

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593176

研究課題名(和文) 口腔バイオフィルムのグラム陰性菌/陽性菌比率と病原性の形態的解析

研究課題名(英文) Analysis of gram-positive/negative bacteria ratio and pathogenicity of oral biofilm

研究代表者

武内 博朗 (TAKEUCHI, HIROAKI)

鶴見大学・歯学部・臨床教授

研究者番号：50572260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎患者(n=116)に対する抗菌療法を含む歯周治療により、口腔総菌数は変化せずP. gingivalis菌比率の著明な低下が確認され、蛍光insituハイブリダイゼーション(FISH)法においても、P.gingivalis菌シグナルが低下し、総レンサ球菌のシグナルが増加した。また重度歯周炎患者(n=12)の菌血症に関しては、スケーリング前で10%、直後で50%、10分後で20%が陽性であったが、歯周治療実施後はスケーリング直後でも5例中3例の菌血症が抑制できた。歯周治療による口腔細菌の制御が、口腔疾患制御は勿論歯原性菌血症、LPS血症など全身疾患のリスク低減になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontal treatments including the antibacterial therapy for periodontitis patients (n=116) resulted in the significant reduction of P. gingivalis ratio, while the number of the total bacteria did not change. The study of the fluorescence insitu hybridization (FISH) also showed that the signal of P.gingivalis decreased and the signal of total streptococci increased. In addition, peripheral blood of the severe periodontitis patients(n=12) showed that 10% were bacteremia-positive before scaling, 20% for just after scaling, and 50% for 10 minutes after scaling. While after periodontal treatment including antibacterial therapy, the peripheral blood of three of five patients turned bacteremia-negative for even just after scaling.

These results suggest that oral bacterial control with the periodontal treatment leads to the risk reduction of systemic disease including odontogenic bacteremia and endotoxemia, as well as oral diseases.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：口腔バイオフィルム エンドトキシン グラム陽性菌 グラム陰性菌 3DS 歯周病 菌血症

1. 研究開始当初の背景

ヒト口腔には、唾液由来糖タンパク質成分が存在している。それら唾液成分と親和性を持つグラム陽性球菌が口腔常在菌とされており、健康維持に不可欠な菌叢を構成する。一方口腔バイオフィルムの成熟に伴い、歯周病菌などのグラム陰性菌性嫌気性桿菌群が増加、LPS が歯周組織炎症を招く。

う蝕と歯周病は、口腔病原性細菌による最も頻度の高い感染症である。う蝕原性、及び歯周病原性バイオフィルムは、それぞれ Mutans Streptococci (以下 MS 菌)<sup>①</sup>、*Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. gingivalis*) 等の比率が高いことが知られている。

う蝕の多発には、糖質の過剰摂取という背景が推測され、高血糖の状態が懸念される。また歯周病の場合は、歯周病菌と LPS による歯周組織の血管の劣化、微小循環障害が生じていると考えられる (図 1)。これら病原性ヒト口腔バイオフィルムを除菌し、その菌叢が改善するとき、構成菌種や形態の推移を捉えた研究は乏しく、そのメカニズム解明は、国民病とも言われ各種代謝性疾患の引き金となりうる歯周病などを制圧し、より専門的な除菌技術を開発し、口腔保健を達成するために急務である。



図 1 全身疾患と深く係わる歯周病

2. 研究の目的

う蝕・歯周病原性バイオフィルムそれぞれについて Dental Drug Delivery System<sup>®③</sup> (以下 3DS、図 2) を用いた MS 菌及び *P. gingivalis* の除菌を行なう。現在は唾液検査で間接的・数値的に判定している除菌評価について、蛍光 insitu ハイブリダイゼーション (以下 FISH: fluorescence in situ hybridization) を用いることで、除菌前後におけるバイオフィルムの菌叢変化の様子を形態的・直接的に捉え、病原性バイオフィルムが良質な菌叢に変化する機序を解明する。



図 2 3DS の全容

3. 研究の方法

〔概要〕

鶴見大学歯学部附属病院及びその関連施設を訪問したう蝕、歯周病患者の口腔を臨床的指標で評価し、同時に口腔バイオフィルム中の細菌叢を培養法、リアルタイム PCR 法で術前評価して、検査の基準値を上回った症例を対象者とする。対象者には、あらかじめ鶴見大学歯学部倫理審査委員会が定めた同意を得るものとする。う蝕、歯周病の対象者とも術前 (除菌前) 6 時間から 120 時間の時系列でバイオフィルムの採取を行い除菌前サンプルとする。

3DS の系にて除菌を行い、同様に 6 時間から 120 時間の時系列でバイオフィルムの採取を行い除菌後サンプルとする。サンプルは、それぞれ培養法、リアルタイム PCR 法、以下に述べる FISH にて対象サンプルを MS 菌と *P. gingivalis* (共に CY3 で赤色に標識) 及び口腔常在性菌 (*Streptococcus mitis* と口腔常在性レンサ球菌 (FITC で緑色に標識) を解析して、菌叢比率を求め、除菌効果を判定する。また、除菌前後で唾液・血液データなどを採取し、LPS 量ならびに菌血症についても解析を行なった。

