

小児プラークへの歯周病原性細菌の定着

木村 美澄

岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座小児歯科学分野

(主任：田中 光郎 教授)

(受付：2013年12月17日)

(受理：2013年12月28日)

'Red complex species' [*Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) および *Tannerella forsythensis* (Tf)], *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) はそれぞれ慢性歯周炎, 侵襲性歯周炎の原因菌として挙げられているが, 歯周疾患に罹患していない小児プラークからも検出されることが明らかにされている. 本研究では, 歯周病原性細菌の小児への感染とミュータンスレンサ球菌 (MS) の感染との関連性, また, 歯周病原性細菌の母子感染の可能性を検討する目的で, 327 名の小児プラーク中の 'red complex species', Aa および MS の感染, および母親のプラークへの感染との関連性について検討した. インフォームドコンセントの得られた小児とその母親よりプラークを採取, DNA の精製を行った. 菌種の同定は菌種特異的 PCR により行った. その結果, 小児のプラークへの MS の感染は dmf/DMF 歯率と正の相関を示した. 歯周病原性細菌では, Aa が母子両群とも最も高い検出率を示し, 次に Tf の検出率が高かった. これらの検出率は増齢に伴い上昇した. Pg は小児群の 13.1%, 母親群の 23.0% で検出されたが, Td は小児群では検出されず, 母親群でも検出率は低かった (7/239). 小児群における MS 感染と歯周病原性細菌感染との間には関連性が認められなかった. 母子ペアで検出の一致度を検討した結果, Tf 陽性の小児 93 人のうち 50 人の母親で, Pg 陽性の小児 43 人のうち 17 人の母親でこれらの菌が検出された. 以上より, Aa, Tf および Pg といった歯周病原性細菌は小児プラークに感染し得ること, これら歯周病原性細菌の感染は MS の感染状況とは関連性の無いことが強く示唆された. また, 歯周病原性細菌, 特に 'red complex species' は, 垂直 (母子) 感染が起こる可能性は低いことが示唆された.

緒 言

小児期には歯周組織の破壊を伴う歯周炎は, 遺伝的疾患や全身疾患のある場合を除き, ほと

んど見られないことが明らかにされている¹⁾. しかし, 歯周炎の兆候の見られない小児のプラーク中に歯周炎の原因細菌として挙げられている細菌 (歯周病原性細菌) が存在する場合の

Periodontopathic bacterial colonization in plaques of children

Misumi KIMURA

Division of Pediatric Dentistry, Iwate Medical University School of Dentistry

(Chief : Prof. Mitsuro TANAKA)

1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通 1 丁目 3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 38 : 107-116, 2014

あることは、いくつかの研究グループによる横断的あるいは長期的観察から明らかにされている²⁻⁶⁾。小児プラークでの検出率はさまざまではあるが、これらの報告によれば、多くの歯周病原性細菌種が小児プラークに定着する可能性がある。若年者の歯周炎（侵襲性歯周炎）の原因細菌とされている *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* のみならず、成人の重度慢性歯周炎との関連性が重要視されている 'red complex species' と呼ばれる 3 菌種の歯周病原性細菌種 (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* および *Tannerella forsythensis*)⁷⁻⁹⁾ も、その検出率は低いとする報告が多いものの^{2, 10-13)}、小児プラーク中に認められる場合のあることが報告されている^{1, 14)}。健常成人の口腔内に常在する歯周病原性細菌が小児プラーク中にも認められるというこれらの研究結果は、小児プラークへの歯周病原性細菌の感染源が身近な成人であることを示唆する。

ヒトの齶蝕原性細菌であるミュータンスレンサ球菌 (*Streptococcus mutans* および *S. sobrinus*) (MS) については、これまでの多くの研究から、母親の唾液を介して子に垂直（母子）感染することが明らかにされている^{1, 15)}。Berkowitz ら¹⁶⁾ は母親の唾液中に 10^5 CFU/ml の MS が存在すれば子への感染が 58% 起こると報告しており、Kishi ら¹⁷⁾ は母親の唾液中の *S. mutans* 密度が $4 \log$ DNA copy/ml (4.4×10^3 CFU/ml 相当) 以下の場合には 2 歳 6 ヶ月時点で齶蝕発症が見られなかったこと、逆に、*S. mutans* に加えて *S. sobrinus* が $2 \log$ DNA copy/ml (70 CFU/ml 相当) 存在すれば *S. mutans* 単独感染の場合より齶蝕発症率が上がることを報告している。これらの研究結果は、歯周病原性細菌についても母親の唾液中に一定量以上存在すれば、母子感染が起こることを強く示唆している。実際、Watson らの報告¹⁸⁾ では、両親のプラーク中に 'red complex species' を含む BANA-positive の歯周病原性細菌の感染が認められる場合にはその子供にも同じ歯周病原性細菌が認められる確率が 9.8 倍高く、さ

