

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592220

研究課題名（和文）歯内療法にフィードバック可能な、新たな感染根管微生物学的評価法の開発

研究課題名（英文）Development of novel microflora-profiling methods of infected root canals and their application to endodontic therapy

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

分子生物学的方法によって治療に伴う根管細菌叢の推移・変遷を観察し、病態に関わる細菌群を明らかにした。感染根管象牙質を採取し、厳密な嫌気条件下で培養し、得られたコロニーについて、16S rRNA 遺伝子のシーケンス法により、細菌叢の量的・質的变化について解析を行った。その結果、感染根管内の環境は嫌气的で、偏性嫌気性菌の生育に適していること、さらに適切な根管治療によって根管内の環境は劇的に変化することが示された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to profile the microflora in infected root canals, using anaerobic culture and molecular biological techniques for bacterial identification, before and after root canal treatment. Samples from infected root canals before and after treatment were collected, followed by anaerobic culture. After incubation, CFUs were counted and isolated bacteria were identified by 16S rRNA gene sequencing. The findings of this study suggest that the environment in root canals is anaerobic and therefore support the growth of anaerobes, and that adequate treatment changes the root canal environment drastically.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：口腔細菌学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学，口腔細菌，根尖性歯周炎，PCR，16S rRNA

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎は根管内に生息する多種多様な細菌により惹起される。根管から分離される細菌群は、臨床症状の有無により大きく異なる。現在実践されている感染根管治療は、機械的拡大と化学的清掃、根管貼薬により根管内の感染源を除去することを目標としており、感染の原因菌やそれらの病原性に特異的に対処しているわけではない。そこで本研究を企画するにあたり、分子生物学的手法に基づいた高感度の細菌検査法を駆使し、治療対象の根管内細菌叢を定性的かつ定量的に把握することにより、合理的な選択的抗菌治療が可能となり、その結果、歯質の犠牲を最小限にとどめることができ、患歯の寿命の延長が期待できるのではないかと、さらには、感染根管の難治症例化を回避できるのではないかと発想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、16S ribosomal RNA 遺伝子をターゲットとした分子生物学的方法に基づく根管内細菌検査を通じて、根管治療に伴う根管内細菌叢の推移・変遷を観察し、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、従来経験則に依存しがちだった根管治療法・治療薬の選択をEvidence-basedなものとし、さらには、根管充填前に必須である、細菌培養検査(従来法)に代わる、簡便で信用度の高い新たな根管内細菌検査法を確立・提唱することである。

3. 研究の方法

本学歯学研究科倫理専門委員会の承認の下、歯内療法科に来院した被験者からインフォームド・コンセントを得た後、感染根管象牙質を根管治療用ファイル(滅菌)によって採取し、試料とした。厳密な嫌気条件下で培養し、得られたコロニーについて、16S rRNA 遺伝子のシーケンス法により、感染根管治療の経過に伴って根管内の細菌叢がどのように変化(シフト)するかについて、量的および質的に検討した。

4. 研究成果

本研究の結果、感染根管内の細菌構成は偏性嫌気性菌が91%(162株)と優勢で、*Olsenella* (27.5%), *Mogibacterium* (19.1%), *Pseudoramibacter* (11.8%), *Propionibacterium* (10.1%), *Parvimonas* (6.7%)が主要な優勢菌であった。また、これらの根管からは2回目あるいは3回目の根管治療時に、細菌が検出されなくなった。以上から、

感染根管内の環境は嫌気的で、偏性嫌気性菌の生育に適していること、さらに適切な根管治療によって根管内の環境は劇的に変化することが示された。

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 7 件)

1) Sato T, Kenmotsu S, Nakakura-Ohshima K, Takahashi N, Ohshima H: Responses of infected dental pulp to α TCP containing antimicrobials in rat molars. *Arch Histol Cytol* **74**: in press, 2011. 査読あり

