乳歯の早期脱落を引き起こす小児の口腔細菌叢の探索

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科　社会環境生命科学専攻

小児歯科学分野

宮井　由記子

(令和 5 年 6 月 8 日受付)

緒言

一般的に歯の早期喪失の原因は，重度齲蝕，外傷，および歯周疾患などが挙げられる [1)]。小児期に発症する歯周炎は極めて稀であり [2)]，全身疾患が関連する歯周炎，あるいは侵襲性歯周炎をはじめとする全身疾患の関連しない歯周炎の 2 つに分類される [3)]。全身疾患が関連する歯周炎として，Down 症候群，低ホスファターゼ症, および Papillon-Lefèvre 症候群などの遺伝性疾患に伴うものと白血病や骨粗鬆症，好中球減少症などの非遺伝性疾患に伴うものがある。全身疾患が関連しない歯周炎には，侵襲性歯周炎や壊死性潰瘍性歯周炎がある。小児期に発症する歯周炎はアタッチメントロスや歯槽骨吸収を伴うものがほとんどであり，乳歯の早期脱落を引き起こすと報告されているものは少ない。一方，乳歯の早期脱落を引き起こす歯周炎として報告されているものの多くは，低ホスファターゼ症や Papillon-Lefèvre 症候群といった遺伝性疾患に関連する歯周炎である [4-6)]。低ホスファターゼ症は，非特異的アルカリホスファターゼをコードする遺伝子の変異により発症する。低ホスファターゼ症では血清中のアルカリホスファターゼ活性が低下し，セメント質形成不全を引き起こし，局所での骨吸収を伴う歯周炎が発症することで，乳歯の早期脱落を引き起こすこと

が知られている[5)]。Papillon-Lefèvre 症候群は, 常染色体劣性遺伝により発症し, 歯槽骨の異常吸収により乳歯が早期脱落することが報告されている[6)]。Papillon-Lefèvre 症候群の治療には通常の歯周治療に加えて，アモキシシリン，メトロニダゾール，およびテトラサイクリンなどの抗菌薬の全身あるいは局所投与が有効とされている[5-7)]。しかしながら，臨床では全身疾患や全身疾患には関連しない歯周炎の中で，侵襲性歯周炎とは異なる乳歯の早期脱落を引き起こす重度の歯周炎がみられることがあり，その発症機序については，不明な点が多い。

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ており，それらの細菌は歯肉縁下プラークや歯肉溝滲出液 (Gingival crevicular fluid ; GCF) 中に検出される[8,9)]。これまでに，歯周病患者の GCF 中の細菌の構成は，歯肉縁下歯垢中の細菌と類似していることが報告されている[8)]。

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* は，歯周ポケットが深くなるに従い，存在頻度が高くなることが報告されている[10-12)]。また，*Fusobacterium nucleatum* は歯周ポケットに豊富に存在し[11)]，常在菌や歯周病原細菌と共凝集することが知られている[13)]。そして，急速な歯槽骨吸収が起きる侵襲性歯周炎

では，*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の存在頻度が高くなると報告されている[14)]。

Actinomyces naeslundii は慢性歯周炎患者では存在頻度は低いものの[15)]，*A. naeslundii* はペプチドグリカンが炎症性サイトカインの産生を誘導し，破骨細胞を活性化させて歯槽骨吸収を引き起こすことが報告されている[16)]。*A. naeslundii* による歯槽骨吸収量は *P. gingivalis* によって引き起こされる吸収量と同程度の高度なものであったことから，*A. naeslundii* は歯周炎発症に重要な病原因子の１つとして報告されている[16)]。

さらに，歯肉の発赤や結合組織付着の喪失が起きている部位では，*Prevotella intermedia*，*Prevotella nigrescens* および *Campylobacter rectus* が検出されると報告されている[11)]。

バイオフィルムの形成過程において，始めに *Streptococcus oralis*，*Streptococcus mitis*，*Streptococcus gordonii*，*Streptococcus sanguinis* などが唾液ペリクル受容体を認識し，歯の表面に付着する。その後，表面に付着した菌は *Haemophilus parainfluenzae*，*P. intermedia*，*Capnocytophaga ochracea*，*Capnocytophaga sputigena*，*Veillonella atypica*，*Eikenella corrodens* および，*A. naeslundii* などと共凝集する。

さらに *F. nucleatum* を介して *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*，*T. forsythia*，および *T. denticola* などと共凝集することにより，成熟することで，バイオフィルム中に歯周病原細菌を獲得していくことが示されている[11,17]。

歯周炎の治療においては，根面に付着した，歯周状態の悪化を惹起する病原性バイオフィルムの機械的除去が最も有効であるとされている[18]。さらに，補助的な全身的[18,19]または局所的[20,21]抗菌薬の投与は，歯周組織の破壊を引き起こす可能性のある特定の細菌の排除または抑制に効果的であるとされている[10,18]。バイオフィルム中に抗菌薬耐性を獲得した細菌が存在する場合，抗菌薬が奏功せず難治化し，バイオフィルムを除去しない限り，再発や慢性化につながるとされている[22,23]。

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，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。さらに患児において，ペニシリン系抗菌薬やセフェム系抗菌薬の奏功が乏しかったため，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。

