菌と称される歯肉縁下バイオフィーム

に生息する細菌種など、多くのオーラルバイオフィーム細菌が存在していることが示されており、これらはセメント質近傍まで象牙細管内へ侵入していることが報告されている（Matsuo T et al, J Endod. 2003）。したがって、根管拡大により根管内バイオフィームをある程度コントロールすることは可能であるが無菌化は不可能であり、それを補う意味で残存細菌の増殖や再感染を阻止すべく緊密な根管充填が要求される。

一方、抜髄や感染根管治療は歯科医療にお

いて基本的かつ日常的な処置内容であるにもかかわらず、医療先進国におけるその治療成績は文献的にみると、初めて行う根管治療（多くは抜髄と推察される）においても再根管治療においても、成功率はおよそ75%と報告されている（Ng YL et al, Int Endod J, 2007, 2008。すなわち、根管処置症例では4例中1例の割合で、短期的あるいは中期的に病気の発症や再発が生じているのが現状である。そこで、実際の臨床における経過不良症例の原因を感染制御の観点より再考すると、感染源の取り残しや不十分な根管充填以外にも、特にラバーダム防湿を実施しなかった場合には、根管内への唾液やデンタルブランクの混入、あるいは口腔粘膜や歯牙に接触した術者のグローブ由来の感染などの問題が生じる可能性が存在する。したがって、歯内療法を成功に導くには、適切な根管拡大と緊密な根管充填を行うとともに、術中感染の予防と制御（無菌的処置）が重要なポイントになると考えられる。しかしながら、根管治療において、実際にどの程度の数や種類の細菌が根管内に意図せず侵入しているのかといった疑問や、また侵入した細菌がどの程度根尖性歯周炎の病態に関わっているのか、といった疑問に対する科学的なエビデンスについては、未だ明らかになっていないのが現状である。

そこで申請者は、術中感染の制御を目的に使用されているラバーダム防湿に着目し、その効果の実態を細菌学的に明らかにすることが、感染制御を本質的に理解し、臨床の現場において質の高い歯内療法を実践するために必要不可欠であると考え、本研究を着想するに至った。



図1. ラバーダム防湿無しの根管
(唾液の混入が認められる)



図2. ラバーダム防湿ありの根管
(無菌的な環境が確立されている)

2. 研究の目的

本研究では、以下の点について明らかにすることを目的とする。

(1) 遺伝子工学的手法（16S rRNA 遺伝子解析法）を用いて、抜髄と感染根管治療を行う際の、根管治療開始時（術前）および最終拡大時（術後）の根管内バイオフィーム構成細菌を検索し、各々をラバーダム防湿の有無で分類して解析することにより、術中感染の実態を明らかにする。

(2) さらに、患者の唾液や患歯歯頸部のデンタルバイオフィーム中、あるいは術者のグローブ表面の細菌を検索し、根管内の検索結果と比較検討することにより、術中感染の感染経路を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) バイオフィーム試料の採取

大阪大学歯学部附属病院保存科を受診し、歯髄炎および根尖性歯周炎罹患歯を有し抜髄あるいは感染根管治療が必要と診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を対象とする。抜髄と感染根管治療、さらにラバーダム防湿の有無で4群に分類し、術前および術後に根尖部の根管象牙質切片を滅菌されたファイルで採取し、得られる試料は直ちに凍結保存する。根管治療については基本的に原則に従ってラバーダム防湿下で行うが、残根状態などでやむを得ずラバーダム防湿が不可能な症例に関しては、可及的に簡易防湿を行うことにする。また、感染経路を検索するた

