



Title	In vivoにおける単一細菌感染による根尖孔外バイオフィルムモデルの開発
Author(s)	竹村, 尚記
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45182
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	たけむらなおき 竹村 尚 記
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 18604 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学 位 論 文 名	<i>In vivo</i> における単一細菌感染による根尖孔外バイオフィームモデルの 開発
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 恵比須繁之 (副査) 教 授 大嶋 隆 助教授 川端 重忠 助教授 島袋 善夫

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

根尖性歯周組織疾患においては、局所免疫反応により根管内細菌の根尖孔外への侵入が阻害されるため、セメント質表層や根尖病巣内では細菌は生息していないと考えられてきた。最近になって、根尖孔外の細菌バイオフィームが根尖性歯周炎の難治化に関与していることが報告された。しかしながら、根管内の細菌が根尖孔外に侵入し、バイオフィームを形成して生息することに関しては状況証拠のみが存在し、バイオフィーム形成メカニズムに関する報告は見あたらない。そこで、本研究ではビーグル犬を用いて単一細菌感染による根尖孔外バイオフィームモデルを作成することを第一の目的とした。

さらに、細菌が根尖孔外で生存している場合、特に易感染性宿主ではバイオフィームから持続的に遊離した細菌が血中に移行し、菌血症を惹起する可能性がある。そこで、開発したモデルを用いて感染根管由来細菌による菌血症を検索した。

【研究方法】

実験 1. 根尖孔外バイオフィームモデルの開発

1. 細菌種の選択

1) *In vivo*におけるガッタパーチャポイント (GP) に対するバイオフィーム形成能に関する検索

Enterococcus faecalis、*Streptococcus sanguis*、*Streptococcus intermedius*、*Streptococcus pyogenes*、*Staphylococcus aureus*、*Fusobacterium nucleatum*、*Propionibacterium acnes*、*Porphyromonas gingivalis* ならびに *Prevotella intermedia* の 9 細菌種を、GP を浸漬した液体培地、5%血清添加培地、50%血清添加培地ならびに 100%血清に接種し、毎日培地を交換しながら嫌氣的に 7 日間培養した後、GP 表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。

2) *In vivo*における根尖孔外単一細菌バイオフィーム形成能に関する検索

E. faecalis、*S. sanguis*、*S. intermedius*、*S. pyogenes* ならびに *S. aureus* の 5 細菌種を実験に供した。ビーグル犬の第一後臼歯を抜髄後、各菌液を根管内に接種し二重仮封した。2 週間放置後、根尖孔を K ファイルにて破壊して、

GP を根尖孔外に突出させ、各菌液を注入した後仮封した。2 週間後、各菌液を再び注入し、さらに 2 週間放置した後、GP を摘出し、バイオフィーム形成細菌を同定した。

2. *E. faecalis* による根尖孔外バイオフィームモデルの確立

1) 細菌の接種回数がバイオフィーム形成能に及ぼす影響の検索

1-2) と同一の方法でビーグル犬の根尖孔外に GP を挿入し、*E. faecalis* 菌液 (3.0×10^{10} CFU/ml、30 μ l) を接種後、2 週間放置群 (Group 1)、4 週間放置群 (Group 2) ならびに 2 週間後に再度菌液を接種し、さらに 2 週間放置群 (Group 3) の 3 群に分類した。抜歯後、根尖孔外 GP 表面を SEM 観察するとともに、一部の試料はバイオフィーム形成細菌の分離、同定と定量分析を行った。

2) GP の根尖孔外への突出と根尖孔外バイオフィーム形成の関連性

1-2) と同一の方法で根尖病巣を惹起し、根尖孔を破壊せずに菌液を接種した群 (Group 1)、根尖孔を破壊し菌液を接種した群 (Group 2) ならびに根尖孔を破壊し GP を孔外に突出させ菌液を接種した群 (Group 3) の 3 群に分類した。2 週間後再度菌液を接種し、さらに 2 週間経過後抜歯し、根尖孔付近を SEM 観察した。他方で、一部の試料はバイオフィーム形成細菌の分離、同定と定量分析を行った。

3) 接種細菌とバイオフィームから分離された細菌の同一性の検討

根尖孔外バイオフィームを形成させた後、バイオフィーム形成細菌と根管内に接種した細菌をパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法により検索した。

