

図4 臨床研修と臨床実習の差異に関する主観的評価点  
平均と標準偏差を示す。\* $p < 0.0083$

・病棟研修など歯科総合診療部を離れなければならない期間には担当患者の診療ができないので診療が滞る。

・他大学出身者にとっては4月中旬からいきなり診療を行うのは難易度が高い。

## 考 察

今回調査対象とした研修歯科医の平均研修経験評点は28.0点であり、満点の60%に相当する30点に近かったことから、本院単独型歯科臨床研修プログラムにおいて設定した目標症例数は全体としてはおおむね達成されていたと考えられた。一方、平均評点の標準偏差が7.0点で30点以上の研修経験評点を達成していた研修歯科医が全体の37.4%という結果は、症例の配分に研修歯科医間でややばらつきがあることを示しており、このことは研修歯科医の意見とも一致していた。経験症例数が多い研修歯科医は臨床実習での経験や担当患者数が多くなる傾向が認められた。各年度の研修歯科医が担当する総患者数にはほとんど変動がなく、その一方平成21、22年度における研修歯科医の担当患者数は平成20、23年度に比較して有意に少なかったことから、担当患者数には研修歯科医の人数が大きく影響することが明らかとなった。しかし、担当患者数は臨床実習経験の多寡とは相関が認められなかったため、いずれの研修歯科医にも主治医として積極的に患者を担当してもらうことができるシステムが機能しており、本院が目的とする臨床研修を運営できていることが示唆された。これらのことより、目標症例数を達成するためには、①研修歯科医間でできるだけ症例が偏らないように配慮する、②研修歯科医が担当する患者数を増加させる、③症例確保が難しい項目については研修目標達成のための目標症例数自体を見直すか、診療実践以外の補充方略を取り入れる、④臨床実習経験を増やす、などの改善が必要と思われた。これらの改善はシステムの変更に加えて、指導歯科医が的確に現状を把握し対応することによって達成されるであろう。

そこで平成25年度より、研修歯科医間での担当症例の偏りをなくすために、研修期間の2分の1、4分の3が終了した時点で経験症例数調査を行い、新患担当時に症例の偏りを改善する対策を行うことにした。今後も推移に注意しながら調査を継続する予定である。

30点以上の研修経験評点を達成していた研修歯科医の平均担当患者数は22.2名で、30点未満の研修歯科医の平均数18.3名に比較して有意に多かった(図3E)。このことより、本プログラムにおいて設定している目標症例数を達成するためには、研修歯科医1人当たり22名以上の患者を担当することが必要であることが示された。また、本調査の結果から、研修歯科医数が本院Aプログラム採用定員の32名(平成23年度までは35名であった)にきわめて近い年には設定した目標症例数に達

することが難しいため、採用される研修歯科医の人数に合わせて研修協力患者を確保する必要があることが明らかとなった。もし、それが難しい状況が生じるようであれば補完方略を講じることも検討すべきであると思われる。

項目別の経験症例数に関しては、平成 22 年度以外はおおむねすべての項目で目標症例数が達成されており、設定数は妥当と考えられた。しかしながら、総義歯は目標 3 症例に対して 4 年間の平均で 0.7 症例と著しく達成率が低く、症例の確保が難しい現状が明らかになったことから目標症例数の再設定を検討する必要性が示唆された。一方、初診医療面接とカルテ記載については 10 症例という目標数を設定していたが、実際には初診医療面接は年間 50 症例以上、カルテ記載は 300 症例以上行っており、これについても目標症例数を再考すべきと思われた。

研修歯科医は臨床実習と臨床研修との相違について、求められる知識や技術、実習や研修のシステムに差があることは必然と捉えており、本院 A プログラムの運営は意図したように行われていることが示唆された。なかでも、平成 22 年度の研修歯科医は他の年度に比較して知識、技術面で実習と研修のギャップが大きくないと感じていたことは興味深い。平成 22 年度は他年度と同様の実習経験評点であったにもかかわらず、担当症例数と平均研修経験評点は 4 年間のなかで最も低かった。この結果は、厚生労働省が平成 22 年度と 23 年度に実施した全国の研修歯科医を対象としたアンケート調査<sup>6)</sup>において、国立大学単独型プログラムの研修修了者のうち 15~20%が研修プログラムの不満足な点として「楽すぎる」ことを挙げており、「厳しすぎる」の 3~5%を大きく上回っていたこととも関係しているように思われた。また、同調査においては 80%以上の回答者が研修到達目標達成のために必要な要素として症例数を挙げていた。このような意見がみられることから、研修歯科医の採用人数にかかわらず、常に適切な指導体制やリスクマネジメント体制を備えたうえで研修初期から研修症例確保に積極的に取り組み、研修歯科医の研修意欲を維持することが重要と考えられた。

臨床実習経験評点と研修経験評点はごくゆるやかな相関を示した。このことは、臨床実習経験が少ない場合においても、臨床研修の内容次第である程度補うことができる可能性を示唆していると思われた。しかしながら、本院 A プログラムにおいては、研修開始当初の 4 月から診療を行うのは難しいとのコメントが例年寄せられることから、臨床研修の形態によっては臨床実習経験の多さが有利になる場合もあると考えられた。

複雑、超高齢化した現代の社会背景を受け、臨床実習

において学生に多くの歯科治療を実践させることは難しくなっているように思われる<sup>3,4)</sup>が、一方では文部科学省によって平成 20 年 7 月に起ち上げられ、継続的に作業が進んでいる「歯学教育の改善・充実に関する調査研究協力者会議」<sup>3,4)</sup>や平成 22 年度に全面的に改訂された歯学教育モデル・コア・カリキュラム<sup>5)</sup>によって提言されているように、卒業直後の歯科医師の臨床技術に関する能力を改善させようとする動きがある。現在、各大学において診療参加型臨床実習の体制見直しが行われているところであるが、今回の調査において臨床実習での経験が不足していると思われた処置、すなわち抜髄、支台築造、義歯床裏装はいずれも歯学教育モデル・コア・カリキュラムの臨床実習水準 1 に含まれており、学生に対して指導者の指導・監督の下に実施が許される歯科医療行為とされているものであった。昨今、歯科医師臨床研修が歯学部 7 年制として形骸化しているとの指摘もみられるようになってきているため、平成 28 年度からの歯科医師臨床研修制度の見直しに向けて厚生労働省のワーキンググループにおいても対策が議論されているものと思われる<sup>7,8)</sup>が、臨床実習-研修連携手帳作成の試みに代表されるように、各大学において臨床実習と臨床研修の有機的な結びつきを真剣に検討する時期にきているのかもしれない。今回の結果はごくわずかなサンプル調査にすぎないが、歯科医師を養成する機関においては現状を真摯に受け止め、さらなる診療参加型臨床実習の充実や歯科医師臨床研修の基本理念<sup>9)</sup>に則った研修プログラムの提供を図るべく継続的に努力することが求められるように思われた。

本調査は臨床研修と臨床実習の量的評価を試みたものであり、質的評価は行っていない。研修歯科医の技術レベルを確実に評価し、研修修了時の歯科医師としての診療能力を担保することは喫緊の課題であるため、本院 A プログラムでは DEBUT 評価、指導歯科医による観察記録評価に加え、ポートフォリオ評価を導入して研修修了判定を行うことを検討している。現状では研修評価に経験症例数を加えることについては賛否両論がある<sup>7,8)</sup>が、われわれは今回の調査から、本プログラムの運営状況を客観的に把握し、研修目標達成のための具体的な改善策を検討することができた。研修歯科医にとっても自分に不足している研修内容を明確に自覚するための情報を得る良い機会になったと思われる。今回の結果より、本プログラムにおいてプログラム運営および研修歯科医自身へのフィードバック、すなわち形成的評価の材料として用いることを目的として目標症例数の設定を行うことには妥当性があると考えられた。

## 結 論

本院 A プログラムにおける研修歯科医 1 人当たりの平均経験症例数はおおむね設定された目標症例数に達しているが、研修歯科医によってばらつきが認められた。研修歯科医の経験症例数は担当患者数および臨床実習における症例の経験に応じて増加する傾向があり、担当患者数は各年の研修歯科医数の影響を受けていた。本プログラムにおいては研修歯科医 1 人当たりの担当患者数が 22 名以上となるよう研修協力患者の確保に努めること、研修歯科医間で担当症例の種類の変りを減らすことが、短期的に実行可能で有用な方策であることが明らかとなった。研修プログラムならびにその運営状況の評価のために目標症例数の設定をすることには一定の意義があると考えられた。

本調査報告の内容については第 31 回日本歯科医学教育学会総会および学術大会（平成 24 年 7 月 20 日、岡山）において発表した。

## 文 献

- 1) 厚生労働省. 歯科医師臨床研修の到達目標. <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/shikarinsyo/gaiyou/kanren/sekou/toutatsu.html> (最終アクセス日 2014.5.26)
- 2) 新潟大学医歯学総合病院. 歯科医師臨床研修. 卒後臨床研修. 研修プログラム. <http://www.niigata-u.ac.jp/kenshu/pdf/26shikasotugoprogram.pdf> (最終アクセス日 2014.5.26)
- 3) 文部科学省. 歯学教育の改善・充実に関する調査研究協力者会議第 1 次報告～確かな臨床能力を備えた歯科医師養成方策～. 平成 21 年 1 月 30 日. [http://www.mext.go.jp/b\\_menu/shingi/chousa/koutou/035/toushin/\\_icsFiles/afieldfile/2009/07/27/1282441.pdf](http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/chousa/koutou/035/toushin/_icsFiles/afieldfile/2009/07/27/1282441.pdf) (最終アクセス日 2014.5.26)
- 4) 文部科学省. 歯学教育の改善・充実に関する調査研究協力者会議第 1 次報告（平成 21 年 1 月）を踏まえたフォローアップ調査まとめ. [http://www.mext.go.jp/component/b\\_menu/shingi/toushin/\\_icsFiles/afieldfile/2012/12/18/1328987\\_001.pdf](http://www.mext.go.jp/component/b_menu/shingi/toushin/_icsFiles/afieldfile/2012/12/18/1328987_001.pdf) (最終アクセス日 2014.5.26)
- 5) 文部科学省. 医学教育モデル・コア・カリキュラム（平成 22 年度改訂版）, 歯学教育モデル・コア・カリキュラム（平成 22 年度改訂版）の公表について. [http://www.mext.go.jp/component/b\\_menu/shingi/toushin/\\_icsFiles/afieldfile/2011/06/03/1304433\\_3.pdf](http://www.mext.go.jp/component/b_menu/shingi/toushin/_icsFiles/afieldfile/2011/06/03/1304433_3.pdf) (最終アクセス日 2014.5.26)
- 6) 厚生労働省. 歯科専門職の資質向上検討会 歯科医師ワーキンググループ. 歯科医師臨床研修修了者アンケート集計結果. <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000036hmo-att/2r98520000036hr0.pdf> (最終アクセス日 2014.5.26)
- 7) 厚生労働省. 歯科専門職の資質向上検討会 歯科医師ワーキンググループ. 歯科医師臨床研修制度の見直しに係る論点とご意見. <http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10801000-Iseikyoku-Soumuka/0000031455.pdf> (最終アクセス日 2014.5.26)
- 8) 厚生労働省. 歯科専門職の資質向上検討会 歯科医師ワーキンググループ報告書（案）. <http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10801000-Iseikyoku-Soumuka/0000039550.pdf> (最終アクセス日 2014.5.26)
- 9) 厚生労働省. 歯科医師臨床研修制度の概要. <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/shikarinsyo/gaiyou/> (最終アクセス日 2014.5.26)

著者への連絡先：中島貴子

〒951-8514 新潟市中央区学校町通二番町 5274

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯学教育研究開発学分野

TEL：025-227-0988, FAX：025-227-0991

E-mail：takako@dent.niigata-u.ac.jp

## A Survey of the Number of Cases Experienced by Trainee Dentists in Post-graduate Dental Clinical Training in Niigata University Medical and Dental Hospital

NAKAJIMA Takako<sup>1)</sup>, ISHIZAKI Hiroko<sup>2)</sup>, TAGUCHI Yuya<sup>3)</sup>, SHIMADA Yasuko<sup>2)</sup>,  
ITO Harue<sup>2)</sup>, OKUMURA Nobuaki<sup>2)</sup>, KOBAYASHI Tetsuo<sup>2)</sup>,  
UOSHIMA Katsumi<sup>3)</sup> and FUJII Noritaka<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Dental Educational Research Development, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

<sup>2)</sup> General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital

<sup>3)</sup> Division of Bio-Prosthodontics, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

**Abstract** The aim of the present study was to clarify the number of cases experienced by trainee dentists and the factors affecting the number in the post-graduate dental clinical training in Niigata University Medical and Dental Hospital, and to consider the validity of setting a target number of cases to be experienced. A questionnaire survey on the number of cases that trainee dentists had experienced by themselves during the period of under-graduate and post-graduate clinical training was performed on 115 trainee dentists belonging to the independent-type program of post-graduate dental clinical training in Niigata University Medical and Dental Hospital during 2008-2011.

The average number of cases experienced by each trainee dentist was close to the target number of cases of the program, although variations were observed among the trainee dentists. There was a tendency that trainee dentists who were in charge of more patients in post-graduate clinical training and experienced more cases in under-graduate clinical training, experienced more cases in post-graduate clinical training. The number of trainee dentists in each year affected the number of patients that each trainee dentist was in charge of.

This survey clarified the required number of patients for each trainee dentist to accomplish the target number of cases, and a biased distribution of the number of patients among the trainee dentists, enabling a strategy to be taken to improve the program and its management. These results suggest that there is some value to setting a target number of cases to be experienced in order to evaluate the post-graduate dental clinical training program and its management condition.

**Key words** independent-type post-graduate dental clinical training, trainee dentists, under-graduate clinical training, experienced case number, patient number in charge

# 体系化された Evidence-Based Dentistry・臨床疫学教育の試み

角舘直樹<sup>1)</sup>、花谷智哉<sup>1)</sup>、唐木純一<sup>1)</sup>、福泉隆喜<sup>1)・2)</sup>、木尾哲朗<sup>3)</sup>、西原達次<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>九州歯科大学 北九州地区大学連携教育研究センター

<sup>2)</sup>九州歯科大学歯学部 総合教育学分野社会歯科学研究室

<sup>3)</sup>九州歯科大学歯学部 総合診療学分野

<sup>4)</sup>九州歯科大学歯学部 感染分子生物学分野

抄録 エビデンスの「つかい手」と「つくり手」の両方を担うハイブリッド型歯科医師を育成するために、九州歯科大学では EBD・臨床疫学教育プログラムの試みを開始した。まず、4年次学生を対象に全4回の「EBD 演習」を実施した。教育内容は1) 疑問の構造化、2) 研究デザイン、3) エビデンスの検索、4) 批判的吟味とした。また、大学院生、教員および学生を対象に、「臨床疫学・EBD セミナー」を実施している。本セミナーでは、参加者各自のリサーチクエストを解決するための臨床疫学研究プロトコル作成および論文化の支援を実施している。体系的な臨床疫学・EBD 教育を受けたハイブリッド型歯科医師が歯科医療の質の向上に貢献すると考えている。

キーワード 科学的根拠に基づく歯科診療 (Evidence-based dentistry)、臨床疫学、クリティカルシンキング、臨床的意思決定

## 緒言

1991年に臨床疫学を基盤とする Evidence-Based Medicine (EBM)<sup>1)</sup>という概念が構築され、歯科領域では1994年にエビデンスに基づく診療の重要性が提唱された<sup>2)</sup>。その後約20年が経過し、Evidence-Based Dentistry (EBD)の重要性については論を俟たない。これらの定義によれば、診療は臨床家の専門的スキルや経験、患者の価値観や嗜好および最良のエビデンスに基づいて最終的な意思決定が行われる必要がある。EBDを実践する際には、臨床疫学研究によるエビデンスが必要であるが、実際の診療現場では参考とするエビデンスは不足している。そこで筆者は「ハイブリッド型歯科医師」を理想的な歯科医師像として提唱している<sup>3)</sup>。ハイブリッド型歯科医師とは「研究マインドに基づいて日々の臨床に取り組む歯科医師」、すなわち日頃から EBD を実践し、必要に応じて自ら臨床疫学研究に携わり、エビデンスを現場から発信できる歯科医師と定義する。ハイブリッド型歯科医師の育成により、各々の診療現場における診療上の疑問に基づいた調査・研究が行われ、その研究結果を診療に直接フィードバックすることで歯科医療の質の向上が可能となる。

今回は、エビデンスの「つかい手」と「つくり手」の両方を担うハイブリッド型歯科医師を育成するために九州歯科大学で実施されている EBD・臨床疫学教育プログラムの試みについて報

告する。

## 対象および方法

EBD および臨床疫学教育として、九州歯科大学にて以下の講義および実習を実施した。

### 1. 学部学生に対する EBD 演習

九州歯科大学4年次学生を対象に EBD の基本的知識の習得を目的として、全4回(90分×4コマ)の EBD 演習を実施した。各回とも30分の講義と60分のグループワークから構成される。教育内容は1) 疑問の構造化、2) 研究デザイン、3) エビデンスの検索、4) 批判的吟味とした。グループワークを通じて、グループごとのクリニカルクエストに基づいて疑問を構造化し、研究デザインを立案した上で、先行研究となる文献を検索し、得られた論文を批判的に吟味した。本演習を通じて、EBDの5step<sup>4)</sup>のうち、「Step 1: 疑問の構造化; 診療上の疑問を回答可能な疑問に構造化する」、「Step 2: エビデンスの検索; 最良の利用可能なエビデンスの系統的な検索」、「Step 3: 批判的吟味; 検索したエビデンスの妥当性、臨床的意義、および応用可能性の検証」までを学習してもらった。

### 2. 大学院生および教員に対する臨床疫学・EBD セミナー

九州歯科大学大学院生、教員および学生を対象

に、「臨床疫学・EBD セミナー」を毎週1回（各回60分間、年間30回程度）実施している。本セミナーでは、EBD ならびに臨床疫学の応用能力を養うために、OJT (On the Job Training) 方式で参加者各自の診療現場での実際の疑問の抽出から研究計画書作成・研究実施まで支援している。主たる教育内容は「疑問の構造化」、「文献検索」、「先行研究のまとめ」、「交絡・バイアスの検討」、「疫学研究デザイン」、「統計解析」、「尺度開発研究」、「システムティックレビュー・メタアナリシス・診療ガイドラインの評価」、「疫学研究における医療倫理」、「プロトコール・質問票作成実習」等から構成されており、講義、グループワークおよびグループ発表会を実施している。

## 結 果

4年次学生を対象とした「EBD 演習」終了後の調査結果から、「文献検索関連（例：思ったような研究を探す技術は非常に難しいように感じた。論文の探し方や、読む論文の選び方などは、今後に役立ちそうだと思った。）」、「論文関連（例：理論的にその論文が自分の求めているものなのか、役に立つものなのかを評価する方法が少し分かったので、これから役に立てたいと思う。）」、「英語関連（例：英語力が全然足りないと思った。普段は英語の論文を読む機会がないので、とても良い経験になった。）」、「授業関連（例：データや物事を批判的思考で見る事が大事と理解した。現場と研究とのつながりで現場が進化すると思う）」の4つの概念が抽出された。大学院生および教員を対象とした「臨床疫学・EBD セミナー」では、基礎的知識に関する講義・実習を終え、現在実践形式で7つの診療科において研究プロジェクト

が立ち上げられ、研究が開始されている。

## 考察およびまとめ

学部学生に対する EBD 演習の結果から、EBD の習得により批判的思考能力が高まる可能性が示唆された。臨床疫学・EBD セミナーでは、各診療科ごとに臨床疫学研究に習熟した人材を育成しており、本セミナーの継続により各診療科内での臨床研究の促進が期待される。今後は学部から大学院まで一貫して体系化された EBD・臨床疫学教育プログラムを構築し、さらにカリキュラムの汎用性を高め、全国の歯学部でも実施可能な内容に標準化していくことが必要と考えている。これらの教育方略により育ったハイブリッド型歯科医師が、個々に備えた高い問題解決能力によりそれぞれの現場から歯科医療の将来を切り拓いてくれると考えている。

## 文 献

- 1) Guyatt GH. Evidence-based medicine. ACP J. Club 1991 ; 114 : A-16.
- 2) Evidence-Based Medicine Working Group. Evidence-based health care: a new approach to teaching the practice of health care. J Dent Educ 1994 ; 58 : 648-53.
- 3) 角舘直樹. 現場から世界へエビデンスを発信—ハイブリッド型歯科医師の育成—. 日本歯科医学教育学会雑誌 2013 ; 29 : 181-184.
- 4) 角舘直樹. 米国における Evidence-Based Dentistry 教育の展開. 日本歯科医療管理学会雑誌 2013 ; 48 : 174-179.2

## 著者への連絡先

角舘 直樹

〒803-8580 北九州市小倉北区真鶴 2-6-1

九州歯科大学 北九州地区大学連携教育研究センター

TEL : 093-285-3114 FAX : 093-285-3118 E-mail : r13kakudate@fa.kyu-dent.ac.jp

---

# A systematic educational program for evidence-based dentistry and clinical epidemiology

Naoki Kakudate<sup>1)</sup>, Tomoya Hanatani<sup>1)</sup>, Junichi Karaki<sup>1)</sup>, Takaki Fukuizumi<sup>1,2)</sup>, Tetsuro Konoo<sup>3)</sup>, and Tatsuji Nishihara<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Educational Cooperation Center, Kyushu Dental University

<sup>2)</sup> Laboratory of Social Dentistry, Division of General Education, Kyushu Dental University,

<sup>3)</sup> Division of Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental University,

<sup>4)</sup> Division of Infections and Molecular Biology, Kyushu Dental University

**Abstract** We propose the “hybrid-type dentist”, a research-minded clinician who combines clinical epidemiology and clinical skills with evidence-based dentistry. At Kyushu Dental University, we have launched systematic lectures and seminars in clinical epidemiology and EBD to develop hybrid-type dentists. First, we provide lectures in epidemiology & EBD practice to 4th year dental students. Contents include: 1) asking focused questions, 2) designing research, 3) finding evidence, 4) critical appraisal, and 5) systematic review & practice guidelines. Second, we have started a weekly seminar in clinical epidemiology & EBD. Participants are faculty members, and undergraduate and graduate students. We assist them in extracting their own clinical questions in the completion of a research protocol. Systematically educated hybrid-type dentists will contribute to the development of dentistry and the future of the dental profession

**Key words** evidence-based dentistry, clinical epidemiology, critical thinking, hybrid-type dentist, clinical decision making

[目次へ戻る](#)

# One-leg standing time with eyes open: comparison between the mouth-opened and mouth-closed conditions

Mitsuyoshi Yoshida<sup>1</sup>, Yayoi Kanehisa<sup>2</sup>, Yoshie Ozaki<sup>3</sup>, Yasuyuki Iwasa<sup>4</sup>, Takaki Fukuizumi<sup>5</sup>, Takeshi Kikutani<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Dental Department, Hiroshima City Rehabilitation Hospital, Hiroshima, Japan, <sup>2</sup>Department of Oral Functional Management, School of Oral Health Sciences Kyushu Dental University, Kitakyushu, Japan, <sup>3</sup>Department of Dentistry, Saiseikai Yahata General Hospital, Kitakyushu, Japan, <sup>4</sup>Department of Dentistry, Haradoi Hospital, Fukuoka, Japan, <sup>5</sup>Laboratory of Social Dentistry, Kyushu Dental University, Kitakyushu, Japan, <sup>6</sup>Division of Clinical Oral Rehabilitation, The Nippon Dental University Graduate School of Life Dentistry, Tokyo, Japan

**Objective:** Many studies report a significant relationship between the one-leg standing time with the eyes open and the occlusal relationship. To determine the association between proprioception (the periodontal membrane vs muscle spindle) to the one-leg standing time, the authors compared the one-leg standing time with eyes open between mouth-opened and mouth-closed conditions.

**Methods:** The study participants were 107 healthy, elderly patients. The authors measured the one-leg standing time with eyes open between mouth-opened and mouth-closed conditions.

**Results:** The one-leg standing time was significantly shorter with the mouth opened ( $21.1 \pm 19.1$  seconds) than with the mouth closed ( $25.1 \pm 21.4$  seconds). Patients whose one-leg standing time was equal or shorter with the mouth opened than with the mouth closed were not different from the other patients with regard to age, handgrip strength, BMI, and the number of remaining teeth.

**Discussion:** The vertical mandibular position may affect body balance.

**Keywords:** Handgrip strength, One leg standing time with eyes open, Remaining teeth

## Introduction

In today's aging society, a variety of initiatives have been proposed to address a major focus in primary care: falls and fractures prevention. The World Health Organization (WHO) declared the 2000–2010 decade as the Bone and Joint Decade.<sup>1</sup> In response, Japan has taken active steps towards preventing primary nursing care and nursing care risks due to locomotive difficulty. This is fueled by new concepts of the locomotive syndrome. A method of assessing the risk of falling is the one-leg standing time with the eyes open.<sup>2</sup> Several reports suggest that this standing time is significantly related to the number of remaining teeth and the occlusal relationship.<sup>3–6</sup> However, the causal relationship between these factors is not yet fully understood, and it is

assumed that the connection lies between the proprioception of muscle spindles (e.g. the periodontal membrane or the masseter muscle).<sup>7</sup> Some researchers have examined the relationship between body posture and the mandibular position by using a stabilometer in young subjects, and they concluded that the foot center of pressure is not influenced by asymmetric malocclusion or by different dental positions.<sup>8–10</sup> This may indicate a need to focus on the effects of extreme mandibular positions in the elderly population to reveal this relationship.

If the proprioception of the periodontal membrane and muscle spindle affect the one-leg standing time with eyes open, a difference between one-leg standing times with the mouth opened and mouth closed would be expected. Therefore, to determine whether such a difference existed, the authors measured and compared the one-leg standing times with the eyes open and the mouth opened and mouth closed in community-dwelling elderly people.

Correspondence to: Mitsuyoshi Yoshida, Dental Department, Hiroshima City Rehabilitation Hospital, 1-39-1, Tomo-minami, Asaminami-ku, Hiroshima, 731-3168, Japan. E-mail: mitsu@hiroshima-u.ac.jp



**Table 1** Comparison between the sexes in age, grip strength, body mass index, number of remaining teeth, and normal one-leg standing time with eyes open (mouth closed)

Physical Indices	Sexes		P
	Male	Female	
Age (years)	75.9±5.1	75.4±5.1	0.650 <sup>NS</sup>
Hand grip strength (kg)	33.0±6.5	19.5±4.5	0.000*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.4±2.5	24.6±3.2	0.903 <sup>NS</sup>
Number of remaining teeth	22.4±8.0	19.0±9.6	0.932 <sup>NS</sup>
Normal one-leg standing time (seconds)	25.3±22.3	25.0±21.2	0.071 <sup>NS</sup>

Note: BMI=body mass index; NS=no significant difference.

\* $P < 0.05$ , based on the Mann-Whitney *U* test.

## Methods

Healthy elderly residents (32 men and 75 women) aged 65–89 years (average age, 75.6±5.1 years) from the Yahatahigashi Ward of Kitakyushu City, Japan were selected for the study. All participants came to the research area (i.e. a community center) voluntarily. Brief medical interviews were performed. Patients with bone and joint disease, neuromuscular diseases, or temporomandibular disorders were excluded as subjects. The study was approved by the Saiseikai Yahata General Hospital Ethics Committee and was conducted with assistance from the Saiseikai Yahata General Hospital in Kokura, Japan.

The authors measured physical indices such as height, weight, and grip strength in the dominant hand and the one-leg standing times with the eyes open. Body mass index (BMI) was calculated by weight/height<sup>2</sup>. For the one-leg standing time with eyes open, the authors measured the length of time with the mouth closed (i.e. ‘normal’) and with the mouth wide open—each for a maximum of 60 seconds. The authors randomized the order of measurements (i.e. open versus close) and waited a minimum of 1 minute between measurements. A dentist confirmed the number of remaining teeth through an intraoral examination: wisdom teeth were included in the measurement, but roots were excluded.

