

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 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592423

研究課題名（和文） 難治性根尖性歯周炎と根尖孔外バイオフィームに対する電磁・高周波の歯内療法への応用

研究課題名（英文） Endodontic therapeutic application of electro-magnetic wave irradiation for refractory periapical periodontitis and periapical biofilm

研究代表者 湯本 浩通 (YUMOTO HIROMICHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：60284303

研究成果の概要（和文）：高周波・電磁波照射(500-1,000 kHz, 5-10 回, 1 秒/回)は、口腔病原菌に対して照射回数依存的な殺菌効果を示した。また高周波・電磁波照射(500 kHz, 5 回, 1 秒/回)は、骨芽細胞の増殖を促進させ、さらに様々な成長因子の遺伝子発現や蛋白産生も増強させた。以上より、高周波・電磁波照射は、難治性根尖性歯周炎に対する非外科的歯内療法あるいは歯槽骨再生療法に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The Electro-Magnetic Wave Irradiation (EMWI) exhibited great bactericidal activity (>95.65%) to kill various oral pathogens. This bactericidal activity by EMWI at 500 kHz (1 sec/time) increased in an irradiation number-dependent manner. Moreover, EMWI activated MC3T3-E1 cell proliferation. After EMWI (500kHz, 5sec), various growth factors were upregulated. This study suggests that EMWI may contribute to the beneficial effects on bone tissue repair as regenerative therapy and be applicable to refractory periapical periodontitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、電磁・高周波、細菌、骨芽細胞、遺伝子発現、成長因子、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 根尖性歯周炎は、根管系に棲息する細菌及びその代謝産物が根尖孔より漏出する事により惹起されると考えられている。従って、根管の器械的・化学的清掃を十分にを行い、根管内を無菌化して緊密に根管充填を行うと、破壊された根尖歯周組織にも修復機転が働き、骨再生が生じると考えられている。しか

し、根管の器械的・化学的清掃が十分に行われているにもかかわらず根管治療に反応しない、いわゆる難治症例が存在する。難治性根尖性歯周炎の原因の一つとして、通常の根管治療では除去できない細菌の存在が挙げられる。我々は、根管治療に反応せずに治癒しない原因と考えられる根管系に残存した細菌種の同定と部位を解明する為、これまで

観察が困難とされてきた感染根管内の歯根内容物を保持した状態で未脱灰試料を作製し、根管内に棲息する細菌種とその局在を免疫組織化学的に検討する系を開発して解析・報告した（日歯保存誌, 2000）。

(2) さらに、根尖性歯周炎の病因論・特に臨床的な観点からも重要な意味を有する管内細菌の局在について、臨床術式に基づいて、器械的根管拡大の程度と根管拡大・清掃後に残存している細菌種の同定・局在、特に象牙細管内への侵入程度を免疫組織化学的手法で明らかにした（J Endodon. 2003）。近年、Tronstad らの報告（Endod Dent Traumatol. 1987, 1990, J Endodon. 2002）により、難治性根尖性歯周炎の一因として、根尖孔外での持続的な細菌感染が注目されるようになってきた。

(3) そこで我々は、抜去された難治性根尖性歯周炎の原因菌を組織学的に SEM 解析し、根尖部の根管や根尖孔外にも細菌の残存が認められ、さらに根尖部の切片を光学顕微鏡レベルで観察すると、セメント-象牙境より根尖孔外に向かって連続した球・桿菌からなる細菌集団が、さらにはセメント質にも密集して細菌が認められ、根尖孔外の細菌は Biofilm を形成し、その一部は宿主防御機構の届かない根管系にハーバリングして宿主の攻撃を回避している事が示唆された（the Quintessence 1999, 日本歯科評論 2003）。

