

平成 2 6 年 6 月 9 日現在

機関番号： 3 2 6 5 0

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2011 ~ 2013

課題番号： 2 3 5 9 3 0 4 3

研究課題名（和文）口腔内細菌叢解析に基づく齲蝕・哺乳齲蝕病因論のリコンストラクション

研究課題名（英文）The etiology of dental caries may need to be refined: Based on the analysis of oral microbiome.

研究代表者

櫻井 敦朗（SAKURAI, ATSUO）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号： 9 0 4 3 1 7 5 9

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000 円、（間接経費） 1,200,000 円

研究成果の概要（和文）：代表者の所属する診療室に来院する小児から歯面プラークを採取し、ミュータンスレンサ球菌のほかに齲蝕の発生に影響する細菌種の検索を行ったところ、試料を得た小児の65%から乳酸桿菌属細菌を検出した。齲蝕を有する小児からの乳酸桿菌の検出率は有意に高かった。また、小児及びその母親から口腔内のswab検体を採取し、シーケンサーによる解析を行ったところ、小児の口腔の細菌叢は成人よりも多くの細菌種が存在している傾向にあり、また個体間でのバリエーションも豊富であることが示された。こうしたバリエーションは、小児期に発生する齲蝕の感受性に影響を与えている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：From 130 children, aged 2-7 years old, swab samples of teeth surfaces were collected after parental informed consent was obtained. Among Lactobacillus species, Lactobacillus salivarius was most frequently identified, followed by L. casei, L. fermentum, and L. gasseri. Especially, L. fermentum was predominantly identified from samples with high caries prevalence (dmf >6). Genetic diversity among the same Lactobacillus species in an individual sample is also related to high caries prevalence. In addition, analysis of oral microbiota in swab samples from children and their mothers revealed that oral microbiota in children showed much more abundance and diversity than in mothers. These characteristics might influence on a susceptibility of dental caries during early childhood age.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学 矯正・小児系歯学

キーワード： 口腔内細菌 レンサ球菌 乳酸桿菌 齲蝕 口腔疾患

1. 研究開始当初の背景

口腔には約 600 種類の細菌種が生息していると考えられており、さらに外界からも多様な微生物の侵入にさらされていることから、非常に複雑で多様な細菌叢が形成されている(Nature, 457:480, J. Dent. Res., 87:1016)。この細菌叢は人体に生じる様々な病態によって異なると考えられ、実際に口腔内の細菌に起因する心内膜炎や骨粗鬆症といった全身疾患、糖尿病の悪化との関連なども報告されている(J. Clin. Periodont., 35:362)。申請者のグループでも、これまで特に疾患の発症などに関与しないとされていたサングイスレンサ球菌の一部に、宿主上皮細胞に侵入し、かつ強い炎症応答を惹起させる菌株があることを報告した(Biochem. Biophys. Res. Commun., 391:1192)。しかし口腔内の細菌種のうち 60% 以上は培養できない未知の細菌種で占められており、ゆえに口腔内細菌に関する研究の手法は限定的なものにならざるをえない。さらに、細菌叢の全体像や個々の細菌が担う役割・働きなどはほとんど明らかとなっていない。

近年、高速シーケンサーの登場に代表されるようにゲノム解析の手法が著しく進展し、数十万塩基もの遺伝子配列が数時間で取得できるようになってきた。得られた情報をウェブ上のデータベースと照合すればその遺伝子がどんな細菌種に由来するものであるかを推定することができる。この方法によって理論上は口腔の細菌叢の全貌を解析することもでき、実際に健康状態と細菌叢の関連性の解明を目指したメタゲノムプロジェクトが開始されたが、特に口腔内の場合、細菌叢の動的な変化・複雑さのために未だに有益な情報が引き出せていないのが現状である(Nat. Med., 14:706)。しかし、口腔内細菌叢を高精度に解析し、健康な口腔環境のデータベースを構築し比較することは将来の口腔内細菌と疾患発症に関する研究面、早期発見・予防に向けた臨床面の双方から必須であると考えられる。

