

## 小児プラークにおける ミュータンスレンサ球菌定着量と齲蝕罹患状況の関連

蒔 苗 剛<sup>1)</sup> 下 山 佑<sup>2)</sup> 松 本 弘 紀<sup>1)</sup>  
木 村 重 信<sup>3)</sup> 田 中 光 郎<sup>1)</sup>

**要旨：**ミュータンスレンサ球菌 (MS) の小児プラークへの定着状況および定着量と齲蝕罹患状況との関連性を明らかにすることを目的に、菌種特異的 PCR 法 (c-PCR) および定量的 PCR 法 (q-PCR) を併用した解析を行った。さらに、口腔レンサ球菌特異的プライマーを開発し、プラーク細菌中の口腔レンサ球菌、*S. mutans* の存在比率についても検討した。その結果、c-PCR と q-PCR を併用することで 98 名の被験者は *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup> 群、*S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup> 群、*S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup> 群、*S. mutans*<sup>-</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup> 群の 4 群に大別された。4 群中 *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup> 群でプラーク全細菌中の口腔レンサ球菌、*S. mutans* の構成比率が最も高く、平均 df 菌率は他群と比較して有意に高かった。c-PCR で *S. mutans* のみ陽性の群は、*S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup> 群と *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup> 群に細分され、前者は後者と比較して有意に高い df 菌率を示し、*S. mutans* 量と df 菌率とは有意の正の相関を示した。一方、*S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup> 群では *S. mutans*<sup>-</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup> 群と比較して df 菌率に有意差は認められなかった。以上の成績より、小児プラーク中への MS、特に *S. mutans* の定着量の増加が小児齲蝕発症に繋がる重要な要因であることが強く示唆された。小児プラーク中の MS の定量解析は、小児齲蝕発症機序の詳細解明への手がかりを与えるとともに、小児齲蝕のリスク診断のための有効な手段となり得る可能性が示唆された。

**Key words：**ミュータンスレンサ球菌、齲蝕、口腔レンサ球菌、定量解析

### 緒 言

ヒトのミュータンスレンサ球菌 (MS) である *Streptococcus mutans* と *S. sobrinus* はともに (デンタル) プラークを主要生息部位とする細菌で、ヒトの齲蝕、特に小児齲蝕の主要な原因細菌であることがこれまでの動物実験やヒトを対象とした疫学調査を含む多くの報告<sup>1-10)</sup> から明らかにされている。齲蝕発症機序という面から見れば、必ずしも十分条件を満たしてはいないものの、MS の口腔/歯面への定着は齲蝕発症の必要条件といえる<sup>11, 12)</sup>。それゆえ MS の定着、定着量についてこれまでに多くの研究がなされてきた。

MS の口腔/歯面への定着については、1990 年代後半までは主として MS の選択培地であるバシトラシン

を添加した Mitis-salivarius 寒天培地 (MSB 寒天培地) を用いた培養法が行われてきた<sup>13-17)</sup> が、それ以降は、遺伝学的解析法、すなわち菌種特異的な DNA 配列に基づく PCR (polymerase chain reaction) 法<sup>18-24)</sup> が MS の同定法として主流を占めている。MS の同定法としての PCR 法 (c-PCR) は、MSB 寒天培地を用いた培養法と比較して高い感度と特異性をもち、比較的少ないサンプル量で他菌種の解析も行えることから、原田<sup>18)</sup> は *gtf* 遺伝子あるいは 16S rRNA 遺伝子を標的とする *S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. gordonii*、*S. sanguinis*、*S. oralis* および *S. salivarius* 特異的 PCR 法を開発し、320 名の小児のプラークを用いて MS を含む 7 菌種の口腔レンサ球菌の感染実態について検討を行った。その結果、増齢に伴う *S. mutans*、*S. anginosus* の定着率上昇と *S. sanguinis* の定着率の低下がみられたが、齲蝕との関連性については *S. mutans* の検出とのみ有意の正の相関性が認められたと報告している。しかし c-PCR では定量測定ができないことから、MS の定着量と齲蝕の関連性については依然不明な点が残されている。MS の量的解析法としては定量的リアルタイム PCR 法 (q-PCR) が開発されている<sup>25-27)</sup> が、感度、コストを含む利便性という点では c-

<sup>1)</sup> 岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座

小児歯科学・障害者歯科学分野

<sup>2)</sup> 岩手医科大学微生物学講座分子微生物学分野

<sup>3)</sup> 関西女子短期大学歯科衛生学科

岩手県盛岡市中央通 1 丁目 3-27

(主任：田中光郎教授)

(2016 年 11 月 29 日受付)

(2016 年 12 月 21 日受理)

PCR に劣り、多くの検体に応用されるまでには至っていない。

そこで本研究では、c-PCR と q-PCR を併用し、98 名（2～12 歳）の小児のプラーク中への MS の定着状況および定着量と齲蝕罹患状況との関連性について横断的解析を行った。さらに、口腔レンサ球菌特異的プライマーを開発し、全プラーク細菌叢中の口腔レンサ球菌および *S. mutans* の存在比率についても検討を行った。

## 材料と方法

### 1. 供試菌株と培養条件

*S. mutans* ATCC 25175 株, *S. sobrinus* ATCC 27351 株, *S. mitis* ATCC 49456 株, *S. oralis* ATCC 10557 株, *S. gordonii* ATCC 10558 株, *S. sanguinis* ATCC 10556 株, *S. salivarius* JCM 5705 株, *S. anginosus* NCTC 10713 株, *S. constellatus* ATCC 27823 株および *S. intermedius* GAI 1157 株を実験に供した。これらの菌株は既報<sup>18)</sup>に従い Todd Hewitt Broth (Becton Dickinson, MD, USA) に播種し、嫌気培養システム (Becton Dickinson) を用いて嫌气的条件下 (90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) で 37℃, 48 時間培養した。*S. pyogenes* ATCC 12344 株, *Abiotrophia defective* ATCC 49176 株, *Granulicatella adiacens* ATCC 49175 株, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 株, *Staph. epidermidis* ATCC 14990 株, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 株, *Escherichia coli* ATCC 25922 株の実験室株についても同様に、嫌气的条件下で培養、維持した。

