

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462945

研究課題名(和文) 根管内細菌叢パンゲノムの特性評価に基づく新しい歯内治療ストラテジー

研究課題名(英文) Evaluation of intracanal biota using metagenomics - a new strategy for endodontic treatment

研究代表者

八巻 恵子 (YAMAKI, KEIKO)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90182419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：根尖性歯周炎を発症した患歯から根管壁象牙質削片を採取し、微生物迅速検査装置、嫌気培養法、16S rRNA遺伝子を標的としたPCR法を利用したメタゲノム解析を通じ治療前後の根管内細菌叢を評価した。その結果、感染根管の細菌叢は嫌気性菌優勢で症例により細菌の種類、数、量が大きく異なること、機械的拡大と抗菌剤による洗浄消毒で感染をほぼ制御できることが判明した。Propionibacterium属やOlsenella属などが治療前に検出されることが多く、根管以外の口腔内細菌叢とゲノム構成を比較することにより根管に定着・感染しやすい菌種群を特定できれば、根尖性歯周炎の診断・治療の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Intracanal microflora associated with apical periodontitis was investigated. Under informed consent of patients, dentin samples were collected and analyzed using two rapid microbial cell counters, anaerobic culture, and PCR targeting 16S rRNA genes. Bacterial species found from endodontically suffering canals showed a great diversity in both quality and quantity. Mechanical enlargement of the root canal combined with chemical disinfection could effectively reduce the pre-dominantly anaerobic pathogen. Propionibacterium sp. and Olsenella sp. were frequently recovered in contrast to previous reports. Evaluating the difference in bacterial profile between oral cavity and root canal through metagenomics could lead to a new strategy for diagnosis and treatment of apical periodontitis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯内治療学 口腔細菌 根尖性歯周炎 PCR法 16S rRNA 嫌気性菌 メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎は根管内の細菌感染に惹起される炎症性病変である。しかし感染根管から検出される細菌は多種多様で、歯周病における Red group に該当するような「根尖歯周組織に対する病原菌の強い菌」というものはまだ特定されていない。

1970年代以降、嫌気培養法により根管細菌叢の検索は大きく進んだが、個々の細菌を分離培養、同定するのに多大な時間と労力、コストが必要であり、適切な抗菌剤の選択という診療行為に迅速にフィードバックするのは困難である。さらに ex vivo での培養不可能な細菌や試料の採取・移送中に死滅する細菌が存在する可能性を考慮すると、嫌気培養法による細菌検査には限界がある。

一方、近年普及してきた分子生物学的手法、すなわち 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR 法による細菌検査は、培養法に比し高感度かつ短時間で細菌の検出が可能である。リアルタイム PCR 法を用いれば増幅された遺伝子を定量的に検出できるので、根管内の優勢菌を特定できる。しかし、高感度ゆえに、主たる病原性菌のみならず、すでに死滅し根尖性歯周炎の発症進展に直接関与していない細菌まで検出してしまうのが欠点である。また、病原を發揮しているのが必ずしも根管内の優勢菌種とは限らない上、個々の菌種よりむしろ根管に棲息している全細菌の総量が根尖性歯周炎の発症を左右している可能性もある。このように、根尖性歯周炎の発症機序はまだ未解明な点が多く残されている。

最近注目されているメタゲノム解析は、多種多様な最近で構成される菌叢を一つの集合体とみなし、そこに含まれる全細菌の遺伝子情報を一括して解析するものである。メタゲノム解析を通じ、感染根管のパンゲノムとしての構造や機能特性を明らかにすることにより、根尖性歯周炎の発症機序の理解が深まり、感染根管治療に新しいストラテジーの加わる可能性がある。

2. 研究の目的

現行の感染根管治療は、経験則に基づいた菌非特異的アプローチ、すなわち、白色象牙質を目安にした根管の機械的拡大形成と抗菌剤を用いた洗浄・消毒が標準的なプロトコルである。本研究の目的は、根管細菌叢をチェアーサイドで質的・量的に迅速に検査する手法を確立し、根尖性歯周炎の病態に関わる細菌群を明らかにするとともに、根管拡大の基準や根管治療薬の選択を Evidence-based なものとし、感染根管に対する合理的かつ効果的な診断と治療を実現することである。必要最小限の根管拡大にとどめることで根管治療後の歯をより長く機能させることが可能となる上、適切な抗菌剤を利用して治療の回数・期間を短縮できれば、医療費の削減も期待できる。