〔方法〕

臨床研究 1. 臨床研究に同意の得られた歯周炎患者 (n=116、図 3) に初期評価検査を行い歯周基本治療を実施、機械的清掃後の評価検査を行なった。続いて 3DS を応用した抗菌療法を実施し、その後評価検査を行なった (図 4、5)。

Study subjects 臨床研究 1		
被験者数	n = 116	
M/F	47/69	
平均年齢	50.1歳 (±12)	
DMFT	27.9±0.9	
慢性歯周炎レベル別被験者数	中等度 および 重度	
侵襲性歯周炎タイプ別被験者数	限局型 広汎型	該当なし

本臨床研究は、鶴見大学歯学部研究倫理委員会の承認を得て実施した

図 3 臨床研究 1 の被験者

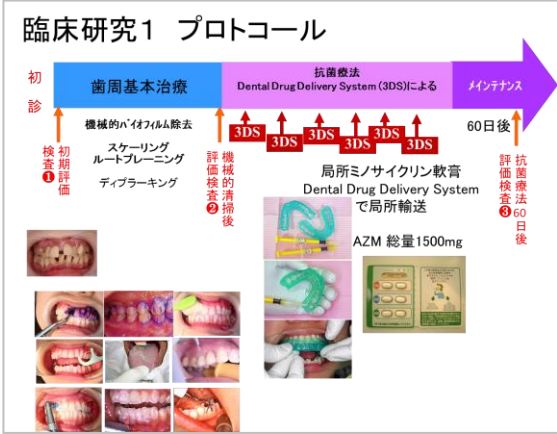


図4 臨床研究1 プロトコル

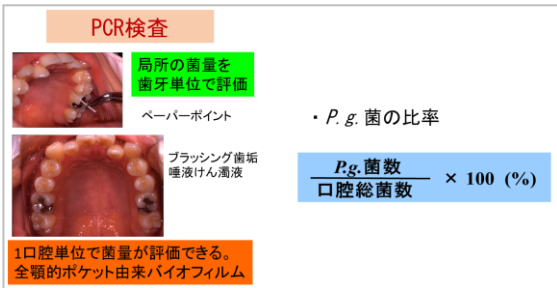
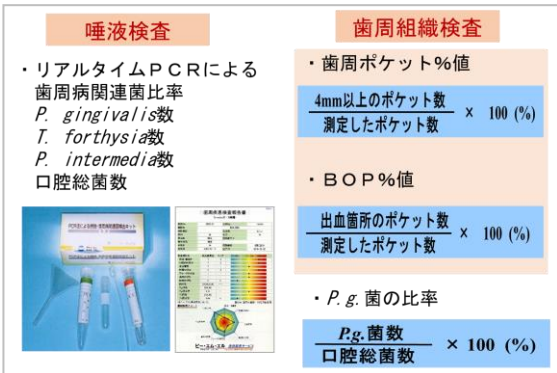


図5 各ステージにおける評価検査

抗菌療法前後における菌面バイオフィーム中の *P. gingivalis* と口腔常在性総レンサ球菌の局在解析を FISH で検討した。

臨床研究 2. 重度歯周病と診断された患者 (n=17) のスケーリング前後の末梢血液検査で、菌血症細菌と LPS を評価した。さらに抗菌療法を実施し、消炎後に同様の検査を行ない菌血症、LPS 血症の抑制について比較した (図 6, 7, 8)。