(4) これらの成果による難治性根尖性歯周炎の病因・病態を吟味すると、これまでの通法による器械的な根管形成・拡大の限界を超えた根尖孔外という領域へのアプローチを可能にする電磁波・高周波の特性を応用した新規の非外科的歯内療法を開発できるのではないかという発想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、難治性根尖性歯周炎の大きな原因である根尖孔外 Biofilm に対して、電磁エネルギーによって発生するジュール熱を根尖孔外に応用し、根尖孔外に棲息して Biofilm を形成する細菌を殺菌すると同時に、ジアテルミー療法により根尖歯周組織の組織治癒・修復力を増強する治療法として、電磁波・高周波を応用した新規の非外科的歯内療法を開発する事を目的とし、電磁波・高周波の難治性根尖性歯周炎から高頻度に検出される細菌種に対する殺菌作用に加えて、歯周組織を構成する骨芽細胞に対する作用として、細胞増殖能や様々な成長因子の発現について遺伝子及び蛋白質発現レベルで解析す

る。すなわち、根尖孔外に棲息して Biofilm を形成する細菌を殺菌すると同時に、根尖歯周組織の組織治癒・修復力を増強する治療法の開発の為に、生物科学的にその効果・有効性を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高周波・電磁波照射器、能動電極と照射条件の検討：周波数は 500-1,000 kHz に設定し、通電時間は 1 秒間に規定し、能動電極は Mani 社製 K- file を使用した。顕熱物質として卵白やアルブミンを 45 mm 注入した透明樹脂製円柱状容器に、能動電極（K-file #10-40）を容器中に挿入して、20 W 出力で 1 秒間通電させ、生じた蛋白凝固層を観察した。

(2) 高周波・電磁波照射による培地の温度変化の測定：周波数は 500-1,000 kHz に設定し、通電時間は 1 秒間に規定し、能動電極は Mani 社製 K- file #10 を使用し、通電による蓄熱現象を検討するため、CUSTUM CT-1300 Type K (CUSTUM Corp.)を用いて培地の温度変化をモニタリングした。

(3) 電磁波・高周波照射の口腔細菌に対する殺菌効果の解析：寒天培地上に播種した大腸菌(*Escherichia coli*)や口腔細菌(*Fusobacterium nucleatum*)に、能動電極として K- file (#10)を用いて高周波・電磁波を照射（500-1,000 kHz、1 秒）し、生じた発育阻止円の直径を測定した。また、口腔細菌(*Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *S. intermedius* や *Enterococcus faecalis*)の菌懸濁液に高周波・電磁波を照射後（500-1,000 kHz、1 秒/回、5-15 回）、菌液を寒天培地に塗抹し、37°C で培養後、colony count を行って殺菌効果を解析した。

(4) 高周波・電磁波照射による口腔細菌の電子顕微鏡下での形態変化の観察：高周波・電磁波照射による形態変化を走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察を行った。

(5) 高周波・電磁波照射 *S. mutans* の THP-1 細胞におけるサイトカイン産生誘導能：ヒト単球系細胞・THP-1 細胞を高周波・電磁波照射（500 kHz、1 秒/回、5 回）した *S. mutans* MT8148 で 6 時間刺激し、培養上清中の炎症性サイトカインを ELISA にて定量した。対照として、100°C で 10 分間熱処理した *S. mutans* と未処理の *S. mutans* 生菌を用いた。

(6) 高周波・電磁波照射（500 kHz、1 秒/回、5 回）した *P. gingivalis* のジンジパイン活性：*P. gingivalis* ATCC33277 の arginine- (Rgp) 及び lysine-specific (Kgp) gingipains 活性は、*P. gingivalis* 懸濁液と基質 2 mM の *N*-Benzoyl-L-Arginine-4-Nitroanilide

Hydrochloride (BAPNA) あるいは L-Lysine-*p*-nitroanilide dihydrobromide (Z-Lys-pNa) を室温で反応させ、反応後の *p*-nitroanilide を 405 nm で測定した。対照として、65°C で 10 分間熱処理した *P. gingivalis* と未処理の *P. gingivalis* 生菌を用いた。

(7) 電磁波・高周波照射のマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の細胞増殖に対する効果と細胞障害性の解析：48-well plate に播種した MC3T3-E1 ($1.8 - 1.9 \times 10^4$ cells/well) に、高周波・電磁波を照射し、TetraColor One (生化学工業) を用いて、経日的に細胞増殖に対する効果を解析した。また電磁波・高周波照射による細胞傷害活性は、LDH Cytotoxicity Assay Kit (Cayman Chemical Co.) を用いて測定した。

