

平成 22 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19592193
 研究課題名（和文） 根管内細菌叢の質的・量的解析に基づく根尖性歯周炎の病態診断と合理的治療法の確立
 研究課題名（英文） Establishment of patho-physiological diagnosis and rational treatment protocol for apical periodontitis using qualitative and quantitative analysis of intracanal microflora.
 研究代表者
 八巻 恵子（YAMAKI KEIKO）
 東北大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：90182419

研究成果の概要（和文）：

根の治療の前後で感染細菌が質的・量的にどう変化するか、患者からインフォームドコンセントを得て検索した。その結果、過去の治療歴の有無や口腔との交通の有無により感染細菌種が大きく異なること、その中で *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* 属が比較的高頻度で検出されること、また細菌種やその多寡にかかわらず標準的治療プロトコールで概ね感染を制御できることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Changes of intracanal microflora during the course of root canal therapy were investigated in patients with apical periodontitis. Informed consent was obtained prior to dentin sample collection. Anaerobic culture of the samples followed by molecular genetic analysis revealed that: a marked variation of the microbial composition was found among the cases according to their clinical conditions such as history of treatment and accessibility to oral cavity; *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* were the frequently-detected species; the conventional treatment protocol was usually capable of maneuvering intracanal infection regardless of bacterial species or bacterial loads.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：歯内療法学・根尖性歯周炎・嫌気性菌・16S rRNA・PCR

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎は根管内に生息する多種多様な細菌の混合感染により惹起される。根管から分離される細菌群は、口腔内との交通の有無や自発痛や根尖部透過像といった臨床症状の有無により大きく異なる。嫌気培養法あるいは分子生物学的手法を用いた根管細菌検査により、症状の急性化には偏性嫌気性菌が関与していること、治療が遷延した難治症例では真菌や *Enterococcus faecalis* など、治療開始時には決して優勢ではなかった菌種による感染が持続していることなどが明らかになってきた。しかし、個々の症例で病原性を発揮している菌種を特定するには至っていない。

一方、現在実践されている標準的治療プロトコルは実際の感染細菌に個別に対応したのではなく、機械的拡大と化学的洗浄、非特異的消毒薬の根管貼薬による感染源の除去を目標としており、根管拡大の目安や貼薬する抗菌剤の選択は経験則に依存するところが大きい。

根管内細菌叢の定性的・定量的解析を通じ、その症例における病原性菌を特定できれば、選択的特異的抗菌治療が可能となり、歯質の犠牲を最小限にとどめた **Minimum intervention** による患歯の寿命の延長、さらに、治療に要する回数と期間の短縮による医療費の抑制につながることを期待できる。

2. 研究の目的

根尖性歯周炎症例の感染根管治療において、嫌気培養法および 16S リボゾーム RNA 遺伝子プライマーを用いた PCR 法を組み合わせた根管細菌検査を随時実施し、術前の細菌構成および治療に伴う細菌叢の変化を定性的・定量的に解析し、打診痛や根尖部透過像といった病態に強く関与する細菌群と病原性を発揮する菌量を明らかにする。

検索症例を通じて、合理的な治療プロトコルの確立、すなわち、時間と労力、費用のかかる根管細菌検査の最も効果的な実施時期の見極めと、残存する病原性細菌に特異的に有効な抗菌療法の開発を目標とする。

3. 研究の方法

東北大学病院附属歯科医療センターを受診し、根尖性歯周炎に罹患していると臨床的に診断された患者に研究の趣旨を説明し、インフォームドコンセントを得て検索した。

術前、治療中、根管充填直前の根管壁から手用ファイルを用いて象牙質削片を採取、嫌気グローブボックスに搬入、40mM リン酸カリウム緩衝液中で分散・均一化後、連続 10 倍希釈で CDC 血液寒天培地に接種し 1 週間嫌気培養、CFU を求めた。さらに、生育したコロニーから InstaGene™ (Bio-Rad) マト

リックスを用いて DNA を抽出し、16S ribosomal RNA のユニバーサルプライマーで PCR 増幅した。得られた PCR 産物は制限酵素で消化後の泳動パターンを基に選別、精製し、そのシーケンスを解析後、NCBI の Blast search program を用いて GenBank Database と照合、細菌種を同定した。