3. 研究の方法

(1) 根管細菌試料の採取

東北大学大学院歯学研究科倫理専門委員会の承認を受けたプロトコルに沿って臨床試料の採取を行った。

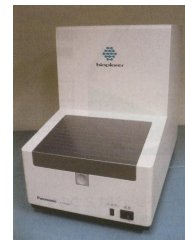
根尖性歯周炎に罹患し東北大学病院歯周病科を受診した患者のうち、インフォームドコンセントの得られた症例を研究対象とした。試料は根管壁象牙質削片で、初回は最初に根尖部に器具が到達した時と、機械的・化学的な根管拡大形成を終え貼薬仮封する直前の2回、採取した。2回目以降は仮封および貼薬剤を除去した時点で採取した。象牙質削片は、根管の太さに適合する手用ファイルで根管壁を切削し、その刃部を滅菌ニッパーで切断、エンドトキシンプリーの滅菌チューブに投入し回収した。チューブは実験室に移送、滅菌生理食塩水 1mL を加え Vortex で均一に分散させ試料として調整した。

(2) 細菌量の定量

試料中の細菌量を ~ の方法で求めた。

バイオフローラ™ (光洋産業) による細菌量の計測

メーカーの指示に従い、試料をポリカーボネートフィルターに吸着させたのち、蛍光試薬 (DAPI および PI) と反応させ、発光点を画像処理することにより、試料中の細菌を計数した。



細菌カウンタ™ (パナソニック) による細菌量の計測

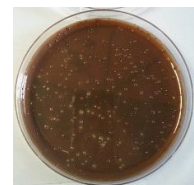


と並行して、細菌カウンタ™ によって細菌量を計測した。細菌カウンタ™ は DEPIM、すなわち液体中の細菌を誘電泳動で電極に捕集させ、その際のインピーダ

ンスの変化を計測することにより、検体 1mL 中の細菌濃度 (CFU) を算出するものである。

嫌気培養を通じた細菌量の算出

さらに、試料を嫌気グローブボックス内でテフロンホモジナイザーにより分散均一化後、CDC 血液寒天平板培地に接種し、7日間嫌気培養後、細菌量 (CFU) を求めた。



(3) 細菌種の同定

嫌気培養した平板培地に生育したコロニーを単離培養し、InstaGene マトリックス (Bio-Rad) を用いて DNA を抽出、16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたユニバーサルプライマー (27F および 1492R) で PCR 増幅、GFX PCR Purification Kit (GE) を用いて精製後、シーケンス解析を行った。得られたシーケンスデータを GenBank Database

BLAST search program を用いて細菌種を同定した。

並行して培養プロセスを経ないメタゲノム解析、すなわち 16S rRNA 遺伝子を標的として 454 Genome Sequencer FLX system (Roche) による pyrosequencing を行い、シークエンスデータを GenBank Database と照合して菌叢を構成する細菌種を同定、それぞれの存在比 (菌叢に占める割合) を求めた。

4. 研究成果

(1) 治療前の根管内細菌量の定量

感染根管 8 症例で、治療前の試料に含まれる細菌量をバイオプロラ™、細菌カウンタ™、嫌気培養後の CFU で比較測定したところ、下の表に示すような結果が得られた。

Case	Tooth	Gender	Age
#1	11	M	56
#2	34	F	65
#3	11	F	68
#4	11	M	59
#5	13	M	59
#6	12	M	59
#7	15	F	63
#8	32	F	68

Case	Bioplorer	Counter	CFU
#1	1.41E+05	<1.00E+5	3.00E+01
#2	2.00E+02	-	1.00E+01
#3	1.04E+05	-	2.10E+03
#4	3.03E+06	2.96E+06	1.04E+05
#5	6.98E+05	<1.00E+6	2.10E+04
#6	3.52E+05	9.26E+05	4.00E+03
#7	1.55E+05	5.83E+05	2.50E+04
#8	1.07E+05	7.86E+05	2.70E+04

細菌カウンタ™での測定値が最大となり、培養後の CFU が最小であった。

抜髄症例では、アクセス直後に採取した試料は嫌気培養陰性 (CFU=0) でありながら、バイオプロラ™で 6.77×10^2 、細菌カウンタ™での測定値は 3.11×10^5 となることから、象牙質削片を含む試料では特に細菌カウンタ™の測定値が大きくなりやすいことが判明した。