The statistical software PASWver.18 (IBM, Tokyo, Japan) was used for the analysis. These physical indices were compared by nonparametric analysis because one-leg standing times were counted up to 60 seconds. Spearman’s rank correlation coefficient was assessed between the normal one-leg standing times and the age, grip strength, BMI and number of

remaining teeth. Using the Wilcoxon signed-rank test, one-leg standing times with the mouth closed were compared to one-leg standing times with the mouth opened. Furthermore, subjects were divided into two subgroups: (1) patients whose one-leg standing times were equal or shorter with the mouth opened than with the mouth closed and (2) patients whose one-leg standing times were prolonged with the mouth opened. Physical indices of these subgroups were compared using the Mann-Whitney *U* test. The significance level was set at 0.05.

## Results

The mean number of remaining teeth was 20.1±9.2. Everyone who had lost molar teeth contacts on both sides was wearing removable dentures. There was no difference between the sexes for all physical indices examined, except for grip strength (Table 1). Therefore, all variables were compared between both sexes. A significant correlation was observed between normal one-leg standing time with eyes open and age, handgrip strength, BMI, and the number of remaining teeth (Table 2).

The average one-leg standing times with the mouth closed and with the mouth opened were 24.84±21.33 and 21.55±19.24 seconds, respectively. The time was significantly shorter with the mouth opened than with the mouth closed. The shortened group patients, whose standing time was equal or shortened with the mouth opened than with the mouth closed, consisted of 19 males and 46 females. The prolonged group patients, whose time with the mouth opened was prolonged, consisted of 13 males and 29 females. There were no significant differences between the two

**Table 2** Comparison between the normal one-leg standing time with eyes open (mouth closed) and the age, grip strength, BMI, and number of remaining teeth

		Age	Grip strength	Body mass index	Number of remaining teeth
Normal one-leg standing time	Correlation coefficient	-0.376	0.193	-0.194	0.316
	P	0.000*	0.047*	0.045*	0.001*

Note: \* $P < 0.05$ , based on Spearman’s rank correlation coefficient.

subgroups in age, handgrip strength, BMI, or the number of remaining teeth (Table 3).

## Discussion

The results of the current study confirmed previous findings that a significant correlation exists between the one-leg standing time with eyes open and the number of remaining teeth. Furthermore, the authors found that the one-leg standing time was significantly shorter with the mouth opened than with the mouth closed. It may be concluded that the vertical mandibular position affects the one-leg standing time.

Gangloff and Perrin<sup>11</sup> report that body swaying increases when conduction anesthesia is performed on the mandibular foramen in young, healthy subjects, and they also indicate that the center of gravity changes, depending on experimentally conferred mandibular positions.<sup>12</sup> Both studies support the possibility that the periodontal membrane functions as a proprioceptor that governs body balance.

On the other hand, Perinetti *et al.*<sup>13</sup> found no evidence of changes to the center of gravity in patients with malocclusion, and concluded that postural control is not different in the closed-mouth state, which includes mandibular rest and the intercuspitation positions.<sup>14</sup>

Based on the authors' hypothesis that muscle spindles are more important than the periodontal membrane for postural control, the one-leg standing times with the mouth opened and with the mouth closed were compared. Bracco *et al.*<sup>15</sup> report that the myocentric position determined by muscle contractions lead to smaller differences in the center of gravity, compared to the rest position of the mandibular joints and centric occlusion. In addition, Sforza *et al.*<sup>16</sup> found that changes to the center of gravity can be stabilized with equivalent muscular activity from the right and left masseter muscles during sprinting. Previous studies by the authors

indicate that edentulous patients with an unstable lower jaw are more prone to shifts of their centers of gravity and that the number of falls can be reduced in patients with dementia who wear dentures.<sup>4,17</sup> These observations suggest that mandibular stability is important for postural control, and the results of the current study support this conclusion.

However, many methods are available for measuring the one-leg standing time, and researchers select the method.<sup>18</sup> It remains to be seen whether the methods used in this study (e.g. one measurement lasting up to 60 seconds) were appropriate. To gain further insights into the role of the mandibular position on postural control, the authors believe that a more detailed investigation employing a stabilometer will be necessary.

## Conclusion

In this study, the authors found that the one-leg standing time with the mouth opened was significantly shorter than the time with the mouth closed. This may be because the proprioception of the periodontal membrane and muscle spindles becomes functional in the mouth-closed condition. The authors conclude that the vertical mandibular position may affect body posture.

## Disclaimer Statements

**Contributors** Mitsuyoshi Yoshida has contributed in conceiving and designing the study, and writing the article in whole; Yayoi Kanehisa has contributed in collecting the data; Yoshie Ozaki has contributed in collecting the data and obtaining ethics approval; Yasuyuki Iwasa has contributed in collecting the data and analysing the data; Takaki Fukuizumi has contributed in collecting the data and revising the article; Takeshi Kikutani has contributed in obtaining funding.

**Funding** This study was supported by a Research Grant for Health Promotion of healthcare programs for the elderly from of the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

**Conflicts of interest** There were no conflicts of interest.

**Ethics approval** The study was approved by the Saiseikai Yahata General Hospital Ethics Committee and was conducted with assistance from the Saiseikai Yahata General Hospital.

## References

- 1 WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. World Health Organ Tech Rep Ser. 2003;919:1–218.
- 2 Yoshimura N, Oka H, Muraki S, Akune T, Hirabayashi N, Matsuda S, *et al.* Reference values for hand grip strength, muscle mass, walking time, and one-leg standing time as indices

**Table 3 Comparison between the 'shortened' and 'prolonged' subgroups**

Physical indices	Subgroup		P
	Shortened	Prolonged	
Age (years)	75.5±5.4	75.7±4.5	0.896 <sup>NS</sup>
Hand grip strength (kg)	23.5±8.6	23.6±7.2	0.592 <sup>NS</sup>
BMI	24.2±2.9	25.1±3.1	0.237 <sup>NS</sup>
Number of remaining teeth	20.9±8.9	18.6±9.6	0.266 <sup>NS</sup>

Note: NS=No significant differences (at  $P=0.05$ , based on the Mann–Whitney  $U$  test).

In the 'shortened' group patients, the one-leg standing time was equal or shortened with the mouth open than with the mouth closed. In the 'prolonged' group patients, the one-leg standing time was prolonged with the mouth open.

- for locomotive syndrome and associated disability: the second survey of the ROAD study. *J Orthop Sci.* 2011;16(6):768–77.
- ▶3 Yamaga T, Yoshihara A, Ando Y, Yoshitake Y, Kimura Y, Shimada M, *et al.* Relationship between dental occlusion and physical fitness in an elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002;57(9):M616–20.
  - ▶4 Yoshida M, Kikutani T, Okada G, Kawamura T, Kimura M, Akagawa Y. The effect of tooth loss on body balance control among community-dwelling elderly persons. *Int J Prosthodont.* 2009;22(2):136–9.
  - ▶5 Moriya S, Muramatsu T, Tei K, Nakamura K, Muramatsu M, Notani K, *et al.* Relationships between oral conditions and physical performance in a rural elderly population in Japan. *Int Dent J.* 2009;59(6):369–75.
  - ▶6 Okuyama N, Yamaga T, Yoshihara A, Nohno K, Yoshitake Y, Kimura Y, *et al.* Influence of dental occlusion on physical fitness decline in a healthy Japanese elderly population. *Arch Gerontol Geriatr.* 2011;52(2):172–6.
  - ▶7 Cuccia A, Caradonna C. The relationship between the stomatognathic system and body posture. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64(1):61–6.
  - ▶8 Ferrario VF, Sforza C, Schmitz JH, Taroni A. Occlusion and center of foot pressure variation: is there a relationship? *J Prosthet Dent.* 1996;76(3):302–8.
  - ▶9 Sakaguchi K, Mehta NR, Abdallah EF, Forgione AG, Hirayama H, Kawasaki T, *et al.* Examination of the relationship between mandibular position and body posture. *J Craniomandib Pract.* 2007;25(4):237–49.
  - ▶10 Baldini A, Nota A, Tripodi D, Longoni S, Cozza P. Evaluation of the correlation between dental occlusion and posture using a force platform. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68(1):45–9.
  - ▶11 Gangloff P, Perrin PP. Unilateral trigeminal anaesthesia modifies postural control in human subjects. *Neurosci Lett.* 2002;330(2):179–82.
  - ▶12 Gangloff P, Louis JP, Perrin P. Dental occlusion modifies gaze and posture stabilization in human subjects. *Neurosci Lett.* 2000;293(3):203–6.
  - ▶13 Perinetti G, Contardo L, Biasati AS, Perdoni L, Castaldo A. Dental malocclusion and body posture in young subjects: a multiple regression study. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(7):689–95.
  - ▶14 Perinetti G. Dental occlusion and body posture: no detectable correlation. *Gait Posture.* 2006;24(2):165–8.
  - ▶15 Braeco P, Deregibus A, Piscetta R. Effects of different jaw relations on postural stability in human subjects. *Neurosci Lett.* 2004;356(3):228–30.
  - ▶16 Sforza C, Tartaglia GM, Solimene U, Morgun V, Kaspranskiy RR, Ferrario VF. Occlusion, sternocleidomastoid muscle activity, and body sway: a pilot study in male astronauts. *J Craniomandib Pract.* 2006;24(1):43–9.
  - ▶17 Yoshida M, Morikawa H, Kanehisa Y, Taji T, Tsuga K, Akagawa Y. Functional dental occlusion may prevent falls in elderly individuals with dementia. *J Am Geriatr Soc.* 2005;53(9):1631–2.
  - ▶18 Michikawa T, Nishiwaki Y, Takebayashi T, Toyama Y. One-leg standing test for elderly populations. *J Orthop Sci.* 2009;14(5):675–85.

## 歯内治療における術後疼痛の発症にかかわる要因の解析

永吉雅人<sup>1</sup> 吉居慎二<sup>1</sup> 角館直樹<sup>2</sup>  
 福泉隆喜<sup>3</sup> 末松美希<sup>1</sup> 平田-土屋志津<sup>1</sup>  
 鷺尾絢子<sup>1</sup> 西野宇信<sup>4</sup> 矢野淳也<sup>5</sup>  
 諸富孝彦<sup>1</sup> 北村知昭<sup>1</sup>

ながよし歯科医院

<sup>1</sup>九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野

<sup>2</sup>九州歯科大学北九州地区大学連携教育研究センター

<sup>3</sup>九州歯科大学口腔機能学講座総合教育学分野

<sup>4</sup>九州歯科大学口腔機能学講座総合診療学分野

<sup>5</sup>山口県健康福祉部健康増進課

### 抄録

目的：本研究の目的は、歯内治療における拡大法の違いが術後疼痛の発症に影響するかを検討することである。

材料と方法：九州歯科大学附属病院保存治療科を受診した105名の慢性根尖性歯周炎患者を対象として、5年以上の経験をもつ歯科医師8名が、根尖狭窄部を保存する拡大方法（従来法）と根尖狭窄部を意図的に拡大する方法（意図的拡大法）をそれぞれ53, 52名に対して実施した。従来法と意図的拡大法における術後疼痛の発症割合の差および根管治療における術後疼痛発症要因について、解析を行った。

成績：従来法と意図的拡大法の2つの術式による術後疼痛の発症割合は、両群ともに13名（25%）と差は認められなかった。年齢による術後疼痛の発症割合は50歳未満で15名（42%）、50歳以上で11名（16%）であり、術前の根管充填材の有無による術後疼痛の発症割合は根管充填材ありの場合で20名（42%）、根管充填材なしの場合では6名（11%）であった。また、従来法群と意図的拡大法群の治療回数の平均の差についてt検定を実施した結果、従来法群に比べ意図的拡大法群のほうが有意に治療回数が増加した。術後疼痛の発症要因についてロジスティック回帰分析を実施した結果、「患者年齢が50歳未満であること」および「術前の根管充填材の存在」が、それぞれOdds比で3.9（95%信頼区間：1.269~11.662）、7.9（95%信頼区間：2.469~25.412）であり、これらの要因により術後疼痛の発症頻度が高くなることが示唆された。

結論：本研究では意図的拡大法群は従来法群に比べ治療回数が増加したが、根管拡大法の違いと術後疼痛の発症との関連には統計学的な有意差は認められなかった。しかし、1) 患者の年齢が50歳未満であること、および2) 根管充填材が術前に存在することにより、術後疼痛の発症頻度が高くなることが示唆された。これらの2つの要因は、術前の状態での術後疼痛の起こるリスクを予測する臨床上の指標となる可能性が示唆された。

キーワード：歯内治療、術後疼痛、臨床統計

責任著者連絡先：吉居慎二

〒803-8580 福岡県北九州市小倉北区真鶴2-6-1 九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野

TEL：093-582-1131, FAX：093-581-5399, E-mail：r08yoshii@fa.kyu-dent.ac.jp

受付：平成26年7月14日/受理：平成26年8月12日

DOI：10.11471/shikahozon.57.407

## 緒言

根管治療の目的は、根管および根尖孔外の無菌化である。根管治療は根管拡大、根管形成、根管洗浄、根管貼薬によって根管を無菌化し、根管からの感染の供給を絶つ。それによって、根尖孔外に波及した感染は自己免疫によって治癒する<sup>1-3)</sup>。

その治療過程において、特に根管洗浄後数日にかけて術後疼痛を引き起こすことがある。根管治療中に生じる痛みは歯科医師と患者間の信頼関係を損ねる大きな要因の一つであり、術前にあらかじめ痛みが生じる頻度を予測することができれば、患者へのインフォームドコンセントや治療中の対処をより徹底することができる。

加えて近年、通法の根管治療で長期間改善が認められず、慢性的に症状が持続する難治性根尖性歯周炎が問題となっており、難治性根尖性歯周炎の原因として根尖孔外のバイオフィルムの可能性が報告されている<sup>4-7)</sup>。根尖孔外に形成されたバイオフィルムを除去するためには、病巣部分への十分な薬剤の到達が不可欠であるが、根尖狭窄部の存在は根尖孔外への薬剤の到達を妨げている可能性がある。また近年再生療法の研究はさまざまな分野で盛んに行われており、歯科の分野でも歯・歯髄ならびに根尖歯周組織の再生研究や歯髄組織の再生時、根未完成歯の血管造成において根尖孔部の拡大が有効であったという報告や、根尖孔部を直径1 mm以上拡大することが根尖孔外から根管内への組織の再生に必要であるという報告もある<sup>8-10)</sup>。

根尖狭窄部を意図的に拡大することにより根尖歯周組織を刺激し、疼痛を惹起する危険性が考えられるが、痛みを発生させる病原因子は正確には明らかにされていない。これまでに、根尖歯周組織に対する化学的・機械的・細菌学的刺激や心理学的要因が根管治療後の術後疼痛を発症させるとする仮説に基づき、さまざまな調査・研究が行われている。それらの調査・研究において、根管治療後の術後疼痛の発症頻度は2~80%とさまざまである<sup>11-16)</sup>。このように発症頻度が異なる要因として、1) 研究デザイン、2) 治療方法、3) 治療記録の採取時期、4) 痛みの計測方法、5) 統計学的分析方法の違いなどが考えられる。さらに、現在歯内療法は非常に多くの方法が提唱されているにもかかわらず、実際にどの方法を選択するかに対して明確な基準はなく、いまだに術者個々の経験則に頼ることが多いことも原因の一つと考えられる。

そこで今回筆者らは、根尖狭窄部の意図的拡大の有無が術後疼痛の発症に関連するかを明らかにすることを目的として研究を実施した。

## 対象および方法

## 1. 対象者

本研究は九州歯科大学附属病院倫理委員会の許可(承認番号: No. 10-038)の下、下記の条件に当てはまる患者を被験者として実施した。平成22年10月から平成23年10月までに九州歯科大学附属病院保存治療科を受診し、慢性根尖性歯周炎により歯内治療法を必要とした患者のうち、インフォームドコンセントを得て保存治療科歯内治療用クリティカルパスに沿って根管治療を行った患者110名で、通院の中断により追跡から脱落した5名を除外した105名(男性48名、女性57名、25~81歳)を解析対象とした。

## 2. 治療方法

対象者は、初診時に根尖狭窄部を保存する「従来法群」と根尖狭窄部を拡大する「意図的拡大法群」に交互に割り付けられた。「従来法群」に対しては、根管拡大時に生理学的根尖孔を保存する方法で、根管長測定器(ROOT-ZX, モリタ)にて0.5の値を示した根管長より0.5 mmを引いた長さを作業長として根管拡大・形成を行った。「意図的拡大法群」に対しては生理学的根尖孔を意図的に拡大する目的から、根管長測定器にて0.5の値を示した根管長をそのまま作業長として根管拡大・形成を行った。「従来法群」および「意図的拡大法群」ともに *in vitro*, *in vivo* および臨床症例に関する文献を基に、歯内治療における一連の処置法を統一した歯内治療用クリティカルパスに沿って、メーカーの統一はしていないが各種手用ファイルにて拡大し、白色削片が付着してさらに1~2番大きなファイルまで根管形成、洗浄、貼薬および貼薬剤を選択し根管治療を実施した<sup>17)</sup>。今回の研究では、5年以上の経験をもつ歯科医師8名が、上記の歯内治療用クリティカルパスに基づき治療を行った。

## 3. アウトカム指標

アウトカムの測定には、主観的尺度である Wong-Baker FACES Pain Rating Scale (WBFPR-scale) を用いた<sup>18,19)</sup>。本尺度は Face scale であり、患者に対して各回の治療開始前に前回治療後に疼痛が生じたかを尋ね、疼痛がなかった場合は  $R_0$ 、疼痛があった場合はその疼痛の程度を  $R_1$  から  $R_5$  で評価してもらうものである。得られたデータに関しては、術者が臨床症状の記録と併せてデータシートに記入した。また、術前疼痛の評価にも WBFPR-scale を用い、6段階で測定を行った。

## 4. 投薬について

投薬(抗生物質・消炎鎮痛剤)については通法に従い、必要性があると術者が判断した場合は服薬方法の説明を十分行ったうえで投薬を行った。服薬に関しては疼痛が

Table 1 Attributes of subjects

		All (n=105)	Conventional preparation (n=53)	Intentional preparation (n=52)	p-value <sup>†</sup>
		n (%)	n (%)	n (%)	
Gender	Male	48 (45.7)	24 (45.3)	24 (46.2)	.929
	Female	57 (54.3)	29 (54.7)	28 (53.8)	
Age	50>	37 (35.2)	16 (30.2)	21 (40.4)	.274
	50≤	68 (64.8)	37 (69.8)	31 (59.6)	
Root canal filling material of preoperative	Presence	48 (45.7)	25 (47.2)	23 (44.2)	.762
	Absence	57 (54.3)	28 (52.8)	29 (55.8)	
Radiolucency	Presence	51 (48.6)	22 (41.5)	29 (55.8)	.174
	Absence	54 (51.4)	31 (58.5)	23 (44.2)	
Preoperative pain	Absence*	44 (41.9)	25 (47.2)	19 (36.5)	.604
	Presence**	61 (58.1)	28 (52.8)	33 (63.5)	
Medication	Yes	67 (63.8)	37 (69.8)	30 (57.7)	.196
	No	38 (36.2)	16 (30.2)	22 (42.3)	

\* : WBFPR-scale R<sub>0</sub>, \*\* : WBFPR-scale R<sub>1</sub>-R<sub>5</sub>, † :  $\chi^2$ -test (p<0.05).

発症した場合に、患者自身の判断で行った。

#### 5. データ解析

データ解析には、統計解析ソフト (SPSS ver. 20, IBM) を用いた。従来法群と意図的拡大法群における術後疼痛発症の頻度について記述し、治療回数の平均値の差については *t* 検定を行い検定した。発症要因の分析には、従属変数を「術後疼痛の発症の有無」とし、それに関連する要因を独立変数としてロジスティック回帰分析を用いて検討した。統計学的有意差については、5%有意水準を設定した。

### 結 果

Table 1 に対象者の属性項目を示す。性別は男性が 48 名 (46%) で女性が 57 名 (54%) であり、年齢は 50 歳未満が 37 名 (35%) で 50 歳以上が 68 名 (65%) であった。患者全体の平均年齢は 56.6 歳であった。術前の根管充填材の有無は「あり」が 48 名 (46%) で「なし」が 57 名 (54%)、透過像は「あり」が 51 名 (49%) で「なし」が 54 名 (51%) であった。術前の疼痛は「あり」が 61 名 (58%) で「なし」が 44 名 (42%)、投薬の有無は「あり」が 67 名 (64%) で「なし」が 38 名 (36%) であった。各属性項目において、従来法群と意図的拡大法群では有意差は認めなかった ( $\chi^2$ 検定, p<0.05)。

Table 2 に術後疼痛の有無で層別化した結果を示す。拡大法の違いでは従来法群 13 名 (24.5%)、意図的拡大法群 13 名 (25.0%) で術後疼痛が発症した。性別では男

性 16 名 (33.3%) と女性 10 名 (17.5%) で、年齢では 50 歳以上の場合に 11 名 (15.9%)、50 歳未満の場合に 15 名 (41.7%) が術後疼痛を発症した。根管充填材の有無では「あり」で 20 名 (41.7%)、「なし」で 6 名 (10.5%) が、透過像の有無では「あり」で 13 名 (25.5%) が、「なし」で 13 名 (24.1%) が術後疼痛を発症した。術前疼痛の有無では「あり」の場合で 16 名 (26.2%)、「なし」の場合で 10 名 (22.7%) が術後疼痛を発症した。投薬の有無では「あり」で 13 名 (19.4%) が、「なし」で 13 名 (34.2%) が術後疼痛を発症した。歯種については、上顎では前歯で 4 名 (21.1%)、小白歯で 3 名 (17.6%)、大白歯で 5 名 (26.3%)、下顎では前歯で 3 名 (30.0%)、小白歯で 5 名 (29.4%)、大白歯で 6 名 (26.1%) が術後疼痛を発症した。

Table 3 に根管拡大法の違いによる根管充填までの治療回数の差を示す。従来法群と意図的拡大法群における治療回数で *t* 検定を行った結果、意図的拡大法群のほうで 5.29±2.20 回と従来法群の 4.26±1.67 回と比較して有意に治療回数が増加した (p<0.05)。

Table 4 に術後疼痛の発症の有無と、性別、年齢、根管充填材の有無、根管拡大法、根尖透過像、術前疼痛の指標として初回 WFPFR-scale rank および投薬との関連を、ロジスティック回帰分析で検討した結果を示す。根管充填材が術前に根管内に存在した場合は、根管充填材がなかった場合に比べると Odds 比で 7.9 (95%信頼区間: 2.469~25.412) であった。同様に、年齢に関しては 50 歳未満の場合は、50 歳以上の場合に比べて Odds 比は 3.9 (95%信頼区間: 1.269~11.662) であった。

Table 2 Frequency of postoperative pain in each attribute

		Postoperative pain		
		Non-occurrence (n=79)	Occurrence (n=26)	
		n (%)	n (%)	
Method of root canal preparation	Conventional preparation	40 (75.5)	13 (24.5)	
	Intentional preparation	39 (75.0)	13 (25.0)	
Gender	Male	32 (66.7)	16 (33.3)	
	Female	47 (82.5)	10 (17.5)	
Age	Less than 50	21 (58.3)	15 (41.7)	
	More than 50	58 (84.1)	11 (15.9)	
Root canal filling material of preoperative	Presence	28 (58.3)	20 (41.7)	
	Absence	51 (89.5)	6 (10.5)	
Radiolucency	Presence	38 (74.5)	13 (25.5)	
	Absence	41 (75.9)	13 (24.1)	
Preoperative pain	Absence*	45 (73.8)	16 (26.2)	
	Presence**	34 (77.3)	10 (22.7)	
Medication	Yes	54 (80.6)	13 (19.4)	
	No	25 (65.8)	13 (34.2)	
Dental group	Maxillary	Anterior	15 (78.9)	4 (21.1)
		Premolar	14 (82.4)	3 (17.6)
		Molar	14 (73.7)	5 (26.3)
	Mandibular	Anterior	7 (70.0)	3 (30.0)
		Premolar	12 (70.6)	5 (29.4)
		Molar	17 (73.9)	6 (26.1)

\* : WBFPR-scale R<sub>0</sub>, \*\* : WBFPR-scale R<sub>1</sub>-R<sub>5</sub>

Table 3 Differences in average treatment times conventional preparation method group with the intentional preparation method group

Method of root canal preparation	Number of treatments		
	n	Mean±SD	p-value*
Conventional preparation	53	4.26±1.67	0.0086
Intentional preparation	52	5.29±2.20	

\* : t-test (p&lt;0.05)

### 考 察

今回の研究では、根尖孔狭窄部の意図的な拡大の有無と術後疼痛の発症とを多変量解析を行い検討したが、統計的に有意な関連は認められなかった。一方で、術後疼痛の発症頻度は患者年齢が50歳未満であること、および術前に根管充填材が存在することが術後疼痛の発症と統

計学的に有意に関連していた。

今回、根管拡大の方法の違いで術後疼痛の発症頻度に差が出ると仮説を設定したが、統計学上の有意差は認められなかった。これは、従来法群では根尖孔外を器具の穿孔により刺激することなく治療を行うが、薬剤の到達深度としては意図的拡大法群よりも浅く、根尖孔外のバイオフィームまでいきわたらないのに対して、意図的拡大法群では根尖孔外への器具の穿孔を起こす頻度が高くなるが、薬剤を従来法群よりも根尖側にいきわたらせることができ、これらが相殺されることにより2つの拡大方法の間で差が出なかったのではないかと考えられる。しかし、意図的拡大法群のほうが従来法群と比較して有意に治療回数が増加したことから、根尖部への刺激の残存により、患者の打診痛や圧痛・違和感の消退が遅れ、根管充填までの期間が長くなったと予測される。

年齢に関しては術後疼痛の有無と関連しており、50歳未満の群で術後疼痛が発症しやすいという結果であったが、これは加齢に伴い歯髓腔は狭窄することから、50歳

**Table 4** Results of multivariate analysis of factors affecting postoperative pain

		OR	95%CI	p-value
Method of root canal preparation	Conventional preparation Intentional preparation*	1.10	0.38-3.17	.955
Gender	Male Female*	2.29	0.79-6.65	.062
Age	50> 50≤*	3.85	1.27-11.66	.006
Root canal filling material of preoperative	Presence Absence*	7.92	2.47-25.41	.000
Radiolucency	Presence Absence*	0.61	0.21-1.83	.867
Preoperative pain	Absence Presence*	0.95	0.68-1.33	.268
Medication	Yes No*	2.01	0.66-6.15	.001

(\* : reference)

未満の群では歯髄腔が狭窄していない人が多く存在しており、器具の穿孔が生じた割合が高かったことが推察される。すなわち、50歳未満の群では、器具の穿孔により感染物質が根尖孔外に押し出された者の割合が高かった可能性があると考えている。

また、術前に根管充填材が存在することも術後疼痛の有無と関連していた。これは、根管治療に伴って根尖孔外への感染物質の押し出し、および根管充填材やシーラーを感染物質の除去の際に根尖孔外に押し出している可能性があると考えられた<sup>20-28)</sup>。

最後に本研究の限界としては、歯種の限定を行っていないこと、ランダムに治療法を割り付けていないことが挙げられる。今後は、従来法群と意図的拡大法群の2群でランダム化比較試験を行い、両群の長期的な予後を観察し、病巣の治癒率および再発率に差が出るかどうか検討していく必要があると考えている。さらに、両治療法の有効性を詳細に比較検討していく必要があると考えられる。

## 結 論

今回の結果では、根管拡大法の違いと術後疼痛の発症との間には統計学的な有意差は認められなかったが、1) 患者の年齢が50歳未満であること、および2) 根充材が術前に存在することにより、術後疼痛の発症頻度が高くなることが示唆された。これらの2つの要因は、術前の状態での術後疼痛の起こるリスクを予測する臨床上的指標となる可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Langeland K, Conn F, Block RM, Va R, Grossman LI. A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. *J Endod* 1977; 3: 8-23.
- 2) Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 89-96.
- 3) Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 139-150.
- 4) Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu C, Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod* 2012; 38: 954-959.
- 5) Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010; 36: 1277-1288.
- 6) Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8738-8743.
- 7) Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002; 28: 679-683.
- 8) Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?. *J Endod* 2004; 30: 196-200.



- 9) Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod* 2006; 32: 1205-1213.
- 10) Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* 2001; 17: 185-187.
- 11) Ng Y-L, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part I: periapical health. *Int Endod J* 2011; 44: 583-609.
- 12) Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Machado AG, Gahyva SM, Oliveira JC, Abad EC. Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy. *J Endod* 2002; 28: 457-460.
- 13) Iqbal M, Kurtz E, Kohli M. Incidence and factors related to flare-ups in a graduate endodontic programme. *Int Endod J* 2009; 42: 99-104.
- 14) Alves Vde O. Endodontic flare-ups: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 110: e68-e72.
- 15) Oshima K, Ishii T, Ogura Y, Aoyama Y, Katsuumi I. Clinical investigation of patients who develop neuropathic tooth pain after endodontic procedures. *J Endod* 2009; 35: 958-961.
- 16) Glennon JP, Ng YL, Setchell DJ, Gulabivala K. Prevalence of and factors affecting postpreparation pain in patients undergoing two-visit root canal treatment. *Int Endod J* 2004; 37: 29-37.
- 17) 矢野淳也, 北村知昭, 諸富孝彦, 永吉雅人, 寺下正道. 歯内治療用クリティカルパスの妥当性の評価. *日歯保存誌* 2004; 47: 823-828.
- 18) 佐伯 茂. 痛みの評価法. *Mod Physician* 2003; 23: 317-321.
- 19) 飯村直子. Wong-Baker のフェイススケールの日本における妥当性と信頼性. *日小児看護会誌* 2002; 11 (2): 21-27.
- 20) Siqueira JF Jr. Microbial causes of endodontic flare-ups. *Int Endod J* 2003; 36: 453-463.
- 21) Signoretti FG, Endo MS, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *J Endod* 2011; 37: 1696-1700.
- 22) Senges C, Wrbas KT, Altenburger M, Follo M, Spitzmüller B, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Bacterial and *Candida albicans* adhesion on different root canal filling materials and sealers. *J Endod* 2011; 37: 1247-1252.
- 23) Salvia AC, Teodoro GR, Balducci I, Koga-Ito CY, Oliveira SH. Effectiveness of 2% peracetic acid for the disinfection of gutta-percha cones. *Braz Oral Res* 2011; 25: 23-27.
- 24) George S, Basrani B, Kishen A. Possibilities of gutta-percha-centered infection in endodontically treated teeth: an in vitro study. *J Endod* 2010; 36: 1241-1244.
- 25) Ricucci D, Siqueira JF Jr. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod* 2010; 36: 1-15.
- 26) Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99: 231-252.
- 27) Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 523-529.
- 28) Barrieshi KM, Walton RE, Johnson WT, Drake DR. Coronal leakage of mixed anaerobic bacteria after obturation and post space preparation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84: 310-314.



Full Length Research Paper

## New system for detection of oral bacterial adhesion to macrophages *in vitro*

Masaki Morishita<sup>1,2</sup>, Ryosuke Saeki<sup>3</sup>, Toshinori Okinaga<sup>1</sup>, Wataru Ariyoshi<sup>1</sup>, Nobuo Okahashi<sup>4</sup>,  
Michihiko Usui<sup>2</sup>, Keisuke Nakashima<sup>2</sup> and Tatsuji Nishihara<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Infections and Molecular Biology, Department of Health Promotion, Kyushu Dental University, Kitakyushu 803-8580, Japan

<sup>2</sup>Division of Periodontology, Department of Oral Function, Kyushu Dental University, Kitakyushu 803-8580, Japan  
<sup>3</sup>Fujikasui Engineering, Otake, Hiroshima 739-0652, Japan

<sup>4</sup>Department of Oral Frontier Biology, Graduate School of Dentistry, Osaka University, Suita 565-0871, Japan

\*Corresponding author Email: [tatsujin@kyu-dent.ac.jp](mailto:tatsujin@kyu-dent.ac.jp)

Accepted 16 December, 2013

### Abstract

*Streptococcus sanguinis*, a member of the viridans group of oral streptococci associated with infective endocarditis, possesses pili reported to be a potential virulence factor based on their ability to adhere to human epithelial cells. We developed and examined a system for detecting bacterial adhesion to cells *in vitro* to determine the possible involvement of *S. sanguinis* pili in attachment to the macrophage cell clumps. We stimulated the mouse macrophage cell line RAW 264.7 with lipopolysaccharide (LPS) derived from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. To evaluate the adhesion ratio of bacteria to macrophages, green fluorescence protein (GFP)-expressing *S. sanguinis* strains were detected using a fluorescence microscope. The *S. sanguinis* SK36 strain showed strong attachment to macrophage cell clumps, while treatment with LPS remarkably enhanced that adhesion. In contrast, an *S. sanguinis* SK36 pili-deficient-mutant ( $\Delta$ pili) did not attach to macrophage cell clumps even after LPS treatment. Although the pili of *S. sanguinis* SK36 showed strong binding activity to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), no such binding was detected with *S. sanguinis* SK36  $\Delta$ pili by Quartz-crystal microbalance (QCM) technique. Our results suggest that the adhesion occurs via interaction of *S. sanguinis* pili with ICAM-1 present on macrophages.

**Key words:** LPS, macrophage, microchannel chip, periodontopathic bacteria, *Streptococcus sanguinis*.

### INTRODUCTION

*Streptococcus sanguinis* is a gram-positive facultative anaerobe and normal inhabitant of the healthy human mouth, where it is most often found in dental plaque (Paik et al., 2005). A number of studies have reported that *S. sanguinis* is a major factor that activates and aggregates platelets, and induces infective endocarditis (Douglas et al., 1993), which occasionally occurs when bacteria in the bloodstream attach to abnormal heart valves or damaged heart tissue (Li et al., 2000). Recently, Okahashi et al. showed that pill, unique long filamentous structures, on

the bacterial cell surface of *S. sanguinis* contribute to formation of biofilm on saliva-coated surfaces (Okahashi et al., 2010; Okahashi et al., 2011).

We previously have reported the development of a microchannel chip to observe mouse macrophage cell clumps on micropillars and that periodontopathic bacteria showed significantly increased cell clump formation on those of lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages (Isoda et al., 2009). In addition, we clarified the mechanism of cell aggregation and the

association between periodontitis and atherosclerosis (Tsutsumi et al., 2010).

In the present study, GFP-expressing *S. sanguinis* strains were subjected to a flow system to evaluate their ratio of adhesion to macrophages with use of a fluorescence microscope. To the best of our knowledge, this is the first report of a suitable evaluation system to detect bacterial adhesion to macrophage cell clumps *in vitro*. Furthermore, we clarified the interaction of *S. sanguinis* pili with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on macrophages.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture and bacterial strains

The mouse macrophage cell line RAW 264.7 was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were grown at 37°C in  $\alpha$ -minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin G (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu$ g/ml) in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. Bacteria were cultured in Brain Heart Infusion broth (BHI; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The properties of *S. sanguinis* SK36 and an SK36 pili-deficient mutant ( $\Delta$ pili) were previously described (Okahashi et al., 2010). RAW 264.7 cells were plated in 100 mm culture plates at a concentration of  $1 \times 10^7$  cells/ml before the experiments, then stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 LPS (1  $\mu$ g/ml) for 24 h. *A. actinomycetemcomitans* Y4 LPS was prepared using a phenol water extraction method and purified as previously described (Nishihara et al., 1986).

### Construction of *S. sanguinis* SK36-GFP and SK36 $\Delta$ pili-GFP

To generate GFP-expressing *S. sanguinis* strains, the highly expressed constitutive lactate dehydrogenase (*ldh*) promoter and green fluorescence protein (*gfp*) gene were generated by PCR using Accuprime Pfx (Invitrogen), with the primers *ldh* F: GGGGGATCCCTTCCGAGCAACAATAACACTC and *ldh* R: GGGAAGCTTGTGGCAGGTATTAGGGATA, both of which had been phosphorylated with T4 polynucleotide kinase (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA). The *ldh* promoter was amplified with chromosomal DNA of the *S. sanguinis* strains, while the *gfp* gene was amplified with chromosomal DNA of the *S. sanguinis* strains and pVIVO1-GFP/LacZ (Invitrogen, Camarillo, CA, USA). The amplicons were ligated together and digested with BamHI and HindIII, then the digested fragment was ligated to pDL278 digested with BamHI and HindIII (Chen and LeBlanc, 1992). The plasmid was transformed to *S. sanguinis* strains and transformants were selected on BHI plates containing spectinomycin (1000  $\mu$ g/ml).

### Immunofluorescent imaging of cell-bacteria adhesion

We utilized a microchannel chip fabricated from silicon (Sumitomo 3M, Ltd, Tokyo, Japan) and acrylic resin. The chip was placed on the stage of an optical microscope, and connected to both the reservoir containing sample solution and a peristaltic pump with a tube as previously described (Isoda et al., 2009). The culture medium was circulated for 2 h at room temperature by the pump. Digital images of macrophages adherent to micropillars in the

channels were obtained using a CCD camera connected to the optical microscope. RAW 264.7 cells were flowed onto the microchannel chips at a concentration of  $1.5 \times 10^6$  cells/ml for 2 h at room temperature. *S. sanguinis* SK36-GFP or  $\Delta$ pili-GFP organisms were flowed onto the microchannel chips for 30 min at room temperature, with culture medium extensively flowed to remove non-adherent bacteria. Bacteria remaining on the cells were visualized using a Fluorescence Microscope BZ-9000 (KEYENCE Corp., Osaka, Japan), with images captured digitally in real time and processed using BZ-II imaging software (KEYENCE Corp.), then digitally recorded and stored as TIFF (tagged image file format) files. Subsequently, the percentage of stained area was analyzed using BZ-II analyzing software (KEYENCE Corp.). The adhesion ratio of the bacteria was defined as the bacterial area ( $\mu\text{m}^2$ ) / area of macrophage cell clump ( $\mu\text{m}^2$ ).

### Kinetic analysis using a quartz-crystal microbalance (QCM) technique

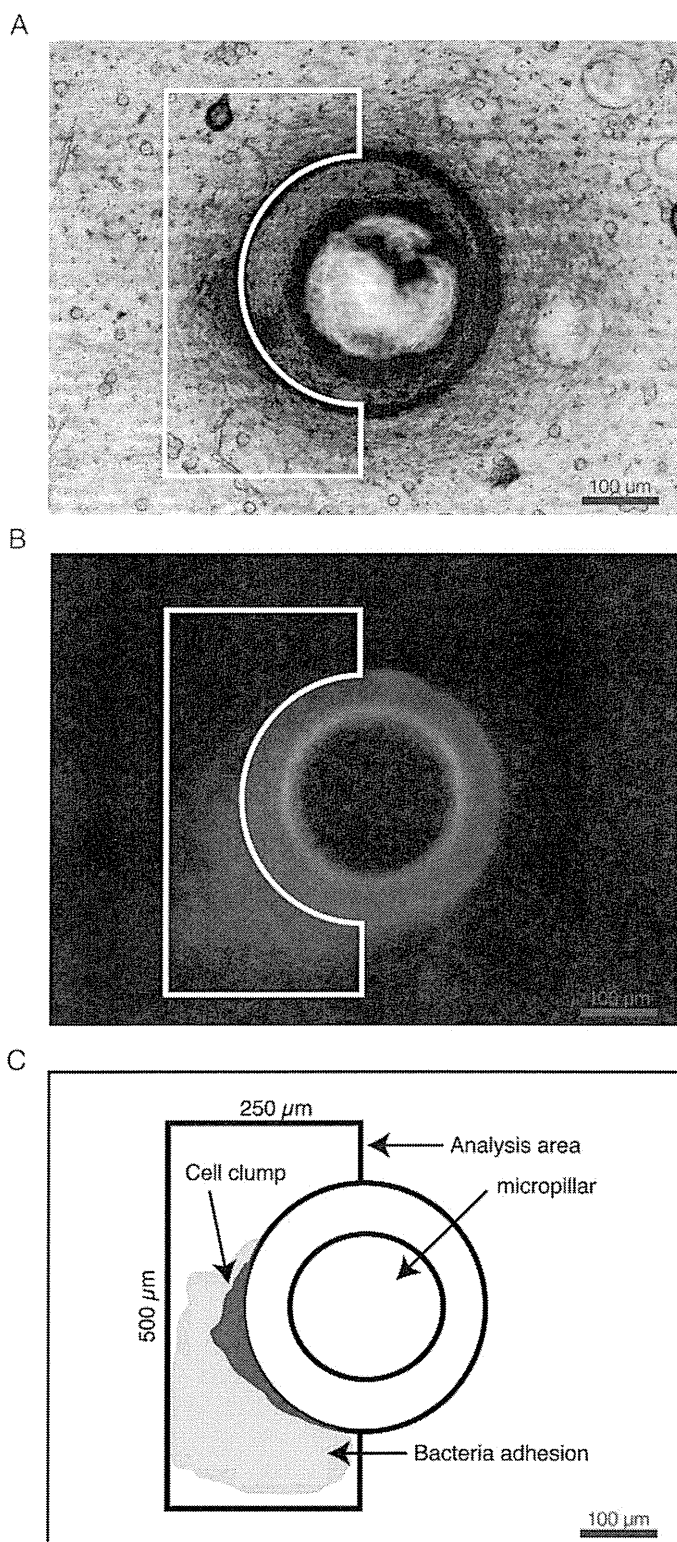
A 27-MHz QCM (AffinixQ; Intium Inc., Tokyo, Japan) was employed to analyze the affinity of the *S. sanguinis* strains with recombinant ICAM-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). ICAM-1 (2  $\mu$ l, 400  $\mu$ g/ml) was placed on the gold electrode surface of a QCM ceramic sensor chip and kept overnight at room temperature. After washing extensively with distilled water, the sensor chip was soaked in a chamber containing 10 ml of phosphate buffered saline (pH7.2; PBS) at 25°C until frequency equilibrium was attained. *S. sanguinis* SK36 or SK36  $\Delta$ pili (OD 0.2; 200  $\mu$ l) was added to the equilibrated solution containing the ICAM-1-immobilized sensor chip. The binding of *S. sanguinis* strains to ICAM-1 was determined by monitoring the alternations in frequency resulting from changes in mass on the electrode surface.

### Statistical analysis

Statistical analyses of the adhesion ratios were performed using the JMP® 9.0.1 software package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A Tukey-Kramer HSD (honestly significant difference) test was utilized to examine differences in regard to group means.

## RESULTS AND DISCUSSION

Dental plaque is a harmful product that is produced by numerous species of microorganisms, resulting not only in oral infectious diseases, such as dental caries and periodontal diseases, but also systemic diseases. It is well known that oral bacteria accelerate the development of systemic diseases such as diabetes mellitus, atherosclerosis, and cardiovascular diseases (Inaba and Amano, 2010). In particular, periodontitis has been found to have a good correlation with heart diseases, including endocardial inflammation, cardiac infarction, and atherosclerosis (Shay, 2002). We previously developed a microchannel chip to observe mouse macrophage cell clumps on micropillars (Isoda et al., 2009). Using that chip, we also investigated the mechanism of cell aggregation in order to examine the association between periodontitis and atherosclerosis, which showed that the rates of adhesion of *A. actinomycetemcomitans* to micropillars were significantly increased with LPS-



**Figure 1.** (A) Representative microscopic image of bacteria attached to cell clump on the microchannel chip. (B) Representative fluorescence microscopic image of bacteria attached to cell clump. A flow test was performed with LPS-stimulated RAW 264.7 cells for 120 min, followed by *S. sanguinis*-GFP for 30 min. (C) The sidewall of the micropillar was used as the area of analysis (250 μm × 500 μm).

stimulated RAW 264.7 cells via upregulation of ICAM-1 (Tsutsumi et al., 2010).

A number of studies have demonstrated that oral bacteria may be associated with infective endocarditis (Barrau et al., 2004). Among them, *S. sanguinis* was found to be the most common viridans group streptococcal species implicated to be related to the disease (Ge et al., 2008) and induced infective endocarditis via activation of platelet aggregation in an animal model (Herzberg et al., 1992). In fact, *S. sanguinis* is the bacterial organism most commonly isolated from infective endocarditis patients (Douglas et al., 1993). It has been shown that dental procedures such as tooth extraction, scaling of dental calculus, and even tooth brushing and flossing may lead to the presence of oral bacteria in circulating blood, which is called bacteremia (Roberts, 1999).

The pili of pathogenic streptococci, such as *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, and *Streptococcus pneumoniae*, have been shown to contribute to adherence to human cells (Telford et al., 2006). However, there are no known reports of a simple system for detection of cell-bacteria adhesion *in vitro*, thus we modified our previously developed microchannel chip method to detect bacterial adhesion and employed it in the present study.

We confirmed the presence of cell clumps around micropillars (Figure 1A and 1C) and found that *S. sanguinis* attached to those clumps in fluorescence microscopy examinations (Figure 1B and 1C). As shown in Figure 2, adhesion of LPS-stimulated cells to *S. sanguinis* SK36 ( $4.433 \pm 2.911$ ) was about 5.6 times higher than that of the *S. sanguinis* SK36  $\Delta$ pili-treated group ( $0.788 \pm 0.633$ ) ( $p < 0.05$ ), indicating that pili on the surface of *S. sanguinis* might be associated with adhesion to LPS-stimulated cells. In our previous study, *A. actinomycetemcomitans* LPS stimulation induced an increase in expression of ICAM-1 on the surface of RAW 264.7 cells, suggesting that ICAM-1 is related to cell-to-bacteria aggregation. Therefore, we also examined whether pili adhere to cells via ICAM-1 on the surface of macrophages using a QCM technique.

*S. sanguinis* strains were loaded onto ICAM-1-immobilized sensor chips at 25°C. As shown in Figure 3, the frequency was decreased by approximately 2000 Hz in *S. sanguinis* SK36  $\Delta$ pili, while that was decreased by approximately 14000 Hz in *S. sanguinis* SK36. These results suggest that pili on the surface of *S. sanguinis* bind to ICAM-1 on the surface of the cell clumps and also support previous findings showing that non typeable *Haemophilus influenzae* bound to respiratory epithelial cells by binding of pili to ICAM-1 (Avandhanula et al., 2006).

Our findings also indicate that LPS enhances not only cell-to-cell (Tsutsumi et al., 2010), but also bacteria-cell aggregation via ICAM-1 on the surface of macrophages. Furthermore, there is a possibility that cell-to-bacteria