

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861785

研究課題名(和文) 感染根管治療に伴う根管内細菌叢の量的・質的推移：メタゲノム解析

研究課題名(英文) Change in infected root canal microflora during the course of root canal therapy

## 研究代表者

橋本 紀洋 (Hashimoto, Kazuhiro)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70646447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膨大な数と種類の細菌が、口腔バイオフィルム常在細菌叢を構成していることが広く知られている。また、その統制が乱れ始めると、病的な細菌叢に変遷し、口腔内環境の変動と相まって、種々の口腔疾患が発症することになる。したがって、口腔細菌生態系の性状を理解(プロファイリング)し、制御することが、口腔疾患の多くを予防する一手段と考えられる。プロファイリングの一手段として、ランダムクローニングを経ずに、超高速シーケンサー解析を行うというメタゲノム解析法があり、口腔疾患の1つである、根尖性歯周炎の病態のプロファイリングに導入可能であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Obligate anaerobes have been reported to comprise the majority of oral biofilm including intracanal-microbiota. The bacterial profiling of infected root canals has been long performed. In the present study, metagenomic analysis was applied to the profiling of microbiota in infected root canals, and detailed components of the microbiota of infected root canals were found utilizing high-speed sequencers without random-cloning.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯学 細菌 感染根管 細菌叢 メタゲノム PCR

## 1. 研究開始当初の背景

膨大な数と種類の細菌が、口腔バイオフィルム常在細菌叢を構成していることが広く知られている。その状態で、いったん、その統制が乱れ始めると、病的な細菌叢に変遷し、諸々の口腔内環境の変動と相まって、種々の口腔疾患が発症することになる。したがって、口腔細菌生態系の性状を理解し、制御することが、口腔疾患の多くを、予防する一手段と考えられる。

口腔細菌叢構成の量的・質的解析の一手段として、高度嫌気培養法があり、高度嫌気実験システムの格段の進歩ならびに分子生物学的手法の併用によって、多種多様な嫌気性菌が口腔細菌叢を構成していることが、最近の研究によって明らかにされている。その一方で、迅速性・多試料解析性といった利点を求めて、培養に依らない手段として、16S ribosomal RNA 塩基配列をターゲットとした PCR ランダムクローニング法なども注目されている。

既に申請者らの研究グループは、ランダムクローニング法による予備的な実験を行っており、(1) 術前の細菌叢は根管治療歴の有無、口腔内との交通の有無により、また根管壁表層と深部によっても大きく異なる。(2) 治療行為すなわち機械的根管拡大および化学的清掃・消毒剤貼付により細菌量(細菌数)が激減する。(3) 当初の感染細菌とは系統的に隔たりが大きく低栄養下でも生育可能な細菌が残存する、といった傾向を掴んでいる。

これらの知見を踏まえると、感染根管治療に伴う根管細菌叢の量的・質的推移を捉え、根尖性歯周炎の病態に関わる細菌叢(細菌群)の全貌を明らかにするには、メタゲノム解析、リアルタイム PCR といった手法が考えられる。臨床の視点からは、細菌叢の量的・質的推移をチェアサイドで迅速に検査する細菌検査法の開発も重要となる。

## 2. 研究の目的

これまでの、本研究者らの研究結果を基盤として、そこから発展させて、本研究では、ランダムクローニングを経ずに、超高速シーケンサー解析を行って、根管細菌叢の細菌構成の全貌を明らかにすることを目指している。そのための端緒として、本研究では、根尖性歯周炎の病態に関わる細菌叢(細菌群)解析に、メタゲノム解析法が導入可能かどうかを詳細に検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 東北大学病院を受診した患者から、インフォームドコンセントを得て、感染根管象牙質を歯科治療用の K ファイルを用いて採取し、40 mM リン酸カリウムバッファー 1 mL を加え試料とした。

(2) 試料からの核酸(DNA)の抽出(MORA-extract キットによる抽出)方法は次の通りである。

試料を MORA ビーズ充填チューブに加え、15,000 rpm、5 分間遠心後、上清を取り除く。

[ライシスバッファーを予め、70 に加温しておいて] 150  $\mu$ L のライシスバッファーを加え、70 で 10 分間加熱し、溶菌を促進させる。

加熱処理後、細胞破砕機(あるいは Vortex ミキサー)で破砕処理を行う。

破砕後、スピンドウンし、1% SDS 溶液 200  $\mu$ L を加えて混和し、70 で 10 分間、再加温する。

400  $\mu$ L のフェノール混合液[下層の黄色部分]を加え、混合後、15,000 rpm、3 分間遠心し、上層(水層)をキット付属の 2 mL チューブに回収し、粗精製核酸とする。