また歯髄死からまもないと思われる根尖性歯周炎症例から得た試料では、根尖部歯肉圧痛や打診痛など、急性の症状を呈していたにもかかわらず、嫌気培養陰性 (CFU=0) で、かつバイオプロラ™での測定値もゼロであった。歯髄壊死後、根管壁象牙質に細菌が侵入するのにある程度時間を要すると推察された。

(2) 治療後の根管内細菌量の定量

根管治療の標準的のプロトコールに従い、化学的洗浄下で機械的に根管を拡大し、水酸化カルシウム貼薬による根管消毒を施すと、根管内の細菌量が大きく低下することが明らかとなった。

治療後の試料における測定値を示す。

Case	Bioplorer	Counter	CFU
#1	2.26E+03	-	0
#2	3.97E+02	-	30
#3	1.45E+04	-	0
#4	9.89E+03	<1.00E+5	0
#5	5.63E+03	-	140
#6	-	-	0
#7	8.30E+02	<1.00E+5	0
#8	1.63E+03	<1.00E+5	0

細菌カウンタ™の測定可能範囲は $10^5 \sim 10^8$ であることから、根管内細菌量の多い初回治療前の定量はできても、治療の進展に伴い細菌量が激減する様子を把握するのは困難である。根管治療の経過に伴う細菌数の変動をモニターし根管充填時期を決定するには、測定可能範囲が $10^2 \sim 10^5$ であるバイオプロラ™がより有用であると考えられた。

(3) 検出された細菌種

8 症例から検出された細菌を表に示す。

Species / Case	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	n
<i>Atopobium rimae</i>								○	1
<i>Dialister</i> sp.				○					1
<i>Enterococcus faecalis</i>		○		○		○	○		4
<i>Lactobacillus fermentum</i>								○	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>					○				1
<i>Lactobacillus salivarius</i>								○	1
<i>Olsenella uli</i>	○							○	2
<i>Parascardovia denticolens</i>		○							1
<i>Parvimonas micra</i>								○	1
<i>Peptostreptococcaceae bacterium</i>	○								1
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>								○	1
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>				○	○	○			3
<i>Propionibacterium granulosum</i>				○					1
<i>Propionibacterium propionicum</i>			○						1
<i>Slackia exigua</i>	○								1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				○					1
<i>Veillonella parvula</i>				○					1
No of species	3	2	1	6	2	2	1	6	

多種多様な細菌が検出され、その多くが偏性嫌気性菌であった。1 根管から検出される細菌種は 1 ~ 6 菌種と差が大きく、*Propionibacterium propionicum*、および *Enterococcus faecalis* の単一感染と思われる症例が各 1 例あった。複数の症例から共通して検出されたのはわずか 3 菌種で、*Enterococcus faecalis*、*Olsenella uli*、*Propionibacterium acidipropionici* のみであった。このうち *Enterococcus faecalis* は、難治性の根尖性歯周炎との関連が取り上げられている。著者らがこれまで行ってきた研究結果と今回の結果を総合すると、未だその具体的な病原性は解明されていないものの、*Lactobacillus* 属、*Olsenella* 属、*Propionibacterium* 属などが感染根管から高い頻度で検出されることがわかった。メタゲノム解析を通じて、口腔内フローラと感染根管内フローラの特徴を比較検討し、その違いを明らかにできれば、感染根管の成立機序ならびに根尖部歯周組織に対する病原性を解明できる可能性がある。根管内フローラのパンゲノムとしての機能を解析することにより、根尖性歯周炎の診断と治療への応用が期待できる。

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)

〔雑誌論文〕(計 12件)

Abiko Y, Sato T, Sakashita R, Tomida J, Kawamura Y, Takahashi N: Profiling subgingival microbiota of plaque biofilms in the elderly. *J Oral Biosci*, 査読有, 58(2): in press, 2016.

DOI: 10.1016/j.job.2015.12.002

Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Mayanagi G, Washio J, Takahashi N: PCR-dipstick DNA chromatography for profiling of a subgroup of caries-associated bacterial species in plaque from healthy coronal surfaces and periodontal pockets. *Biomed Res (Tokyo)*, 査読有, 37(1): 29-36, 2016.

https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biomedres/37/1/_contents

Tanda N, Hoshikawa Y, Ishida N, Sato T, Takahashi N, Hosokawa R, Koseki T: Oral malodorous gases and oral microbiota: From halitosis to carcinogenesis. *J Oral Biosci*, 査読有, 57(4): 175-178, 2015.

