

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 6 月 6 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592428

研究課題名（和文） *in vitro* モデルを用いたバイオフィilm除去法と根尖歯周組織再生の検討研究課題名（英文） Study of biofilm elimination and regeneration of periapical lesion using *in vitro* periapical lesion defect model

研究代表者

永吉 雅人 (NAGAYOSHI MASATO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30382419

研究成果の概要（和文）：

根尖性歯周炎への歯内治療成功率向上と難治性根尖性歯周炎の病態解明・治療法開発に向け、根尖部バイオフィilmに対し様々な研究が行われている。近年、歯科治療において各種レーザーが光学的治療法 (photodynamic therapy:PDT) として応用されつつあり、歯内治療においても各種レーザーが根管の無菌化に対して高い効果を発揮するという報告もある。

今回我々は、レーザーの中でも低出力から高出力までの連続的変換使用が可能な半導体レーザー（パナソニック P-Laser）の殺菌効果・作用条件および殺菌メカニズムを明らかにするため、新たに *in vitro* 根尖病巣モデルを作製し、半導体レーザーの作用量（出力およびパルス幅）、作用時間、また、半導体レーザー集積に影響を与える特定色素 (photosensitizer:PS) の有無による、レーザー照射の根尖部病巣モデルへの影響を検討した。

実験の結果、半導体レーザー照射により、*in vitro* 根尖病変モデル内の *E. faecalis* は PS 存在下で死滅したが、PS 非存在下では殆ど死滅しなかった。また、PS 存在下ではレーザー照射によって病巣内部の温度は 65℃と著しく上昇したが、病巣周囲の温度には殆ど変化がなかった。さらに *E. faecalis* はレーザー照射時と同じ温度の一過性の熱刺激のみでは死滅しなかった。すなわち、半導体レーザーは PS を併用することで *E. faecalis* に殺菌効果を示すこと、半導体レーザーのエネルギーは PS 併用により周囲に拡散せず根尖病巣部のみに集積すること、およびレーザー照射時にみられる発熱と同程度の熱刺激のみでは *E. faecalis* は死滅しないことから半導体レーザーによる殺菌効果は発熱によるものではないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Objective. Photodynamic therapy has been expanded for use in endodontic treatment. The aim of this study was to investigate the antimicrobial effects of diode laser irradiation on endodontic pathogens in periapical lesions using an *in vitro* apical lesion model. **Study Design.** *Enterococcus faecalis* in 0.5% semisolid agar with a photosensitizer was injected into apical lesion area of *in vitro* apical lesion model. The direct effects of irradiation with a diode laser as well as heat produced by irradiation on the viability of microorganisms in the lesions were analyzed. **Results.** The viability of *E. faecalis* was significantly reduced by the combination of a photosensitizer and laser irradiation. The temperature caused by irradiation rose, however, there were no cytotoxic effects of heat on the viability of *E. faecalis*. **Conclusion.** Our results suggest that utilization of a diode laser in combination with a photosensitizer may be useful for clinical treatment of periapical lesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：歯内療法学

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、傷害を受けた歯髄の再生療法確立に関する研究成果をあげてきた(Nomiyama et al., J Endod, 2007; Kikuchi et al., J Endod, 2007)。しかしながら、う蝕等から歯髄炎・根尖性歯周炎が連続する症例は多く、根尖性歯周炎はう蝕や歯周病と並び日常診療で頻繁に遭遇する疾患と言える。歯内療法後に再発する根尖性歯周炎も多く、最終的に抜歯に到ることもある。これまでに歯内治療歯の予後追跡調査から、歯髄炎による歯内治療歯の治癒率は90%以上であるのに対し、根尖性歯周炎、とりわけ根尖病巣の認められる再治療症例の治癒率は70%程度であることが報告されている(Sjogren et al., J Endod, 1990)。

根尖病巣には *Peptostreptococcus* 等の嫌気性菌や *Enterococcus* 等の通性嫌気性菌が複数存在すること(Fukushima et al., J Endod, 1990)、根尖病巣内の歯根表層にはバイオフィームが存在すること(Noiri et al., J Endod, 1990)が明らかにされ、根尖部バイオフィームが難治性根尖性歯周炎の原因の1つと考えられている。根尖部バイオフィームの適切な除去・無菌化が根尖性歯周炎の歯内治療成功率向上に寄与するといえる。

根尖性歯周炎の歯内治療成功率向上と難治性根尖性歯周炎の病態解明・治療法開発に向け、根尖部バイオフィームと広範囲骨欠損に対し様々な研究が行われている。バイオフィーム除去に関しては、*in vivo* 動物

実験において感染根管を作成・検討した研究や、*in vitro* 実験で細菌感染後の抜去歯に対するレーザー照射の効果を検討した研究

(Soukos et al., J Endod. 2006; Foschi et al., Lasers Surg Med. 2007) が報告されている。我々は、これまでに *in vitro* においてバイオフィームや歯根象牙細管内に存在する細菌除去におけるオゾン水の有効性について報告してきた(Nagayoshi et al., Oral Microbiol Immunol 2004; Nagayoshi et al., J Endod 2004)。また、歯周組織再生療法確立を目指して各種サイトカインを用いた歯根膜周囲組織に存在する骨芽細胞、線維芽細胞等の増殖・分化を検討した研究が数多く報告されている (Liu et al., J Dent Res. 2007; Tomokiyo et al., Differentiation. 2008)。最近では生体に大きな侵襲を加えない低出力レーザー照射による骨芽細胞機能発現・分化誘導療法の研究関心が集まっている (Xu et al., Photomed Laser Surg. 2008)。しかしながら、根尖部バイオフィーム除去と根尖歯周組織再生を同時に目指す治療法の研究は見られず、また根尖病変・組織欠損モデルを作製し、*in vitro* の3次元的環境下にバイオフィーム形成・除去および組織再生に関わる各種細胞の増殖・分化を検討した研究は無い。

そこで、今回、以下に示す研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) 根尖病巣の人工的モデル作製

レジン歯およびレジンブロックを用いて、簡便かつ規格化された根尖病巣モデルを作製する。これらのモデルを滅菌処理後、根尖病巣に相当する空間に培地および細菌を注入・培養し、人工歯根表層にバイオフィルムを形成する最適な条件を確立する。

(2) 歯内治療に使用される各種薬剤の殺菌効果の検討

作製した根尖病巣モデルを用いて確立した根尖部バイオフィルムモデルに対し、歯内治療に用いられている各種根管洗浄剤・貼薬剤を人工歯根管部分から作用させることにより、我々が確立したモデルの有効性を検討するとともに、各種薬剤の根尖部バイオフィルム除去効果を、より生体に近い環境下で検討する。

(3) 半導体レーザーの殺菌効果および根尖部バイオフィルム除去の検討

近年、歯科治療において各種レーザーが光学的治療法(photodynamic therapy:PDT)として応用されている(Konoplam et al., J Dent Res, 2007)。歯内治療においても各種レーザーが根管の無菌化に対して高い効果を発揮したという報告もある(Garcez et al., J Endod. 2008)しかし、レーザーがどのような機序で殺菌効果を発揮しているのかは未だ十分に解明されていない。今回、根尖病巣バイオフィルムモデルを用いて、レーザーの中でも低出力から高出力までの連続的変換使用が可能な、半導体レーザー(パナソニック P-Laser)の殺菌効果・作用条件および殺菌メカニズムを明らかにする。

(4) 根尖歯周組織を構成する各種細胞への低出力レーザー効果の検討

近年、低出力レーザーによる細胞活性化療法(Low-level Laser Therapy; LLLT)が注目されている。一方で、FGF-2 や BMPs が血管新生や骨芽細胞等の分化誘導に深く関与していることが数多く報告されている。我々は、確立した根尖病巣モデルの根尖周囲の空間中にコラーゲンゲル等の細胞外マトリックスとともに骨芽細胞・線維芽細胞、あるいは神経細胞を注入して、3次元培養する方法を確立し、培養細胞に半導体レ

ザー(パナソニック P-Laser)を低出力照射した場合と FGF-2 や BMPs を併用した場合の細胞分化の違いに関して検討し、根尖部骨欠損部を組織再生するのに最適なレーザー出力を検討する。

3. 研究の方法

1) 根尖病巣モデル作製

株式会社ニッシンとの共同研究において、今回の研究で用いる根尖病巣モデルの開発・作製を行なう。モデルは歯根ブロックと根尖病巣部に相当する空間のある顎骨ブロックが独立し、個々に滅菌したパーツを適合させることにより病巣と類似した環境を作り出すように設計する。根尖病巣に相当する空間は、エックス線写真上での根尖病巣直径が 5mm 以上の症例では予後不良であることが多いという研究(Sjogren et al. JOE 16: 498-504, 1990)に基づき、最大幅径を 10mm とする。

2) 根尖部バイオフィルム・モデルの作製

上記計画 1) で作成した根尖病巣モデルを用いる。根尖部バイオフィルム形成のために、根尖病巣空間に直接あるいは歯根ブロックの根管を經由して細菌および基質を注入し、細菌培養環境を作り出す。一定期間経過後に歯根ブロックの根尖表層におけるバイオフィルム形成状態を確認することで、本モデルにおける最適な根尖病巣バイオフィルム形成条件を検討する。

3) 歯内治療に用いる各種根管洗浄剤・根管貼薬剤の殺菌効果の検討

上記計画 2) において作製した根尖部バイオフィルム・モデルに対し、現在歯内治療に用いられている各種根管洗浄剤および根管貼薬剤を歯根ブロックの根管を經由して作用させる。作用濃度、作用時間、作用量の違いによる各薬剤のバイオフィルムに対する効果を組織学的に検討する。

4) 半導体レーザー照射による根尖部バイオフィルムへの影響の検討

上記計画 2) において作製した根尖部バイオフィルム・モデルに対し、歯根ブロックの根管を經由して、半導体レーザー(パ

ナソニック P-Laser) をバイオフィームに照射する。半導体レーザーの作用量(出力およびパルス幅) および作用時間の違い、また、半導体レーザー集積に影響を与える特定色素(photosensitizer:PS)の有無による、レーザー照射の根尖部バイオフィームへの影響を検討する。

バイオフィームの影響については、走査型電子顕微鏡によるバイオフィーム内細菌の微細構造観察、および蛍光色素染色後の菌体を蛍光顕微鏡観察し、菌体表層構造の変化、ならびに細胞膜透過性の変化を検討する。

5) モデル顎骨ブロックの根尖病巣空間における細胞培養法の確立

作製モデルの根尖病巣空間部分における、線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および神経細胞といった根尖歯周組織を構成する各細胞の培養条件を確立する。細胞外基質となるコラーゲン・ゲルあるいはグリコサミノグリカン・ゲルと各細胞を混合した状態でモデルの空間に注入し、適切な培養条件を検討する。各細胞の生死を MTT アッセイ、BrdU アッセイ等により確認し、また培養細胞とゲルの混合物の切片を作製し、形態を光学顕微鏡、走査型あるいは透過型電子顕微鏡下で観察する。

6) 3次元培養細胞への各種薬剤および半導体レーザーの影響の検討

上記計画5)で確立した培養細胞に対し、根管洗浄剤、根管貼薬剤の各薬剤、および半導体レーザーを様々な条件で作用させ、各刺激が培養細胞に与える影響を MTT アッセイ、BrdU アッセイ、ELISA 法、および免疫組織学的手法により検討する。

