氏　　名	宮井　由記子
授与した学位	博　士
専攻分野の名称	歯　学
学位授与番号	博甲第６９２４号
学位授与の日付	令和５年９月２５日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 （学位規則第４条第１項該当）
学位論文の題目	乳歯の早期脱落を引き起こす小児の口腔細菌叢の探索
論文審査委員	大原　直也　教授　　江國　大輔　教授　　大森　一弘　准教授

学位論文内容の要旨

【目的】

乳歯の早期脱落は、ダウン症などの遺伝性疾患、白血病、および低フォスファターゼ症などの全身疾患に関連する歯周炎あるいは全身疾患の関連しない侵襲性歯周炎で起こることが多い。成人の歯周疾患による歯の脱落には歯肉縁下の細菌叢が関与し、その細菌叢細菌は歯肉溝浸出液（gingival crevicular fluid;GCF）中に検出される。小児期では、成人で重度な歯周炎を発症した患者で検出されるグラム陰性菌の検出が少なく、歯周炎の原因菌については不明な点が多い。

本研究では、急速な歯周組織の破壊を伴い、歯根吸収がみられない乳歯の早期脱落あるいは重度の動揺を認めた患児のGCF中の細菌叢の菌種やそれらの割合を解析し、健常児のものと比較検討した。さらに患児から検出された細菌について、抗菌薬に対する耐性およびバイオフィルム形成能を健常児のものと比較検討した。

【方法】

（1）供試菌

本研究では岡山大学倫理審査委員会承認のもと、歯根の吸収が認められない乳歯の早期脱落あるいは重度の動揺を主訴とし、岡山大学病院小児歯科を受診した9名（7.8 ± 2.5歳）を患児群として解析を行った。なお、各患児は、血液検査にて早期脱落に関連する全身疾患の既往はなく、問診において遺伝性疾患の既往もないことを確認した。また、定期検診のため受診した歯周疾患がない健常児10名（8.0 ± 1.8歳）を健常児群（対照群）とした。患児群では、パノラマエックス線画像検査および歯周組織検査をもとに局所的垂直性の骨吸収あるいはアタッチメントロスが認められる部位から、健常児群では下顎両側第2乳臼歯周囲から滅菌ペーパーポイントを歯周ポケット内に挿入してGCFを採取した。採取したGCFは生理食塩水に懸濁した後、血液寒天培地に播種し、37℃で5～6日間嫌気培養し、独立したコロニーを顕微鏡下にて釣菌し、実験に供試した。使用した菌株は患児群では342株（22~66株/人）で、健常児群では368株（23~52株/人）であった。

（2）歯周病細菌の簡易同定

歯周病細菌を検出するために、通法によりGCFから抽出したDNAを用いてPCRを行った。プライマーは、歯周病に深く関連することが報告されており、小児期で検出されるグラム陰性菌10菌種に対する種特異的プライマーを使用した。各菌種の存在は、増幅産物を電気泳動することによって得られたバンドのサイズにより判定した。陽性対照には16S ribosomal RNA（16S rRNA）遺伝子に対するユニバーサルプライマーを用いた。

（3）塩基配列解析による細菌の同定

血液寒天培地上の各コロニーからDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子に対するユニバーサルプライマーを用いてPCRを行い、得られた増幅産物の塩基配列を解読した。データベースを用いてその配列の相同性検索を行うことで菌種を同定した。

（4）最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration；MIC）の測定

各群から分離した *Actinomyces naeslundii* と *Fusobacterium nucleatum* を Trypticase Soy Broth（TSB）培地で、37℃で一晩、嫌気培養した後、McFarland=2.0 に調整することで供試菌液を得た。この菌液を各種抗菌薬が添加されたドライプレート DP53 に播種した。37℃で 48 時間嫌気培養した後、菌の増殖を目視で判定した。

(5) バイオフィルム形成量の測定

Brain Heart Infusion（BHI）液体培地で前培養した供試菌を1%グルコース添加BHI液体培地に1/100量になるように播種した。これらの菌液を96穴平底細胞培養用マイクロタイタープレートの各ウェルに100μLずつ分注して、37℃で、24および48時間培養した。そして、1%クリスタルバイオレット溶液で底面に形成されたバイオフィルムを染色、蒸留水で洗浄した後、95%エタノールで固定し、乾燥後、100μLの蒸留水を添

加し、波長570nmにおける吸光度を測定した。

【結果】

(1) 歯周病細菌の簡易同定

患児群のGCF中に、重度に進行した歯周炎で検出される*Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*および*Treponema denticola*を検出した。健常児群では本3菌種は検出されなかった。

(2) 塩基配列解析

各群で検出された株の割合を比較したところ、*Actinomyces*属、特に*A. naeslundii*が患児群で有意に割合が高かった（$P<0.01$）。一方で、*Veillonella*属、特に*V. parvula*は健常児群で割合が高かった（$P<0.01$）。また、*F. nucleatum*の検出された株の割合は同程度であり、*Streptococcus*属は健常児群で検出された株の割合が高かった。

(3) MIC の測定

2種のペニシリン系（ベンジルペニシリンカリウムとアンピシリンナトリウム）と1種類のセフェム系抗菌薬（塩酸セフェピム）において、患児群から分離された*A. naeslundii*では、健常児群よりも耐性菌の割合が有意に高かった（$P<0.05$）。*F. nucleatum*では差はなかった。

(4) バイオフィルム形成量の測定

健常児群と比較して患児群では、1%グルコースを添加した場合、24時間後に*V. parvula*のバイオフィルム形成量が有意に高く（$P<0.01$）、48時間後では*V. parvula*および*F. nucleatum*のバイオフィルム形成量が有意に高かった（$P<0.05$）。

