

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463119

研究課題名(和文) 小児口腔内細菌叢の多様性と齲蝕罹患性 ～口腔疾患に罹患しにくい細菌叢の構築～

研究課題名(英文) Bacterial community of dental biofilm in children and its association with caries risk.

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：90431759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：成人のデンタルバイオフィルムは、形成初期は白色だが、成熟するに従い黄色や灰色(有色)を呈する。小児の口腔から検出されるバイオフィルムも多くの場合白色だが、時に黄色や黄褐色のバイオフィルムを認めることもある。本研究では有色バイオフィルムを有する小児から有色および白色の試料を採取し、細菌構成を解析比較した。その結果、一部の被験者で白色および有色の試料の細菌構成に大きな差異を認められた。また、重度の齲蝕経験を持つ小児では、いくつかの属において有色および白色バイオフィルム中の構成比率に有意な差を認めた。

研究成果の概要(英文)：The dental biofilm is transparent or white in the early stages, but often becomes yellow or gray as it matures. Dental biofilm detected in children is white in most cases, but it is occasionally yellow or yellow-brown (colored biofilm). On the other hand, among children, there are also cases where dental caries and gingivitis are absent and oral health status is not poor despite the presence of colored biofilm. In the present study, the bacterial composition of colored biofilms from children was analyzed through 16s rRNA gene pyrosequencing. When the phylogenetic tree was drawn, the distance between the colored and white biofilms was large in some cases, even for samples from the same subjects. Next, Relative abundance of each genus were compared between the colored and white biofilms. In children with severe ECC experiences, 6 genus were detected at significantly different frequencies between colored and white biofilms.

研究分野：小児歯科学

キーワード：口腔内細菌叢 齲蝕 口腔疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 人体には少なくとも約 100 兆の細菌が存在し、全細胞数の 10 倍に達すると言われている。それらすべての細菌種がヒトに与える有益、または有害な作用について解明するのは困難であるが、ヒトの皮膚や消化器、生殖器や口腔などに生息する細菌叢の全貌を捉えようとする試みは近年盛んに行われている。こうした手法は、2001 年に Lederberg によって "Microbiome" という言葉が提唱されて以来、大量の遺伝子解読が可能になった次世代シーケンサーが利用されはじめたこともあり、特にこの 10 年間で大きな広がりを見せた。各臓器に構成される細菌種の違いが疾患の発生に直接関わっているのか、または罹患の結果細菌叢の変化が生じたのかについてはまだ検討の余地はあるものの、ヒトの各組織でそれぞれ構成されている細菌叢は健康な状態 (ホメオスタシス) の維持と密接に関わっており、こうした細菌叢が攪乱されることは何らかの疾患発生に大きく影響すると考えられている。

(2) 口腔疾患においても、齲蝕の病原性を研究するためには、ミュータンスレンサ球菌にのみ着目して研究を進めるのは不十分であり、このように検出頻度に差が認められる菌種についても、齲蝕発生への関与の有無やその程度について検討していく必要があると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、小児において、齲蝕を中心とした口腔疾患への感受性が低い細菌叢モデルを決定することを第一の目標とした。しかし、研究代表者らはこれまで、主に小児口腔に存在する細菌叢の解明を目指す取り組みを行ってきた。代表者の所属する小児歯科診療室に来院する患児およびその母親から口腔内の swab 検体を得てシーケンス解析を行ったところ、小児の口腔の細菌叢は成人よりもバリエーションが豊富であることが分かっている。多様性に富む小児の口腔において齲蝕をはじめとした口腔疾患の感受性が低い細菌叢のパターンを見いだすことは困難と思われた。

(2) 小児歯科の日常診療において、歯面から検出されるバイオフィルムは多くの場合白色だが、時に黄色や黄褐色のバイオフィルム (以下有色バイオフィルムと略す) を認めることがある。成人であればそうした有色バイオフィルムは成熟バイオフィルムであることを示唆し、red または orange complex に属する菌種を多く含む場合が多い。しかし、小児の場合、有色バイオフィルムを認めても齲蝕や歯肉炎を認めないケースもあり、口腔内の状況が悪いとは限らない。そこで、まず有色バイオフィルムを有するような小児からバイオフィルムを採取し、その細菌構成を解析

することとした。得られたデータは同じ被験者から採取した白色バイオフィルムと比較を行ったほか、被験者の齲蝕または歯肉炎の罹患状況とバイオフィルム中の細菌構成について関連性があるかについても検討した。

3. 研究の方法

(1) 本研究の対象は研究代表者が所属する大学の小児歯科診療室を受診した小児のうち、上顎第一大臼歯または乳臼歯頬側面に有色バイオフィルムを認めた 13 歳未満の者である。滅菌した歯科用エキスカベーターを用い、歯肉縁上バイオフィルムを採取してサンプルとした。また、同一被験者のサンプル採取部位に最も近接した部位 (隣在歯または下顎の反対側の臼歯の頬側面) の白色バイオフィルムも採取した。得られたサンプルは市販のキットを用いて細菌由来 DNA を抽出した。