DOI: 10.1016/j.job.2015.05.004

Sato T, Tomida J, Naka T, Fujiwara N, Hasegawa A, Hoshikawa Y, Matsuyama J, Ishida N, Kondo T, Tanaka K, Takahashi N, Kawamura Y: *Porphyrromonas bronchialis* sp. nov., isolated from intraoperative bronchial fluids of a patient with non-small cell lung cancer. *Tohoku J Exp Med*, 査読有, 237(1): 31-37, 2015.

DOI: 10.1620/tjem.237.31

Sato T, Kenmotsu S, Nakakura-Ohshima K, Takahashi N, Ohshima H: Responses of infected dental pulp to TCP containing antimicrobials in rat molars. *Arch Histol Cytol*, 査読有, 73(4+5): 165-175, 2015.

<http://doi.org/10.1679/aohc.73.165>

Ishida N, Sato T, Hoshikawa Y, Tanda N, Sasaki K, Kondo T, Takahashi N: Microbiota profiling of bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. *J Oral Biosci*, 査読有, 57(2): 110-117, 2015.

DOI: 10.1016/j.job.2014.11.001

Kawamura Y, Kuwabara S, Kania SA, Kato

H, Hamagishi M, Fujiwara N, Sato T, Tomida J, Tanaka K, Bemis DA: *Porphyrromonas pogonae* sp. nov., an anaerobic but low concentration oxygen adapted coccobacillus isolated from lizards (*Pogona vitticeps*) or human clinical specimens, and emended description of the genus *Porphyrromonas* Shah and Collins 1988. *Syst Appl Microbiol*, 査読有, 38: 104-109, 2015.

DOI: 10.1016/j.syapm.2014.11.004

Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Tanner AC, Takahashi N: Rapid and sensitive PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex analysis of oral microbiota. *BioMed Res Int* 2014, 査読有, Article ID189323, 10 pages, 2014.

DOI: 10.1155/2014/180323

Hasegawa A, Sato T, Hoshikawa Y, Ishida N, Tanda N, Kawamura Y, Kondo T, Takahashi N: Detection and identification of anaerobes from intraoperative bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. *Microbiol Immunol*, 査読有, 58, 375-381, 2014.

DOI: 10.1111/1348-0421.12157

Fukushima A, Mayanagi G, Nakajo K, Sasaki K, Takahashi N: Microbiologically induced corrosive properties of the titanium surface. *J Dent Res*, 査読有, 93, 525-529, 2014.

DOI: 10.1177/0022034514524782

Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, Domon-Tawaraya H, Takahashi N: Effect of fluoride-releasing restorative materials on bacteria-induced pH fall at the bacteria-material interface: An in vitro model study. *J Dent*, 査読有, 42, 15-20, 2014.

DOI: 10.1016/j.jdent.2013.11.006

Kawashima J, Nakajo K, Washio J, Mayanagi G, Shimauchi H, Takahashi N: Fluoride-sensitivity of growth and acid production of oral Actinomyces: comparison with oral Streptococcus. *Microbiol Immunol*, 査読有, 57, 797-804, 2013.

DOI: 1111/1348-0421.12098

〔学会発表〕(計 15件)

Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Mayanagi G, Abiko Y, Washio J,

Takahashi N: PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex and semi-quantitative analysis of plaque biofilm microbiota. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2016年1月18-19日、仙台。

鷲尾純平, 小川珠生, 北村 淳, 森島浩允, 田 玲錫, 石黒和子, 真柳 弦, 安彦友希, 佐藤拓一, 高橋信博: メタボローム解析: 口腔疾患の発生機序解明への新たなアプローチ. 第68回東北大学歯学会 インターフェイス口腔健康科学研究紹介. 2015年12月11日, 仙台(招待講演).