(8) 電磁波・高周波照射による MC3T3-E1 細胞での遺伝子発現変化の網羅的解析：高周波・電磁波(500 kHz、1 秒/回、5 回)照射 1 日と 3 日後に、MC3T3-E1 から抽出・精製した total RNA を用いて、Microarray (Affimetrix) により遺伝子発現を網羅的に解析した。

(9) 電磁波・高周波照射による MC3T3-E1 細胞での遺伝子発現と蛋白産生の定量：Microarray による遺伝子発現解析結果に基づいて、高周波・電磁波(500 kHz、1 秒/回、5 回)照射後に、MC3T3-E1 細胞から抽出・精製した total RNA と培養上清を用いて、real-time PCR と ELISA により遺伝子発現と蛋白産生の定量解析を行った。

(10) 電磁波・高周波照射が影響を及ぼす MC3T3-E1 細胞のシグナル伝達経路の解析：高周波・電磁波(500 kHz、1 秒/回、5 回)照射後、細胞を Lysis buffer を用いて回収し、各 cell signaling molecule 特異的抗体を用いた Western Blot 法にてリン酸化に対する影響を解析した。また、各シグナル経路特異的阻害剤で 30 分間前処理後、高周波・電磁波(500 kHz、1 秒/回、5 回)照射し、培養上清中の Growth Factor や Osteopontin の濃度を ELISA 法にて定量した。

4. 研究成果

(1) 卵白やアルブミンに高周波・電磁波照射(500-1,000 kHz)後、生じた蛋白凝固層を確認すると、能動電極である File 先端部の側面方向に 1-2 mm 程度の蛋白凝固層が認められた。

(2) 電磁波・高周波(周波数 500 kHz)照射では、1 回の照射につき約 4.5°C の温度上昇を認め、10 回照射後の温度は、74.5 °C であった(図 1)。

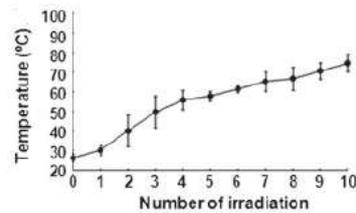


図 1
高周波・電磁波照射による温度変化

(3) 寒天培地上に播種した *E. coli* や *F. nucleatum* に、高周波・電磁波を照射すると約 2-3 mm の阻止円が確認され、項目(1)の蛋白凝固層と同様に、寒天培地上で側方に向けての殺菌効果が確認できた(図 2A)。さらに、*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *S. mutans*, *S. intermedius* や *E. faecalis* の菌懸濁液に高周波・電磁波を照射すると、500-1,000 kHz の周波数では、殺菌効果に顕著な差は認められなかったが、*E. faecalis* を除いて、照射回数依存的に colony count により顕著な viability の減少、すなわち殺菌効果の増強が認められた(図 2B)。

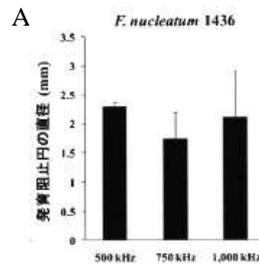
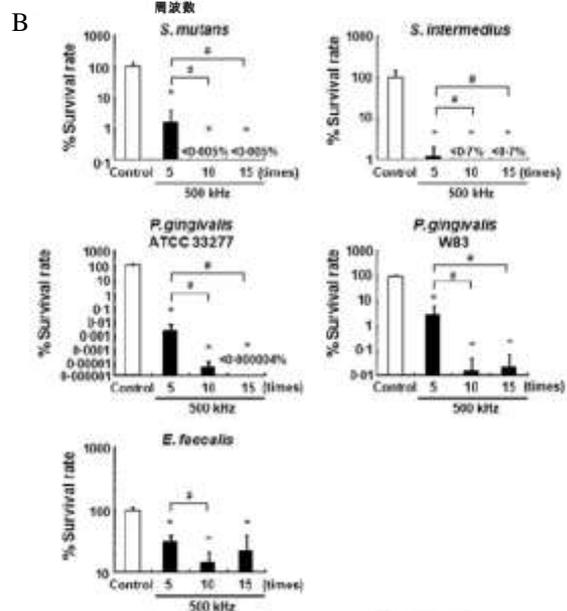