(2) サンプル中の特定の菌種の有無を明らかにするために、過去に報告された方法を用いた PCR を行った。検出を行った菌種は、デンタルバイオフィルム中に存在することが知られており、齲蝕や歯周病の発症に関与すると考えられる 11 菌種とした。

(3) 被験者について、口腔内状況のよい群 (Healthy group: 乳歯、永久歯のう蝕経験がなく、下顎臼歯部の歯肉炎を認めない)、口腔内状況の悪い群 (High risk group: う蝕経験のある乳歯が 10 歯以上で、下顎臼歯部の歯肉炎を認める) に該当するものを抽出し、Illumina MiSeq sequencing platform および MiSeq Reagent Kit V3 を用いシーケンシングを行った。

(4) シーケンシングで得られたすべてのデータは Bioinformatics pipeline QIIME 上で解析を行った。Quality check に残った reads について、SILVA database 上の参照シーケンスとマッチするものを検索し、operational taxonomy unit (OTUs) に分類した。検出菌種数の豊富さについて Observed OTUs、Shannon Index を算出し、有色バイオフィルムと白色バイオフィルムで比較を行った。被験者は口腔内の状況が大きく異なる Healthy group と High risk group の 2 群に分かれるため、それぞれの群内での比較も行った。

4. 研究成果

(1) 研究期間中、上顎第一大臼歯または乳臼歯に有色バイオフィルムを認め、かつ研究参加の協力が得られたのは 58 名であった。有色バイオフィルムを認めた被験者の年齢の平均は 8.2 歳であった。Conventional PCR はこの被験者すべてを対象とした。また、被験者のうち 6~10 歳で、Healthy group または High risk group に該当する 16 名 32 サンプルを 16S rRNA gene pyrosequencing に供した。

(2) 歯周病発症の red complex に属する菌種、齲蝕原性がすでに知られている菌種 11 種について、既知の特異的プライマーを用いて PCR によって検出を試みたところ、白色および有色バイオフィルムの間で検出率に差異は認めなかった。High risk group と Healthy group に分けて検出率を比較した場合でも、バイオフィルムの色による検出率の違いは認めなかった。

(3) クオリティチェックを行ったあと、32 サンプルの平均リード数は 94,159 だった。99% similarity level で phyla level よりも細かい階層まで同定できた OTUs 数は 32 サンプルで 587 であり、1 サンプル当たり平均 145 (range 83-236) であった。有色と白色バイオフィルムでそれぞれ観察された OTUs 数に有意差は認めなかった (Fig. 1A)。High risk 群と Healthy 群の間でも有意差は認めなかった。

(4) 各群の全体において、Unifrac distance の結果から、有色および白色バイオフィルムの間に有意な Dissimilarity は認めなかった。しかし、同じ被験者から得たサンプルでも、有色と白色バイオフィルムで距離の大きく離れているものがあつた。

(5) すべてのサンプルから検出された bacterial taxa を core microbe と位置づけ、ヒートマップを作成して有色および白色バイオフィルムで細菌構成比を比較したところ、いくつかの属については、バイオフィルムの色別で大きく異なることが明らかとなった。特に、High risk group の小児が有する有色および白色バイオフィルムの細菌構成は、Healthy group に比べて差異が大きい taxa が多かった。

(6) 有色および白色バイオフィルムの細菌構成について一定したパターンの差異はなかったが、有色バイオフィルムの中にはある属の細菌を特に多く含むものがあり、そのほとんどは High risk group に属する被験者から得たものであつた。そうした細菌構成の変化がもたらす何らかの疾患発生リスクの有無について、今後検討を加える予定である。

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 12 件)

Kanemoto T, Imai H, Sakurai A, Dong H, Shi S, Yakushiji M, Shintani S. Influence of Lifestyle Factors on Risk of Dental Caries among Children Living in Urban China. 査読有、Bull Tokyo Dent Coll, 57 巻 3 号, 2016、143-157

辻野 啓一郎、櫻井 敦朗、荒井 亮、大多和 由美、佐藤 秋絵、新谷 誠康、上

顎中切歯が双生歯および歯内歯を併発した Brachmann-de Lange 症候群の 1 例、障害者歯科、査読有、38 巻 1 号、2017、30-35

本間 宏実、櫻井 敦朗、新谷 誠康、虐待による多数歯齲蝕を有した児童に対し継続的な口腔内管理を行った一例、歯科学報、査読有、116 巻 6 号、2016、470-477

櫻井 敦朗、新谷 誠康、子どものう蝕治療 乳前歯カリエス治療のポイント、DENTAL DIAMOND、査読無、41 巻 10 号、2016、52-55

櫻井 敦朗、乳前歯のう蝕予防、小児歯科臨床、査読無、20 巻 11 号、2015、17-23

浦野 絢子、岩田 美奈子、小鹿 裕子、荒井 亮、櫻井 敦朗、辻野 啓一郎、大多和 由美、新谷 誠康、東京都心の歯科大学小児歯科における歯の外傷に関する実態調査、小児歯科学雑誌、査読有、53 巻 3 号、2015、414-420

Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, Kawabata S, Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci, PLoS One、査読有、9 巻 1 号、2014、e88136、doi: 10.1371/journal.pone.0088136.

