

学位論文

PCR法を用いた小児における歯周病原性菌の  
検出と分布に関する研究

学位申請者 林 文子

広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻  
顎口腔頸部医科学講座小児歯科学研究室

(主任：香西 克之教授)

2003年度

## 謝辞

本研究に際して、終始ご指導ならびにご鞭撻を賜りました本学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座小児歯科学研究室 香西克之教授に心から感謝の意を表します。また、ご校閲を賜りました本研究科創生医科学専攻探索医科学講座細菌学研究室 菅井基行教授ならびに本研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座歯周病態学研究室 栗原英見教授に深謝致します。さらに、種々有益なご助言を賜りますとともに、直接実験の御指導を頂きました小児歯科学研究室 岡田 貢学内講師に厚く御礼を申し上げます。最後に、研究遂行上惜しみないご協力を頂いた小児歯科学研究室教室員各位に深く感謝致します。

本論文の一部は以下の雑誌に掲載された。

1) Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. (2000) Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol* **27**, 763-768.

2) Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. (2001) PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol* **28**, 576-582.

3) Hayashi F, Okada M, Zhong X, Miura K. (2001) PCR Detection of *Capnocytophaga* Species in Dental Plaque samples from Children Aged 2 to 12 Years. *Microbiol Immunol* **45**, 17-22.

## 目次

緒言	・・・ 1
第1章 歯ブラシによるプラーク採取法（歯ブラシ法）の有効性および妥当性の検討	
第1節 概要	・・・ 3
第2節 被験児および方法	・・・ 4
第1項 被験児	
第2項 ペーパーポイントによる縁下プラークの採取	
第3項 歯ブラシによるプラーク採取	
第4項 標準株の genomic DNA の調製	
第5項 歯ブラシによるプラークサンプルからの genomic DNA の調製	
第6項 Polymerase chain reaction (PCR) primer の設定	
第7項 PCR 法および PCR 産物の検出	
第8項 統計処理	
第3節 結果	・・・ 9
第1項 ペーパーポイント法による検出部位数	
第2項 必要サンプル数の検討	
第4節 考察	・・・ 12

第2章	歯周病原性菌の検出と歯周病との関連性	
第1節	概要	・・・ 15
第2節	被験児および方法	・・・ 17
第1項	被験児	
第2項	臨床的検査	
第3項	被験児の分類	
第4項	プラーク採取	
第5項	標準株の genomic DNA の調製	
第6項	プラークサンプルからの genomic DNA の調製	
第7項	PCR primer の設定	
第8項	PCR 法および PCR 産物の検出	
第9項	統計処理	
第3節	結果	・・・ 22
第1項	年齢別の歯周組織の臨床所見	
第2項	歯周組織の臨床所見別検出率	
第3項	年齢別検出率	
第4節	考察	・・・ 28
	結論	・・・ 38
	参考文献	・・・ 39

## 緒 言

歯周病は、歯の支持組織に特異的な病原性細菌が感染することによって惹起される疾患である。ヒトの歯垢（以下プラーク）を構成する微生物叢は多様で、300種以上の異なる細菌が存在する（Kimura et al. 2002）。歯周病の発症と進行にはグラム陰性菌が深く関与し、それぞれ歯周疾患別に特異的な細菌の関与が示唆されている（Zambon 1996, 奥田 1996）。そのうち、歯周炎には10種から15種の歯周病原性菌と考えられる細菌が関連している（Haffajee & Socransky 1994, van Winkelhoff et al. 1996）。これらには、*Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), non-classified spirochetes, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Streptococcus intermedia*, *Prevotella nigrescens*などが含まれる（Haffajee & Socransky 1994, Darveau et al. 1997）。特に、*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Pr. intermedia* (Moore et al. 1991) および *T. denticola* (Simonson et al. 1992) は進行性の歯周病罹患部位にしばしばみられると報告されている。

小児において、一般的にみられるのが歯肉炎であり、歯周炎は稀である（岩本ら 1986, Watanabe 1990）。しかし、小児が口腔内に歯周病原性菌を保有している場合、これらの細菌が乳歯の脱落部位に残存し、混合歯列期の永久歯の歯肉溝に生存し続ける可能性がある。口腔内に保有している細菌数自体は必ずしも多くないかもしれないが、口腔内の歯周病原性菌を検出することにより、歯周病原性菌のキャリアーもしくは青年期に歯周病が進行するリスクを予測する

ことが可能になると考えられる (Watatabe & Frommel 1993)。しかし、それらの細菌がいつから定着するのかは未だ明らかにされていない。従って、小児において歯周病の発症に関与する歯周病原性菌を検出することは歯周病の発症の初期メカニズムを解明する上で非常に重要である。

本研究ではまず、小児の口腔内からプラークを採取する方法として歯ブラシ法を開発し、その有効性を検討した。次に、歯ブラシ法で小児口腔から採取したプラークから歯周病原性菌の検出を行い、その検出率および歯周病との関連性を検討した。

## 第1章 歯ブラシによるプラーク採取法（歯ブラシ法）の有効性および妥当性の検討

### 第1節 概要

小児における歯周病原性菌の定着を検討するためプラークを採取する必要があるが、その方法として、キュレット法やペーパーポイント法が用いられてきた（Watanabe & Formmel 1993, Ashimoto et al. 1996, Conrads et al. 1996）。しかし、小児歯科臨床において低年齢の小児から歯肉縁下プラークを採取する際にキュレットやペーパーポイントの様な先端が鋭利な器具を用いることは恐怖や不安を惹起することがある。また、これらの器具を用いて多くの部位から歯肉縁下プラークを採取することは時間がかかる。さらに、限られた部位からでは重要な菌を採取し損じる可能性もある。そこで、著者は簡便で容易に縁下プラークを採取する方法として、歯ブラシによるプラーク採取法（歯ブラシ法）の有効性と妥当性を検討することを試みた。

## 第2節 被験児および方法

### 第1項 被験児

広島大学歯学部附属病院小児歯科診療室を受診した乳歯列期の小児 10名（4歳0か月から6歳2か月，男児7名，女児3名）を被験児とした。プラークサンプル採取の際には，保護者に研究の目的を十分に説明し，同意を得た上で行った。

### 第2項 ペーパーポイントによる縁下プラークの採取

縁下プラークの採取は，Christersson ら（1992）の方法に準じて，滅菌ペーパーポイント（#30，（株）ジーシー，東京）1本を各歯の近心頬側歯肉溝に10秒挿入した。Lin ら（1994）の方法に従い，ペーパーポイントは0.5 ml の1×PCR buffer（50 mM KCl，10 mM Tris-HCl（pH 9.0），0.1% Triton X-100，0.01% gelatin），0.05 mg/ml proteinase K，20 mM dithiothreitol および1.8  $\mu$ M sodium dodecyl sulphate（SDS）を含む滅菌エッペンドルフチューブに入れた。その後，細菌壁を溶解するために37°C，2時間インキュベートし，proteinase K を不活性化するために95°C，5分間加熱した。サンプルは genomic DNA を抽出するまで-20°Cで保存した。

### 第3項 歯ブラシによるプラーク採取

ペーパーポイントによるプラーク採取後，全萌出歯から滅菌歯ブラシ（タフト #17 もしくは#20，（株）オーラル ケア，東京）を用いて各被験児の担当医が1分間ブラッシングすることによりプラークを採取した。歯ブラ

シに付着したプラークは、15ml の滅菌水を入れた滅菌遠沈管（BD Biosciences Discovery Labware, Billerica, MA, USA）中で数回懸濁した。サンプルは genomic DNA を抽出するまで-20℃で保存した。

#### 第4項 標準株の genomic DNA の調製

*C. rectus* ATCC33238, *T. forsythensis* (*B. forsythus*) ATCC43037 を対照菌株とし、両菌は 5 µg/ml hemin, 0.3 µg/ml menadione, 1 µg/ml vitamin K, 5% 綿羊脱線維血（株）日本バイオテスト研究所，東京）添加非選択血液寒天培地 Tryptic soy agar（Difco, Detroit, MI, USA）上で、嫌気ボックス（EAN-140, Tabai Spec. Co., 大阪）内、48～72 時間、37℃にて培養（5～10% CO<sub>2</sub>, 5～10% H<sub>2</sub>, 80～90% N<sub>2</sub>）を行った。

コロニーを TE buffer（10 mM Tris-HCl（pH 7.5），1 mM ethylenediaminetetraacetic acid）に懸濁し、1,600×g、20 分間遠心した。上清を捨て、各々の細胞は DNA を抽出するまで-20℃で保存した。

DNA の抽出はミニプレップ法（Wilson 1990）を用いて行った。まず、沈渣を TE buffer で2回洗浄し、その後 567 µl の TE buffer で再懸濁した。30 µl の 10% SDS と 3 µl の 20mg/ml proteinase K を加え、37℃、1 時間インキュベートした。次に、100 µl の 5M NaCl および 80 µl の CTAB/NaCl（10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide / 5 M NaCl）溶液を加え、65℃、10 分間インキュベートした。溶解した細胞は 700 µl の chloroform/isoamyl alcohol（24:1）で抽出した後、同量の phenol/chloroform/isoamyl alcohol（25:24:1）で再抽出した。抽出した DNA を室温で 0.6 倍量の isopropanol

