

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2017

課題番号：26462869

研究課題名（和文）根管内細菌叢メタゲノム解析に基づく、新しい根尖性歯周炎の臨床診断法の開発

研究課題名（英文）Microbiota profiling of infected root canals using metagenomic analysis

研究代表者

佐藤 拓一（Sato, Takuichi）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10303132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：歯内疾患は根管内に生息する多種多様で、多量な細菌により惹起される。したがって、根管内に生息する細菌を質的ならびに量的に把握することが重要とされている。本研究では、近年、注目を集めているメタゲノム解析法を応用して、精密で、高感度な細菌検査法によって、治療対象の根管内細菌叢を、モニタリングすることを試みた。

研究成果の概要（英文）：Apical periodontitis is an infectious and inflammatory disease of periapical tissues caused by oral bacteria invading the root canal system. In the present study, metagenomic analysis was performed in order to profile the microbiota of infected root canals.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 口腔細菌 バイオフィルム 歯内治療 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

歯内疾患は根管内に生息する多種多様で、多量な細菌により惹起される、とされている。したがって、根管内に生息する細菌を質的ならびに量的に把握することが重要とされている。

既に申請者らの研究グループは、予備的な研究で、少数例ながら、(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報告している。

2. 研究の目的

本研究では、近年、注目を集めているメタゲノム解析法を応用して、精密で、高感度な細菌検査法によって、治療対象の根管内細菌叢を、モニタリングすることを目指した。感染根管内試料を対象として、効率的な質的解析の実験条件の開発を行った。

3. 研究の方法

【メタゲノム解析】

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。東北大学病院を受診した被験者から、インフォームドコンセントを得て、「治療の初回」および「治療が進んだ段階」の感染根管象牙質を試料として採取した。16S ribosomal RNA 遺伝子を標的とし、454 Genome Sequencer FLXsystem (Roche) によって pyrosequencing を行った。得られたシーケンス・データを BLAST search 解析 (97%超の相同性) によって菌種の同定を行った。

4. 研究成果

【メタゲノム解析】

治療の初回の試料の優勢菌は (Genus level で記すと) *Actinomyces* (30%), *Olsenella* (13%), *Streptococcus* (12%), *Pyramidobacter* (9%), *Prevotella* (6%), *Pseudoramibacter* (4%), *Eubacterium* (4%), *Abiotrophia* (4%), *Bacillus* (3%), *Porphyromonas* (2%), *Enterococcus* (1%),

Tannerella (1%), *Atopobium* (1%) であった。

また一方、治療が進んだ段階の試料では、*Streptococcus* (37%), *Actinomyces* (10%), *Prevotella* (10%), *Eubacterium* (5%), *Neisseria* (4%), *Olsenella* (4%), *Propionibacterium* (3%), *Fusobacterium* (3%), *Peptostreptococcus* (2%), *Bergeyella* (2%), *Oribacterium* (2%), *Porphyromonas* (1%), *Tannerella* (1%), *Helicobacter* (1%), *Veillonella* (1%), *Enterococcus* (1%) が優勢であった。

本研究によって歯内疾患に関わる根管内に生息する細菌叢構成の詳細が明らかとなった。また、実際の歯内治療の進展に伴って、その構成が変遷していく様子も捉えることができた。本研究の成果の1つとして、Pyrosequencing 法が歯内治療の対象となる根管内細菌叢のモニタリングに利用可能であることを示すことができたことが挙げられる (すなわち、本研究は、その根拠となるデータとなると考えられた)。

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 11 件)

- 1) Hasegawa A, Sato T, Hoshikawa Y, Ishida N, Tanda N, Kawamura Y, Kondo T, Takahashi N: Detection and identification of oral anaerobes from intraoperative bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. *Microbiol Immunol* **58(7)**: 375-381, 2014. 査読有, doi: 10.1111/1348-0421.12157, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1348-0421.12157>
- 2) 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*, Volume 2014, Article ID 180323, 10 pages, 2014. Nov 18; 査読有, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/180323>
- 3) Kawamura Y, Kuwabara S, Kania SA, Kato H, Hamagishi M, Fujiwara N, Sato T, Tomida J, Tanaka K, Bemis DA: *Porphyromonas pogonae* sp. nov., an anaerobic but low concentration oxygen adapted coccobacillus isolated from lizards (*Pogona vitticeps*) or human

- clinical specimens. *Syst Appl Microbiol* **38(2)**:104-109, 2015. March, 査読有, doi: 10.1016/j.syapm.2014.11.004
- 4) **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* **57(2)**: 110-117, 2015. 査読有, doi:10.1016/j.job.2014.11.001
- 5) **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* **73(4+5)**: 165-175, 2010-2011. 査読有, (Published as of 11 July, 2015; Accepted as of 20 January, 2012) <http://doi.org/10.1679/aohc.73.165>
- 6) **Sato T, Tomida J, Naka T, Fujiwara N, Hasegawa A, Hoshikawa Y, Matsuyama J, Ishida N, Kondo T, Tanaka K, Takahashi N, Kawamura Y**: *Porphyromonas bronchialis* sp. nov., isolated from intraoperative bronchial fluids of a patient with non-small cell lung cancer. *Tohoku J Exp Med* **237(1)**: 31-37, 2015. September, 査読有, doi:10.1620/tjem.237.31
- 7) **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* **57(4)**: 175-178, 2015. November, 査読有, doi:10.1016/j.job.2015.05.004
- 8) **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)* **37(1)**: 29-36, 2016. February, 査読有, https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/37/1/37_29/_article, doi:10.2220/biomedres.37.29
- 9) **Abiko Y, Sato T, Sakashita R, Tomida J, Kawamura Y, Takahashi N**: Profiling subgingival microbiota of plaque biofilms in the elderly. *J Oral Biosci* **58(2)**: 62-65, 2016. May, 査読有, doi:10.1016/j.job.2015.12.002
- 10) **Sakashita R, Hamada M, Sato T, Abiko Y, Takami M**: Oral health promotion program for fostering self-management of the elderly living in communities. *Intell Autom Soft Comput* **23(3)**: 535-541, 2017. 査読有, doi: 10.1080/10798587.2017.1348459, <http://www.tandfonline.com/eprint/ZCuYfPnzZGxmjbZ35kDQ/full>
- 11) **Gunarathne TGNS, Nakamura M, Aoki H, Taguchi M, Hotta K, Ishida M, Yamazaki Y, Sakai S, Sakagami M, Sato M, Sato T, Yamamoto H, Iwafuchi M**: Consideration to health care and gender in Sri Lanka. *J Health Sci Niigata Univ* **16(1)**: in press. 査読有

[学会発表](計 25 件)

- 1) **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 Meeting of ASM (American Society for Microbiology)*, 20 May, 2014, Boston, USA, Final Program of ASM 2014, p. 221 (#2869), 2014.
- 2) **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. *Satellite Symposium on The 56th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology*, 25 September, 2014, Fukuoka, *J Oral Biosci Supplement*: p. 85-86, 2014. (Abstract #SS10-2)
- 3) **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. *The 56th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology*, 27 September, 2014, Fukuoka, *J Oral Biosci Supplement*: p. 133, 2014. (Abstract #02-G3)
- 4) **Tian L, Sato T, Niwa K, Mayanagi G,**

- Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N: A novel method for oral microbiota analysis: PCR-dipstick DNA chromatography. *China-Japan-Korea Dental Science Symposium*, 8-9 November, 2014, Dalian, China
- 5) 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*, 13 March, 2015, Boston, USA, *J Dent Res* **94 Spec Iss A**: 2646, 2015 (www.dentalresearch.org).
- 6) 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).
- 7) 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 (Taxonomic analysis of *Porphyromonas* new species candidate, requiring vitamin-K as growth factor), 第 88 回日本細菌学会総会 2015 年 3 月 26 日 岐阜、P1-007, *日本細菌学雑誌* **70(1)**: 134, 2015.
- 8) 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 (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)*, 28 April, 2015, Copenhagen, Denmark, Location: Paper Poster Session VI, Session: P73 Analysing human microbiota in health and disease (Poster No: P1326)
- 9) 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)*, 25-28 April, 2015, Copenhagen, Denmark, Location: ePoster Area, Session: EV04 Antimicrobials: in vitro antibacterial susceptibility (Poster No: EV0132)
- 10) 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 (併催; 第 85 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第 58 回日本感染症学会中日本地方会学術集会), 2015 年 10 月 17 日 2015 プログラム・抄録集: p. 335 (演題番号 289), 奈良市
- 11) 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*, 31 October, 2015, Fukuoka, Poster No. 136.
- 12) 鷲尾純平, 小川珠生, 北村 淳, 森島浩允, Tian Lingyang, 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
- 13) 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*, 18-19 January, 2016, Sendai, *Program and Abstracts* p. 61 (P2-1)
- 14) Tanda N, Hoshikawa Y, Sato T, Hosokawa R, Takahashi N, Koseki T: Acetone analysis in perioperative patients of lung cancer under oral hygiene program. *MASCC/ISOO 2016*, 23-25 June, 2016, Adelaide, Australia (MASCC: The Multinational Association of Supportive Care in Cancer, ISOO: International Symposium on Supportive Care in Cancer)
- 15) 田中香お里, 佐藤拓一, 八巻恵子, 林 将