口腔感染症の代表的なものとして、齲蝕と歯周病が挙げられる。齲蝕は *Streptococcus mutans* や *Streptococcus sobrinus* という 2 種のミュータンスレンサ球菌に、歯周病は *Porphyromonas gingivalis* など数種の菌によって引き起こされると考えられている(Microbiol. Rev., 44:331, J. Mol. Bacteriol. Biotechnol., 2:341)。これらの菌は過去の膨大な研究のデータから確かに齲蝕や歯周病の発生に強く関与していると考えられるのだが、一方で、齲蝕や歯周病患者から採取した試料にも培養できない、解析のされていない細菌が多く存在することには目が向けられていない。また、近年は歯周病菌の増殖を阻害するレンサ球菌の存在など口腔内細菌種間での相互作用についても報告が多いことから(J. Dent. Res., 88:1026)、単一の細菌を対象に感染させる研究のみによって口腔内に存在する 1 つの菌種の病原性を決定づける

には不十分である。特に齲蝕では、申請者が所属する小児歯科の臨床において、歯冠部全体が溶けるように進行する乳幼児期の哺乳齲蝕を未だに多く目にする。しかし哺乳齲蝕の進行様式や形態は、いわゆる不潔域に形成される一般的な齲蝕とは全く異なっており、同じようにミュータンスレンサ球菌を中心とした齲蝕発生メカニズムが当てはまるのかということについては、大いに疑問の残るところである。

2. 研究の目的

本研究では口腔内細菌叢に関するデータをもとにして、齲蝕発生に関わる細菌・それらの細菌間の相互作用・細菌と宿主との相互作用を解析した。口腔内細菌に起因する疾患は近年糖尿病や心臓疾患が取りざたされているところであるが、まずは主たる口腔感染症である齲蝕について、これまでのミュータンスレンサ球菌を中心とした齲蝕病因論をもう一度見なおしたいと考えた。

まず、研究者の所属する大学に来院する患児を哺乳齲蝕群、通常の齲蝕群、齲蝕のない対照群に分類し、それぞれの口腔内細菌叢のデータをできるだけ高精度に得ることを試みた。培養可能な菌種については保存した。その後、各群において特異的または共通であることからピックアップした菌種について口腔内環境と該当菌種の菌数・菌株数などの相関を解析した。その後それらの菌種について、齲蝕発生との関わりを詳細に解析した。以上のような方法を通じて、口腔内細菌叢全体から齲蝕発生メカニズムに影響を与える因子を明らかにすることを試みた。

歯科領域において、齲蝕や歯周病に関する研究は数多く行われており、先述のように数種類の細菌が原因菌とされている。現在はそれらの持つビルレンス因子に関する解析が多く行われているものの、本研究のように口腔内細菌叢を構成する他の菌の疾患への影響について顧みられることは多くない。齲蝕については *Lactobacillus* 属細菌(乳酸桿菌)が主たる原因菌とされた時代もあったにもかかわらず、歯面付着能の低さなどからいつしか研究対象から外されてきた歴史がある(Infect. Immun., 33:690)。また、ヒトの口腔内細菌叢や食習慣を再現できる動物モデルは存在しないため、未知または解析がされていない細菌種の中にも新たな原因菌が存在する可能性がある。本研究は、近年の遺伝子解析技術の進歩を利用し、口腔内細菌叢全体をターゲットにする点で以前の研究とは異なっており、これまで明らかとなっていなかった菌種の齲蝕発生への関与が明らかとなる可能性が高いと考えた。特に乳酸桿菌については多く解析を行い、当然口腔内細菌叢解析によって候補となる菌種はできるだけ解析を加えることにした。

3. 研究の方法

1) 被験者からの試料の採取、保存、細菌由

来ゲノム DNA の抽出

申請者の所属する大学の診療科に来院する患児を対象に、保護者に対する十分な説明の上で唾液、歯面プラークの試料を採取した。患児は齲蝕の有無により 哺乳齲蝕を認める(哺乳齲蝕群: 概ね 2~3 歳)、乳臼歯部を中心とする一般的な齲蝕を認める(齲蝕群: 概ね 3~7 歳)、齲蝕を認めない(対照群: に対応する年齢, 2~7 歳)の 3 群に分けた。対象となる患児については、齲蝕の有無のほか、口腔内清掃状態や歯肉の状態など詳細な口腔内診査を記録し、刷牙習慣や食事などの生活習慣に関するアンケートを行った。試料は以下のように用いた。

