

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862030

研究課題名(和文) 歯周病原性細菌の母子伝播時期と小児口腔の変化に伴う細菌の栄養供給源の変化の解明

研究課題名(英文) A study on intra-familial transmission of periodontal pathogens and relationship with change in children's oral cavity and change of metabolism by periodontopathic bacteria

研究代表者

布施 晴香 (Fuse, Haruka)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60611663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：小児の口腔における歯周病原性細菌の検出および家族間での歯周病原性細菌の伝播に関する研究をおこなうため、昭和大学歯科病院小児歯科学講座関連施設を受診した対象者の中から出産後の母親とその子どもを対象とし、そのうち経年的にサンプル採取を行うことができた3組の対象者の解析を行った。解析の方法は、サンプルとして口腔内より採取した唾液を使用し、子どもおよび母親の口腔内における歯周病原性細菌の検出は、メタ16SrDNA解析を用いて行った。

研究成果の概要(英文)：In order to gain information about the prevalence of periodontopathic bacteria in children and about transmission of bacteria between family members, we tested 3 children and their family members for periodontal pathogens at the dental clinic of Showa University. we investigate the distribution and correlation of periodontopathic bacteria in saliva specimens taken from children and their mothers by meta 16SrDNA analysis.

研究分野：小児歯科

キーワード：歯周病原性細菌 母子伝播 小児

## 1. 研究開始当初の背景

歯周疾患の発症には歯周病原性細菌の感染が原因であり特に、*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* が歯周組織の破壊に深く関与していると考えられている。また *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia* といった歯周病原性細菌は、歯周疾患罹患者のみならず、健常者の歯肉縁上プラーク中からも検出されたとの報告があり、歯肉縁上プラーク中に生息している歯周病関連細菌が歯肉縁下プラークの細菌叢に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。しかしながら、小児の歯周疾患における口腔細菌叢の生態および発症における歯肉縁上プラークの役割に関しては明確な見解が得られていない。口腔内でのプラークは、歯面にペリクルを介して様々な細菌が定着し、細菌由来の多糖合成酵素がスクロースからグルカンやフルクタンといった多糖を合成し完成される。プラークは成熟することで、酸素供給、外部からの栄養供給が低下するが、このような環境下においても増殖可能な菌種によりさらに構成され、さまざまな病原性を発揮することができる。う蝕は、*Streptococcus mutans* がプラーク構成多糖を分解し菌体内に取り込み栄養源として利用、代謝産物として乳酸を産生し、プラーク内部の pH を低下させう蝕を発症させることから、プラークおよび *S. mutans* の多糖分解酵素が病因となっていることが知られている。一方歯周病は、歯周病原性細菌が口腔内に定着後、プラークの成熟がおこり歯周組織に変化をもたらす、歯周ポケットといった嫌気環境が形成される。歯肉縁下における歯周病原性細菌は、歯肉溝浸出液中のタンパク質や剥離上皮をタンパク質分解酵素で分解後、栄養源として利用していることが明らかとなっている。しかしながら、歯周病原性細菌は健常者の口腔内および小児からも検出されることが近年報告されており、このような健全な口腔環境における歯周病原性細菌の増殖についてはいまだ明らかではない。そこで、炎症のない口腔内や歯周ポケットの浅い小児、健常者の口腔内における歯周病原性細菌は増殖のために栄養源をどのように確保しているのかという疑問に至った。申請者は、まず、歯周病原性細菌の口腔内への定着時期を解明するため、妊娠期・出産後の母親とその子供を対象として、菌の検出を行い母子伝播の時期の解明を行うことを目的とした。また、歯周病原性細菌である *Prevotella intermedia* の多糖(フルクタン)分解酵素群の解析( Gene 投稿 )をもとに、今後早期に定着した歯周病原性細菌とその多糖分解能との関連性を解明し、小児における歯周病原性細菌の増殖と歯肉縁上プラークの関与を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

妊娠期・出産後の母親の口腔内における歯周病原性細菌の検出と子供への伝播を調べることで歯周病原性細菌の母子伝播の時期を解明することが可能となる。また今後、歯周病原性細菌の口腔内への定着と多糖分解活性の関連性を調べることで、多糖代謝が歯周病原性細菌における新たな病原因子を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### 1).被験母子の抽出

