

歯科保存学の未来への扉を開く



研究室紹介

林 美加子*

Opening a door to the future of conservative dentistry

Key Words : conservative dentistry, oral bilfilm, apical periodontitis

はじめに

臨床歯科医学において歯科保存学は、文字どおり歯を抜くことなくう蝕（むし歯）と歯周病や、それに続発する疾患を予防・診断・治療し、口の機能を回復させ健康を維持増進させることを攻究する学問です。この度、教室の活動を紹介する機会をいただきましたので、当教室が幅広く展開してきた活動を基盤として、今後、取組む研究活動の方向を「歯科保存学の未来への扉を開く」と題して概説させていただきます。

臨床教室として歯学部附属病院における保存科では、特に一般臨床医から紹介の多い「難治性根尖性歯周炎（治りにくい歯の根の先の感染症）」に対して、歯科用顕微鏡およびCT画像診断を駆使した歯内療法（歯の神経の治療）を実施することによって、より確実な治癒をめざすとともに、2011年から先進医療「X線CT画像診断に基づく手術用顕微鏡を用いた歯根端切除手術」を導入して高度な医療を展開してきました（図1）。このような背景と実績にもかかわらず、臨床では依然として完全には治らない難しい根尖性歯周炎への対応に苦慮する場面があります。そのような難症例に対し、当教室で展開してきた多方面にわたる先端的研究成果を適応することによって、難治性疾患の克服に取り組んでいます。

具体的には、根尖性歯周炎が難治化する原因とも



図1. 先進医療としての歯根尖切除術
14才女児、4年前に転倒し上顎切歯を打撲。近医にて根管治療を受けるも歯肉腫脹および排膿が止まらないため紹介来院。
上段：術前の口腔内所見およびデンタルエックス線写真。
中段：術前のCBCT像。左より前頭断、矢状断（中切歯）、同（側切歯）、および水平断。
下段：先進医療として歯根尖切除術を実施。左より術中所見、術直後、6ヵ月後、および1年後。



図2. 難治性根尖性歯周炎を攻略するためのアプローチ



* Mikako HAYASHI

1961年8月生
現在、大阪大学 大学院歯学研究所
口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）教授 博士（歯学） 歯科保存学
TEL：06-6879-2926
FAX：06-6879-2929
E-mail：mikarin@dent.osaka-u.ac.jp

いべきオーラルバイオフィルムの実態の解明、根尖病巣が急速に拡大する宿主側因子の解明、さらに、

修復に際しては象牙質自体の強化と組織再生能力に優れた修復材料の開発などが挙げられます (図2)。近未来には、根尖病巣が拡大した骨欠損部に対して、教室で開発が進みつつある骨再生能力が極めて高い未分化間葉系細胞を応用することを想定しており、新しい先進医療の提案を視野に入れた「難治性根尖性歯周炎への骨再生細胞治療」へと発展させたいと考えています。本稿では、これらのプロジェクトの成果と今後の展望をご紹介します。

オーラルバイオフィルムの実態の解明と抑制法の開発

根尖性歯周炎の難治化とオーラルバイオフィルム：根尖病巣内で細菌がバイオフィルムを形成しているかを検索するため、難治化した根尖性歯周炎罹患歯より得た生体サンプルを電子顕微鏡で観察した結果、約82%の症例において根尖孔外でバイオフィルムが形成されていました¹⁾。さらに、難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外バイオフィルム構成細菌を遺伝子解析法にて調べた結果、70%の症例で細菌のDNAが検出され、*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* といった歯周病原性細菌が高頻度で検出されました²⁾。すなわち、根尖性歯周炎の難治化には、主に歯周病原性細菌で構成される根尖孔外バイオフィルムがかなりの頻度で関与していることがわかり、バイオフィルムの克服が難治性根尖性歯周炎を克服する鍵であることが示されています。

Porphyromonas gingivalis バイオフィルム抑制の遺伝子学的取組み：一般的に細菌は様々な遺伝子の発現を変化させ、環境に適応することが報告されています。難治性根尖性歯周炎罹患歯から高頻度で分離される *P. gingivalis* においても、遺伝子の発現変化により、病原因子の発現やバイオフィルムの形成が制御されている可能性が考えられます。そこで、*P. gingivalis* において黒色色素産生能が欠如するグリコシルトランスフェラーゼのモチーフを持つ遺伝子である *gtfB* の役割を解析した結果、*gtfB* は病原因子であるプロテアーゼの活性化やリポ多糖の発現に必須であり、バイオフィルム形成に対しては抑制的に機能することを明らかにしました³⁾。このように病原因子発現やバイオフィルム形成の制御機構に

