様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　６　月　　８　日現在

機関番号：　３１２０１
研究種目：　基盤研究(C)
研究期間：　2012～2014
課題番号：　２４５９３１０８

研究課題名（和文）ミュータンスレンサ球菌が伝播しない小児口腔細菌叢の解明

研究課題名（英文）Elucidation of oral flora of children with no transmission of mutans streptococci

研究代表者
田中　光郎（Tanaka, Mitsuro）

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：１０１４３５９６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：ミュータンスレンサ球菌(MS)がプラーク中に存在していた小児は327名中121名で37%の存在率でやや比率が低かった。MSが口腔内に存在する小児121名と存在しない小児206名で、P.gingivalis,T.denticola,T.forsythensis,A.actinomyceptemcomitansの検出された割合（%）はそれぞれ、16：12、0：0、26：30、77：77という結果であり、歯周病原性細菌4種類の有無には、口腔内のMSの有無は全く相関がないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Mutans Streptococcus (MS) was detected in 121 children out of 327. The abundance ratio was 37%. The detection ratio of P.gingivalis, T.denticola, T.forsythensis, A.actinomyceptemcomitans in 121 children who had MS in their mouth and 206 children who had no MS were 16：12、0：0、26：30、77：77 respectively. This result showed that there was no relationship between existence of the four major periodontal pathogen bacteria and existence of MS in the mouth of children.

研究分野：　小児歯科学

キーワード：　ミュータンスレンサ球菌　感染　細菌叢　歯周病原性細菌　T-RFLP

１．研究開始当初の背景

母親の唾液ミュータンスレンサ球菌（MS）数を減少させるとその子供へのMS 感染率が低くなり、さらにその結果として、小児の齲蝕罹患率が低くなることは広く知られており、小児へのMS の感染定着は、小児の齲蝕予防の観点から現在においても未だに重要な課題である。また、小児への MS の感染時期が遅ければ遅いほど、小児の齲蝕発生は抑制されることも示されており、小児の齲蝕を抑制するためには、MS の小児への感染を阻止する、あるいはその時期を遅らせることがきわめて有効な予防法となる。

齲蝕のないグループと齲蝕の多いグループの口腔内細菌叢を DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）を用いて比較した研究において、齲蝕のないグループの口腔内細菌叢は齲蝕の多いグループに比べて、細菌の種類が多様であり、多くの種類の細菌が存在していた。さらに興味深いことに帝王切開による分娩で生まれた小児よりも産道を経て生まれた小児の方が、MS の感染時期が有意に遅くなることが示されており、これは産道で様々な細菌に感染した口腔内には、帝王切開で無菌的に生まれた場合に比べてより多くの細菌が早く定着し、口腔内細菌叢が多様化することが、ひとつの要因ではないかと考察されている。

MS の小児への感染は生後 19 か月から31 か月の間に最も起こりやすく、ニューヨーク大学の Caufield PW らはこの期間をMS の小児への感染の窓と呼んでいる。この時期は小児の歯の萌出時期と対応しており、MS の主な定着部位が歯である事との関連性が示唆されているが、このデータで特に注目されることは、この期間以降はMS の感染が起こりにくくなるという事実である。その理由として、MS の感染が遅れた場合、他の先に感染した細菌との競合によってMS が感染しにくい環境が作り出される、というシナリオが考えられる。そこではバクテリオシンの関与やクオラムセンシングによる細菌間の化学的相互作用が働いているものと想像される。

２．研究の目的

MS が感染し難い環境を作り出している口腔内細菌叢とはどのようなものなのであろうか？本研究では、MS に感染しにくい細菌叢を構成している細菌種を網羅的に解析することによって、MS の存在しない口腔内細菌叢の特徴を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

（１）試料収集と DNA 採取

岩手医科大学小児歯科外来に定期的に通院している３歳から５歳までの患児について、全顎からエキスカベーターを用いて収集した歯垢を試料とし、Nagashima の方法（Nagashima K, Appl Environ Microbiol, 2003）で DNA を採取した。

（２）MS 並びに歯周病原性細菌が試料中に存在するか否かのスクリーニング

当教室の原田が開発した *S.mutans* に特異的なプライマー（原田利佳子、小児歯誌、2006）ならびに Amano らの報告に基づいて、歯周病原性細菌についてのプライマーを作成して PCR 法を行い、試料中の細菌のスクリーニングを行った。