当科関連施設を受診した出産後の母親とその子供を対象としサンプルとして口腔内から唾液を採取した。対象者は本研究を行うにあたりインフォームドコンセントを得た小児 12 名(1 か月-1 歳)とその母親 12 名とした。なお本研究は、昭和大学歯学部医の倫理委員会の承認(承認番号 2011-040 号)を得て行った。サンプル採取時期は、小児では新生児期(0 か月) 離乳食開始前期(3・4 か月) 乳切歯萌出期(6-8 か月) 1 歳児期とした。継続してサンプル採取が行えない場合は、～ に期間で 2 つの期間を継続して採取することを条件とした。小児でのサンプル採取方法はフロスをつけたロールワッテを口腔内に一定時間留置し唾液を浸透させたあと Oragene® DNA OG-500 (DNA Genotek Inc) キットの保存液に浸漬した。母親からのサンプル採取方法は Oragene® DNA キットに直接採取した。

サンプルを採取した 12 組の母子のうち、経年的にサンプル採取を行うことができた母子 3 組を抽出した。

### ・被験母子 A

母：出産後  
子：5 か月時 (無歯顎)  
1 歳 2 か月時 (上下左右 AB  
8 本萌出)  
3 歳 2 か月時 (乳歯列完成)

### ・被験母子 B

母：出産後  
子：4 か月時 (下顎左右 A 2 本)  
1 歳 2 か月時 (上下左右 AB・  
上下左右 D の 12 本萌出)  
3 歳 2 か月時 (乳歯列完成)

### ・被験母子 C

母：出産後  
子：3 か月時 (無歯顎)  
6 か月時 (下顎左右 A 2 本萌出)  
1 歳 3 か月時 (上下左右 AB・  
上下左右 D・下顎左右 C14 本萌出)

### 2).DNA の抽出および精製

唾液サンプルからの DNA の抽出および精製は Oragene® DNA 付属の DNA 精製キットを用いて行った。

### 3).メタ 16SrDNA 解析

16S の V4 領域を PCR で増幅(1st\_PCR)  
F:ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTT  
CCGATCTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA  
R:GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCT  
TCCGATCTNNGGACTACHVGGGTWTCT  
AAT

マルチプレックスバーコード配列(下線)  
を PCR で付与(2nd\_PCR)

F (T510)

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTA  
CACTATCCTCTACACTCTTTCCCTACAC  
GACGCTCTTCCGATCT-3'

R (T701)

5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATC  
GAGTAATGTGACTGGAGTTCAGACGTG  
TGCTCTTCCGATCT-3'

次世代シーケンス MiSeq (illumina 社)  
Miseq1500 万クラスター V2-300cycle キットを使用

今回のシーケンスのクラスター密度:  
527K/mm2 PassFilter: 95.7% Q30:  
94.3% とおり良好な結果が得られている。

以上の次世代シーケンス解析は、口腔常在  
微生物叢解析センターにて実施された。

### 4).解析方法

シーケンスで得られた各サンプルの  
Read1、Read2 の品質を確認後、低品質塩基  
の除去を行いリードを結合した。さらにキメ  
ラ配列の除去し、RDP Classifier および  
Blastn による相同性解析を行った。解析結果  
を metagenome@kin に投入し、データの可  
視化は MEGAN を用いた。サンプル間の比  
較解析は Principal Component Analysis  
(PCA 解析)を用いた。

## 4. 研究成果

### Taxonomy Profile

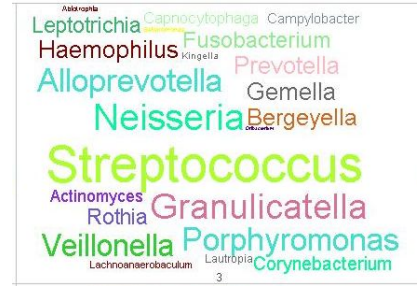
#### 被験者 A



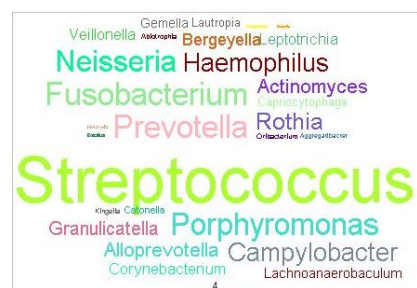
子: 5 か月時 (無菌顎)



