



Title	新規開発した in vivo モデルによる根尖孔外バイオフィルムと根尖病巣に関する研究
Author(s)	呉本, 勝隆
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34375
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (呉 本 勝 隆)

論文題名

新規開発した *in vivo* モデルによる
根尖孔外バイオフィルムと根尖病巣に関する研究

論文内容の要旨

【研究目的】

近年、根尖孔外に形成されるバイオフィルムが根尖性歯周炎の難治化に関与することが明らかとなった。根尖孔外バイオフィルムは、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解明のままである。それらの問題の解明ならびに根尖孔外バイオフィルムに対する新たな制御法の開発のためには、*in vivo* における根尖孔外バイオフィルムモデルの確立が必要と考えられた。そこで本研究では、ラットを用いて根尖孔外バイオフィルムモデルを開発し、根尖孔外バイオフィルムを形成する細菌の同定・定量を行うとともに、根尖孔外バイオフィルムが根尖病巣に及ぼす影響を、マイクロ CT を用いて経時的三次元計測にて検討した。

【材料および方法】

1. ラットにおける根尖孔外バイオフィルムモデルの開発

5 週齢の雄性 Wistar 系ラットの下顎両側第一臼歯をラウンドバーにて露髄し、髄腔を開放状態で 4 週間放置することにより根尖病巣を惹起した。その後、ガッタパーチャポイント（以下、GP と略す）を下顎右側第一臼歯の近心根に根尖孔外まで挿入し被験歯とした。下顎左側第一臼歯には GP を挿入せず対照歯とした。露髄 6 および 8 週後に、根尖孔外バイオフィルムを組織学的観察、微細形態学的観察および遺伝子学的分析により検索した。

1) 組織学的観察

露髄 6 および 8 週後にラットを屠殺し、摘出した顎骨を 4 % パラホルムアルデヒドにて固定後、10% EDTA による脱灰、テッシュプレップへの包埋を行った。その後、厚さ 8 μm の凍結薄切切片を作製し、Brown - Brenn 染色を施して、光学顕微鏡にて根尖孔外における細菌の存在を検索した。

2) 微細形態学的観察

露髄 6 および 8 週後にラットを屠殺し、下顎両側第一臼歯を抜去した。抜去歯をハーフカルノフスキー液で固定し、エタノールによる脱水、凍結乾燥、白金コーティングの後、根尖孔外のセメント質および根尖孔外に突出した GP 表面を走査型電子顕微鏡にて観察した。

3) 遺伝子学的分析

露髄 6 および 8 週後にラットを屠殺し、下顎両側第一臼歯を抜去した。被験歯からは根尖孔外の GP と根尖付近のセメント質表層面をエキスカベータにて採取し、対照歯からは根尖付近のセメント質表層面のみを同様に採取し、これらを根尖孔外試料とした。根尖孔外試料から遺伝子を抽出し、ユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動を行った。

2. ラットにおける根尖孔外バイオフィルム細菌の同定・定量

前述の1. 項と同一の方法でラットの下顎両側第一臼歯に根尖病巣を惹起させ、露髄 4 週後に GP を下顎右側第一臼歯の近心根に根尖孔外まで挿入し被験歯とした。下顎左側第一臼歯には GP を挿入せず対照歯とした。

1) 根管内・根尖孔外バイオフィルム形成細菌の同定

露髄 6 および 8 週後に、前述の 1. 3) 項と同一の方法で被験歯と対照歯から根尖孔外試料を採取した。また、被験歯と対照歯の根管内をファイリングすることによって得られた削片を根管内試料とした。採取した根尖孔外試料と根管内試料について、直接分離培養および増菌培養を行った。両培養より得られた異なるコロニーについて、グラム染色性、形態、発育性ならびに生化学的性状により細菌種を同定した。

2) リアルタイム PCR による根尖孔外細菌の定量

露髄 6、8、12、16 および 20 週後に前述した 1. 3) 項と同一の方法で得られた各時点の根尖孔外試料より遺

伝子を抽出した後、ユニバーサルプライマーを用いてリアルタイムPCRを行い、各時点において根尖孔外に存在する細菌量を計測した。被験歯と対照歯における細菌量の統計学的有意差の検定には Student's *t* test を用いた。また、各期間の細菌量の差については、一元配置分散分析を用いて統計学有意差を検討した。