2) Ito Y, Sato T, Yamaki K, Mayanagi G, Hashimoto K, Shimauchi H, Takahashi N: Profiling of infected root canal microflora before and after treatment using culture-independent methods. *J Microbiol* **49**: in press, 2011. 査読あり

3) Hashimoto K, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N: Profiling of dental plaque microflora on root caries lesions and the protein-denaturing activity of these bacteria - A pilot study. *Am J Dent* **24**: in press, 2011. 査読あり

4) Masaki M, Sato T, Sugawara Y, Sasano T, Takahashi N: Detection and identification of non-*Candida albicans* species in human oral lichen planus. *Microbiol Immunol* **55**(1): 66-70, 2011. 査読あり

5) Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N: Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodontal Res* **45**(3): 389-395, 2010. 査読あり

6) Thaweboon B, Laohapand P, Amornchat C, Matsuyama J, Sato T, Nunez PP, Uematsu H, Hoshino E: Host β -globin-gene fragments of crevicular fluid as a biomarker in periodontal health and disease. *J Periodontal Res* **45**(1): 38-44, 2010. 査読あり

7) 河村好章, 長谷川義明, 佐藤拓一: 口腔内細菌叢のコントロール. *ファルマシア* **46**(10): 929-933, 2010. 査読なし

[学会発表] (計 32 件)

1) Abiko Y, Sato T, Sakashita R, Takahashi N: Subgingival plaque biofilm microflora of elderly subjects: quantitative analysis of *Porphyromonas gingivalis* and genotyping of its virulence-associated *fimA*. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

2) Hasegawa A, Sato T, Hoshikawa Y, Kondo T, Takahashi N: Silent aspiration of oral bacteria - Microbiological analysis of intraoperative bronchial fluids from patients with pulmonary carcinoma. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

3) Kato K, Tamura K, Nakagaki H, Sakakibara S, Ou Y, Matsumoto S, Fujita K, Sato T: A method for quantitatively evaluating plaque biofilm removing capacity of a dental water jet using EPMA. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

4) Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Quantification and identification of bacteria in the maxillary obturator-prostheses. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

5) Yamaki K, Sato T, Shimauchi H: Change in infected root canal microflora during the course of root canal therapy. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

6) Nishihira T, Nishitani M, Sato T, Abiko Y, Matsushita K, Hamada M, Sakashita R: Community oral health promotion program fostering self-management for elderly people. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science, 8 March, 2011, Sendai

7) 佐藤拓一, 安彦友希, 長谷川彩子, 真柳 弦, 鷺尾純平, 中條和子, 堀 (宮澤) はるみ, 高橋信博: 口腔フローラのプロファイリング, 第58回東北大学歯学会, 2010年12月10日, 仙台

8) 丹田奈緒子, 星川 康, 遠藤ひとみ, 佐藤拓一, 細川亮一, 田浦勝彦, 齋藤恵一, 井川

恭子, 鈴木 淳, 小関健由: 高齢肺切除症例に対する周術期口腔ケアの試み, 第59回日本口腔衛生学会・総会, 2010年10月8日, 新潟

9) Hasegawa A, Sato T, Hoshikawa Y, Abiko Y, Kondo T, Takahashi N: Silent aspiration of oral bacteria in elderly subjects. The 88th General Session of the International Association for Dental Research, 17 July, 2010, Barcelona, Spain

10) 星川 康, 松田安史, 遠藤ひとみ, 丹田奈緒子, 佐藤拓一, 岡田克典, 近藤 丘: 高齢者肺切除術後肺炎発症機序の解明と予防策, In: シンポジウム「SY03: 高齢者呼吸器外科手術後の合併症防止対策」, 第27回日本呼吸器外科学会総会, 2010年5月13-14日, 仙台

11) 星川 康, 遠藤ひとみ, 丹田奈緒子, 佐藤拓一, 長谷川彩子, 野田雅史, 佐渡 哲, 大石 久, 前田寿美子, 桜田 晃, 遠藤千頭, 岡田克典, 近藤 丘: 周術期専門的口腔ケア介入の肺切除術後肺炎予防効果, 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 2010年4月23-25日, 京都

