

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792357

研究課題名(和文)象牙質う蝕の進行性を促進する口腔細菌種構成の解明

研究課題名(英文)Identification of the microbiota in carious dentin lesions

研究代表者

富岡 未記子(Tomioka, Mikiko)

九州大学・歯学研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：70546473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：32名の被検者からう蝕象牙質を採取し、分子生物学的手法を用いて、う蝕象牙質に存在する細菌叢の網羅的解析を試みた。う蝕象牙質サンプルの細菌構成のクラスター解析を行った結果、Lactobacillus の比率の違いにより大きく3グループ(I、II、III)に分類された。グループIIはLactobacillus属が全体の70%を占めるシンプルな細菌構成であった。グループIIIは最も多く存在する菌属がPropionibacterium属やOlsenella属という今までに報告のない日本人特有の細菌構成であり、両菌属の主要な菌種はP. acidifaciensとO. profusaであった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the bacterial communities in the carious dentin of Japanese subjects were analyzed comprehensively using molecular approaches. Carious dentin lesion samples were collected from 32 subjects. The bacterial composition was classified into clusters I, II, and III according to the relative abundance (high, middle, and low, respectively) of Lactobacillus. Cluster I consisted of high proportions of Lactobacillus. The bacterial communities in cluster III were characterized by the predominance of Propionibacterium or Olsenella. Clusters mainly related to Olsenella and Propionibacterium, were novel combinations of microbiota in carious dentin lesions and may be characteristic of the Japanese population. Clone library analysis revealed that O. profusa and P. acidifaciens were specific species associated with dentinal caries among these genera in a Japanese population.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：う蝕象牙質 細菌叢

1. 研究開始当初の背景

う蝕の発症メカニズムについては多くの基礎的研究が遂行され、エナメル質う蝕に関与する細菌の実態は明らかになってきた。しかしながら、エナメル質う蝕が象牙質に達してさらに進行していく過程で重要な役割を果たす細菌についての情報は非常に少ない。いくつかの研究グループがう蝕象牙質中に存在する細菌を培養法で同定し、*Lactobacillus* 属、*Prevotella* 属、*Propionibacterium* 属、*Bifidobacterium* 属などが分離されたことを報告している。なかでも、*Lactobacillus* 属は被検歯の3分の1に見出されて、最も優勢であり、*Streptococcus* 属の検出率は非常に低いことが示された。一方、歯肉縁上プラーク中からは *Streptococcus* 属が高率に検出され、*Lactobacillus* 属は非常に低い比率でしか検出されないことが明らかにされている。このような両者の細菌叢の違いからみても、エナメル質う蝕の原因菌とは異なる細菌種が象牙質う蝕の進行に重要な役割を果たしている可能性が非常に高い。さらに、エナメル質と象牙質の構造の違い(エナメル質はほとんど無機質であり、有機質は1%であるのに対し、象牙質には20%程度有機質が存在し、その主成分はコラーゲンである)を考えると、象牙質う蝕のメカニズムはエナメル質う蝕のメカニズムとは異なるものであることが容易に想像される。しかしながら、象牙質う蝕の最前線で、象牙質う蝕を進行させ、歯髄炎へと至らしめている細菌叢の詳細、個々の細菌種については未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、う蝕象牙質中に存在する細菌を網羅的に調べ、その細菌叢の構成を明らかにすること、そして、同定された細菌種の生化学的性状を調べ、象牙質う蝕の進行に重要な役割を果たしている細菌種ならびに細菌種構成を特定することである。

本研究により特定の細菌種が同定できれば、残存象牙質に対して効果的な抗菌剤の使用など象牙質う蝕の進行を抑制する治療の開発につながり、歯髄炎発症から抜髄、そして抜歯へという負のスパイラルを断ち切ることができる。また、縁上プラーク細菌叢とう蝕象牙質細菌叢との関連性が明らかになれば、縁上プラークの細菌叢を解析することで、象牙質う蝕の進行性を判断することも可能となる。

さらに、近年、8020運動の普及により残存歯が増加するにつれ、高齢者に多発する根面う蝕が問題となっている。根面う蝕の進行はそのまま歯の喪失につながり、高齢者の歯の喪失要因のひとつである。よって、高齢者の歯の喪失を予防するという観点から、根面う蝕対策の早期実施が待ち望まれている。根面う蝕も典型的な象牙質う蝕であり、本研究の成果は根面う蝕対策にも重要な指針を与え

るものとなり得る。

3. 研究の方法

被験者および被験歯

被験者は九州大学病院歯内治療科および協力歯科医院を受診した患者で、う蝕治療を要する者のうち、本研究内容の説明を行って同意を得られた患者32名(男性17名、女性15名、平均年齢25 ± 20.1歳)を対象とした。被験歯は乳歯11歯、永久歯21歯である。

