

論文内容要旨

The oral microbiome of children with Down syndrome

(ダウン症候群小児の口腔内細菌叢)

主指導教員：香西 克之教授

(医系科学研究科 小児歯科学)

副指導教員：谷本 幸太郎教授

(医系科学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：柴 秀樹教授

(医系科学研究科 歯髓生物学)

角 奈央

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【緒言】

ダウン症候群（以下 DS）は、21 番染色体トリソミーの結果発症し、出生児に占める割合は 1/700 ~ 1/800 である。全身的には、心機能・免疫機能・筋骨格機能などに異常を伴うとされ、口腔内においてもさまざまな症状が認められる。中でも、歯周病は早期に発症し重症化しやすく、細菌学および免疫学的研究等が行われてきたが、その正確な原因は未だに解明されていない。一方、我々の口腔内には 800 ~ 1000 種以上の細菌が生息し、培養不能菌や難培養菌も多数含んでいる。歯周病に関連する DS 児の口腔内細菌叢の研究は、これまで培養可能な細菌のみをターゲットとし PCR 法などを用いて行われてきたが、小児期において網羅的口腔内細菌叢を調べたという報告はない。本研究では、DS 児と健常児の口腔内細菌叢を比較することで、DS 児の歯周状態に影響を与える細菌学的要因を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 対象: 被験者は 2018 年から 2019 年までに本学病院小児歯科外来を受診した、2 歳から 18 歳の DS 児 40 名（男児 18 名女児 22 名、平均年齢 10.12 ± 4.28 歳）および 2 歳から 18 歳の健常児コントロール（以下 HC）群 40 名（男児 18 名女児 22 名、平均年齢 9.64 ± 4.21 歳）、計 80 名とした。
2. 臨床パラメータ: う蝕罹患評価のため DMF/dmf およびう蝕有病者率を、口腔内清掃状態評価のために Plaque Index（以下 PLI）を、歯肉炎症状態評価のため Gingival Index（以下 GI）、Probing Depth（以下 PD）および Bleeding on Probing（以下 BOP）を記録した。
3. サンプル採取: 滅菌歯ブラシによるブラッシングにて採取した口腔細菌を用いた。
4. 16S rRNA 遺伝子増幅: サンプルから DNA を抽出し、ユニバーサルプライマーおよびインデックスプライマーを用いて PCR 法を行い、アダプター配列の付与された 16S rRNA の V4 領域を増幅した。増幅産物はビーズ法を用いて精製し、その後相対定量化および均一化を行った。
5. データ解析: 専用ソフトウェア (FastQC) を用いてクオリティの低いリードを除去し、エラー除去を含む前処置以降の行程には Qiime2 を使用した。リファレンスは Greengene database を参照し、専用ソフトウェア (Naïve Bay Classifier) を用いて菌種の同定を行った。得られた OTU (Operational taxonomic unit) データに、被験者の分類、歯列などの個別のサンプル情報を付与し OTU table を作成した。種の豊富さを表す α 多様性は、系統発生的に質的計測した値を示す Faith's Phylogenetic diversity を用い、サンプル間の類似性を示す β 多様性は unweighted UniFrac distance metrics を用いた主座標分析を行った。構成細菌の相対存在比の比較を門レベルで行った後、属・種レベルの比較を行った。
6. 統計方法: 臨床パラメータの比較に Chi-square for independence test、Mann-Whitney's U test、構成細菌の比較に Mann-Whitney's U test、 α 多様性は Kruskal-Wallis test、 β 多様性は PERMANOVA をそれぞれ用いた。いずれも $p < 0.05$ をもって有意と判断した。

【結果・考察】

1. 臨床パラメータの結果より、DMFT/dmft 指数は DS 群と HC 群間に有意差を認めなかったが、う蝕有病者率が HC 群で 42.5%なのに対し DS 群は 20%と有意に低かった。また PLI および PD も両群間に有意差を認めなかったが、GI の平均値は HC 群では 1.38 なのに対し DS 群で 1.78 と有意に高く、BOP による出血割合は HC 群で 47.5%なのに対し DS 群は 82.5%でいずれも DS 群が有意に高かった。DS 児は歯肉に炎症が見られるが、口腔内清掃状態はその要因でないと考えられた。
2. 種多様性の結果より、OTU 数や α 多様性は DS 群が HC 群と比較して有意に高いことが明らかとなった。さらに歯列別の比較では、両群間で異なる傾向を示した。 β 多様性についても両群間に有意差を認め、歯列別の比較では両群の混合歯列間に有意差を認めた。また、両群を歯肉炎症の有無に別け比較したところ、DS 群および HC 群の炎症あり群に有意差を認めた。これにより、DS 児と健常児では口腔内細菌叢ならびに成長に伴う細菌層の変化が異なり、歯肉炎症における口腔内細菌叢が異なることが明らかとなった。
3. 構成細菌の相対存在比の比較より、門レベルでは HC 群で TM7 が DS 群と比較して有意に多かった。相対比が 0.2% 以上で存在した属・種レベルの解析では HC 群で *Abitrophia* および *Lautrophia* が DS 群と比較して有意に高く、DS 群では *Corynebacterium* および *Rothia mucilaginosa* (*R.mucilaginosa*) が HC 群と比較し有意に高かった。DS 群において有意に多かった種のうち、歯肉炎または歯周炎に関連する種は認められなかった。これにより DS 児の歯肉炎は、歯肉炎および歯周炎に関連する細菌の存在によるものではないことが示唆された。また、*R.mucilaginosa* は口腔常在菌の一つだが、免疫力の低下した宿主で心内膜炎などの感染を引き起こす起因菌として報告されている。本研究により、本菌が DS 児の口腔内細菌叢に定着しやすい性質を持つことが明らかとなった。

【結論】

本研究では、DS 児はいずれの歯列においても健常児と比較し歯肉の炎症が認められ、それには DS 特有の口腔内細菌叢が要因の一つとして関連することが示唆された。また、DS 群で有意に多い属・種のうち、歯肉炎および歯周炎に関連する細菌は認められなかったが、心内膜炎の起因菌である *R.mucilaginosa* が多く存在していた。このような細菌種を含む細菌叢が DS 児の歯肉に炎症をもたらす要因と関連する可能性が示唆された。