子: 1 歳 2 か月時



子: 3 歳 2 か月時



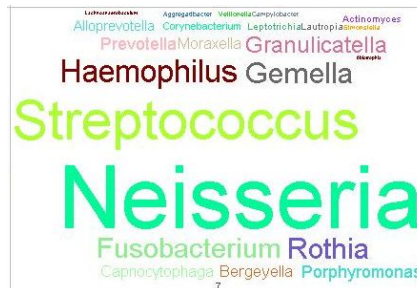
#### 被験者 B



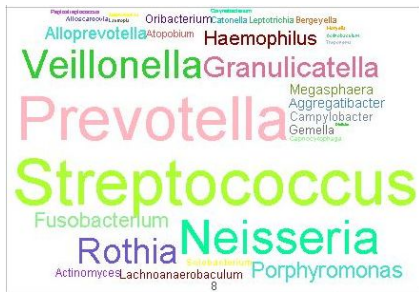
子: 4 か月時



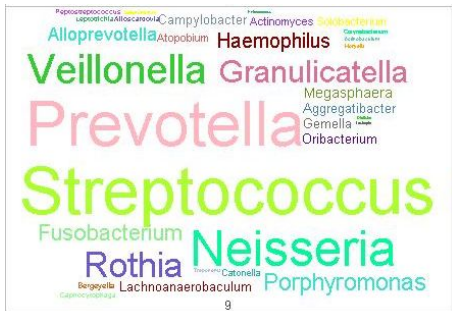
子: 1 歳 2 か月時



子：3歳2か月時



被験母子 C



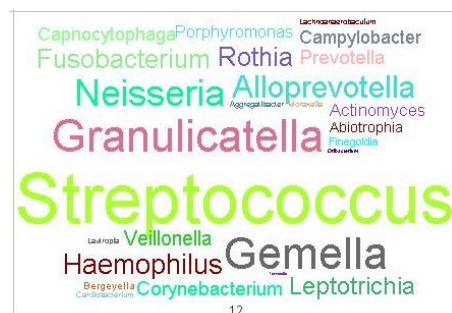
子：3か月時



子：6か月時



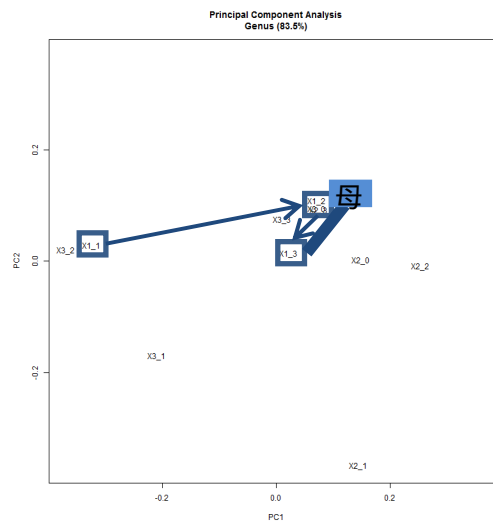
子：1歳3か月時



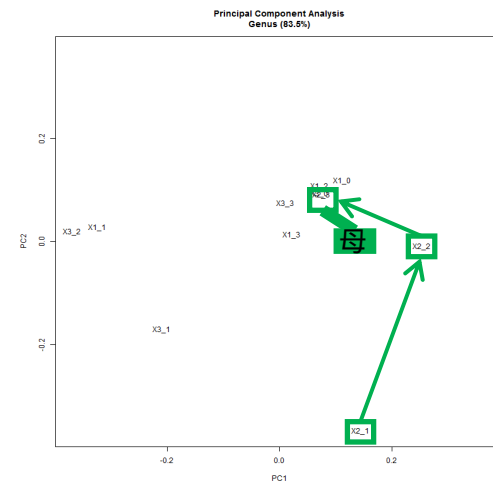
## PCA 解析

子のサンプル採取 1 回目 2 回目 3 回目を矢印で結び、3 回目と母親を実線で結んで表示した。

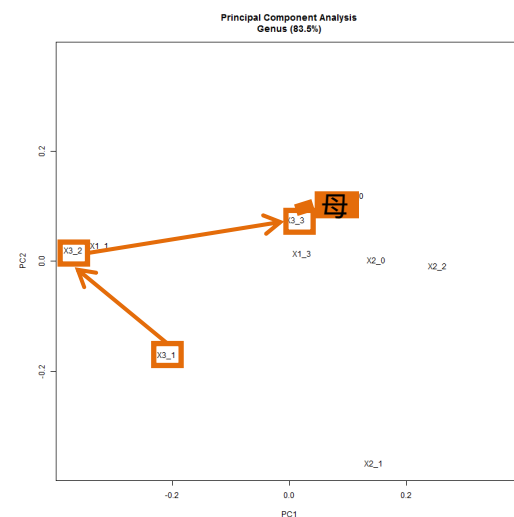
被験母子 A



被験母子 B



被験母子 C



## 考察

今回の対象者の中で経年的にサンプル採取を行うことができた母子3組に関して、メタ16S rDNA解析を行った。それぞれの子の3組の子の結果から菌の多様性に関しては歯の萌出前は、*Streptococcus* が優位で、*Rothia*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Gemella* など数種類の属から構成されている細菌叢からなり、多様性は小さく、歯の萌出に伴い多様性が大きくなることがわかった。また3組の子において、それぞれのPCA解析から、歯の萌出前は、母親の細菌叢と類似しているという傾向は認められなかったが、乳臼歯萌出以降、母親の細菌叢と類似した細菌が出現する傾向はみられた。今回の解析では、グラム陰性菌、グラム陽性菌ともに同じような傾向を認めた。今回サンプルとして唾液を使用したプラーク中の細菌叢の解析の必要があると思われる。また、経年的に経過を追った対象者を増やすことや、生活状況(食事の与え方、食器の共有など)のアンケート調査の検討も行う必要があるため、これらを今後の課題としている。

### 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1件)

布施晴香、島田幸恵、船津敬弘、宗田友紀子、入江太郎、美島健二、井上美津子  
連続した歯原性嚢胞により側方歯3歯の転位をみた1例  
査読有、小児歯科学会誌(0583-1199)52巻1号69-76、2014

[学会発表](計7件)

