

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09835

研究課題名(和文) 早期発症型小児齲蝕罹患小児における口腔内細菌叢の解析と新しい疾患予防法について

研究課題名(英文) The metagenome analysis of salivary microflora in Japanese children with Early Childhood Caries and new caries prevention

研究代表者

佐藤 恭子 (SATO, Kyoko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：70404499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：早期発症型小児齲蝕は小児歯科領域で近年問題となっており、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小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。一般的な齲蝕の原因菌はStreptococcus mutansであるが、早期発症型小児齲蝕の発症はその感染時期よりも早いことが多く、このためS. mutansを原因菌とするのは無理があるように思われ、改めて細菌学的な視点でこの早期発症型小児齲蝕の原因菌を追及した研究はあまりない。

本研究では、早期発症型小児齲蝕を発症した小児の口腔細菌叢を解析し、菌種構成に違いがあることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常の成人型齲蝕とは異なり、いまだその原因菌、発症メカニズムが明らかとなっていない早期発症型小児齲蝕の原因菌の究明を、実際の臨床と近年発達した遺伝子工学的手法を組み合わせることで口腔細菌叢の解析を行うという点で本研究は独創的であり、特色とする。また、結果として得られるのは、早期発症型小児齲蝕の原因菌と発症機構の解明であり、これらの結果より得られる意義としては、小児歯科領域あるいは母子保健の領域において、子どもの口腔環境の育成のための指導に役立つ知見および齲蝕の予防の一助となる知見が得られることである。

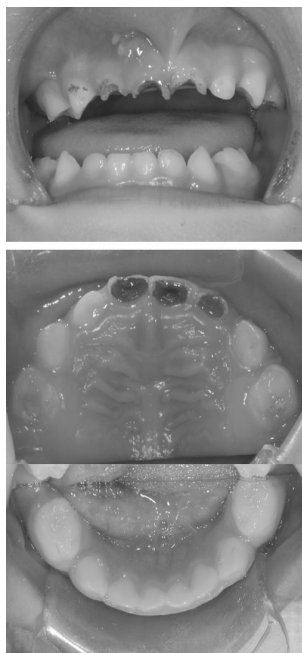
研究成果の概要(英文)：Dental caries is one of the most common chronic infectious disease and Mutans streptococci are well known as prime causative organisms of human dental caries. The oral flora where had caries risk were well analyzed by using 16S rRNA gene probe and so on, and the dental caries associated bacteria were proposed. However, the metagenome sequencing analysis has not yet been employed in children with early childhood caries. The metagenome-sequencing analysis of oral flora is considered important for the prevention of dental caries.

The aim of this study is to indicate the dental caries associated bacteria and/or the phenomenon in salivary flora of children with early childhood caries by microorganism community analysis using metagenome-sequencing. In the microorganism community analysis, the composition of salivary bacterial flora in caries active children would differ from that of caries free children.

研究分野：小児歯科

キーワード：Early Childhood Caries 早期発症型小児齲蝕 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



(図1) ECCを発症している
2歳0か月の女児の口腔内写真

1960年代に Keyes らによって、ミュータンス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。乳歯齲蝕は3歳児において、昭和60年に1人平均2.9歯、有病者率56.2%であったものが、最新の調査である平成28年度の歯科疾患実態調査では1人平均1.0歯、有病者率8.6%と減少し、確実に減少傾向が認められるなど着実に成果が上がってきているといえる。

しかし小児歯科臨床の現場において乳児や低年齢児に、母乳などの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は Early Childhood Caries (早期発症型小児齲蝕)(図1)とよばれている。一般的に齲蝕の原因菌は *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* が口腔内に定着する時期は「感染の窓」と呼ばれており、Caufield (1993) は最も感染が確認される時期は19か月から31か月であると報告している。しかし、Ripa (1988)、Tsubouchi (1994)、Bowen (1997) らはこれらの重症齲蝕を発症した患児の年齢を考えると「感染の窓」以前に齲蝕を発症していると報告している。また Birkhed (1993)、Erickson (1999)、Danchaivijitr (2006) らは母乳あるいは人工乳と齲蝕の関連性について報告をしており、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早期発症型小児齲蝕の発症メカニズムに関しては不明な点が多く、*S. mutans* をそのまま早期発症型小児齲蝕発症の原因菌とするには無理があるように思われる。

研究代表者は2006~2007年度科学研究費補助金(若手研究(スタートアップ))“最新分子生物学的手法を用いた哺乳齲蝕発生メカニズムの解明において”で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 *in vitro* の系で検証を行った。その結果、浮遊培養系のミュータンスレンサ球菌は母乳や人工乳に含まれる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では乳糖から酸産生を行わないことを明らかにした。また *S. mutans* に対して、乳糖の代謝に必要な乳糖の分解酵素 - 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 - ガラクトシダーゼの発現量は浮遊培養系のそれより減少しており、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。

