

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592791

研究課題名(和文)メタゲノム解析に基づく根管内細菌叢菌種の全貌解明と根尖性歯周炎の臨床診断への応用

研究課題名(英文)Profiling of Microbiota in Infected Root Canals Utilizing Metagenomic and Bioplorer Analyses: Their Clinical Application to the Evaluation of the Outcomes of Endodontic Treatment

研究代表者

佐藤 拓一 (Sato, Takuichi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：10303132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：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から歯内治療などの歯科臨床への応用に関して有望と考えられた。また、バイオプローブを利用した、新規な細菌定量検出法によって、感染根管内の細菌を迅速に定量できること、ならびに治療経過に伴う細菌量の変動をモニターできることが判明した。この細菌定量検出法は、その迅速性からもチェアーサイドにおける歯内疾患などの治療効果の評価・判定に広く適用可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The bacterial examination has been performed during the course of the root canal treatment. In this study, metagenomic and Bioplorer (using fluorescence reagents and a membrane filter) analyses were applied to the profiling of microbiota in infected root canals, in order to evaluate the outcomes of the treatment. As a result, detailed components of the microbiota and rapid quantification of bacteria in infected root canals were found to be successfully performed utilizing these two methods.

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：歯学 口腔細菌 バイオフィルム メタゲノム 根尖性歯周炎

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。既に本研究者らは、従来法であるシーケンス法による検索を開始しており、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が見出していた。

2. 研究の目的

本研究は、メタゲノム解析法の導入により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とともに、管内細菌叢の量的・質的推移をチェアサイドで迅速に検査する新しい細菌検査法の開発を試みた。1)根尖性歯周炎の病態に関わる細菌叢(細菌群)の変遷、すなわち、治療の経過の追跡調査へのメタゲノム解析法導入の可能性の探索。これに並行して、2)微生物迅速検査装置バイオプローラを導入し、管内細菌叢の量的推移をチェアサイドで迅速に検査する新しい細菌検査法の開発を試みた。

3. 研究の方法

1)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3名(59~71歳)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15号および45号のK-file(GC社製)を用いて採取した。16S rRNA 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%以上の相同性)によって菌種の同定を行った。

2)バイオプローラ解析

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、新規な細菌迅速検出法の、

特にチェアサイドへの応用の可能性について検討した。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た後、感染根管象牙質をKファイル(GC社)によって採取した。ファイルの刃部を滅菌ニッパーで切断、滅菌チューブに投入し、滅菌生理食塩水を加え、試料とした。蛍光試薬(DAPI および PI)、ポリカーボネートフィルターならびにバイオプローラ(光洋産業)によって、試料中の細菌量を求めた。比較のために、細菌カウンタ(Panasonic社)嫌気および好気培養によって細菌量を求めた。

4. 研究成果

1)メタゲノム解析

各試料から平均 $46,510 \pm 7,090$ (37,207 ~ 55,117) reads のシーケンスが得られ、genus レベルで、平均 75 ± 5 (70 ~ 82) 菌属、species レベルで平均 343 ± 74 (270 ~ 461) 菌種が同定された。15号による試料では、*Actinomyces* (29.6%), *Olsenella* (12.6%), *Streptococcus* (11.5%), *Pyramidobacter* (8.8%), *Prevotella* (6.3%) が優勢菌属であった。また、45号での優勢菌属は、*Streptococcus* (36.6%), *Actinomyces* (10.3%), *Prevotella* (9.6%), *Eubacterium* (5.0%) 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から歯内治療などの歯科臨床に応用可能と考えられた。現在、より広範な症例に対してメタゲノム解析を施し、解析を続行中である。

