

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 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592337

研究課題名（和文）プラーク細菌叢の網羅的解析結果を基盤にした成人齲蝕病因論の新たな進展

研究課題名（英文）The elucidation of the cause of adult caries based on the comprehensive analysis of plaque microbites

研究代表者

柴田 幸江 (SHIBATA YUKIE)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：30274476

研究成果の概要（和文）：う蝕未経験群のプラーク中の *Gemella* 属の分布割合はう蝕経験多発群に比べて高い傾向が認められた。また、*Gemella* 属の菌種の分布割合はう蝕未経験群のプラークでは形成課程を通じて *G. haemolysans* が高い割合を占めたのに対し、う蝕多発群では形成初期はう蝕未経験群と同様にほとんど *G. haemolysans* であったが、後期のプラークでは *G. haemolysans* のみではなく、*G. morbillorum* と *G. sanguinis* が高い比率で検出された。以上の結果から、プラーク中の *Gemella* 属の分布割合ならびに菌種が両群で異なっていることが明らかとなり、*Gemella* 属の菌種がう蝕抑制的な影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The distribution rate of *Gemella* in the plaque of the caries-free group showed the high tendency compared with that of the caries-experienced group. In the plaque of the caries-free group, *G. haemolysans* was detected predominantly during the biofilm formation stage. On the other hand, in the plaque of caries-experienced group, *G. morbillorum* and *G. sanguinis* were detected by the high ratio in the late stage, while *G. haemolysans* showed the high distribution rate in the early stage. These results indicate that the distribution rates of *Gemella* and *Gemella* species in a plaque differ between both groups, suggesting that *Gemella* may be involved in caries incidence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：う蝕、デンタルプラーク、*Gemella* 属

1. 研究開始当初の背景

う蝕発症にバイオフィルムとして形成されるデンタルプラークが決定的な病原因子として働くことは周知の事実であり、その成熟に伴い、細菌の種類ならびに各細菌の割合が変化し、病原性が増していくことは古くから

知られている。しかしながら、プラークを構成している細菌叢の経時的変化の根拠となっているのは未だに、1967年に Ritz HL が培養法を用いて行った研究結果であり（Microbial population shifts in developing human dental plaque, 1967）、

また、各個人のプラーク構成細菌の個体差を考慮に入れて、プラークの成熟過程を明らかにした報告は未だ無い。そこで、我々は平成20年度の萌芽研究において、う蝕の全くない者10名、う蝕が多発している者9名の合計19名に対して、焼結体合成ハイドロキシアパタイトのプレートと結合した義歯様装置を装着してもらい、装置装着後1, 2, 3, 4, 5, 7日目のプラークの細菌叢を、クローンライブラリー法に代わる新しい細菌叢分析法として、最近我々の研究室で新規に開発に成功した改良 Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法を用いて分析し、プラークの経日的変化を比較検討した。その結果、両群にそれぞれ4つずつの特異的なピークが認められ、う蝕未経験群ならびにう蝕多発群においてプラークの細菌叢全体の構成に顕著な違いがあることが明らかになり、ミュータンス連鎖球菌を主要なう蝕原性細菌とする従来のう蝕病因論だけでは十分に説明できなかった成人のう蝕発症メカニズムの解明に向けて大きく前進した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、う蝕原性プラークならびに非う蝕原性プラークに特異的に存在する細菌種をすべて特定し、それらの生化学的性状ならびにう蝕発症への関与を明らかにすることで、新たなう蝕原性細菌あるいはう蝕抑制細菌を同定し、新規成人う蝕病因論を確立することである。

