

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463189

研究課題名(和文) 早期発症型小児齲蝕(ECC)発症患児の口腔細菌叢解析とその原因菌の再考察

研究課題名(英文) The metagenome analysis of salivary microflora in Japanese children with Early Childhood Caries and reassessment of causative bacteria and risk factors

研究代表者

佐藤 恭子(SATO, Kyoko)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：70404499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ECCを発症した小児における口腔細菌叢のメタゲノム解析を行い、その原因となる細菌を再考察することを目的とする。齲蝕罹患群の小児2名からは齲蝕原因菌であるミュータンスグループレンサ球菌が検出されなかった。またすべての小児からは乳酸桿菌は検出されなかった。メタゲノム解析により、ミュータンスグループレンサ球菌の検出の有無により口腔内細菌叢に違いが認められた。

齲蝕に罹患している小児間での菌種構成の違いが、ECC発症に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)：We analyzed the salivary flora of children with Early Childhood Caries to reassess the causative bacteria and risk factors of Early Childhood Caries. Streptococcus mutans was not detected from two caries affected children, and Lactic acid bacteria such as the genus Lactococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium and Pediococcus were not detected in caries non affected and caries affected children. As the results of metagenome analysis of salivary microflora, the average detection ratio of the genus Streptococcus, Abiotrophia, Neisseria, Veillonella, Rothia, Lautropia, Actinomyces, Prevotella, Gemella and Porphyromonas in caries active children would differ from that of caries free children.

In the microorganism community analysis, it was suggested that the composition of salivary bacterial flora would be changed by having caries or not.

研究分野：小児歯科学

キーワード：Early Childhood Caries 唾液中細菌叢の解析 メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

1960年代に Keyes らによって、ミュータンスグループレンサ球菌を中心とした齲蝕の発症メカニズムが明らかになり、病因論に基づく齲蝕予防が行われるようになったため、日本における小児の齲蝕は大幅に減少した。しかし小児歯科臨床の現場において乳児や低年齢児に、誤った授乳行為を伴う重症の齲蝕である“哺乳(瓶)齲蝕”が依然として認められ、齲蝕の二極化の傾向にある。しかし最近では乳幼児期の誤った授乳行為のみが原因ではないという観点から、欧米では早期に発症する齲蝕を早期発症型小児齲蝕、Early Childhood Caries (ECC) とよんでいる。

齲蝕の原因菌は *Streptococcus mutans* であるとされ、*S. mutans* が口腔内に定着するためにはショ糖(スクロース)が必須であり、スクロースの経口摂取が始まる幼児期から成人において発症する齲蝕ではその因果関係は揺るぎないものである。*S. mutans* が口腔内に定着をする時期は「感染の窓」と呼ばれており、最も感染が確認される時期は19か月から33か月である。しかし、ECCを発症する患児の年齢を考えると「感染の窓」以前に重症の齲蝕を発症していたり、母乳あるいは人工乳と齲蝕の関連性について多くの研究が古くから現在に至るまで行われているにもかかわらず ECC 発症メカニズムに関しては不明な点が多く、*S. mutans* を ECC 発症の原因菌とするには無理があるように思われる。

申請者は平成20~21年度科学研究費補助金(若手研究(B))“哺乳齲蝕はなぜできるのか? - 糖原病型患児の口腔細菌叢の解析から - ”(課題番号20791584)において、スクロースの摂取制限がされているにもかかわらず、上顎乳前歯部に哺乳齲蝕と思われる齲蝕を発症した糖原病I型患児の口腔細菌叢の解析で、患児の口腔内から *S. mutans* が検

出されなかったこと、その後患児は上顎乳前歯部の齲蝕以外は齲蝕を発症していないことから、*S. mutans* は哺乳齲蝕の原因菌ではない可能性を示唆した。また、近年では齲蝕と乳酸菌の関連性が見直され、*Bifidobacterium* 属をはじめとした乳酸菌と齲蝕の関連性が示唆され始めている。こうした点から小児歯科領域での懸案事項になっている ECC の原因菌を改めて追求することは、母子保健における指導や早期からの齲蝕予防の点で極めて重要な知見になると考えられることから、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