中に沈殿させた。沈殿した DNA を 30  $\mu$ l の TE buffer に懸濁した。RNase を加え (Smith et al. 1989), 37°C, 5 分間インキュベート後, -20°C で保存した。

#### 第5項 歯ブラシによるプラークサンプルからの genomic DNA の調製

プラークサンプルは 1,600 $\times$ g, 20 分間遠心し, 上清を捨て, 細胞は DNA を抽出するまで -20°C で保存した。DNA の抽出は前項と同様の方法で行った。抽出された genomic DNA を -20°C で保存した。

#### 第6項 Polymerase chain reaction (PCR) primer の設定

PCR に際しては, Ashimoto ら (1996) が設計した *C. rectus* および *T. forsythensis* に対する primer を選択した。得られたプラークサンプルが細菌の DNA を含んでいることを確認するため, 細菌の eubacterial 16S ribosomal DNA (rDNA) をターゲットとして Goncharoff ら (1993) が設計した primer を用いた。primer は, 菌種特異的アミノ酸配列である 16S rDNA をターゲットとした。

全ての primer は Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA) 製を使用した (表 1)。

#### 第7項 PCR 法および PCR 産物の検出

表 1 に PCR 増幅条件を示す。

PCR 反応は鋳型として, 100ng の genomic DNA, 1 $\times$ PCR buffer (50 mM KCl,

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM deoxyribonucleotide mixture (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA), 各 primer 100 pmol および 2 unit の Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) を含む 50 μl の reaction mixture により行った。非特異的増幅の防止および初期の変性温度に達するまでの間に伸長反応が生じるのを防ぐために、“hot start”法を用いた。各菌種と eubacterial 16S rDNA の PCR 増幅はそれぞれ Ashimoto ら (1996) および Goncharoff ら (1993) の増幅条件に準じて、サーマルサイクラー (program temp control system PC-700, ASTEC Co. Ltd., 福岡) を用いて行った。増幅後、15 μl の PCR 増幅産物は 1.2%アガロースゲル上で電気泳動を行った。エチジウムブロマイド染色後、紫外線下 (302nm) にて観察し、写真撮影を行った。

図 1 にプラーク採取から DNA 増幅までの流れを示す。

## 第 8 項 統計処理

歯周病原性菌を保有している被験児から、ペーパーポイント法にて菌を検出する際に、少なくとも 1 部位以上で陽性となるために必要なサンプル採取部位数を求めた。以下にその確率を表す式を示す。

$$P=1-(\text{陰性の部位数} / \text{総部位数})^n$$

$P$  は確率を示し、 $n$  は必要な部位数を示す。95%の確率で陽性を得るために必要な部位数は  $P=0.95$  の時の  $n$  となる。

表1 PCR primer および PCR condition

Primer sets (5'-3')	Size* (bp)	Condition of PCR	reference
<i>Campylobacter rectus</i> TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT	598	95°C for 30sec 60°C for 1min 72°C for 1min	Ashimoto et al. 1996
<i>Tannerella forsythensis</i> GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641		
Eubacterial 16S ribosomal DNA CAG GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC ACG C GAC GGG CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	625	95°C for 30sec 55°C for 30sec 72°C for 30sec	Goncharoff et al. 1993

\*PCR増幅によって予想されるフラグメントの大きさ

ペーパーポイント法

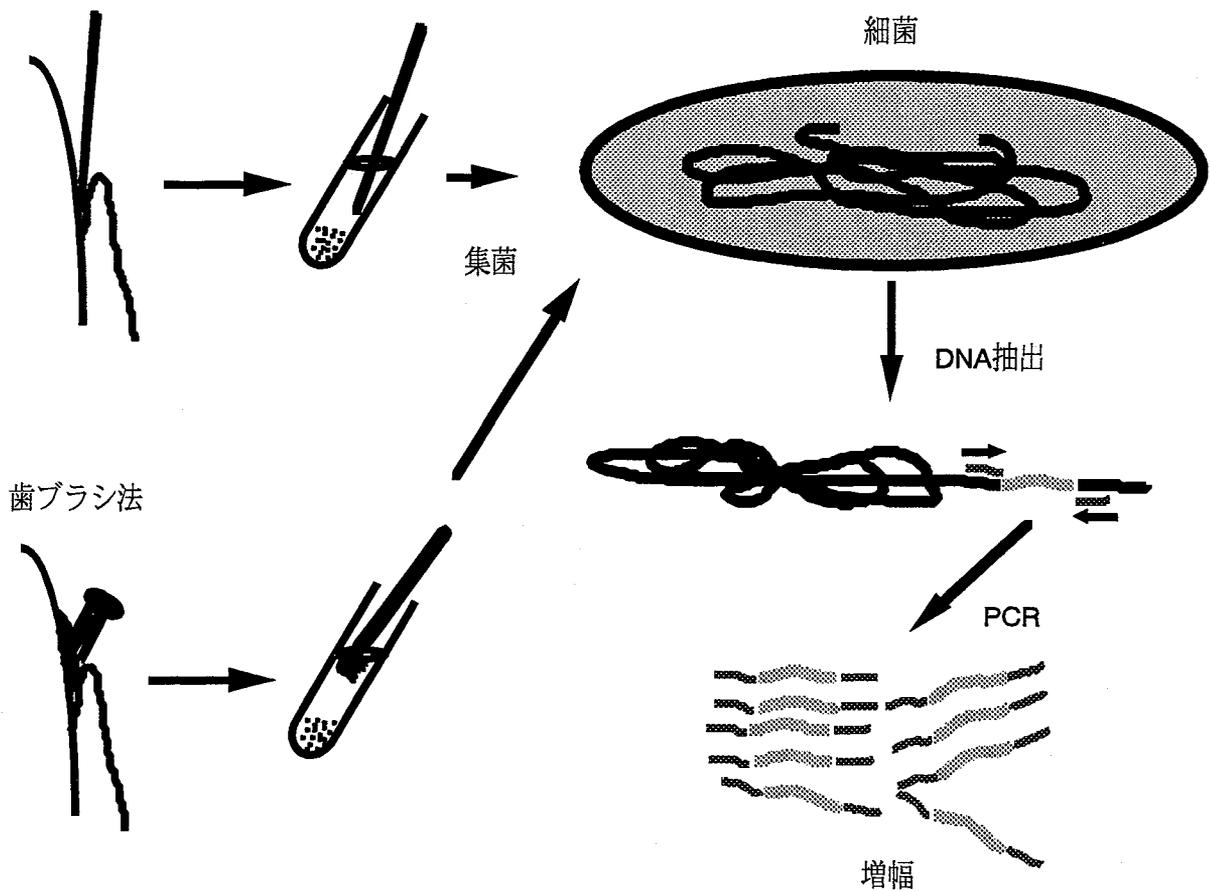


図1 プラーク採取からDNA増幅までの流れ

### 第3節 結果

#### 第1項 ペーパーポイント法による検出部位数

ペーパーポイント法では、10名中9名は20部位全て細菌のDNAを含んでいたが、1名は20部位中18部位で陽性で、2部位は陰性であった。

歯ブラシ法によるプラークサンプルは全て細菌のDNAを含んでいた。

歯ブラシ法によるプラーク採取において、*C. rectus* および *T. forsythensis* は全てのサンプルで検出された（表2）。

一方、ペーパーポイント法では、細菌のDNAが検出されなかった部位を除き、*C. rectus* は20部位中平均  $17.6 \pm 2.4$  (12~20) 部位、*T. forsythensis* は平均  $9.3 \pm 5.0$  (1~19) 部位で検出された（表2）。

#### 第2項 必要サンプル数の検討

歯周病原性菌を保有している被験児からペーパーポイント法にて菌を検出するのに最低限必要なサンプル採取部位数を求めた。

95%の確率で目的とする細菌のDNAを検出するためには、*C. rectus* は  $1.7 \pm 0.8$  部位、*T. forsythensis* は  $6.4 \pm 4.9$  部位からのサンプル採取が必要であった。また、99%の確率で細菌のDNAを検出するためには、*C. rectus* は  $2.3 \pm 1.1$  部位、*T. forsythensis* は  $8.0 \pm 5.1$  部位必要であった（表3）。さらに、歯ブラシ法において目的とする細菌が検出されなかった被験児からはペーパーポイント法においても検出されなかった。

ペーパーポイント法で陽性となった部位は前歯、犬歯および臼歯で *C. rectus* はそれぞれ 91.0%、87.5%および 88.8%であり、*T. forsythensis* はそれ

ぞれ 34.6%, 67.5%および 48.8%であった。

なお、歯肉縁下プラークの採取に要した時間は 1 名当たり歯ブラシ法では平均 1 分であり、ペーパーポイント法では平均 10 分であった。

表2 歯ブラシ法およびペーパーポイント法における細菌の検出数

	Toothbrush sampling		Paper point sampling				
	Number of subjects	Number of positive subjects	Sampling sites per subject	Positive sampling sites			
				Mean	SD	Min	Max
<i>C. rectus</i>	10	10	20	17.6	2.4	12	20
<i>T. forsythensis</i>	10	10	20	9.3	5.0	1	19

SD: standard deviation

表3 ペーパーポイント法における95%または99%の確率で細菌を検出するために必要なサンプル数

	Number of samples at 95 % confidence				Number of samples at 99 % confidence			
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
<i>C. rectus</i>	1.7	0.8	1	3	2.3	1.1	1	5
<i>T. forsythensis</i>	6.4	4.9	1	19	8.0	5.1	2	20

SD: standard deviation

$P=1-(\text{陰性の部位数} / \text{総部位数})^n$  により求めた。(nは必要な部位数)

#### 第4節 考 察

歯肉縁下プラークを採取する際、従来キュレット法やペーパーポイント法が用いられてきた (Watanabe & Formmel 1993, Ashimoto et al. 1996, Conrads et al. 1996)。しかし、用いられるペーパーポイントの数は報告によって様々である。Alaluusua & Asikainen (1988) は *A. actinomycetemcomitans* の検出を試みる際に 1 部位以上のポケットからの採取が必要と述べており、Van der Weijden ら (1994)、Conrads ら (1996) および Meurman ら (1997) は 1 部位から 4 部位のプラークを採取している。また、Christersson ら (1992)、Preus ら (1994)、Nakagawa ら (1996) および Dibart ら (1998) は全萌出歯からサンプルを採取している。さらに、Aass ら (1994) は近心ポケットからサンプルを採取している。

本研究において、ペーパーポイント法では、10 名中 9 名は 20 部位全てにおいて細菌の DNA を認めたが、1 名においては 20 部位中 2 部位で陰性であった。一方、歯ブラシ法では全てのサンプルは細菌の DNA を含んでいた。

ペーパーポイント法を用いて 95%以上の確率で目的とする歯周病原性菌を検出するためには、*C. rectus* は 20 部位中平均 2 部位以上、*T. forsythensis* は 7 部位以上から採取する必要がある。歯ブラシ法では両菌ともに検出することができた。さらに、*T. forsythensis* においては個人差が大きく (20 部位中 1 部位から 19 部位で陽性)、採取するサンプル数によっては偽陰性と判定してしまう可能性がある。Chen ら (1997) は 3 部位からサンプルを採取した場合、4 歳以下の小児から、*T. forsythensis* は検出されなかったと報告している。また、Christersson ら (1992) は成人の歯周病患者から歯周病原性菌を検

出するために6部位以上無作為にサンプルを採取する必要があると述べている。さらに、感染した歯肉縁下部位の割合はそれぞれの細菌で異なり、サンプル部位数は細菌の感染の広がりに基づいて採取すべきであると述べている。

本研究において、4歳から6歳の小児において *C. rectus* が20部位中12部位から20部位検出された。Ashimotoら(1996)は *C. rectus* は歯周病の進行に関与する内因性の細菌と考えられると述べている。一方、Mooreら(1991)は、*C. rectus* は進行性の歯周病部位にしばしば存在すると報告している。本研究の結果では、*C. rectus* は口腔内に広範囲に分布していることが示唆された。一方、*T. forsythensis* は1部位から19部位の範囲で陽性となり、*C. rectus* と比較し、*T. forsythensis* はより多くの部位から歯肉縁下プラークを採取する必要があるといえる。Tannerら(1989)および Gersdorfら(1993)は、*T. forsythensis* は進行性の歯周炎部位から検出されたと報告している。一方、歯肉縁上および健康歯肉部位から検出されたとの報告もある(Gmür & Guggenheim 1994)。Ximénez-Fyvieら(2000a)はチェッカーボード DNA-DNA ハイブリダイゼーション法を用いて、健康な歯肉を有する成人の縁上および縁下プラークから *C. rectus* はそれぞれ17%および10%検出され、*T. forsythensis* はそれぞれ5%および12%検出されたと報告している。歯周病原性菌を正確に検出するために必要なサンプル数を決めるためには、さらなる研究結果から比較検討する必要がある。

歯ブラシ法は、縁上プラークおよび縁下プラークともに採取している。これまで、多くの研究は縁下プラークに焦点を当てたものであった(Haffajee et al. 1994, Zambon 1996)。しかし、最近、縁上プラークが縁下プラークのり

ザーバーとなるとの報告がある (Ximénez-Fyvie et al. 2000a, b)。そのため、小児の口腔内における歯周病原性菌の定着を検討するためには、縁上および縁下プラークともにできるだけ多くの部位から採取する必要がある。

部位別による各菌の検出率について検討したところ、*C. rectus* において陽性となったサンプル部位による差はみられなかった。*T. forsythensis* においては乳前歯および乳臼歯と比較し乳犬歯より多く検出されたが、有意差は認められなかった。

縁下プラークの採取に要した時間は、歯ブラシ法では平均1分であったが、ペーパーポイント法では平均10分を要し、歯ブラシ法はペーパーポイント法と比較して、短時間でプラークを採取することが可能であった。さらに、実際に被験児から歯肉縁下プラークを採取する際、ペーパーポイント法に比べ歯ブラシ法の方が、被験児の協力が得られやすいと推察された。

従って、小児口腔内から歯周病原性菌の定着をスクリーニングする方法として歯ブラシ法は有効かつ簡便であることが示された。

## 第2章 歯周病原性菌の検出と歯周病との関連性

### 第1節 概要

歯周病原性菌といわれる, *A. actinomycetemcomitans* および *P. gingivalis* は, 限局性若年性歯周炎および成人性歯周炎患者の歯周組織に存在していると報告されている (Newman et al. 1982, Christersson et al. 1987, Saglie et al. 1988)。さらに, *Capnocytophaga* 属および *A. actinomycetemcomitans* は, しばしば前思春期性歯周炎の患児から検出されると報告されている (Sweeney et al. 1987, Watanabe 1990, Ram & Bimstein 1994)。一方, Wojcicki ら (1987) は前思春期の小児からは *P. gingivalis* が検出されなかったと報告している。また, *T. forsythensis* や *Pr. nigrescens* は健康な歯肉溝からも検出されており (Lai et al. 1987, Gmür et al. 1989, Gmür & Guggenheim 1994), Dahlén ら (1992) は, アタッチメントロスの認められない下顎第一大臼歯と犬歯の歯肉溝から *C. rectus* が検出されたと報告している。従って, 歯周病原性菌が歯周病罹患部位以外からも検出されており, 小児における歯周病原性菌と歯周病との関連は十分には明らかにされていない。

また, Socransky ら (1979) による細菌の生理学的特徴に基づいた比較および Williams & Hammond (1979) による DNA ホモロジーの研究に基づいて Leadbetter ら (1979) は *Capnocytophaga* 属を *C. ochracea*, *C. sputigena* および *C. gingivalis* の3菌種に分類した。Conrads ら (1996) は, 多くの研究において *C. ochracea*, *C. sputigena* および *C. gingivalis* の区別がなされていないと指摘している。従って, 小児において, *Capnocytophaga* 属のそれぞれの菌種における検出について十分に調査・研究されているとは言えない。

そこで、小児口腔から採取したプラークについて種々の歯周病原性菌の検出を行い、その検出率および歯周病との関連性を検討した。

## 第2節 被験児および方法

### 第1項 被験児

被験児は、広島大学歯学部附属病院小児歯科診療室を受診した小児 122 名で、対象年齢は 2 歳から 12 歳であった。保護者に研究の目的を十分に説明し、同意を得てから研究を開始した。

### 第2項 臨床的検査

歯周組織の臨床所見は、Löe & Silness (1963) の gingival index (GI) を用いた。アタッチメントロスはプローブ (PCP-11, Hu-Friedy Co. Ltd., Chicago, IL, USA) を用いて測定した。X線写真は、X線写真フィルム (Kodak, DF-57, 53, Rochester, NY, USA) を用い二等分法で撮影した。

### 第3項 被験児の分類

細菌の検出率を歯周組織の臨床所見別に検討するため、被験児を以下の 3 つに分類した。GI の評価基準に従い、全ての歯において臨床的に歯肉 (頬側, 舌側, 近心, 遠心の各 4 部位) に炎症およびブラッシング時に出血が認められず、かつ X線写真上で歯槽骨吸収像が認められない者を健康歯肉群、1 歯以上に軽度から中等度の炎症 (GI=1 もしくは 2) が認められるが、X線写真上では歯槽骨吸収像が認められない者を歯肉炎群およびアタッチメントロスを 3mm 以上有する被験歯が少なくとも 1 歯以上認められ X線写真上で歯槽骨吸収像が認められる者を歯周炎群とした。

#### 第4項 プラーク採取

プラーク採取の方法は、第1章に記載した方法と同じ歯ブラシ法を用いた。

#### 第5項 標準株の genomic DNA の調製

*A. actinomycetemcomitans* ATCC29522, *P. gingivalis* ATCC33277, *Pr. intermedia* ATCC25611, *Pr. nigrescens* ATCC33563, *T. forsythensis* ATCC43037, *T. denticola* ATCC33521, *C. rectus* ATCC33238, *C. sputigena* ATCC33612, *C. ochracea* ATCC27872 および *C. gingivalis* ATCC33624 を対照標準株として用いた。