### 2. 被験者と齲蝕罹患状況

平成 27 年 10 月から平成 28 年 1 月までの期間に本学小児歯科を受診した小児 98 名（男児 45 名と女児 53 名, 2～12 歳, 平均年齢±標準偏差: 8.1±2.7 歳）を対象に歯肉縁上プラークサンプルを採取した。事前に保護者および本人に本研究の主旨を説明し同意を得た。なお、本

研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号 D-01231, 承認年月日 平成 26 年 12 月 1 日）。口腔内診査はプラークサンプル採取時に行った。齲蝕歯は WHO の齲蝕診査基準に基づき、齲蝕罹患状況は df 歯 (DF 歯) 率, すなわち, 各人の (df 歯数 + DF 歯数) / 現在歯数 (乳歯 + 永久歯) × 100 (%) で示した (df 歯率)。本被験者の df 歯率の平均値は 23.3 ± 2.6% (平均値 ± 標準誤差) であった。

### 3. プラークサンプルの採取とゲノム DNA の精製

プラークサンプルの採取は原田<sup>18)</sup>, 木村<sup>10)</sup>の方法に準じて行った。すなわち, 簡易防湿下で滅菌エキスカベーターを用いて, 全歯面から歯肉縁上プラークを採取した。採取したサンプルを滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Nacalai Tesque, 京都) 1 ml に懸濁し, 2 度遠心洗浄を行い, 遠心沈渣をプラークサンプルとした。

プラークサンプルおよび供試菌株からのゲノム DNA の精製は Wizard<sup>®</sup>ゲノム DNA 精製キット (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った。精製ゲノム DNA は滅菌超純水に溶解し, 260 nm の吸光度から DNA 濃度を算出した。c-PCR および q-PCR に用いたプラークサンプルおよび供試菌株 DNA を TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解し 20 ng/μl (*S. mutans* および *S. sobrinus*) または 10 ng/μl (真性細菌, 口腔レンサ球菌, MS を除く各供試菌株) に調製した。ゲノム DNA サンプルはいずれも -80℃ で保存した。

### 4. プライマー

表 1 に c-PCR に用いたプライマーを示した。*S. mutans*, *S. sobrinus* については原田の報告<sup>18)</sup>, 真性細菌については Lyons らの報告<sup>28)</sup>をもとに作製したプライマーを用いた。*Abiotrophia/Granulicatella* 属を除く口腔レンサ球菌特異的プライマーは, *S. mutans* Elongation factor Tu (*tuf*) の塩基配列 (accession no. EF 536028) をもとに設計した。設計したプライマーの特異性は National center

表 1 本研究で用いたプライマーと反応条件

菌種	遺伝子	配列 (5' to 3')	PCR 産物 (bp)	出典
真性細菌	16S rDNA	ggattagataccctggtagtc taccttggtacgactt	728	Sharon R. Lyons
真性細菌	16S rDNA	cgctagtaatcgtggatcagaatg tgtgacggcggtgtgtga	69	A. Yoshida
全口腔レンサ球菌	<i>tuf</i>	ccaatgccacaaactcgtgaac gatcacggattccattcaacc	136	This study
<i>S. mutans</i>	<i>gtfB</i>	atggacaagaaagtgcgttata gaagttttgtcaactgtagttg	377	R. Harada-Oikawa
<i>S. sobrinus</i>	<i>gtfI</i>	atggagaagaatgtacgttttaa cggttattagctgcaataatgt	653	R. Harada-Oikawa

for Biotechnology Information (NCBI) の Primer BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)) を用いて確認した。q-PCR では、口腔レンサ球菌, *S. mutans* については c-PCR に用いたプライマーを用い、真性細菌については Yoshida らの報告<sup>27)</sup>をもとに作製したプライマーを用いた(表1)。

## 5. プラークサンプルの c-PCR 解析

プラークサンプルからの DNA をテンプレートとする c-PCR は原田<sup>18)</sup>, 木村<sup>10)</sup>の方法に準じて行った。すなわち, DNA テンプレート 1  $\mu$ l, 菌種特異的プライマー 0.15  $\mu$ M, 1 x AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて, ゲノム DNA サンプル中の真性細菌, 口腔レンサ球菌, *S. mutans*, *S. sobrinus* の c-PCR を行った。真性細菌, *S. mutans*, *S. sobrinus* の PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C, 15 秒, 55 $^{\circ}$ C, 15 秒, 72 $^{\circ}$ C, 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクル, 口腔レンサ球菌は 94 $^{\circ}$ C, 15 秒, 62 $^{\circ}$ C, 15 秒, 72 $^{\circ}$ C, 15 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。PCR 産物は, 44.5 mM Tris-borate, 1 mM EDTA を用いて pH 8.0 に調製した 0.5 M TE buffer 中で, 0.1  $\mu$ g/ml エチジウムブロマイド (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 含有 1.8% もしくは 3.0% のアガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

