

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07108

研究課題名(和文) 乳幼児期における過酸化水素産生性ミテイス群レンサ球菌の初期定着機構の解明

研究課題名(英文) To elucidate the mechanism of early colonization by hydrogen peroxide producing mitis group of streptococci in infancy.

研究代表者

松島 瞳 (Matsushima, Hitomi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60804911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、齲蝕原性のないミテイス群レンサ球菌の持つ過酸化水素産生能が、小児期の初期定着へ関与するかを検討するため、乳幼児を対象に唾液を採取し、全口腔細菌に対するこれらの菌群の割合をTaqMan probeを用いたリアルタイムPCR法により測定した。その結果、過酸化水素産生性細菌の割合は無歯期から乳前歯萌出期より徐々に変化することがわかった。これにより、齲蝕リスクの低い口腔細菌叢の形成は無歯期から乳前歯萌出期にかけて始まることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過酸化水素産生性ミテイス群レンサ球菌の産生する過酸化水素は自身にとっても毒性を示すにもかかわらずカタラーゼを持たず、好気的環境で大量の過酸化水素を放出する。小児期におけるより良い口腔細菌叢の形成についての解明を行うことは、その後の小児期への齲蝕予防に大きく寄与することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mitis group of streptococci which is unrelated to caries, is an inhabitant of the oral commensal flora and it is known to have a hydrogen peroxide-producing ability. In this study, we analyzed the ratio of mitis group of streptococci to all of the oral bacteria using TaqMan real-time PCR Assay on sample of saliva from infancy children. As a result, their ratio increase in accompany of eruption teeth. We investigated that hydrogen peroxide-producing ability might influence of early colonization in predental period through eruption stage of deciduous teeth.

研究分野：小児歯科

キーワード：小児 口腔レンサ球菌 初期定着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔常在細菌叢を構成するミテイス群レンサ球菌は、唾液成分や口腔粘膜細胞に高い付着能を持ち、乳歯が萌出する前から口腔内に定着している。しかし、これらの菌群は生体にとって有害である活性酸素種のひとつである過酸化水素の産生能を持つことでも知られている。最近の研究ではミテイス菌群の産生する過酸化水素は、免疫細胞や上皮細胞に対し細胞死や炎症反応を誘導することが報告されている。

これまで我々は、ミテイス群レンサ球菌が産生する過酸化水素が自然免疫細胞であるマクロファージにどのような機能変化を与えるか解析を進めており、過酸化水素産生性細菌である *Streptococcus oralis* に感染させたマクロファージは、*Tnf* や *IL-6* などの炎症性サイトカインの産生が抑制されることを明らかにした。また、マクロファージに過酸化水素処理を行ったところ、核内転写因子である *NF-kB* の活性化を抑制し、炎症性サイトカインの産生を抑制すること、さらにマクロファージの代表的な機能である貪食能の低下が見られることを明らかにした。

以上のことから、ミテイス群レンサ球菌の産生する過酸化水素は口腔粘膜における免疫機構に何らかの影響を及ぼし、乳幼児期における初期定着に有利に働いているのではないかとこの仮説をたて、これらの菌群について追及することは、齲蝕予防の点で重要な糸口になると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

ミテイス群レンサ球菌は齲蝕原性や歯周病原性がなく、健常人においてはほとんど毒性を示さない。口腔内に初期定着する菌は、本研究で着目しているこれらの菌群の他に乳酸菌として知られている乳酸桿菌や乳酸球菌があげられるが、これらの菌群もまた同様に過酸化水素産生性細菌である。これらの細菌がなぜ他の細菌に先駆けて口腔粘膜に定着しているのかは明らかになっていないが、研究代表者らはこの過酸化水素産生能が口腔内での初期定着に何らかの影響を及ぼし、齲蝕に罹患しにくい口腔細菌叢の形成に関与しているのではないかとこの仮説を立てている。本研究は乳幼児期における全口腔細菌に対する過酸化水素産生性細菌の割合をリアルタイム PCR により測定し、初期定着への関与を考察することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、乳幼児から採取した唾液をサンプルとして用い、過酸化水素産生性細菌の割合について明らかにした。なお、本研究を実施するにあたり、昭和大学歯科病院臨床試験委員会の承認および保護者からの同意を得ている。