*A. actinomycetemcomitans* は、Brain Heart Infusion 培地 (Difco, Detroit, MI, USA) 上で、5% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 85% NO<sub>2</sub> を含む gas-pak jar system (BBL, Cockeysville, Md, USA) を用いて、37°C、48~72 時間で培養した。

*P. gingivalis*, *Pr. intermedia* および *Pr. nigrescens* は 5 µg/ml の hemin と 1 µg/ml の vitamin K 添加の Todd-Hewitt 培地 (BBL, Cockeysville, Md, USA) で培養した。

*T. forsythensis*, *T. denticola*, *C. rectus*, *C. sputigena*, *C. ochracea* および *C. gingivalis* は 5 µg/ml の hemin, 0.3 µg/ml の menadione, 1 µg/ml の vitamin K, 5% 綿羊脱線維血 ((株) 日本バイオテスト研究所, 東京) 添加非選択血液寒天培地 Tryptic soy agar (Difco, Detroit, MI, USA) 上で培養した。

*A. actinomycetemcomitans* を除く全ての菌株は、嫌気ボックス (EAN-140, Tabai Spec. Co., 大阪) 内で 48~72 時間, 37°C にて培養 (5~10% CO<sub>2</sub>,

5～10% H<sub>2</sub>, 80～90% N<sub>2</sub>) を行った。genomic DNA の抽出は第1章, 第2節, 第4項に準じた。

#### 第6項 プラークサンプルからの genomic DNA の調製

プラークサンプルから genomic DNA を抽出する方法は第1章, 第2節, 第5項に準じて行った。

回収された DNA 量は Sambrook ら (1989) の方法に準じ, 紫外・可視分光光度計 (Ultrospec 2000, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) にて  $A_{260}$  を測定することにより求めた。

#### 第7項 PCR primer の設定

PCR に際して本研究で用いた primer を表4に示す。

全ての primer は Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA) 製を用いた。

#### 第8項 PCR 法および PCR 産物の検出

PCR 反応は, 鋳型とし 50～100 ng の genomic DNA, 1×PCR buffer (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)), 1.0～1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM deoxyribonucleotide mixture (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA), 各 primer 100 pmol および 2 unit の Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) を含む 50 μl の reaction mixture により行った。なお, 反応は “hot start” 法を用いた。PCR 増幅に用いた条件

は *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythensis*, *Pr. intermedia*, *Pr. nigrescens* および *C. rectus* は Ashimoto ら (1996) によって報告されたものを, *C. sputigena*, *C. ochracea* および *C. gingivalis* は Conrads ら (1996) によって報告されたものを, eubacterial 16S rDNA は Goncharoff ら (1993) によって報告されたものを用い, サーマルサイクラー (program temp control system PC-700, (株) アステック, 福岡) で表 4 に表記した条件で増幅した。増幅後, 15  $\mu$ l の PCR 増幅産物は 1.2%アガロースゲル上で電気泳動を行った。エチジウムブロマイド染色後, 紫外線 (302nm) 下にて観察し, 写真撮影を行った。

#### 第9項 統計処理

健康歯肉群, 歯肉炎群および歯周炎群間の検出率の統計学的処理は  $\chi^2$  検定および健康歯肉群に対する Odds ratio を用いた。年齢別による検出率の統計学的処理は直線回帰分析を用いた。

表4 PCR primerおよびPCR condition

Primer sets (5'-3')	Size* (bp)	Condition of PCR	reference
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC ATG CCA ACT TG A CGT TAA AT	557		Ashimoto et al. 1996
<i>Prevotella intermedia</i> TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	575	94°C for 30sec 55°C for 1min 72°C for 2min	Ashimoto et al. 1996
<i>Prevotella nigrescens</i> ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	804		Ashimoto et al. 1996
<i>Porphyromonas gingivalis</i> AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404		Ashimoto et al. 1996
<i>Treponema denticola</i> TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACAT TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316		Ashimoto et al. 1996
<i>Tannerella forsythensis</i> GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641	95°C for 30sec 60°C for 1min 72°C for 1min	Ashimoto et al. 1996
<i>Campylobacter rectus</i> TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT	598		Ashimoto et al. 1996
<i>Capnocytophaga sputigena</i> AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG GAT GCC GCT CCT ATA TAC CAT TAG G	185		Conrads et al. 1996
<i>Capnocytophaga ochracea</i> AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG GAT GCC GTC CCT ATA TAC TAT GGG G	185	94°C for 1min 55°C for 1min 72°C for 2.5min	Conrads et al. 1996
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG GGA CGC ATG CCC ATC TTT CAC CAC CGC	227	94°C for 1min 70°C for 1min 72°C for 2.5min	Conrads et al. 1996
Eubacterial 16S ribosomal DNA CAG GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC ACG C GAC GGG CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	625	95°C for 30sec 55°C for 30sec 72°C for 30sec	Goncharoff et al. 1993

\* PCR増幅によって予想されるフラグメントの大きさ

### 第3節 結果

#### 第1項 年齢別の歯周組織の臨床所見

被験児の歯周組織の臨床所見を年齢別に比較した。年齢別歯周組織の臨床所見分布を図2に示す。健康歯肉群は、年齢の増加とともに減少した。また、歯周炎群はほとんどの年齢で認められた。

#### 第2項 歯周組織の臨床所見別検出率

回収された細菌のDNA量は健康歯肉群、歯肉炎群および歯周炎群でそれぞれ1人平均  $15.6 \pm 11.4 \mu\text{g}$ ,  $20.2 \pm 12.3 \mu\text{g}$  および  $19.3 \pm 12.1 \mu\text{g}$  であった。これはPCRを行うのに十分な量のDNAであった。また、菌種特異的アミノ酸配列である16S rDNAをターゲットとしたprimerを用いたDNA解析により、全てのサンプルは細菌のDNAを含んでいた。

*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Pr. intermedia*, *Pr. nigrescens*, *T. forsythensis*, *T. denticola*, *C. sputigena*, *C. ochracea* および *C. gingivalis* の歯周組織の臨床所見別の検出率を図3に、各菌における健康歯肉群に対するOdds ratio および各群間の $\chi^2$ 検定を表5に示す。

健康歯肉群、歯肉炎群および歯周炎群における検出率はそれぞれ *A. actinomycetemcomitans* は4.0%, 8.2%および16.7%, *P. gingivalis* は4.0%, 8.2%および25.0%, *Pr. intermedia* は0.0%, 5.9%および25.0%であった。これらの菌は健康歯肉群および歯肉炎群よりも歯周炎群から多く検出された。健康歯肉群に対して歯周炎群のOdds ratioは *A. actinomycetemcomitans* では4.80であり、*P. gingivalis* では8.00であった。*Pr. intermedia* は、健

健康歯肉群に対して歯周炎群の Odds ratio は 5 倍より高く、 $\chi^2$  検定において 5%の危険率で有意差を認めた。健康歯肉群、歯肉炎群および歯周炎群でそれぞれ *T. denticola* は 0.0%、17.6%および 16.7%の検出率であった。*T. denticola* は健康歯肉群に対して歯肉炎群および歯周炎群の Odds ratio は 5 倍より高かった。また、これらの菌においていずれの対象群においても 25%以下の検出率であった。さらに、*Pr. intermedia* および *T. denticola* は健康歯肉群では全く検出されなかった。

健康歯肉群、歯肉炎群および歯周炎群における検出率はそれぞれ *Pr. nigrescens* は 48.0%、80.0%および 50.0%、また、*T. forsythensis* は 36.0%、63.5%および 58.3%であった。*Pr. nigrescens* は健康歯肉群および歯周炎群と比較し、歯肉炎群で有意に多く検出され ( $P<0.01$ )、Odds ratio は 4.67 であった。同様に *T. forsythensis* も、歯肉炎群で有意に多く検出され ( $P<0.05$ )、Odds ratio は 3.10 であった。

*Capnocytophaga* 属の検出率は、健康歯肉群、歯肉炎群および歯周炎群でそれぞれ *C. sputigena* は 48.0%、36.5%および 25.0%、*C. ochracea* は 100%、89.4%および 50.0%、*C. gingivalis* は 96.0%、84.7%および 75.0%であった。また、*Capnocytophaga* 属全体では歯肉炎群および歯周炎群と比較して健康歯肉群に多く検出され、特に *C. ochracea* の健康歯肉群における検出率は 100%で、0.1%の危険率で有意差を認めた。*C. ochracea* は歯周炎群の Odds ratio は 0.04 未満、また、*C. gingivalis* は、歯周炎群の Odds ratio は 0.13 で、健康歯肉群に高い割合で検出された。図には示していないが、*C. rectus* は健康歯肉群、歯肉炎群および歯周炎群すべての被験児より検出された。