ECC は、早期から発症する重症度の高い齲蝕で、小児歯科領域で近年問題となっている病態の一つである。この ECC は疫学的調査において、乳幼児期の誤った授乳習慣や罹患した患児の経済的状态等の社会的要因との関連性が指摘されている。しかし齲蝕の原因菌は *S. mutans* であるという前提をそのまま採用しており、改めて細菌学的な視点で ECC の原因菌を追及した研究はあまりない。本研究では、ECC を発症した小児の口腔細菌叢を解析し、その原因となる細菌を再考察することを目的とする。

3. 研究の方法

ECC の認められた小児5名(齲蝕罹患群: 男児2名, 女児3名, 1歳11か月~5歳8か月)より唾液と歯垢を採取した。また齲蝕の認められない小児5名(健常群: 男児2名, 女児3名, 3歳6か月~4歳11か月)を対照群とした。



齲蝕罹患児の口腔内写真 健常児の口腔内写真

なお、本研究は実施にあたり、長崎大学倫

理委員会の承認(承認番号 1179)を得るとともに、小児の保護者から本研究に関する了承を得た。

本研究では、

(1) ECC を発症した小児の口腔細菌叢の調査する。

(2) (1) の結果をデータベース化し、統計的に処理することによって、ECC の発症に最も関連性の高い菌を同定する。

これを遂行するための具体的手法として、ECC を発症した小児および齲蝕の認められない小児からプラークあるいは全唾液のサンプリングと細菌 DNA の抽出を行う。

被験小児からの抽出 DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、16S rRNA 増幅産物を得る。これを次世代シーケンサー Roche 454GS FLX+ での Deep-Sequencing および取得データの BLAST 検索を行い、Class(綱)、Family(科)、Genus(属)レベルでの群集解析を行い、属レベルでの細菌の絞り込みを行う。

得られたデータをまとめてデータベース化する。構築されたデータベースから統計学的手法を用いて ECC の原因細菌となりそうな細菌種の同定を試みる。

唾液や口腔内のスワップを検体とした細菌検査キットによるミュータンス菌、乳酸菌の同定検査を行う。

4. 研究成果

(1) 口腔内所見

	プラークの付着(人)	歯肉炎(人)	う蝕歯数(本数)
齲蝕罹患群(N=5)	1	1	7
健常群(N=5)	1	0	0

(2) 細菌検査キットでの唾液中の齲蝕関連細菌の検出数

すべての小児で齲蝕関連細菌(Mutans streptococci, Lactobacilli) は検出限界以下であった。

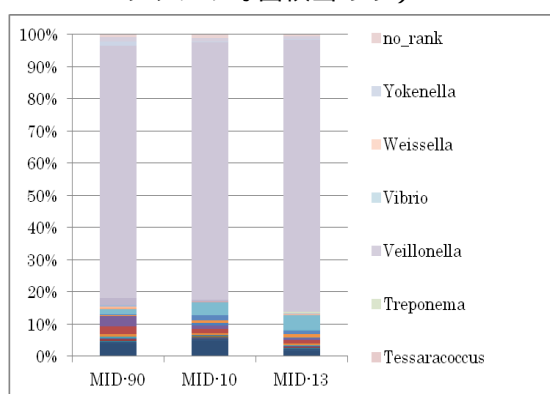
	唾液量(ml)	唾液pH	総レンサ球菌($\times 10^5$)
齲蝕罹患群(N=5)	2.2 \pm 0.8	6.8 \pm 0.3	4.5 \pm 4.3
健常群(N=5)	2.7 \pm 2.9	7.0 \pm 0.4	4.3 \pm 3.4