サンプル採取

表層のう蝕象牙質を除去した後、深層のう蝕象牙質を滅菌済スプーンエキスカベータにて採取した。

DNA抽出

う蝕象牙質中の細菌からの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。

バーコードパイロシーケンス法

サンプル別にそれぞれバーコード配列の異なるプライマーを用いて、32サンプルの抽出DNAから約300 bpの16S ribosomal DNA断片を増幅し、RocheのGenome Sequencer FLX instrumentを用いて塩基配列を決定した。

クローンライブラリー法

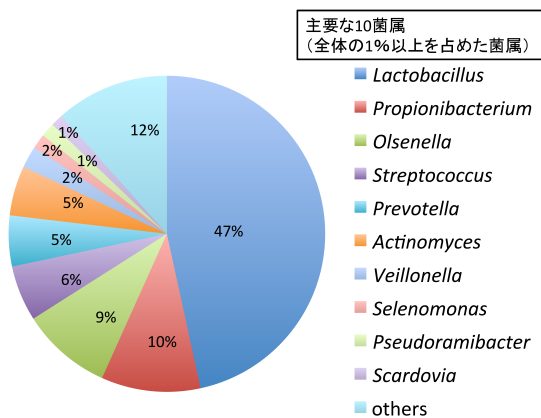
約700 bpの16S ribosomal DNA断片を増殖し、pBluescriptSKに挿入して塩基配列を決定した。

4. 研究成果

う蝕象牙質における平均的な細菌構成

う蝕象牙質32サンプルについて、バーコードパイロシーケンス法を用いて16S rRNA遺伝子塩基配列を合計93,969リード(各サンプル平均2,551リード)解読したところ、8菌門、71菌属が同定された。全体の1%以上を占めた菌属は、71菌属中10菌属で、その割合を図1に示す。

図1 う蝕象牙質における平均的な細菌構成



これまで報告されていた *Lactobacillus* 属

が47%と約半分を占め、次に *Propionibacterium* 属(10%)、*Olsenella* 属(9%)が続いた。これら2つの細菌属がう蝕象牙質に存在はすることは知られていたが、これほど多い割合で検出されたのは今回が初めてである。そして、う蝕原因菌である *S. mutans* が属する *Streptococcus* 属は4番目に多い6%であった。

う蝕象牙質サンプルの細菌構成比率

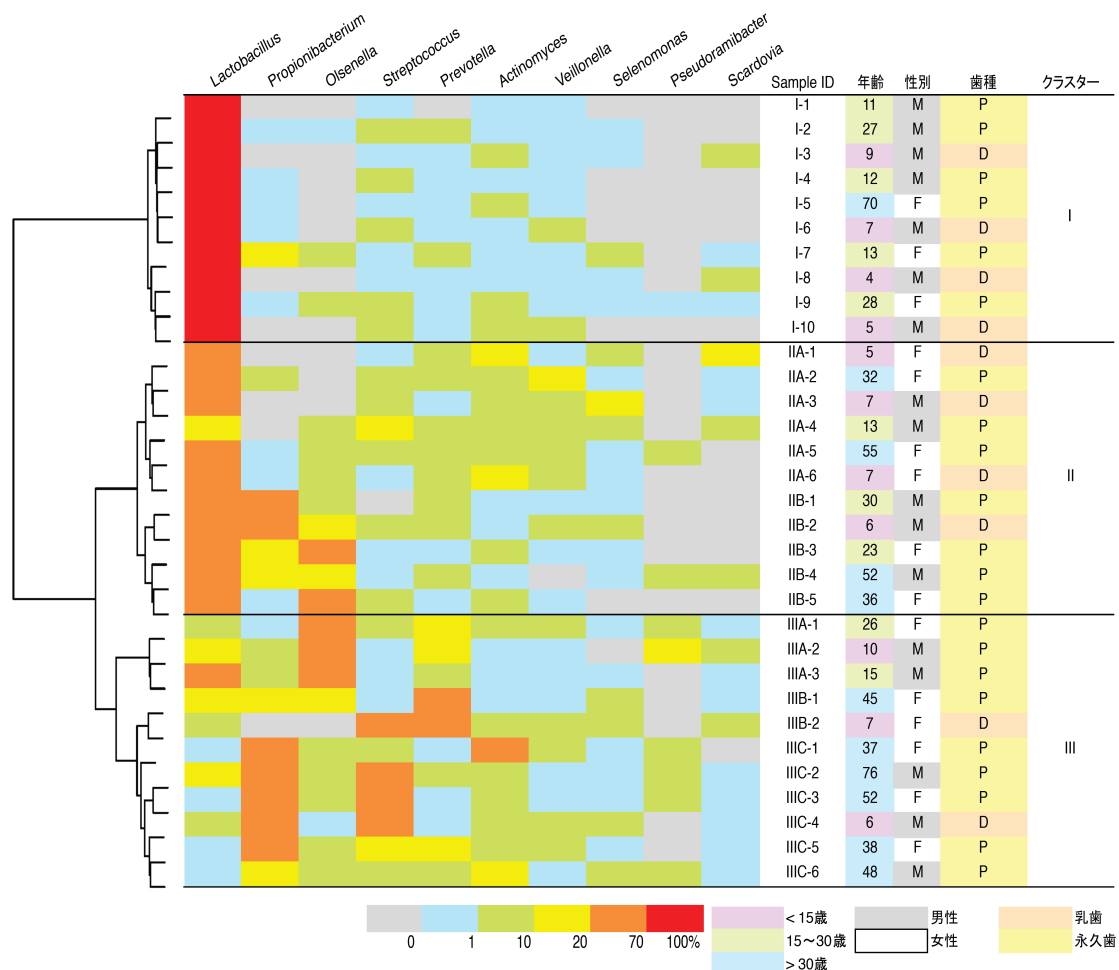
32のう蝕象牙質サンプルの細菌構成についてクラスター解析を行い、細菌構成の類似度に基づいてサンプルを分類した(図2)。横軸に主要な10菌属を並べており、各サンプルにおける10菌属の構成割合を色で示した(ヒートマップ)。図の下方に示している通り、赤色は70~100%存在することを示しており、色の変化に従ってその比率が低くなっている。その他の情報として、年齢、性別、歯種を明記した。