### Study subjects 臨床研究2

被験者数	n = 17
M/F	11/6
平均年齢	39 ± 11.5歳
健康コントロール	5名
慢性歯周炎 レベル別被験者数	重度歯周炎 12名

本臨床研究は、鶴見大学歯学部研究倫理委員会の承認を得て実施した

図6 臨床研究2の被験者

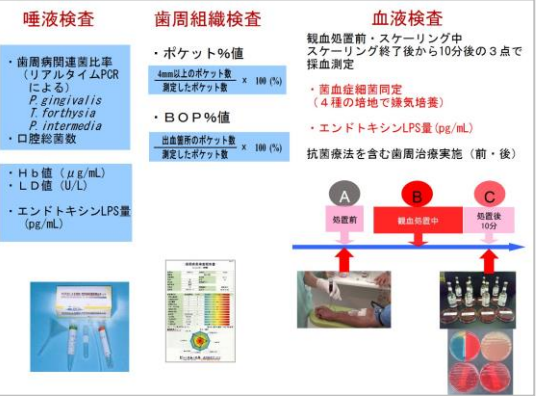


図7 臨床研究2の評価検査

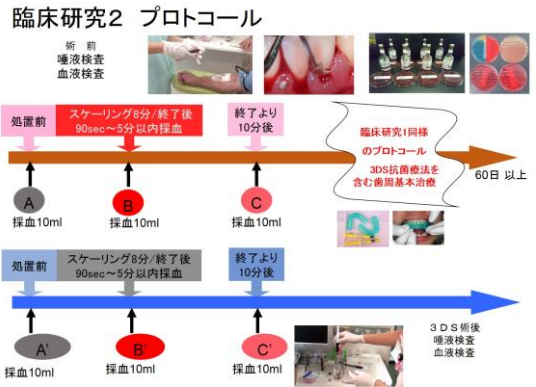


図8 臨床研究2のプロトコル

### 4. 研究成果

(1) 抗菌療法を含む歯周治療 (n=116)により、口腔総菌数は変化せず *P. gingivalis* 比率が著しく低下した (図9, 10)。

(2) 抗菌療法を含む歯周治療前後におけるバイオフィーム中の *P. gingivalis* 比率の低下が、反応する FISH シグナルでも確認され、*P. gingivalis* など歯周病関連菌の除菌が可能であることが示された。

(3) 重度歯周炎患者 (n=12)の末梢血液検査にて菌血症は、スケーリング前で10%陽性、

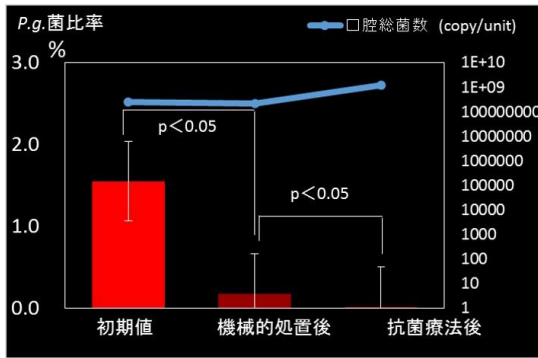


図9 重度歯周炎患者を対象とした、抗菌療法実施前後における *P. gingivalis* 菌比率と口腔総菌数の推移 (n=116)

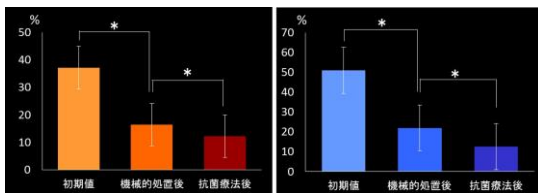


図10 重度歯周炎患者を対象とした、抗菌療法実施前後における (左) ポケット%値、(右) BOP%値の推移

スクレーリング直後で50%陽性、スクレーリングの10分後で20%陽性、80%が陰性であった。

(4) 抗菌療法(3DS)を含む歯周治療を実施すると、スクレーリング直後であっても菌血症が60%(5例中3例)抑制できた。

(5) 血液中LPS量はすべて検出限界(1pg/ml)以下であった。(健常基準値0.06pg/mlで、1.1pg/ml以上は感染症)

重度歯周炎によるエンドトキシン血症は、0.1~0.9pg/ml程度のレンジに入ると考えられる。(唾液中には百万倍のLPSが存在)

歯周病予防・治療の意義が、局所疾患制御は勿論、歯原性菌血症及び、LPS血症など多臓器横断的リスク低減になることが示唆された。

#### [引用文献]

- ① Hanada, N.: Current Understanding of Cause of Dental Caries. Journal of Infectious Diseases. 53:1-5, 2000.
- ② Takeuchi H et al. New Dental Drug Delivery System for removing Mutans Streptococci from the oral cavity: Effect on oral microbial flora. Japanese Journal of Infectious Diseases, 53:211-212, 2000.

③ Takeuchi H et al. Clinical study of mutans streptococci using 3DS and monoclonal antibodies. Japanese Journal of Infectious Diseases, 54:34-36, 2001.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

① 武内博朗: 第58回春季日本歯周病学会学術大会. 平成27年5月15日, 幕張メッセ(千葉県千葉市). シンポジウム「歯周病は史上最悪の感染症か」シンポジスト. テーマ「歯科医師による歯原性菌血症とエンドトキシンLPS血症の予防」

② 10th IADR World Congress on Preventive Dentistry (平成25年10月12日, Budapest Congress Center, Budapest, Hungary) H. Takeuchi, T. Murata, E. Kakuta, Y. Nomura, H. Senpuku and N. Hanada: Investigation on the control of odontogenic bacteremia

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

武内 博朗(TAKEUCHI, Hiroaki)

鶴見大学・歯学部・臨床教授

研究者番号: 50572260

##### (2) 研究分担者

泉福 英信(SENPUKU, Hidenobu)

国立感染症研究所・細菌第6室・室長

研究者番号: 20250186

野村 義明(NOMURA, Yoshiaki)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号: 90350587

花田 信弘(HANADA, Nobuhiro)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号: 70180916