(a) 細菌培養培地にて嫌気、非嫌気の各条件下で培養し、培養可能な菌体はグリセロール含有培地で保存した。以後、必要に応じて単離培養を行った。

(b) 市販のキットに若干の変更を加えた方法により細菌由来のゲノム抽出を行った。

2) 口腔内細菌叢に関するデータ取得、解析

遺伝子シーケンス、菌種同定に利用する系統マーカー遺伝子としては、最も使用されている 16S rRNA 遺伝子を用いた。前項で得られたゲノム DNA をテンプレートとして、細菌の 16S rRNA 遺伝子の一部(約 400 bp)の増幅を行った。本研究では、すでに作製してある細菌の 16S rRNA を網羅的に増幅することが可能なユニバーサルプライマーを用いた。高速シーケンサー Roche 454 FLX titanium によって遺伝子シーケンスを行ない、試料 1 つに対し 5,000 以上の配列を取得した。得られた配列はウェブ上のデータベースと照合して細菌種を推定した(DNA Res., 14:169)。試料に同じ配列が多く含まれると、該当する菌種が多く存在することになる。その後、各試料間、各群間における比較を行ない、各群に共通で多く含まれる菌種、特異的に認められる菌種をピックアップした。ピックアップの基準としては取得した遺伝子配列より明らかになる菌種から、全体の 0.1%以上存在するものとした。

3) ピックアップした菌種の菌数・菌株数と口腔内診査・アンケートとの相関解析

前項でピックアップされた菌種については、すでに採取した試料のほか、新たに対象とする患児より試料を採取し、(a) 寒天添加選択培地上で希釈した試料を播種し菌数をカウント、(b) 特異的プライマーを用いた定量的 PCR、のいずれかの方法で試料中の菌数、細菌叢全体に占める割合を測定した。また、同一試料より得られた一つの菌種であっても、すべてが同じ遺伝子プロファイルを持った単一の菌株に由来するとは限らず、また *Lactobacillus fermentum* などでは複数の菌株を口腔内に有していると齲蝕が多くなるという報告がある (Mol. Oral Microbiol., 25:157)。そのため寒天培地上のコロニーを各試料につき数個採取し、ゲノム DNA を抽出後各種

制限酵素による処理を行う。その上で CHEF-DRII によるパルスフィールドゲル電気泳動を行うことで、一つの試料中の同一菌種内に異なる遺伝子プロファイルを持つ菌株がないかを検索した。得られた結果は、前項の結果と共に口腔内診査記録や生活習慣に関するアンケートと照合し、相関の有無を検討した。

4) ピックアップした菌種の齲蝕原性に関する解析および既知の齲蝕原性菌との相互作用に関する解析

ピックアップした菌種について齲蝕発生との関わりを詳細に解析した。同一試料から得られた同菌種でも遺伝子構造が大きく異なることも多いため、各菌種の中でも可能な限り多くの菌株について解析を進めた。菌種間の相互作用については既知の齲蝕原性菌とピックアップした菌、またはピックアップした菌種同士の複数の組み合わせによって解析し、培地中や唾液コートしたハイドロキシアパタイトなど存在下での菌増殖や歯面への付着能試験、バイオフィーム形成の評価、酸産生能試験を行った(J. Dent. Res., 80:1672)。それぞれの試験は単独の菌を供試した場合と比較した。

以上の研究によって、各群に特異的な菌種を供試した場合は齲蝕抑制・発生にはたらく菌種・菌株、可能な限り原因因子を、共通の菌種を用いた場合は各群の菌株間で齲蝕形成に影響を与える菌株・原因因子を明らかにすることを試みた。得られたデータをもとに口腔内細菌叢からの齲蝕発生リスク予測、齲蝕予防・早期治療に活かせる系を構築したい。また、口腔内細菌叢に関するデータは他の疾患との関連を明らかにする今後の研究にも利用したい。