図2に示すように、う蝕象牙質内の細菌構成は、全て同じ構成ではなく、サンプルによって細菌の種類やその比率が異なることがわかった。そして、クラスター解析の結果から、*Lactobacillus* 属の比率の違いにより大きく3グループ(I、II、III)に分類された。3グループの細菌構成を比較検討した結果、グループIは *Lactobacillus* 属が全体の70%

を占めるシンプルな細菌構成であった。グループIIは *Lactobacillus* 属が最も多く存在することはグループIと同様であるが、70%には及ばず、他の菌属の存在もある程度認められた。さらに、グループIIIは最も多く存在するのが *Lactobacillus* 属以外の菌属(*Propionibacterium* 属や *Olsenella* 属等)であり、グループI、IIに比べて細菌叢が複雑であるという特徴を示した。う蝕象牙質においてグループIIIのような細菌構成は今までに報告されたことが無く、日本人特有の細菌構成であることがわかった。

次に、これらの細菌構成の違いに影響を与える因子について検討した。これまでう蝕の有病率においては女性の方が男性に比べて高く、性差があるとされてきたが、う蝕象牙質の細菌構成においては性別との関連は認められなかった。年齢については、30歳以上のサンプルがグループIIIに多く存在することがわかった。すなわち、*Lactobacillus* 属の比率が高いクラスターでは小児および若年者が多く、*Lactobacillus* 属以外の菌属が優勢であるクラスターでは成人が多く認められた。年齢によってう蝕象牙質の細菌構成が異なる傾向にあり、年齢が高くなるにつれ *Lactobacillus* 属以外の菌により複雑な細菌構成を形成していることが示唆された。

図2 細菌構成比率分布



Propionibacterium, Olsenella, Streptococcus 属に該当する菌種の同定

今回の研究ではう蝕象牙質中に比較的高い比率で *Propionibacterium* 属と *Olsenella* 属が存在することがわかった。これまでの研究では両菌属の存在は報告されていたが、存在比率がそれほど高くなかったため、菌種レベルまで明らかにした報告は未だ無い。そこで、今回、*Propionibacterium* 属と *Olsenella* 属、さらに4番目に多い *Streptococcus* 属に注目し、これらの菌属のいずれかがバーコードパイロシーケンス法にて10%以上を占める16サンプルについて、クローンライブラリー法を実施し、菌種レベルでの解明を試みた。その結果を図3に示す。*Propionibacterium* 属に関しては、*P. acidifaciens* と *P.*

propionicum が同定されたが、大部分は *P. acidifaciens* であった。*Olsenella* 属に関してはほとんどが *O. profusa* であった。さらに、*Streptococcus* 属については、*S. mutans*、*S. oralis*、*S. salivarius*、*S. sanguinis*、*S. vestibularis* が検出されたが、そのほとんどが *S. mutans* であった。

