

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462880

研究課題名(和文) 難治性根尖性歯周疾患形成の原因追究に関する多面的解析

研究課題名(英文) Multi-faceted analysis of cause investigation on refractory periapical periodontitis

研究代表者

永山 智崇 (NAGAYAMA, TOMOTAKA)

大阪大学・歯学研究科・招聘教員

研究者番号：60456944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：難治性根尖性歯周炎の原因を明らかにする目的で、歯根端切除術あるいは抜歯により得られた根尖部におけるバイオフィームについて、16s rRNA遺伝子解析法により検索した。さらに、走査型電子顕微鏡(SEM)による微細形態学的検索や、臨床的な診査も加えて、基礎と臨床の両面から病態を解析した。その結果、根尖孔外バイオフィーム以外にも、根尖病変の3次元形状や根尖部の解剖学的形態、咬合性外傷といった他の要素も関与しており、難治性根尖性歯周炎はこれらの要素が複合した多様な病態を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the cause of refractory periapical periodontitis, bacterial biofilm on root apex obtained by apicoectomy or tooth extraction was investigated by PCR-based 16s rRNA gene assay. In addition, we performed morphologically examination by scanning electron microscope and clinical examination in order to analyze pathology from both the basic and clinical aspects. As a result, we demonstrated the various patterns of pathology on refractory periapical periodontitis combined with multiple factors such as the 3D shape of apical lesion, anatomical form of root apex and occlusal trauma in addition to extraradicular biofilm.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯内療法学 細菌 バイオフィーム 難治性根尖性歯周炎 16s rRNA遺伝子解析法 CBCT 咬合性外傷

1. 研究開始当初の背景

歯内療法の成功率は、初回の根管治療、再根管治療ともに概ね 75%と報告されている (Ng YL et al, *Int Endod J*, 2007, 2008)。再根管治療を行ったにもかかわらず経過不良となった症例に対しては一般的に外科的歯内療法 (歯根端切除術や意図的再植法) あるいは抜歯という手段が取られているが、再根管治療と歯根端切除術の併用療法でも成功率は 81%と報告されており (Wu MK et al, *Int Endod J*, 2009)、未だに根管治療の成功率が 100%にならないのが現状である。経過不良症例については、きっちりと原則に沿った処置を行っていれば回避できたものから、歯の解剖学・病理学的問題、細菌学・免疫学的問題、治療手技に起因する問題などを背景としたいわゆる“エンド難症例”まで様々なカテゴリーが存在することが知られている。さらに、根管内に臨床上的問題がなくかつ通法の歯内療法を施しても治癒しない、いわゆる難治性根尖性歯周炎に陥った症例も臨床ではしばしば経験する。結果的に破折や穿孔など歯科治療中の偶発事故の問題や病理解剖学的問題が原因であった症例を除くと、実に 80%以上 (11 症例中 9 症例) で根尖孔外バイオフィームが関与しているという報告があり (Noiri Y et al, *J Endod*, 2002)、現状では消去法的な診断により外科的歯内療法による保存や抜歯・欠損補綴という次善策が講じられている。

一方で、我々が行った 16s rRNA 遺伝子解析法による研究では、外科的歯内療法で 31% (32 症例中 10 症例)、抜歯で 65% (23 症例中 15 症例) しか根尖孔外バイオフィームが関与しておらず (第 136 回日本歯科保存学会春季学術大会 2012)、難治性根尖性歯周炎の原因は他の要素も含めてより詳細に検討する必要があることが示唆された。

ここで難治性根尖性歯周炎の原因を根尖部歯周組織の病態に絞って考えると、細菌性因子 (根管/根尖孔外バイオフィーム) の他に、生体応答性因子 (根尖病変の病態や 3 次元の拡がり、個体差)、環境因子 (根尖吸収、咬合性外傷) などの要素が複雑に絡み合っているものと推察される。臨床的にはどの要素がどの程度病態に影響を与えているかを把握することができればそれに対する個別の方策を考えることができ、Minimum intervention の観点からもその診断的価値ならびに治療方針への影響は極めて大きいと思われる。しかしながら、難治性根尖性歯周炎の病態を包括的に捉えた解析は未だ行われていないのが現状である。