## 6. プラークサンプルの q-PCR 解析

プラークサンプルからの DNA をテンプレートとする q-PCR は Matsui らの報告<sup>29)</sup>に準じて行った。すなわち, DNA テンプレート 1  $\mu$ l, 菌種特異的プライマー 0.4  $\mu$ M, 1 x SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqII (タカラバイオ, 草津) を用いて, ゲノム DNA サンプル中の真性細菌, 口腔レンサ球菌, *S. mutans* の q-PCR を行った。PCR 反応条件は, 真性細菌では 95 $^{\circ}$ C, 5 秒, 58 $^{\circ}$ C, 30 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル, 口腔レンサ球菌では 95 $^{\circ}$ C, 5 秒, 60 $^{\circ}$ C, 30 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル, *S. mutans* では 95 $^{\circ}$ C, 5 秒, 58 $^{\circ}$ C, 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った(表1)。蛍光検出は Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System Single (タカラバイオ) を用いて行った。

## 7. 統計解析

被験者の年齢と df 菌率, 口腔レンサ球菌の定着の有無および定着量の関連性について, ノンパラメトリック解析を行なった。すべての結果において有意水準は 0.05 未満とした。

## 結 果

### 1. 新たに設計した口腔レンサ球菌特異的プライマーの感度と特異性

本研究で新たに設計した口腔レンサ球菌特異的プライマーの検出感度と特異性について, 類縁の *Abiotrophia/Granulicatella* 属を含む口腔レンサ球菌 12 菌種および *S. pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* の実験室株を用いて検討した。その結果, 本プライマーは *Abiotrophia/Granulicatella* 属を除く口腔レンサ球菌に特異的であること, その検出限界は 10~100 pg DNA であることが明らかとなった(図1)。

### 2. c-PCR および q-PCR による *S. mutans* の検出感度

*S. mutans* の検出感度について c-PCR と q-PCR を比較検討した。その結果, c-PCR では *S. mutans* の検出限界は 1~10 pg ( $2 \times 10^2 \sim 10^3$  CFU/ml 相当)(図2A)であるのに対し, q-PCR では 1 pg まではネガティブコントロールと重なり判別できず, 検出限界は 10 pg と判定された(図2B)ことから, 本研究で用いた c-PCR の検出感度は q-PCR のそれと比較して 10~100 倍高いことが明らかとなった。

### 3. MS のプラーク中への定着状況および定着量と齲蝕罹患状況との関連性

被験 98 名の小児から採取した全プラークサンプル中に細菌, 口腔レンサ球菌が存在することを真性細菌特異的プライマーおよび口腔レンサ球菌特異的プライマーを用いた c-PCR により確認した。

続いて, *S. mutans*, *S. sobrinus* 特異的プライマーを用いた c-PCR により *S. mutans*, *S. sobrinus* の検出を行った結果, *S. mutans* は 61.2%, *S. sobrinus* は 12.2% のプラークサンプルで検出された(表2)。そこで *S. mutans*,

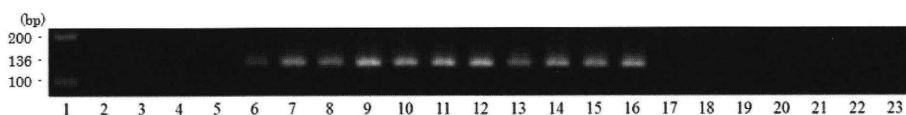


図1 口腔レンサ球菌特異的プライマーの特異性と検出限界。1. 100 bp マーカー, 2. ネガティブコントロール, 3. *S. mutans* DNA 0.1 pg, 4. *S. mutans* DNA 1 pg, 5. *S. mutans* DNA 10 pg, 6. *S. mutans* DNA 100 pg, 7. *S. mutans* DNA 1000 pg, 8. *S. sobrinus*, 9. *S. salivarius*, 10. *S. mitis*, 11. *S. oralis*, 12. *S. sanguinis*, 13. *S. gordonii*, 14. *S. anginosus*, 15. *S. intermedius*, 16. *S. constellatus*, 17. *S. pyogenes*, 18. *Abiotrophia defectiva*, 19. *Granulicatella adiacens*, 20. *Staphylococcus aureus*, 21. *Staph. epidermidis*, 22. *Enterococcus faecalis*, 23. *Escherichia coli* をそれぞれ 1000 pg DNA テンプレートとし口腔レンサ球菌特異的 PCR を行った。