材料ならびに方法

1. 供試菌株と培養条件

本研究では岡山大学倫理審査委員会承認（研 1810-028）のもと，対象者から同意を得た上で実施した。本研究は症例対照研究であり，調査対象は 2015 年 10 月から 2022 年 3 月に岡山大学病院小児歯科を受診した小児を対象とした。本研究における対象者の選別は図 1 のチャートに従い行った。患児群の候補者は，歯根の吸収が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 10 名から抽出された。患児群はパノラマエックス線画像検査および歯周組織検査において，5mm 以上のアタッチメントロスおよび乳歯根長 1/3 以上の歯槽骨吸収を確認し，重度歯周炎と判断した。患児群の選別ではカルテより血液検査において全身疾患がないこと（表 1）を確認した。血液検査のうち，生化学検査項目で，炎症反応の有無として白血球数，プロカルシトニン，および C 反応性タンパクを，免疫異常や自己免疫疾患の有無として血沈 1 時間，C3，C4，血清補体価を，その他，低フォスファターゼ症の指標としてアルカリフォスファターゼを，好中球減少症の指標として血小板数を評価した。追加問診にて遺伝性疾患がないことを確認し

た。候補者のうち 1 名は研究途中で遺伝性疾患が判明したため，対象から除外した。その結果，9 名（7.8 ± 2.5 歳）を患児群とした。

健常児群の候補者は，長期間にわたる定期検診での当科受診歴があり，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，局所的な垂直性の骨吸収あるいはアタッチメントロスがないことを確認した。候補者への追加問診にて医科的既往歴（全身疾患や遺伝性疾患）がないこと，乳歯列期もしくは混合歯列期で患児群と年齢が近いことを選別条件として抽出した。その結果，健常児 10 名（8.0 ± 1.8 歳）を健常児群とした。なお，本研究は予備的調査のため，サンプルサイズの計算は行わなかった。

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，局所的な垂直性の骨吸収あるいはアタッチメントロスがある部位から GCF を採取した（表 2）。一方，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 を 1 mL の滅菌生理食塩水に懸濁し，血液寒天培地（CDC 血液寒天培地 ; Beckton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA）に播種し，37℃ で 5〜6 日間，5% CO_2 下で嫌気培養した。培養後，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。本研究で使用した菌株は健常児群からは 368 株（23~52 株/人）（表 3-1），患児群からは 342 株（22~66 株/人）（表 3-2）であった。細菌の増殖には Trypticase soy broth（TSB）培地（Beckton Deckinson）に yeast extract（1 mg/mL；和光純薬，大阪），menadione（1 μg/mL；和光純薬），および hemin（5 μg/mL；和光純薬）を添加したものを使用した。

2. 染色体 DNA の抽出

採取した GCF は，1 mL の滅菌生理食塩水に懸濁した。上記で得られたコロニーは, TSB 培地にて継代培養した。これら 2 つの試料から, Puregene Yeast/Bact. Kit B（QIAGEN Sciences，Germantown，MD，USA）を用いて，染色体 DNA を抽出した。キットの添付書に従って得られた DNA を乾燥後，TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl，1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)] 100 μL に溶解させたものを実験に供試した。

3. 歯周病原細菌の簡易同定

GCF から得られた細菌の染色体 DNA を用いた PCR 法を利用して歯周病原細菌の簡易同定を行った。表 4 に示す，小児期の歯周病と関係があると報告されているグラム陰性菌，*P.gingivalis*（*P. g*），*T. denticola*（*T. d*），*T. forsythia*

（*T. f*），*P. intermedia*（*P. i*），*P. nigrescens*（*P. n*），*C. rectus* （*C. r*），*C. ochracea*（*C. o*），*C. sputigena*（*C. s*），*A. actinomycetemcomitans*（*A. a*），*E. corrodens*（*E. c*），10 菌種に対する特異的プライマーを使用した [24-29]。PCR による DNA の増幅には，TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ，滋賀）を用いて，20 μg/mL の DNA 2 μL および終濃度 0.2 μM となるように特異的プライマー 1 μg/mL を含む全量 20 μL で行い，PCR の増幅反応には T100 サーマルサイクラー（Bio-Rad, Hercules，CA，USA）を用いた。増幅条件は，95℃ 5 分の熱変性を行い，94℃ 30 秒の熱変性，62℃ 30 秒のアニーリング，72℃ 30 秒の伸張反応を 30 サイクル行った。増幅産物は 1.5% アガロースゲル（アガロース S，和光純薬）を用いて TAE 緩衝液 （40mM Tris-HCl，40mM 酢酸，1 mM EDTA，pH 8.0）中で 100V の定電圧で，35 分間電気泳動を行った。DNA サイズマーカーとして 100bp ラダー（Amersham Biosciences，Buckinghamshire，UK）を使用した。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液（0.5 μg/mL；和光純薬）で 15 分間の染色，続いて 15 分間水洗した後，波長 312 nm の紫外線でバンドのサイズを確認し，菌を同定した（図 2）。陽性対照には 16S ribosomal RNA（16S rRNA）遺伝子に対するプライマーを用いた。

4. 塩基配列解析による細菌種の同定

コロニーから得られた細菌の染色体 DNA を用いて，歯周病原細菌簡易同定の方法に準じて DNA 溶液を調製した。DNA 溶液は Nano Photometer 微量分光光度計 N50（Implen，Muenchen，Germany）を用いて波長 260 nm で濃度を測定し，最終的に 20 μg/mL に調整した後，PCR 法を用いて菌種の同定を行った。PCR による DNA の増幅には表 4 に示す 16S rRNA 遺伝子に対するプライマーを使用し，歯周病簡易同定と同様に TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ）により増幅した。増幅産物を 1.0% アガロースゲルを使用して電気泳動を行い，バンドを確認した。増幅物が得られたもののみ塩基配列解析を行った。塩基配列解析に際して，PCR 産物を精製するために反応に使われなかった余剰プライマーや反応液中一本鎖 DNA の除去を目的として，Exo SAP（タカラバイオ）7.5 μL，PCR 産物 3 μL を添加し，37℃ 15 分処理後，80℃ 15 分処理を行った。酵素反応後，PCR 産物の塩基配列解析は外部委託（FASMAC，神奈川）により行った。その後 PCR 増幅領域の塩基配列を確認し，米国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information；NCBI）が公開している解析ツ

