

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893139

研究課題名(和文)根尖孔外バイオフィームが根尖病巣に及ぼす影響

研究課題名(英文)The effects of extraradicular biofilms to periapical lesions

研究代表者

呉本 勝隆 (Kuremoto, Katsutaka)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40734306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：根尖性歯周炎の難治化には根尖孔外に存在するバイオフィームが関与していることが報告されている。そのため、我々は根尖孔外バイオフィームを形成する動物実験モデルを開発した。本研究では、そのモデルにおいてガッタパーチャポイントを引き抜く改良モデルの開発と、ガッターパーチャポイントが根尖病巣に及ぼす影響について検索した。

マイクロエンド用の器具を用いることで、ガッタパーチャポイントを引き抜くモデルの開発に成功し、そのモデルを用いて、ガッタパーチャポイントの有無によって根尖病巣サイズに影響がないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It's reported that the biofilm which exists outside the root apex participates in refractory apical periodontitis. So we developed extraradicular biofilm model in rats. In this research, we tried to development new model that pulls out gutta-percha point and investigated the effects of gutta-percha point on periapical lesions.

We succeeded in development of new model that pulls out gutta-percha point using instrument for micro endodontics. And it became clear that gutta-percha point doesn't influence periapical lesion size.

研究分野：歯内療法

キーワード：バイオフィーム 根尖性歯周炎 根管治療

1. 研究開始当初の背景

近年、根尖性歯周炎の難治化には、根尖孔外に形成されたバイオフィームが関与することが明らかとなった¹⁻⁴⁾。バイオフィーム内の細菌は、宿主の免疫反応や抗生物質に対し抵抗性を示すため、バイオフィーム感染症である齶蝕や歯周病の治療には主にバイオフィームの機械的除去が行われている。しかし、根尖孔外バイオフィームは根管からの機械的除去が不可能であるため、対応の第一選択は外科的歯内療法(歯根端切除術)となる。現在、根尖孔外など、機械的除去が困難なバイオフィームに対して新たな治療法や抑制法の開発を目指した研究が行われている^{6, 7)}。Asahi ら⁸⁾は、細菌の細胞間コミュニケーションであるクオラムセンシングに参与するアシルホモセリンラク톤の類似化合物の3種が、*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成に対して阻害効果を示すことを報告した。また、Maezono ら⁹⁾はマクロライド系抗菌剤のアジスロマイシンが、浮遊系の *P. gingivalis* の最小発育阻止濃度以下で *P. gingivalis* バイオフィームを抑制することを報告した。これら *in vitro* で得られた結果を臨床応用するためには、動物実験での抗バイオフィーム効果の検討が必要である。そのために、*in vivo* における根尖孔外バイオフィームモデルの開発が必要であると考えた。

これまで、動物を用いて実験的に根尖性歯周炎を惹起させた研究は数多く報告されている。しかし、根尖性歯周炎を惹起させ、さらに根尖孔外にバイオフィームを形成させた実験モデルの報告は未だ存在しなかった。そのため、根尖孔外バイオフィームは、その形成メカニズムや難治化との関連、および根尖病巣に及ぼす影響については未だ明らかになっていなかった。

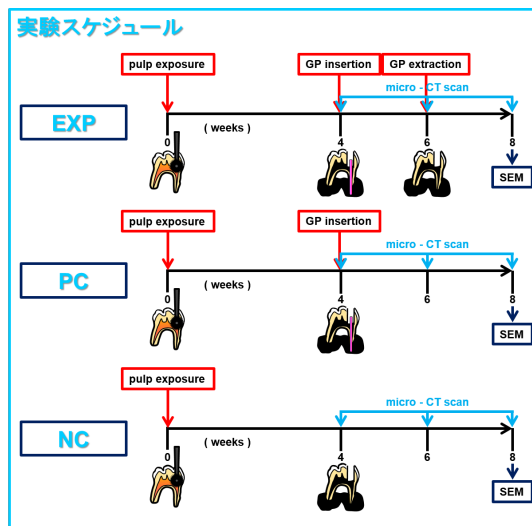
我々のグループは、実験的根尖病巣を形成したラットの下顎第一臼歯にガッタパーチャポイント(GP)を根尖孔外まで挿入することによって、実験的に根尖孔外バイオフィームを形成することに成功した¹⁰⁾。このモデルを用いて根尖孔外バイオフィームを形成させた後、マイクロCTにて経時的・三次元的に根尖病巣体積を計測したところ、GPを挿入し根尖孔外バイオフィームを形成した被験歯では、根尖孔外バイオフィームを形成していない対照歯に比べ、露髄後8週以降の根尖病巣体積が有意に拡大した。しかしこのモデルでは、根尖孔外に形成されたバイオフィームの他に、根尖孔外まで挿入されたGPも病巣拡大の原因となった可能性がある。さらに、根尖孔外バイオフィームと難治化との関連を解明するために、根尖孔外バイオフィームを形成した後に根管治療を行うモデルが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、根尖孔外バイオフィーム形成の足場として用いたGPをバイオフィーム形成後に除去するモデルを作製し、根尖孔外に挿入されたGPが根尖病巣に及ぼす影響について検索した。