12) 安彦友希, 佐藤拓一, 高橋信博: 高齢者の歯肉縁下プラークバイオフィーム微生物叢の特徴, 文部科学省特別経費対象事業「歯学連携ネットワークによる口腔からQOL向上を目指す研究」第2回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会, 2010年2月10日, 長崎

13) 八巻恵子, 佐藤拓一, 島内英俊: 感染根管治療に伴う根管内細菌叢の変動, 日本歯科保存学会2009年度秋季学術大会(第131回), 2009年10月30日, 仙台

14) 坂下玲子, 桑原未代子, 松下健二, 佐藤拓一, 安彦友希, 三重幸恵, 井上昌一: 高齢者の様々な口腔保健行動が口腔状態に及ぼす影響, 第58回日本口腔衛生学会・総会, 2009年10月11日, 岐阜

15) Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Detection of bacteria in closed hollow obturators of maxillary prostheses. The 2nd Meeting of IADR Pan Asian Pacific Federation (PAPF) and the 1st Meeting of IADR Asia/Pacific Region (APR), 24 September, 2009, Wuhan, China

16) 松山順子, 安彦友希, 佐藤拓一: 小児のう蝕歯面上のプラークバイオフィーム細菌

叢構成細菌の定量的解析, 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 2009 年 9 月 11 日, 新潟

17) 佐藤拓一, 八巻恵子, 橋本紀洋, 竹内裕尚, 安彦友希, 長谷川彩子, 島内英俊, 高橋信博: 歯内治療に伴う、感染根管内細菌叢の変動に関する研究, 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 2009 年 9 月 11 日, 新潟

18) 安彦友希, 佐藤拓一, 坂下玲子, 高橋信博: 高齢者の歯肉縁下プラーク細菌叢への *Porphyromonas gingivalis* の定着, 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 2009 年 9 月 10 日, 新潟

19) Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Detection of microorganisms from inside of acrylic resin prostheses. The 13th International College of Prosthodontists, September 10, 2009, Cape Town, South Africa

20) 竹内裕尚, 中條和子, 佐藤拓一, 佐久間陽子, 小山重人, 佐々木啓一, 高橋信博: アクリルレジン製補綴物内部の微生物の検出, 平成 21 年度先端歯学スクール 2009, 2009 年 8 月 27-28 日, 淡路島, 兵庫

21) Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Detection of microorganisms from inside of acrylic resin prostheses. ナノ・アモルファス材料および高機能インターフェイス科学シンポジウム, 2009 年 8 月 7-8 日, Zao, Yamagata

22) 竹内裕尚, 中條和子, 佐藤拓一, 佐久間陽子, 小山重人, 佐々木啓一, 高橋信博: 顎義歯の中空型オブチュレーター (塞栓部) 内部の細菌叢の解析, 第 6 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2009 年 6 月 16 日, 仙台

23) Sato T, Takahashi N: Metabolic activity of oral microbial ecosystem in health and disease. The 1st Tohoku-Forsyth Symposium, 10 March, 2009, Boston, USA

24) Tran TT, Kato T, Nakagaki H, Kawamura Y, Sato T: Streptococcal distribution within plaque formed on enamel with glass-ionomer cement. The 56th General Session of Japanese Association for Dental Research, 29 November, 2008, Nagoya

25) 佐藤拓一, 星川 康, 近藤丘, 高橋信博: 全身麻酔手術後の上気道防御反射低下と口腔細菌不顕性誤嚥: 誤嚥性肺炎のモデルとし

て, 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 2008 年 9 月 25 日, 東京

26) 小森亮, 佐藤拓一, 山本照子, 高橋信博: 矯正用バンドおよびブラケット装着歯面のプラークバイオフィーム細菌叢プロファイリングとその構成菌の生化学的性質, 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 2008 年 9 月 23 日, 東京

