

研究者：小橋 美里（所属：北海道医療大学歯学部 口腔構造・機能発育学系
小児歯科学分野）

研究題目：小児における口腔内環境と歯周病原因細菌の関連性

目的：

う蝕と歯周病は歯科の二大疾患である。現在、う蝕はフッ化物応用などにより年々減少傾向を示しているものの、歯周病は30代で約8割が罹患しており、歯周病の罹患者は年々増加している。小児期では、不潔性歯肉炎が主体であり、成人に比較し重篤な歯周病は稀である。しかし、小児の口腔内には歯周病の原因細菌である侵襲性歯周炎の原因細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) や、red complex に含まれる *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*)、*Treponema denticola* (*T.d*)、*Tannerella forsythensis* (*T.f*) も検出率が低いと報告されるもののスピロヘータなどが既に存在することが明らかになっており、小児期における歯周病菌の早期感染が、将来の歯周病リスクを高める可能性がある。近年、簡便かつ非侵襲的に採取可能な唾液を試料とするサリバリーマルチテストが開発された。サリバリーマルチテストは、多項目唾液検査システムであり、う蝕原性菌、唾液 pH、酸緩衝能、潜血、白血球、タンパク質、アンモニアの評価が可能であり、それらの項目検査である従来法と比較し高い相関を有しており、歯周病リスクの判定にも使用されている。

次世代シーケンスは、サンガーシーケンスと比較し、クローニングすることなく全ゲノム配列を決定すること可能であり、口腔細菌叢解析では細菌の 16sRNA 細菌叢解析が可能となり包括的な解析が行える。

本研究では小児の口腔内を対象として、次世代シーケンスにより小児個人の細菌叢をスクリーニングし、さらに唾液を使用したスクリーニング機器であるサリバリーマルチテストメーターにより、唾液中の白血球量およびタンパク量を測定し、小児期における歯周病原因細菌と歯周病に関連した口腔内環境の相関を検定し、小児期からの歯周病リスクを明らかにすることを目的とした。

対象および方法：

対象：本学小児歯科を受診し同意の得られた、来院6か月以内において抗生物質の服用がない3歳から18歳までの男女16名（平均年齢：7.5歳、男女比：1：1）とした。なお、本研究は、北海道医療大学個体差医療科学センター倫理委員会の承認（第162号）を得て行った。患者には、口腔内診査、歯周ポケット測定、BOP検査、唾液およびプラーク採取を行った。

・サリバリーマルチテスト

唾液サンプルは、診療前に3mlの滅菌蒸留水により10秒間洗口を行った吐出水とした。吐出水は、専用のスポイトによりサリバリーマルチテストに滴下し、サリバリーマルチテストメーターにセットし、色調変化を読み取った。

・次世代シーケンス

1) プラークサンプルからの微生物 RNA 採取

プラークは、上顎右側乳中切歯ないし中切歯とし滅菌された雑用エクスカバーターにより採取した。採取したプラークは、DNeasy[®] Blood & Tissue Kit のプロトコールに従い微生物 DNA を抽出した。抽出した DNA の濃度は Qubit[®] 3.0 で測定した。

2) ライブラリー調整

ライブラリーの調製は、16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol を参照した。

アンプリコン PCR は、抽出した DNA の 16Sr RNA 遺伝子の V3-V4 領域を用いた。5 ng / μ l 微生物ゲノム、Forward Primer 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG CCTACGGGNGGCWGCAG-3'、Reverse Primer 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3' および KAPA HiFi HotStart ReadyMix をそれぞれ混合し増幅した。増幅後、AMPure XP ビーズを使用して 16Sr RNA 遺伝子の V3-V4 領域由来のアンプリコンを精製した。Index PCR は、Nextera[®] XT Index kit v2 Set A を用いた。精製後のサンプル DNA、Nextera XT Index 1 Primers、Nextera XT Index 2 Primers、滅菌水および KAPA HiFi HotStart ReadyMix をそれぞれ混合し、サンプル DNA にアダプターおよびインデックス配列を付加させた。さらに、AMPure XP ビーズを用いてライブラリーを精製し、Qubit[®] 3.0 を用いて DNA ライブラリー濃度を測定した。

3) NGS sequencing

インデックス付きサンプルとその 15% の PhiX Control を混合し、MiSeq Reagent Kit v3 を用いて、MiSeq (Illumina) によりシーケンスを行った。シーケンスデータは、QIIME により解析を行った。

結果および考察：

サリバリーマルチテストにおいて、BOP 検査と潜血において弱い正の相関を認めたものの、歯周ポケット検査と潜血、タンパク質においては相関を認めなかった。NGS において、プラークの細菌叢は Other species 構成が大勢を占め、次いで Leptotrichia、Streptococcus 属であった。唾液では、プラークと同様に Other species 構成が大勢を占め、次いで Streptococcus 属であった。

本研究において、平均年齢が低く顕著なポケットの増加がないこともあり、歯周ポケット検査において潜血やタンパク質に相関を認めなかったと示唆された。NGS では、Other species 構成が大勢を占めていたものの、Streptococcus 属の構成が高かった。また小児において歯周病関連細菌の存在が特定できたものの、*Porphyromonas* 属がみられない患者も存在したことから、口腔内診査では歯周病罹患が困難であり、網羅的検査が有効であることが考えられた。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・第 38 回北海道医療大学歯学会学術大会