

令和4年度 8020 公募研究報告書抄録 (採択番号: 22-5-13)

研究課題: 根面う蝕細菌叢のゲノム解析・生理代謝機能解析

研究者名: 平石典子

所属: 東京医科歯科大学歯学部 う蝕制御学分野

【背景・目的】

口腔内には、500種類以上の細菌が生息し、歯の喪失に繋がるう蝕疾患や歯周病の原因になるとされている。近年の次世代シーケンサーの進歩により、口腔内の細菌叢の構造解明が高解像度で可能になった。この手法を用いて、う蝕罹患部における細菌叢の構成や各細菌叢内の生理代謝を解明するため、歯根部・歯冠部のう蝕罹患部を比較して、根面う蝕細菌叢の特徴をゲノム解析によって比較した。

【方法】

ヒトう蝕歯の使用に関し、倫理審査は、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科倫理委員会の承認を得た(承認番号: D2021-034)。過去に収集され、すべての個人情報と削除され、連結不可能に処理され、抜去後から冷凍保存された、軟組織付着が少ない歯を対象に選択した。抜去歯からのサンプル収集は、歯冠う蝕: CCを有する12歯と根面う蝕: RCを有する10歯の合計22本の抜去歯を使用した。抜歯後、歯はすぐに冷凍保存され、う蝕象牙質サンプル採取まで保存した。サンプル採取の前に、X線写真を撮影しう蝕の存在を確認した。サンプルの採取に先立ち、抜去歯を解凍し、生理食塩水で血液とプラークを洗浄した。雑用エキスカで軟組織とう蝕病巣の表層も丁寧に取り除いた。う蝕象牙質試料は、滅菌スプーンエキスカバーターを用いて、EDTAを含むチューブに入れ、 -20°C に保存した。更に、得られた象牙質試料はサーモミキサーを用い、 37°C で72時間脱灰した。脱灰後、ガラスビーズとジルコニアビーズを加え、Tissue Lyser LTで500Hzで5分間ホモジナイズした。その後、ISOSPIN Fecal DNA Kitを使用し細菌叢DNAを抽出した。細菌16S rRNA遺伝子のV3-V4領域をターゲットとしたPCR増幅を行い、細菌叢解析を行った。シーケンス結果は、分類群の相対的な存在量、アルファおよびベータ多様性を計算し、類似性を検討した。

【結果・考察】

細菌叢の α 多様性解析(各試料における微生物多様性の尺度)は、その結果、根面う蝕では歯冠う蝕に比べて、細菌叢が高い多様性を持つことがわかった。 β 多様性を用いたクラスタリングによると、う蝕病巣の場所による微生物群集の違いは明確には区別できず、各細菌叢の β 多様性にも有意差は認められなかった($p=0.053$)。したがって、細菌叢の組成がう蝕病巣の部位によって変化したとは言えなかった。サンプル毎の類似性に基づいて実行した結果を示すと、*Lactobacillus*属優勢(high クラスタ)が、主に歯冠部う蝕に多く、歯冠部細菌叢に根面う蝕群に比べて4倍高かった。一方で根面う蝕群では、*Clostridia*, *Eubacteriales*, *Pseudoramibacter*, *Eubacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Patescibacteria*, *Saccharimonadia*, *Saccharimonadales*が3倍多く認められた。以上より、歯冠う蝕・根面う蝕を引き起こす原因菌の特徴に差異がある可能性が示唆された。