4. 研究成果

術前の根管細菌叢の構成は根管治療歴の有無や口腔との交通の有無に左右され、同一人でも症例により大きく異なるなど、多種多様な細菌が存在することが判明した。その中で *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* 属が比較的高頻度で存在していた。

表 1 に、拡大前の根管 8 例から検出・同定した細菌の一覧を示す。

表 1. 拡大前の根管 8 例から検出・同定した細菌コロニー 137 個の内訳

colony %		colony %	
Anaerobes	93 67.9	Facultative anaerobes	44 32.1
<i>Propionibacterium</i>	33 24.1	<i>Lactobacillus</i>	29 21.2
<i>acidifaciens</i>	21	<i>crispatus</i>	11
<i>acnes</i>	6	<i>antri</i>	2
<i>genomosp.</i>	6	<i>johnsonii/gasseri</i>	5
<i>Olsenella</i>	22 16.1	<i>plantarum</i>	3
<i>profusa</i>	18	<i>vaginalis</i>	3
<i>uli</i>	1	<i>salivarius</i>	2
<i>sp.</i>	3	<i>rhamnosus</i>	3
<i>Pseudoramibacter</i>	18 13.1	<i>Enterococcus</i>	13 9.5
<i>alactolyticus</i>	18	<i>faecalis</i>	13
<i>Parvimonas</i>	6 4.4	<i>Actinomyces</i>	2 1.5
<i>micra</i>	6	<i>israelii</i>	2
<i>Mogibacterium</i>	5 3.6		
<i>timidum</i>	5		
<i>Acidaminococcus</i>	3 2.2		
<i>intestini</i>	3		
<i>Campylobacter</i>	3 2.2		
<i>gracilis</i>	3		
<i>Dialister</i>	1 0.7		
<i>invisus</i>	1		
<i>Eubacterium</i>	1 0.7		
<i>irrfirmum</i>	1		
<i>Shuttleworthia</i>	1 0.7		
<i>satelles</i>	1		

治療前の根管総細菌量 (log CFUs/mL) は平均 5.70 で、偏性嫌気性菌が多く認められたが、実質欠損が大きく根管と口腔が交通している症例では通性嫌気性菌の割合が高かった。(図 1)

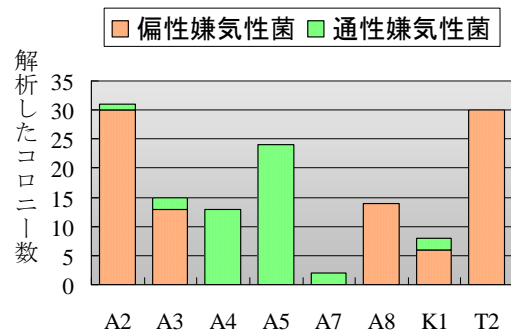


図 1: 拡大前の根管 8 例から検出同定した細菌

生理食塩水の洗浄下で健康象牙質が出現するまで根管を拡大形成すると、根管総細菌量は平均 3.11 となり、感染源の除去としてはまだ不十分であるものの、術前の 1%以下に激減した。拡大後も残存する細菌は、そのほとんどが通性嫌気性菌であった (表 2, 図 2)。

表 2. 拡大直後の根管 7 例から検出・同定した細菌種
検出例 コロニー数 %

細菌種	検出例	コロニー数	%
Anaerobes	5	17	19.5
<i>Propionibacterium</i>	4	13	14.9
<i>Olsenella</i>	1	1	1.1
<i>Veillonella</i>	1	1	1.1
<i>Atopobium</i>	1	1	1.1
<i>Scardovia</i>	1	1	1.1
Facultative anaerobes	6	70	80.5
<i>Streptococcus</i>	5	32	36.8
<i>Lactobacillus</i>	6	27	31
<i>Enterococcus</i>	2	7	8
<i>Actinomyces</i>	2	4	4.6