そこで我々は、難治性根尖性歯周炎における感染の実態と病態の関連性を解明することが、難治性根尖性歯周疾患を克服し、歯内療法の診断や治療の精度をさらに高めていく上で必須であると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、難治性根尖性歯周炎罹患歯に対する外科的歯内療法および抜歯に際し、以下の点を明らかにすることを目標とする。

(1) 遺伝子工学的手法 (16s rRNA 遺伝子解析法) を用いて、根管/根尖孔外バイオフィーム構成細菌種を検索する。

(2) 根尖孔外バイオフィームが存在しない可能性が高いと判断される場合は、走査型電子顕微鏡 (SEM) により根尖部を微細形態学的に解析する。

(3) 術前に問診と現症の診査、画像検査、咬合診査を行った上で、術中に Microscope を用いて根尖部を観察することにより、各症例毎に詳細な原因分析を行う。さらに予後を追跡することで、診断および治療の妥当性についても検討する。

3. 研究の方法

大阪大学歯学部附属病院保存科を受診し、難治性根尖性歯周炎罹患歯を有し外科的歯内療法あるいは抜歯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。

(1) 診査と臨床試料の採取

術前診査としては、問診と現症の診査、画像検査、咬合診査を行う。問診 (主訴、現病歴、既往歴) と現症に関する診査については患歯の病態を把握するために極めて重要であるため、詳細に記録する。画像検査については CBCT を撮像し、根尖部の解剖学的形態 (外部吸収の有無) と根尖病変の 3 次元の拡がりや診査する。咬合診査については咬合性外傷の有無を診査する。特に、咀嚼運動時の早期接触や日中のくいしばり、睡眠時の歯ぎしりなどに注目して、可及的詳細に診査する。術中診査としては、外科的歯内療法の場合は Microscope を用いて根尖部を観察する。特に、根切した断面の診査は入念に行う (根尖破折の有無、根管の解剖学的形態の問題の有無、根尖病変への露出歯根面の性状すなわち歯根膜やう蝕様病変の有無)。

(2) 基礎的解析

まずバイオフィーム試料の作製を行う。根管充填直前の根尖部付近をファイリングして得られた根管象牙質削片あるいは根切された根尖より採取された削片からバイオフィームを剥離し、細菌由来ゲノム DNA を抽出、調整を行い、-20 で凍結保存する。

次に、バイオフィーム構成細菌種の解析を行う。16s rRNA 遺伝子解析法によりバイオフィーム構成細菌の同定を行う (Noguchi N et al, *Appl Environ Microbiol*, 2005)。細菌

由来ゲノム DNA を 16s rRNA 遺伝子の保存領域に対するプライマーを用いた PCR 法を行い、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。

また、根尖孔外バイオフィームがおそらく存在しないと予測される症例については、根尖部の詳細な解析を優先させた方が病態を把握するのに望ましいと考えられるので、16s rRNA 遺伝子解析法ではなく SEM による微細形態学的解析を行う。具体的には、バイオフィームの有無の他に、歯根膜やう蝕様病変、外部吸収の有無および根管口の形態を精査する。

4. 研究成果

難治性根尖性歯周炎における根尖孔外バイオフィームの検出頻度については、今回のように多因子を考慮した解析方法では症例選択の基準の取り方により様々な解釈が可能であるため、明確に算出することは困難であった。大まかな傾向としては我々の過去の研究結果と相違なかった(第 136 回日本歯科保存学会 2012)。また、その中で根管/根尖孔外バイオフィーム構成細菌種については、どの症例にも共通するような特徴的な検出傾向は認められず、症例の病態に応じて多様な傾向を示すことが明らかになった。したがって、多くの症例をまとめて難治性根尖性歯周炎の病態を解析することは極めて困難であり、むしろ個別の症例を可能な限り詳細に解析し、その蓄積により多様な病態を把握した上で予後まで確認することで、診断や治療の妥当性を確認することが重要であることが示唆された。よって、以下ではこれまでの症例毎の検討で明らかになった事実を中心に記載していく。