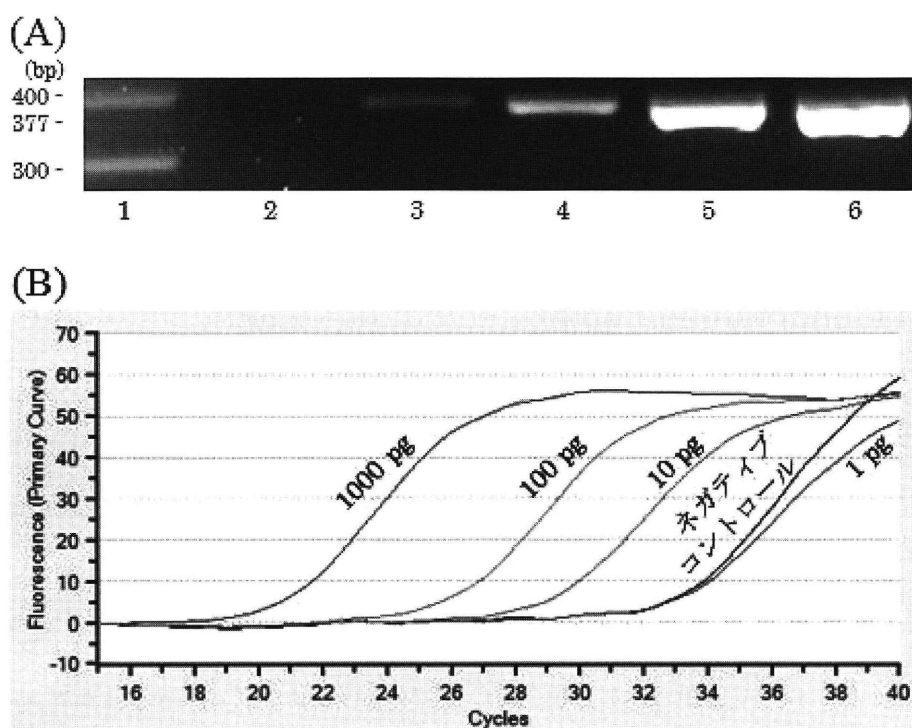


図2 *S. mutans* 特異的 c-PCR と q-PCR の検出限界の比較。1. 100 bp マーカー, 2. ネガティブコントロール, 3. *S. mutans* DNA 1 pg, 4. *S. mutans* DNA 10 pg, 5. *S. mutans* DNA 100 pg, 6. *S. mutans* DNA 1000 pg を DNA テンプレートとし (A) *S. mutans* 特異的 c-PCR および (B) *S. mutans* 特異的 q-PCR を行った。

表2 本研究に用いた被験者群の定性分析による分類

<i>S. mutans</i> の検出	<i>S. sobrinus</i> の検出	人数	平均 df 菌率 (%) <sup>§</sup>	平均年齢 <sup>h</sup>
+	+	11	42.6 ± 6.8* <sup>§</sup>	7.5 ± 3.1
+	-	49	20.9 ± 3.6	8.8 ± 2.6
-	+	1	75	3
-	-	37	12.9 ± 2.9	7.9 ± 2.7
合計		98	23.3 ± 2.6	8.1 ± 2.7

§ : 平均値 ± 標準誤差

<sup>h</sup> : 平均値 ± 標準偏差

\* : *S. mutans* (+) - *S. sobrinus* (-) 群と比較して有意に高い ( $p < 0.05$ )

# : *S. mutans* (-) - *S. sobrinus* (-) 群と比較して有意に高い ( $p < 0.05$ )

*S. sobrinus* の検出の有無により被験者を4群 [*S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (+) 群, *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (-) 群, *S. mutans* (-)・*S. sobrinus* (+) 群および *S. mutans* (-)・*S. sobrinus* (-) 群] に群分けすると, *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (-) 群が49名 (50%) と最も多く, *S. mutans* (-)・*S. sobrinus* (+) 群は1名のみであった (表2)。*S. mutans* (-)・*S. sobrinus* (+)

群を除く3群間で平均年齢と平均 df 菌率を比較した結果, 平均年齢には有意差は認められなかったが, df 菌率については *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (+) 群が他の2群と比較して有意に高い値を示すことが明らかとなった (表2)。

次に, c-PCR で *S. mutans* あるいは *S. sobrinus* が検出されたサンプルを対象に, *S. mutans*, *S. sobrinus* 特異的プライマーを用いた q-PCR を行った (表3)。その結果, 11例の *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (+) 群のすべてで q-PCR でも *S. sobrinus* が検出された。q-PCR による *S. mutans* 検出は *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (+) 群の11例中10例で認められた (表3)。しかし *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (-) 群では q-PCR で *S. mutans* が検出される場合とされない場合に分けられた。そこで, 上記の c-PCR および q-PCR による *S. mutans* の検出感度の差を勘案し, *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (-) 群 (49例) を q-PCR で *S. mutans* が検出された群, *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群 (30例) と, *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (-) 群で q-PCR で *S. mutans* が検出されなかった群, *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群 (19例) に再群分けし, MS のプラーク中への定着状況/定着量と齲蝕罹患

状況との関連性について検討した。その結果, *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群の平均 df 歯率が *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup>群のそれと比較して有意に低く ( $p<0.05$ ), *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群のそれと比較して有意に高いことが明らかとなった ( $p<0.05$ ) (表3)。そこで *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群での *S. mutans* 量と df 歯率との関連性を検討した結果, 有意の正の相関を認めた ( $p<0.05$ ) (図3)。一方, *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群と *S. mutans*<sup>-</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群間では平均 df 歯率に有意差は認められなかった (表3)。

#### 4. プラークサンプル中の口腔レンサ球菌および *S. mutans* の定量解析

全被験プラークサンプルを対象に q-PCR による真性

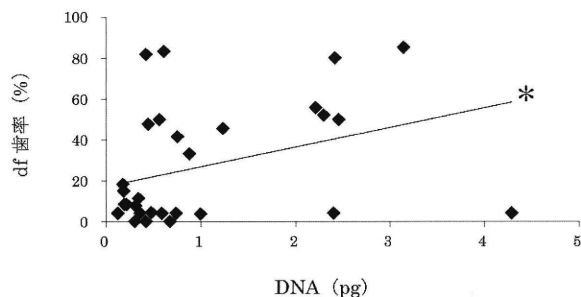


図3 *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群における *S. mutans* 量と df 歯率の相関。*S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群の *S. mutans* 量と df 歯率の相関を示した。(\*) は有意な正の相関を示す ( $p<0.05$ )。

細菌および口腔レンサ球菌の定量解析を行った。その結果, 本研究の被験者 98 名の小児から採取したプラークサンプルにおいては口腔レンサ球菌が全真性細菌の 15.9 % を占めることが明らかとなった (図4)。

つぎに, 表3の6群中, 1例のみの群 (*S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup>群および *S. mutans*<sup>-</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup>群) を除く主要4群間での全真性細菌中に占める口腔レンサ球菌量, *S. mutans* 量を比較検討した結果, *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup>群で全真性細菌中に占める口腔レンサ球菌および *S. mutans* の構成比率が高く, *S. mutans*<sup>-</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群で全真性細菌中に占める口腔レンサ球菌が低い傾向が観察された (図4)。

