

平成 22 年 5 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390530  
 研究課題名（和文）歯周病原性菌の小児口腔内への伝播機序の解明と成人性歯周炎予防対策への展開  
 研究課題名（英文）Elucidation of transmission of bacteria induced in periodontal diseases in children and development of prevention from periodontitis in adults  
 研究代表者  
 香西 克之（KOZAI KATSUYUKI）  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号：10178212

研究成果の概要（和文）： 歯周病原性菌は歯周疾患の発症と進行に重要な役割を果たしており、小児期の定着時期および感染経路をあきらかにすることは、歯周疾患の予防対策を考えるうえで重要である。今回我々は、菌種特異的なプライマーを用いた PCR 法により最終的な菌種の同定を行い、*Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus* の 2 種の菌種を選び、その伝播経路をパルスフィールド電気泳動装置を用いて検討した。その結果、一部の菌に関して母子間での伝播を認めた。嫌気性菌の培養が確立されることにより、さらに多くの菌の伝播経路や分布が解明できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The bacterial species induced periodontitis play an important role to the appearance of disease and the progress of periodontal disease, and it is important for thinking about the prophylactic measure of periodontal disease to clarify the established time and the route of infection of the infant period. We identified a final bacterial strain by the PCR method with a primer the bacterial strain peculiar, chose two kinds of bacterial species of *Prevotella nigrescens* and *Campylobacter rectus*, examined the transmissive route with a pulse field electrophoresis unit, and admitted the spread among mother and child for a part of bacterium in this research. If the method of culturing anaerobic bacteria was able to be established, it was suggested that the transmission mechanism and the distribution of more bacteria would be interpretable.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・矯正・小児系歯学

キーワード： 歯周病原菌，伝播，小児歯周病，歯学，パルスフィールド電気泳動，DNA フィンガープリント

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病感染論に基づき、歯周病原性菌の分布、伝播に関する研究は国内外で数多く行われてきているが、小児を対象にした歯周炎発症前の予防をターゲットとした細菌学的研究は少ない。

我々はこれまで「健常小児の歯周病原性菌の分布」について研究を行い、

(1) 健常歯肉小児では、歯周病原性菌の保有種類数が少ない。しかも成人性歯周炎と強い関連があるといわれる *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) および *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) の検出率が低い。

(2) 歯肉炎、歯周炎罹患小児ではともに、歯周病原性菌を多数種保有しているのが特徴で、さらに、歯周炎罹患小児では、*A. a.*, *P. g.* および *Treponema denticola* (*T. f.*) の検出率が高い。

(3) 小児の歯周病原性菌の保有分布は両親の歯周病原性菌の保有との関連が極めて強い、

ことを明らかにした。

また「早期発症型歯周炎の家系での家族内の伝播」について研究を行い、

(1) 歯周病原性菌の家族内共有は確認されるものの、感染源や伝播経路は特定できない。

(2) 早期発症型歯周炎の家系で、特定の歯周病原性菌の相同性を調べた結果、小児が保有する歯周病原性菌は親から伝播する可能性が高い、

ことを明らかにした。しかし、歯周病原性菌の健常小児への初期伝播あるいは家族内伝播経路について多数家族を対象に調べた研究はない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究をさらに発展させ、健常児とその家族を対象に、歯周病原性菌を口腔内から分離し、染色体DNAフィンガープリントを用いた分子疫学的多型解析により感染源の鑑別、特定を行う。さらに口腔内の歯周状態評価、生活環境などの歯周病リスク因子の解析を行い、

(1) 歯周病原性菌の感染源、小児への伝播感染経路、感染時期、菌種間の相異、家族間の共有等、

(2) 伝播、感染に及ぼす歯周病リスク因子(宿主因子)の影響について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 被験者の家族への説明と了解

平成 21 年度に広島大学病院小児歯科を受診した小児およびその家族を対象とした。本研究の目的および方法について十分に説明し理解していただいたのち、承諾書を取り保管した。なお、本研究は広島大学倫理委員会の承認を得ている(許可番号 56)。