4. 研究成果

本研究では当初目標とした人数より多い、患児 130 名から試料を得ることができた。また、成人と小児の口腔内細菌叢の比較についても、25 組の母子から試料を得た。ミュータンスレンサ球菌を除く口腔内細菌のうち、特に乳酸桿菌属細菌に着目して保有の有無を解析したところ、患児の 65% から乳酸桿菌属細菌を検出した。菌種が同定された細菌種は、多くが *L. salivarius*, *L. casei* であり、少数ながら *L. fermentum*, *L. gasseri* も検出された。齲蝕のない患児から得た試料からは 33% で乳酸桿菌属細菌を検出したのに対し、齲蝕を有する患児からは 75% とその検出率が有意に高かった。特に *L. fermentum* の検出と齲蝕の有無には強い相関が見られた(図 1)。遺伝子核型解析では、同じ試料から得た同一の細菌種でもその遺伝子構造にバリエーションを有する場合、齲蝕の保有率が上昇する傾向が見られた(図 2)。また、16S rDNA をターゲットにした遺伝子シーケンスによる口腔内細菌叢解析では各試料から最低 5000reads の遺伝子情報を得ることができ

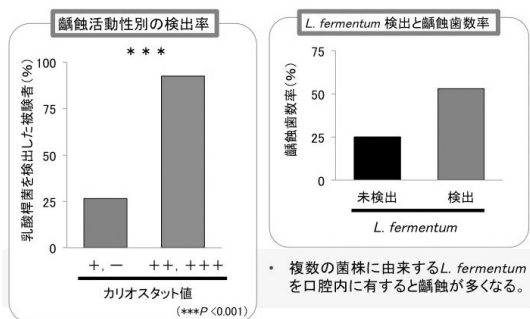


図 1 : *L. fermentum* の検出と齲蝕歯率

た．小児は成人よりも口腔内に多くの細菌種が存在しており，個体間のバリエーションが多い傾向があることが示された．口腔内細菌叢と口腔疾患の関連について，今後さらに解析を進める必要がある．

乳酸桿菌は歯面付着性が低いとされているが，本研究では歯面から得られた試料をまずショ糖含有培地で培養することで，採取時に歯面に付着しており，かつ耐酸性の高い乳酸桿菌の検出を試みた．*L. fermentum* の保有と齲蝕発生との関連については，これまでの報告と一致する．しかし，遺伝子核型解析をすることによって同菌種であっても遺伝子構造にバリエーションを有する場合は齲蝕発生に影響を与えることが示された．遺伝子構造におけるバリエーションの存在は，口腔内への同一菌の定着が複数のソースから成立した可能性を示唆している．本研究で検出された乳酸桿菌が実際に歯面に定着していたものかどうかは更に検討が必要だが，今回の結果は唾液等から乳酸桿菌の検出を試みた他の報告とは大きく異なっており，*L. salivarius*，*L. casei* および *L. fermentum* の小児齲蝕発生への関与を示唆していると考えられる．

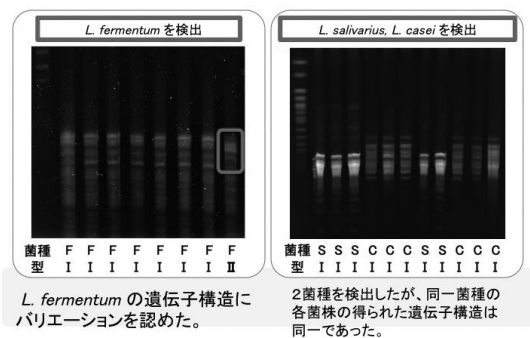


図 2 : 遺伝子核型解析 (パルスフィールドゲル電気泳動) と齲蝕重症度との関連

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 8 件)