(1) 根尖孔外バイオフィームが検出された症例

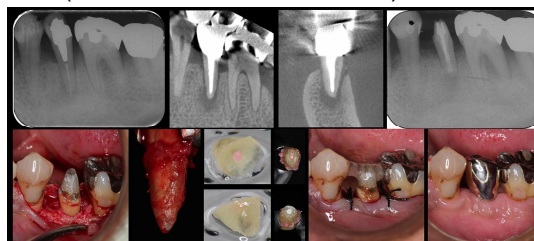
根尖孔外バイオフィームが検出された症例に関しては、総じて抜髄からの経過年数が長いことが共通点としてあげられた。これは根管内の感染源が根尖孔外へ波及するのに時間を要するためと考えられ、その結果として根尖部の感染がより進行した状態になっているものと推察された。さらに波及経路については、根尖部の解剖学的形態(根尖孔や

側枝の形態、根尖吸収など)が関係していると考えられ、これが根尖病変の 3 次元的形態に影響していると推察された。これらの要素を合わせたものが、根尖病変の大きさと根尖病変に露出した根尖部(つまり歯根膜が喪失して根尖孔外バイオフィームが付着している可能性のある部分)の関係であり、進行した症例では、根尖孔付近の歯根表面にう蝕様病変や外部吸収、セメント質肥厚などの変化が認められるものと考えられた。(症例 1、歯根端切除術)



根尖孔外バイオフィーム構成細菌として、*Porphyromonas gingivalis*、*Porphyromonas gulae* が高頻度に検出された。

また、過剰根管充填により難治化した症例においても、根尖孔外に逸出したガッタパーチャポイントおよび根尖孔外の歯根表面にも根尖孔外バイオフィームの付着が認められたことから、このような要素も根尖部の感染の進行に関与している可能性が推察された。(症例 2、再植歯根端切除術)



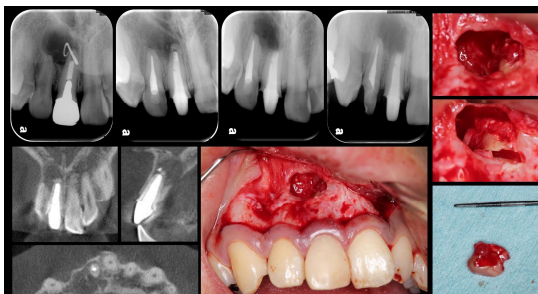
根尖孔外に逸出したガッタパーチャポイントからは、*Porphyromonas gingivalis*、*Bacteroides-like sp* が、根尖孔外バイオフィーム構成細菌としては、*Phocaecicola sp*、*Phocaecicola abcessus* が高頻度に検出された

このような局所的な病態の詳細は、外科的歯内療法時の予後に影響を及ぼしていることが示唆された。

(2) 根尖孔外バイオフィームが検出されなかった症例

大きな根尖病変を形成しているにもかかわらず、根尖孔外バイオフィームが検出されなかった症例も存在した。このことは、根尖病変の大きさと根尖孔外バイオフィームの有無に相関関係がないことを示唆している。さらに、歯槽骨や上顎洞底を穿孔している症例では、免疫による根尖病変の抑制が低下しているために、通法の根管治療に反応せず治

癒に向かわなかったことが推察された。(症例 3、歯根端切除術)



また、う蝕が存在しないにもかかわらず失活して難治性根尖性歯周炎を形成した症例においても、根尖孔外バイオフィームは検出されなかった。この症例の難治化の原因としては、根尖部の SEM による解析より特徴的な根尖孔の形態変化や歯根膜の喪失が認められたため、先程述べた免疫の要素以外にも早期接触やくいしばりによる咬合性外傷が関与している可能性が考えられた。(症例 4、歯根端切除術)