【考察】

患児群では、成人において重度に進行した歯周炎で検出される*P. gingivalis*、*T. forsythia*、および*T. denticola*が検出され、これらの歯周病原菌は小児においても同様に歯周炎の重症化に関与している可能性が示唆された。また、健常児群と比較して患児群では*A. naeslundii*の割合が高かったことから、小児期の重度歯周炎では*A. naeslundii*が関与している可能性が示唆された。今回の患児群には臨床的に通常用いられるペニシリン系やセフェム系抗菌薬を投与したが奏功しなかったため、初診時のGCFから分離した細菌の抗菌薬に対する耐性の程度を調べた。患児群から分離された*A. naeslundii*は、健常児群から分離された同菌種と比較して、2種類のペニシリン系と1種類のセフェム系抗菌薬に耐性を示す株の割合が有意に高かった。本結果は、*A. naeslundii*が何らかの契機により抗菌薬耐性を獲得していた可能性を示唆する。菌の代謝に関連するグルコースを添加した場合において、48時間後に*F. nucleatum*および*V. parvula*が高いバイオフィルム形成能を示したことは、小児期における重度歯周炎に関与している可能性を示唆する。

本研究の結果から、患児群では*P. gingivalis*、*T. forsythia*、および*T. denticola*が検出されるとともに、*A. naeslundii*の割合が高かったことから、小児期の重度歯周炎ではこれらの菌が関与している可能性が示された。また、*A. naeslundii*の抗菌薬耐性の獲得および*F. nucleatum*および*V. parvula*が高いバイオフィルム形成能が小児期における重度歯周炎に関与している可能性を示唆している。

論文審査結果の要旨

【緒言】乳歯の早期脱落は、ダウン症などの遺伝性疾患、白血病、および低フォスファターゼ症などの全身疾患に関連する歯周炎あるいは全身疾患の関連しない侵襲性歯周炎で起こることが多い。小児期では、成人で重度な歯周炎を発症した患者で検出されるグラム陰性菌の検出が少なく、歯周炎の原因菌については不明な点が多い。本研究では、乳歯の早期脱落の原因を明らかにすることを目的として、急速な歯周組織の破壊を伴い、歯根吸収がみられない乳歯の早期脱落あるいは重度の動揺を認めた患児の歯肉溝浸出液（gingival crevicular fluid; GCF）中の細菌叢の菌種やそれらの割合を解析し、健常児のものと比較検討した。さらに患児から検出された細菌について、抗菌薬に対する感受性およびバイオフィルム形成能を健常児のものと比較検討した。

【方法】岡山大学倫理審査委員会承認のもと、歯根の吸収が認められない乳歯の早期脱落あるいは重度の動揺を主訴とし、岡山大学病院小児歯科を受診した 9 名（7.8 ± 2.5 歳）を患児群、定期検診のため受診した歯周疾患のない健常児 10 名（8.0 ± 1.8 歳）を対象群とし、解析した。GCF 中の歯周病細菌の検出は、菌種特異的プライマーを用いた PCR 法によって行った。また、GCF を血液寒天培地上に播種して嫌気的に培養した。生じた各コロニーから DNA を抽出し、16S rDNA の塩基配列を解読することで菌種の同定を行った。さらに同定された菌の抗菌薬に対する耐性度とバイオフィルム形成能を調べた。

【結果】患児群では、成人において重度に進行した歯周炎で検出される *Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia*、および *Treponema denticola* が検出された。培養法で得られた株の中から、患児群では 342 株（22~66 株/人）、健常児群では 368 株（23~52 株/人）を選択し、以降の実験に供した。各群で検出された株の割合を比較したところ、*Actinomyces naeslundii* は患児群で有意に高く（$P<0.01$）、*Veillonella parvula* は健常児群で有意に高かった（$P<0.01$）。さらに患児群では奏功しなかった抗菌薬と同系である、2 種類のペニシリン系抗菌薬（ベンジルペニシリンカリウムとアンピシリンナトリウム）と 1 種類のセフェム系抗菌薬（塩酸セフェピム）に対する感受性を調べたところ、*A. naeslundii* では、患児群から分離された株は、健常児群から分離された株よりも耐性菌の割合が有意に高かった（$P<0.05$）。また、患児群から得た菌株と健常児群から得た菌株の、1%グルコース存在下におけるバイオフィルムの形成を調べたところ、24 時間後では患児群由来の *V. parvula* 株のバイオフィルム形成量は健常児群由来の株よりも有意に高く（$P<0.01$）、48 時間後では患児群由来の *Fusobacterium nucleatum* 株と *V. parvula* 株のバイオフィルム形成量は健常児群由来の株よりも有意に高かった（$P<0.05$）。

【考察】患児群では *P. gingivalis*、*T. forsythia*、および *T. denticola* が検出されたとともに、*A. naeslundii* の割合が高かったことから、小児期の重度歯周炎ではこれらの菌が関与している可能性が示唆された。また、患児群から分離された *A. naeslundii* 株では健常児群から分離された株と比較して、供試した抗菌薬に耐性を示す株数の割合が高かったことから、増殖が抑制されず、投与効果が得られなかったため、重症化につながった可能性が考えられた。さらに *F. nucleatum* および *V. parvula* のバイオフィルム形成能も小児期における重度歯周炎の重症化に関与する可能性が示唆された。

本研究で得られた結果は、小児期における重度歯周炎の発症メカニズムを明らかにするための重要な知見と考えられる。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。