3. マイクロ CT による根尖病巣体積の経時的三次元計測

前述の1. 項と同一の方法でラットの下顎両側第一臼歯に根尖病巣を惹起させ、露髄 4 週後に GP を下顎右側第一臼歯の近心根に根尖孔外まで挿入し被験歯とした。下顎左側第一臼歯には GP を挿入せず対照歯とした。露髄後 1、2、3、4、6、8、12、16 および 20 週にマイクロ CT にて顎骨の撮影を行った。各時点で得られたデータにおいて、根尖病巣体積を三次元画像解析ソフトにて計測し、被験歯と対照歯の病巣体積を比較した。統計学的有意差の検定には Student's *t* test を用いた。

【結果】

1. ラットにおける根尖孔外バイオフィームモデルの開発

1) 組織学的観察

露髄 6 および 8 週後ともに全ての被験歯で根尖孔外にバイオフィーム形成が観察された。一方、対照歯では全ての試料において根尖孔外にバイオフィームはみられなかった。

2) 微細形態学的観察

露髄 6 および 8 週後ともに全ての被験歯の根尖孔外にまばらに細菌バイオフィーム構造が観察されたが、対照歯では根尖孔外に細菌は観察されなかった。

3) 遺伝子学的分析

被験歯では露髄 6 および 8 週後全ての根尖孔外試料において 1300 bp 付近に明瞭なバンドがみられた。一方、対照歯では露髄 6 および 8 週後の全ての根尖孔外試料においてバンドは検出されなかった。

2. ラットにおける根尖孔外バイオフィーム細菌の同定・定量

1) 根管内・根尖孔外バイオフィーム形成細菌の同定

被験歯の根尖孔外 10 試料中 8 試料から *Enterococcus avium* が、7 試料から *Escherichia coli* が、6 試料から *Klebsiella pneumoniae*、*Morganella morganii* および *Proteus mirabilis* が検出された。

対照歯の根尖孔外 10 試料中 5 試料から *Enterococcus gallinarum* および *Klebsiella pneumoniae* が検出された。

2) リアルタイム PCR による根尖孔外細菌の定量

全ての期間において被験歯の細菌量は対照歯に比べ有意に多く検出された ($p < 0.05$)。また、被験歯の細菌量は、露髄後 20 週まで経時的な増加傾向を示した。

3. マイクロ CT による根尖病巣体積の経時的三次元計測

露髄後 8 週から 20 週まで被験歯の根尖病巣体積は対照歯に比べ有意に大きかった ($p < 0.05$)。

【考察】

本研究では、GP を根尖孔外まで挿入することにより根尖孔外バイオフィームの形成を試みた。組織学的観察、微細形態学的観察および遺伝子学的分析の結果より、露髄後 6 週以降に本手法により根尖孔外バイオフィームが形成されることが明らかとなり、ラットにおける根尖孔外バイオフィームモデルが確立されたと考えられる。

ラットの根管内・根尖孔外に存在する細菌を同定したところ、ヒトの根管内と同様に *Enterococcus* が高頻度で検出された。検出された細菌種は、根管内と根尖孔外で同様の傾向を示したことから、根管内で形成されたバイオフィームが根尖孔外へ向かって伸展することで根尖孔外バイオフィームが形成されることが示唆された。また、被験歯の根尖孔外の細菌量は各時点で有意差はないものの増加傾向を示したことから、根尖孔外バイオフィームは経時的に成長していくことが示唆された。

根尖病巣体積の経時的三次元計測では、露髄 8 週以降被験歯の根尖病巣体積は対照歯に比べ有意に大きかった。これは、根尖孔外バイオフィームの存在によって、根尖周囲で持続的な炎症反応が生じ、免疫応答が変化したために病巣体積に有意な差が生じたと推察された。

【結論】

本研究より、ラットにおける根尖孔外バイオフィームモデルが開発された。また、根尖孔外バイオフィームは根尖病巣の進展に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (呉 本 勝 隆)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	林 美加子
	副 査	教授	川端 重忠
	副 査	准教授	北村 正博
	副 査	講師	久保庭 雅恵

論文審査の結果の要旨

本研究は、ラットを用いて根尖孔外バイオフィームモデルを開発し、根尖孔外バイオフィーム構成細菌を同定および定量するとともに、根尖孔外バイオフィームが根尖病巣に及ぼす影響について検討したものである。

その結果、ラットの下顎第一臼歯を露髄させ、ガッタパーチャポイントを根尖孔外まで挿入することによって、露髄後 6 週以降に根尖孔外バイオフィームを形成することに成功した。また、根尖孔外バイオフィームは、根管内のバイオフィームが根尖孔外に伸展することによって形成され、根尖病巣の拡大に影響を及ぼすことを明らかにした。

以上の研究成果は、*in vivo* における根尖孔外バイオフィームモデルを確立し、根尖孔外バイオフィームの形成と、根尖性歯周炎の難治化との関連の一端を解明したものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。