1. 杉山智美、浅里 仁、布施晴香、加藤里英、渡来真央、佐藤昌史、井上 美津子  
保護者への指導によって口腔内環境が改善したWolf-Hirschhorn症候群の1例  
査読有、日本障害者歯科学会(0913-1663)35巻3号page549、2014  
2014.11/14-16、第31回日本障害者歯科学会、仙台国際センター

2. 島田幸恵、加藤里英、布施晴香、杉山智美、入江太郎、美島健二、井上美津子  
上顎右側臼歯部に歯牙腫が発生した1例  
査読有、日本小児口腔外科学会(0917-5261)24巻2号page549、2014  
2014.11/7.8、第26回日本小児口腔外科学会、ホテルサンシャイン宇都宮

3. 栗原亜由希、山田亜希子、布施晴香、杉山智美、浅里 仁、井上 美津子  
家庭における子どもへの歯科保健に対する意識と実態について 保育園児の父母による違い

査読有、小児歯科学雑誌(0583-1199)52巻2号Page388、2014

2014.5/16-17、第52回日本小児歯科学会大会、きゅりあん

4. 布施晴香、島田幸恵、船津敬弘、宗田友紀子、入江太郎、美島健二、井上美津子

複合した含歯性嚢胞により側方歯3歯の転位をみた1例

査読有、小児歯科学会誌(0583-1199)51巻2号page215、2013

2013.5/23,24、第51回日本小児歯科学会学術大会、長良川国際会議場

5. 布施晴香、船津敬弘、宮内康範、島田幸恵、佐藤昌史、井上美津子

精神発達遅滞を有する先天性筋緊張性ジストロフィー患者の口腔管理

査読有、日本障害者歯科学会誌(0913-1663)34巻3号、Page471、2013

2013.10/11-13、第30回日本障害者歯科学会学術大会、神戸国際展示場

6. 島田幸恵、布施晴香、田村文誉、井上美津子

歯冠周囲過誤腫による臼歯部歯肉増殖症に対する外科的処置後の長期予後

査読有、日本障害者歯科学会誌(0913-1663)34巻3号、Page506、2013

2013.10/11-13、第30回日本障害者歯科学会学術大会、神戸国際展示場

7. 島田幸恵、加藤りえ、布施晴香、木村洋子、入江太郎、美島健二、井上美津子

過剰歯の含歯性嚢胞により上顎両側中切歯および左側側切歯の位置異常をきたした1例

査読有、小児口腔外科学会誌(0917-5261)23巻2号Page155、2013

2013.11/2-3、第29回小児口腔外科学会、刈-ホール船堀

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

布施晴香 (FUSE HARUKA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60611663