実験 2. 根尖孔外バイオフィームに対する血清 IgG 抗体価の測定と易感染性実験動物における菌血症の検索

1-2) と同一の方法で GP に *E. faecalis* の根尖孔外バイオフィームを形成させた後、実験動物をコントロール群および免疫抑制群の 2 群に分類した。コントロール群には 0.9% NaCl 溶液、免疫抑制群には酢酸メチルプレドニゾロン 20 mg/ml を、各々 1 ml ずつ 2 週間毎に 2 ケ月間投与した。実験開始より 2 週間毎に末梢静脈血を採取し、*E. faecalis* に対する血清 IgG 抗体価を酵素免疫測定法にて測定した。また、根尖孔外バイオフィーム形成時から、採取した末梢静脈血を用いて、血液中に存在する細菌も検索した。一方、菌血症の陽性対照として、根尖孔を破壊した後、根尖病巣内に *E. faecalis* 菌液 (3.0×10^{10} CFU/ml、30 μ l) を直接接種し、菌血症を検索した。

【結果】

実験 1. 根尖孔外バイオフィームモデルの開発

1. 細菌種の選択

1) *E. faecalis*、*S. sanguis*、*S. intermedius*、*S. pyogenes* ならびに *S. aureus* において GP の表面を広範囲に覆うバイオフィームが観察された。しかしながら、*F. nucleatum*、*P. acnes*、*P. gingivalis* ならびに *P. intermedia* とともに培養した GP ではバイオフィーム形成は観察されなかった。

2) 根尖孔外バイオフィーム形成実験で、最も高頻度に分離された細菌は *E. faecalis* であり、16 試料中 15 試料から分離された。

2. *E. faecalis* による根尖孔外バイオフィームモデルの確立

1) Group 3 の GP より分離された *E. faecalis* の平均細菌数 (1.5×10^4 CFU) は、Group 1 および 2 からの平均分離細菌数 (1.6×10^3 および 2.1×10^3 CFU) と比較して有意に多かった ($p < 0.001$)。また、3 グループともに根尖孔外 GP 表面にバイオフィームが観察されたが、Group 3 においては Group 1 および 2 のバイオフィームと比較してより成熟し、マトリックス様構造物に被覆されたバイオフィームが観察された。

2) 細菌学的検索および SEM 観察より Group 1 および 2 においては根尖孔外から細菌は検出されなかった。一方、Group 3 からは 1.8×10^4 CFU の *E. faecalis* が分離され、根尖孔外 GP 表面に *E. faecalis* バイオフィームが観察された。

3) PFGE により、バイオフィームから分離された *E. faecalis* は接種した *E. faecalis* と同一の泳動パターンを示した。そして、実験動物の口腔内から分離された *E. faecalis* の泳動パターンとは異なっていた。

実験 2. 根尖孔外バイオフィームに対する血清 IgG 抗体価の測定と易感染性実験動物における菌血症の検索

血清 IgG 抗体価は、実験開始 2 週間後および 4 週間後は実験開始前と比較して有意に上昇した ($p < 0.01$)。4 週

間後から 14 週間後まで減少傾向がみられたが、14 週間後においても、両群ともに実験開始時と比べて有意に高い値を示していた ($p < 0.01$)。免疫抑制後、いずれの測定時期においても免疫抑制群がコントロール群と比較して有意に低い値を示した ($p < 0.01$)。一方、実験期間を通じて、コントロール群および免疫抑制群の両群において末梢血液中から細菌は分離されなかったが、陽性対照においては末梢血液中から *E. faecalis* は 100% 分離され、菌血症は接種後 30 分間継続した。

【考察および結論】

In vivo における GP に対する単一細菌バイオフィーム形成は、供試した細菌種の中で *E. faecalis* が最も著明であった。この結果にもとづき、*E. faecalis* を用いてイヌの根尖孔外に単一細菌バイオフィームを形成するモデルを確立した。これらより、根尖孔外で細菌がバイオフィームを形成して生息していることが解明され、遊離した細菌により菌血症が発症する可能性が示唆された。

本研究では根尖孔外バイオフィームに起因する菌血症は惹起されなかったが、確立した実験モデルは末梢血を経時的に十分量採血することが可能であり、このモデルをもとに根尖孔外バイオフィームから遊離した細菌による菌血症や、菌血症に由来する遠隔臓器疾患の検索モデルの開発が可能であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、難治性根尖性歯周炎の主要な原因と推察されている根尖孔外での細菌の定着や増殖を、ビーグル犬を用いて単一細菌感染による根尖孔外バイオフィームモデルを作成することにより検索したものである。

その結果、根管内から検出される細菌種のうち、*Enterococcus faecalis* をはじめとする通性嫌気性グラム陽性球菌が、*in vitro* においてガッタパーチャポイントにバイオフィームを形成することを明らかにした。そして、*E. faecalis* の単一細菌バイオフィームをビーグル犬の根尖孔外に形成するモデルの開発に成功し、*in vivo* において細菌が根尖孔外でバイオフィームを形成して生息していることを解明した。

以上の研究成果は、根尖性歯周炎の難治化の一因と考えられる根尖孔外でのバイオフィームの形成メカニズムを解明するための礎となるものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。