

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592112

研究課題名（和文）

根管內細菌のプロファイリングに基づく根尖性歯周炎の客観的診断と治療法の確立

研究課題名（英文）

Development of Diagnosis and Treatment Protocol for Apical Periodontitis based on the Profiling of Intra-canal Microflora

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

研究成果の概要（和文）：根尖性歯周炎を発症した根管壁象牙質試料を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 法により解析し、治療前後の根管內細菌叢を質的・量的に評価した。その結果、機械的拡大と抗菌剤による洗浄消毒で感染源をほぼ排除できること、また、拡大消毒後も残存検出されやすい菌種や根尖部不快症状との相関が推察される菌種が判明した。術前にこれらの菌の感染が疑われる場合には、特異的抗菌療法を併用すると Minimum Intervention を実現できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Intracanal microflora with apical periodontitis was investigated using two rapid microbial cell counters, anaerobic culture, and PCR targeting 16S rRNA genes. Mechanical enlargement of the root canal combined with chemical disinfection could effectively reduce the pathogen, though some species were resistant to this conventional protocol. Also, there were species seemingly linked to apical symptom. Species-specific antimicrobial therapy might enhance minimum intervention in cases harboring such species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学、口腔細菌、根尖性歯周炎、PCR、16S rRNA、嫌気性菌

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎は根管内に棲息する多種多様な細菌により惹起される。しかし、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。

嫌気培養法により根管內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、菌種ではなく、むしろ根管に棲息している全細菌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。

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、根管内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、合理的かつ効果的な感染根管の診断と治療を実現することである。

3. 研究の方法

(1) 細菌試料

東北大学大学院歯学研究科倫理専門委員会の承認のもと、東北大学病院歯内・歯周療法科外来を受診した患者のうち、インフォームドコンセントを得られた根尖性歯周炎症例を研究対象とした。初診から根管充填までの治療期間中、手用ファイルを用いて根管壁から象牙質削片を随時採取した。削片採取に用いたファイル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実験室に移送、滅菌生理食塩水 1mL を加え試料とした。

(2) 細菌量の定量

試料中の細菌量を①～③の方法で求めた。

①バイオプローラ™ (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。



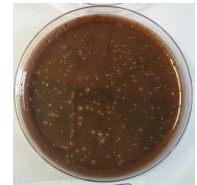
②細菌カウンタ™ (パナソニック) による細菌量の計測



①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。

③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、シークエンス解析を行った。得られたシークエンスデータを GenBank Database BLAST search program を用いて細菌種を同定した。

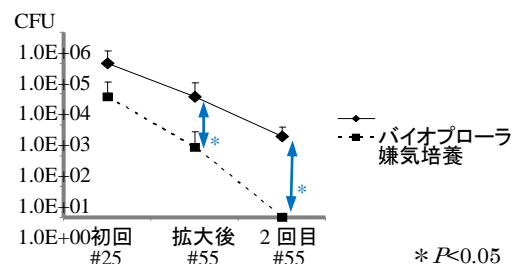
4. 研究成果

(1) 細菌量の定量

①バイオプローラ™と嫌気培養の比較

患者7名の8症例で、バイオプローラ™と嫌気培養による定量結果を比較した。試料採取時期は、初回の治療前 (採取に使用したファイル: #25K) および拡大洗浄後 (同#55K)、そして水酸化カルシウムを1週間貼薬後の2回目来院時 (同#55K) の3時点とした。症例の概要と定量結果を以下に示す。

症例	1	2	3	4	5	6	7	8
年齢	23	23	71	79	62	46	30	55
性別	F	F	F	F	F	F	F	M
部位	21	12	13	43	12	22	45	45



治療前の感染根管象牙質からは、バイオプローラ™で $1.0 \pm 1.4 \times 10^4$ (CFU)、嫌気培養法で $1.6 \pm 2.0 \times 10^4$ (CFU) と、いずれの方法でも 10^4 (CFU) 以上の細菌が検出された。

また、化学的洗浄下での根管拡大、および水酸化カルシウムの貼薬により細菌量が大きく減少することが明らかになった。

②バイオプローラ™と細菌カウンタ™の比較
症例8の試料で両測定器の比較を行ったところ、下表の結果が得られた。

	治療前#25	拡大後#55	2回目#55
バイオプローラ	2.2×10^5	3.3×10^4	8.4×10^2
細菌カウンタ	2.4×10^5	$< 1.0 \times 10^5$	$< 1.0 \times 10^5$

①および②の結果から、バイオプローラ™および細菌カウンタ™はともに小型でありチェアサイドで根管内の細菌を迅速定量するのに適した装置であることがわかった。しかし、細菌カウンタ™の測定可能範囲は $10^5 \sim 10^8$ であり、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 $10^2 \sim 10^5$ であるバイオプローラ™がより有用であると考えられた。