図 2
A: 発育阻止円
B: 高周波・電磁波照射の照射回数による殺菌効果



(4) SEM 観察により、電磁波・高周波の 500 kHz・5 回照射(1 秒/回)では、*S. mutans* の連鎖は明らかに短くなり、*S. mutans* (10 回以上照射)と *P. gingivalis* (5 回以上照射)の菌体外形は不明瞭で凝集塊様様が観察された(図 3)。

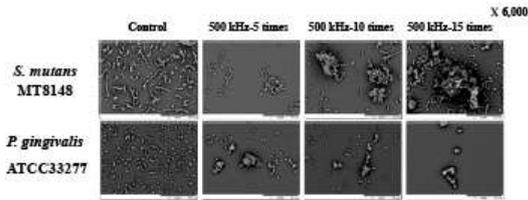


図3 高周波・電磁波照射後のSEM像

(5) 高周波・電磁波照射した *S. mutans* の THP-1 細胞へのサイトカイン産生誘導能は、熱処理した死菌と同レベルまで減少した (図4)。

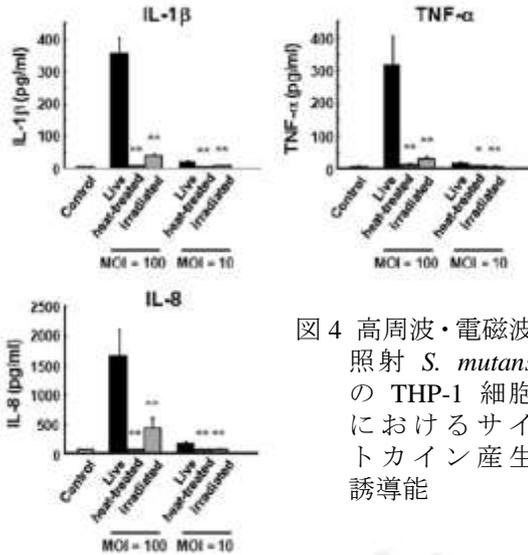


図4 高周波・電磁波照射 *S. mutans* の THP-1 細胞におけるサイトカイン産生誘導能

(6) 高周波・電磁波照射は、*P. gingivalis* の gingipain 活性を顕著に抑制した (図5)。

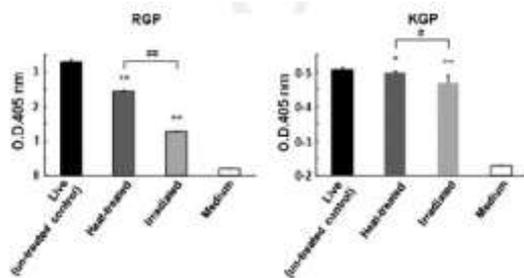


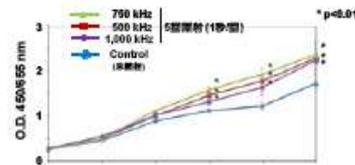
図5 高周波・電磁波照射した *P. gingivalis* の gingipain 活性

上記の結果より、高周波・電磁波照射は、蛋白凝固効果に加えて、顕著な殺菌効果を認め、根管系に棲息する病原細菌の殺菌に有効である可能性が示唆された。さらに、根管治療に使用する細く・フレキシブルな根管治療用 file を応用できることから、細く彎曲した根管のみならず、根尖孔外にも照射可能である利点を有する事が示唆された。