## 考 察

MS の定着が齲蝕の発症要因であることはこれまでの多くの報告<sup>12-18, 30-32)</sup> から明らかであるが, 齲蝕を認めない群においても MS の定着が認められるとの観察結果<sup>33, 34)</sup> は, MS の定着量もまた齲蝕の発症要因として重要であることを示唆する。そこで本研究では, 量的解析が可能な q-PCR と感度の高い c-PCR とを併用し, 小児のプラーク中への MS の定着状況および定着量と齲蝕罹患状況との関連性について横断的解析を行った。

対象とした小児 98 名 (平均年齢:  $8.1 \pm 2.7$  歳) の df 歯率の平均値は  $23.3 \pm 2.6\%$ , 平成 23 年度歯科疾患実態調査の 8 歳児 df 歯率 14.1%, 9 歳児 df 歯率 8.9% と

表3 定性分析と定量分析の併用による群分け

c-PCR による群分け	人数	q-PCR による群分け	人数	平均 df 歯率 (%) <sup>†</sup>	平均年齢 <sup>‡</sup>
<i>S. mutans</i> (+) <i>S. sobrinus</i> (+)	11	<i>S. mutans</i> <sup>high</sup> - <i>S. sobrinus</i> <sup>+</sup>	10	$46.4 \pm 6.1^{**}$	$7.2 \pm 3.0$
		<i>S. mutans</i> <sup>low</sup> - <i>S. sobrinus</i> <sup>+</sup>	1	4.2	11
<i>S. mutans</i> (+) <i>S. sobrinus</i> (-)	49	<i>S. mutans</i> <sup>high</sup> - <i>S. sobrinus</i> <sup>-</sup>	30	$27.1 \pm 5.3^{**}$	$8.6 \pm 2.6$
		<i>S. mutans</i> <sup>low</sup> - <i>S. sobrinus</i> <sup>-</sup>	19	$11.2 \pm 3.3$	$9.1 \pm 2.6$
<i>S. mutans</i> (-) <i>S. sobrinus</i> (+)	1	<i>S. mutans</i> <sup>-</sup> - <i>S. sobrinus</i> <sup>+</sup>	1	75	3
<i>S. mutans</i> (-) <i>S. sobrinus</i> (-)	37	<i>S. mutans</i> <sup>-</sup> - <i>S. sobrinus</i> <sup>-</sup>	37	$12.9 \pm 2.9$	$7.9 \pm 2.7$

<sup>†</sup>: 平均値 ± 標準誤差

<sup>‡</sup>: 平均値 ± 標準偏差

\*: *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群と比較して有意に高い ( $p<0.05$ )

#: *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群と比較して有意に高い ( $p<0.05$ )

§: *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群と比較して有意に高い ( $p<0.05$ )

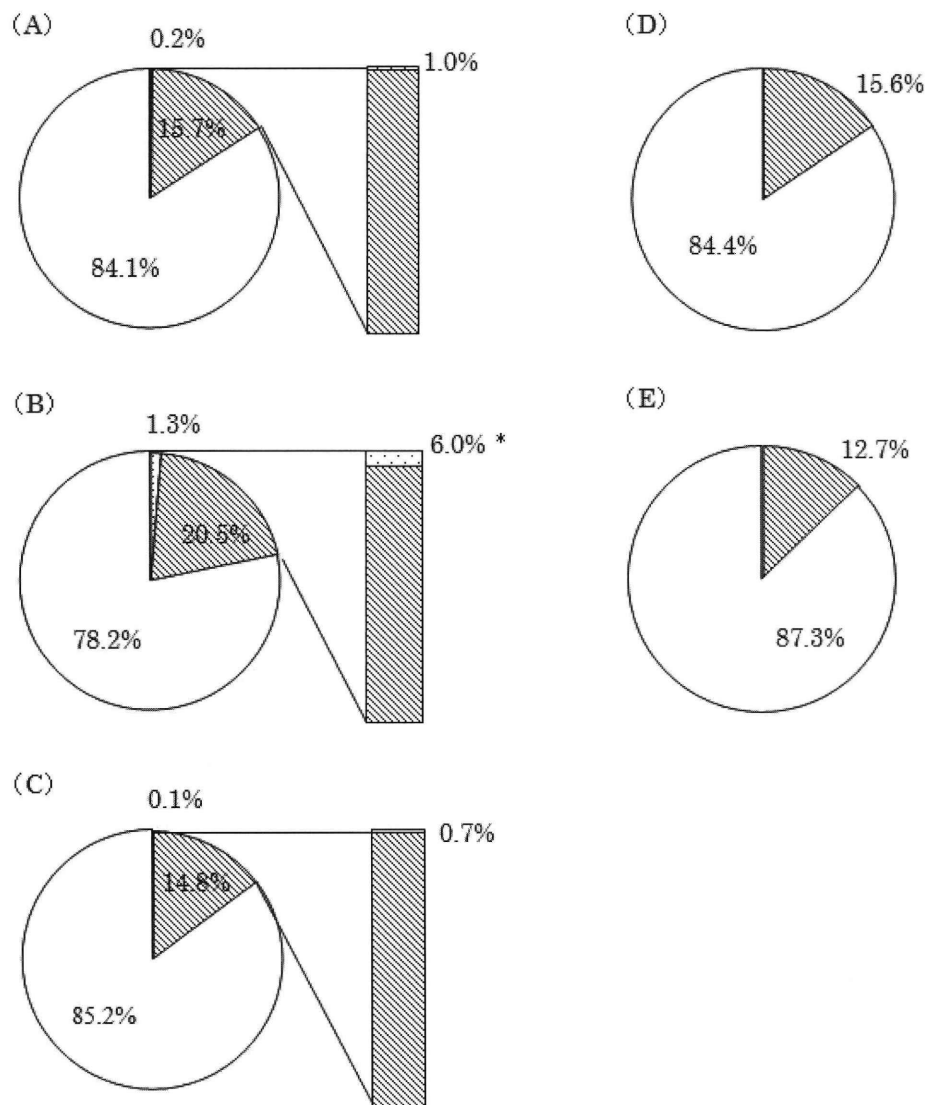


図4 定量分析による各群の口腔レンサ球菌と *S. mutans* の比率。(A) 被験者全体, (B) *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup>群, (C) *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群, (D) *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群, (E) *S. mutans*<sup>-</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群のプラーク由来 DNA 中の口腔レンサ球菌量 (斜線) および *S. mutans* DNA 量 (縦線) を示した。(\*) は有意な *S. mutans* DNA 量の増加を示す。