（３）次世代シーケンサとの対比における T-RFLP 法の網羅的細菌叢解析法としての評価

同一人の口腔内から採取したプラーク並びに唾液サンプルを次世代シーケンサと T-RFLP で分析して、T-RFLP 法の網羅的細菌叢解析法としての評価を行った。

T-RFLP 法では蛍光ラベル（FAM 標識）したプライマーを用いて PCR を行い、得られた DNA を制限酵素（Hha Ⅰ,Msp

Ⅰ,Hae Ⅲ）で消化した。この試料をキャピラリー電気泳動装置（ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer）を用いて泳動を行い、その断片の分布を解析ソフト「Gene Mapper」で分析し、細菌 DNA のデータベースから細菌種を同定し、その細菌叢の構成を網羅的に解析した。次世代シーケンサーの解析は Techno Suruga Laboratory に依頼した。

４．研究成果

（１）プラークに MS が存在するか否かで、歯周病原性細菌の存在に差があるか？

プラーク中に MS が検出された小児と検出されなかった小児について、歯周病原性細菌として重要と考えられている 3 種類の細菌、P.gingivalis, T.denticola. T.forsythensis ならびに、小児の若年性歯周炎との関連が指摘されている、A.actinomyceptemcomitans について、存在の有無に差があるのかを検討した。

その結果、MS がプラーク中に存在していた小児は 327 名中 121 名で 37%の存在率でやや比率が低かった。MS が口腔内に存在する小児 121 名と存在しない小児 206 名で、P.gingivalis,T.denticola,T.forsythensis, A.actinomyceptemcomitans の検出された割合（%）はそれぞれ、16：12、0：0、26：30、77：77 という結果であり、歯周病原性細菌 4 種類の有無には、口腔内の MS の有無は全く相関がないことが明らかになった。母親についての調査に於いても、その割合（%）はそれぞれ、22：25、55：49、4：2、79：84 という結果であり、小児、母親ともに、MS と歯周病原性細菌とは独立して存在しているものと考えられた。

（２）T-RFLP 法の網羅的細菌叢解析法としての評価

口腔内細菌叢の網羅的解析を行う際の T-RFLP 法の有用性を評価するために、口腔内細菌叢の構成細菌とその構成比率をほぼ完全に検査できる、次世代型シーケンサーを用いて、同じサンプルの分析結果の比較検討を行った。その結果、T-RFLP 法によって次のような菌種が同定できた。

①制限酵素 Hha Ⅰで検出できる菌種（属）

- Streptococcus＋Eubacterium
- Streptococcus＋Veillonella
- Fusobacterium＋Neisseria
- Porphyromonas＋Prevotella
- Streptococcus
- Filifactor*
- Parvimonas*

②制限酵素 HaeⅢで検出できる菌種（属）

- Streptococcus＋Parvimonas
- Eubacterium＋Streptococcus＋Filifactor
- Neisseria＋Aggregatibacter ＋Selenomonas
- Streptococcus
- Eubacterium
- Veillonella*
- Fusobacterium*
- Prevotella*
- Porphyromonas*

③制限酵素 Msp Ⅰで検出できる菌種（属）

- Eubacterium＋Parvimonas
- Eubacterium＋Filifactor
- Porphyromonas＋Prevotella
- Eubacterium
- Streptococcus*
- Veillonella*
- Fusobacterium*
- Neisseria*

制限酵素で切断した断片の大きさが共通している菌種については２～３種類が重なって検出されることから、単独の菌種としては*印を付けた 10 菌種(重複を除くと 8 菌種)の全体の菌数に対する比率をモニターすることが可能であった。この 10 菌種について、次世代シーケンサーの値（NGS）との差を検討したのが図 1 である。その相関係数は r＝0.901 であり相関は高く、真の値に近いと思われる次世代シーケンサーの値と大きな差

は認められなかった。

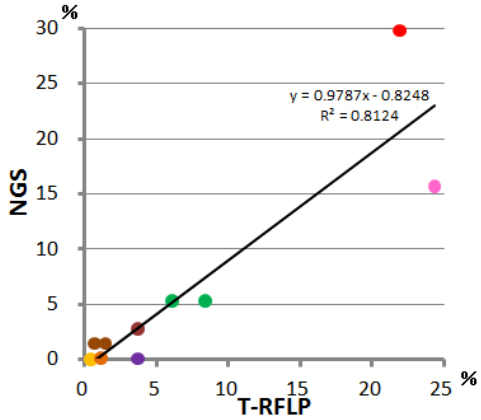


図１

さらに 2 名の被験者に対して 4 週間にわたって毎週試料採得を行い 8 菌種について、特に介入を行わない条件下で、経時的な変化の推移を調査したのが図２、図３である。口腔内細菌叢全体に対する各菌種の割合において、最大 4.4%の標準偏差の変動が観察された。こうした研究結果は、T-RFLP を口腔内細菌叢の追跡調査研究に用いることの有用性を示唆していた。

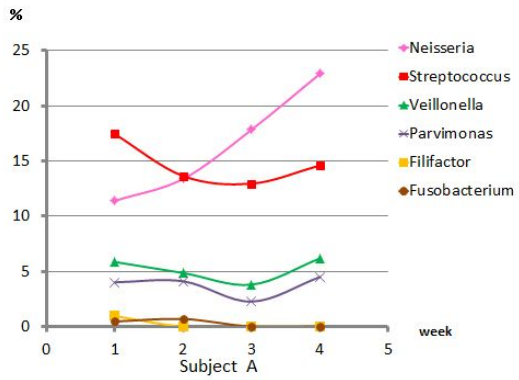


図２

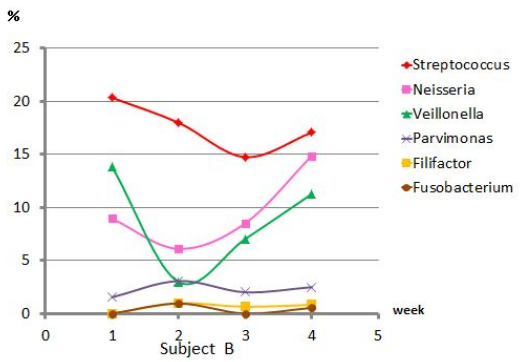


図３

＜引用文献＞

① Nagashima K, Hisada T, Sato M, Mochizuki J.
Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces.
Appl Environ Microbiol. 2003 Feb;69(2):1251-62.

②原田利佳子、ミュータンスレンサ球菌およびその他の口腔レンサ球菌の小児プラーク中への定着と齲蝕との関連性
小児歯誌 44（1）：8-17、2006

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　1 件）

①木村美澄：小児プラークへの歯周病原性細菌の定着
岩手医科大学歯学雑誌 38（3）107-116,2014

〔学会発表〕（計　5 件）

①木村美澄, 下山佑, 及川利佳子, 佐々木実, 田中光郎, 木村重信
小児プラークへの *Porphyromonas gingivalis* の感染
第 66 回日本細菌学会東北支部総会
2012 年 8 月 23、24 日
東北大学　片平さくらホール（宮城県仙台市）

②Misumi Kimura, Yu Shimoyama, Yuko Ohara-Nemoto, Shigenobu Kimura, Mitsuro Tanaka
Colonization of Porphyromonas gingivalis in the plaques from mothers and their children
11th congress of the European Academy of Pediatric Dentistry

May24-27,2012
Strasbourg (France)

③木村美澄、下山佑、及川利佳子、松本弘紀、木村重信、田中光郎
'Red complex species'を含む歯周病原性細菌の小児プラークへの感染
第５１回日本小児歯科学会学術大会
2013 年 5 月 23,24 日
長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

④木村美澄、下山佑、及川利佳子、松本弘紀、蒔苗剛、斎藤桂子、木村重信、田中光郎
小児プラークへの歯周病原性細菌の定着
第５２回日本小児歯科学会大会
2014 年 5 月 16,17 日
品川区立総合区民会館（東京都品川区）

⑤Saito K, Makinae T, Sakurai M, Oikawa R, Kimura S, Tanaka M
Evaluation of T-RFLP as a tool for comprehensive analysis of oral microflora
25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry
July1-4,2015
Glasgow (UK)

〔図書〕（計　0 件）

６．研究組織
(1)研究代表者
田中　光郎　（TANAKA, Mitsuro）
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：10143596

(2)連携研究者
木村　重信　（KIMURA, Shigenobu）
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：10177917