め、各患者の唾液や患歯歯頸部のデンタルバイオフィルム、あるいは術者のグローブの表面の一部を滅菌されたペーパーポイントで採取し、同様に凍結保存する。

(2) バイオフィーム構成細菌種の解析

凍結バイオフィルム試料は、10 試料毎に 16s rRNA 遺伝子を用いた解析に供する。すなわち、前頁(1)で得られる試料から、超音波処理によりバイオフィルムを剥離し、細菌由来ゲノム DNA を回収し、抽出する。得られる DNA 増幅した後、16S rRNA 遺伝子の保存領域に対するプライマーを用いてサーマルサイクラーによる PCR 法を行い、根尖部細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅する。得られる PCR 産物は TA クローニング法によりベクターに挿入し、その後大腸菌への形質転換を行い、プラスミドライブラリーを作成する。それぞれの大腸菌クローンからプラスミド DNA を回収し、シーケンサーによりそれぞれのインサートの塩基配列を決定する。得られる塩基配列を、NCBI database Blast N Program にて照合し、配列解析ソフトによりマルチアライメントを行い、配列間の進化距離を計算して系統樹を作成するとともに、培養不可能な未同定細菌についても 16S rRNA の全配列を決定し、それらの細菌種を明らかにする。

(3) 歯内療法における術中感染の実態の解明

“抜髄・ラバーダム防湿有り”群と“抜髄・ラバーダム防湿無し”群の術前および術後のバイオフィルム構成細菌種の解析結果を比較検討することにより、術中感染した細菌種を明らかにする。

(4) 歯内療法における術中感染の感染経路の解明

“抜髄・ラバーダム防湿有り”群と“抜髄・ラバーダム防湿無し”群の術前と術後、および“感染根管治療・ラバーダム防湿有り”群と“感染根管治療・ラバーダム防湿無し”群の術前と術後のバイオフィルム構成細菌種の解析結果を比較検討することにより、ラバーダム防湿による術中感染の予防効果を評価する。さらに、それぞれについて、患者の唾液や患歯歯頸部のデンタルバイオフィルム中、あるいは術者のグローブに付着している細菌種の解析結果と比較検討することにより、術中感染の感染経路を明らかにする。

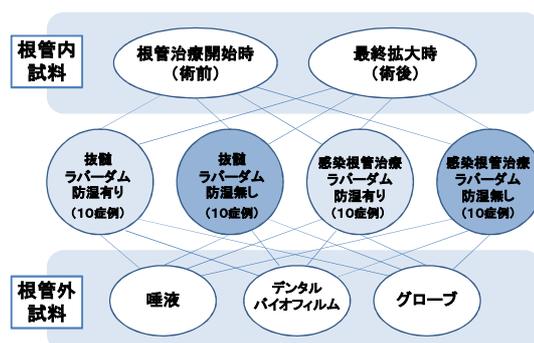


図3. バイオフィーム資料の群分けと採取部位および目標症例数

4. 研究成果

“抜髄・ラバーダム防湿有り”群では、術前 8 資料、術後 8 資料、計 16 資料を採取した。術前 8 資料のうち 7 資料（便宜抜髄 5 資料含む）で細菌が検出されなかった。一方、術後 8 資料のうち 6 資料（便宜抜髄 5 資料含む）で細菌が検出されなかった。術前に細菌が検出された症例は歯髄に近接した深在性かつ大きなう蝕を有した生活歯の抜髄であり、*Actinomyces viscosus* や *Actinomyces oris* などが検出されたことから、う蝕病巣の細菌が根管内にコンタミネーションしたか、あるいはその一部がすでに歯髄腔に侵入していた可能性が示唆された。一方、術後に細菌が検出された症例においては、検出頻度は減少していたが *Actinomyces viscosus* や *Actinomyces oris* が検出され、さらに *Corynebacterium durum* や *Haemophilus sp* も検出されたことから、感染源が完全に除去しきれていない可能性や口腔外からの術中感染が生じた可能性が示唆された。

“抜髄・ラバーダム防湿無し”群については、現時点ではラバーダム防湿が不可能と思われる症例の資料までは採取したが解析段階まで進んでおらず、プラークや歯周ポケット由来の細菌が根管内にコンタミネーションするのかどうかについては明らかになっていない。しかし、歯髄炎、ラバーダム防湿ありの群の全症例において、プラークや歯周ポケット由来の細菌が全く検出されていない事実から考えると、ラバーダム防湿は口腔内細菌に対する術中感染の予防に一定の効果があると推察された。

