

研究者：永井 宜子（所属：東京歯科大学小児歯科学講座）

研究題目：小児の有する成熟歯面バイオフィーム構成細菌種の解析

目的：

一般的にデンタルバイオフィームは形成初期に白色だが、成熟するに従い黄色やオレンジ色（有色）を呈することが多い。一方、小児の口腔内でも有色バイオフィームを認めることがあるが、そのような小児の口腔内の状況が常に不良であるとはいえない。小児で認められる有色バイオフィームが、成人同様にバイオフィームの成熟化を示唆しているのかについては、その中の細菌構成を詳細に検討した研究がなく、明らかとなっていない。そこで本研究では、有色バイオフィームを有する小児を対象に、主に 16s rRNA gene pyrosequencing によってその細菌構成を解析した。さらに、被験者の齲蝕罹患状況とバイオフィーム中の細菌構成について関連性があるかについても検討した。

対象および方法

対象は東京歯科大学千葉病院小児歯科を受診した、有色バイオフィームを認める 5～12 歳の患児 58 名である。上顎第一大臼歯または乳臼歯の頬側歯面から有色歯肉縁上バイオフィームを採取し、サンプルとした（図 1）。また、同一被験者のサンプル採取部位に最も近接した部位の白色バイオフィームも採取した。市販のキットを用いて細菌由来のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを使用した細菌叢解析を行った。

得られた結果は、まず有色および白色バイオフィームの間で比較を行った。また、6～10 歳の患児で、これまで齲蝕経験のない者 7 名（Healthy 群）と 10 歯以上の乳歯齲蝕経験を持つ者 9 名（High risk 群）について、口腔内の状況と各群小児のバイオフィームに含まれる細菌種との相関性について解析を試みた。本研究の手法については東京歯科大学千葉病院倫理委員会の承認を経ている（承認番号 251）。



図 1 小児に認められる有色バイオフィームの例。

結果および考察

有色バイオフィームを認めた患児 58 名の齲蝕経験歯率は乳歯 38%、永久歯 13%であり、平成 23 年歯科疾患実態調査における同年代の齲蝕経験歯率よりも高かったが、対象患児のうち 31% は齲蝕経験がなかった。次に細菌叢解析の結果、99% similarity level で属レベルよりも細かい階層まで同定できた Operational Taxonomic Units (OTUs) 数は 32 サンプルで計 587 であり、1 サンプル当たり平均 145 であった。有色と白色バイオフィームでそれぞれ観察された OTUs 数は、有色バイオフィームの方が少ない傾向にあったが、有意差は認めなかった。また、Healthy 群または High risk 群に含まれる患児のバイオフィームを比較したところ、High risk 群の方が

Healthy 群よりも OTUs 数が多い傾向にあったが、これも有意差は認めなかった。各サンプルに含まれている細菌構成のパターンをもとに樹形図を作成したところ、有色および白色バイオフィルムの間には有意な Dissimilarity は認めなかったが、一部の被験者の有色および白色バイオフィルムで距離の大きく離れているものがあった。そうした被験者ではバイオフィルムの色によって細菌叢中の細菌構成が異なっていることを示している (図 2)。

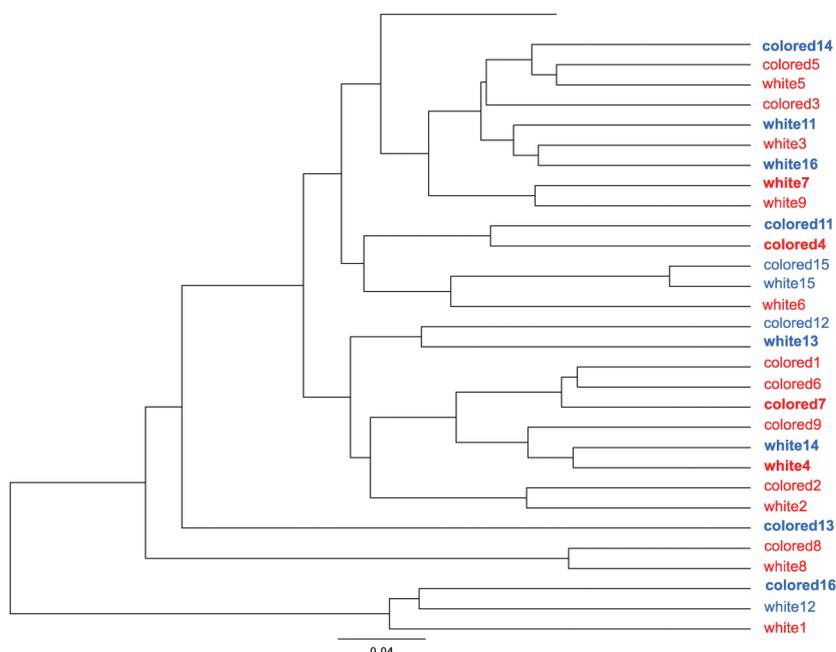


図 2 各サンプルの細菌構成パターンをもとに作製した樹形図。
Healthy 群患児を青、High Risk 群患児を赤で示し、患児を 1~16 の番号で表した。白色および有色バイオフィルムで細菌構成のパターンが大きく異なっているものを太字で示す。