比較して高かったが、これは歯科治療を希望して本院小児歯科外来を受診した小児を被験者としたことによるのかも知れない。

本研究ではまず、*S. mutans* の定着の有無と齲蝕罹患状況 (df 菌率) の関連性について検討を行った。その結果、本研究で供した 98 名のプラークサンプルでの *S. mutans*, *S. sobrinus* の検出率はそれぞれ 61.2% および 12.2% で、これはこれまでの報告<sup>8, 18, 32)</sup>と同程度の検出率であった。被験者を *S. mutans*, *S. sobrinus* の検出の有無で 4 群に分類し df 菌率との関連性について検討した

結果、これまでの報告と同様に MS, 特に *S. mutans* の定着と df 菌率に有意の関連性を認めた<sup>8, 18, 31, 35)</sup> (表 2)。

そこで、c-PCR と比較して検出感度が 10~100 倍低い q-PCR を用いて MS の定量解析を行った。その結果、c-PCR で *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (+) 群と分類された例のほとんど (10/11 例) では q-PCR によっても *S. mutans*, *S. sobrinus* とともに検出されたが、*S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (-) 群は q-PCR で *S. mutans* が検出される場合とされない場合に分けられた。そこで q-PCR によっても *S. mutans* が検出された群を *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. so*



brinus<sup>-</sup>群 (30 例), 10~100 倍検出感度の高い c-PCR でのみ *S. mutans* が検出された群を *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群 (19 例) として再群分けし, MS のプラーク中への定着状況/定着量と齲蝕罹患状況との関連性について検討した。その結果, *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群の平均 df 菌率が *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群のそれと比較して有意に高いことが明らかとなった ( $p < 0.05$ ) (表 3)。群間の平均年齢には有意差は認められず (表 3), 被験者の増齢に伴う df 菌率の上昇の影響はないことを勘案すると, この成績から *S. mutans* のプラーク中への定着量が齲蝕罹患状況に深く関与することが示唆される。そこで *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群での *S. mutans* 量と df 菌率との関連性を検討した結果, 有意の正の相関を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 3)。これまで小児齲蝕発症機序の中で小児プラーク中への MS の定着の有無に注意が向けられてきたが, 本研究成績からは, 小児プラーク中への MS, 特に *S. mutans* の定着量の増加が小児齲蝕発症に繋がる重要な要因であることが強く示唆された。

つぎに, 口腔レンサ球菌特異的プライマーを開発し, 全プラーク細菌叢中の口腔レンサ球菌および *S. mutans* の存在比率についても検討を行った。口腔レンサ球菌のプライマーについては新規の口腔レンサ球菌特異的プライマーを設計し用いた。設計したプライマーの特異性の検討は NCBI の Primer BLAST を用い, *S. pyogenes* や *S. pneumoniae* などの他のレンサ球菌や他菌種と交差せず, コピー数も同一であることを確認し実験に供した。新たに設計した口腔レンサ球菌特異的プライマーを用いた q-PCR から, プラークサンプルでの口腔レンサ球菌の比率を検討した結果, 口腔レンサ球菌のプラークでの構成比率は 15.9% で, プラークのメタゲノム解析 (10.1%<sup>36)</sup>および 14.0%<sup>37)</sup>の結果を支持する成績が得られた (図 4)。

MS のプラーク中への定着状況/定着量に基づく分類 (表 3) 中の主要 4 群での全真性細菌中に占める口腔レンサ球菌量, *S. mutans* 量を検討した結果, *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup>群で全真性細菌中に占める口腔レンサ球菌および *S. mutans* の構成比率が高い傾向を示した (それぞれ 21.8% および 1.3%)。このことは, 口腔レンサ球菌のプラーク中への定着量が増加するに伴い, その構成比率という点でなんらかの変化が起こっている可能性を示唆するものかも知れない。今後, プラーク中への口腔レンサ球菌の定着量と MS の構成比率の変動, 齲蝕罹患状況との関連性についてもさらなる検討が必要となるものと考えられる。

## 結 論

本研究では小児プラーク中への MS の定着状況および定着量と齲蝕罹患状況との関連性を明らかにすることを目的に, c-PCR と q-PCR を併用した解析を行うとともに, 口腔レンサ球菌特異的プライマーを開発し, 全プラーク細菌叢中の口腔レンサ球菌および *S. mutans* の存在比率についても検討し, 以下の結論を得た。