### 第3項 年齢別検出率

図4に各菌の年齢別検出率を示す。*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Pr. intermedia* および *T. denticola* はいずれの年齢においても低い検出率であった。*C. ochracea* および *C. gingivalis* は、いずれの年齢においても高い割合で検出された。*C. sputigena* は年齢によって検出率に差があるものの、中程度の割合で検出された。また、*Pr. nigrescens* および *T. forsythensis* は、年齢の増加とともに検出率が増加し、年齢依存的であった。その回帰直線係数は、それぞれ 7.72 ( $P<0.001$ ) および 7.20 ( $P<0.001$ ) であった。さらに、*C. rectus* は全ての対象年齢で 100%検出された。

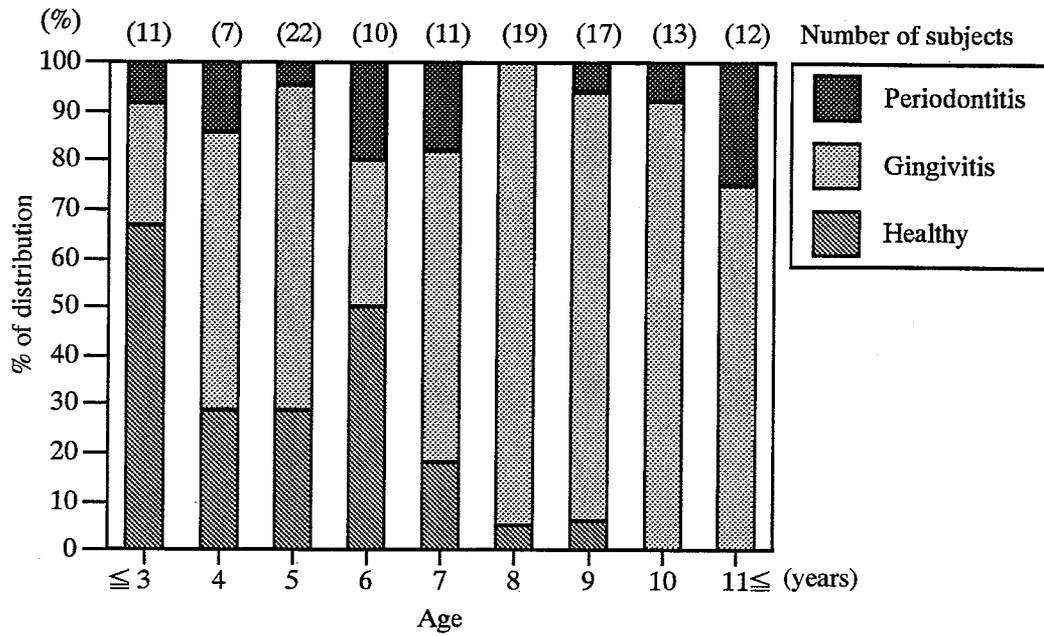


図2 年齢別による健康歯肉群，歯肉炎群および歯周炎群の分布

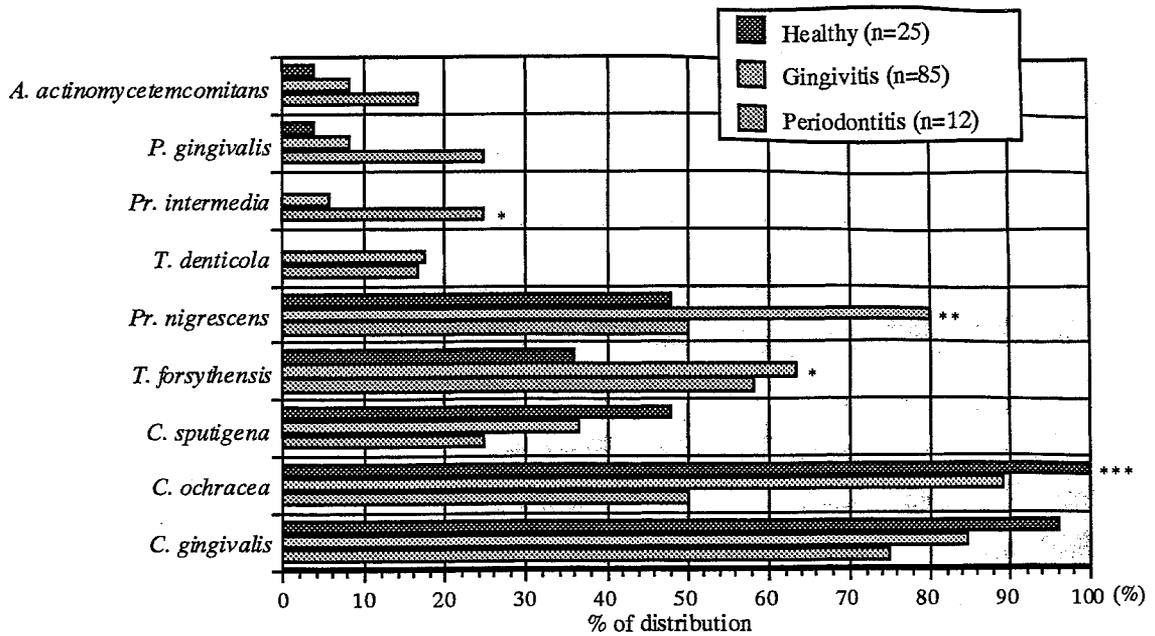


図3 健康歯肉群，歯肉炎群および歯周炎群における検出率  
( $\chi^2$ 検定, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ )

表5 歯周状態間のOdds ratioおよび $\chi^2$ 検定

	Odds ratio			$\chi^2$
	healthy	gingivitis	periodontitis	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1	2.15	4.80	1.73
<i>P. gingivalis</i>	1	2.15	8.00	4.57
<i>Pr. intermedia</i>	—	1.56<	5.00<	8.48*
<i>T. denticola</i>	—	5.36<	5.00<	5.10
<i>Pr. nigrescens</i>	1	4.67	1.08	13.35**
<i>T. forsythensis</i>	1	3.10	2.49	6.00*
<i>C. sputigena</i>	1	0.62	0.36	2.01
<i>C. ochracea</i>	—	<0.34	<0.04	19.56***
<i>C. gingivalis</i>	1	0.21	0.13	3.50
<i>C. rectus</i>	NA	NA	NA	NA

Odds ratioは健康歯肉群を基準とした。

NA: not available, statistical significance, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$