- 1) N. Okahashi, T. Okinaga, A. Sakurai, Y. Terao, M. Nakata, K. Nakashima, S. Shintani, S. Kawabata, T. Ooshima, T. Nishihara. *Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death of macrophages in association with production of reactive oxygen species. FEMS Microbiology. 323:164-170, 2011. 査読有.
- 2) 桜井敦朗, 新谷誠康. 口腔内細菌に対する宿主免疫応答と疾患への関与. 小児歯科学雑誌. 50:22-30, 2012. 査読無.
- 3) T. Yonekura, H. Homma, A. Sakurai, M. Moriguchi, T. Miake, S. Toyosawa, S. Shintani. Identification, characterization, and expression of dentin matrix protein 1 gene in *Xenopus laevis*. Journal of Experimental Zoology. 320(8):525-537, 2013. 査読有.
- 4) 桜井敦朗. 隣接面齲蝕に対する予防法とその考え方. 小児歯科臨床, 18(5), 36-45, 2013. 査読無.
- 5) N. Okahashi, T. Sumitomo, M. Nakata, A. Sakurai, H. Kuwata, S. Kawabata. Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci. Pros One. 9(1):e88136, 2014. 査読有.
- 6) 岩田美奈子, 小鹿裕子, 浦野絢子, 荒井亮, 山頭亜里沙, 陽田みゆき, 辻野啓一郎, 桜井敦朗, 大多和由美, 新谷誠康, 山下秀一郎. 歯科大学病院小児歯科における初診患者の実態調査. 小児歯科学雑誌. 52(1):47-53, 2014. 査読有.
- 7) 小鹿裕子, 岩田美奈子, 浦野絢子, 荒井亮, 山頭亜里沙, 陽田みゆき, 辻野啓一郎, 桜井敦朗, 大多和由美, 新谷誠康, 山下秀一郎. 歯科大学病院小児歯科における低年齢児齲蝕の実態調査. 小児歯科学雑誌. 52(1):54-61, 2014. 査読有.
- 8) 桜井敦朗, 新谷誠康. エナメル質形成不全 (MIH)—わが国における MIH 発症に関する大規模調査から. Journal of Health Care Dentistry. 14(1), 6-12, 2014. 査読有.

〔学会発表〕(計 16 件)

- 1) 高橋直子, 桜井敦朗, 本間宏実, 新谷誠康. 小児口腔より検出された乳酸桿菌属細菌の構成と小児齲蝕発生への影響に関する考察. 第 292 回東京歯科大学学会, 2011 年 10 月 15 日.
- 2) 桜井敦朗. 口腔内細菌に対する宿主免疫応答と疾患への関与. 日本小児歯科学会. 2011 年 11 月 28 日. 盛岡. 招待講演.
- 3) 高橋直子, 桜井敦朗, 本間宏実, 新谷誠康. 小児口腔に存在する高耐酸性乳酸桿菌属細菌の齲蝕原性に関する解析. 第 50 回日本小児歯科学会, 2012 年 5 月 12 日. 東京.
- 4) 本間宏実, 桜井敦朗, 高橋直子, 大嶋隆, 新谷誠康. 線毛 pili を発現する *S. sanguinis* の宿主細胞への侵入性と炎症性応答の惹起.