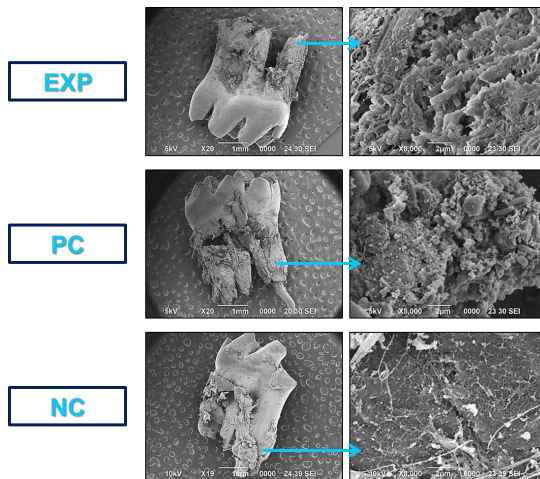
3. 研究の方法

本研究は大阪大学歯学研究科および工学研究科の動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号:22-003-2, 23-2-1)。5週齢雄性Wistar系ラットを実験に用いた。ラットの下顎両側第一臼歯をラウンドバーにて露髄させ、露髄後4週にGPを根尖孔外まで挿入し、2週後にGPを引き抜く実験群、GPを引き抜かない陽性対照(PC)群、GPを挿入しない陰性対照(NC)群の3群に群分けした。露髄後4週から8週までそれぞれの群の根尖病巣をマイクロCT(R_mCT2, RIGAKU)で撮影し、骨形態解析ソフト(TRI3D-BON, RATOC)を用いて根尖病巣体積を経時的・三次元的に計測した。また、露髄後8週にラットを屠殺した後、下顎第一臼歯を抜去し、全ての群で根尖孔外バイオフィームの存在を走査型電子顕微鏡(SEM)にて確認した。



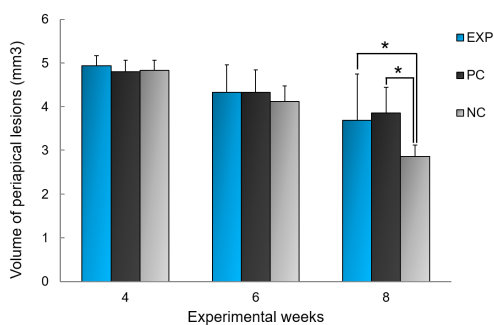
4. 研究成果

SEM 観察の結果より、全ての実験群・PC 群にて根尖孔外バイオフィルムの形成が確認されたが(右上図), NC 群では根尖孔外バイオフィルムは観察されなかった。



実験的根尖性歯周炎の根尖病巣体積は露髄後 6 週において、全ての群で有意な差はなかったが、露髄後 8 週において、実験群・PC 群では NC 群に比べて有意に増大した ($p < 0.05$)。

実験群と PC 群の間に有意差は認められなかった。



GP を引き抜いた実験群で根尖孔外バイオフィルムの存在が確認されたことから、本手法により GP の突出が影響ない根尖孔外バイオフィルムモデルが開発されたと考えられる。また、実験群と PC 群で根尖病巣体積に有意差が認められなかったことから、根尖孔外バイオフィルムが形成されている根尖病巣内では、根尖孔外に挿入されたガッタパーチャポイントは病巣拡大に影響しないことが示唆された。

【参考文献】

- 1) Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L (2002) Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 28: 304-310.
- 2) Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S (2002) Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 28: 679-683.
- 3) Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC (2002) EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 28: 815-818.
- 4) Nair PN (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Biol Med* 15: 348-381.
- 5) Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.
- 6) Kagan S, Jabbour A, Sionov E, Alquntar AA, Steinberg D, Srebnik M, Nir-Paz R, Weiss A, Polacheck I (2013) Anti-Candida albicans biofilm effect of novel heterocyclic compounds. *J Antimicrob Chemother*: Epub ahead of print.
- 7) Ma H, Darmawan ET, Zhang M, Zhang L, Bryers JD (2013) Development of a poly(ether urethane) system for the controlled release of two novel anti-biofilm agents based on gallium or zinc and its efficacy to prevent bacterial biofilm formation. *J Control Release* 172: 1035-1044.
- 8) Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Asai H, Suga H, Ebisu S (2010) Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodontol Res* 45: 255-261.
- 9) Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Izutani N, Asakami H, Ebisu S (2011) Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 5887-5892.
- 10) Kuremoto K, Noiri Y, Ishimoto T, Yoneda N, Yamamoto R, Maezono H, Nakano T, Hayashi M, Ebisu S (2014) *Appl Environ Microbiol* 80: 3804-3810.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

呉本勝隆, 野杣由一郎, 米田直道, 松井沙織, 石本卓也, 中野貴由, 恵比須繁之, 林美加子. ラット根尖孔外バイオフィルムモデルの改良. 第141回日本歯科保存学会, 山形.

6. 研究組織

(1)研究代表者

呉本 勝隆 (KUREMOTO, Katsutaka)

大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員

研究者番号: 40734306