(7) 高周波・電磁波(500, 750, 1,000 kHz)照射後3日目より、MC3T3-E1細胞に有意な細胞

増殖・活性の上昇が認められた (図6A)。また細胞増殖・活性の上昇に関して、周波数(500, 750, 1,000 kHz)による有意な影響は認められなかった。さらに石灰化誘導培地 (5 mM β -glycerophosphate と 50 μ g/ml ascorbic acid 添加) を用いた場合でも、500 kHz で 1 秒間 5 回の電磁波・高周波照射により、MC3T3-E1 細胞の有意な細胞増殖・活性の上昇が認められた。照射方法に関して、500 kHz で 1 秒間 5 回の電磁波・高周波照射を 5 日間連日照射した場合も、1 日目だけ照射した場合と比較して有意な細胞増殖・活性の上昇は認められなかった。様々な周波数(500, 750, 1,000 kHz で 1 秒間 5 回)や照射回数(500 kHz で 1 秒間 5, 10, 15 回)による条件で電磁波・高周波照射後、MC3T3-E1 細胞に対する細胞障害性を LDH Cytotoxicity Assay にて調べた結果、すべての条件下において顕著な細胞障害は認められなかった (図6B)。

A



B

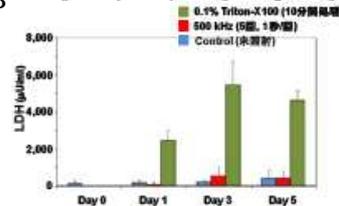


図6 電磁波・高周波照射の MC3T3-E1 細胞の細胞増殖に対する効果(A)と細胞障害性(B)

(8) Microarray による遺伝子発現解析結果より、MC3T3-E1 細胞で、2 倍以上の発現増強が認められた遺伝子数は 147 であり、1/2 以下に発現が抑制された遺伝子数は 117 であった。特に高周波・電磁波(500 kHz, 5 回, 1 秒/回)照射 1 日後で、Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Connective Tissue Growth Factor (CTGF) や Osteopontin 等の遺伝子発現が顕著に増強(2.26-4.02 倍)していた。

(9) Real-time PCR 及び ELISA により MC3T3-E1 細胞での遺伝子発現と蛋白産生の定量解析を行った結果、PDGF α , TGF- β 1, bFGF, CTGF の遺伝子発現変化は、Microarray の結果と一致し、それらの培養上清中の蛋白量も ELISA 法にて高周波・電磁波照射 5 日後まで顕著に増加していた。また Microarray 上に Spot の無い Osteopontin に関しては、照射

1日と3日後で遺伝子発現誘導が認められ、さらに培養上清中の Osteopontin 量を ELISA 法にて解析した結果、電磁波・高周波照射1日目以降で有意に Osteopontin の分泌増強が認められた(図7)。

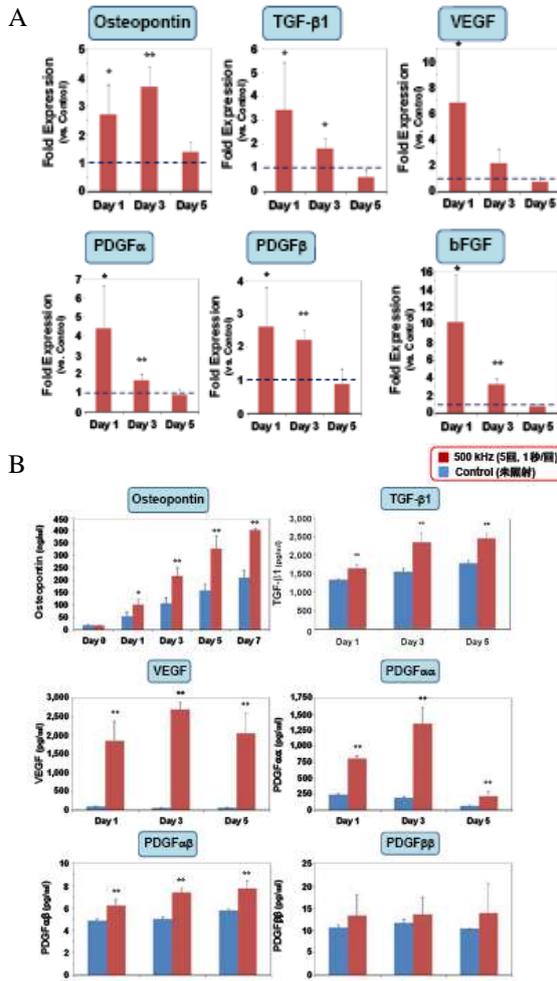


図7 MC3T3-E1細胞での Real-time PCR による遺伝子発現の定量解析(A)と ELISA による蛋白産生の定量解析(B)