1. c-PCR と q-PCR を併用することで, プラーク中への MS の定着状況および定着量から 98 名の小児被験者は *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup>群, *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群, *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群, *S. mutans*<sup>-</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群の 4 群に大別された。
2. これら 4 群においては, *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>+</sup>群 (10 例) でプラーク中の全真性細菌中に占める口腔レンサ球菌および *S. mutans* の構成比率が最も高く, その平均 df 菌率が他の群と比較して有意に高かった。
3. c-PCR での *S. mutans* (+)・*S. sobrinus* (-) 群は, q-PCR を併用することで *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群 (30 例) と *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群 (19 例) に細分され, *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群は *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群と比較して有意に高い df 菌率を示すことが明らかとなった。
4. *S. mutans*<sup>high</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群において, *S. mutans* 量と df 菌率とは有意の正の相関を示した。
5. 一方, *S. mutans*<sup>low</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群では, *S. mutans*<sup>-</sup>-*S. sobrinus*<sup>-</sup>群と比較して df 菌率に有意差は認められなかった。

以上の成績より, 小児プラーク中への MS, 特に *S. mutans* の定着量の増加が小児齲蝕発症に繋がる重要な要因であることが強く示唆された。小児プラーク中の MS の定量解析は, 小児齲蝕発症機序の詳細解明への手がかりを与えるとともに, 小児齲蝕のリスク診断のための有効な手段となり得る可能性が示唆された。

本論文に関する著者らの利益相反: なし

## 文 献

- 1) Hamada, S., Ooshima, T., Torii, M., Imanishi, H., Masuda, N., Sobue, S., Kotani, S.: Dental caries induction in experimental animals by clinical strains of *Streptococcus mutans* isolated from Japanese children, *Microbiol Immunol*, 22: 301-314, 1978.
- 2) Kuramitsu, H. K., Wondrack, L.: Insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans* serotype c strains, *Infect Immun*, 42: 763-770, 1983.
- 3) Bender, G. R., Sutton, S. V., and Marquis, R. E.: Acid tol-

- erance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci, *Infect Immun*, 53 : 331-338, 1986.
- 4) Okahashi, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Hamada, S., Koga, T. : Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries, *Mol Microbiol*, 3 : 673-678, 1989.
  - 5) Hoerman, K. C., Keene, H. J., Shklair, I. L., Burmeister J. A. : The association of *Streptococcus mutans* with early carious lesions in human teeth, *J Am Dent Assoc*, 85 : 1349-1352, 1972.
  - 6) Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, Y., Kushiya, M., Koga, T. : Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction, *Oral Microbiol Immunol*, 15 : 258-262, 2000.
  - 7) Wu, H., Fan, M., Zhou, X., Mo, A., Bian, Z., Zhang, Q., Chen, Z. : Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* on the permanent first molars of the Mosuo people in China, *Caries Res*, 37 : 374-380, 2003.
  - 8) Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., Doi, T., Suzuki, J., Miura, K., Kozai, K. : PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children, *J Med Microbiol*, 51 : 443-447, 2002.
  - 9) Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., Doi, T., Suzuki, J., Miura, K., Kozai, K. : Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children, *J Med Microbiol*, 54 : 661-665, 2005.
  - 10) 木村美澄：小児プラークへの菌周病原性細菌の定着. 岩医大歯誌 38 : 107-116, 2014.
  - 11) Marsh, P. D. : Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease, *Adv Dent Res*, 8 : 263-271, 1994.
  - 12) Kimura, S., Ohara-Nemoto, Y. : Early childhood caries and childhood periodontal diseases. : *In Pediatric Infectious Diseases Revisited* (H. Schroten and S. Wirth, eds.), Birkhäuser-Verlag AG, Basel. p.177-197, 2007.
  - 13) Caufield, P. W., Cutter, G. R., Dasanayake, A. P. : Initial acquisition of mutans streptococci by infants : evidence for a discrete window of infectivity, *J Dent Res*, 72 : 37-45, 1993.
  - 14) Dasanayake, A. P., Caufield, P. W., Cutter, G. R., Stiles, H. M. : Transmission of mutans streptococci to infants following short term application of an iodine-NaF solution to mothers' dentition, *Community Dent Oral Epidemiol*, 21 : 136-142, 1993.
  - 15) Karn, T. A., O'Sullivan, D. M., Tinanoff, N. : Colonization of mutans streptococci in 8- to 15-month-old children, *J Public Health Dent*, 58 : 248-9, 1998.
  - 16) Mohan, A., Morse, D. E., O'Sullivan, D. M., Tinanoff, N. : The relationship between bottle usage/ content, age, and number of teeth with mutans streptococci colonization in 6-24-month-old children, *Community Dent Oral Epidemiol*, 26 : 12-20, 1998.
  - 17) Schaeken, M. J., van der Hoeven, J. S., Franken, H. C. : Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium, *J Dent Res*, 65 : 906-8, 1986.
  - 18) 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 : 8-17, 2006.
  - 19) Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N. : Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction, *Oral Microbiol Immunol*, 11 : 294-8, 1996.
  - 20) Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N. : PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*, *J Med Microbiol*, 49 : 1069-74, 2000.
  - 21) Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, Y., Kushiya, M., Koga, T. : Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction, *Oral Microbiol Immunol*, 15 : 258-262, 2000.
  - 22) Igarashi, T., Yano, Y., Yamamoto, A., Sasa, R., Goto, N. : Identification of *Streptococcus salivarius* by PCR and DNA probe, *Lett Appl Microbiol*, 32 : 394-7, 2001.
  - 23) Pan, Y. P., Li, Y., Caufield, P. W. : Phenotypic and genotypic diversity of *Streptococcus sanguis* in infants, *Oral Microbiol Immunol*, 16 : 235-42, 2001.
  - 24) Hoshino, T., Kawaguchi, M., Shimizu, N., Hoshino, N., Ooshima, T., Fujiwara, T. : PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 48 : 195-9, 2004.
  - 25) Kishi, M., Abe, A., Kishi, K., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S., Yonemitsu, M. : Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of mutans streptococci in plaque in their 2.5-year-old children, *Community Dent Oral Epidemiol*, 37 : 241-249, 2009.
  - 26) Yano, A., Kaneko, N., Ida, H., Yamaguchi, T., Hanada, N. : Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*, *FEMS Microbiol Lett*, 217 : 23-30, 2002.
  - 27) Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Kawada, M., Oho, T., and Koga, T. : Development of a 5' Nuclease-Based Real-Time PCR Assay for Quantitative Detection of Cariogenic Dental Pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, *J Clin Microbiol*, 41 : 4438-4441, 2003.
  - 28) Lyons, S. R., Griffen, A. L., Leys, E. J. : Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria, *J Clin Microbiol*, 38 : 2362-2365, 2000.
  - 29) Matsui, M., Chosa, N., Shimoyama, Y., Minami, K., Kimura, S., Kishi, M. : Effects of tongue cleaning on bacterial flora in tongue coating and dental plaque : a crossover study, *BMC Oral Health*, 14 : doi : 10.1186/1472-6831-14-4, 2014.
  - 30) Babaahmady, K. G., Challacombe, S. J., Marsh, P. D., Newman, H. N. : Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children, *Caries Res*, 32 : 51-58, 1998.
  - 31) Fujiwara, T., Sasada, E., Mima, N., Ooshima, T. : Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan, *Community Dent Oral Epidemiol*, 19 : 151-154, 1991.
  - 32) Tanner, A. C., Milgrom, P. M., Kent, R. Jr, Mokeem, S. A., Page, R. C., Riedy, C. A., Weinstein, P., Bruss, J. : The microbiota of young children from tooth and tongue samples, *J Dent Res*, 81 : 53-57, 2002.
  - 33) Corby, P. M., Lyons-Weiler, J., Bretz, W. A., Hart, T. C.,