櫻井 敦朗、わが国における MIH 発症に関する大規模調査から、日本ヘルスケア歯科学雑誌、査読有、14 巻 1 号、2014、6-12

櫻井 敦朗、新谷 誠康、酸蝕症と細菌学、小児歯科臨床、査読無、19 巻 6 号、2014、34-39

櫻井 敦朗、母親への授乳中止時期の指導、DENTAL DIAMOND、39 巻 5 号、2014、109-110

小鹿 裕子、岩田 美奈子、浦野 絢子、荒井 亮、山頭 亜里沙、島田 みゆき、辻野 啓一郎、櫻井 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、査読有、小児歯科学雑誌、52 巻 1 号、2014、54-61

岩田 美奈子、小鹿 裕子、浦野 絢子、荒井 亮、山頭 亜里沙、島田 みゆき、辻野 啓一郎、櫻井 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、

査読有、小児歯科学雑誌、52 巻 1 号、
47-53

〔学会発表〕(計 14 件)

米倉 智子, 本間 宏実, 桜井 敦朗, 見
明 康雄, 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、日
本口腔科学会雑誌、66 巻 1 号、2017、
36

富永 早紀, 松崎 和江, 浦野 絢子, 岩
田 美奈子, 桜井 敦朗, 辻野 啓一郎,
新谷 誠康、東京都心の歯科大学小児歯
科における初診患児の実態調査 患児
の多様性に求められる対応、小児歯科学
雑誌、55 巻 1 号、2017、94

辻野 啓一郎, 荒井 亮, 桜井 敦朗, 大
多和 由美, 新谷 誠康、強度の歯根変形
を伴う歯内歯をもつ Down 症候群の一
例、障害者歯科、37 巻 3 号、2016、333

永井 宜子, 桜井 敦朗, 本間 宏実, 新
井 敬, 新谷 誠康、小児の有する成熟歯
面バイオフィーム構成細菌種の解析、小
児歯科学雑誌、2016、89-90

桜井敦朗、今さら聞けない基本から最新
の予防法まで～隣接面齲蝕を考える、招
待講演、第 34 回日本小児歯科学会近畿
地方会(招待講演)

辻野 啓一郎, 桜井 敦朗, 荒井 亮, 小
鹿 裕子, 大多和 由美, 新谷 誠康、双生
歯および歯内歯を有する Brachmann-de
Lange 症候群の歯科治療経験、障害者歯
科、36 巻 3 号、2015、399

岡橋 暢夫, 中田 匡宣, 住友 倫子, 桜
井 敦朗, 桑田 啓貴, 川端 重忠, Journal
of Oral Biosciences Supplement、2015、483

桜井敦朗、隣接面齲蝕を考える、今さら
聞けない基本から最新の予防法まで、大
阪小児歯科専門医臨床研究会(OSP)(招
待講演)

桜井敦朗、舌小帯短縮症～切るべきか、
切らないべきか～、千葉県小児歯科医会、
平成 26 年度学術講演会(招待講演)

大多和 由美, 辻野 啓一郎, 高野 正行,
片田 英憲, 宮崎 晴代, 桜井 敦朗, 新
谷 誠康, 末石 研二, 池田 正一、障害者
歯科、35 巻 3 号、2014、537

永井 宜子, 桜井 敦朗, 本間 宏実, 田
中 公子, 新谷 誠康、歯科学報、114 巻
3 号、2014、292

宮島 美樹, 桜井 敦朗, 本間 宏実, 川
上 響子, 永井 宜子, 田代 紋子, 大澤
枝里, 新居 由紀, 江木 勝彦, 中内 彩
乃, 米倉 智子, 田中 公子, 熊澤 海道,
今井 裕樹, 辻野 啓一郎, 米津 卓郎,
新谷 誠康、当科通院患者における上顎
正中過剰歯の発生率と永久歯列への影
響度に関する検討、小児歯科学雑誌、52
巻 2 号、2014、347

永井 宜子, 桜井 敦朗, 本間 宏実, 田
中 公子, 新谷 誠康、小児の有する成熟
歯面バイオフィーム構成細菌種の解析、
小児歯科学雑誌、52 巻 2 号、2014、287

荒井 亮, 小鹿 裕子, 岩田 美奈子, 浦
野 絢子, 桜井 敦朗, 辻野 啓一郎, 新
谷 誠康、上顎犬歯の萌出障害に関する
臨床的検討、小児歯科学雑誌、52 巻 2
号、2014、283

〔図書〕(計 2 件)

桜井 敦朗、新谷 誠康、他、小児歯科
学ベーシックテキスト: 第 11 章齲蝕の
予防と進行抑制、2016、183-200

桜井 敦朗、新谷 誠康、他、6. 小児
歯科学クリニカルテキスト: 第 1 章 予
防填塞と小児の歯冠修復 1. フィッシ
ャーシーラント(予防填塞)、2016、2-7

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: 90431759

(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: 90273698

(3)連携研究者

本間 宏実(HOMMA, Hiromi)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 80637760
(平成 27 年度から連携研究者)