本研究により、う蝕象牙質の深い部分における細菌構成が明らかになり、主に成人の象牙質う蝕に関連すると思われる新たな菌種、*P. acidifaciens* と *O. profusa* の存在が明らかになった。さらに、う蝕発生に関与することが知られている *S. mutans* がう蝕の進行した部位であるう蝕象牙質においても、*Streptococcus* 属の主要な菌種として存在することがわかった。

図3 *Propionibacterium*、*Olsenella*、*Streptococcus* 属に該当する菌種の同定

Species	HOT	HOT															
		I7	IIA4	IIB2	IIB4	IIB5	IIIA1	IIIA2	IIIA3	IIIB1	IIIB2	IIIC1	IIIC2	IIIC3	IIIC4	IIIC5	IIIC6
Lactobacillus		32	21	13	30	24	0	0	1	0	1	3	1	0	0	0	0
<i>L. acidophilus</i>	529					3											
<i>L. crispatus</i>	817				8												
<i>L. fermentum</i>	608												1				
<i>L. gasseri</i>	615				2	14						3					
<i>L. oris</i>	709					6											
<i>L. paracasei</i>	716	19	21		7	1			1								
<i>L. reuteri</i>	818																
<i>L. rhamnosus</i>	749				1	2											
<i>L. salivarius</i>	756	11			7								1				
<i>L. vaginalis</i>	51				4												
<i>Lactobacillus</i> sp.	461	1															
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> str. ATCC BAA-365					8												
<i>L. delbrueckii</i> str. YIT 0080					4												
Propionibacterium		4	0	21	11	0	0	0	0	0	0	25	39	58	22	65	38
<i>Pro. acidifaciens</i>	191	4		21	11							25	39	58	22	65	35
<i>Pro. propionicum</i>	739																3
Olsenella		1	0	51	17		0	1	0	70	0	7	27	0	0	17	10
<i>O. profusa</i>	806	1		51	17					70		7	27			17	9
<i>Olsenella</i> sp.	807																1
Atopobium		0	2	0	6	66	92	95	91	0	4	0	0	0	0	2	0
<i>Ato. parvulum</i>	723										1						
<i>Ato. rimae</i>	750		2								3						
<i>Atopobium</i> sp.	416				6	66	92	95	91								2
Streptococcus		0	6	1	0	0	0	0	0	0	30	0	11	16	52	0	3
<i>Str. mutans</i>	686			1						30			11	9	56		
<i>Str. oralis</i>	707																1
<i>Str. salivarius</i>	755		2														
<i>Str. sanguinis</i>	758													7			2
<i>Str. vestibularis</i>	21		4														
Prevotella		0	1	0	0	0	0	0	0	21	7	0	0	0	0	3	0
<i>Pre. denticola</i>	291		1													3	
<i>Pre. histicola</i>	298										1						
<i>Pre. multisaccharivorax</i>	794									21							
<i>Pre. oris</i>	311										1						
<i>Pre. salivae</i>	307										1						
<i>Pre. veroralis</i>	572										4						
<i>Prevotella</i> sp.	292																
<i>Prevotella</i> sp.	300																
Actinomyces		0	4	0	0	1	0	0	0	0	1	47	1	4	0	2	9
<i>Act. gerencseriae</i>	618					1											
<i>Actinomyces</i> sp.	169											42					
<i>Actinomyces</i> sp.	170												1				
<i>Actinomyces</i> sp.	171		4									2				1	
<i>Actinomyces</i> sp.	180																1
<i>Actinomyces</i> sp.	446													3			
<i>Actinomyces</i> sp.	448									1		3				1	
<i>Actinomyces</i> sp.	449													1			5
<i>Actinomyces</i> sp.	525																3
Veillonella		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>V. parvula</i>	161		2									1					
<i>Veillonella</i> sp.	158																
Selenomonas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Sel. noxia</i>	130																1
Pseudoramibacter		1	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Pse. alactolyticus</i>	538				3												
<i>Pse. alactolyticus</i> str. 23263T					6												2
<i>Pse. fragi</i> p423		1															
Scardovia		0	38	0	18	1	0	0	0	0	41	0	0	4	0	0	0
<i>Sca. inopinata</i>	642				18												
<i>Sca. wiggisiae</i>	195		38								41			4			
Others		58	17	9	7	1	0	0	0	1	1	8	6	11	11	2	24
Total clones		94	93	95	93	96	92	96	92	92	94	91	85	93	89	91	87

今後、これらの細菌構成は何によって特徴付けられているのか、これらの細菌の種類がう蝕の進行にどのように影響を与えているのかについて解明することが重要である。そしてそれはう蝕の新たな予防法や治療法の開発に繋がるものである。

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡 未記子 (Tomioka Mikiko)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号: 70546473

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: