

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 20～21 年

課題番号：20791403

研究課題名（和文）

ラット根管における細菌バイオフィルムの作製、分析

研究課題名（英文）

Analysis of bacterial biofilm in rat's root canal in vivo

研究代表者

樋口 直也 (HIGUCHI NAOYA)

愛知学院大学・歯学部歯学科・講師

研究者番号：10329609

研究成果の概要（和文）：

*Enterococcus faecalis*、*Porphyromonas gingivalis* を用いて、in vitro で細菌バイオフィルムの形成条件を調べた。その培養条件下、生きたラットの抜髄した根管にバイオフィルムの形成を試みたが、いずれにおいても認められなかった。原因には、十分な抜髄を行うことが困難で、免疫担当細胞に殺菌されたことが考えられる。In vivo では、細菌叢からの持続的な感染が必要だと推察された。

研究成果の概要（英文）：

First of all, I examined some growth conditions to form bacterial biofilm in vitro, using *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. Then I tried to make bacterial biofilm in rat's root canal under the growth condition in vivo. As the result, I could not find any bacteria in all samples. I think that the cause was uncertain pulpectomy. Many immunity charge cells left in every root canal were killed all of bacteria. I suppose that biofilm formation in rat's root canal in vivo need continuous infection from bacterial flora.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：細菌バイオフィルム、根管

1. 研究開始当初の背景  
歯科を含む医学界において、細菌バイオフィ

ルムが注目されて久しくなる。細菌バイオフィ

フィルムとは、病巣局所において細菌が産生する菌体外多糖 (glycocalyx) からなるフィルム状の殻、あるいは隠れ家の中で細菌がコロニー形成した状態をいう。バイオフィルム中の細菌は、抗菌物質や免疫システムに対して抵抗性を示して局所に長期に留まり、感染の難治化、慢性化を招くことが示唆されている。各研究により、バイオフィルム形成能をもつ細菌や菌体外多糖の成分、あるいは形成能に関わる遺伝子の解析や抗菌剤への耐性システムなど、その全貌がさまざまな角度から徐々に明らかにされつつある。

歯科においては、歯垢はバイオフィルムとされ、歯科のあらゆる分野で研究されている。歯内療法の領域においても、細菌バイオフィルムは未だ注目されている。根尖性歯周炎において、通常通り根管治療を行っても治癒まで長期間かかったり、治癒しなかったりする難治性の症例が存在する。このような症例では、根尖部で細菌がバイオフィルムを形成しており、抗菌物質や免疫に対して抵抗性を示し、難治化、慢性化していることが示唆されている。また、このような症例では、通性嫌気性菌の関与が疑われている上、根尖孔外にも存在するとも言われている。

根尖性歯周炎を有する感染根管の中には、多種類の細菌が混在しており、偏性嫌気性菌も多く存在する。これら偏性嫌気性菌は、臨床において急性症状が認められる場合に、その感染根管から高率に検出されると言われている。研究代表者らは、これまで、歯周病原菌であり、偏性嫌気性菌である *Tannerella forsythensis* のバイオフィルム形成能を分析し、急性症状への関与を調べてきた (科学研究費平成17-19年度)。

## 2. 研究の目的

バイオフィルムの形成能の分析を含めた

基礎的研究は、多く報告されているが、生きた動物の根管内で、混合感染させることによって、より臨床に近い状態のバイオフィルムを形成させ、観察・分析した報告はない。そこで、今回、動物 (ラット) の下顎切歯を用いて、生体内でのバイオフィルムの形成を試み、観察した後、その構造を分析していく。

本研究の具体的な到達目標は、(1) ラットを用いて、*in vivo* で根管内に細菌バイオフィルムを作製し、観察すること、(2) 作製した細菌バイオフィルムの構造を分析・検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養条件の設定

細菌には、早期に歯牙表面に付着する *early colonizer* として *Enterococcus faecalis* (以下 *E.f.*)、late colonizer として *Porphyromonas gingivalis* (以下 *P.g.*) を用い、バイオフィルム作製のための培養条件を調べた。

両細菌とも液体培地には *Trypticase soy broth* を用い、37°C、嫌気状態で、前培養から本培養を行い、*E.f.* については2時間ごとに、*P.g.* については6時間ごとに、吸光度計で濁度を測定し、時間と増殖の関係を調べた。