このように、根尖孔外バイオフィーム以外の原因も、難治性根尖性歯周炎形成の原因に間接的に関与していることが示唆された。

以上をまとめると、難治性根尖性歯周炎が形成される直接的な原因としては、まず根管内に残存する感染源の量が重要であり、時間の経過とともに様々な経路を介して根尖孔外に波及した結果として根尖孔外バイオフィームが形成されて難治化することが考えられた。一方で、根管内に残存する感染源が根尖孔外に波及して起きた炎症により骨吸収が進行し、根尖病変の大きさと周囲骨の表面積とのバランスが崩れ免疫による制御が破綻して難治化する場合もあることが明らかになった。咬合性外傷については、炎症による組織破壊が進行することで、間接的に免疫による制御が働きにくい環境を助長している可能性が示唆された。実際の病態はこれらの要素が複合したものであり、その結果として多様な病態が発現していると考えられる。したがって、難治性根尖性歯周炎の診断と治療については、これらの要素を統合して理解した上で個別に対応していくことが必要であり、今後も症例を蓄積しながら更に検討を継続していく予定である。

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 5 件)

1. Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Gotoh K, Miura J, Machi H, Iida T, Ebisu S: Temporal dynamics of bacterial microbiota in the human oral cavity determined using an in situ model of dental biofilms. *npj Biofilms and Microbiome* 2, 16018, 2016 (査読有)
2. Ikeda S, Itoh S, Yamamoto Y, Yamauchi Y, Matsushita K, Naruse H, Hayashi M: Developmental Stage-Dependent Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Adipocyte Differentiation of Murine Bone Marrow Stromal Cells. *Cell Biochem Biophys* 74(1), 11-17, 2016 (査読有)
3. Yamamoto Y, Itoh S, Yamauchi Y, Matsushita K, Ikeda S, Naruse H, Hayashi M: Density Gradient Centrifugation for the Isolation of Cells of Multiple Lineages. *J Cell Biochem* 116(12), 2709-14, 2015 (査読有)
4. Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S, Hayashi M: Inhibition of polysaccharide synthesis by the sinR orthologue PGN_0088 is indirectly associated with the penetration of Porphyromonas gingivalis biofilms by macrolide antibiotics. *Microbiology* 161, 422-429, 2015 (査読有)
5. Asahi Y, Miura J, Tsuda T, Kuwabata S, Tsunashima K, Noiri Y, Sakata T, Ebisu S, Hayashi M: Simple observation of Streptococcus mutans biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express* 5, 6, 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 永山智崇, 朝日陽子, 住岡龍一, 米田直道, 松井沙織, 後藤満帆, 野杣由一郎, 恵比須繁之, 林美加子: 過剰根管充填された難治性根尖性歯周炎の治療経過における細菌学的解析. 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会: 2016, 10, 27, 松本
2. 松井沙織, 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, 野杣由一郎, 林美加子: 新規開発したラット根管治療モデルを用いた電磁波根尖療法の評価. 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会: 2016, 10, 28, 松本

3. 伊藤祥作, 山内裕香子, 成瀬陽菜, 伊藤勇紀, 林美加子: 新規間葉系幹細胞集団による神経再生能の評価. 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会: 2016, 10, 27, 松本
4. 成瀬陽菜, 伊藤祥作, 山内裕香子, 伊藤勇紀, 林美加子: 根尖性歯周炎と Wnt/ β -catenin シグナルとの関連性についての解析. 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会: 2016, 10, 28, 松本
5. Yamauchi Y, Itoh S, Hayashi M: Repairing the function of injured nerve with novel mesenchymal population. 94th International Association for Dental Research General Session: 2016, 6, 21-24, Seoul, South Korea
6. 永山智崇, 朝日陽子, 住岡龍一, 米田直道, 野杢由一郎, 恵比須繁之, 林美加子: 難治性根尖性歯周炎において根尖孔外バイオフィーム以外の原因の関与が考えられた 1 症例. 第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会: 2016, 6, 10, 宇都宮
7. 米田直道, 野杢由一郎, 呉本勝隆, 松井沙織, 恵比須繁之, 石本卓也, 中野貴由, 林美加子: 新規開発したラット根管治療モデルを用いた電磁波根尖療法の評価. 第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会: 2016, 6, 10, 宇都宮
8. 和氣菜々子, 朝日陽子, 町博之, 野杢由一郎, 恵比須繁之, 林美加子: 実験的 in situ デンタルバイオフィーム構成細菌の包括的解析. 第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会: 2015, 11, 13, 東京
9. 松井沙織, 野杢由一郎, 岡口守雄, 呉本勝隆, 米田直道, 恵比須繁之, 林美加子: 難治性根尖性歯周炎に対するマイクロエキスカベータの有効性の評価. 第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会: 2015, 11, 13, 東京
10. Yamauchi Y, Itoh S, Hayashi M: Repairing the function of injured nerve with novel mesenchymal population. 63rd Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research: 2015, 10, 30, Fukuoka, Japan
11. 和氣菜々子, 朝日陽子, 町博之, 野杢由一郎, 恵比須繁之, 林美加子: メタゲノム解析による実験的 in situ デンタルバイオフィーム構成細菌の包括的同定. 第 29 回日本バイオフィーム学会: 2015, 7, 11, 愛知県蒲郡市
12. 山本れいこ, 野杢由一郎, 高橋直紀, 山崎和久, 恵比須繁之, 林美加子: Porphyromons gingivalis バイオフィームは人口胃液耐性を有す. 第 29 回日本バイオフィーム学会: 2015, 7, 10, 愛知県蒲郡市
13. Yamauchi Y, Itoh S, Yamamoto Y, Matsushita K, Naruse H, Hayashi M: New mesenchymal population from murine bone marrow can repair the injured sciatic nerve. The ISSCR 2015 Annual Meeting: 2015, 6, 26, Stockholm, Sweden
14. 松井沙織, 野杢由一郎, 呉本勝隆, 米田直道, 恵比須繁之, 林美加子: 実験病理学的根尖孔外バイオフィームモデルの開発. 日本顕微鏡歯科学会第 12 回学術大会: 2015, 4, 21, 東京
15. Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Machi H, Ebisu S, Hayashi M: Time-dependent Analysis of Dental Biofilms by New in situ Model. 93th International Association for Dental Research General Session: 2015, 3, 13, Boston, USA
16. Yamauchi Y, Itoh S, Yamamoto Y, Matsushita K, Naruse H, Hayashi M: Differentiation potency of new mesenchymal populations for neural cell lineage. 93th International Association for Dental Research General Session: 2015, 3, 12, Boston, USA
17. Wake N, Asahi Y, Noiri Y, Machi H, Ebisu S, Hayashi M: Quantitative Analysis of Human Dental Biofilms by New in situ Model. 62nd Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research: 2014, 12, 4, Osaka, Japan
18. Yamauchi Y, Itoh S, Yamamoto Y, Matsushita K, Naruse H, Hayashi M: The analysis of a new mesenchymal population for neural stemness. 62nd Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research: 2014, 12, 4, Osaka, Japan
19. 和氣菜々子, 朝日陽子, 町博之, 野杢由一郎, 恵比須繁之, 林美加子: デンタルバイオフィームの形成と制御に関する包括的 in situ 解析~各細菌属の経時的定量解析~. 第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会: 2014, 10, 31, 山形
20. 米田直道, 野杢由一郎, 呉本勝隆, 松井沙織, 石本卓也, 中野貴由, 恵比須繁之, 林美加子: ラット感染根管治療モデルの開発. 第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会: 2014, 10, 31, 山形
21. 呉本勝隆, 野杢由一郎, 米田直道, 松井沙織, 石本卓也, 中野貴由, 恵比須繁之, 林美加子: ラット根尖孔外バイオフィームモデルの改良. 第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会: 2014, 10, 31, 山形
22. 山本由美子, 伊藤祥作, 松下健太, 池田峻, 山内裕香子, 林美加子: 骨芽細胞

の細胞表面マーカー解析法の開発. 第
140 回日本歯科保存学会春季学術大会:
2014, 6, 19, 大津

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

(2)研究分担者

野杣 由一郎 (NOIRI YUICHIRO)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50218286
伊藤 祥作 (ITOH SHOUSAKU)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：90360495

(3)連携研究者

朝日陽子 (ASAHI YOKO)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：50456943