

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19791581
研究課題名 (和文) 小児口腔のバイオフィルム解析によるオーダーメイド治療の確立
研究課題名 (英文) Probability of the Custom-made treatment, analyzed of Biofilm of children' s mouths.
研究代表者 吉村 剛 (YOSHIMURA GOH) 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教 研究者番号 50403530

研究成果の概要：齲蝕は歯面に付着するバイオフィルム（デンタルプラーク (p1)）によって生ずる。したがって、原因菌 (MS: *S. mutans* (S. m) と *S. sobrinus* (S. s)) を含めた p1 の解析は重要である。今回我々は、酸による環境の変化による p1 および MS の変化について着目し、検討を行った。その結果、p1 の Cariostat 値 (CAT21[®]) と p1 中の S. m 菌の比率は相関する傾向が見られた。また、MS のうち耐産生能が高い株は F-ATPase の発現量が 2 倍程度高いことが示された。従って、酸環境と p1 の状態、及び菌の性状には深い関連があることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1, 100, 000	0	1, 100, 000
2008 年度	1, 000, 000	300, 000	1, 300, 000
年度			
年度			
年度			
総計	2, 100, 000	300, 000	2, 400, 000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：小児、齲蝕、齲蝕リスク、定量 PCR, リアルタイム RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

小児の齲蝕予防を実践する上で、齲蝕原性菌 (MS: *S. mutans* (S. m) と *S. sobrinus* (S. s)) の病原性を調べることは重要である。そして、齲蝕原因菌およびデンタルプラーク (p1) の性状は、齲蝕病原性に関連しており、p1 内の酸性環境により影響を受けることが明らかとなってきた。

また、p1 に含まれる齲蝕原因菌の菌種や量は、特に酸性環境に伴って変化するとの報告

があり、酸性下で *S. m* が増殖し生存できる能力 (耐酸性能) に関連する遺伝子 (*f-atpase*) の領域も明らかにされた。

2. 研究の目的

今回、我々は、p1 および MS の性状と、酸性環境との関連性について、分子生物学に検討を行った。

まず、p1 から *S. m* および *S. s* を分離し、p1 が産生する酸の Cariostat 値 (CAT 値) と分離菌株の耐酸性能について検討し、p1 の酸産生

能(CAT 値)と齶蝕原因菌耐酸性能の関連について、検討を行った。

次に、リアルタイム PCR 法を用いて、酸性環境が pI および MS の性状に与える影響について、菌の比率の測定を行った。

そして、齶蝕原因菌 (*S. m*) の齶蝕病原性に関連する、*f-atpase* などの遺伝子の mRNA 発現を検討した。

3. 研究の方法

1) プラークの採取および菌の分離

プラークからのミュータンスレンサ球菌の分離は広島大学病院小児歯科診療室を受診した小児のうち、保護者と小児にプラークの採取について説明を行い、同意の得られた 4-17 歳の 20 名を対象とした。患児および保護者の同意を得たうえでプラークを採取した(広島大学倫理委員会許可番号 56)。併せて口腔内診査を行い、齶蝕経験歯率(df 歯率)を算出するとともに Cariostat (CAT21[®]) の判定を行った。

プラークの採取にはブラッシング法を用いた。通法に従い滅菌歯ブラシで全歯面をブラッシングし、付着したプラークを生理食塩水中に懸濁した。懸濁液を遠心して上清を取り除き、沈殿物を試料とした。

臨床分離株は、採取したプラークを、改良型 MSB 培地に塗布することにより、分離した。最終的には、*S. mutans* と *S. sobrinus* 両菌種の特異的なプライマーを用いた PCR 法によって、菌種を決定した。

2) プラークに含まれる齶蝕原因菌の比率の測定 (実験 1, 図 1)

試料から、Wilson の方法を用いて DNA を抽出した。リアルタイム PCR 法を用いてプラーク中の齶蝕原因菌の DNA 量を定量的に測定し、Streptococcus 属全体に占める *S. m*, *S. s* の比率を検討した。*S. m*, *S. s* の菌種特異的なプライマー、プローブ等は Yoshida らの報告を用い、Streptococcus 属を認識するものは松本の報告を用いた。なお、比率の測定は 2~5 歳の乳歯列の患児 11 人を対象とした。

3) 分離菌株の耐酸性と Cariostat 値 (CAT 値) の比較 (実験 2, 図 2)

分離菌株を BHI 液体培地にて培養後、pH7.0 及び pH4.0 (低 pH 条件) のリン酸緩衝液中に懸濁し、37°C で 1 時間インキュベーションを行った。