ールである，Basic Local Alignment Search Tool（BLAST）を用いて，データベース上の既知の塩基配列情報との相同性検索を行った。

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

MIC の測定はドライプレート DP53（栄研化学，東京）を用い，Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）が定めた薬剤感受性検査法に関する基準に従い，微量液体希釈法で行った [30-32]。各群から分離した *A. naeslundii* と *F. nucleatum* の株を 3 mL の TSB 培地にて 37℃ で一晩培養したものを供試菌液とした。供試菌液は滅菌生理食塩水で McFarland = 2.0 に調整した。混濁液 25 μL を Brucella broth（栄研化学）に加え，均等に浮遊させて接種用菌液とした。接種用菌液を 100 μL ずつ，各種抗菌薬が添加されたドライプレートに播種し，培養した。添加された抗菌薬はペニシリン系ではベンジルペニシリンカリウム（PCG ; 0.12, 0.25, 0.5, 1 μg/mL），アンピシリンナトリウム（ABPC ; 0.12, 0.25, 0.5, 1 μg/mL），ピペラシンナトリウム（PIPC；2, 4, 8, 16, 32, 64 μg/mL），セフェム系のセフメタゾールナトリウム（CMZ；1, 2, 4, 8, 16, 32 μg/mL），セフトリアキソンナトリウム（CTRX ; 1, 2, 4, 8, 16, 32 μg/mL），セフタジシム（CAZ ; 1, 2, 4, 8, 16, 32 μg/mL），塩酸セフェピム（CFPM；1, 2, 4, 8, 16, 32 μg/mL），オ

キサセフェム系のフロモキセフナトリウム（FMOX；1, 2, 4, 8, 16, 32 μg/mL），β- ラクタム系合剤のスルバクタムナトリウム/アンピシリンナトリウム（S/A；8/16, 4/8, 2/4, 1/2 μg/mL），タゾバクタムナトリウム/ピペラシンナトリウム（TAZ/PIPC；4/64, 4/32, 4/8, 4/4, 4/2 μg/mL），クラブラン酸カリウムアモキシシリン（ACV；8/4, 4/2, 2/1, 1/0.5 μg/mL），スルバクタムナトリウム/セフォベラゾンナトリウム（S/C；32/32, 16/16, 8/8, 4/4, 2/2 μg/mL），カルバペネム系のイミペネム（IPM；0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 μg/mL），メロペネム（MEPM；0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 μg/mL），テトラサイクリン系のミノサイクリン（MINO；0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 μg/mL），リンコマイシン系のクリンダマイシン（CLDM；0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μg/mL），キノロン系のモキシフロキサシン（MFLX；0.25, 0.5, 1, 2, 4 μg/mL），その他の抗菌薬としてメトロニダゾール（MNZ；2, 4, 8, 16 μg/mL）を使用した（表 5）。48 時間後の細菌の発育を目視で確認し，CLSI の薬剤感受性判定基準に従い，感性（susceptible），中間（intermediate），耐性（resistant）と判定した [30-32]。本研究では，CLSI の分類の中間と耐性を耐性と判断し，耐性率を計算した。

6. バイオフィルム形成量の測定

供試菌液を 1% グルコース添加 Brain Heart Infusion（BHI）液体培地（Becton Dickinson）で希釈し, 96 穴平底細胞培養用マイクロタイタープレート（FALCON, Franklin Lakes，NJ，USA）の各ウェルに 100 μL ずつ分注し，37℃ で 24 または 48 時間 5% CO_2 下で嫌気培養した。各ウェルの浮遊菌液を取り除いた後，25 μL の 1% Crystal violet 溶液（ナカライテスク）を加えて 15 分間室温で静置することにより底面に付着した菌体を染色した。その後，蒸留水で 6 回洗浄を行った。その後，95% エタノール（和光純薬）を加えて溶解，乾燥固定後，蒸留水を 100 μL 加えて波長 570 nm における吸光度を測定した。

7. 統計処理

バイオフィルム形成量の測定は独立して各 5 回行った。連続変数については平均 ± 標準偏差で示した。健常児群と患児群の比較にはフィッシャーの正確確率検定 と Mann–Whitney *U* 検定を用いて行った。有意水準は 5% とした。医療統計ソフト GraphPad Prism8（エムデーエフ，東京）を使用した。

結果

1. 対象者の選別

健常児群と患児群の基礎データを表 6 に示す。健常児群では 6 名がう蝕治療経験を有し，そのうち 1 名に未処置のう蝕を確認した。また，健常児群では早期喪失歯や交換期での脱落歯牙はなかった。一方，患児群では 4 名がう蝕治療経験を有し，そのうち 3 名に未処置のう蝕を確認した。さらに，う蝕治療経験を有さない，2 名も未処置のう蝕を確認した。乳歯の早期喪失を確認した患児が存在したため，初診時における乳歯の早期喪失状況を表 7 に示す。早期喪失歯は上顎よりも下顎において顕著であった。パノラマエックス線画像検査をもとに，歯槽骨吸収量を評価した結果，乳歯根長 1/3 以上 2/3 未満の歯槽骨吸収を患児群の全対象者で確認した。乳歯根長 2/3 以上の歯槽骨吸収は患児 1～4 にのみ確認した。乳歯根長 2/3 以上の歯槽骨吸収部位は下顎にのみ存在した（表 2）。乳歯の早期喪失部位および歯槽骨吸収部位から上顎よりも下顎で歯周炎が重症化する傾向にあった。

2. 歯周病原細菌の簡易同定

歯周病原細菌特異的プライマーを用いた PCR の結果を表 8 に示す。患児群のみに *P. gingivalis*（33.3%），*T. denticola*（11.1%），および *T. forsythia*（44.4%）のバンドが確認された。また，侵襲性歯周炎患者において検出が報告されている *A. actinomycetemcomitans*（11.1%） も患児群でのみ検出された。さらに，*P. nigrescens* も患児群でのみ 55.6% と高い割合で検出された。*C. ochracea*（健常児群 vs. 患児群；50.0% vs. 44.4%），*C. sputigena*（健常児群 vs. 患児群；40.0% vs. 55.6%），*C. rectus*（健常児群 vs. 患児群；50.0% vs. 77.8%），および *E. corrodens*（健常児群 vs. 患児群 30.0% vs. 55.6%）は両群で検出されたが，特に *C. sputigena*，*C. rectus*，および *E. corrodens* の割合は患児群の方が高い傾向にあった。

3. 塩基配列解析による細菌種の同定

健常児群と患児群の塩基配列解析の結果において，構成細菌の分類傾向は類似していた（表 9）。各群で検出された菌種の割合を属レベルで比較したところ， *Actinomyces* 属（健常児群 vs. 患児群；6.1% vs. 29.8%）と *Staphylococcus* 属（健常児群 vs. 患児群；0.6% vs. 4.7%）は，健常児群と比較して患児群で検出された菌種の割合が有意に高く（$P<0.01$），*Streptococcus* 属（健常児群 vs. 患

児群；48.5% vs. 33.3%）と *Veillonella* 属（健常児群 vs. 患児群；23.4% vs. 15.8%）は，患児群と比較して健常児群で検出された割合が有意に高かった（*Streptococcus* 属：$P<0.01$，*Veillonella* 属：$P<0.05$）（図 3）。さらに菌種レベルでは， *F. nucleatum*（健常児群 vs. 患児群；4.9% vs. 4.7%）は，両群で検出された割合に有意差はなく，同程度であった（図 4-A）。属レベルでの比較で高い割合で検出された *Actinomyces* 属，*Veillonella* 属，および *Streptococcus* 属に着目すると，*Actinomycces* 属では *A. naeslundii*（健常児群 vs. 患児群；3.8% vs. 15.6%）が患児群で有意に高い割合で検出され（$P<0.01$）（図 4-B），*Veillonella* 属では *V. parvula* が健常児群において有意に高い割合で検出された（$P<0.01$）（図 4-C）。*Streptococcus* 属では難治性歯周炎で確認される *S. constellatus* や *S. intermedius* が患児群でのみ検出された。*S. sanguinis* は有意差はなかったが，患児群で高い割合で検出された。その他の頻出した *Streptococcus* 属の菌に関しても，健常児群の方が高い割合で検出されたものの，有意差はなかった（図 4-D）。

各健常児および各患児で検出された菌種の割合を属ごとに比較したところ，各健常児において *Streptococcus* 属と *Veillonella* 属が占める割合が高い傾向に

あった（図 5-A）。一方，各患児においては *Actinomyces* 属が占める割合が高い患児が多い傾向がみられた（図 5-B）。また，各健常児と各患児の構成細菌について表 10 に示す。健常児において *V. parvula* は全ての健常児から検出されており（表 10-1），一方で患児群においては，健常児群と比較して *A. naeslundii* が検出された患児が多かった（表 10-2）。

3. MIC の測定

A. naeslundii の抗菌薬耐性を示した株の割合を健常児群と患児群で比較した結果，ペニシリン系の PCG，ABPC，セフェム系の CFPM は健常児群と比較して患児群の方が有意に高い割合を示した（PCG : $P<0.05$，ABPC : $P<0.01$，CFPM : $P<0.05$）。リンコマイシン系の CLDM，キノロン系の MFLX，その他の抗菌薬の MNZ は有意な差はなかったが，両群とも耐性株の割合が高い傾向があった（表 11-1，図 6-A）。

一方，*F. nucleatum* の抗菌薬耐性株の割合を健常児群と患児群で比較した結果，今回使用したほとんどの抗菌薬において有意な差はなかった。ただし，セフェム系の CMZ，FMOX，カルバペネム系の MEPM，テトラサイクリン系の

MINO については有意な差はなかったが，患児群と比較して健常児群の方が耐性株の割合が高い傾向にあった（表 11-2，図 6-B）。

さらに *A. naeslundii* の健常児群と患児群の抗菌薬耐性を示した抗菌薬の数について，耐性株の割合をそれぞれ比較した結果，患児群の方が広い分布を示し，より多くの抗菌薬に対して耐性をもつ傾向があった。中央値はいずれの群も 7 種類に耐性を持っていた。7 種類の抗菌薬に耐性を持つ株の割合は健常児群では 26.7%，患児群では 44.9% であった（図 7）。

4. バイオフィルム形成量の測定

健常児群と患児群のバイオフィルム形成量を比較した結果，*A. naeslundii* は 24 時間後および 48 時間後の両方で，患児群と比較して健常児群において有意に高いバイオフィルム形成量を示した（24 時間後：$P<0.05$, 48 時間後：$P<0.001$）。また，*V. parvula* は 24 時間後および 48 時間後の両方で健常児群と比較して患児群で有意に高いバイオフルム形成量を示した（24 時間後：$P<0.01$，48 時間後：$P<0.001$）。*F. nucleatum* は 24 時間後は患児群と比較して健常児群で有意な差はなかったが，高い傾向にあった。しかしながら，48 時間後には健常児

群と比較して患児群の方が有意に高いバイオフィルム形成量を示した（$P<0.05$）（図 8）。

S. mitis，*S. gordonii*，および *S. sanguinis* のバイオフィルム形成量を比較した結果，*S. mitis* のバイオフィルム形成量は 24 時間後，および 48 時間後の両方で患児群と比較して健常児群において有意差はなかったが，高い傾向がみられた。*S. gordonii* のバイオフィルム形成量は 24 時間後は患児群と比較して健常児群で有意に高かった（$P<0.05$）。48 時間後では患児群と比較して健常児群において有意差はなかったが，高い傾向がみられた。一方，*S. sanguinis* のバイオフィルム形成量は，24 時間後，および 48 時間後の両方で健常児群と比較して患児群において有意差はなかったが，高い傾向がみられた（図 9）。

考察

本研究では，これまでに小児期で検出されると報告されているグラム陰性菌 10 菌種を抽出し，これらの菌に対する特異的プライマーを使用し，菌の同定を行った[33,34]。歯周病原細菌の簡易同定の結果から，本研究の患児群では，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* が検出されたが，健常児群ではいずれの菌も検出されなかった（表 8）。*P. gingivalis*，*T. denticola*，および *T. forthysia* は重度に進行した歯周炎の病巣から高頻度に分離され，特に *T. denticola* は *P. gingivalis*，*T. forsythia*，および *F. nucleatum* などの細菌種と共凝集することが知られている[10-12,35]。本研究の患児群においても侵襲的な歯槽骨吸収が起きていたことから，嫌気性菌である *P. gingivalis*，*T. denticola*，および *T. forthysia* が小児の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，塩基配列解析の結果から，健常児群と比較して患児群において *A. naeslundii* の検出された割合が有意に高かった（図 4-B）。*A. naeslundii* は歯槽骨吸収を引き起こすことや歯槽骨吸収を悪化させることが報告されていること

から[36]，小児期の重度歯周炎においても *A. naeslundii* が関与している可能性が示唆された。

さらに難治性歯周炎の結合組織の上皮付着を喪失した部位で検出される *S. constellatus* や *S. intermedius* が患児群のみから検出された（図 4-D）。*S. constellatus* や *S. intermedius* の存在は，患児において歯周炎が進行した原因である可能性が示唆された。

本研究において，歯周病原細菌簡易同定で同定された，*A. actinomycetemcomitans*，*P. gingivalis*，*T. denticola*，*T. forthysia*，*C. rectus* および *E. corrodens* は塩基配列解析では検出されなかった。Praveen らの報告では，PCR 法を用いることで，微量の DNA 量で *T. forsythia* を同定することが可能であることが報告されている[37]。また，*A. actinomycetemcomitans*，*P. gingivalis*，*T. denticola*，および *T. forthysia* に関して，分離・培養が難しい場合には，縁下歯垢から DNA を抽出し，その DNA をテンプレートとした PCR 法を用いることによって，菌の同定が可能であるという報告がある[25,38]。PCR 法は少量の DNA でも菌の同定が可能であるため，分離・培養が難しい歯周病原細菌の同定

に適しており，本研究でも塩基配列解析では検出できなかった菌を同定することができた可能性が考えられる。

今回の患児群では，通常使用されるペニシリン系やセフェム系抗菌薬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，ペニシリン系抗菌薬の PCG と ABPC，セフェム系抗菌薬の CFPM に耐性を示す株の割合が有意に高かった（表 11-1，図 6-A）。また，*A. naeslundii* に対する耐性を示した抗菌薬数ごとに耐性株の割合を比較したところ，有意差はなかったが，より多くの抗菌薬に対して耐性をもつ患児が存在することが明らかとなった（図 8-A）。*A. naeslundii* の抗菌薬耐性に関する報告は少ないが，Alexsandra らの報告では，小児から得た *A. naeslundii* の臨床分離株を用いた寒天希釈法と E-test 法において，ペニシリン系やセフェム系抗菌薬に対して *A. naeslundii* が感受性を示したことが明らかになっている [39]。また，リンコマイシン系の CLDM，キノロン系の MFLX，およびその他の MNZ では有意差はなかったが，両群とも耐性株の割合が高い傾向を示した（表 11-1，図 6-A）。