先の萌芽研究の結果、う蝕未経験群を特徴づけているピーク49の分布割合はう蝕多発群に比べてう蝕経験のない群で極めて高いことが確認された。各ピークに対応する細菌種を我々の構築した口腔細菌データベースで検索したところ、ピーク49はほとんどが *Gemella* 属の細菌種であることが明らかとなり、*Gemella* 属の菌種にはう蝕を抑制する働きがある可能性が示唆された。近年、*Streptococcus oligofermentans* がう蝕細菌の産生した乳酸を酸化することで過酸化水素を発生し、う蝕細菌の生育を抑制することが報告されており (J Bacteriol, 2007)、*Gemella* 属の菌種のう蝕抑制機構を解明することは非常に興味深い。一方、他のピークについては、複数の菌属がその候補として挙げられ、特定の細菌の同定には至っていない。さらなる解析により、う蝕発症に関与する新たな細菌種を同定することは、新規成人う蝕病因論の進展、確立へと繋がる。

3. 研究の方法

被験者

DMFTが0の者 [う蝕未経験群] 9名、9以上の者 [う蝕多発群] 10名を対象とした。

ハイドロキシアパタイト (HA) ディスクを結合した義歯用装置を装着させ、装置装着後1, 2, 3, 4, 5, 7日目のHAディスク上よりプラークを回収した。加えて、唾液を採取した。

表1 被験者の特性

	う蝕未経験群 (n = 9)	う蝕多発群 (n = 10)
	Mean±SD	Mean±SD
年齢	23.2±2.0	24.1±2.4
歯数		
現在歯数	29.4±2.1	29.2±2.3
う蝕歯数	0	0.6±1.1
治療歯数	0	11.9±3.0
唾液流量 (ml/min)	1.4±0.6	1.2±0.5
	人数	人数
唾液緩衝能		
中等度	2	2
高度	7	8

DNA 抽出

プラークおよび唾液中の細菌からのDNA抽出はジルコニウムビーズとボルテックスミキサーを用いて行われた。

リアルタイムPCR法による菌数の同定

プラークおよび唾液中の総菌数の測定には検量線サンプルに *Streptococcus mutans* UA159 を用いた。リアルタイムPCR法はSYBR Green I 検出系により行った。

クローンライブラリー法

約700 bpの16S ribosomal DNA断片を増殖し、pBluescriptSKに挿入して塩基配列を決定した。

Gemella 属の釣菌

被験者の歯面からプラークを採取し、段階的希釈を行ってコロニーCNA5%ヒツジ血液寒天培地に接種した。5% CO₂ 存在下で培養し、コロニー形態を観察して、*Gemella* 属を釣菌した。その際、ATCCより購入した *Gemella* 属の標準株である *G. haemolysans* ATCC 10379、*G. morbillorum* ATCC 27824 および *G. sanguinis* ATCC 700632 のコロニー形態を参考にした。

Gemella 属の同定

釣菌したコロニーを再びコロニーCNA5%ヒツジ血液寒天培地に接種し、増殖した菌体より染色体DNAを抽出した。*Gemella* 属特異プライマーを用いてPCRを行い、16S ribosomal DNA断片(約700 bp)の増殖を確認した。

さらに、菌種を同定するために、約1300 bp

の 16S ribosomal DNA 断片を増殖し、塩基配列を決定した。

ATCC より購入した *Gemella* 属の 3 標準株についても、同様に、約 1300 bp の 16S ribosomal DNA 断片の塩基配列を決定し、被験者から得られた塩基配列と比較した。

分離した *Gemella* 属細菌種の生化学的性状

アビストレップ 20 (シスメックス・バイオメリュー社) を用いて、分離した *Gemella* 属細菌種の生化学的性状を調べた。測定はキットに添付された文書に従って行った。

生育阻害実験

菌の濁度 (OD₅₅₀ の吸光度) を同一にした *S. mutans* UA159 株および *Gemella* 属標準株 3 菌種ならびに被験者から分離同定した *Gemella* 属を Brain heart infusion (BHI) 寒天培地に 5 μl 滴下し、5% CO₂ 存在下で培養した。2 日間培養後、菌の生育を観察した。