細菌検査キットの結果より、齲蝕罹患群は健常群に比較して唾液量がやや少なく、唾液の pH が酸性にやや偏っていた。

(3) メタゲノム群集解析

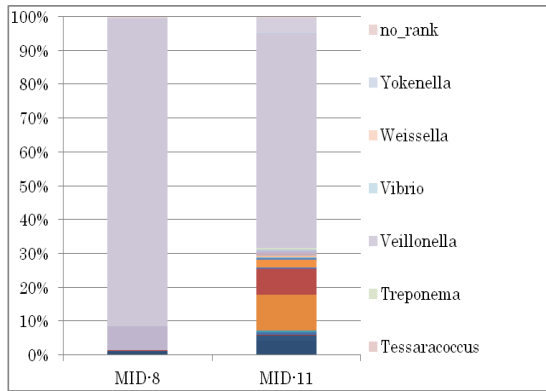
齲蝕罹患群の小児2名からはミュータンスグループレンサ球菌が検出されなかった。またすべての小児からは乳酸桿菌は検出されなかった。そこで齲蝕罹患群をミュータンスグループレンサ球菌の検出の有無によって2群に分けた。

齲蝕罹患群小児(ミュータンスグループレンサ球菌検出あり)



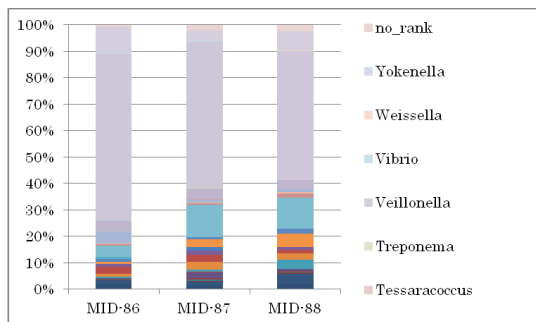
それぞれ 39, 35, 37 属検出された。

齲蝕罹患群小児(ミュータンスグループレンサ球菌検出なし)



それぞれ 11, 40 属検出された。

健常群 (3 名分のみ示す)



それぞれ 33, 49, 43 属検出された。

ミュータンスグループレンサ球菌が検出された齲蝕罹患群小児, 健常群からは検出属数, 割合は異なるが, 構成菌種は似ている傾向にあった。

(4) 各群での唾液中口腔細菌の平均検出率 (属【Genus】レベル) 上位 30 位

齲蝕罹患群小児 (ミュータンスグループレンサ球菌検出あり)

口腔細菌叢の平均検出種別は上位より, 属レベルで Streptococcus(約 81%), Abiotrophia(約 3%), Neisseria (約 3%)の順であった 検出属数は 51 属であった (図 1)

齲蝕罹患群小児 (ミュータンスグループレンサ球菌検出なし)

同様に Streptococcus(約 77%), Gemella(約 3%), Rothia (約 3%)であった。検出属数は 41 属であった。(図 2)

(図 1)

齲蝕罹患群 (<i>Streptococcus mutans</i> 検出有り)	%
Streptococcus	80.986
Abiotrophia	3.485
Neisseria	3.417
Haemophilus	1.621
Granulicatella	1.559
Veillonella	1.014
Leptotrichia	0.948
Rothia	0.916
Lautropia	0.734
Terrahaemophilus	0.624
Gemella	0.589
Actinomyces	0.505
Kingella	0.424
Capnocytophaga	0.409
Prevotella	0.239
Corynebacterium	0.200
Porphyromonas	0.198
Campylobacter	0.168
Selenomonas	0.127
Streptobacillus	0.122
Nevskia	0.111
Aggregatibacter	0.074
Eikenella	0.063
Chryseobacterium	0.063
Microlunatus	0.059
Propionibacterium	0.054
Bergeyella	0.050
Cardiobacterium	0.037
Alloprevotella	0.020
Burkholderia	0.019

(図 2)