特に、半導体レーザーについては、その照射出力が連続的に変換できるため、細胞生存に影響を与えない低出力照射法を検討する。

7) 根尖歯周組織再生に向けた3次元培養細胞への半導体レーザーの影響の検討

根尖歯周組織再生療法を確立するため、上記計画5)で確立した培養細胞に対して半導体レーザーを低出力照射し、細胞増殖

能、石灰化能、および炎症・免疫応答能を MTT アッセイ、BrdU アッセイ、ALP アッセイ、ELISA 法、RT-PCR 法、Western Blotting 法を用いて検討する。

また、細胞培養時に FGF-2 や BMPs を投与した場合の半導体レーザーの影響についても検討する。

8) バイオフィーム除去と培養細胞分化を連続的に誘導する半導体レーザー照射法の検討

上記計画1)から計画7)で得られた結果を元に、バイオフィーム・モデル除去、および各種細胞分化誘導を連続的に行なえる半導体レーザー照射条件を検討する。具体的には、歯根ブロック表層へのバイオフィーム形成と、病巣空間における細胞培養を別々に実施し、バイオフィームが形成された歯根ブロックを細胞培養されている顎骨ブロックに挿入することにより、上記実験を行なう。

4. 研究成果

実験の結果、半導体レーザー照射により、*in vitro* 根尖病巣モデル内の *E. faecalis* は PS 存在下で死滅したが、PS 非存在下では殆ど死滅しなかった。また、PS 存在下ではレーザー照射によって病巣内部の温度は 65℃と著しく上昇したが、病巣周囲の温度には殆ど変化がなかった。さらに *E. faecalis* はレーザー照射時と同じ温度の一過性の熱刺激のみでは死滅しなかった。すなわち、半導体レーザーは PS を併用することで *E. faecalis* に殺菌効果を示すこと、半導体レーザーのエネルギーは PS 併用により周囲に拡散せず根尖病巣部のみに集積すること、およびレーザー照射時にみられる発熱と同程度の熱刺激のみでは *E. faecalis* は死滅しないことから半導体レーザーによる殺菌効果は発熱によるものではないことが明らかとなった。

今回の研究の第一目標であった、新たな *in vitro* 根尖病巣モデルの確立、ならびに半導体レーザーの殺菌効果を発揮する条件設定と周囲組織への影響の検討を行うことができたが、作製モデルの根尖病巣空間部分における、線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および神経細胞といった根尖歯周組織を構成する各細胞の培養条件を検討が今後の検討課題として残った。

現在、モデル顎骨ブロックの根尖病巣空間における細胞培養法の確立のために、作製モデルの根尖病巣空間部分における、線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および神経細胞といった根尖歯周組織

を構成する各細胞の培養条件を検討中である。細胞外基質となるコラーゲン・ゲルあるいはグリコサミノグリカン・ゲルと各細胞を混合した状態でモデルの空間に注入し、適切な培養条件を検討している。

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 3 件)

(著者名)

北村知昭, 西野宇信, 矢野淳也, 永吉雅人, 鷺尾絢子, 平田志津, 吉居慎二, 西藤法子

(論文標題)

歯科保存学の現状と先端科学

(雑誌名)

九州歯科学会雑誌

(巻)

64

(発行年)

2010

(最初と最後の頁)

66-73

(著者名)

Nagayoshi M, Nishihara T, Nakashima K, Iwaki S, Chen KK, Terashita M, Kitamura C.

(論文標題)

Bactericidal Effects of Diode Laser Irradiation on Enterococcus faecalis Using Periapical Lesion Defect Model

(雑誌名)

ISRN Dent.

掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子): 10.5402/2011/870364

(発行年) 2011

(最初と最後の頁)

Article ID 870364 (6 pages)

(著者名)

Takahashi Y, Yoshida A, Nagayoshi M, Kitamura C, Nishihara T, Awano S, Ansai T.

