

令和 7 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K10002

研究課題名（和文）根尖病巣複合Biofilmの性状解明と天然成分エッセンシャルオイルの有用性

研究課題名（英文）Characterization of periapical lesion complex biofilm and the usefulness of natural essential oils

研究代表者

原口 晃（Haraguchi, Akira）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00734998

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：根尖性歯周炎は細菌感染で惹起される感染症であり、心疾患との関連も報告されている。E. faecalisは、根管治療中に高頻度に検出され、菌血症や感染性心内膜炎との関連も示唆され、根管内に侵入し他種細菌とBiofilmを形成し治療に抵抗性を獲得するとされる。根管内の感染源の除去には革新的治療法の開発が望まれる。天然に存在するTerpinen-4-olは抗菌性をはじめ多くの生物学的活性を有する。ここでは根尖性歯周炎において菌同士の相互作用を解明し、複合Biofilmに対してTerpinen-4-olを用いた新規抑制方法を検討する。これらは細菌の抑制に効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

E. f 等に由来するBiofilmの病原性に関する細菌間相互作用の見解は少ない。E. fを含めた細菌間の効果を検討することで根尖部における複雑性を解明し、またE. f等による複合Biofilmに対するTerpinen-4-olのBiofilm抑制法の可能性を検証する。

感染性心内膜炎(IE)の予防と治療に関するガイドラインでは、腸球菌はIEの原因菌の10%を占め、レンサ球菌、ブドウ球菌について多い。IEの原因腸球菌のうちE. fは90%以上を占めているという報告などから、全身への影響を根尖性歯周炎関連細菌制御の面から解明することに繋がり、学術的な意義は高い。

研究成果の概要（英文）：E. faecalis is frequently detected during root canal treatment, and has been reported to be associated with bacteremia and infective endocarditis, and is believed to invade the root canal and form a biofilm with other bacteria, causing resistance to treatment. The development of innovative treatment methods to eliminate the source of infection in the root canal is desirable. Naturally occurring Terpinen-4-ol has many biological activities including antibacterial activity. Here, we elucidate the bacterial interactions in apical periodontitis and investigate novel inhibitory methods using Terpinen-4-ol against complex biofilms. It is suggested that these are effective in inhibiting bacteria.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：Biofilm E. faecalis Terpinen-4-ol

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

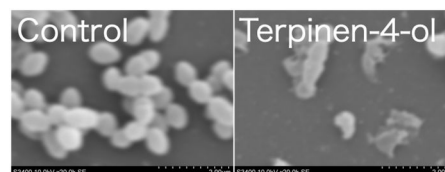
根管治療の成功率は意外に低く、本邦では87%の患者が根管充填歯を有しており、そのうち81%の患者に1本以上の根尖部透過像があることが報告されている(1)。慢性化膿性根尖性歯周炎は細菌由来の感染症である。根尖部根管内のバイオフィルムの性状に関する知見は少ないが、根管および根尖孔外から検出される細菌種として *Enterococcus faecalis* (E. f)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a)、*Streptococcus gordonii*、*Staphylococcus aureus*、*Actinomyces israelii* や *Porphyromonas gingivalis* (P. g)、*Fusobacterium nucleatum* (F. n)、*Prevotella intermedia* (P. i)などの偏性嫌気性細菌が報告されている(2,3)。よってこれらの細菌種が治療に抵抗性を示すバイオフィルムの発生に関与していることが考えられる。

これらの菌種のうち E. f は、培養法と遺伝増幅法などの分子生物学的方法のいずれを用いても、既治療の歯から頻繁に検出される細菌種(4)である。また、E. f の検出頻度が高いのは、複数回治療を受けた例やドレナージのため開放していた症例であることも報告されている(5)。これは E. f が二次的に根管内に侵入した細菌であり、その後根管内でバイオフィルムを形成し治療に対して抵抗性を獲得していることを示唆している。

菌体外多糖で構成されるグリコカリックスによって保護されたバイオフィルム中の細菌は、局所に長期に滞留し、感染の慢性化、難治化を招くと考えられている。よって口腔内のバイオフィルム感染症に対しての治療の第一選択は機械的除去であるが、除去困難な部位に形成されたバイオフィルムに対しては持続的な効果が期待できる化学療法薬を選択し対応することとなる。しかしながら、殺菌効果の高い薬剤は組織刺激性、為害性も強く、薬剤に起因する疼痛や細胞毒性が懸念される。近年では水酸化カルシウム製剤などが主流となっているが操作性、除去性について改善すべき点も多く、根管バイオフィルムに対しては新たな化学的制御法の開発が望まれる。

