

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791584

研究課題名（和文）

哺乳齲蝕はなぜできる？－糖原病Ⅰ型患児の口腔細菌叢の比較解析から－

研究課題名（英文）

Why is Nursing Caries established ? ;From the Findings of Oral Flora in the Child with Glycogenosis type I.

研究代表者

佐藤 恭子 (SATO KYOKO)

長崎大学・病院・助教

研究者番号：70404499

研究成果の概要（和文）：

哺乳齲蝕を有する糖原病Ⅰ型患児から分離された口腔レンサ球菌は *S. gordonii* のみで、齲蝕原性細菌の *S. mutans* は検出されなかった。これは患児のショ糖の摂取制限の為、*S. mutans* が歯面に定着出来なかったからと考えられた。

その一方で患児の主たる摂取炭水化物であるデンプン存在下で、分離された *S. gordonii* の酸産生能や平滑面付着能はともに低く、本症例での哺乳齲蝕の原因菌ではないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, *Streptococcus mutans*, which is cariogenic bacteria, was not detected, but *Streptococcus gordonii* was only isolated from the oral cavity of the glycogenosis type I child with nursing bottle caries. The reason was thought to be that *S. mutans* could not produce adhesive glucan from sucrose by her restricted intake of sugar. On the other hand, it was observed that the isolated *S. gordonii* strain possess low possibility of acid production and adhesion to smooth surface in the presence of starch that was her mainly taken carbohydrate. For this reason, it was suggested that the *S. gordonii* strain could not cause the nursing bottle caries in this case.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：小児・矯正歯科

科研費の分科・細目：

キーワード：糖原病Ⅰ型、哺乳齲蝕、口腔細菌叢

1. 研究開始当初の背景
一般の齲蝕は、

(1) ミュータンスレンサ球菌がショ糖を基質として粘着性の非水溶性グルカンを産生して歯面に付着し、デンタルプラークバイオフィルムを形成する。

(2) プラークバイオフィルム中の細菌がショ糖をはじめとした発酵性炭水化物から代謝産物としての有機酸を産生し、この有機酸により歯面が脱灰する。

という二つのステップを経て発症する。その成立は、Keyesの輪で示されるように、**歯・食物(糖質)・細菌の三要素**が揃ってできるものであり、とくに**原因菌であるミュータンスレンサ球菌と原因基質であるショ糖の二つの因子は必須**といえる。

一方、**哺乳齲蝕では、**

① 齲蝕原性菌であるミュータンスレンサ球菌の定着は2歳以降に起きる。

② 哺乳齲蝕の主たる原因食物と考えられる母乳、人工乳に含まれるのは7%乳糖であり、ショ糖ではない。

③ 哺乳齲蝕では顕著なプラークバイオフィルムの形成は認められない。

という点から、ミュータンスレンサ球菌とショ糖によって引き起こされる一般の齲蝕と哺乳齲蝕は発症メカニズムが異なると考えられる。また、通常の食事においてショ糖や乳糖も含め糖類の摂取が制限されている糖原病I型の患児でも哺乳齲蝕が発症しているという事実は、これを裏付けるものである。

これまで我々は、ミュータンスレンサ球菌が哺乳齲蝕の原因菌となり得るかどうかの検証を *in vitro* の系で行ってきた。その結果、浮遊培養系のミュータンスレンサ球菌は乳糖から酸産生を行うものの、人工的に作成したグルカンバイオフィルム中のミュータンスレンサ球菌は、乳糖から酸産生を行わないことを明らかにした。また、ヒトの齲蝕に関与する主たるミュータンスレンサ球菌のうち、*Streptococcus mutans* に対して、乳糖の代謝に必要な乳糖の分解酵素β-ガラクトシダーゼの mRNA レベルでの発現の観察をリアルタイム RT-PCR を用いて行った。その結果、グルカンバイオフィルム系でのβ-ガラクトシダーゼの発現量は、浮遊培養系のその1/34まで減少しており、グルカンバイオフィルム中の *S. mutans* は殆ど乳糖の代謝を行っていないことを明らかにした。