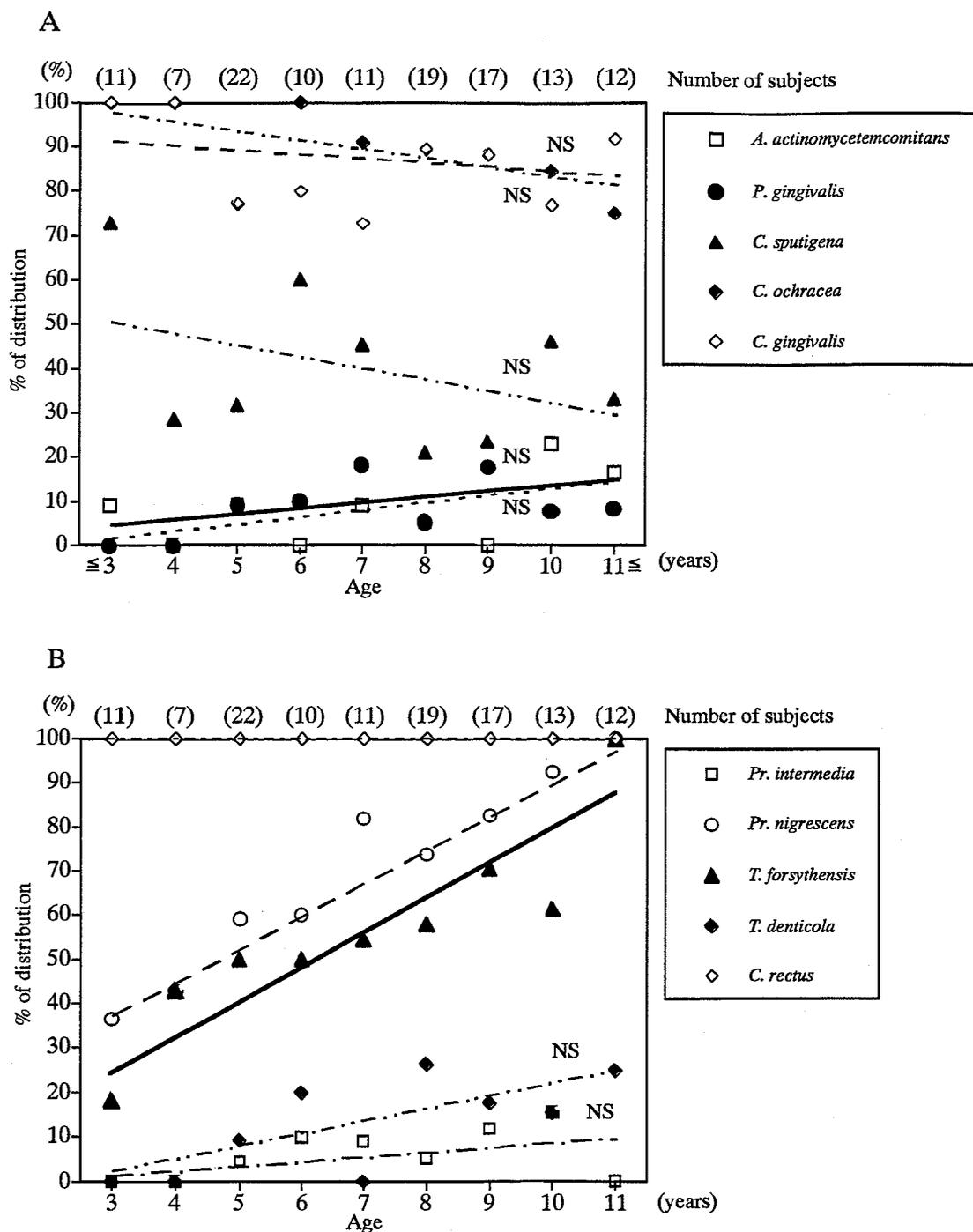


図4 年齢別検出率

A. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. ochracea*および

*C. gingivalis*の検出率

NS: not significant

B. *Pr. intermedia*, *Pr. nigrescens*, *T. forsythensis*, *T. denticola*および*C. rectus*の検出率

*Pr. nigrescens* :  $Y = 7.72 \times X + 15.8$  ( $P < 0.001$ )

*T. forsythensis* :  $Y = 7.20 \times X + 5.77$  ( $P < 0.001$ )

NS: not significant

#### 第4節 考 察

本章では、歯周病原性菌とされる細菌 10 種の検出を行い、それぞれの細菌における歯周組織の臨床所見別および年齢別の検出率の比較を行った。

##### 1. *A. actinomycetemcomitans*

*A. actinomycetemcomitans* は、しばしば前思春期性歯周炎の患児から検出されると報告されている (Sweeney et al. 1987, Watanabe 1990, Ram et al. 1994)。また、垂直性骨吸収を引き起こすことも報告されており (Van der Weijden et al. 1994)、歯周病との関連が強い菌の一つとして挙げられている。

これまでに、Ashimoto ら (1996) は、PCR 法によって歯肉炎を有する小児の 14%から *A. actinomycetemcomitans* を検出しており、Delaney & Kornman (1987) は、培養法において前思春期性歯周炎の小児の 9 名中 5 名から *A. actinomycetemcomitans* が検出されたと報告している。本研究において、*A. actinomycetemcomitans* が歯肉炎群では 85 名中 7 名 (8.2%) から検出され、歯周炎群では 12 名中 2 名 (16.7%) から検出された。これまでの報告と比較して、本研究の検出率は低いものであったが、*A. actinomycetemcomitans* において健康歯肉群に対して歯周炎群の Odds ratio は 4.80 であり、*A. actinomycetemcomitans* は歯周炎と強く関連していることが示された。また、培養法を用いて、乳歯列を有する 5 歳から 7 歳の小児では、55 名中 7 名 (13%) から *A. actinomycetemcomitans* が検出され (Alaluusua & Asikainen 1988, Frisken et al. 1987)、2 歳 5 か月未満の小児からは *A. actinomycetemcomitans* が検出されていない (Frisken et al. 1990)。結果には示していないが、本研究において

*A. actinomycetemcomitans* が検出された最少年齢は3歳5か月であった。一方、Conradsら(1996)は3歳から10歳の小児においてPCR法を用いた研究で、1名当たり4部位から採取した場合、健康歯肉から*A. actinomycetemcomitans* は検出されなかったと報告している。本研究の結果およびこれまでの報告より、健康歯肉を有する小児から*A. actinomycetemcomitans* は稀にしか検出されないことが明らかとなった。

## 2. *P. gingivalis*

*P. gingivalis* は健康歯肉および歯肉炎部位からの検出頻度は低いが、歯周炎部位での菌数は増加すると報告されており(Haffajee et al. 1994)、歯周病との関連が強い菌の一つとして挙げられている。Ashimotoら(1996)はPCR法によって2歳から11歳の歯肉炎に罹患した小児から*P. gingivalis* が14%検出されたと報告している。Sweeneyら(1987)は培養法を用いて、5歳10か月から10歳9か月の小児のうちX線写真にて骨の喪失の認められる歯周炎の小児9名中2名から*P. gingivalis* が検出されたと報告している。また、Mishkinら(1986)は7歳の前思春期性歯周炎に罹患した小児の歯周炎部位から*P. gingivalis* が23%認められたと報告している。本研究において、歯肉炎群では*P. gingivalis* が85名中7名(8.2%)から検出された。また、歯周炎群では*P. gingivalis* は12名中3名(25.0%)から検出されており、本研究の結果はこれまでの報告と類似していた。さらに、本研究において歯周炎群における*P. gingivalis* のOdds ratioは8.00であり、歯周炎と強く関連していることが示された。一方、Conradsら(1996)は、PCR法により3歳から10歳の健康歯肉を有する小児からは*P. gingivalis* は検出されなかったと報告している。

また、培養法にて、前思春期に健康歯肉を有する小児のプラークから *P. gingivalis* は稀にしか検出されないと報告されている (Wojcicki et al. 1987, Frisken et al. 1987)。同様に Petit ら (1994) は、培養法では *P. gingivalis* が乳歯列期の健康歯肉から 49 名中 1 名のみ検出されたと報告している。本研究においても *P. gingivalis* は乳歯列期の健康歯肉群では検出されず、混合歯列期の健康歯肉群では 9 歳 11 か月の小児から 1 名のみ検出された。本研究の結果およびこれまでの報告より *A. actinomycetemcomitans* 同様 *P. gingivalis* も健康歯肉を有する小児から稀にしか検出されることが示された。

最近、*P. gingivalis* の *fimA* の type が歯周病原性に関与するということが報告されている。Amano ら (2000a) は、*P. gingivalis fimA* について type I および type V は健康歯肉の成人に多く認められるが、type II および type IV は歯周炎で主に認められたと報告している。このことより、*fimA* genotype は *P. gingivalis* の病原性と関連した因子である可能性が考えられ、健康歯肉で検出される *P. gingivalis* は、病原性が低い可能性が考えられる。

### 3. *Pr. intermedia* および *Pr. nigrescens*

これまでの培養法を用いた研究で、Delaney & Kornman (1987) は、*Pr. intermedia* は 3 歳 3 か月から 11 歳 11 か月の小児 9 名中 6 名から検出されたと報告している。また、Frisken ら (1990) は培養法を用いて生後 1 か月の小児から *Pr. intermedia* を検出しており、小児から高頻度に検出される菌であると報告している。これに対し、Ashimoto ら (1996) は PCR 法によって 2 歳から 11 歳の歯肉炎の小児から *Pr. intermedia* を 18% 検出しており、Chen ら (1997) は PCR 法を用いて 2 歳から 10 歳の小児から *Pr. intermedia* が 18%

検出されたと報告している。本研究も同様の傾向を示した。さらに、Conradsら（1996）は3歳から10歳の小児においてPCR法を用いた場合、健康歯肉からは*Pr. intermedia*は検出されなかったと報告している。本研究においても、乳歯列の健康歯肉群および歯肉炎群において*Pr. intermedia*は検出されなかった。さらに、本菌は混合歯列期の健康歯肉群からも検出されなかった。一方、歯周炎群において12名中3名（25.0%）から*Pr. intermedia*が検出され、健康歯肉群に対し5%の危険率で有意に高かった。また、Odds ratioは5倍より大きかった。このことより、*Pr. intermedia*は歯周炎と強く関連していることが示唆された。

Shah & Gharbia（1992）の報告では、*Pr. intermedia*はDNAのhomologyによる研究によって*Pr. intermedia*および*Pr. nigrescens*に区別されるようになった。近年では、Mättöら（1996）が、健康歯肉を有する成人および初期の歯周病患者からは*Pr. nigrescens*のみを検出し、進行した歯周炎患者からは*Pr. intermedia*および*Pr. nigrescens*の両菌を検出したと報告している。*Pr. intermedia*が小児から高頻度に検出されたという報告は、健康歯肉から高頻度に検出される*Pr. nigrescens*が*Pr. intermedia*として同定されたために生じたと推察される。

本研究において、歯肉炎群では85名中68名（80.0%）から*Pr. nigrescens*が検出され、1%の危険率で有意差を認めた。これは、*Pr. nigrescens*が歯肉炎と関連していることを示唆している。Ashimotoら（1996）はPCR法を用いて2歳から11歳の歯肉炎の小児から*Pr. nigrescens*が22%検出されたと報告している。この報告と比較して本研究の結果は高い検出率であった。一方、