らにその両親が歯周炎に罹患している場合には子供のプラーク中にその歯周病原性細菌が存在する確率が 12 倍高くなることが示されている [BANA-positive の歯周病原性細菌とは、N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide (BANA) という合成基質を水解する trypsin 様酵素を持つ（すなわち、BANA-test 陽性の）歯周病原性細菌のことで、*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythensis* および *Capnocytophaga* 属の細菌が含まれる]。また、北欧や日本での調査報告でも歯周病原性細菌の垂直感染が示唆されている^{19, 20)}。しかしこれらの報告とは逆に、多数の家族を調べた米国、北欧、日本での研究²¹⁻²⁴⁾ では、特に *P. gingivalis* については、垂直感染は起こらないことが示されており、歯周病原性細菌の垂直感染については依然明確な結論が得られていないのが現状である。

そこで本研究では、乳歯列期または混合歯列期の小児 327 名を対象に、菌種特異的 PCR を用いて、'red complex species' の 3 菌種および *A. actinomycetemcomitans* の小児プラークへの感染状況について検討した。また、これまで注意が払われてこなかった歯周病原性細菌とミュータンスレンサ球菌の感染状況の関連性についても検討した。さらに、母親からもプラークを採取し、その感染状況の類似性から、歯周病原性細菌の母子感染の可能性についても検討を行った。

材料と方法

1. 供試菌株と培養条件

P. gingivalis ATCC 33277 株, *T. denticola* ATCC 33520 株, *T. forsythensis* ATCC 43037 株, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 株, *S. mutans* ATCC 25175 株, *S. sobrinus* ATCC 27351 株を実験に供した。培養は kimura ら²⁵⁾、Ohara-Nemoto ら²⁶⁾ および原田²⁷⁾ の方法に準じて行った。すなわち、*A. actinomycetemcomitans* は ABCM (Eiken Chemical, Tokyo, Japan) Broth に、*P. gingivalis* は $5.0 \mu\text{g/ml}$ hemin (SIGMA ALDRICH, Tokyo, Japan) および 1.0

表1 被験者

	小児	母親
総数	327	239
年齢	4.6 ± 0.1 [§]	35.4 ± 0.4 [§]
dmf/DMF歯率 (%) [‡]	11.9 ± 1.1 [§]	45.8 ± 1.5 [§]

[§] 平均値 ± 標準誤差

[‡] 未処置歯数(d/D), 喪失歯数(m/M)および処置歯数(f/F)の和を現在歯数で除した率

µg/ml menadione (SIGMA ALDRICH) を添加した ABCM (Eiken Chemical) Broth に, *T. denticola* および *T. forsythensis* は 5 µg/ml hemin, 1.0 µg/ml menadione, 1.0% L-cystein (Nacalai tesque, Kyoto, Japan), 15 µg/ml acetylmuramic acid (SIGMA ALDRICH) を添加した GAM (Nissui Medical Co., Tokyo, Japan) Broth に, *S. mutans*, *S. sobrinus* は Todd Hewitt Broth (Becton Dickinson Co., Cockeysville, USA) にそれぞれ播種し, 嫌気培養システム (Becton Dickinson) を用いて 37°C, 嫌気的条件下 (90% N₂, 5% CO₂) で 48 時間培養した。

2. 被験者と口腔内診査

岩手医科大学附属病院歯科医療センター小児歯科外来を受診し, 事前に保護者もしくは本人に本研究の主旨を説明し同意を得た小児 327 名 (男児 180 名および女児 147 名) とその母親で臨床的に歯周炎の兆候のないもの 239 名を被験者とした (表 1)。なお, 本研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 01163)。齲蝕経験の指標として dmf/DMF 歯率を用いた。dmf/DMF 歯率 (%) は, 各人の dmf/DMF 歯数 (WHO のう蝕診査基準²⁸⁾) に基づき, 乳歯列期の場合は dmf 歯, 混合歯列期の場合は dmf 歯と DMF 歯を加えた (dmf 歯 + DMF 歯) を現在歯 (乳歯 + 永久歯) 数で除して算出した。