- 第 50 回日本小児歯科学会, 2012 年 5 月 12 日・東京。
- 5) Naoko Takahashi, Atsuo Sakurai, Hiromi Homma, Seikou Shintani. Identification and genomic comparison of *Lactobacillus* species on teeth surfaces in Japanese children, Pediatric Dentistry Association of Asia, 2012 年 5 月 25 日・Bali, Indonesia.
 - 6) 桜井敦朗. 子どものむし歯の現状と最近のむし歯予防論. 多摩市教育委員会平成 24 年度学校歯科講習会. 2012 年 6 月 28 日・東京. 招待講演.
 - 7) 米倉智子, 本間宏実, 桜井敦朗, 森口美津子, 見明康雄, 豊澤悟, 新谷誠康. *Xenopus laevis* の硬組織石灰化に關与する DMP1 の発現解析. 第 294 回東京歯科大学学会, 2012 年 10 月 20 日・千葉.
 - 8) 桜井敦朗. 子どもの齲蝕をとりまく現状～近年流行の齲蝕予防法を検討する～. 千葉県小児歯科医会平成 24 年度学術講演. 2012 年 12 月 2 日・千葉. 招待講演.
 - 9) 新居由紀, 桜井敦朗, 今井裕樹, 中内彩乃, 江木勝彦, 米倉智子, 石岡みずき, 本間宏実, 児島泰子, 熊澤海道, 山下治人, 泉水祥江, 米津卓郎, 杉山精一, 新谷誠康. わが国における Molar Incisor Hypomineralization (MIH) の実態調査. 第一報 MIH の発症頻度と重症度について. 第 51 回日本小児歯科学会 2013 年 5 月 23 日・岐阜.
 - 10) 本間宏実, 今井裕樹, 桜井敦朗, 中内彩乃, 江木勝彦, 新居由紀, 米倉智子, 石岡みずき, 児島泰子, 熊澤海道, 山下治人, 泉水祥江, 米津卓郎, 杉山精一, 新谷誠康. わが国における Molar Incisor Hypomineralization (MIH) の実態調査. 第二報 MIH 発症に影響を与える要因の解析. 第 51 回日本小児歯科学会 2013 年 5 月 23 日・岐阜.
 - 11) 米倉智子, 本間宏実, 桜井敦朗, 森口美津子, 見明康雄, 豊澤悟, 新谷誠康. 両生類 *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル) における DMP1 遺伝子の同定および発現解析. 第 51 回日本小児歯科学会, 2013 年 5 月 24 日・岐阜.
 - 12) Ayano Nakauchi, Atsuo Sakurai, Hiroki Imai, Yuki Arai, Katsuhiko Egi, Seiichi Sugiyama, Seikou Shintani. Investigation of Molar incisor hypomineralization (MIH) in Japanese children. The 24th IAPD 2013 Seoul, 2013 年 6 月 14 日・Seoul, Korea.
 - 13) 岡橋暢夫, 沖永敏則, 桜井敦朗, 寺尾豊, 中田匡宣, 川端重忠, 西原達次. *Streptococcus sanguinis* はマクロファージの泡沫化と細胞死を誘導する (*Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death of macrophages). 第 86 回日本細菌学会, 2013 年 3 月 19 日・千葉.
 - 14) 岡橋暢夫, 沖永敏則, 桜井敦朗, 寺尾豊, 中田匡宣, 川端重忠, 西原達次. 過酸化水素は口腔レンサ球菌の隠れた病原因子かも

しれない. 第 55 回基礎歯科医学会, 2013 年 9 月 22 日・岡山.

- 15) 米倉智子, 本間宏実, 桜井敦朗, 森口美津子, 見明康雄, 豊澤悟, 新谷誠康. 両生類 *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル) における DMP1 遺伝子の同定および発現解析. 第 55 回基礎歯科医学会, 2013 年 9 月 22 日・岡山.
- 16) 本間宏実, 桜井敦朗, 高橋直子, 江木勝彦, 永井宜子, 新谷誠康. 小児口腔の乳酸桿菌属細菌を中心とした口腔内細菌の構成と齲蝕発生への影響. 第 28 回日本小児歯科学会関東地方会. 2013 年 10 月 27 日・横須賀. 招待講演

〔図書〕(計 6 件)

- 1) 桜井敦朗. 小児齲蝕症 授乳と齲蝕の関係をどのように指導するか. デンタルダイヤモンド春期特別号「小児歯科はいま、成育医療へ」, 94, 2011.
- 2) 桜井敦朗. 小児齲蝕症 最新の齲蝕病因論. デンタルダイヤモンド春期特別号「小児歯科はいま、成育医療へ」, 96, 2011.
- 3) 桜井敦朗. 小児齲蝕症 哺乳齲蝕とその対応. デンタルダイヤモンド春期特別号「小児歯科はいま、成育医療へ」, 101, 2011.
- 4) 桜井敦朗. 歯冠修復処置 乳臼歯コンボジットレジン修復の適応とその対応. デンタルダイヤモンド春期特別号「小児歯科はいま、成育医療へ」, 138, 2011.
- 5) 桜井敦朗. クランプの種類と適応. デンタルダイヤモンド, 38(1), 116-117, 2013.
- 6) 桜井敦朗. 母親への授乳中止時期の指導. デンタルダイヤモンド, 39(5), 109-110, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桜井 敦朗 (SAKURAI, Atsuo)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 9 0 4 3 1 7 5 9

(2) 研究分担者

新谷 誠康 (SHINTANI, Seikou)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 9 0 2 7 3 6 9 8

丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 3 0 4 2 3 1 2 2