(10) 高周波・電磁波(500 kHz, 5回, 1秒/回)照射により、MC3T3-E1細胞において照射後5-30分以内に ERK1/2, p38 MAPK 及び SAPK/JNK のリン酸化が誘導され、さらに ERK1/2 や p38 MAPK の特異的 inhibitor 処理により、Osteopontin, PDGFαや VEGF の産生誘導が部分的に抑制された(図8)。

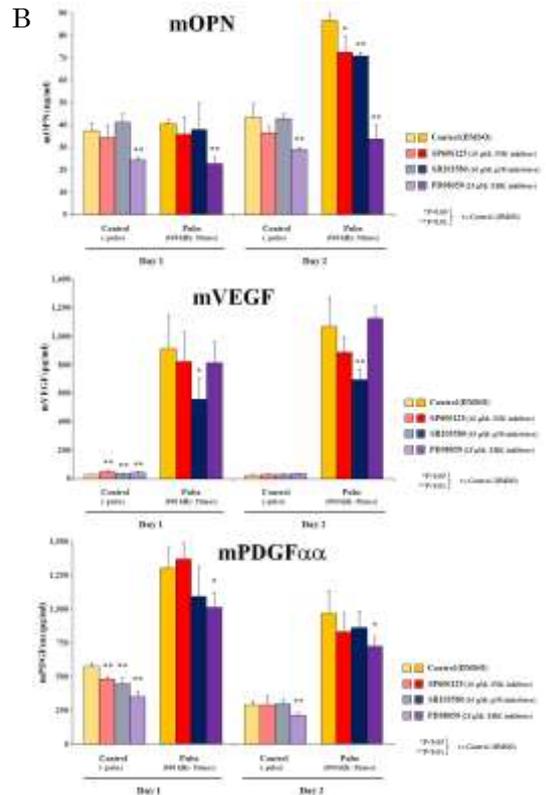
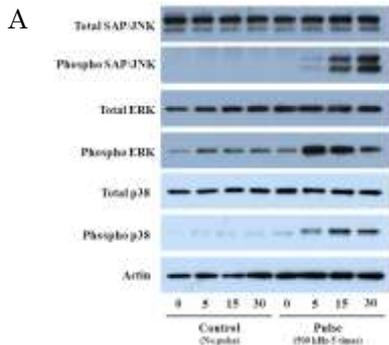


図8 電磁波・高周波照射が影響を及ぼす MC3T3-E1 細胞のシグナル伝達経路の Western Blot 法(A)と各シグナル経路特異的阻害剤(B)による解析

上記の結果より、高周波・電磁波照射は、骨芽細胞の ERK1/2, p38 MAPK 及び SAPK/JNK Pathways を活性化して Growth Factor や Osteopontin 等の遺伝子発現と蛋白産生を誘導する事が示された。また治癒促進に適用されている高周波治療や電磁波照射を難治性根尖性歯周炎に対する非外科的歯内療法あるいは歯周組織再生療法に適用できる可能性が示唆された。

現在、“難治性根尖性歯周炎の大きな原因である根尖孔外-Biofilmや副根管等の複雑化した根管系”にアプローチできるEvidenceを有した治療法はなく、これまではEr:YAG等の歯科用レーザーの歯内療法への応用を試みる為の細菌に対する基礎的な報告はなされているが、レーザーチップの材質・直径等の形態や彎曲根管等の解剖学的形態による制限の為、根尖孔外はもちろん根尖孔から1mm以内の照射には限界があり不可能であった。さらに高齢化社会において、外科的歯内療法は患者にとって負担となり、口腔内という特殊な環境においては、大白歯部や口蓋側等、部分的にも適応困難な症例も存在し、制限があり、患者側の利益を考慮すると、難治性根尖性歯周炎に対して、根管経由での新たな治療法の開発が望まれている。