### (2) 口腔内診査およびサンプルの採取

① 小児およびその家族の口腔内診査を行い、宿主歯周状態のデータを収集した。全萌出歯、デンタルプラーク付着状況および 6 点法による歯周ポケット測定値、出血、排膿の有無を確認、診査用紙に記録した。また歯列および咬合の記録として口腔内写真を撮影した。測定した歯周ポケットのうち最も深い 5 点よりサンプルを採取することとした。

② 林らが開発した歯ブラシ法により、小児およびその家族の口腔内より、滅菌歯ブラシを用いてデンタルプラークを採取した。

③ ペーパーポイント法により、小児およびその家族の口腔内より歯周病原性細菌を採取した。健康な小児では歯肉溝は 0~1mm と浅く、滅菌ペーパーポイントの挿入および保持が困難である。また低年齢の小児では長時間のペーパーポイント挿入が不可能である。これらを想定して挿入するペーパーポイントの本数、挿入時間と集菌数の関係について検討した結果、ペーパーポイントを 5 本、挿入保持時間を 30 秒とした。

### (3) 歯周病原性細菌の分離

ペーパーポイントで採取したサンプルの保存液には予備還元した GAM 液体培地を用い、37℃で保存時間は 30 分以内とした。検討の結果、選択培地として、*Fusobacterium* 属に対して変法 FM 寒天培地を、*Capnocytophaga* 属に対してセアーマーチン、寒天培地を用いた。変法 FM 寒天培地は使用前 4 時間以内に作製したもの、セアーマーチン寒天培地は使用直前まで予備還元したものを使用した。嫌気性を維持するため、採取したサンプルを希釈することなく、可及的速やかに各寒天培地に播種し、播種後 15 分以内に酸素濃度 0.1% 以下の嫌気培養を開始した。嫌気培養は 3 日培養では検出率が 6 割程度と低いため、37℃嫌気条件下で 3 日以上、最長 7 日間まで培養を継続することとし、コロニーの有無を確認した。発育したコロニーの継代および分離に

は選択培地 2 種に加え、ウサギおよびヒツジ脱繊維血液を添加したブルセラ HK (RS) 寒天培地を使用した。また、液体培地を用いた培養では発育しない菌株が多く認められ、継代回数を最小限にするためにサンプル採取直後の播種時に選択培地を使用した。

分離、培養の過程では、寒天培地上でコロニーの色調および形態を観察し、グラム染色標本にて菌体の特異的形態の観察される株を選択した。すなわち、*Fusobacterium nucleatum* (*F. n.*) については変法 FM 培地に発育した円形で白い平滑なコロニーあるいは白いパンくず様の脆弱なコロニーで、UV 下にて黄緑色の蛍光が認められるもの、紡錘形の嫌気性無芽胞性グラム陰性桿菌を選択した。*Capnocytophaga ochracea* (*C. o.*) ほか 2 種は極小のコロニーで、棒状の嫌気性無芽胞性グラム陰性桿菌を選択した。また、最終的な菌種の同定には PCR 法を用いた。菌種特異的のアミノ酸配列である 16S ribosomal DNA (rDNA) をターゲットとして Ashraf ら (2002) および Conrads ら (1996) が設計した primer を使用した PCR 法を用いた。

(4) 染色体 DNA フィンガープリントによる伝播の分析

① 染色体 DNA の抽出は中山らの方法 (1995) に準じて行った。分離株は対数増殖中期に達するまで嫌気培養した後、Tris-HCl で遠心洗浄し、集菌した。この菌体を 2% low melt agarose に封入し、1.5mg/ml lysozyme を加えて 37°C 24 時間処理後、2mg/ml proteinase K および 1% SDS を加えて 50°C 24 時間処理することにより細胞壁溶解およびタンパク質の除去を行った。また、40U の NotI および EcoRI にて 37°C 15 時間制限酵素処理を行った。グラム陰性菌であり 3 層構造の細胞壁を持つ歯周病原性細菌は、lysozyme および proteinase K などの化学的溶解のみでは菌体を完全に破壊するのは困難であり、本来ガラスビーズや超音波振動などの機械的細胞壁破砕を併用すべきである。しかし、染色体 DNA を可及的に保存するためには物理的的刺激を避けて細胞壁を破壊する必要があるため、lysozyme および proteinase K の量を増量し作用時間を延長することで細胞壁溶解およびタンパク質除去を行った。