Conrads ら (1996) は PCR 法を用いて健康歯肉を有する幼児および学童から *Pr. nigrescens* がそれぞれ 29% および 75% 検出されたと報告している。また, Chen ら (1997) は PCR 法によって 2 歳から 10 歳の小児から *Pr. nigrescens* は 41% 検出されたと報告していた。本研究の結果において *Pr. nigrescens* は健康歯肉群で 25 名中 12 名 (48.0%) 検出されており, これまでの報告と類似していた。*Pr. nigrescens* が検出された最少年齢は 2 歳 1 か月であり, その後, *Pr. nigrescens* の検出率は年齢の増加とともに増加した (回帰直線係数 7.72,  $P < 0.001$ )。これは, 増齢とともに細菌に接触する機会が増加するためと考えられる。このことより, *Pr. nigrescens* の検出率は年齢依存的であることが示唆された。

#### 4. *T. denticola*

Chen ら (1997) は PCR 法を用いて, 2 歳から 11 歳の小児から *T. denticola* が 27% 検出されたと報告している。Ashimoto ら (1996) は PCR 法によって 2 歳から 11 歳の歯肉炎の小児から *T. denticola* が 16% 検出されたと報告している。本研究において, *T. denticola* は, 歯肉炎群において 85 名中 15 名 (17.6%) および歯周炎群において 12 名中 2 名 (16.7%) から検出されており, これまでに報告されている検出率と類似していた。さらに Odds ratio は 5 倍より大きく, 歯周炎群と強く関連していることが明らかとなった。Kimura ら (2002) は, 2 歳から 13 歳の健康歯肉を有する小児からは *T. denticola* が検出されなかったと報告しているが, 興味深いことに, *T. denticola* も *Pr. intermedia* と同様に乳歯列期および混合歯列期の健康歯肉群からは検出されなかった。このことより, *T. denticola* が健康歯肉を有する小児からは稀にしか検出されな

いことが明らかとなった。

#### 5. *T. forsythensis*

*T. forsythensis* は 122 名中 70 名 (57.4%) から検出された。Chen ら (1997) はプラーク採取にペーパーポイント法を用い、PCR 法によって 2 歳から 10 歳の小児において *T. forsythensis* が 27% 検出されたと報告している。また、プラーク採取を 1 名につき 3 部位から行った場合、*T. forsythensis* は 4 歳未満においては検出されなかったと報告している。一方、Ashimoto ら (1996) はプラークをペーパーポイントにて 4 部位から採取し、PCR 法を用いて、2 歳から 11 歳の歯肉炎の小児から *T. forsythensis* が 8% 検出されたと報告している。本研究では歯肉炎群において *T. forsythensis* は 85 名中 54 名 (63.5%) から検出されており、健康歯肉群に対し 5% 危険率で有意に高かった。これは、*T. forsythensis* が歯肉炎と強く関連していることを示している。これまでの報告と比較して本研究の結果は高い検出率であったが、これは用いたサンプル採取法、あるいは研究対象および人種の相違が考えられる。

Chen ら (1997) は *T. forsythensis* の検出率は年齢依存的であったと報告しており、これは増齢とともに細菌に接触する機会が増加するためと考えられる。本研究においても、*T. forsythensis* の検出率は *Pr. nigrescens* と同様に年齢の増加とともに増加しており (回帰直線係数 7.20,  $P < 0.001$ ), *T. forsythensis* の検出率は年齢依存的であることが明らかとなった。

#### 6. *C. rectus*

*C. rectus* は健康部位と比較し罹患部に多く存在すると報告されている (Lippke et al. 1991, Lai et al. 1992)。しかし、本研究において *C. rectus* は全

ての被験児から検出された。結果には示していないが、健康歯肉群において *C. rectus* が検出された最少年齢は2歳1か月であった。これまでの研究で、*C. rectus* は2歳から11歳の小児において Ashimoto ら (1996) は78%および Chen ら (1997) は92%検出されたと報告している。本研究においても、*C. rectus* は他の対象菌種と比較して小児の口腔から高頻度に検出された。また、培養法において *C. rectus* は68.6%の成人から検出された (Papapanou et al. 1997) と報告されている。本研究の結果およびこれまでの報告における健康歯肉を有する小児からの検出率は高く、本菌が口腔常在細菌である可能性を示唆している。Ashimoto ら (1996) は、*C. rectus* は歯周病の進行に関与する内因性の細菌である可能性があるとして述べている。本研究において全ての被験児の口腔内に *C. rectus* が存在するということから内因性の常在細菌である可能性が示唆された。

#### 7. *C. sputigena*, *C. ochracea* および *C. gingivalis*

小児からの歯肉縁下プラークや浸出液中の細菌を研究しているものの多く (Delaney & Kornman 1987, Frisken et al. 1987, Frisken et al. 1990, Sweeney et al. 1987) は培養法を用いたものであるため、*Capnocytophaga* 属の菌種の特定は困難であった。しかし、PCR法を用いることにより、*Capnocytophaga* 属を3菌種に分類することが可能となった。

Amano ら (2000b) は、PCR法によって *C. sputigena* および *C. ochracea* は2歳から10歳の小児から約50%検出されたと報告している。それに対し、Conrads ら (1996) は、3歳から10歳の小児において4部位から採取した場合、PCR法を用いて健康歯肉からは *C. sputigena* および *C. gingivalis* とともに

検出されなかったと報告している。また、*C. ochracea* は3歳から5歳において6%検出され、9歳から10歳において42%検出されたと報告している。本研究においては、*C. sputigena*、*C. ochracea* および *C. gingivalis* はそれぞれ46名(37.7%)、107名(87.7%) および105名(86.1%) から検出されており、これまでの報告と比較して高い検出率であった。Friskenら(1990)は、培養法を用いて小児の口腔内の異なる部位における *Capnocytophaga* 属の検出頻度を比較している。プラーク、舌、唾液および扁桃からの細菌サンプルからそれぞれ67.2%、26.9%、35.8%および56.0%検出されたと報告している。このことから *Capnocytophaga* 属は舌、唾液サンプルと比較してプラークに多く存在したと考えられる。ペーパーポイント法を用いたこれまでの報告と異なり、本研究においては、歯ブラシ法を用いることで、より多くのプラークを採取することができたために *Capnocytophaga* 属の検出率が高かったと考えられる。

Kimuraら(2002)は2歳の小児からPCR法を用いて *C. sputigena* および *C. ochracea* が検出されたと報告している。また、培養法であるため菌種の特定は出来ていないが、Friskenら(1990)は6か月未満の小児から検出されたと報告している。検出された最少年齢は、*C. sputigena* は2歳2か月、*C. ochracea* および *C. gingivalis* はともに2歳1か月であった。さらに、本研究では調査した全ての菌種は、全ての年齢群で検出され、小児の口腔に低年齢から定着する可能性が示唆された。

歯周状態別では、歯周炎群における *Capnocytophaga* 属の検出率は健康歯肉群および歯肉炎群と比較して低かった。特に、*C. ochracea* において健康歯

肉群の検出率は歯周炎群と比較し 0.1%の危険率で有意に高かった。これは、*C. ochracea* は歯周炎との関連が低いことを示している。Delaney & Kornman (1987) は、培養法を用いて限局性前思春期性歯周炎の患者から *C. sputigena* および *Capnocytophaga* 属はそれぞれ 44.4%および 55.6%検出されたと報告している。一方、Sweeney ら (1987) は *Capnocytophaga* 属が前思春期性歯周炎の患者では 88.9%および健康な歯周組織からも 74.3%検出されたと報告している。さらに、Mombelli ら (1995) は *Capnocytophaga* 属は成人性歯周炎の患者で歯周治療後に高頻度に検出されたと報告している。これらの報告と本研究の結果はともに *Capnocytophaga* 属、特に *C. ochracea* および *C. gingivalis* は 2 歳から 12 歳の小児の口腔から高い割合で検出され、歯周病とは関連していない可能性が示された。

## 8. 混合感染

歯肉縁下には多様な菌種が生息していることからいわゆる混合感染が生じている可能性が考えられる (Socransky & Haffajee 2003)。成人において、ある種の組み合わせは歯周病において重要であることが示唆されており、チェッカーボード DNA - DNA ハイブリダイゼーション法を用いて *P. gingivalis*, *T. forsythensis* および *T. denticola* の組み合わせが成人の歯周炎部位から高頻度に検出されたと報告している (Haffajee et al. 1998, Socransky et al. 1998, Ximénez-Fyvie et al. 2000a)。小児期において歯周病原性菌の混合感染がどのように歯周病に関連しているかは不明である。

本研究において、歯周病に強く関連していた細菌は *A.*

*actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *Pr. intermedia* および *T. denticola* であった。また、*T. forsythensis* および *Pr. nigrescens* は歯肉炎と関連しており、検出率は年齢依存的であった。一方、*C. rectus* および *Capnocytophaga* 属は、歯周病とは関連していない可能性が示唆された。特に、*C. rectus* は口腔内に早期に定着し、内因性の常在細菌である可能性が示唆された。