齲蝕罹患群 (<i>Streptococcus mutans</i> 検出なし)	%
Streptococcus	77.174
Gemella	5.343
Rothia	3.966
Granulicatella	3.956
Abiotrophia	2.575
Veillonella	2.316
Lautropia	1.157
Actinomyces	0.806
Porphyromonas	0.297
Fusobacterium	0.287
Dolosigranulum	0.287
Selenomonas	0.265
Leptotrichia	0.222
Prevotella	0.178
Streptobacillus	0.167
Haemophilus	0.131
Neisseria	0.120
Corynebacterium	0.051
Capnocytophaga	0.040
Kingella	0.033
Burkholderia	0.025
Bergeyella	0.025
Campylobacter	0.022
Propionibacterium	0.018
Terrahaemophilus	0.011
Tannerella	0.011
Mycoplasma	0.011
Eikenella	0.011
Atopobium	0.011
Moraxella	0.007

健常群

同様に Streptococcus(約 56%), Neisseria(約 9%), Veillonella(約 7%)の順であった。検出属数は56属であった。

健常群	%
Streptococcus	55.776
Neisseria	9.381
Veillonella	6.785
Rothia	3.771
Lautropia	2.891
Actinomyces	2.387
Prevotella	2.299
Granulicatella	2.181
Gemella	2.063
no_rank	1.759
Abiotrophia	1.690
Fusobacterium	1.626
Haemophilus	1.338
Leptotrichia	1.221
Corynebacterium	0.870
Oribacterium	0.781
Terrahaemophilus	0.444
Campylobacter	0.441
Kingella	0.435
Porphyromonas	0.312
Megasphaera	0.291
Catonella	0.270
Capnocytophaga	0.176
Atopobium	0.122
Propionibacterium	0.098
Selenomonas	0.097
Peptostreptococcus	0.065
Mogibacterium	0.055
Aggregatibacter	0.054
Bergeyella	0.052

一般的に健常者の唾液中からは Streptococcus 属, Staphylococcus 属, Neisseria 属, Veillonella 属, Actinomyces 属, Lactobacillus 属, Fusobacterium 属などが検出され, Streptococcus 属は最大の比率を占め, 培養可能菌数の約 1/3 前後に及ぶ。今回すべての群において Streptococcus 属が大きな割合を占めたが, これは被験小児が低年齢のためと考えられ, 今後は Prevotella 属や Porphyromonas 属などが増加し, Streptococcus 属の相対的な比率は減少すると考えられる。また健常群の Streptococcus 属の割合は齲蝕罹患群に比較して少ない傾向にあった。

さらに齲蝕に罹患していても, 齲蝕原因菌

といわれているミュータンスグループレンサ球菌が検出されなかった小児が2名認められた。この齲蝕に罹患している小児間での菌種構成の違いが, ECC 発症に影響を及ぼしている可能性が示唆され, 今後低年齢小児の齲蝕予防における口腔ケアの方法に影響を及ぼすと考えられた。

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)

佐藤恭子, 釜崎陽子, 星野倫範, 藤原 卓, Early Childhood Caries 小児の唾液中細菌叢のメタゲノム群集解析, 第62回小児保険協会学術集会, 2015年6月18日~6月20日, 「長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)」

Fujiwara T, Satoh K, Hoshino T, The metagenome analysis of salivary microflora in Japanese children with early childhood caries, The 25th congress on the International Association of Pediatric Dentistry, 2015年7月1日~7月4日, 「Glasgow (England)」

〔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

佐藤 恭子 (SATOH, Kyoko)
長崎大学・病院 (歯学系) ・助教
研究者番号 : 70404499

(2)研究分担者

星野 倫範 (HOSHINO, Tomonori)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系) ・
准教授
研究者番号 : 00359960

齋藤 幹 (SAITOH, Kan)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号 : 40380852

西口 美由季 (NISHIGUCHI, Miyuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系) ・
助教

研究者番号 : 10253676
藤原 卓 (FUJIWARA, Taku)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系) ・
教授
研究者番号 : 00228975