CLDM, MFLX, MNZ は，両群ともに耐性を獲得しており，MIC50 や MIC90 の値も同じであったため, 自然耐性を獲得していた可能性が考えられる。ただし，*A. naeslundii* がこれらの抗菌薬に自然耐性を獲得するという報告はない。しかしながら，成人の歯周病患者から得た *A. naeslundii* の臨床分離株を用いた E-test 法や *A. naeslundii* の標準株を用いた微量希釈法において，CLDM や MNZ が感受性を示すという報告がある [35,40]。一方で, 成人の歯周病患者から得た *A. naeslundii* の臨床分離株を用いたディスク拡散法では *A. naeslundii* が MNZ に耐性を示すという報告もある [41]。本研究では，患児群から分離された *A. naeslundii* が何らかの要因により抗菌薬に対して耐性を獲得していた可能性が示唆された。また，患児群では多数の抗菌薬に耐性を示したことから（図 7），*A. naeslundii* に対して抗菌薬が奏功せず，増殖が抑制されなかったために病態が重症化した可能性が考えられる。

バイオフィルム形成に関して， *P. gingivalis*，*T. denticola*，および *T. forthysia* は *F. nucleatum* と凝集するため，バイオフィルムが病原性細菌を獲得する上で *F. nucleatum* は重要な役割を果たす菌とされている。本研究において，*F. nucleatum* は健常児群と患児群で検出された割合と人数はほぼ同程度であった

（表 10，図 4-A）が，健常児群と患児群で得られた *F. nucleatum* の病原性の違いを調べるために抗菌薬耐性を比較した。しかしながら，今回使用した抗菌薬のほとんどにおいて，有意差はなかった（表 11-2）。そのため，本研究では，さらにバイオフィルム形成能を検討することとした。

バイオフィルム形成量に関して，*A. naeslundii* のバイオフィルム形成量は 24 時間後，48 時間後の両方で，患児群と比較して健常児群において有意に高かった（図 9）。*A. naeslundii* はスクロースを代謝することで成熟することが知られているが [42]，グルコースの代謝に関する報告はない。一方，*F. nucleatum* のバイオフィルム形成量は両群で有意差はないものの, 24 時間後には患児群と比較して健常児群で高い傾向にあり, 48 時間後には健常児群と比較して患児群の方が有意に高かった（図 8）。*F. nucleatum* はグルコースを代謝しないことが知られている [43]。これにより，糖の存在に関わらずバイオフィルム形成が可能であると考えられる。

さらに， *V. parvula* のバイオフィルム形成量は, 24 時間後および 48 時間後の両方で健常児群と比較して患児群で有意に高かった（図 9）。*V. parvula* はグルコースの代謝に関わる酵素であるグルコキナーゼとフルクトキナーゼが欠如

しているため，グルコース，フルクトース，および二糖類を代謝できない[44]。このことは, 他の 2 つの菌と同様に糖の存在に関わらずバイオフィルム形成が可能であると考えられる。

本研究の MIC の測定とバイオフィルム形成量の測定結果から，患児群において *V. parvula* の検出された株の割合は有意に低く，一方で *F. nucleatum* は同程度の割合で検出されたものの，糖の存在に関わらず患児群でのバイオフィルム形成量が高かった。そのため，*V. parvula* と *F. nucleatum* の高いバイオフィルム形成能が小児期の重度歯周炎の病態に関与している可能性が示唆された。

また，*S. mitis*，*S. gordonii*，および *S. sanguinis* のバイオフィルム形成量を比較した結果，*S. mitis* と *S. gordonii* のバイオフィルム形成量は 24 時間後および 48 時間後ともに患児群と比較して健常児群において高い傾向が見られた。一方で，*S. sanguinis* のバイオフィルム形成量は，24 時間後および 48 時間後ともに健常児群と比較して患児群において高い傾向が見られた（図 9）。*S. sanguinis* は塩基配列解析では有意な差はなかったが，患児群の方が健常児群と比較して高い割合で検出される傾向もあった（図 4-D）。*S. mitis*，*S. gordonii*，および *S. sanguinis* は共通してグルコースを代謝することで成熟することが知

られている[45]。そのため，患児群では *S. sanguinis* が初期のバイオフィルム形成の足がかりとなり, バイオフィルム成熟過程に関与する可能性が示唆された。

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，さらに *A. naeslundii* の割合も有意に高かったことから，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有意に高かったため，増殖が抑制されずに抗菌薬の投与効果が得られず，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の重度歯周炎の重症化に関与する可能性が示唆された。*A. naeslundii* の抗菌薬耐性の獲得やバイオフィルム形成における *F. nucleatum* および *V. parvula* の存在が重要であると考えられた。しかしながら，本研究は対象者が少ない横断的な調査であったこと，歯垢中の細菌を調べておらず，また現段階では確定診断ができていないため, これらの結果を全ての症例に当てはめることは難しい。さらに，培養法による菌種同定のため，患児が保有している全ての細菌を網羅できてい

ない。以上の点から，小児期に歯周炎が重症化するメカニズムについて今後もさらなる検討が必要である。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の仲野道代教授および仲周平講師に心から感謝致します。また，様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1) (公財) 8020 推進財団. 第 2 回 永久歯の抜歯原因調査報告書. https://www.8020zaidan.or.jp/pdf/Tooth-extraction_investigation-report-2nd.pdf (最終アクセス 2018 年 11 月)

2) Oh TJ, Eber R, Wang HL. Periodontal diseases in the child and adolescent. J Clin Periodontol. 2002; 29(5): 400-410.

3) 公益社団法人　日本小児歯科学会学術委員会.　小児期・思春期患者の歯周病分類.　https://www.jspd.or.jp/recommendation/article12/（最終アクセス 2021 年 8 月）

4) Spodzieja K, Olczak-Kowalczyk D. Premature Loss of Deciduous Teeth as a Symptom of Systemic Disease: A Narrative Literature Review. Int J Environ Res Public Health. 2022; 19(6): 3386.