### (2) バイオフィルム形成条件の設定

ヒト抜去歯牙から象牙質片を作製し、オートクレーブにて滅菌後、滅菌管の中で、各細菌の接種と、両細菌の混合接種を行った。*E.f.* は24、48時間、*P.g.* は48、72時間、共培養は48、72時間、37°C、嫌気状態で培養し、バイオフィルムの形成を試みた。象牙質片表面に形成されたバイオフィルムを、2%パラホルムアルデヒドと2.5%グルタルアルデヒドの混合固定液で固定後、上昇エタノール系列で脱水し、走査型電子顕微鏡で組織学的

に観察した。

### (3) ラット (in vivo) でのバイオフィルムの作製

ラットの下顎切歯を抜髄し、各細菌を感染させ、光重合型レジンにて仮封した。E.f.については24時間、P.g.については48時間、共培養については48時間、ラットを飼育した後、屠殺し、下顎切歯を摘出、分割した。前述の固定・脱水方法で処理を行い、走査型電子顕微鏡で組織学的に観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 培養条件の設定

液体培地では、E.f.は24時間、P.g.は72時間、混合感染は72時間でフルグロースとなった。

### (2) バイオフィルム形成条件の設定

完全に成熟したバイオフィルムの形成には、上記の培養時間以上の時間が必要であると思われるし、詳細が異なる可能性はあるが、上記の培養時間を参考にバイオフィルムの形成を試みた。E.f.については、24時間で成熟したバイオフィルムが観察され、48時間でも特に変化は認められなかった。P.g.については、48、72時間培養したどちらの根管も、象牙質への付着は確認されたものの、成熟したバイオフィルムは確認できなかった。共培養については、48、72時間培養したどちらの根管においても、E.f.によるバイオフィルムは認められたものの、P.g.はE.f.のバイオフィルムに付着しなかった。

### (3) ラット (in vivo) でのバイオフィルムの作製

各細菌を接種した根管、混合感染させた根管のいずれにおいてもバイオフィルムは認

められなかった。この原因としては、接種する細菌量に限界があるにもかかわらず、十分な抜髄を行うことが困難で、残存した歯髄に存在する免疫担当細胞に殺菌されてしまったことが考えられる。In vivo では、無菌根管とはいえ、残存歯髄や根尖部歯周組織からの血液により免疫システムが機能するため、少量の細菌ではバイオフィルムは形成されず、う蝕やプラークのような細菌叢から持続的な細菌感染が必要であることが推察された。また、E.f.とP.g.の共培養については、抑制的に働く何らかの物質をどちらかの細菌が放出しているためか、あるいはE.f.の菌体外多糖類(グリコカリックス)に付着することが困難であるのか検討が必要である。付着するようであれば、E.f.によるバイオフィルム形成後に、P.g.を接種するなどの方法自体の再考が必要と思われた。

## 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1件)

K. Moriguchi, T. Jogahara, T. Kurihara, J. Iwami, N. Higuchi, Y. Murakami, H. Maeda, F. Yoshimura, H. Nakamura, N. Ohno: Immunocytochemical approach for surface layer proteins of freeze-substituted *Tannerella forsythensis* by energy-filtering transmission electron microscopy; Okajimas Folia Anatomica Japonica 査読有, 85, 67-72, 2008.

[学会発表] (計5件)

① 中田和彦、安芸義朗、柴田直樹、今泉一郎、樋口直也、鈴木一吉、中村 洋、泉 雅浩、内藤宗孝、有地榮一郎：歯科用CTとマイクロスコープを併用した歯内療法；第21回日本歯科医学会総会（横浜）、2008.11.15

②樋口直也、中村 洋：マイクロスコープ下で根管内破折器具を除去した症例；第6回日本顕微鏡歯科学会（名古屋）、2009.04.19

③K. Nakata, I. Imaizumi, N. Higuchi, T. Watanabe, K. Inamoto, N. Shibata, H. Nakamura: Evaluation of Correspondence of Dental Computed Tomography Imaging to Anatomical Observation of External Root Resorption; The 15<sup>th</sup> Asian Pacific Endodontic Confederation. The 7<sup>th</sup> KAE & JEA, 30<sup>th</sup> JEA. (Tokyo) , 2009.04.25

④樋口直也、中田和彦、中村 洋：歯内療法における歯科用CTとマイクロスコープの有用性：症例報告；第130回日本歯科保存学会春期学術大会（北海道）、2009.06.11

⑤樋口直也、中田和彦、中村 洋：歯内療法において歯科用CTとマイクロスコープが有用であった1症例；愛知学院大学歯学会第74回学術大会（名古屋）、2009.06.14

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

樋口 直也 (HIGUCHI NAOYA)

愛知学院大学・歯学部歯学科・講師

研究者番号：20791403

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし