

令和元年6月25日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17326

研究課題名（和文）小児齲蝕のさらなる低減へ向けた原因因子の解明と予防法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of risk factors of dental caries and established the more effective preventive method

研究代表者

大原 紫 (Ohara, Yukari)

広島大学・医歯薬保健学研究所（歯）・専門研究員

研究者番号：80634469

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：齲蝕は小児歯科臨床において最も多く遭遇する疾患であり、個人が保有する齲蝕原因菌の病原性を把握したうえで個々に適した齲蝕予防法を確立することが重要である。齲蝕の主要な原因菌である *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) は口腔内の様々な環境変化による影響を受けている。その齲蝕原性を低減される効果的な齲蝕予防法の確立のためフッ素他酵素活性を阻害する物質を用い、遺伝子発現変化から効果的な予防法の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的に齲蝕は減少傾向と言われているが、本邦の現状として小児歯科診療室を訪れる重症齲蝕の低年齢児あるいは発達障害児は少なくなく、齲蝕罹患について二極化が認められている。齲蝕の原因としては食生活（糖分摂取）・歯質・細菌と多因子により罹患するが、本研究はその原因因子のうちの細菌をターゲットとした。個人が保有する齲蝕原因菌の病原性を把握したうえで個々に適した齲蝕予防法を確立することは学術的にも社会的にも重要で意義あることである。

研究成果の概要（英文）：Dental caries is a most popular disease in an pediatric dental practice. It is important that suitable caries prophylaxis is established individually with comprehending the pathogenicity character of the caries pathogen which an individual child holds. *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) which is a main pathogen of the dental caries suffers effects by intraoral various environmental changes. For establishment of the effective dental caries prophylaxis that the cariogenicity is reduced, It was searched for effective prophylaxis from a gene expression change with the material included fluoride and et al which inhibited enzyme activity of *S.mutans*.

研究分野：小児歯科学

キーワード：小児齲蝕

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦における小児の齲蝕経験者率は減少している。その一方で、小児歯科診療室を訪れる小児のなかには重症齲蝕の小児も少なくなく、齲蝕罹患の二極化傾向が認められる。齲蝕は歯面に形成されたバイオフィーム内に生息する齲蝕原因菌が産生した酸により歯質が脱灰されることで生じる細菌感染症であり、バイオフィーム内での *muans sreptococci* の比率が高いほど、齲蝕原性が高いことが報告されている。

齲蝕原因菌の1つである *Streptococcus mutans* (以下 *S.mutans*) は sucrose や glucose を基質として生存に必要なエネルギーである ATP を合成するが、その代謝物として乳酸などの酸が産生される。さらに、*S.mutans* は glucosyltransferase を介して sucrose から粘着性の不溶性グルカンを合成することで歯面に強固に付着する。不溶性グルカンが多量に含まれるバイオフィームは、内部の齲蝕原性菌が産生した酸の拡散を防ぐとともに、緩衝能をもつ唾液の侵入を妨げることで酸性環境を長時間保持することができる。細菌は菌体周囲の酸性化によって代謝酵素の変性や失活などの酸障害を受けるが、*S.mutans* は、酸が蓄積されたバイオフィーム内で生息するために他の口腔細菌と比較して高い耐酸性と酸産生能を有することが報告されている。細菌が持つ耐酸性機構の一つとして F-ATPase による菌体内からのプロトン排出機構が挙げられるが、*S.mutans* の F-ATPase の至適 pH が他の口腔内レンサ球菌と比較して酸性側にあることが報告されている。

筆者はこれまでに小児口腔内より分離した *S.mutans* について glucosyltransferase B 遺伝子 (*gtfB*) の mRNA 発現量を Real-time RT-PCR 法による検討し、齲蝕重症度が高い小児で酸性環境下および glucose あるいは sucrose を添加した環境下において発現量が増加することを見出した (図1)。また、F-ATPase の γ -subunit である *atpD* の mRNA 発現量と酸性環境下における *S.mutans* の生存率が齲蝕重症度に関連していることを明らかにした。

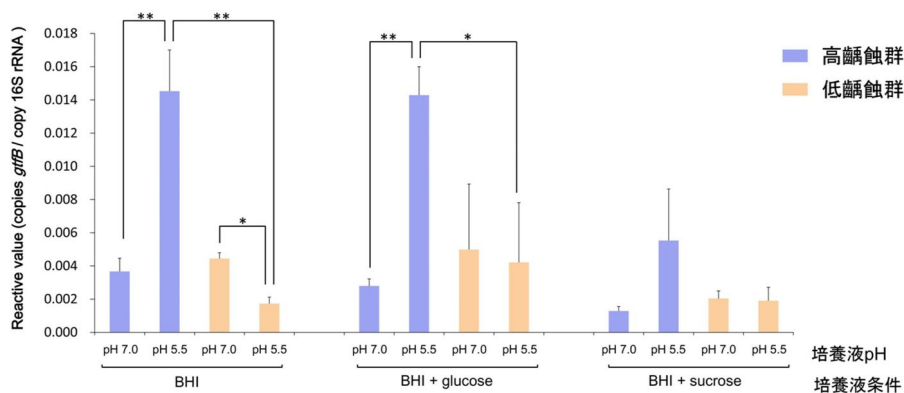


図1. *gtfB* の mRNA 発現量

2. 研究の目的

齲蝕は小児歯科臨床において最も多く遭遇する疾患であり、個人が保有する齲蝕原因菌の病原性を把握したうえで個々に適した齲蝕予防法を確立することが重要である。齲蝕の主要な原因菌である *S.mutans* は口腔内の様々な環境変化による影響を受けている。臨床分離 *S.mutans* によって形成されたバイオフィーム内において、その齲蝕原性を変化させる環境因子を明らかにし、その齲蝕原性を低減される効果的な齲蝕予防法の確立の一助となることを目的とする。

細菌は、菌密度を感知して遺伝子の発現状況を変化させる quorum sensing システムを持つことが報告されている。臨床分離 *S.mutans* を用いてバイオフィームを形成させ、*gtfB*、*atpD* および quorum sensing システムに関連する遺伝子の発現量を測定し、齲蝕重症度との関連を明らかにする。

フッ化物やキシリトールなどの糖アルコール、バクテリオシンや quorum sensing システムに関連する抗菌ペプチドの *S.mutans* に対する効果を検討し、小児ひとりひとりに適した齲蝕予防法を開発する。

3. 研究の方法

実験1 バイオフィーム形成時の齲蝕関連遺伝子発現量の測定

小児口腔内より分離した *S.mutans* を BHI 液体培地で定常状態まで培養後菌体を回収する。その後、佐藤らの方法に準じ、菌液を sucrose あるいは glucose を含有する BHI 液体培地に播種し、水平面に対して 30 度傾斜させた状態で 48 時間インキュベートする。上清を取り除いた後、試験管内にリン酸緩衝生理食塩水を加え、vortex mixer で振盪しバイオフィームを洗浄する。上清を取り除き試験管に強固に付着したものをバイオフィームとし、トリゾール試薬を用いて mRNA を抽出する。gtfB, atpD および quorum sensing システムに關与する mRNA 発現量を Real-time RT-PCR 法により定量的に測定する。各遺伝子 mRNA 発現量を比較し、齲蝕重症度との関連を検討する。

実験2 新たな齲蝕リスクレベル低減法の開発

S.mutans の酵素活性を阻害するフッ素やキシリトールによる *S.mutans* の齲蝕原性への影響を検討するため、*S.mutans* をフッ素、キシリトール等を含む培養液で培養し、不溶性グルカン合成能および耐酸性用に生じる変化を検討する。gtfB, atpD および quorum sensing システムに關与する mRNA 発現量を Real-time RT-PCR 法により定量的にすることにより *S.mutans* への影響を検討し、より効果的に *S.mutans* の齲蝕原性を低減させる因子を明らかにし、齲蝕予防法へと発展させる。

一方、低年齢時に発症する重症齲蝕は muans streptococci が早期に口腔内に定着し、感染することで発症するが、定着に貢献する口腔内環境として菌叢の違いが關与する可能性があると考えられる菌叢について検討する。今回の対象者の中から低年齢時数名を抽出し、またコントロールとして同年齢の平均齲蝕数の児を選び、それぞれよりプラークを採取後、口腔内細菌の DNA を調整し、次世代シーケンスを行い、低年齢重症齲蝕の特徴を明らかにし、齲蝕予防法開発への一助とする。

