The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	難治性根尖性歯周疾患における根尖孔外バイオフィルム構成細菌の検索
Author(s)	野口, 展生
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45571
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

【17】

氏　　名	野口展生（のぐちのぶお）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　１９３９８　号
学位授与年月日	平成 17 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	**難治性根尖性歯周疾患における根尖孔外バイオフィルム構成細菌の検索**
論文審査委員	（主査） 教　授　恵比須繁之 （副査） 教　授　雫石　聰　　助教授　小川　裕三　　講　師　中川　一路

論文内容の要旨

【研究目的】

近年、難治性根尖性歯周炎羅患歯の根尖孔外に細菌バイオフィルムが形成されることが報告され、根管内だけでなく根尖孔外に形成されたバイオフィルムが根尖性歯周疾患の難治化の一因であることが示唆された。しかし、根尖孔外バイオフィルムの形成メカニズムや構成微生物は全く解明されていない。そこで、本研究では、根尖孔外のバイオフィルム形成に関与している細菌種を 16S rRNA 遺伝子解析を用いた分子生物学的手法により同定し、それらの細菌の根尖孔外バイオフィルムにおける局在について免疫組織化学的に検索した。

【材料および方法】

1. 16S rRNA 遺伝子解析を使用した根尖孔外バイオフィルム構成細菌の検索

大阪大学歯学部附属病院歯質歯内科を受診し、感染根管治療により臨床症状や臨床所見の改善がみられず、難治性根尖性歯周炎と診断された患者のうち、本研究に対する同意の得られた 20 人の患者を被験者とした。得られた抜去歯あるいは歯根端切除術により切断された根尖部歯片を生理食塩水にて洗浄後、根尖部付近を掻爬しバイオフィルム細菌を採集した。一方、20 人の被験者のうち６人は、最終的に根管拡大した根管内より K ファイルにて採取した削片を細菌の DNA 検索に供した。得られた試料よりフェノール抽出法にて DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を PCR を用いて増幅した後、PCR 産物を pDrive cloning vector にサブクローニングし、*Escherichia coli* DH5 α に形質転換した。各試料について 96 クローンをランダムに選択し、ミニプレップにてプラスミドを精製し、BigDye Terminator cycle sequence kit を用いてシークエンスを行った。塩基配列を BLAST program にて解析し、細菌種を同定した。98～100%の相同性を示すものを同一細菌種とし、90～98%の相同性を示したものは同属とした。

2. 根尖孔外バイオフィルム構成細菌の免疫組織化学的検索

上記１項に記載した診断基準と同一の条件のもと、７人の患者を被験者とし、得られた抜去歯あるいは歯根端切除術より切断した根尖部歯片を被験試料とした。採取した試料をリン酸緩衝液にて洗浄し、４%パラホルムアルデヒド-0.1%グルタルアルデヒド水溶液にて固定した後、10%ギ酸クエン酸水溶液にて低温脱灰した。次いで、試料を OCT compaund に包埋し、クリオスタットにて厚さ 10 μ m の連続薄切切片を作製した。得られた切片の一部は Brown-Brenn modified Gram 染色を施し、他の一部は、*Porphyromonas gingivalis*、*Fusobacterium nucleatum*、および *Tannerella forsythensis* に対するポリクローナル抗体を用いたストレプトアビジン－ビオチン法による酵素

抗体法を施した後、光学顕微鏡下の観察に供した。

【結果】

1. 16S rRNA 遺伝子解析を使用した根尖孔外バイオフィルム構成細菌の検索

根尖孔外から採取した 20 試料のうち、14 試料から細菌の DNA が検出されたが、6 試料からは DNA は検出されなかった。DNA が検出された 14 試料より、113 の細菌種および属が同定され、*F. nucleatum*（14/14）、*P. gingivalis*（12/14）、*T. forsythensis*（8/14）ならびに *Prevotella intermedia*（7/14）の DNA は根尖孔外バイオフィルムから高頻度で検出された。また、根管内より採取した 6 試料全てから細菌の DNA が検出され、*P. gingivalis*（6/6）ならびに *F. nucleatum*（4/6）が高頻度で検出された。また、Unidentified bacterium が根尖孔外バイオフィルム（11/14）と根管内（5/6）試料から高頻度で検出された。

2. 根尖孔外バイオフィルム構成細菌の免疫組織化学的検索

根管内あるいは根尖部側枝内には、すべての試料においてグラム陰性菌を中心とする細菌コロニーが観察されたが、根尖孔外部では 3 試料に細菌が認められた。一部の試料の根尖孔外で、厚さ 30～40 μm のバイオフィルム形成がみられた。抗 *F. nucleatum* 抗体に対する陽性反応は、根尖孔外バイオフィルムに散在性に認められ、抗 *P. gingivalis* 抗体では根面からバイオフィルム表層部にいたる広範囲で陽性反応が検出された。また、抗 *T. forsythensis* 抗体に対する陽性反応は主にバイオフィルム表層にみられた。

【考察および結論】

1. 根尖孔外バイオフィルムから、*F. nucleatum*、*P. gingivalis* ならびに *T. forsythensis* の DNA が高頻度で検出され、さらにそれらの局在性が明らかとなり、不明であった根尖孔外バイオフィルムの形成メカニズムの一端が解明された。

2. 根尖孔外で検出された細菌の DNA の 86.7%は根管内からも検出され、根管内細菌が根尖孔外に侵入し、根尖孔外バイオフィルムを形成することが強く示唆された。

3. 根尖孔外部根面に近接した部位からも検出された *P. gingivalis* は、同部における初期のバイオフィルム形成に関与している可能性が示唆された。

4. 根尖孔外バイオフィルム表層にみられた *T. forsythensis* は、デンタルプラーク形成と同様に、根尖孔外のバイオフィルム形成においても late colonizer としての役割を担っていると推察された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、難治性根尖性歯周疾患罹患歯の根尖孔外バイオフィルムの構成細菌種を分子生物学的手法により同定し、高頻度に検出された細菌種について免疫組織化学的に検索したものである。

その結果、根尖孔外バイオフィルムからは、*Fusobacterium nucleatum*、*Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythensis* ならびに *Prevotella intermedia* の DNA が高頻度に検出された。また、根尖孔外で検出された細菌種の DNA は根管内からも高頻度に検出され、根管内細菌が根尖孔外に侵入し、根尖孔外バイオフィルムを形成することが強く示唆された。さらに、免疫組織学的検索により、根尖孔外バイオフィルムにおける *F. nucleatum*、*P. gingivalis* ならびに *T. forsythensis* の局在が解明され、不明であった根尖孔外バイオフィルム形成メカニズムの一端が明らかとなった。

以上の研究成果は、難治性根尖性歯周疾患に対する新たな治療法や、抗バイオフィルム薬の開発の礎となるものであり、本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。