また2008~2009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 - ”において、スクロースの摂取制限がされているにも関わらず、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を行った。患児の口腔内から *S. mutans* は検出されず、その後患児は上顎乳前歯部の齲蝕以外に新生齲蝕を発症していなかったことから、*S. mutans* は哺乳齲蝕の原因菌ではない可能性を

示唆した。

さらに 2013～2015 年度科学研究費基金（基盤研究（C））“早期発症型小児齲蝕（Early Childhood Caries）発症患児の口腔細菌叢解析とその原因菌の再考察”において早期発症型小児齲蝕を発症した小児の口腔細菌叢の群集解析を行い、健常児と比較を行った。齲蝕罹患小児と健常児の口腔内は Streptococcus 属が最大の比率をしめ、成人の構成比と異なることが明らかになった。また 12 名の齲蝕罹患小児の中にミュータンスレンサ球菌が検出されない小児が 3 名（1 歳 11 か月～3 歳 6 か月）存在し、齲蝕に罹患している小児との菌種構成の違いが、早期発症型小児齲蝕発症に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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。その一方で、プロバイオティクスとして乳酸菌の摂取に関心が集まっている。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早期発症型小児齲蝕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。本研究の目的は、*S. mutans* に感染していない早期発症型小児齲蝕に罹患している小児の口腔細菌叢の解析を行い、その原因となる細菌を検索することである。

3．研究の方法

ECC の認められた小児 22 名（齲蝕罹患群：男児 10 名、女児 12 名、1 歳 1 か月～3 歳 4 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 2 名（健常群：男児 1 名、1 歳 6 か月、女児 1 名、2 歳 1 か月）を対照群とし、唾液と歯垢を採取した。また齲蝕罹患群は、Mutans



齲蝕罹患児の口腔内写真 健常児の口腔内写真
図 2

Streptococci (*S. mutans* または *S. sobrinus*) の感染の有無で MS (-) 群と MS (+) 群の 2 群に分けた。MS (-) 群は(男児 5 名、女児 5 名、1 歳 1 か月～2 歳 10 か月)、MS (+) 群は(男児 5 名、女児 7 名、1 歳 7 か月～3 歳 4 か月)であった。

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 の抽出を行った。
- (2) 被験小児からの(1)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 増幅産物を得た。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った。

4. 研究成果

各群における、口腔細菌叢の属レベルでの検出結果を図3~5に示す。表1~3は各群の属レベルでの平均検出率（上位30位）を示す。

(1) MS (-) 群

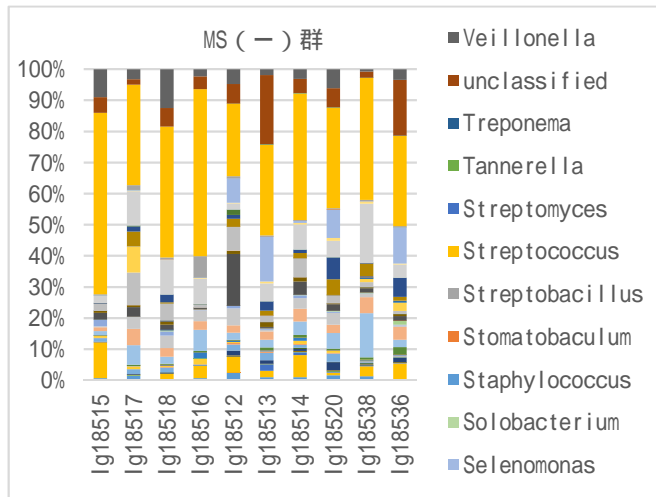


図3

口腔細菌叢の平均検出種別は上位より、属レベルで Streptococcus 属(約38%)、Rothia 属(約8%)、Veillonella 属(約5%)の順であった。平均検出属数は54属であった。

MS (-) 群	%
Streptococcus	37.98
Rothia	7.67
unclassified	7.55
Veillonella	4.77
Gemella	4.71
Selenomonas	4.41
Actinomyces	4.04
Neisseria	3.97
Granulicatella	3.32
Lautropia	3.28
Haemophilus	2.65
Prevotella	2.30
Porphyromonas	2.14
Capnocytophaga	1.30
Oribacterium	1.22
Streptobacillus	1.14
Abiotrophia	1.05
Campylobacter	0.80
Leptotrichia	0.73
Kingella	0.65
Fusobacterium	0.64
Chryseobacterium	0.62
Corynebacterium	0.43
Schaalia	0.37
Aggregatibacter	0.36
Lachnoanaerobaculum	0.28
Pseudoleptotrichia	0.21
Cardiobacterium	0.19
Bergeyella	0.17
Peptidiphaga	0.10