5) Linglart A, Biosse-Duplan M. Hypophosphatasia. Curr Osteoporos Rep. 2016; 14: 95–105.

6) Nualart Grollmus ZC, Morales Chávez MC, Silvestre Donat FJ. Periodontal disease associated to systemic genetic disorders. Med Oral Pathol Oral Cir Bucal. 2007; 12: E211-215.

7) Lundgren T, Renvert S. Periodontal treatment of patients with Papillon-Lefevre syndrome: A 3-year follow-up. J Clin Periodontol. 2004; 31: 933–938.

8) Asikainen S, Doğan B, Turgut Z, Paster BJ, Bodur A, Oscarsson J. Specified species in gingival crevicular fluid predict bacterial diversity. PLoS One. 2010 Oct 25; 5(10): e13589.

9) Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival Crevicular as a Source of Biomarkers for Periodontitis. Periodontol 2000. 2016; 70(1): 53-64.

10) Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. Periodontol 2000. 2018; 76: 85–96.

11) Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28: 12-55.

12) Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol 2000. 2005; 38: 72-122.

13) Jung YJ, Jun HK, Choi BK. *Porphyromonas gingivalis* suppresses invasion of *Fusobacterium nucleatum* into gingival epithelial cells. J Oral Microbiology. 2017; 9: 1320193.

14) Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: A triple A* periodontopathogen? Periodontol 2000. 2010; 54: 78–105.

15) Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. J Clin Periodontol. 1998; 25(2): 85–98.

16) Sato T, Watanabe K, Kumada H, Toyama T, Tani-Ishii N, Hamada N. Peptidoglycan of *Actinomyces naeslundii* induces inflammatory cytokine production and stimulates osteoclastogenesis in alveolar bone resorption. Archives Oral Biol. 2012; 57:1522–1528.

17) Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol. 2002; Rev. 66(3):486-505.

18) Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S. A systematic review on the e-ect of systemic anti-microbials as an adjunct to scaling and root planning in periodontitis patients. J Clin Periodontol. 2002; 29：136−159.

19) Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy A systematic review. Ann Periodontol. 2003; 8：115−181.

20) Kimura S, Ooshima T, Takiguchi M, Sasaki Y, Amano A, Morisaki I, Hamada S. Periodontopathic bacterial infection in childhood. J Periodontol. 2002; 73: 20–26.

21) Cortelli JR, Fernandes CB, Costa FO, Cortelli SC, Kajiya M, Howell SC, Kawai T. Detection of periodontal pathogens in newborns and children with mixed dentition. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(6): 1041-50.

22) Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol. 2007; 5: 48–56.

23) Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45: 999–1007.

24) Watanabe K, Frommel TO. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. J Clin Periodontol. 1996; 23(3 Pt 1): 212-9.

25) Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 1996; 11(4): 266-273.

26) Conrads G, Mutters R, Fischer J, Brauner A, Lütticken R, Lampert F. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within

plaque samples of periodontally healthy individuals. J Periodontol. 1996; 67(10): 994-1003.

27) Doungudomdacha S, Rawlinson A, Douglas CW. Enumeration of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples by a quantitative-competitive PCR method. J Med Microbiol. 2000; 49(10): 861-74.

28) Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Iida T, Shizukuishi S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19(3): 168-76.

29) Kato Y, Shirai M, Murakami M, Mizusawa T, Hagimoto A, Wada K, Nomura R, Nakano K, Ooshima T, Asai F. Molecular detection of human periodontal pathogens in oral swab specimens from dogs in Japan. J Vet Dent. 2011; 28(2): 84-9.

30) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved

standard, 10th ed. CLSI standard M07-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

31) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. approved standard, 9th ed. CLSI standard M11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

32) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

33) Tamura K, Nakano K, Hayashibara T, Nomura R, Fujita K, Shintani S, Ooshima T. Distribution of 10 periodontal bacteria in saliva samples from Japanese children and their mothers. Arch Oral Biol. 2006; 51(5): 371-7.

34) Cortelli JR, Fernandes CB, Costa FO, Cortelli SC, Kajiya M, Howell SC, Kawai T. Detection of periodontal pathogens in newborns and children with mixed dentition. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(6): 1041-50.

35) Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25(2): 134-144.

36) Li CL, Seneviratne CJ, Huo L, Lu WW, Zheng LW. Impact of *Actinomyces naeslundii* on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats with periodontitis. J Craniomaxillofac Surg. 2015; 43(8): 1662-1669.

37) Bankur PK, Nayak A, Bhat K, Bankur R, Naik R, Rajpoot N. Comparison of culture and polymerase chain reaction techniques in the identification of *Tannerella forsythia* in periodontal health and disease, an in vitro study. J Indian Soc Periodontol. 2014;18(2):155-160.

38) Zijnge V, Welling GW, Degener JE, van Winkelhoff AJ, Abbas F, Harmsen HJ. Denaturing gradient gel electrophoresis as a diagnostic tool in periodontal microbiology. J Clin Microbiol. 2006; 44(10): 3628-3633.

39) Wolff A, Rodloff AC, Vielkind P, Borgmann T, Stingu CS. Antimicrobial Susceptibility of Clinical Oral Isolates of *Actinomyces spp*. Microorganisms. 2022; 10(1): 125.

40) Soares GM, Teles F, Starr JR, Feres M, Patel M, Martin L, Teles R. Effects of azithromycin, metronidazole, amoxicillin, and metronidazole plus amoxicillin on an in vitro polymicrobial subgingival biofilm model. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(5): 2791-2798.