(論文標題)

Enumeration of viable Enterococcus faecalis, a predominant apical periodontitis pathogen, using propidium monoazide and quantitative real-time polymerase chain reaction.

(雑誌名)

Microbiol Immunol.

(巻)

55(12)

(発行年)

2011

(最初と最後の頁)

89-92

[学会発表] (計 8 件)

(発表者名)

永吉 雅人

(発表標題)

in vitro 根尖病巣モデルにおける半導体レーザーの殺菌効果の検討

(学会等名)

第 69 回九州歯科学会総会

(発表年月日)

2009 年 5 月 30 日

(発表場所)

九州歯科大学(北九州市)

(発表者名)

永吉 雅人

(発表標題)

in vitro 根尖病巣モデルを用いた半導体レーザー照射による殺菌効果の検討

(学会等名)

第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会

(発表年月日)

2009 年 10 月 28 日

(発表場所)

仙台国際センター(仙台市)

(発表者名)

永吉雅人

(発表標題)

Propidium monoazide(PMA)を用いた Real-time PCR 法による根管細菌の定量化の試み

(学会等名)

日本歯科保存学会秋季学術大会

(発表年月日)

2010/10/28,29

(発表場所)

岐阜

(発表者名)

NAGAYOSHI Masato

(発表標題)

Quantification of Endodontic bacteria using Propidium Monoazide(PMA), with Real-time PCR.

(学会等名)

Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research

(発表年月日)

2010/11/20,21

(発表場所)

Kitakyushu

(発表者名)

永吉雅人

(発表標題)

歯内治療における術後疼痛の分析 — (1) 根管治療中の術後疼痛の発生頻度と根尖孔穿通が術後疼痛出現に与える影響の解析

(学会等名)

九州歯科学会

(発表年月日)

2011年, 5/28, 5/29

(発表場所)

北九州

(発表者名)

永吉雅人

(発表標題)

歯内治療における術後疼痛の分析 — 感染根管治療における根尖狭窄部拡大が術後疼痛の発生頻度に与える影響の解析

(学会等名)

歯内療法学会

(発表年月日)

2011年, 7/30, 7/31

(発表場所)

長崎

(発表者名)

永吉雅人

(発表標題)

感染根管治療時の術後疼痛発症頻度および非菌原性疼痛との関連についての検討

(学会等名)

日本口腔顔面疼痛学会

(発表年月日)

2011年 10/8, 10/9

(発表場所)

神戸

(発表者名)

永吉雅人

(発表標題)

感染根管治療時の意図的根尖狭窄部拡大が術後疼痛発生に与える影響と非菌原性疼痛との関連の検討

(学会等名)

日本歯科保存学会

(発表年月日)

2011年 10/20, 10/21

(発表場所)

大阪

[図書] (計1件)

(著者名)

阿南壽・泉利雄・諸富孝彦・木村裕一・松島潔・赤峰昭文・吉嶺嘉人・五十嵐勝・古市保志・森真理・石井信之・前田宗宏・小木曾文内・吉田隆一・林宏行・馬場忠彦・恵比須繁之・林美加子・中川寛一・寺下正道・永吉雅人・島内英俊・松尾敬志・北村知昭・笠原悦男

(出版社)

医歯薬出版

(書名)

歯内治療学 第4版

(発行年)

2012年

(総ページ数)

292

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永吉 雅人 (NAGAYOSHI MASATO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 30382419

(2) 研究分担者

北村 知昭 (KITAMURA CHIAKI)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 50265005

尾川 幸雄 (OGAWA YUKIO)

九州歯科大学・歯学部・特別研修員

研究者番号: 50379989

上野 喜子 (UENO YOSHIKO)

九州歯科大学・歯学部・特別研修員

研究者番号: 60536291

寺下 正道 (TERASHITA MASAMICHI)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号:

西原 達次 (NISHIHARA TATSUJI)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：80192251

(3) 連携研究者
()

研究者番号：