2)バイオプローラ解析

細菌カウンタ、培養法、ならびにバイオプローラ解析の、何れの方法でも、初回治療時の感染根管象牙質から、 10^4 (CFU) 以上の細菌が検出された。また根管治療の経過に伴って細菌量が大きく減少することが明らかとなった。本成果により、バイオプローラを利用した、新規な細菌定量検出法によって、感染根管内の細菌を迅速に定量できること、ならびに治療経過に伴う細菌量の変動をモニターできることが判明した。この細菌定量検出法は、その迅速性からもチェアサイドにおける歯内治療(さらには齶蝕や歯周治療な

ど)の治療効果の評価・判定に広く適用可能と考えられた。

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 9 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**: in press, 2014. 査読有, DOI: 10.1111/1348-0421.12157
- 2) 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* **75**: in press, 2014. 査読有, <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/ahc>
- 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(3)**: 171-175, 2012. 査読有, <http://www.amjdent.com/Archive/2012/June%202012%20Issue.html>
- 4) Komori R, Sato T, Takano-Yamamoto T, Takahashi N: Microbial composition of dental plaque microflora on first molars with orthodontic bands and brackets, and the acidogenic potential of these bacteria. *J Oral Biosci* **54(2)**: 107-112, 2012. 査読有, DOI: 10.1016/j.job.2012.01.009
- 5) Sato T, Yamaki K, 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 filter: A pilot study on its clinical application to the evaluation of the

outcomes of endodontic treatment. *Int J Dent* **Volume 2012**, Article ID 172935, 4 pages, 2012. 査読有, DOI: 10.1155/2012/172935

- 6) Sato T, Yamaki K, 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* **Volume 2012**, Article ID 609689, 5 pages, 2012. 査読有, DOI: 10.1155/2012/609689
- 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(1)**: 58-62, 2012. 査読有, DOI: 10.1007/s12275-012-0459-4
- 8) 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(5)**: 295-299, 2011. 査読有, <http://www.amjdent.com/Archive/2011/October%202011%20Issue.html>
- 9) 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. 査読有, DOI: 10.1111/j.1348-0421.2010.00285.x

[学会発表](計 22 件)

- 1) Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N: A rapid and simple detection of plaque bacteria using a novel molecular method, PCR-PAS, and its clinical application. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 20-21 January, 2014, Sendai
- 2) Ishida N, Sato T, Hoshikawa Y, Tanda N,