さらにグルカンバイオフィルム中の *S.*

mutans がどのような経路で、代謝のための糖源を得ているかを推定するために、デキストラナーゼ遺伝子 (*dexA*) の発現をみたところ、グルカンバイオフィルム系では浮遊培養系の約2倍であり、**グルカンバイオフィルムを形成した *S. mutans* は、周囲のグルカンをデキストラナーゼで分解してできたグルコースから糖源を得ている**ことが明らかとなった。

以上のことから、グルカンバイオフィルムを形成した *S. mutans* は哺乳齲蝕の原因菌ではないこと、状況証拠が揃えられ、哺乳齲蝕の真の原因菌とその発症メカニズムに関する研究はようやくそのスタートラインに立ったところである。

2. 研究の目的

この小児歯科領域ではいまだに問題となっている哺乳齲蝕はどうしてできるのだろうか？

本研究の目的はこの哺乳齲蝕の発症メカニズムを明らかにすることであり、ミュータンスレンサ球菌が原因菌でないのであれば、**真の原因菌を明らかにすることである。**

3. 研究の方法

本研究では、哺乳齲蝕を発症した糖原病I型患児と、同じく哺乳齲蝕を発症した健常児から得られた唾液もしくはプラークを被験対象とする。これらの検体からその構成細菌叢のプロフィールを作成し、その比較から実際に糖原病I型患児で哺乳齲蝕の原因菌となりうる菌種が絞り込まれているかどうかを検討する。また、構成細菌叢のプロフィールの作成には、従来型の培養法からそれに続く生化学的性状検査に加え、分子生物学的な手法を用いた遺伝子レベルでの詳細な調査も行う。哺乳齲蝕の原因菌として同定された菌種に対しては、本来齲蝕の基質とならないが糖原病I型患児では哺乳齲蝕の原因基質と考えざるを得ないデンプンに関して、その代謝に関わる分解酵素の産生があるのかをタンパクレベル、遺伝子レベルで検索し、この哺乳齲蝕の原因菌のデンプンからの酸産生能についても検討する。

平成20年度

(1) 哺乳齲蝕を発症した糖原病I型患児と健常児の口腔細菌叢のプロフィールの作成

① サンプルの採取

②唾液サンプル中の細菌の培養と生化学的性状検査による菌種同定

単一菌に分離されたことを確認した後、生化学的性状検査による菌種同定キットにて菌種同定を行う。

③プラークおよび唾液サンプルからの細菌 DNA の抽出と分子生物学的な手法を用いた菌種同定

唾液中には培養法により検出できない菌や難培養性の菌も存在するので、プラークおよび唾液から細菌 DNA を抽出し、分子生物学的な手法を用いてダイレクトに口腔細菌の検出同定を行う。

④ 口腔細菌叢のプロファイルの比較と哺乳齲蝕の原因菌の統計学的推定

平成 21 年度

(2) 同定された哺乳齲蝕の原因菌は、どのようにして哺乳齲蝕を発症するか？

通常の哺乳齲蝕の基質は乳糖と考えられる。したがって、哺乳齲蝕の原因菌が他の口腔細菌に比べて、その分解酵素であるガラクトシダーゼの発現が上昇し、これを代謝の基質として利用して有機酸の産生が出来るようになっているか？を検証する必要がある。

(3) 同定された哺乳齲蝕の原因菌が糖類の摂取制限を受けている糖原病 I 型患児で、どのようにして哺乳齲蝕を発症したか？

糖原病 I 型患児で哺乳齲蝕の原因基質と考えられるものは、デンプンをおいて他にはない。したがって、その原因菌はデンプンを代謝に利用可能なサイズにまで水解することが出来る酵素を有していることが予想される。このデンプン分解酵素の遺伝子が外来性なのか、本来持っているものかを検討した上で、哺乳齲蝕の原因菌の口腔内への定着様式についても言及する。