我々は、電磁波・高周波の狭小領域での電磁エネルギー発生・ジュール熱発生という特性に着目した。すなわち通常根管治療に使用するファイルを根尖孔外及び根尖部に挿入し、そのファイル先端から電磁波・高周波を照射する事により、根尖孔外あるいは複雑化した根尖部根管系に棲息してBiofilmを形成する細菌を殺菌すると同時に、ジアテルミー療法により根尖歯周組織の組織治癒・修復力を増強する治療法として、電磁波・高周波を応用した新規の非外科的歯内療法を開発する事を目的として研究を行い、上記の結果を得た。得られた結果に基づく電磁波・高周波の歯内療法への応用方法は、これまでに国内はもとより国外・世界的にも報告は皆無であり、現在までの通法による器械的な根管形成・拡大の限界を超えた根尖孔外という領域へのアプローチが可能というのみならず、抗生剤の応用による耐性菌の出現・慢性化の危険性も生じることがなく、臨床的にも意義深く・有用であると期待される。今後、さらに動物実験や臨床試験へ展開・進展させて、早期の臨床応用が望まれる。

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2件)

- ① Hiromichi Yumoto, Toshihiko Tominaga, Kouji Hirao, Tomoko Kimura, Kanako Takahashi, Takashi Sumitomo, Naoki Bando, Takashi Matsuo, Bactericidal activity and oral pathogen inactivation by electromagnetic wave irradiation, Journal of Applied Microbiology, In press, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05307.x
 - ② 坂東直樹、富永敏彦、湯本浩通、住友孝史、平尾早希、平尾功治、松尾敬志、電磁波照射の歯内療法への応用 -EMAT (Electro-Magnetic Apical Treatment)-、歯内療法学会雑誌、査読有、Vol. 32、No. 3、2011、pp. 184-200.
- [学会発表] (計13件)
- ① Hiromichi Yumoto, Basic Research aimed at Application of Electro-Magnetic Wave Irradiation for Endodontic Treatment, The 13th Joint-Scientific Meeting of Korean Academy of Conservative Dentistry & Japanese Society of Conservative Dentistry, 2011. 11. 11, Kim Koo Museum & Library (Korea, Seoul)
 - ② 湯本浩通、高周波・電磁波照射による骨芽細胞のGrowth Factorの発現・産生誘導、第135回日本歯科保存学会秋季学術大会、2011. 10. 20、大阪国際交流センター(大阪市)

- ③ 湯本浩通、高周波・電磁波照射を歯内療法に応用した症例、第134回日本歯科保存学会春季学術大会、2011. 6. 9、東京ベイ舞浜ホテル クラブリゾート(浦安市)
- ④ Hiromichi Yumoto, Inactivation and Bactericidal Activity against Oral Bacteria of Electro-Magnetic Wave, 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2010. 7. 15, Centre Convencions Internacional Barcelona (Spain, Barcelona)
- ⑤ 湯本浩通、The effects of Electro-Magnetic-Wave on Oral Bacterial Viability, 第83回日本細菌学会総会、2010. 3. 29、パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑥ 湯本浩通、口腔病原菌に対する高周波・電磁波照射の殺菌効果、第131回日本歯科保存学会秋季学術大会、2009. 10. 29、仙台国際センター(仙台市)

[その他]

- ① 口腔病原菌の殺菌に高周波・電磁波照射が有用、Medical Tribune、2010. 5. 6.
- ② Tissue Regeneration, NHK World News, 2009. 8. 4

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯本 浩通 (YUMOTO HIROMICHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：60284303

(2) 研究分担者

松尾 敬志 (MATSUO TAKASHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：30173800

尾崎 和美 (OZAKI KAZUMI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：90214121

中西 正 (NAKANISHI TADASHI)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：00217770

中江 英明 (NAKAE HIDEAKI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号：30227730

(3) 連携研究者

()

研究者番号：