本研究より得られた知見は、小児の歯周病の発症メカニズムを解明する基礎資料となると考えられる。

## 結 論

1. 小児口腔内からプラークを採取する方法として歯ブラシ法の方がペーパーポイント法よりも有効であり，妥当性が認められた。
2. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Pr. intermedia* および *T. denticola* は，歯周病に強く関連していることが明らかとなった。
3. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Pr. intermedia* および *T. denticola* は，健康歯肉からは稀にしか検出されないことが明らかとなった。
4. *T. forsythensis* および *Pr. nigrescens* の検出率は，年齢の増加とともに増加することが明らかとなった。
5. *C. rectus* は，口腔内に早期に定着し，内因性の常在細菌である可能性が示唆された。
6. *C. sputigena*, *C. ochracea* および *C. gingivalis* は，歯周病とは関連していない可能性が示唆された。
7. *C. sputigena* は中程度の割合で検出され，*C. ochracea* および *C. gingivalis* は，歯周状態および年齢に関わらず高い割合で検出され，低年齢より口腔内に定着することが明らかとなった。

## 参考文献

- Aass AM, Preus HR, Zambon JJ, Gjermo P (1994) Microbiologic tests in epidemiologic studies: are they reproducible? *Scand J Dent Res* **102**, 355-360.
- Alaluusua S, Asikainen S (1988) Detection and distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the primary dentition. *J Periodontol* **59**, 504-507.
- Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S (2000a) Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and periodontal health status. *J Dent Res* **79**, 1664-1668.
- Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, Morisaki I (2000b) Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol* **71**, 249-255.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J (1996) Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* **11**, 266-273.
- Chen C, Ashimoto A, Sangsurasak S, Flynn MJ, Slots J (1997) Oral food consumption and subgingival microorganisms: subgingival microbiota of

gastrostomy tube-fed children and healthy controls. *J Periodontol* **68**, 1163-1168.

Christersson LA, Albini B, Zambon JJ, Wikesjo UM, Genco RJ (1987) Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol* **58**, 529-539.

Christersson LA, Fransson CL, Dunford RG, Zambon JJ (1992) Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. *J Periodontol* **63**, 418-425.

Conrads G, Mutters R, Fischer J, Brauner A, Lütticken R, Lampert F (1996) PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. *J Periodontol* **67**, 994-1003.

Dahlén G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O (1992) Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol* **19**, 35-42.

Darveau RP, Tanner A, Page RC (1997) The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* **14**, 12-32.

Delaney JE, Kornman KS (1987) Microbiology of subgingival plaque from children with localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **2**, 71-76.

Dibart S, Chapple IL, Skobe Z, Shusterman S, Nedleman HL (1998) Microbiological findings in prepubertal periodontitis. A case report. *J Periodontol* **69**, 1172-1175.

Friskén KW, Tagg JR, Laws AJ, Orr MB (1987) Suspected periodontopathic microorganisms and their oral habitats in young children. *Oral Microbiol Immunol* **2**, 60-64.

Friskén KW, Higgins T, Palmer JM (1990) The incidence of periodontopathic microorganisms in young children. *Oral Microbiol Immunol* **5**, 43-45.

Gersdorf H, Meissner A, Pelz K, Krekeler G, Gobel UB (1993) Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque from patients with advanced periodontitis. *J Clin Microbiol*, **31**, 941-946.

Gmür R, Strub JR, Guggenheim B (1989) Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodontal Res* **24**, 113-120.

Gmür R, Guggenheim B (1994) Interdental supragingival plaque - A natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J Dent Res* **73**, 1421-1428.

Goncharoff P, Figurski DH, Stevens RH, Fine DH (1993) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of *lktA*-specific sequences. *Oral Microbiol Immunol* **8**, 105-110

Haffajee AD, Socransky SS (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**, 78-111.

Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS (1998) Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* **25**, 346-53.

岩本義史, 岩崎妃佐子, 森下真行, 河村 誠, 土田和範, 宮城昌治, 青山 旬  
(1986) 学校における歯周保健に関する研究—中学生の歯周疾患実態調査—, *口衛誌* **36**, 96-102.

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

Lai CH, Listgarten MA, Shirakawa M, Slots J (1987) *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **2**, 152-157.

Lai CH, Oshima K, Slots J, Listgarten MA (1992) *Wolinella recta* in adult gingivitis and periodontitis. *J Periodontal Res* **27**, 8-14.

Leadbetter ER, Holt SC, Socransky SS (1979) *Capnocytophaga*: new genus of gram-negative gliding bacteria. I. General characteristics, taxonomic considerations and significance. *Arch Microbiol* **122**, 9-16.

Lin CY, Wong MY, Jeng JH, Chang WK, Kuo MY (1994) Rapid and specific detection of the leukotoxin sequences of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets by the polymerase chain reaction. *J Formos Med Assoc* **93**, 289-293.

Lippke JA, Peros WJ, Keville MW, Savitt ED, French CK (1991) DNA probe detection of *Eikenella corrodens*, *Wolinella recta* and *Fusobacterium nucleatum* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* **6**, 81-87.

Löe, H & Silness, J (1963) Periodontal diseases in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odont Scand* **21**, 533-551.

Mättö J, Saarela M, von Troil-Lindén B, Könönen E, Jousimies-Somer H, Torkko H, Alaluusua S, Asikainen S (1996) Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* **11**, 96-102.

Meurman JH, Wahlfors J, Korhonen A, Alakuijala P, Väisänen P, Torkko H, Jänne J (1997) Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival dental plaque with the aid of a rapid PCR method. *J Dent Res* **76**, 1376-1380.

Mishkin DJ, Grant NC, Bergeron RA, Young WL (1986) Prepubertal periodontitis: a recently defined clinical entity. *Pediatr Dent* **8**, 235-238.

Mombelli A, Nyman S, Brägger U, Wennström J, Lang NP (1995) Clinical and microbiological changes associated with an altered subgingival environment induced by periodontal pocket reduction. *J Clin Periodontol* **22**, 780-787.

Moore WE, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA (1991) The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol* **18**, 729-739.

Nakagawa M, Kurihara H, Nishimura F, Isoshima O, Arai H, Sawada K, Nagai A, Murayama Y (1996) Immunological, genetic, and microbiological study of family

members manifesting early-onset periodontitis. *J Periodontol* **67**, 254-263.

Newman MG, Saglie R, Carranza FA (1982) Pocket epithelium - associated plaque in human periodontal disease. *J Dent Res* **61**, 290.

奥田克爾 (1996) 口腔の感染症とアレルギー, 一世出版, 東京, p 264-275.

Papapanou PN, Madianos PN, Dahlén G, Sandros J (1997) "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur J Oral Sci* **105**, 389-396.

Petit MD, van Steenberghe TJ, Timmerman MF, de Graaff J, van der Velden U (1994) Prevalence of periodontitis and suspected periodontal pathogens in families of adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **21**, 76-85.

Preus HR, Zambon JJ, Dunford RG, Genco RJ (1994) The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. *J Periodontol* **65**, 2-7.

Ram D, Bimstein E (1994) Subgingival bacteria in a case of prepubertal periodontitis, before and one year after extractions of the affected primary teeth. *J Clin Pediatr Dent* **19**, 45-47.

Saglie FR, Marfany A, Camargo P (1988) Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. *J Periodontol* **59**, 259-265.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Shah HN, Gharbia SE (1992) Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 542-546.

Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE (1992) *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J Periodontol* **63**, 270-273.

Smith GL, Socransky SS, Smith CM (1989) Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* **4**, 47-51.

Socransky SS, Holt SC, Leadbetter ER, Tanner AC, Savitt E, Hammond BF (1979) *Capnocytophaga*: new genus of gram-negative gliding bacteria. III. Physiological characterization. *Arch Microbiol* **122**, 29-33.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* **25**, 134-44.

Socransky SS, Haffajee AD (2003) Microbiology of Periodontal Disease. Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 4th edition. Lindhe J, Karring T, Lang NP, Blackwell Munksgaard, Denmark, p.122.

Sweeney EA, Alcoforado GA, Nyman S, Slots J (1987) Prevalence and microbiology of localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **2**, 65-70.

Tanner A, Bouldin HD, Maiden MF (1989) Newly delineated periodontal pathogens with special reference to selenomonas species. *Infection* **17**, 182-187.

Van der Weijden GA, Timmerman MF, Reijerse E, Wolffe GN, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U (1994) The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol* **21**, 583-588.

van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J (1996) Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000* **10**, 45-78.

Watanabe K (1990) Prepubertal periodontitis: a review of diagnostic criteria,

- pathogenesis, and differential diagnosis. *J Periodontal Res* **25**, 31-48.
- Watanabe K, Frommel TO (1993) Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. *J Dent Res* **72**, 1040-1044.
- Williams BL, Hammond BF (1979) *Capnocytophaga*: new genus of gram-negative gliding bacteria. IV. DNA base composition and sequence homology. *Arch Microbiol* **122**, 35-39.
- Wilson, K (1990) Preparation of genomic DNA from bacteria. In: *Current protocols in molecular biology*, eds. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J A, Struhl K, p.2.4.1-2.4.2. Philadelphia: Wiley Interscience.
- Wojcicki CJ, Harper DS, Robinson PJ (1987) Differences in periodontal disease-associated microorganisms of subgingival plaque in prepubertal, pubertal and postpubertal children. *J Periodontol* **58**, 219-223.
- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000a) Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* **27**, 648-57.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000b) Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* **27**, 722-32.

Zambon JJ (1996) Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol.* **1**, 879-925.