② パルスフィールドゲル電気泳動装置には、SHEF-DR III システム (日本バイオラッド) を用いた。1% Pulse Field Certified agarose と 0.5XTBE を用い、スイッチングタイム 5.3~49.9 秒、パルス角度 120°、電圧勾配 6V/cm、液温 14°C にて 24 時間泳動した。泳動後、ethidium bromide を用いてバンドの染色を行い、UV 下で観察した。

③ 泳動パターンについて NIH image を使った画像解析により homology 解析を行い、各個人の保有する菌株の分類、家族構成員の菌株のフィンガープリントによる相同性の決定、各菌株の伝播経路の決定、感染源の特定、について分析を行った。

#### 4. 研究成果

本研究に対する協力が得られた 7 家族のうち、*Fusobacterium* 属および *Capnocytophaga* 属について、小児から臨床分離株が採取された 2 家族に対し、検討を行った。

菌属	家族	続柄	菌株数	菌種			
				<i>F. nucleatum</i>	<i>C. ochracea</i>	<i>C. sputigena</i>	<i>C. gingivalis</i>
<i>Fusobacterium</i>	1	母	4	3			
		子1(兄)	4	3			
		子2(弟)	5	2			
	2	母	4	3			
		子	5	3			
<i>Capnocytophaga</i>	1	母	3		1		1
		子1(兄)	3		1		1
		子2(弟)	3		1		1
	2	母	5		2	1	1
		子	1		1		1

表1 家族内での歯周病原性菌株保有状況

家族 1: *Fusobacterium* 属について、兄は 4 菌株、弟は 5 菌株、母親は 4 菌株保有するものの、共通する菌株は認められなかった。*Capnocytophaga* 属について、兄は 3 菌株、弟は 3 菌株、母親は 3 菌株保有していた。母と弟に *C. ochracea* 1 株が共通して見られ、母親から弟へ伝播したと考えられた。

家族 2: *Fusobacterium* 属について、子は 5 菌株、母親は 4 菌株保有し、共通する菌株は認められなかった。*Capnocytophaga* 属について、子は 1 菌株、母親は 5 菌株保有し、共通する菌株は認められなかった。

研究対象となった 7 家族の小児において、歯ブラシ法を用いて採取した DNA サンプルでは歯周病原性菌の保有が確認されたのに対し、生菌が分離されなかった者が見られた。この理由としては、研究対象が健康な小児であるため、もともと歯周病原性菌の保有菌数が少ないこと、歯肉溝が浅くペーパーポイント法を用いた集菌数では不十分であること、歯周病原性菌自体の生命力あるいは伝播力が弱いこと、などの理由により、臨床分離できなかった可能性が考えられた。

今回の研究では、低年齢の小児での保有率が高い歯周病原性細菌として報告されている *Fusobacterium* 属および *Capnocytophaga* 属を分離の対象とした。*Capnocytophaga* 属は生後 3 か月の早期より口腔内に定着し、とくに侵襲性歯周炎の歯周ポケットから高率に分離されることから、注目されている。ま