- Aas, J. A., Boumenna, T., Goss, J., Corby, A. L., Junior, H. M., Weyant, R. J., Paster, B. J. : Microbial Risk Indicators of Early Childhood Caries, *J Clin Microbiol*, 43 : 5753-5759, 2005.
- 34) Jiang, Q., Yu, M., Min, Z., Yi, A., Chen, D., Zhang, Q. : AP-PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in caries-free and caries-active subjects, *Mol Cell Biochem*, 365 : 159-164, 2012.
- 35) Fragkou, S., Balasouli, C., Tsuzukibashi, O., Argyropoulou, A., Menexes, G., Kotsanos, N., Kalfas, S. : *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Candida albicans* in oral samples from caries-free and caries-active children, *Eur Arch Paediatric Dent* : 367-375, 2016.
- 36) Xie, G., Chain, P. S., Lo, C. C., Liu, K. L., Gans, J., Merritt, J., Qi, F. : Community and gene composition of a human dental plaque microbiota obtained by metagenomic sequencing, *Mol Oral Microbiol*, 25 : 391-405, 2010.
- 37) Ismail, F., Baetzner, C., Heuer, W., Stumpp, N., Eberhard, J., Winkel, A., Ismail, I., Haverich, A., Stiesch, M. : 16S rDNA-based metagenomic analysis of human oral plaque microbiota in patients with atherosclerosis and healthy controls, *Indian J Med Microbiol*, 30 : 462-466, 2012.

## Quantification of Mutans Streptococci in Plaque Samples from Children and Relationship to Caries Prevalence

Tsuyoshi Makinae<sup>1)</sup>, Yu Shimoyama<sup>2)</sup>, Hiroki Matsumoto<sup>1)</sup>  
Shigenobu Kimura<sup>3)</sup> and Mitsuro Tanaka<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>*Divisions of Pediatric Dentistry, and* <sup>2)</sup>*Molecular Microbiology, Iwate Medical University*

<sup>3)</sup>*Department of Oral Hygiene, Kansai Women's College*

(Chief: Prof. Mitsuro Tanaka)

Mutans streptococci (MS), are Gram-positive facultatively anaerobic cocci considered to play important roles in the development of dental caries. Although possession of MS is correlated with caries prevalence, quantification of those harbored in dental plaque remains unclear. Furthermore, bacterial microflora known as dental plaque is considered to enhance possession of MS, though related mechanisms have not been reported. In this study, we determined quantitative levels of oral streptococci and total bacteria, as well as specifically *Streptococcus mutans* (Sm) in plaque samples obtained from children, and assessed their relationships to caries prevalence.

Following oral examinations, plaque samples were collected from 98 children and their mothers after obtaining informed consent to participate in this study, and bacterial DNA from each was purified. MS, Sm, and *S. sobrinus* (Ss) were detected using species-specific conventional PCR (c-PCR) assays, and the levels were quantified using real-time quantitative PCR (q-PCR). In addition, quantification of oral streptococci and total bacteria was also performed using a q-PCR method.

In c-PCR results, 49 of the 98 samples had Sm-positive and Ss-negative (Sm<sup>+</sup> - Ss<sup>-</sup>) results. Notably, the combination of c- and q-PCR findings suggested that the 49 Sm<sup>+</sup> - Ss<sup>-</sup> subjects could be divided into two groups based on the quantitative levels of Sm, Sm<sup>high</sup>-Ss<sup>-</sup> (30/49) and Sm<sup>low</sup>-Ss<sup>-</sup> (19/49). Among the 4 groups, the MS-double positive group showed the highest dft score and composition ratios of Sm in oral streptococci and total bacteria, followed by the Sm<sup>high</sup>-Ss<sup>-</sup> group. Average dft score was not significantly different between the Sm<sup>low</sup>-Ss<sup>-</sup> and Sm<sup>-</sup>-Ss<sup>-</sup> groups. Our results indicate that quantification of MS in plaque samples may be an efficient method to clarify the relationship between MS colonization and caries in children.

**Key words :** *Streptococcus mutans*, Caries, Oral streptococci, Quantitative analysis