植物より抽出されたエッセンシャルオイルは、抗菌、抗ウイルス、抗真菌、抗酸化、抗炎症、抗腫瘍作用を発揮することが報告されている。その構成物のモノテルペン系は植物の二次代謝産物であり宿主の防御機構に関与することが知られている。そのうち Tea Tree Oil の主成分である Terpinen-4-ol(モノテルペン系モノテルペンアルコール)は前述した多くの生物活性を有しており、抗菌、抗炎症、抗真菌作用などがよく知られている。さらに Terpinen-4-ol は抗菌活性のみでなく抗バイオフィルム活性も報告されており(6)、歯科臨床に応用できる可能性が高い。

これまで、歯周病細菌間におけるバイオフィルム形成時の相互作用や、P.g と A.a のバイオフィルム中における競合関係について研究を進めてきた(7, Haraguchi et al.)。現在では、E. f バイオフィルムに対する Terpinen-4-ol の抗バイオフィルム活性について検討を進めている。Preliminary な検討から、E. f バイオフィルムを Terpinen-4-ol 処理することで、細胞壁の損傷が確認された(右図)。しかし、構造的な複雑さが予想される根尖部バイオフィルムの細菌叢について、E. f を含めた他種細菌間との相互関係についての詳細な報告はなく、この性状の解明は、根管におけるバイオフィルム形成機序とその抑制方法を理解することに繋がり、ひいては根管治療の成功率の向上、及び細菌の血中への播種に伴う全身疾患への波及の予防に寄与する。



2. 研究の目的

この度の申請では、根尖性歯周炎においてバイオフィルムを形成している E. f と A. a、P. g 等の細菌同士の共存・淘汰に向けた相互作用を検討することでバイオフィルムの増強、競合効果を明らかにする。また複合バイオフィルムに対する Terpinen-4-ol のバイオフィルム抑制方法について検討する。

3. 研究の方法

- ・ E. f と他の根尖性歯周炎原因細菌によるバイオフィルムの増強、剥離、凝集阻害作用の検討、及び変異株による E. f バイオフィルム増強因子の同定
- 各種細菌の菌体懸濁液、培養上清で各バイオフィルムを処理し、そのバイオフィルム形成増強効果、剥離効果試験を行う。特定のプロテアーゼインヒビターを用いて増強・剥離試験を行い影響のあるプロテアーゼの種類を特定する。
- ・ 複合バイオフィルムに対する Terpinen-4-ol の有効性の検討

E. f 等各菌による複合バイオフィルムを作成し、Terpinen-4-ol を用いて最小発育阻止濃度を検討すると同時に、バイオフィルム表面形態の変化を SEM にて評価する。

4 . 研究成果

今回の研究ではまず、根尖性歯周炎で検出される E. f と他種細菌との相互作用を解明することとした。E.f、P.g、P.i、F.n を用いて複合バイオフィルムに対するバイオフィルムの性状の変化の観察を行った。

E.f を基準としたバイオフィルムではそれぞれの菌でバイオフィルム増強効果が認められた。これは Ef が歯周病菌と合わさるとバイオフィルム量を増強し、より抵抗性のあるバイオフィルム構造を獲得することに寄与することが示唆された。また合わさる菌量も少量の Ef 菌との共培養によってバイオフィルム量が増強されるため、難治性根管において Ef の排除は根管バイオフィルム除去において重要であると考えられる。

各種細菌の菌体懸濁液、培養上清で各バイオフィルムを処理し、そのバイオフィルム形成増強効果、剥離効果試験を行った。

E.f のバイオフィルムに対して P.g、P.i の培養上清だけを作用させたところバイオフィルム量は減少した。また熱処理した培養上清ではバイオフィルム量ため、それぞれの菌体外に放出したプロテアーゼ、ベジクル等による剥離が行われた可能性がある。

E.f のバイオフィルムは各菌との共培養により増強され、それはそれぞれの菌体との共凝集により起こることが示唆された。またそのバイオフィルムは SEM においても厚みが増し強固なバイオフィルムが形成されていることが確認された。

複合バイオフィルムに対する Terpinen-4-ol の効果は単独バイオフィルムのと比べて抑制された。複合バイオフィルム形成により Terpinen-4-ol の効果が部分的にしか発揮できなかったと思われる。

今後においてはより詳細にバイオフィルム形成時に Ef の蛋白が関与しているかを解明し、その蛋白に対する阻害剤の検討を行う必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamiya Harunobu, Haraguchi Akira, Mitarai Hiromi, Yuda Asuka, Wada Hiroko, Shuxin Wang, Ziqing Ran, Weihao Sun, Wada Naohisa	4. 巻 30
2. 論文標題 In vitro evaluation of the antimicrobial properties of terpinen-4-ol on apical periodontitis-associated bacteria	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 306 ~ 314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2023.10.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 尚久 (Wada Naohisa) (60380466)	九州大学・大学病院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関