表1

(2) MS (+) 群

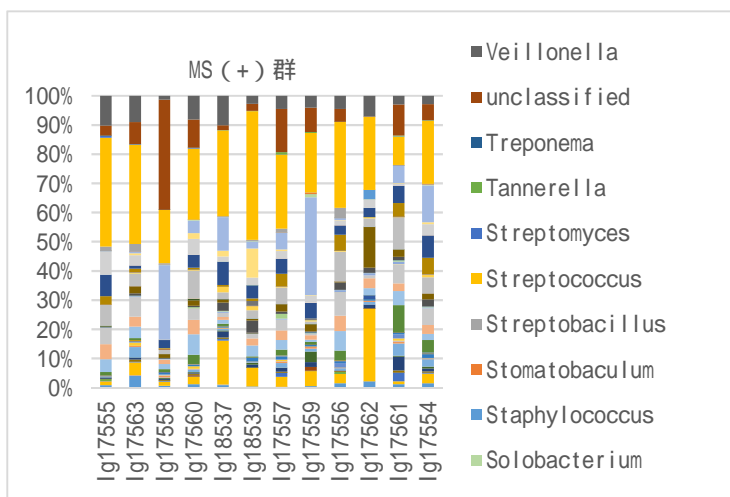


図4

口腔細菌叢の平均検出種別は上位より、属レベルで Streptococcus 属(約27%)、Selenomonas 属(約9%)、Actinomyces 属(約6%)の順であった。平均検出属数は58属であった。

MS (+) 群	%
Streptococcus	26.56
unclassified	8.85
Selenomonas	8.58
Actinomyces	5.99
Veillonella	5.63
Neisseria	5.28
Prevotella	4.87
Haemophilus	3.73
Gemella	3.52
Granulicatella	3.10
Rothia	2.92
Leptotrichia	2.58
Fusobacterium	2.23
Porphyromonas	2.19
Lautropia	1.42
Capnocytophaga	1.38
Schaalia	1.36
Campylobacter	1.23
Abiotrophia	1.21
Streptobacillus	0.83
Corynebacterium	0.64
Oribacterium	0.57
Candidatus Saccharimonas	0.52
Aggregatibacter	0.46
Kingella	0.35
Lachnoanaerobaculum	0.35
Cardiobacterium	0.35
Clostridium	0.32
Chryseobacterium	0.30
Bergeyella	0.30

表2

(3) 健常群

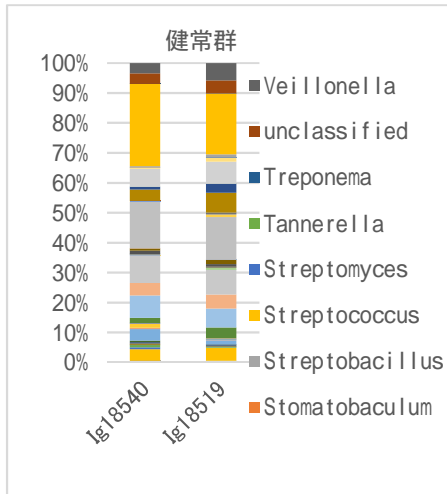


図 5

健常群	%
Streptococcus	23.83
Neisseria	14.86
Haemophilus	8.65
Gemella	6.91
Rothia	6.64
Porphyromonas	5.11
Veillonella	4.62
Granulicatella	4.43
Actinomyces	4.10
unclassified	4.04
Capnocytophaga	2.63
Fusobacterium	2.59
Prevotella	1.97
Leptotrichia	1.08
Lautropia	1.03
Schaalia	0.85
Streptobacillus	0.68
Chryseobacterium	0.66
Alloprevotella	0.51
Oribacterium	0.48
Lachnoanaerobaculum	0.47
Abiotrophia	0.47
Campylobacter	0.45
Aggregatibacter	0.41
Peptostreptococcus	0.40
Bergeyella	0.34
Cardiobacterium	0.26
Kingella	0.25
Candidatus Saccharimonas	0.24
Corynebacterium	0.18

表 3

健常群 2 名の口腔細菌叢の属レベルでの検出結果を図 5 に示す。それぞれ 36 属、34 属検出された。口腔細菌叢の平均検出種別は上位より、属レベルで Streptococcus 属(約 24%)、Neisseria 属(約 15%)、Haemophilus 属(約 9%)の順であった。平均検出属数は 49 属であった。

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、中でも 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ていたが、比率は異なっており、ECC を発症している小児では、健常群と比較して、Streptococcus 属の割合は多い傾向にあった。

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約半数の 10 名認められ、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を示唆しており、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

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	藤原 卓 (Fujiwara Taku) (00228975)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	削除：2022年9月15日
研究分担者	星野 倫範 (Hoshino Tomonori) (00359960)	明海大学・歯学部・教授 (32404)	
研究分担者	西口 美由季 (Nishiguchi Miyuki) (10253676)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	
研究分担者	近藤 好夫 (Kondo Yoshio) (30581954)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関