Tanda N, Ishida N, Takahashi N, Sato T, Hoshikawa Y, Hosokawa R, Koseki T: Malodorous gases from saliva of perioperative patients of lung resection. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research, 2015年10月31日、福岡。

田中香お里, 佐藤拓一, 八巻恵子, 林 将大, 河村好章: 嫌気性無芽胞グラム陽性桿菌 *Olsenella* spp. の薬剤感受性. 第63回日本化学療法学会西日本支部総会, 2015年10月15-17日、奈良。

Sato T, Yamaki K, Kawamura Y, Tomida J, Tian L, Ishida N, Takeuchi Y, Hashimoto K, Abiko Y, Matsuyama J, Takahashi N: Profiling of microbiota from infected root canals with and without marginal leakage using anaerobic culture and molecular biological techniques (16S rRNA gene sequencing). The 25th ECCMID, 2015年4月28日、コペンハーゲン、デンマーク。

Tomida J, Morita Y, Sato T, Kawamura Y: Antimicrobial susceptibility profiles of *Helicobacter cinaedi* strains isolated from patients in Japan. The 25th ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), 2015年4月25日、コペンハーゲン、デンマーク。

河村 好章, 佐藤 拓一, 富田 純子, 森田 雄二, 中 崇, 藤原 永年, 田中 香お里: 発育にビタミン K を要求する新しい *Porphyromonas* 属菌種の分類学的検討. 第88回日本細菌学会総会, 2015年3月26-28日、岐阜。

Yamaki K, Sato T, Ishida N, Tian L, Hashimoto K, Shimauchi H, Takahashi N: Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals with/without marginal leakage. The 93rd IADR

General Session & Exhibition, 2015年3月13日、ボストン、アメリカ合衆国。

Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N: PCR-dipstick DNA chromatography for semi-quantitative analysis of oral microbiota. The 93rd IADR General Session & Exhibition. 2015年3月13日、ボストン、アメリカ合衆国。

Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G, Kawase M, Tanner ACR: A novel method for oral microbiota analysis: PCR-dipstick DNA chromatography. China-Japan-Korea Dental Science Symposium, 2014年11月8-9日、大連、中華人民共和国。

Quispe-Salcedo A, Sato T, Matsuyama J, Ohshima H: Responses of infected dental pulp to capping with a mixture of three antibacterial drugs (3Mix) or calcium hydroxide cement in mouse molars. 第56回歯科基礎医学学会学術大会, 2014年9月27日、福岡。

Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G, Yamaki K, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N: PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex analysis of oral microbiota. 第56回歯科基礎医学学会学術大会サテライトシンポジウム, 2014年9月25日、福岡。

Kawamura Y, Kuwabara S, Kania SA, Kato H, Hamagishi M, Hayakawa S, Fujiwara N, Naka T, Sato T, Tomida J, Tanaka K, Yoshida Y, Morita Y, Bemis DA: *Porphyromonas pogonae* sp. nov., a strong beta-hemolytic, low concentration oxygen tolerant species from lizards and human clinical specimens. The 114th General Meetings of ASM, 2014年5月20日、ボストン、アメリカ合衆国。

Sato T, Kawamura Y, Ishida N, Yamaki K, Matsuyama J, Takahashi N: Molecular biological profiling of oral biofilm: Quantitative and qualitative analyses. The 2nd IADR-APR (Asia Pacific Region), 2013年8月21日、バンコク、タイ。

Sato T, Kawamura Y, Yamaki K, Shimauchi H, Takahashi N: Profiling of oral biofilm microbiota utilizing molecular biological methods. Peking-Tohoku Dental Symposium: Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface, 2013年7月26日、北京、中華人民共和国。

〔図書〕(計 2件)

Sato T, Kawamura Y, Yamaki K, Ishida N, Takeuchi Y, Hashimoto K, Abiko Y, Mayanagi G, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N: Oral microbiota in crevices around dental implants: Profiling of oral biofilm. In: Sasaki/ Suzuki/ Takahashi (eds.). Interface Oral Health Science 2014: Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface, Springer, Tokyo, 2015, 351 pages (pp.45-50).

Sakashita R, Takami M, Ono H, Nishihira T, Sato T, Hamada M: Preventing aspiration pneumonia for the elderly: a review focused on the impact of the consistency of food substances. In: Sasaki/ Suzuki/ Takahashi (eds.). Interface Oral Health Science 2014: Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface, Springer, Tokyo, 2015, 351 pages (pp.335-351)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

八巻 恵子 (YAMAKI KEIKO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90182419

(2)研究分担者

佐藤 拓一 (SATO TAKUICHI)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：10303132

真柳 弦 (MAYANAGI GEN)

東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：10451600

島内 英俊 (SHIMAUCHI HIDETOSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授
研究者番号：70187425