(4) 哺乳齲蝕の予防を行う方法の策定

以上の哺乳齲蝕発症メカニズムに関する情報をもとに、これを生化学的、分子生物学的に予防する方法を策定するとともに、その一方で食生活を含めた生活習慣の改善でできることがあれば、実際の診療の現場で指導できるような指針の構築を行い、その情報を学会発表する。

4. 研究成果

糖原病 I 型 (von Gierke 病) は肝臓にグリコーゲンが蓄積する代謝疾患で、グリコーゲンの基質と成り易いショ糖、ブドウ糖、果糖、

乳糖などの糖類の摂取がこの疾患患者は原則禁忌であり、炭素源の摂取は主としてデンプンからである。当科を受診した糖原病 I 型患児は夜間も乳糖などの糖類を含まない人工乳にコーンスターチを加えたものを摂取し、上顎前歯部に哺乳齲蝕を発症していた。この齲蝕の原因は夜間の哺乳であるが、これには齲蝕の原因であるショ糖は含まれていない。したがって、この患児の口腔細菌叢を解析することは、哺乳齲蝕の成因を検討する上で重要であると考え、この患児の口腔細菌叢の解析を行った。

PCR 法で検出された唾液中の菌種は、培養法で分離しストレプトグラムで同定した菌種と結果が一致し、この検出された菌種中には、齲蝕の原因菌の *S. mutans* は存在しなかった。採取唾液を MSB 寒天培地に播種したところ、単一の *S. mutans* 様のラフ型コロニーのみが得られたが、この菌株は血液寒天培地上で α 溶血性を示し、ストレプトグラムおよび菌種同定 PCR でともに *S. gordonii* と同定された。これより、この菌株は *S. mutans* ではなく *S. gordonii* と判定され、この患児の口腔内には *S. mutans* が存在しないことが示唆された。これは口腔内にショ糖が存在しないために *S. mutans* が定着するのに必要な粘着性グルカンを合成することができなかったからと考えられる。

今回分離された *S. gordonii* を用いてデンプンからの酸産生を観察したところ、その pH は 6.8 であったことから酸産生は弱いと考えられた。また、スクロース、デンプンによる付着試験では全く試験管壁に付着しないことがわかった。*S. gordonii* は、amylase-binding protein を介して歯面に定着することが報告されているが、amylase を付与した状態でのデンプンによる付着試験でも全く試験管壁に付着しないことがわかった。

以上のことから、

(1) 哺乳齲蝕を有する糖原病 I 型患児から分離された口腔レンサ球菌は *S. gordonii* のみで、齲蝕原性細菌の *S. mutans* は検出されなかった。これは患児のショ糖の摂取制限の為、*S. mutans* が歯面に定着出来なかったからと考えられた。

(2) その一方で患児の主たる摂取炭水化物であるデンプン存在下で、分離された *S. gordonii* の酸産生能や平滑面付着能はともに低く、本症例での哺乳齲蝕の原因菌ではな

いことが示唆された。

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)

[学会発表] (計1件)

佐藤恭子、星野倫範、齋藤 幹、西口美由季、小西郁理、藤原 卓、哺乳齲蝕はなぜできるか？—糖原病I型患者の口腔細菌叢の解析から—、第46回日本小児歯科学会、2008年6月、埼玉県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 恭子 (SATO KYOKO)
長崎大学・病院・助教
研究者番号：70404499

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

藤原 卓 (FUJIWARA TAKU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00228975

星野倫範 (HOSHINO TOMONORI)
長崎大学・病院・講師
研究者番号：00359960

齋藤 幹 (SAITOU KAN)
長崎大学・病院・助教
研究者番号：40380852

西口 美由季 (NISHIGUTI MIYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10253676

小西 郁理 (KONISHI IKURI)
長崎大学・病院・助教
研究者番号：00572380