41) Aguilar-Luis MA, Casas Apayco L, Tinco Valdez C, De Lama-Odría MDC, Weilg C, Mazulis F, Silva-Caso WG, Del Valle-Mendoza JM. Screening and Assessment of Antimicrobial Susceptibility of Periodontopathic Bacteria in Peruvian Patients with Periodontitis: A Pilot Study. Int J Dent. 2021; 2021: 2695793.

42) Yoneda S, Kawarai T, Narisawa N, Tuna EB, Sato N, Tsugane T, Saeki Y, Ochiai K, Senpuku H. Effects of short-chain fatty acids on *Actinomyces naeslundii* biofilm formation. Mol Oral Microbiol. 2013 Oct; 28(5): 354-365.

43) Robrish SA, Oliver C, Thompson J. Sugar metabolism by *Fusobacteria*: regulation of transport, phosphorylation, and polymer formation by *Fusobacterium mortiferum* ATCC 25557. Infect Immun. 1991; 59(12): 4547-4554.

44) Zhou P, Manoil D, Belibasakis GN, Kotsakis GA. Veillonellae: Beyond Bridging Species in Oral Biofilm Ecology. Front Oral Health. 2021; 2: 774115.

45) Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA. Biology of Oral *Streptococci*. Microbiol Spectr. 2018; 6(5): 10.1128.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科　社会環境生命科学専攻　小児歯科学分野

(指導：仲野道代教授)

本論文の一部は，以下の学会において発表した。

・第 59 回 日本小児歯科学会大会（2021 年 6 月，Web 開催）

・第 69 回 国際歯科研究学会日本部会（JADR）総会・学術大会

（2021 年 10 月，Web 開催）

・第 40 回 中四国地方会（2021 年 11 月，Web 開催）

・第 42 回　岡山歯学会学術集会（2021 年 11 月，Web 開催）

・第 60 回 日本小児歯科学会大会

（2022 年 5 月，幕張メッセ国際会議場）

・第 70 回 国際歯科研究学会日本部会（JADR）総会・学術大会

（2022 年 10 月，Web 開催）

・第 41 回 中四国地方会（2022 年 11 月，徳島大学大塚講堂）

・第 43 回　岡山歯学会学術集会（2022 年 12 月，Web 開催）

・Korean Academy of Pediatric Dentistry (KAPD) Annual Congress

（2023 年 4 月，COEX Convention & Exhibition Center ， Seoul，Korea）

・第 61 回　日本小児歯科学会大会（2023 年 5 月，出島メッセ長崎）

・第 29 回 International Association of Pediatric Dentistry（IAPD）

CONGRESS

（2023 年 6 月，MECC Maastricht，Maastricht，The Netherlands）

図の説明

図 1. 本研究における対象者の選別

対象者の選別方法をフローチャートで示す。フローチャートに従い，遺伝疾患や全身疾患の既往がないにも関わらず, 歯周組織の急速な破壊が見られた重度歯周炎を疑う患児 9 名を患児群とした。また，健常児の選別基準に従い，問診において遺伝疾患や全身疾患がなく, 定期検診のため受診した歯周疾患のない健常児 10 名を健常児群とした。

図 2. 患児 5 の PCR 法を利用した歯周病原細菌の簡易同定

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，歯周病原細菌の簡易同定を行った。患児 5 の GCF から抽出した DNA を用いて PCR を行い，増幅産物を電気泳動することによって得られた結果を示す。陽性対照には 16S ribosomal RNA（16S rRNA）遺伝子に対するプライマーを用いた。

図 3. 塩基配列解析により検出された菌種の割合を属ごとに比較

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。

（フィッシャーの正確確率検定 : *P<0.05，**P<0.01）

図 4. 塩基配列解析により検出された菌種の健常児群と患児群の割合を各属の菌種ごとに比較

A: *Fusobacterium* 属

B: *Actinomyces* 属

C: *Veillonella* 属

D: *Streptococcus* 属

（フィッシャーの正確確率検定 : *P<0.05，**P<0.01）

図 5. 塩基配列解析により検出された菌種の割合を各健常児および各患児で属ごとに比較

A: 各健常児

B: 各患児

図 6. 各種抗菌薬耐性株の割合を健常児群と患児群で比較

A: *A. naeslundii*

B: *F. nucleatum*

（フィッシャーの正確確率検定 : *P<0.05，**P<0.01）

各群から分離した *A. naeslundii* と *F. nucleatum* を 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。

図 7. *A. naeslundii* が耐性を獲得した抗菌薬数ごとに耐性株の割合を健常児群と患児群で比較

A. naeslundii が耐性を獲得した抗菌薬数ごとに耐性株の割合を示した。

図 8. *A. naeslundii, V. parvula, F. nucleatum* の 24 時間後と 48 時間後におけるバイオフィルム形成量の比較

A: 24 時間後

B: 48 時間後

（Mann–Whitney *U* test : *P<0.05，**P<0.01，***P<0.001)

BHI 液体培地で前培養した健常児群と患児群の *A. naeslundii*，*V. parvula*，*F. nucleatum* 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。

図 9. *Streptococcus* 属の 24 時間後と 48 時間後におけるバイオフィルム形成量の検討

A: 24 時間後

B: 48 時間後

（Mann–Whitney *U* test : **P*<0.05）

健常児群と患児群の *S. mitis*，*S. gordonii*，*S. sanguinis* の波長 570 nm における吸光度を測定した。