- Kondo T, Sasaki K, Takahashi N: Microbiota profiling of bronchial fluids of elderly patients. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 20-21 January, 2014, Sendai
- 3) Matsuyama J, Sato T, Quispe-Salcedo A, Mayanagi G, Takahashi N, Ohshima H: Comprehensive analysis of indigenous plaque microbiota of pre- and post-weanling, and grown-up mice. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 20-21 January, 2014, Sendai
- 4) Kawamura Y, Sato T, Tomida J, Morita Y, Naka T, Fujiwara N, Tanaka K, Yoshida Y, Yoshimura F, Takahashi N: *Porphyromonas* new species candidate isolated from intraoperative bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 20-21 January, 2014, Sendai
- 5) Sakashita R, Nishitani M, Ono H, Sato T, Hamada M: Relationship between the consistency of food substances and the incidence of aspiration pneumonia of the elderly. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 20-21 January, 2014, Sendai
- 6) Tanda N, Hoshikawa Y, Ishida N, Sato T, Takahashi N, Hosokawa R, Koseki T: Oral malodorous gasses of a perioperative patient with postoperative pneumonia. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 20-21 January, 2014, Sendai
- 7) Sato T, Kawamura Y, Mayanagi G, Washio J, Takahashi N: Oral microbiota in crevices around dental implants: profiling of the oral biofilm. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium: The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 20 January, 2014, Sendai
- 8) 佐藤拓一, 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, 愛知県蒲郡市
- 9) 松山順子, 佐藤拓一, Angela Quispe-Salcedo, 高橋信博, 大島勇人: 離乳前後および成熟マウスの口腔内プラーク常在菌叢の網羅的解析, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 22 日, 岡山
- 10) 大島朋子、浜田信城、宮川博史、佐藤拓一 (企画・座長): The Front Line of Research on Oral Microbiota: The challenge reports by young investigators. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム (SS-8) 2013 年 9 月 20 日, 岡山
- 11) Ishida N, Sato T, Hoshikawa Y, Tanda N, Kondo T, Takahashi N: Microbiota profiling of bronchial fluids of elderly patients. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム, 2013 年 9 月 20 日, 岡山
- 12) Tanda N, Ishida N, Hoshikawa Y, Sato T, Takahashi N, Hosokawa R, Koseki T: Hydrogen sulfide, methyl mercaptan, and acetaldehyde in oral health care for perioperative patients with pulmonary carcinoma. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム, 2013 年 9 月 20 日, 岡山
- 13) 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): JADR Mini-Symposium, 21 August, 2013, Bangkok, Thailand
- 14) **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, 26 July, 2013, Beijing, China
- 15) Tanda N, Ishida N, Hoshikawa Y, **Sato T**, Takahashi N, Hosokawa R, Koseki T: Analysis of hydrogen sulfide, methyl mercaptan, and acetaldehyde in oral health care for perioperative patients of lung cancer. MASCC (The Multinational Association of Supportive Care in Cancer), 27-29 June, 2013, Berlin, Germany
- 16) 庄司 恵, 佐藤愛美加, **佐藤拓一**, 石田直子, **八巻恵子**, 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
- 17) **佐藤拓一**, 河村好章, **八巻恵子**, 島内英俊, 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
- 18) **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9月16日, 郡山
- 19) **佐藤拓一**, 大島朋子, 宮川博史, 浜田信城(企画・座長): The oral microbiome and biofilm research: new concepts and new approaches by presentation by young researchers. 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9月14日, 郡山
- 20) 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: *Porphyromonas gingivalis* の定量解析と *fimA* 遺伝子型タイピング, 第53回歯科基礎医学会学術大会, 2011年10月2日, 岐阜
- 21) **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
- 22) Hoshikawa Y, Tanda N, Endo H, **Sato T**, Hasegawa A, Kondo T: Intensive perioperative oral care prevents postoperative pneumonia after lung resection. American Thoracic Society 2011 International Conference, 17 May, 2011, Denver, Colorado, USA
- [図書](計 10 件)
- 1) **佐藤拓一**(翻訳): 第10章 口腔内微生物叢と歯面のバイオフィルム (The oral microflora and biofilms on teeth), pp. 146-170, In: 「デンタルカリエス その病態と臨床マネジメント 原著第2版 (Dental Caries -The Disease and its Clinical Management)」医歯薬出版, 東京, 2013年10月10日発行
- 2) **佐藤拓一**(翻訳): 第31章 齲蝕に関する臨床的方針のばらつき (Variation in clinical decision making related to caries), pp. 508-527, In: 「デンタルカリエス その病態と臨床マネジメント 原著第2版 (Dental Caries -The Disease and its Clinical Management)」医歯薬出版, 東京, 2013年10月10日発行
- 3) **佐藤拓一**, 河村好章, **八巻恵子**, 島内英俊, 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, 医歯薬出版, 歯界展望特別号, p. 190, 2013年
- 4) 庄司 恵, 佐藤愛美加, **佐藤拓一**, 石田直子, **八巻恵子**, 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, 医歯薬出版, 歯界展望特別号, p. 294, 2013年
- 5) 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*. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 176-177, 2012. February

- 6) 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. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 181-182, 2012. February
- 7) 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. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 186-188, 2012. February
- 8) Takeuchi Y, Nakajo K, **Sato T**, Sakuma Y, Koyama S, Sasaki K, Takahashi N: Quantification and identification of bacteria in the maxillary obturator-prostheses. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 209-211, 2012. February
- 9) 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 therapy. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 221-222, 2012. February
- 10) 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. In: K. Sasaki, O. Suzuki, N. Takahashi (eds.) *Interface Oral Health Science 2011*, Springer, New York, pp. 317-319, 2012. February

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

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

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

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

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