(1) 被験者から唾液の採取、保存

研究代表者の所属する小児歯科外来および協力型施設に来院した患児を対象に、保護者に対する十分な説明を行い、同意を得た上で唾液を採取した。唾液の採取時期は①無歯顎期 乳切歯萌出期 乳歯列完成期 永久歯萌出開始期とし、比較するために成人からも採取した。なお、バイアスを少なくするために、口腔内にう蝕がないものを対象とした。唾液の採取方法は、患児の安静時唾液を滅菌スポイトにて採取し、-80 で保存した。

(2) DNA の抽出

QIA amp UCP Pathogen Mini Kit(50)を用いて採取したサンプルから DNA の抽出を行い、-80 で保存した。

(3) TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR

過酸化水素産生に關与する可能性のある4つの遺伝子、pyruvate oxidase(spxB)、NADH oxidase(NOX-1)、Lactate oxidase(LOX)、 α -glycerophosphate oxidase(GLP)にそれぞれ特異的なプローブおよびプライマーを作製した。過酸化水素酸性性細菌の割合は16S rRNA 遺伝子を内部標準として Ct 値を比較することで算出した。作製したプローブ、プライマーのシーケンスは以下の通りである。

spxB Probe [6FAM]CGTCACCTTCACATGACACC[TAM]

16S universal Probe [HEX]CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC[TAM]

S.oralis *spxB* Primer F: 5' -AACAAACCAAACTGGCGTGA-3'

S.oralis *spxB* Primer R: 5' -CACTCTTTGCGACAATGGGT-3'

16S universal Primer F: 5' -TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA-3'

16S universal Primer R: 5' -TGCGGGACTTAACCCAACA-3'

(4) 次世代シーケンサーによる菌叢解析

研究代表者は初年度に健常な小児(無歯顎期1名、乳切歯萌出期1名、乳歯列完成期2名、永久歯萌出開始期2名) 6名の唾液から DNA を抽出し、次世代シーケンサー (Miseq, illumina) を用いてメタ 16S rRNA 解析を行った。

4. 研究成果

(1) TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR

本研究では2年間で①無歯顎期28名、乳切歯萌出期17名、乳歯列完成期27名、永久歯萌出開始期18名、永久歯列期6名の合計96名の唾液サンプルを採取することができた。全口腔細菌に対する過酸化水素産生性細菌の割合を測定するために、過酸化水素産生に關与する可能性のある4つの遺伝子に着目しリアルタイム PCR での定量を試みた。*S.oralis* のゲノム DNA を鋳型として実験し pyruvate oxidase(spxB) 以外は特異的な増幅が見られなかった。そのため、spxB のプライマー、プローブを用いて解析を行った。

全口腔細菌に対する過酸化水素産生性細菌の割合は Ct 値を比較することで行った。口腔細菌叢は食生活などの様々な環境因子により変化することから、研究代表者は当初、乳前歯萌出期から乳歯列期にかけて大きく変化することを予測していた。しかし、リアルタイム PCR の結果、過酸化水素産生性細菌の割合は無歯顎期から乳前歯萌出期から徐々に変化することがわかった。これより、齶蝕感受性の低い口腔環境を形成するには乳児期からの予防が重要であることが示唆された。今後は無歯顎期から乳前歯萌出期までの移行期に焦点を当て研究を進めていく予定である。

(2) 次世代シーケンサーによる菌叢解析

細菌叢構成を比較したところ、無歯顎期では *Streptococcus* 属は約 65%であったが、乳切歯萌出期になると約 45%、乳歯列完成期、永久歯萌出開始期になると約 20%と歯の萌出に伴い *Streptococcus* 属の減少と、その他の細菌種の増加が認められた。

また、このうち3名については兄妹であったが、細菌の構成比分布は他の者と比較し概ね類似していたが、口腔環境や食生活に違いがあったため、主要な細菌以外の構成比分布に違いが認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松島瞳 島田幸恵 佐藤昌史 井上美津子 桑田啓貴
2. 発表標題 Streptococcus oralisが産生する過酸化水素によるマクロファージの炎症性遺伝子発現制御について
3. 学会等名 第55回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新田雅一 永田夏琳 下村直史 井澤基樹 川島翼 松島瞳 小倉万莉 志賀正康 杉山智美 浅川剛吉 島田幸恵
2. 発表標題 2015年度当科における全身麻酔手術症例の臨床的観察
3. 学会等名 第55回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松島瞳 杉山智美 大川真純 新田雅一 浅川剛吉 飯島毅彦 島田幸恵
2. 発表標題 急性リンパ性白血病の寛解期に全身麻酔下でう蝕治療を行った1例
3. 学会等名 第34回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----