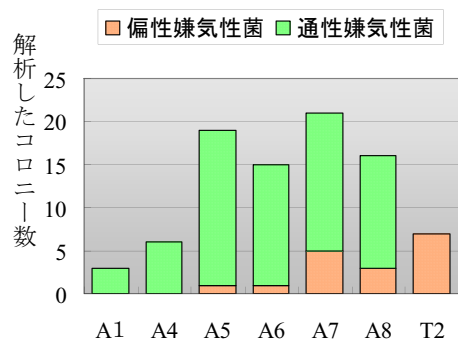


図 2 : 拡大後の根管 7 例から検出同定した細菌

その後 NaOCl を用いた化学的洗浄と水酸化カルシウムその他の抗菌剤の根管貼薬を追加施行すると、大多数の症例で次回来院時の象牙質試料は培養陰性となり、標準的な治療プロトコール、すなわち chemo-mechanical preparation と抗菌剤の根管貼薬により、根管内の感染はほぼ制御できることが判明した (図 3)。

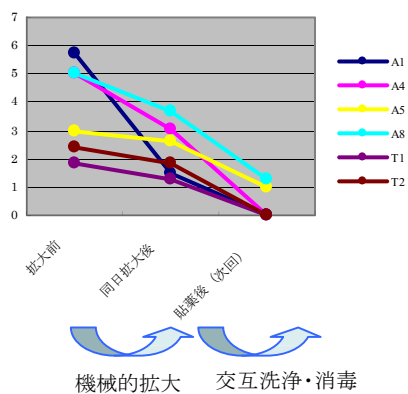


図 3 : 処置内容による細菌数の変化

Enterococcus faecalis は近年、難治性根尖性歯周炎との関連が注目されているが、本研究においては特に治療抵抗性を認めなかった。一方、今回検出頻度の高かった *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* 属は、これまでも報告例が多く、根尖性歯周炎の発症に関与している可能性が高い。しかし根管内に定着・感染している細菌は多種多様で、少数特定細菌種だけが根尖性歯周炎の病原性を有するとは考えにくい。感染根管治療の失敗の原因は、根管内の細菌学的要因だけでなく、宿主の免疫学的素因、および患歯の解剖学的要因 (根尖分岐やイスマスなど) から分析する必要があると思われた。

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 7 件)

- 1) Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N: Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. J Periodont Res 2010; 45: 389-395. 査読あり.
- 2) Thaweboon B, Laohapand P, Amornchat C, Matsuyama J, Sato T, Nunez PP, Uematsu H, Hoshino E: Host β -globin gene fragments in crevicular fluid as a biomarker in periodontal health and disease. J Periodont Res 2010; 45: 38-44. 査読あり.
- 3) Sato R, Sato T, Takahashi I, Sugawara J, Takahashi N: Profiling of bacterial flora in crevices around titanium orthodontic anchor plates. Clin Oral Impl Res 2007; 18: 21-26. 査読あり.

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 八巻恵子, 佐藤拓一, 島内英俊: 感染根管治療に伴う根管内細菌叢の変動. 第 131 回日本歯科保存学会 2009 年度秋季学術大会. 2009 年 10 月 29-30 日. 仙台.
- 2) 安彦友希, 佐藤拓一, 他: 高齢者の歯肉縁下プラーク細菌叢への *Porphyromonas gingivalis* の定着. 2009 年 9 月 10 日. 新潟.
- 3) 佐藤拓一, 八巻恵子, 橋本紀洋, 竹内裕尚, 安藤友希, 島内英俊, 高橋信博: 歯内

治療に伴う、感染根管内細菌叢の変動に関する研究. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会. 2009 年 9 月 11 日. 新潟.

4) 松山順子、佐藤拓一、他：小児のう蝕歯面上のプラークバイオフィルム細菌叢構成細菌の定量的解析. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会. 2009 年 9 月 11 日. 新潟.

5) Sato T: Metabolic activity of oral microbial ecosystem in health and disease. The1st Tohoku-Forsyth Symposium. 2009 年 3 月 10 日. ボストン.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八巻 恵子 (YAMAKI KEIKO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90182419

(2) 研究分担者

島内 英俊 (SHIMAUCHI HIDETOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70187425

(3) 研究分担者

佐藤 拓一 (SATO TAKUICHI)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：10303132