3. サンプルの採取

滅菌エキスカベーターを用いて, 歯肉縁下プラークを含む全プラークを全歯面より採取した。採取したサンプルを滅菌 PBS 溶液 (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) (1 ml) に懸

表2 本研究で用いたプライマー

菌種	ターゲット遺伝子	PCR産物(bp)	Ta (°C)	参考文献
<i>P. gingivalis</i>	16S rDNA	197	58	29)
<i>T. denticola</i>	16S rDNA	311	55	30)
<i>T. forsythensis</i>	16S rDNA	641	60	30)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	16S rDNA	593	60	30)
<i>S. mutans</i>	gfb	377	55	27)
<i>S. sobrinus</i>	gfl	653	55	27)

濁後, 滅菌 PBS 溶液で 2 度遠心洗浄を行い, 遠心沈渣をプラークサンプルとした。

4. ゲノム DNA の精製

供試菌株およびプラークサンプルからのゲノム DNA の精製は Wizard ゲノム DNA 精製キット[®] (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った。精製ゲノム DNA は 10 mM Tris-HCl (Nacalai), 1 mM EDTA (Wako, Osaka, Japan) を用いて pH 8.0 に調整した TE buffer に溶解し, 260 nm の吸光度から DNA 濃度を算出した。供試菌株 DNA とサンプル DNA の菌種特異的 PCR に用いる作業濃度はそれぞれ 1 ng/ml, 10 ng/ml とし, ゲノム DNA サンプルはすべて -80°C で保存した。

5. プライマーと PCR

本研究に用いた菌種特異的プライマーおよび PCR 反応条件は原田²⁷⁾ および Amano^{ら^{29, 30)}} の報告に準じた (表 2)。PCR 産物は, 44.5 mM Tris-borate (Nacalai), 1 mM EDTA (Wako) を用いて pH 8.0 に調整した 0.5 M TBE 溶液中にて, 0.1 µg/ml エチジウムブロマイド (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 含有 1.5% あるいは 3.0% のアガロース (Invitrogen) ゲルを用いた電気泳動を行なった。

6. 統計解析

年齢と歯周病原性細菌ならびに MS の検出率の関連は Pearson の単相関分析により検討した。また, 小児を *S. mutans*, *S. sobrinus* の検出状況により 4 群 [Sm(-)・Ss(-)群, Sm(-)・Ss(+)群, Sm(+)・Ss(-)群および Sm(+)・Ss(+)群] に分け, 群間の比較を行なった。その際, 平均年齢の比較には分散分析を用い, dmf/DMF 歯率ならびに各細菌の検出率の差の

比較にはカイ二乗検定と多重比較検定³¹⁾を用いた。母子での細菌の定着についてもカイ二乗検定で検討した。すべての解析には統計解析ソフト IBM SPSS Ver.19.0 (日本 IBM, 東京)を用いた。なお、有意水準は0.05未満とした。

結 果

1. 被験者の平均年齢と平均 dmf/DMF 歯率

平均年齢は小児群 4.6 ± 0.1 歳 (平均 \pm 標準誤差), 母親群 35.4 ± 0.4 歳であった。平均 dmf/DMF 歯率は小児群で $11.9 \pm 1.1\%$ (平均 \pm 標準誤差), 母親群で $45.8 \pm 1.5\%$ であった (表 1)。これらは平成 23 年度歯科疾患実態調査をもとにして算定した dmf/DMF 歯率 (「4 歳で 7.5%, 5 歳で 14.0%」³²⁾ から計算して 4.6 歳で 11.4%, 「35 から 40 歳で 42.5%」³²⁾) とほぼ同等の値であった。

2. 母子プラークからの歯周病原性細菌および MS の検出

母子プラークからの歯周病原性細菌と MS の検出率は図 1 に示した。小児群, 母親群とも *A. actinomycetemcomitans* の検出率が最も高かった (小児群で 77.1%, 母親群で 81.2%)。'Red complex species' としては 37.9% の小児プラーク, 60.3% の母親プラークで検出されたが, 3 菌種の中では *T. forsythensis* の検出率が最も高く (小児群で 28.4%, 母親群で 52.3%), つぎに *P. gingivalis* の検出率が高かった (小児群で 13.1%, 母親群で 23.0%)。しかし, *T. denticola* は被験 327 名の小児群では検出されず, 母親群においても検出率は低かった (2.9%)。