4. 研究成果

う蝕未経験群とう蝕多発群における HA 上に形成されたプラークならびに唾液中の細菌数の比較

総菌数に関しては、う蝕多発群のプラークの方がう蝕未経験群のプラークに比べて形成初期に有意に多かった。*Gemella* 属菌数は両群で有意な差は形成過程を通じて認められなかった。唾液中の総菌数ならびに *Gemella* 属菌数は両群で差がなかった。*Gemella* 属の分布割合は 5 日目までう蝕経験多発群に比べて高い傾向が見られ、2 日目と 4 日目に有意差が認められた。7 日目になると両者の間に *Gemella* 属の分布割合の違いはなかった (図 1)。

図1 総菌数と*Gemella*属菌数の経日変化

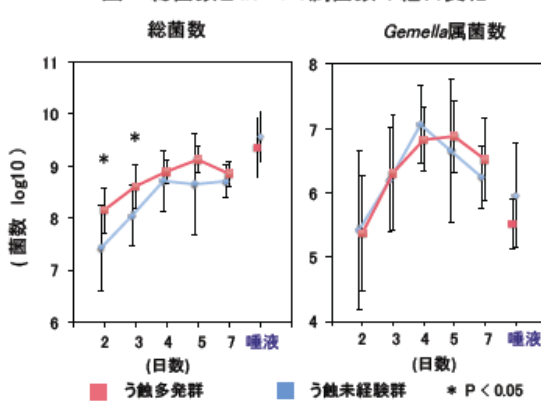
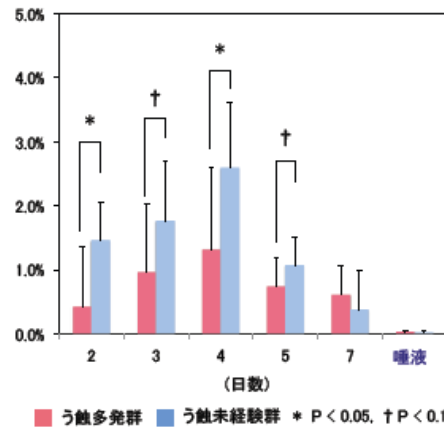


図2に示すように、う蝕未経験群のプラーク中の *Gemella* 属の割合は5日目までう蝕多発群に比べて高い傾向が見られ、2日目と4日目に有意差が認められた。

図2 総菌数に占める*Gemella*属菌数の割合



HA上に形成されたプラークおよび唾液中の *Gemella* 属の菌種同定

1日目のプラーク中に存在する *Gemella* 属は両群共にほぼ *G. haemolysans* であった。4日目と7日目のプラークではう蝕未経験群に比べてう蝕多発群において *G. haemolysans* のみでなく、*G. morbillorum* と *G. sanguinis* もが高比率に検出された (図3)。

唾液中に存在する *Gemella* 属はプラーク中に比べて両群とも *G. sanguinis* の分布割合が多くなった (図 4)。しかしながら、プラークと同様に唾液でも、う蝕多発群に比べてう蝕未経験群で *G. haemolysans* が有意に多く検出された。う蝕未経験群とう蝕多発群の *Gemella* 属菌種の平均分布を図5に示す。以上の結果より、*Gemella* 属の菌種構成はう蝕未経験群とう蝕多発群で異なっており、*Gemella* 属の菌種がう蝕抑制的な影響を及ぼしている可能性は示唆された。