粗精製核酸に、99%エタノール 1 mL を加え、15,000 rpm、10 分間遠心する。

上清を取り除いた後、70%エタノールを 1 mL 加え、混和後、再度 15,000 rpm、5 分間遠心する。

上清を取り除いた後、遠心濃縮器(5 分間)でチューブを乾燥させる。

乾燥させた沈殿に、10  $\mu$ L の TE バッファーを加え、溶解させ、-20 で冷凍保存する。

## (3) PCR 増幅および Pyrosequencing

精製 DNA を基に、16S rRNA 遺伝子を標的として PCR 増幅し、454 Genome Sequencer FLX system (Roche) によって pyrosequencing を行った。得られたシーケンス・データを相同性検索(BLAST search 解析)によってデータベースと照合し、97%超の相同性のものを同一の菌種として同定し、リストを作成した。

## 4. 研究成果

(1) Copenhagen (Denmark) および Boston (USA) で、報告した成果概要は次の通りであ

る。

根先病巣の形成や歯内疾患の治癒遅延に  
関与していると考えられている根管内の感  
染細菌（感染根管内細菌叢）について  
pyrosequencing法を用いて網羅的に検出・検  
討した。各試料から約5万 readsのシークエ  
ンスが得られ、genusレベルで、75菌属程度、  
speciesレベルで300菌種程度が同定された。  
その内、*Actinomyces*、*Olsenella*、  
*Streptococcus*、*Pyramidobacter*、  
*Prevotella*が優勢であった。

Pyrosequencing法によるメタゲノム解析  
によって感染根管内細菌叢の詳細・多様性が  
明らかになり、また本解析法の精密性および  
迅速性から歯内治療などの歯科臨床に応用  
可能と考えられた。また、適切な歯内治療を  
施した場合でも、一定の割合で細菌が残存す  
ることが示された。

一方、

（2）愛知県蒲都市で報告した成果概要は次  
の通りである。

膨大な数と種類の微生物が、口腔バイオフ  
ィルム常在微生物叢（フローラ）を構成して  
いる。口腔フローラ構成の量的・質的解析（プ  
ロファイリング）の一手法として、嫌気培養  
法があり、多種多様な嫌気性菌が口腔フロ  
ーラを構成していることが報告されている。ま  
た、定量PCRを含む菌種特異的なPCRによっ  
て、目的とする菌群の定性・定量的な情報を  
得ることが可能となっている。

本研究者らが現在行っている、口腔フロ  
ーラのプロファイリングについて報告した。  
蛍光染色フィルターおよび機器バイオプロ  
ーラを利用した、新規な総細菌量定量法によ  
って、治療前後の細菌量の減少が迅速にモニ  
ターできた。メタゲノム法によって治療  
前後のフローラ細菌構成の変動もモニター  
可能であった。

齲蝕や歯内疾患、歯周病、口臭症の他、誤  
嚥性肺炎等、口腔フローラに起因する疾患は  
多い。歯学における口腔フローラ研究が重要  
視され、今後、研究手法の進歩に伴う、新た  
な知見の集積がより一層、期待されている。

以上の研究成果から、ランダムクローニ  
ングを経ずに、超高速シークエンサー解析を行  
うというメタゲノム解析法が、根尖性歯周炎  
の病態に関わる細菌叢（細菌群）解析に導入  
可能であることが分かり、今後、感染根管内  
細菌叢細菌構成の全貌が明らかになること  
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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 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 genes  
sequencing).

The 25th ECCMID (European Congress of  
Clinical Microbiology and Infectious  
Diseases)

28 April, 2015, Copenhagen, Denmark

2. 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  
13 March, 2015, Boston, USA

*J Dent Res* **94 Spec Iss A**: 3084, 2015  
(www.dentalresearch.org).

3. 佐藤拓一、橋本紀洋、河村好章：口腔フ  
ローラのプロファイリング，第 50 回日本細  
菌学会中部支部総会，2013 年 10 月 18 日，ホ  
テル竹島（愛知県蒲都市）

〔図書〕(計 1 件)

1. Sato T, Kawamura Y, Yamaki K, Ishida N,  
Tian L, 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: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi  
(eds.) *Interface Oral Health Science 2014:  
Innovative Research on Biosis-Abiosis  
Intelligent Interface*, Springer, Tokyo,

pp. 45-50, 2015.  
[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55192-8\\_4](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55192-8_4)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 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 0 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

橋本 紀洋 (HASHIMOTO, KAZUHIRO)  
東北大学・大学院歯学研究科・  
大学院非常勤講師  
研究者番号： 70646447

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

佐藤 拓一 (SATO, TAKUICHI)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号： 10303132