その後、懸濁液を BHI 寒天培地に播種して 37°C にて培養を行った。2 日後、生菌数をカウントすることにより生存率を算出し、CAT 値との関係を検討した。

そして、次の実験に、CAT 値と耐酸性能が共に高かった *S. m* 菌 5 株と、共に低かった 5 株、計 10 株を用いた。

4) 耐酸性に関連する遺伝子の発現の測定 (実験 3, 図 3, 4)

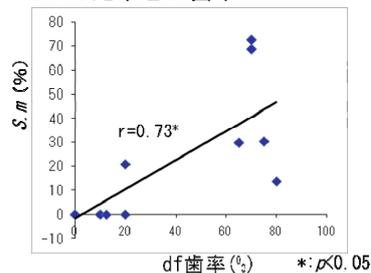
(3) において分離した齶蝕原因菌のうち、耐酸性及び CAT 値が共に高い株と、両方が低い株を各 5 株ずつ用いた。各株を pH5 (酸性) と pH7 (中性) に調整した BHI 液体培地中で OD₆₀₀=0.6 まで培養した後、菌体を回収した。回収した菌体から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法を用い、各遺伝子の mRNA の発現を高耐酸性株群と低耐酸性株群で比較した。なお、菌体内・外の pH を調整する酵素である *f-atpase* に特異的なプライマーは Kunhert らの報告を用い、齶蝕との関係が深い *gtf-B* には Yoshida らの報告に、菌の分離・生理活性と関係が深い *aml* については Ahn らの報告によるものを用いた。

4. 研究成果

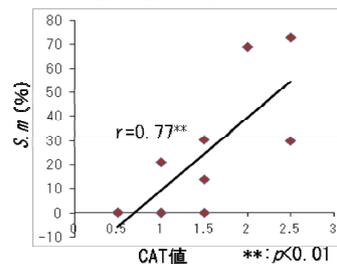
1) 対象者の 100% から *S. m* が、72.7% から *S. s* が検出された。プラークに含まれる streptococcus 属全体に占める齶蝕原因菌の比率と齶蝕経験歯率及び CAT 値との関係を検討した結果、*S. m* で正の相関関係が認められた。*S. s* については相関関係は認められなかった。

sample	CAT 値	df 歯率 (%)	<i>S. m</i> (%)	<i>S. s</i> (%)	<i>S. s</i> / <i>S. m</i> (%)
1	1	20	20.9	0.0006	2.9 × 10 ⁻³
2	0.5	20	0.07	0.005	7.1
3	1	10	0.1	0.004	4.0
4	0.5	0	0.18	0.24	133.3
5	1	0	0.0069	—	—
6	1.5	12.5	0.034	0.0045	13.2
7	1.5	80	13.77	0.71	5.2
8	1.5	75	30.28	—	—
9	2	70	68.86	0.0076	1.1 × 10 ⁻²
10	2.5	70	72.74	0.003	4.1 × 10 ⁻³
11	2.5	65	29.77	—	—

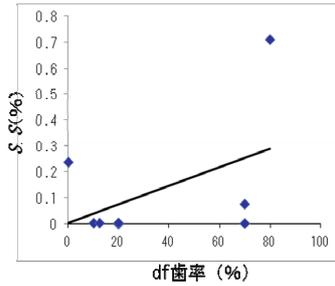
S. m の比率と df 歯率



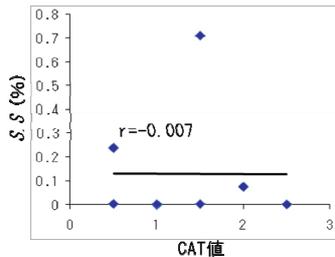
S. m の比率と CAT 値



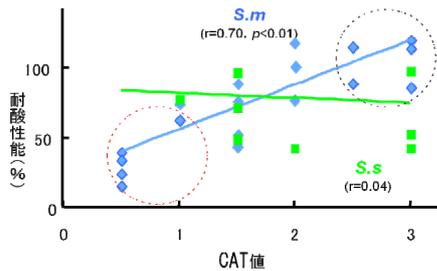
S. sの比率とdf歯率



S. sの比率とCAT値



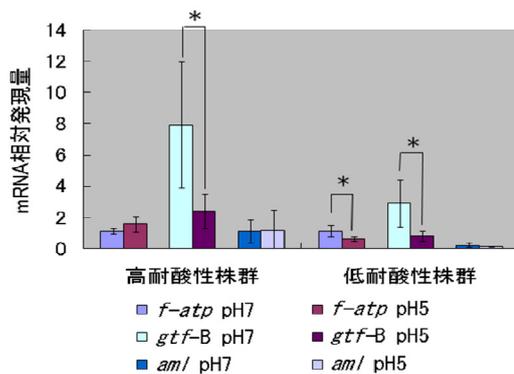
2) *S. m* 菌群の耐酸性能は、CAT 値と正の相関関係にあったが、*S. s* については CAT 値との間に相関関係は認められなかった。



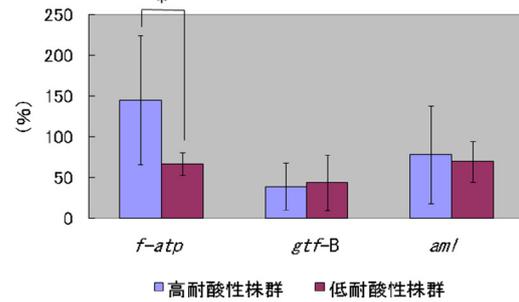
3) 耐酸性機構と関係が深いと考えられる *f-atpase* の mRNA 発現量は株の耐酸性能によって傾向が異なっていた。酸性環境下における *f-atpase* 遺伝子の mRNA 発現量は、中性環境下と比べ高耐酸性株群では 40% 上昇したが、低耐酸性株群では 33% 減少した。

4) 酸性環境下における *gtf-B*, *aml* の mRNA の発現量は、高耐酸性株群も低耐酸性株群も低下し、*gtf-B* では中性環境下の 50%, *aml* では 70% まで減少した。

齶蝕関連遺伝子のmRNA発現量



酸環境の変化による各遺伝子発現量の増減



Student's *t*: * $p < 0.05$

今回の結果から、口腔内における *S. m* の比率と df 歯率、プラークの CAT 値との間に正の相関関係が示された。特に、CAT 値との相関関係が示されていることより、*S. m* の比率がプラークの酸性環境に影響されることが示された。*S. s* については、相関関係が示されなかったため、酸性環境による影響を受けているかは明らかでない。

菌の耐酸性能とプラークの CAT 値を調べた結果でも、*S. m* で正の相関があるという結果が得られた。このことは、プラーク中で *S. m* が優勢となる要因の一つに耐酸性能の違いがあることを示していると考えられる。

一方、これまでの研究で、*S. m* は pH 環境(酸)に応じて酵素の産生量が調節されることが示されている。そして、耐酸性能については、*f-atpase* などの酵素が深く関わっていることが明らかとなっている。

今回、齶蝕病原性に関連する遺伝子の mRNA の発現を調べた結果、酸性環境下における *f-atpase* の発現量が、高耐酸性株群では中性環境下と比べ 40% 上昇したが、低耐酸性群では 33% 減少していた。今回示された *f-atpase* の発現量の違いは、菌の耐酸性能に影響していると考えられる。*gtf-B* と *aml* は、酸性環境下において耐酸性の違いに関係なく発現量が低下していた。

今後はさらに、酸性環境下での mRNA の発現に違いを与える因子について、分子生物学的に検討を行ってみたい。

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 4 件)

1) 大原 紫, 吉村剛, 鈴木淳司, 香西克之., 酸性環境下におけるミュータンスレンサ球菌の性状変化の検討, 小児歯科学雑誌, 無, 47 (2), 2009, 386-386

2) 吉村 剛, 鈴木淳司, 中岡美由紀, 坪井 文, 大谷 聡子, 大原 紫, 香西克之., 小児口腔より分離した黄褐色を呈するデンタルプラークの研究, 小児歯科学雑誌, 有, 46(4), 2008, 415-422

3) 鈴木淳司, 吉村剛, 大谷聡子, 有木美早, 三浦梢, 角本法子, 蔵本銘子, 中岡美由紀, 林文字, 香西克之., 小児病棟入院患児のう蝕罹患状態, 障害者歯科, 有, 29 (2), 2008, 187-191

4) 吉村剛, 大谷聡子, 坪井文, 鈴木淳司, 香西克之., 小児から分離したミュータンスレンサ球菌の耐酸性能に関する研究, 小児歯科学雑誌, 無, 46 (1), 2008, 108-108

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 大原 紫, 吉村剛, 鈴木淳司, 香西克之., 酸性環境下におけるミュータンスレンサ球菌の性状変化の検討, 第47回日本小児歯科学会大会, 2009. 5. 14-15, 大阪

2) 大谷聡子, 吉村剛, 坪井文, 海原康孝, 水野龍治郎, 光畑智恵子, 有木美早, 三宅奈美, 鈴木淳司, 香西克之., 入院患児の口腔管理について 5年間の評価, 第46回日本小児歯科学会大会, 2008. 6. 12-13, 埼玉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 剛 (YOSHIMURA GOH)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 50403530

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者