図3 プラーク中の *Gemella* 属の菌種の比較

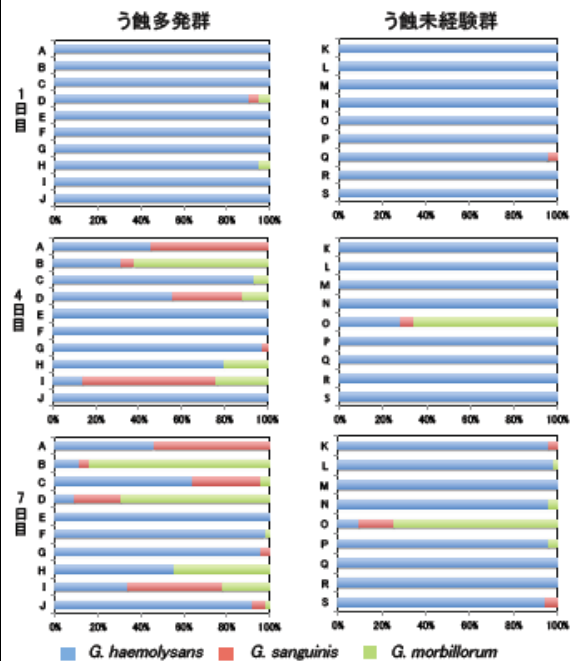


図4 唾液中の *Gemella* 属の菌種の比較

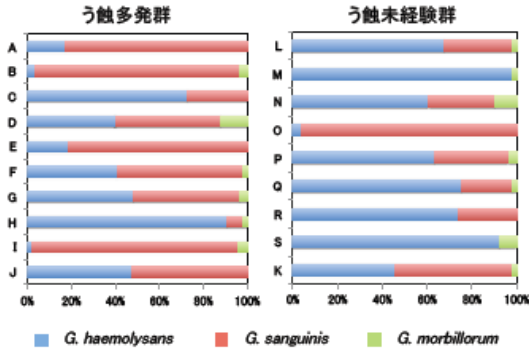
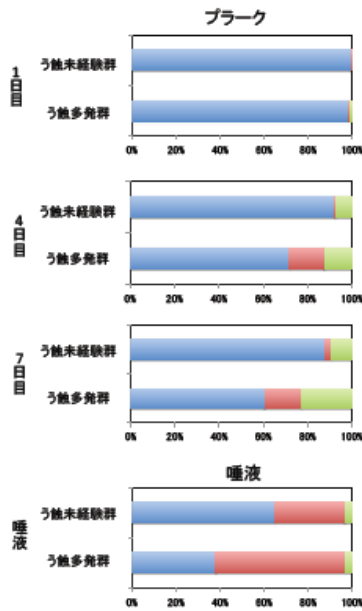


図5 う蝕未経験群とう蝕多発群の *Gemella* 属菌種の平均分布



被験者から分離された *Gemella* 属の同定

う蝕多発群の被験者8名中4名より *Gemella* 属6種(表2)、およびう蝕未経験群の被験者9名中7名より *Gemella* 属12種(表3)を分離した。約1300 bpの16S ribosomal DNA断片の塩基配列解析の結果、う蝕未経験群から分離した *Gemella* 属12種の内訳は、*G. haemolysans* 2種、*G. morbillorum* 10種、*G. sanguinis* 0種であった。一方、う蝕多発群から分離した *Gemella* 属6種はすべて *G. morbillorum* であった。

しかしながら、標準株と塩基配列が100%一致したのはう蝕未経験群の被験者1名から分離された2種のみであった。尚、今回決定した *Gemella* 属標準株の塩基配列はデータベースに登録されているものと100%一致した。

表2 う蝕多発群の被験者から分離された *Gemella* 属菌種の塩基配列解析

被験者	相同性		
	<i>G. haemolysans</i>	<i>G. morbillorum</i>	<i>G. sanguinis</i>
B	98.50%	99.80%	97.60%
C	98.50%	99.90%	97.70%
E	98.80%	99.00%	97.40%
G-1	98.80%	99.00%	97.40%
G-2	98.80%	99.00%	97.40%
G-3	98.30%	99.80%	97.60%

表3 う蝕未経験群の被験者から分離された *Gemella* 属菌種の塩基配列解析

被験者	相同性		
	<i>G. haemolysans</i>	<i>G. morbillorum</i>	<i>G. sanguinis</i>
K	98.90%	99.10%	97.50%
L-1	99.00%	99.10%	97.70%
L-2	98.50%	99.90%	97.70%
L-3	99.00%	99.10%	97.70%
M-1	98.60%	99.60%	97.60%
M-2	98.60%	99.60%	97.60%
M-3	98.60%	99.60%	97.60%
N	99.00%	99.10%	97.70%
O-1	98.40%	100%	97.70%
O-2	98.40%	100%	97.70%
P	99.80%	98.30%	98.50%
Q	99.80%	98.30%	98.50%

