

Title	Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions
Author(s)	藤井, 理絵
Journal	歯科学報, 110(4): 516-517
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/2006">http://hdl.handle.net/10130/2006</a>
Right	

氏名(本籍)	藤井理絵 (広島県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1711号(甲第994号)
学位授与の日付	平成19年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions
掲載雑誌名	Oral Microbiology and Immunology 第24巻 502~505頁 2009年
論文審査委員	(主査) 中川 寛一教授 (副査) 井上 孝教授 奥田 克爾教授 下野 正基教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

根尖性歯周炎の主要な原因は細菌感染である。歯内療法治療における環境は、複数菌種が存在するバイオフィームが定着しやすい環境であると考えられる。診断および治療方針の決定には感染根管および根尖孔部に検出される細菌の同定が不可欠である。この研究の目的は、歯根端切除手術の際に切除した根尖を試料として、難治性慢性根尖性歯周炎病変の細菌叢を解明することである。

#### 2. 研究方法

歯根端切除手術によって切除された23症例を試料とした。採取した根尖部を速やかにビーズ入りのPBS溶液に入れ攪拌し階段希釈を行った。本懸濁液を血液寒天培地に塗抹し、好気および嫌氣的に培養した。分離培養された細菌を純粋培養した後、PUREGENE™ DNA Purification Kit(Genetra SYSTEMS)を用いてDNAを抽出した。得られたDNAからPCR法により16S rRNAの配列の一部をMicroSeq® Full Gene16S rDNA Bacterial Identification Kit(Applied Biosystems)のプライマーを用いて増幅した。得られたDNA断片の配列をBigDye® Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)とABI Prism310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いて決定し、細菌種の同定を行った。

#### 3. 研究成績および結論

23症例の根尖病変から合計74菌株が検出された。複数菌種による感染は最も多くのケースに認められ、17症例において2から8種存在していた。23症例中 *Propionibacterium acnes* が60.9%, *Staphylococcus epidermidis* が34.8%, *Pseudomonas aeruginosa* が26.1%, *Fusobacterium nucleatum* が17.4%認められた。

以上の結果から、根尖性歯周炎病変を構成するバイオフィーム細菌叢には複数の細菌が存在していることを確認した。根尖性根尖性歯周病変から多く分離されたのは *P. acnes*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *F. nucleatum* であり、これらの微生物による混合感染が根尖性歯周炎の感染の拡大にとって重要であることが考えられた。

## 論文審査の要旨

根管処置に対して臨床症状や根管内環境の改善が長期にわたって認められない難治性の根尖性は歯内療法処置の問題点の一つである。これらの原因の一つとして根尖部根管ならびに根尖孔外における細菌叢の影響が以前から解析されてきた。これらの細菌については現在までに、好気ならびに嫌気環境下での培養およびそれに対する抗菌剤の感受性等、主として臨床的な治療指針を得る事を目的とした検討が実施されてきた。しかしながらそれらの多くは根管経由での細菌の採取が殆どで唾液中細菌、根管内の影響を認められるため、根尖部細菌叢、根尖孔外のバイオフィルムを構成する再現しているとは言い難い点がある。さらに、難治性慢性根端性歯周組織炎についての解析は非常に少ない。

本研究は難治性根尖性歯周炎の細菌叢を検索する目的で歯根端切除手術によって切除された根尖部手術材料から細菌を分離・同定することを試みた。

好気ならびに嫌気環境下での培養によって分離された細菌から DNA を抽出し、PCR 法により 16S rRNA の配列の一部を増幅した。そして得られた DNA 断片の塩基配列を決定し細菌種の同定を行った。根尖病変全 23 症例から合計 74 菌株が検出され、複数菌種による感染が多くケースに認められた。本研究において分離されたこれらの菌のうち、嫌気性菌が 82.3% で、好気性菌に比べ優位であった。また、複数菌種が検出された例では *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium nucleatum* の検出率が多かった。

以上の結果から、根尖の感染病変は複数菌種が存在する感染であり、好気性菌、嫌気性菌、グラム陽性菌、グラム陰性菌が複雑なバイオフィルムエコシステムを形成し、それが根尖性歯周炎の難治性に関連していると考えられた。

本審査委員会では、臨床的観点から現在重要視されている根尖性歯周炎について、特にその根尖部における菌群の構成を明らかにする目的で資料採取時の汚染が懸念される従来の根管経由の方法から外科的手術時の切除断端から菌群を分離する方法を選択したこと、さらにその同定に分子生物学的解析をした点について評価がなされた。また本委員会では、①根尖部におけるバイオフィルムの状態および定義、②好気性菌と嫌気性菌の分布について、③菌種とくに真菌類の存在について、④臨床症状と菌種との関係について、⑤論文の構成と英文表記等について、など質疑が行われたが、これらに関して解答が得られた。なお、論文の文章について、いくつかの指摘がなされ、検討して加筆した。本研究で得られた研究成果は今後の歯学の進歩発展に十分貢献するものであると評価され、学位授与に値するものと判定した。