27) Abiko Y, Sato T, Matsushita K, Sakashita R, Takahashi N: Presence of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque-biofilm of elderly people. The 86th General Session of the International Association for Dental Research, 5 July, 2008, Toronto, Canada

28) Hashimoto K, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N: Profiling of dental plaque microflora of root-carries lesions. The 86th General Session of the International Association for Dental Research, 4 July, 2008, Toronto, Canada

29) Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y, Sasaki K, Takahashi N: Quantification and identification of bacteria within acrylic resin denture bases. The 86th General Session of the International Association for Dental Research, 3 July, 2008, Toronto, Canada

30) Thaweboon B, Laohapand P, Amornchat C, Matsuyama J, Sato T, Uematsu H, Hoshino E: Host-DNA-fragments in periodontal pockets before and after periodontal treatment. The 86th General Session of the International Association for Dental Research, 3 July, 2008, Toronto, Canada

31) 小森亮, 佐藤拓一, 山本照子, 高橋信博: 歯科矯正用バンドおよびマルチブラケット装着歯のプラークバイオフィーム細菌叢プロファイリング, 第 5 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2008 年 5 月 19 日, 仙台

32) 竹内裕尚, 中條和子, 佐藤拓一, 佐久間陽子, 佐々木啓一, 高橋信博: アクリルレジン製の入れ歯 (レジン床義歯) の内部に潜む細菌の解析, 第 5 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2008 年 5 月 19 日, 仙台

[図書] (計 8 件)

1) Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Sakuma Y,

Sasaki K, Takahashi N: Detection of viable bacterial cells in acrylic resin denture bases. *In:* Sasano T, Suzuki O (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 230-231, 2010. 査読あり

2) **Kato K, Tamura K, Thuy TT, Nakagaki H, Sato T:** A method for determining the profiles of glucan and plaque mass volume within dental plaque. *In:* Sasano T, Suzuki O (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 237-239, 2010. 査読あり

3) **Abiko Y, Sato T, Matsushita K, Sakashita R, Takahashi N:** *Porphyromonas gingivalis* is widely distributed in subgingival plaque biofilm of elderly people. *In:* Sasano T, Suzuki O (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 240-242, 2010. 査読あり

4) **Hashimoto K, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N:** Profiling of dental plaque microflora on root caries lesions and the protein-degrading activity of these bacteria. *In:* Sasano T, Suzuki O (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 243-244, 2010. 査読あり

5) **Komori R, Sato T, Takano-Yamamoto T, Takahashi N:** Profiling of dental plaque biofilm on first molar with orthodontic bands and brackets. *In:* Sasano T, Suzuki O (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 248-249, 2010. 査読あり

6) **Matsuyama J, Sato T, Abiko Y, Kato K, Hoshino E:** Real-time PCR analysis of cariogenic bacteria in supragingival plaque biofilm microflora on caries lesions of children. *In:* Sasano T, Suzuki O (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 271-272, 2010. 査読あり

7) **Sato T, Hoshikawa Y, Kondo T, Hashimoto K, Abiko Y, Hasegawa A, Matsuyama J, Takahashi N:** Involvement of cough reflex impairment and silent aspiration of oral bacteria in postoperative pneumonia: A model of aspiration pneumonia. *In:* Sasano T, Suzuki O (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 273-274,

2010. 査読あり

8) **Sakashita R, Otsuka K, Sato T, Watanabe K, Kamide M, Takimoto N, Kawaguchi M, Nishihira T:** Can symptom awareness of the elderly be a clue to find oral diseases and promote oral health behavior? *In:* Sasano T, Suzuki O (eds.) *Interface Oral Health Science 2009*, Springer, New York, 346-348, 2010. 査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

島内 英俊 (SHIMAUCHI HIDETOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70187425

高橋 信博 (TAKAHASHI NOBUHIRO)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：60183852

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

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

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

(3) 連携研究者：なし