4. 研究成果

実験1 バイオフィーム形成時の齲蝕関連遺伝子発現量の測定

小児歯科外来受診の低年齢小児を対象とし、本人ならびに保護者の同意を得たうえで、小児の口腔内からプラークを採取し、*S.mutans* の分離ならびに同定を行った。菌体から DNA を抽出した後、*S.mutans* のデキストラナーゼ A 遺伝子を用いて PCR 法により同定された分離株を用いて、バイオフィーム形成を行い、採取したバイオフィームならびに上清部分を浮遊細菌とそれぞれより mRNA を抽出し、gtfB, atpD, Automutanolysin および quorum sensing システムに係わる comB comC について RT-PCR 法により、それぞれの mRNA の定量を行い、浮遊状態での培養と比較した。gtfB はバイオフィーム内での発現減少が認められた。また、Severe-Early Childhood Caries 罹患児より分離された *S.mutans* を高齲蝕群、それ以外を低齲蝕群として、酸性下での性状について比較したところ、高齲蝕群 *S.mutans* は酸性化により生存する傾向が見られ、gtfB, atpD の発現量との関連性が窺われた。

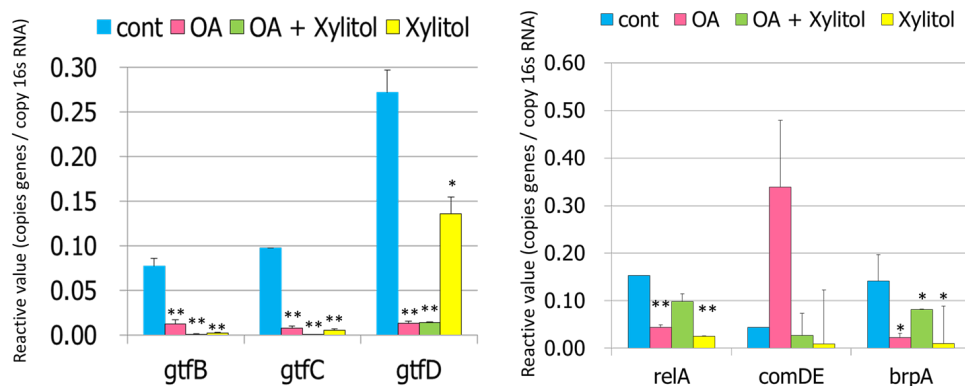


図2 Effect of OA and Xylitol on mRNA expression of some target genes

実験2 新たな齲蝕リスクレベル低減法の開発

齲蝕発症リスクレベル低減法開発に係わる研究として、*S.mutans*の酵素活性を阻害するフッ化物、キシリトール、triterpenoidなどによる齲蝕原性への影響について標準株を用いて検討を行った。上記のそれぞれを含む培養液で培養後、comB, comCを含む複数のターゲット遺伝子についてReal-time RT-PCR法を行い、各阻害物質による影響について検討した。至適濃度のフッ素添加により、プラーク形成に関与するgtfBを含むglucosyltransferase, comDEは減少したが、glucan binding protein Bやbiofilm regulatory proteinであるbrpAは増加していた。キシリトールは増殖抑制濃度でほとんどの遺伝子で発現が減少していたが、10%以上と大量の投与が必要であった。オレアノール酸(OA)やウルソール酸を含むTriterpenoid添加においてもほとんどの遺伝子で発現の減少が認められたが、comDEの発現は増加していた(図2)。

以上の結果よりTriterpenoidは、quorum sensingシステムを介して抑制に関与している可能性が示唆された。キシリトールは大量に摂取することで副作用等があることが報告されていることから、複数の阻害剤を併用で用いることを検討し、triterpenoidとキシリトールを併用することで、それぞれの単独使用に比較し、triterpenoid 1/2量+キシリトール 1/10で同じ抑制効果があることが明らかとなった。複数の阻害剤を併用することでそれぞれの阻害物質を低濃度で使用することで効果的な予防に繋がることが示唆された。

一方、齲蝕原因菌が早期に口腔内に定着することも重症齲蝕に繋がる可能性となることから、重症齲蝕児とコントロール児の口腔細菌について次世代シーケンスを用いて比較検討を行い、重症齲蝕児の口腔内菌叢の特徴を明らかにすることを目指し、現在シーケンスの結果の解析を行っている。今後の研究に継続させる予定としている。

今回の研究を今後発展させることにより、個々の齲蝕原因菌の齲蝕原性を把握したうえでそれぞれに適した齲蝕予防法を開発するシステムの構築を行っていきたい。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 0件)

〔雑誌論文〕(計 0件) 投稿準備中

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。