た、*Fusobacterium* 属は幼児期より口腔内に定着し、歯石保有者の歯肉縁上プラークから分離されることから、歯石形成に関与する可能性が示唆されている。

今回の結果から、口腔内に定着する *Capnocytophaga* 属は1~5菌株の保有が見られ、*Fusobacterium* 属は4~5菌株の保有が見られたが、母子間、兄弟間で共通の株は1種類だけであった。同一菌種で複数の株を保有することが明らかとなり、これは成人での結果と一致する。しかし、同一家族間での伝播が *C.o*1 株でしか認められなかったことは、嫌気性菌である歯周病原性菌の伝播経路に疑問を残すこととなった。小児の口腔は出生後、外界の様々な細菌に晒され、口腔内の環境あるいは生活環境の影響を受けながら、常在細菌叢を確立していく。我々は、過去、ミュータンス菌の伝播に注目し、その伝播経路に関する研究を行ってきた。従来よりミュータンス菌は母子感染であることが、多くの歯科医療、歯科保健活動の中で当然のごとく受け入れられてきたが、我々の研究結果では、必ずしも母親だけではなく父親や他の家族構成員等も感染源となりうることを示された。歯周病原性菌もミュータンス菌と同様に母親からの伝播が多いのか、感染の時期はいつなのか、など解明しなければならない事項が非常に多い。ミュータンス菌と異なり伝播時期が遅いと思われるため、感染源は母親以外も多いことが予想される。しかし伝播力の強い歯周病原性菌（ミュータンス菌でいえば不溶性グルカン合成能の高いものやバクテリオシン産生能の高いもの）が存在する可能性もあり、伝播や感染に関連する因子を宿主側およびパラサイト側両方で分析する必要がある。今回対象とした7家族10人の小児の年齢は5歳5カ月~10歳3カ月と比較的高かったため、臨床分離株の分離が可能であった2家族の小児3人についても、母親以外の以外の家族から伝播する可能性が高いと考えられる。

今後は、採取コロニー数を大幅に増やした上で、標的菌種を1つに絞り、DNAフィンガープリント法を用いて母子間の伝播についてさらに検討する。また父親や祖父母を始めとして、対象を増やし、家族内での歯周病原性菌の伝播について症例を増やして検討していく予定である。合わせて、歯周病原性菌の定着時期および保有菌種と口腔内状態について検討を行い、歯周病の発症および進行との関連性を明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① 鈴木 淳司 :  
小児期侵襲性歯周炎の発症機構 (総説), 小児歯科学雑誌, 48(1): 20-28, 2010. (査読無し)
- ② 鈴木 淳司, 香西克之 :  
小児歯科領域における歯周疾患を考える (2) 歯肉炎と歯周炎の相違, 小児歯科臨床 15(3):37-39, 2010. (査読無し)
- ③ 鈴木 淳司, 香西克之 :  
小児歯科領域における歯周疾患を考える (1) 歯周疾患の分類, 小児歯科臨床 15(2):49-53, 2010. (査読無し)

[学会発表] (計7件)

うち招待講演 計(1)件

- ① 角本法子 :  
歯周病原性菌の家族内伝播に関する研究, 第48回日本小児歯科学会大会, 2010. 05. 19-20, 名古屋国際会議場
- ② 鈴木 淳司 :  
小児歯周疾患の発症に関する基礎的研究, 第47回日本小児歯科学会, 2009. 5. 15, 大阪大学コンベンションセンター.
- ③ 林 文子 :  
小児における real-time PCR 法を用いた *Porphyromonas gingivalis* の定量解析, 第47回日本小児歯科学会, 2009. 5. 15, 吹田市, 大阪大学コンベンションセンター.
- ④ 中岡美由紀 :  
小児歯科における歯周病原性細菌検出試薬バナペリオの有用性の評価, 第46回日本小児歯科学会, 2008. 6. 12-13 (大宮ソニックシティホール)
- ⑤ 有木美早 :  
小児1型糖尿病キャンプ参加患児の口腔内状態について—3年間の経年的変化— : 第46回日本小児歯科学会, 2008. 6. 12-13 (大宮ソニックシティホール)
- ⑥ 有木美早 :  
広島小児1型糖尿病キャンプに参加した小児の口腔内状態について, 日本糖尿病学会中国四国地方会第45回総会, 2007. 10. 20, 愛媛県医師会館.
- ⑦ K.Kozai :  
Center of Periodontal Diseases in Children, 2nd Hiroshima Conferene on Education and Science in Dentistry  
2007. 10. 6-7, 広島市国際会議場.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香西 克之 (KOZAI KATSUYUKI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号：10178212

(2) 研究分担者

鈴木 淳司 (SUZUKI JUNJI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
准教授  
研究者番号：90263714

林 文子 (HAYASHI FUMIKO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：50325180

吉村 剛 (YOSHIMURA GO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：50403530

(3) 連携研究者

なし