分離した *Gemella* 属細菌種の生化学的性状

Gemella 属標準株ならびに被験者より分離した *Gemella* 属菌種の生化学的性状を表4に示す。塩基配列で *G. haemolysans* と推定された2菌種は生化学的性状に関しても *G. haemolysans* 標準株と類似していた。

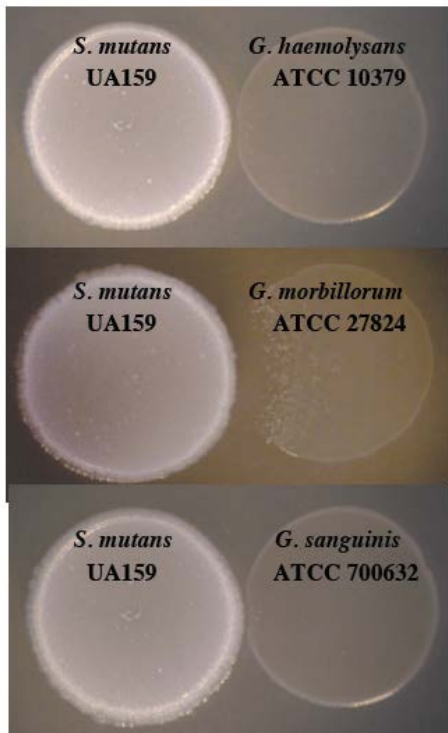
Streptococcus mutans の生育に対する *Gemella* 属の影響

Gemella 属の標準株3菌種はすべて *S. mutans* UA159株に対して生育阻害効果を示さなかった。一方、*S. mutans* UA159株は *G. morbillorum* ATCC 27824に対して生育阻害効果を示したが、*G. haemolysans* ATCC 10379および *G. sanguinis* ATCC 700632の生育には影響しなかった(図6)。また、*Gemella* 属3菌種間に阻害効果は認められなかった。生育阻害実験においては *S. mutans* UA159株と *Gemella* 属菌種の菌液を同時にスポットする方法と事前に *Gemella* 属菌種をスポットしておく方法を試してみたが、どちらも結果は同じであった。

表 4 Gemella属細菌種の生化学的性状

Strain	<i>G. haemolysans</i>	<i>G. morbillorum</i>	<i>G. sanguinis</i>	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
<i>G. haemolysans</i>	100%	98.40%	98.60%	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. morbillorum</i>	98.40%	100%	97.70%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. sanguinis</i>	98.60%	97.70%	100%	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
う蝕多発群																							
B	98.50%	99.80%	97.60%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	98.50%	99.90%	97.70%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
E	98.80%	99.00%	97.40%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G-1	98.80%	99.00%	97.40%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G-2	98.80%	99.00%	97.40%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G-3	98.30%	99.60%	97.60%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
う蝕経験のない群																							
K	98.90%	99.10%	97.50%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-1	99.00%	99.10%	97.70%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-2	98.50%	99.90%	97.70%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L-3	99.00%	99.10%	97.70%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-1	98.60%	99.60%	97.60%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-2	98.60%	99.60%	97.60%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-3	98.60%	99.60%	97.60%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	99.00%	99.10%	97.70%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-1	98.40%	100%	97.70%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
O-2	98.40%	100%	97.70%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
P	99.80%	98.30%	98.50%	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q	99.80%	98.30%	98.50%	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図 6 Gemella 属標準株 3 菌種に対する *S. mutans* UA159 株の生育阻害効果