- 大,河村好章**: 歯科感染症から分離されたグラム陽性嫌気性菌の薬剤感受性, 第64回日本化学療法学会西日本支部総会(併催; 第86回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第59回日本感染症学会中日本地方会学術集会)2016年11月24-26日, 那覇市, 2016 プログラム・抄録集: p. 341 (演題番号 205)
- 16) **曾田彩花, 佐藤拓一, 石黒和子, 安彦友希, 真柳 弦, 鷲尾純平, 高橋信博**: ペットボトルの口の部分に付着する細菌の量および構成 (A pilot study), 第6回口腔保健用機能性食品研究会, 2017年1月29日, 横浜市鶴見
- 17) **涌井杏奈, 佐野拓人, 平吹有香, 曾田彩花, 佐藤拓一**: 液体ミルクの安全性の立証に向けて: 飲料物の飲み口に付着する細菌の検出および同定, 第12回日本臨床検査学教育学会学術大会 学部生セッション, 2017年8月24日, 埼玉県越谷市
- 18) Sano H, Hirabuki Y, Wakui A, Aida A, Abiko Y, Yamaki K, Mayanagi G, Washio J, Takahashi N, Sato T: Quantification and composition of remaining bacteria in plastic bottles after drinking. *The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology*, 17 September, 2017, Shiojiri, Nagano
- 19) **涌井杏奈, 平吹有香, 佐野拓人, 曾田彩花, 佐藤拓一**: 液体ミルクの安全性の立証に向けて: 飲料物の飲み口に付着する細菌の量および構成の解析, 第57回日本臨床化学会年次学術集会(日本臨床検査学教育学会臨床化学分科会共催シンポジウム), 2017年10月8日, 札幌市
- 20) **平吹有香, 涌井杏奈, 佐野拓人, 曾田彩花, 竹中佑太, 河内美帆, 佐藤拓一**: ペットボトル飲料物の飲み口に付着する細菌の検出および同定, 第54回日本細菌学会中部支部会, 2017年10月14日, 名古屋市
- 21) Sakashita R, Hamada M, Izumoto M, Ono K, Takami M, Ono H, Sato T: Development of a life enhancement program focusing on dining for senior home care patients: A pilot study. *International Nursing Research Conference*, 20-22 October 2017, Bangkok, Thailand
- 22) **佐野拓人, 涌井杏奈, 平吹有香, 曾田彩花, 竹中佑太, 河内美帆, 佐藤拓一**: 液体ミルクの安全性の立証に向けて: 細菌学的解析, 新大産学交流フェスタ 2017, 2017年10月31日, 新潟
- 23) Aida A, Sano H, Wakui A, Hirabuki Y, Takenaka Y, Kawachi M, Vidanapathirana GU, Washio J, Abiko Y, Mayanagi G, Ishiguro K, Yamaki K, Takahashi N, Sato T: A microbiological study on bacteria in the PET bottles after drinking. *The 65th Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research*, 18 November, 2017, Tokyo
- 24) Sano H, Aida A, Vidanapathirana GU, Wakui A, Hirabuki Y, Takenaka Y, Kawachi M, Aihara H, Washio J, Abiko Y, Mayanagi G, Ishiguro K, Yamaki K, Takahashi N, Sato T: Microbiota profiling at the mouth of plastic bottles after drinking straight from bottles. *International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2018*, 13-14 January, 2018, Sendai
- 25) **河内美帆, 佐野拓人, 涌井杏奈, 平吹有香, 曾田彩花, 竹中佑太, 米田茜音, 中畑那奈, 相原 瞳, Vidanapathirana GU, 鷲尾純平, 安彦友希, 石黒和子, 真柳 弦, 高橋信博, 佐藤拓一**: ペットボトルの口の部分に付着する細菌および飲料物中の細菌の量および構成の解析(第2報), 第7回口腔保健用機能性食品研究会, 2018年1月21日, 大阪府柏原市

[図書](計 2 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.
- 2) 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: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2014: Innovative Research on Biosis-Abiosis*

Intelligent Interface, Springer, Tokyo,
pp. 335-351, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

真柳 弦 (MAYANGI, GEN)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号： 10451600

河村 好章 (KAWAMURA, YOSHIAKI)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号： 80262757

田中 香お里 (TANAKA, KAORI)
岐阜大学・
生命科学総合研究支援センター・教授
研究者番号： 20242729

松山 順子 (MATSUYAMA, JUNKO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号： 30293236

大島 勇人 (OHSHIMA, HAYATO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号： 70251824