ついて明らかにすることにより、慢性期と急性期が存在する根尖性歯周炎の進行メカニズムの解明の一助になると考えられ、新たな治療法および抑制法の開発につながるものと期待されます。

一方、*P. gingivalis* は、線毛、プロテアーゼ、莢膜ならびに Lipopolysaccharide (LPS) などの病原因子を産生することが知られています。バイオフィルムは、初期付着から成熟に至る一連の過程を経て形成され、バイオフィルム細菌中の遺伝子発現は各形成過程で異なることが報告されています。我々が独自に開発したバイオフィルム形成モデルを用いて、全ゲノム配列が解読されている *P. gingivalis* ATCC 33277 株のバイオフィルムを作製し、遺伝子発現の変化を各形成過程において経時的に解析した結果、バイオフィルム成長期中・後期間にバイオフィルム形成量が顕著に増加し、その時期に一致して発現が変動する遺伝子の数が最多となることが明らかとなりました⁴⁾。さらに、病原因子に関与する遺伝子の発現を検索した結果より、線毛関連遺伝子および LPS 関連遺伝子はバイオフィルム形成に強く関与すると推察されました。

クオラムセンシングによるオーラルバイオフィルムの抑制：クオラムセンシングは、細菌の情報伝達機構であり、バイオフィルム形成や病原因子の発現を調節しています。従来の“成長したバイオフィルムを抑制する”という概念とは異なり、“成長させない”という新しいコンセプトのもと、バイオフィルムの新たな抑制法の開発を目指し、クオラムセンシングの担体であるオートインデューサーの類似化合物が、*P. gingivalis* バイオフィルムに及ぼす影響を検討しました。その結果、類似化合物がバイオフィルムの成長を抑制し、立体構造を変化させることを示し、⁵⁾ さらに、類似化合物と抗菌剤を併用することで抗菌剤の効果が増強されることを明らかとしました⁶⁾。これは、類似化合物によって構造的に変化したバイオフィルムに抗菌剤が浸透し、より効果的にバイオフィルムが抑制されたためと考えられます。既存の方法ではコントロールが難しい感染を化学的に制御できる可能性が示唆されたことは、臨床的に極めて有意義であるといえます。

アジスロマイシンによるオーラルバイオフィルムの抑制：一般的にバイオフィルム細菌は抗菌薬に抵抗性を示しますが、マクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシン (AZM) は、インフルエンザ菌や緑膿菌に対し最小発育阻止濃度 (MIC) 以下の濃度 (sub-MIC) でそれらのバイオフィルム形成を阻害・抑制することが報告されています。我々は、*P. gingivalis* が形成したバイオフィルムに対する5種の抗菌薬の影響について検討したところ、AZMのみがバイオフィルムモデルにおいて *P. gingivalis* バイオフィルムを sub-MIC で有意に抑制することを発見しました⁷⁾。このことは AZM が *P. gingivalis* バイオフィルムに対して抗バイオフィルム効果を有する薬剤であることを示しており、将来、*P. gingivalis* が関与する難治性根尖性歯周炎といったバイオフィルム疾患の抑制法のひとつとなり得る可能性が示されました。

以上のように、根尖性歯周炎の難治化とオーラルバイオフィルムの関わりを先端的手法にて詳細に探索し、得られた結果に基づいて斬新かつ効果的なバイオフィルムの抑制法を多方面から検討することにより、難治性根尖性歯周炎の克服を目指しています。

未分化間葉系幹細胞精製法の開発および新規幹細胞集団の機能解析

う蝕により失われた象牙質・歯髄複合体の回復を目指した薬剤を用いた治療法の開発は、多くの研究グループのもとで行われてきました。これに対し、本プロジェクトは、薬剤ではなく未分化間葉系幹細胞を用いて象牙質・歯髄複合体の回復を目指すという新たな治療法の確立を最終目標としています。これまでの内外での研究により、象牙質・歯髄複合体をメンテナンスしている細胞は未分化間葉系幹細胞であることがわかってきています。そこで、この未分化間葉系幹細胞を単離できる方法の開発を行った結果、未分化間葉系幹細胞を多く含む新規細胞集団を特定することに成功しました。この細胞集団は、従来の未分化間葉系幹細胞集団に比べて硬組織再生能が100倍も高いことが明らかとなっています⁸⁾。

現在、更に純度の高い未分化間葉系幹細胞の精製法の開発に取り組んでいます。このプロジェクトから得られる成果は、将来、歯科領域での新規治療法の

確立のみならず、硬組織再生という観点から医学全般にも応用可能であると考え、精力的に推進しています。

加熱および紫外線による失活象牙質の強化

歯科において、徹底したプラークコントロールによってう蝕や歯周病などの細菌感染症はほぼ予防できるものの、過剰な力の負担に起因する歯の破折は防止することは困難であり、歯の破折防止は取り組むべき重要課題の一つとなっています。上述の難治性根尖性歯周炎の治療では、感染の克服に続いて、耐久性に優れた材料で歯を再建することは不可欠です。