次に、“感染根管治療、ラバーダム防湿有り”群では、術前 9 資料、術後 9 資料、計 18 資料を採取した。術前 9 資料のうち 6 資料で細菌が検出され、残りの 3 資料では細菌が検出されなかった。この 3 資料はいずれも歯髄壊死かつ根尖病変がない症例であったため、

根管バイオフィルムの量が比較的少なく、検出限界以下だったものと考えた。一方、術後の9資料のうち5資料では細菌が検出されなくなり、根管内の感染源の除去がある程度達成されたと考えた。細菌が検出された残りの4資料のうち、術前も術後も細菌が検出された3症例については、*Uncultured Bacterium* が最多で、他にも *Olsenella*、*Prevotella*、*Stenotrophomonas* などが多く見られたが、術前と術後を比較すると、偏性嫌気性が5.6%から15.3%に、嫌気性菌が27.8%から53.8%と優勢になり、細菌叢が変化している傾向が認められた。術前に細菌が検出されず術後に細菌が検出された1症例については、*Prevotella*、*Porphiromonas*、*Capnocytophaga* などが認められ、プラークや歯周ポケット由来の細菌による術中感染が生じた可能性が示唆された。この感染経路については、感染根管治療開始時の隔壁形成時に患歯歯頸部のデンタルバイオフィルムが根管内にコンタミネーションした可能性が推察された。

“感染根管治療・ラバーダム無し”群については、現時点では術前の資料数が不足しており、他の群や術後との比較は行えていない。一方、術後の資料で細菌が検出された症例では、“感染根管治療・ラバーダム防湿有り”群の術後で検出された細菌種と大きな相違が存在する傾向は認められなかった。したがって、感染根管治療での解析では、感染根管における根管バイオフィルム構成細菌の実態は明らかにできても、術中感染の実態を捉えたり感染経路を特定することは困難であると思われる。よって、今後はラバーダム防湿の有無での比較とともに、難治性根尖性歯周炎における根尖孔外バイオフィルム構成細菌との関連性についても検討を加えていきたいと考えている。

最後に、各患者の唾液や患歯歯頸部のデンタルバイオフィルム、あるいは術者のグローブの資料については現在資料採取まで完了しており、不足している根管バイオフィルム資料の採取と合わせて今後更なる解析を進めていく予定である。

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1件)

1. う蝕象牙質除去後の残存細菌に Er:YAG レーザーが与える影響: 高橋雄介, 吉岡靖介, 朝日陽子, 永山智崇, 野杻由一郎, 林美加子. 日歯科保誌, 56(1): 1~8, 2013, 査読有.

[学会発表] (計3件)

1. 根尖孔外バイオフィルムモデルにおける

ラット根尖病巣のマイクロ CT 解析: 吳本勝隆, 野杻由一郎, 永山智崇, 騎馬和歌子, 前菌葉月, 山本れいこ, 米田直道, 林美加子, 恵比須繁之, 石本卓也, 中野貴由. 第137回秋季日本歯科保存学会. 2012. 11. 23. 広島

2. 難治性根尖性歯周炎に関わるバイオフィルム構成細菌種と臨床症状との関係: 藪根敏晃, 野杻由一郎, 山本れいこ, 山口幹代, 朝日陽子, 前菌葉月, 永山智崇, 吳本勝隆, 騎馬和歌子, 林美加子, 恵比須繁之. 第136回春季日本歯科保存学会. 2012. 6. 29. 沖縄

3. 軟化象牙質除去後の残存細菌に対して Er:YAG レーザーが与える影響: 吉岡靖介, 野杻由一郎, 高橋雄介, 藪根敏晃, 朝日陽子, 永山智崇, 古谷優, 栗本絵里子, 北川蘭奈, 武田侑子, 大嶋淳, 山本由美子, 住岡龍一, 永井真澄, 板東秀典, 林美加子. 第136回春季日本歯科保存学会. 2012. 6. 29. 沖縄

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永山 智崇 (NAGAYAMA TOMOTAKA)

大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員

研究者番号: 60456944