



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45182">https://hdl.handle.net/11094/45182</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	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> における单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
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ル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、バイオフィル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、バイオフィル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单一細菌感染による根尖孔外バイオフィル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ル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ルムモデルの開発

## 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ル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気的に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*における根尖孔外单一細菌バイオフィル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歯後、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、バイオフィル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ルムモデルの確立

### 1) 細菌の接種回数がバイオフィル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 ( $3.0 \times 10^{10}$  CFU/ml, 30  $\mu$ 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ルム形成細菌の分離、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ルム形成の関連性

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ルム形成細菌の分離、同定と定量分析を行った。

### 3) 接種細菌とバイオフィル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ルムを形成させた後、バイオフィル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ルムに対する血清 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ルムを形成させた後、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ン 20 mg/ml を、各々 1 ml ずつ 2週間毎に 2ヶ月間投与した。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ルム形成時からは、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 ( $3.0 \times 10^{10}$  CFU/ml, 30  $\mu$ 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ルムモデルの開発

#### 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ルムが観察された。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 ではバイオフィルム形成は観察されなかった。

2) 根尖孔外バイオフィルム形成実験で、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ルムモデルの確立

1) Group 3 の GP より分離された *E. faecalis* の平均細菌数 ( $1.5 \times 10^4$  CFU) は、Group 1 および 2 からの平均分離細菌数 ( $1.6 \times 10^3$  および  $2.1 \times 10^3$  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 表面にバイオフィルムが観察されたが、Group 3 においては Group 1 および 2 のバイオフィル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ルムが観察された。

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  $1.8 \times 10^4$  CFU の *E. faecalis* が分離され、根尖孔外 GP 表面に *E. faecalis* バイオフィルムが観察された。

3) PFGE により、バイオフィルムから分離された *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ルムに対する血清 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ルム形成は、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ル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ル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ルムに起因する菌血症は惹起されなかつたが、確立した実験モデルは末梢血を経時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ルムから遊離した細菌による菌血症や、菌血痕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ル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ル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ル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ル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ル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。