被験者より分離した Gemella 属菌種と *S. mutans* UA159 株について生育阻害効果を調べた結果、塩基配列で *G. haemolysans* と推定された 2 菌種は *G. haemolysans* ATCC 10379 株と同様に *S. mutans* UA159 株によって生育を阻害されなかった。その他の *G. morbillorum* と推定された分離株に関してはすべて *S. mutans* UA159 株により生育阻害を受けた。

被験者から採取した歯面プラーク中の Gemella 属菌種の分布

培養法により同定されたプラーク中の Gemella 属細菌種は、う蝕未経験群では 12 菌種中 10 菌種 (83%) が *G. morbillorum*、2 菌種 (17%) が *G. haemolysans* であり、う蝕多発群では 6 菌種すべてが *G. morbillorum* であった。ハイドロキシアパタイト上に形成された 7 日目のプラークの菌叢解析では、う蝕未経験群では 9 名の被験者のうち 8 名に *G. haemolysans* が 90%以上存在し、う蝕多発群においても、10 名中 3 名は *G. haemolysans* が 90%以上検出された。これらの違いの原因が培養法によるものかどうか明らかにするために、再び被験者の歯面からプラークを採取し、以前行ったのと同様のクローンライブラリー法を用いて、被験者 4 名の歯面プラーク中の Gemella 属 3 菌種の分布を調べた (表 5)。被験者 4 名はすべてハイドロキシアパタイト上に形成された 7 日目のプラークからは *G. haemolysans* が 90%以上検出されていたが、今回の結果では 2 名から 3 菌種すべてが検出され、残りの 2 名からも 2 菌種が検出された。さらに、*G. haemolysans* が主流である者はひとりもいなかった。

表 5 被験者から採取した歯面プラーク中の Gemella 属菌種の分布

被験者	<i>G. haemolysans</i>	<i>G. morbillorum</i>	<i>G. sanguinis</i>
う蝕未経験のない群			
L	0%	80%	20%
M	10%	40%	50%
N	10%	90%	0%
R	20%	60%	20%

う蝕が多発する被験者とう蝕経験のない被験者のそれぞれから Gemella 属の細菌種を分

離培養して、それぞれの性質の特徴の解明を試みた。*Gemella*属の細菌種用の選択培地がないため、各被験者から*Gemella*属の細菌種を分離することは困難を極めたが、最終的にはう蝕多発群から6株とう蝕未経験群から12株の*Gemella*属の細菌種が分離でき、これらの生化学的性状も明らかになった。

また、実験プラークの遺伝子レベルの網羅的解析ではう蝕未経験群に*G. haemolysans*が多いという結果であったが、実際の歯面プラークからの分離頻度はう蝕未経験群およびう蝕多発群のいずれからも*G. morbillorum*が最も高頻度で分離された。実験プラークと実際の歯面プラークとの結果の違いは今後の研究課題であると思われる。

また、*G. haemolysans*, *G. morbillorum*, *G. sanguinis*が*S. mutans*との生育阻害に及ぼす影響を調べたが、いずれの細菌種も*S. mutans*の生育を阻害しなかった。その一方で、遺伝子レベルの網羅的解析でう蝕多発群により多く認められた*G. morbillorum*の生育が*S. mutans*によって阻害されたことは興味深い結果であり、今後の検討の余地がある。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 李 丹、柴田幸江、竹下 徹、安井雅樹、山下喜久：う蝕未経験者に特徴的なデンタル

プラークの構成細菌種. 第34回九州口腔衛生学会. 2012年10月7日、鹿児島市

(2) 李 丹、柴田幸江、竹下 徹、山下喜久：う蝕未経験者とう蝕多発者のプラークにおける *Gemella* 属菌種構成の違い. 第 62 回日本口腔衛生学会・総会. 2013 年 5 月 17 日、松本市

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 幸江 (Shibata Yukie)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：30274476

(2) 研究分担者

山下 喜久 (Yamashita Yoshihisa)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：20192403

(3) 連携研究者

()