(2) 検出した細菌種

46 症例から下表に示すように多種多様な細菌が検出された。多くの場合、偏性嫌気性菌を主体とする混合感染であった。培養法による検出感度が低いため、薬液洗浄下で拡大形成後の根管や、水酸化カルシウム貼薬後の根管から採取した試料から同定までできた症例は少なくなった。

<i>Acidaminococcus</i>	<i>intestinalis</i>	<i>Mogibacterium</i>	<i>timidum</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>israelii</i>	<i>Olsenella</i>	<i>profusa</i>
	<i>naeslundii</i>		<i>uli</i>
	<i>orissensis</i>	<i>Parascardovia</i>	<i>denticolens</i>
	<i>radicidentis</i>	<i>Parvimonas</i>	<i>micra</i>
	<i>radiniae</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>stomatidis</i>
<i>Anaeroglobus</i>	<i>geminatus</i>	<i>Prevotella</i>	<i>nigrescens</i>
<i>Atopobium</i>	<i>parvulum</i>		<i>oralis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>acidifaciens</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>dentium</i>		<i>acidipropionici</i>
<i>Brevibacillus</i>	<i>brevis</i>		<i>acnes</i>
	<i>parabrevis</i>		<i>propionicum</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>stutzeri</i>
<i>Dialister</i>	<i>invisus</i>	<i>Pseudoramibacter</i>	<i>alactolyticus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	<i>Shuttleworthia</i>	<i>satelles</i>
	<i>faecium</i>	<i>Slackia</i>	<i>exigua</i>
	<i>gallinarum</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
<i>Eubacterium</i>	<i>infirimum</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>
<i>Filifactor</i>	<i>alocis</i>		<i>australis</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i>		<i>constellatus</i>
<i>Gemella</i>	<i>morbillorum</i>		<i>gordonii</i>
	<i>sanguinis</i>		<i>intermedius</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>variticola</i>		<i>mutans</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>antri</i>		<i>oralis</i>
	<i>casei</i>		<i>pseudopneumoniae</i>
	<i>crispatus</i>		<i>sanguinis</i>
	<i>fermentum</i>		<i>sobrinus</i>
	<i>gasseri</i>	<i>Veillonella</i>	<i>dentocariosa</i>
	<i>johnsonii</i>		<i>parvula</i>
	<i>plantarum</i>	<i>Weissella</i>	<i>confusa</i>
	<i>rhannonis</i>		
	<i>salivarius</i>		
	<i>vaginalis</i>		

治療前の試料で得られた結果より、根管治療歴の有無、根管と口腔との交通の有無（閉鎖性か開放性か）、打診痛や根尖部圧痛などの急性症状の有無により、検出される細菌の種類と量、また菌種数に大きな差が認められ、こうした条件が異なると、同一個人の症例であっても、全く異なる細菌叢であることが判明した。

根管治療歴のない primary infection 例では、根管充填後の経過不良例（secondary infection）に比し、検出される細菌種、細菌量ともに多い傾向が認められた。

全体を通じ、*Olsenella* 属、および *Propionibacterium* 属が検出される頻度が高かった。このうち、*Olsenella* 属は治療前、すなわち根管にアクセスした直後の試料から検出されることが多く、薬液洗浄下で機械的拡大を終えた根管や、さらに水酸化カルシウムを1週間貼薬した根管から検出されることは1例を除きなかった。このことから、*Olsenella* 属は感染根管細菌叢の恒常的な構成菌であるが、標準治療で制御しやすい菌種と思われる。一方、*Propionibacterium* 属は治療前よりむしろ拡大後や貼薬後に検出されることが多かった。治療前には細菌叢中の優勢菌種ではなかったのが、根管への介入治療でもたらされた根管内環境の激変に耐え、他菌種が排除された中で優位を占める例のあることが窺がえた。

また、打診痛や根尖部圧痛などの臨床症状を伴う根管は、無症状の歯に比べ細菌量が多い傾向にあり、*Mogibacterium timidum* や *Parvimonas micra* を検出することが多かった。この2つの菌種が根尖部症状と関連している可能性があり、今後さらに症例を増やして検索していく必要が認められた。

本研究により、感染根管内の恒常的な構成菌種、治療に抵抗性を示すと思われる菌種、根尖部の急性症状に関与すると思われる菌種などが見つかった。こうした菌の感染が予想される症例に対しては、治療プロトコールとして特異的抗菌剤の利用を組み込むと、過度の根管拡大による患歯の脆弱化や非特異的抗菌剤の長期使用による根尖組織傷害を回避できる可能性がある。