属レベルで 26 bacterial taxa についてはすべてのサンプルから検出されたが、その中でも *Actinomyces* 属は最も構成比の高い taxa の一つであった。被験者から得たサンプルのうち、構成比 15%以上を *Actinomyces* 属が占めていたものが 5 つあり、そのすべてが有色バイオフィルム由来であった。また、5 つのうち 4 つが High risk 群の有色バイオフィルムに由来していた (表 1)。

表 1 Actinomyces 属細菌を多く検出したサンプル数

	サンプル数	15%以上検出した サンプル数
全サンプル	32	5
有色バイオフィルム	16	5*
(High Risk 群)	9	4
(Healthy 群)	7	1
白色バイオフィルム	16	0*
(High Risk 群)	9	0
(Healthy 群)	7	0

* : P < 0.05, カイ 2 乗検定

次に、ヒートマップを作成して有色および白色バイオフィルムで細菌構成比を比較したところ、High risk 群では有色および白色バイオフィルムで構成比の大きく異なるものが多く認められ、それらの中には *Actinomyces* 属や *Veillonella* 属という構成比の大きなものも含まれていた。このことから、High risk 群の小児が有する有色および白色バイオフィルムの細菌構成の差異は、Healthy 群に比べて大きいと考えられる (図 3)。

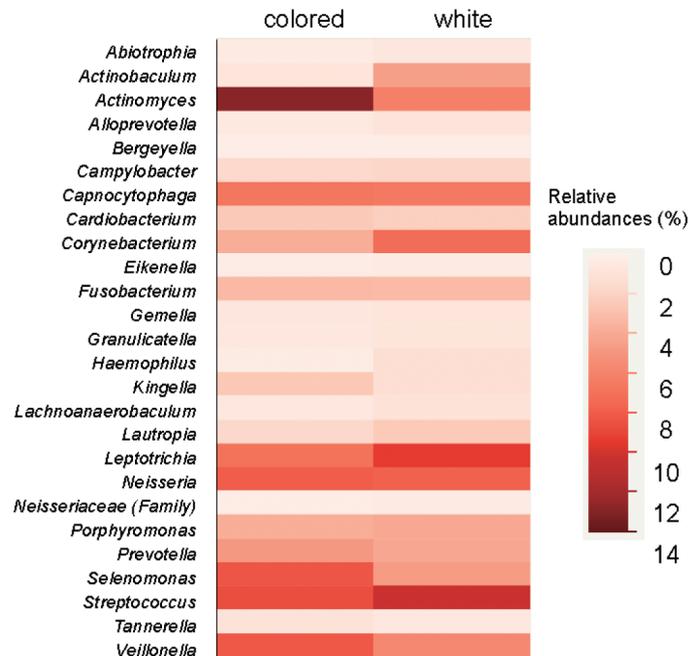


図 3 バイオフィルム中の口腔内細菌叢に占める 26 bacterial taxa の構成比。

小児のバイオフィルムの色の差異による歯周病原性菌の検出については大きな差が認められないことから、小児の有色バイオフィルムは必ずしも成人と同じようなバイオフィルムの成熟化を示すものとはいえない。しかし、特に High risk 群小児では有色および白色バイオフィルムの間で細菌構成の大きく異なる bacterial taxa を多く認め、バイオフィルムの色によって成人とは異なる様式で構成細菌の変化を生じていることが示唆された。High-Risk 群では、細菌種間での協調や競合関係がより複雑に存在することで、Healthy 群とは異なる有色バイオフィルムが形成されている可能性がある。これまで、*Actinomyces* 属は齲蝕のない健康な歯肉で検出される一方、一部の菌種は歯周病発症に関与しているとの報告もある。また、*Veillonella* 属は齲蝕を有する小児のバイオフィルムで多く検出されるという報告がある。High risk 群にこうした構成細菌の変化は将来何らかの疾患リスクを上昇させる可能性があるため、バイオフィルム中の細菌構成と口腔内の状況の関連性についてさらに詳細を解析する必要がある。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)