我々は、歯の有機質の主成分であり、象牙質の体積の25%を占めるタイプIコラーゲンを110°Cで加熱すると引張り強さが増加する事実に着目し、加熱が象牙質の機械的強度に及ぼす影響を多面的に分析しました。その結果、110~140°Cで象牙質を加熱することによって、曲げ強さが加熱前と比較して最大3倍高くなることを発見しました⁹⁻¹⁰⁾。さらに、その強化メカニズムは、加熱によってコラーゲンのトリプルヘリックスの分子間距離が14Åから11Åへ約30%収縮するためであることを明らかにしました。

研究の過程で明らかとなったことは、象牙質の有機成分であるコラーゲンを強化することが、象牙質そのものの強化につながるという事象であり、この概念は、整形外科学領域で明らかとされている「骨粗鬆症患者の骨の強度はハイドロキシアパタイトの含有成分のみならず、タイプIコラーゲンの架橋構造の違いが大きく影響している」という事実にも通ずるものです。

そこで、歯のコラーゲンの強化に焦点を絞り、より安全かつ持続的な強化効果を期待できる次段階の方法として、コラーゲン架橋促進の代表的な因子である長波長の紫外線による象牙質の強化を着想しました。その結果、象牙質に365~405nmの長波長の紫外線を5-15分照射すると、曲げ強さが約2倍に増加するという事実を発見し、水素結合や水分子を介した新しい分子間結合の形成が強化に関与していることを明らかにしました¹¹⁾。現在、歯根破折を確実に防止することを念頭にいた臨床研究への展開を進めています。

おわりに

上記の他にも、根尖病巣が拡大しやすい宿主側の遺伝子要因の解明や、抗菌性や組織再生能力を備えた修復材料の開発にも注力しています。これらプロジェクトが成果を生み、より良い歯科臨床の実現に貢献するため、現教室のポテンシャルを最大限に引き出し、教室が一丸となって邁進したいと考えており、まさに歯科保存学の未来への扉の前に立っていると実感しています。

文献

- 1) Noiri, Y., Ehara, A., Kawahara, T., Takemura, N. and Ebisu, S. (2002) Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* **28**, 679-683.
- 2) Noguchi, N., Noiri, Y., Narimatsu, M. and Ebisu, S. (2005) Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8738-8743.
- 3) Yamaguchi, M., Sato, K., Yukitake, H., Noiri, Y., Ebisu, S. and Nakayama, K. (2010) A *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of the polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation, and increased biofilm formation. *Infect Immun* **78**, 3801-3812.
- 4) Yamamoto, R., Noiri, Y., Yamaguchi, M., Asahi, Y., Maezono, H. and Ebisu, S. (2011) Time course of gene expression during *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **77**, 6733-6736.
- 5) Asahi, Y., Noiri, Y., Igarashi, J., Asai, H., Suga, H. and Ebisu, S. (2010) Effects of *N*-acyl homoserine lactone analogs on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodontal Res*, **45**, 255-261.
- 6) Asahi, Y., Noiri, Y., Igarashi, J., Suga, H., Azakami, H. and Ebisu, S. (2012) Synergistic effects of antibiotics and an *N*-acyl homoserine lactone analog on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol*, **112**, 404-411.
- 7) Maezono H, Noiri Y*, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Izutani N, Azakami H, Ebisu S. (2011) Antibiofilm effects if azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 5887-5892.
- 8) Itoh, S. and Aubin J.E. (2009) A novel purification method for multipotential skeletal stem cells. *J Cell Biochem* **108**, 368-377.
- 9) Hayashi, M., Koytchev, E.V., Okamura, K., Sugeta, A., Hongo, C., Okuyama, K. and Ebisu, S. (2008) Heat treatment strengthens human dentin. *J Dent Res* **87**, 762-766.
- 10) Hayashi, M., Furuya, Y., Minoshima, K., Saito, M., Marumo, K., Nakashima, S., Hongo, C., Kim, J., Ota, T. and Ebisu, S. (2012) Effects of heating on the mechanical and chemical properties of human dentin. *Dent Mater* **28**, 385-391.
- 11) Hayashi, M., Okamura, K., Koytchev, E. V., Furuya, Y., Sugeta, A., Ota, T. and Ebisu, S. (2010) Effects of rehydration on dentin strengthened by heating or UV irradiation. *J Dent Res* **89**, 154-158.