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)

- 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* **75**: in press, 2013. 査読有。

- ② Yamaki K, Sato T, Ishida N, Shoji M, Sato E, Abiko Y, Hashimoto K, Takeuchi Y, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N: Rapid quantification of bacteria in infected root canals using fluorescence reagents and a membrane filter: A pilot study on its clinical application to the evaluation of the outcomes of endodontic treatment. *Int J Dent* 2012. 査読有. DOI:10.1155/2012/172935
- ③ Takeuchi Y, Nakajo K, Sato T, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Quantification and identification of bacteria in acrylic resin denture bases and dento-maxillary obturator-prostheses. *Am J Dent* 25: 171-175, 2012. 査読有.
- ④ Komori R, Sato T, Takano-Yamamoto T, Takahashi N: Microbial composition of dental plaque microflora on first molars with orthodontic bands. *J Oral Biosci* 54: 107-112, 2012. 査読有. DOI: 10.1016/j.2012.01.009
- ⑤ Ma S, Imazato S, Chen J-H, Mayanagi G, Takahashi N, Ishimoto T, Nakano T: Effects of a coating resin containing S-PRG filler to prevent demineralization of root surfaces. *Dent Mater J* 31: 909-915, 2012. 査読有. DOI: 10.4012/dmj.2012-061
- ⑥ Takahashi N, Washio J, Mayanagi G: Metabolomic approach to oral biofilm characterization -A future direction of biofilm research. *J Oral Biosci* 54: 138-143, 2012. 査読有. DOI: 10.1016/j.job.2012.02.005
- ⑦ Ito Y, Sato T, Yamaki K, Mayanagi G, Hashimoto K, Shimauchi H, Takahashi N: Microflora profiling of infected root canal before and after treatment using culture-independent methods. *J Microbiol* 50: 58-62, 2012. 査読有. DOI:10.1007/s12275-012-0459-4
- ⑧ Yamaki K, Sato T, Ishida N, Hashimoto K, Takeuchi Y, Shoji M, Sato E, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N: Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals. *Int J Dent* 2012. 査読有. DOI:10.1155/2012/609689
- ⑨ 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. *Am J Dent* 24: 295-299, 2011. 査読有.
- ⑩ 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: 66-70, 2011. 査読有. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00285.x.
- ⑪ 河村好章, 佐藤拓一: 口腔内細菌叢のコントロール. *ファルマシア* 46: 929-933, 2010. 査読無.
- ⑫ 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: 389-395, 2010. 査読有. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2009.01250.x
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 庄司 恵、佐藤愛美加、石田直子、八巻恵子、佐藤拓一、高橋信博: 蛍光フィルターを利用した、感染根管細菌の迅速定量検出法. 第 22 回日本歯科医学会総会、2012 年 11 月 11 日、大阪.
- ② 佐藤拓一、河村好章、八巻恵子、高橋信博: 口腔バイオフィルムの分子生物学的プロファイリングメタゲノム解析. 第 22 回日本歯科医学会総会、2012 年 11 月 10 日、大阪.
- ③ 松山順子、佐藤拓一、Angela Quispe-Salcedo、石田直子、高橋信博、大島勇人: マウス口腔内プラーク常在菌叢の網羅的解析. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会、2012 年 09 月 16 日、郡山.
- ④ 佐藤拓一、大島朋子、宮川博史、浜田信城: 口腔マイクロバイオーームおよびバイオフィルム研究: 研究の最先端と若手のチャレンジ. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム、2012 年 09 月 14 日、郡山.
- ⑤ 佐藤拓一、河村好章、八巻恵子、島内英俊、高橋信博: 感染根管細菌叢の pyrosequencing 法によるメタゲノム解析. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会、2011 年 10 月 1 日、岐阜市.
- ⑥ Yamaki K, Sato T, Hasegawa A, Abiko Y,

Hashimoto K, Takeuchi Y, Matsuyama J, Shimauchi H, Takahashi N: Change in infected root canal microflora during the course of root canal treatment. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science. 平成 23 年 3 月 8 日、仙台.

- ⑦ 佐藤拓一：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、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. 第 88 回国際歯科研究学会 (IADR)、2010 年 7 月 17 日、Barcelona, Spain.

[図書] (計 2 件)

- ① 佐藤拓一 (翻訳) 口腔内微生物叢と歯面のバイオフィルム In: デンタルカリエス—その病態とクリニカルマネージメント、第 2 版、医歯薬出版、2013 年印刷中
- ② Yamaki K: Change in infected root canal microflora during the course of root canal therapy. In: Interface Oral Health Science 2011: 221-222, Springer, 2012.

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

(3) 研究分担者

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

(4) 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