MS については, 小児群では *S. mutans*, *S. sobrinus* とも検出されなかった MS 陰性群 [Sm(-)・Ss(-)] が最も多く (58.4%), MS 陽性群の中では Sm(+)-Ss(-) の小児の割合が最も高かった (小児群全体の 33.6%, MS 陽性小児群の 80.9%)。一方, 母親群においては, MS 陽性群が陰性群を上回った (61.9% vs. 38.1%) が, MS 陽性群の中では, 小児群同様, Sm(+)-Ss(-) の被験者の割合が最も高かった (母親群全体の 40.6%, MS 陽性母親群の 65.5%)。

3. 増齢にともなう歯周病原性細菌および MS の検出率の推移

小児群で検出のない *T. denticola* を除く歯周病原性細菌および MS の 5 菌種について, 小児群での増齢にともなう検出率の推移を検討した (図 2)。その結果, *S. mutans*, *T. forsythensis* および *A. actinomycetemcomitans* は増齢とともに有意に検出率が上昇することが明らかとなった (それぞれ $p < 0.02$, $p < 0.02$ および $p < 0.01$)。一方, *P. gingivalis* および *S. sobrinus* では有意な上昇はみられなかった。

4. 小児群における MS 感染状況と dmf/DMF 歯率ならびに歯周病原性細菌の感染状況

MS の小児プラークへの感染状況と齲蝕の関連性を検討する目的で, 小児群を MS 感染状況

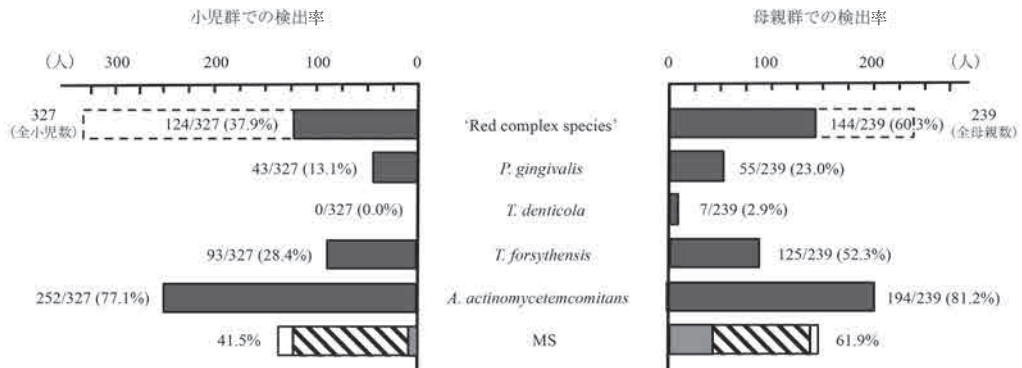


図 1 母子プラークでの 'red complex species', *A. actinomycetemcomitans* および MS の感染率。MS 感染率の closed column (■) は Sm(+)-Ss(+)-群を, hatched column (▨) は Sm(+)-Ss(-) 群を, open column (□) は Sm(-)-Ss(+)-群を示す

別に4群に分類し dmf/DMF 歯率の群間の差異を比較した結果、カイ二乗検定で群間の差を認め、次いで行なった多重比較検定において Sm(+)・Ss(+)群は他の群と比較して有意に高率であった ($p < 0.05$)。次いで dmf/DMF 歯率が高かったのは Sm(+)・Ss(-)群であったが、多重比較検定において他群との有意な差は認めなかった(表3)。一方、平均年齢については、分散分析の結果、群間に有意な差は認められなかった ($p = 0.164$)。

小児群を MS 感染状況別に分類した4群間での 'red complex species', *A. actinomycetemcomitans* の感染状況を検討した結果、Sm(+)・Ss(+)群では他の3群と比較して 'red complex

species' の感染率が有意に高かった(表3)。また、*P. gingivalis* および *T. forsythensis* の検出率についても Sm(+)・Ss(+)群で他の3群と比較して高値を示したが、MS 検出との関連性を検討した結果、いずれの歯周病原性細菌感染についても MS の感染状況とは有意の関連性は認められなかった(いずれも $p > 0.05$)。

5. 母子ペアにおける歯周病原性細菌の感染状況

小児とその母親 327 組について、'red complex species' および *A. actinomycetemcomitans* の検出結果の一致度から、これらの細菌の母への定着と子への定着に関連があるか否かを検討した(表4)。その結果、*A. actino-*

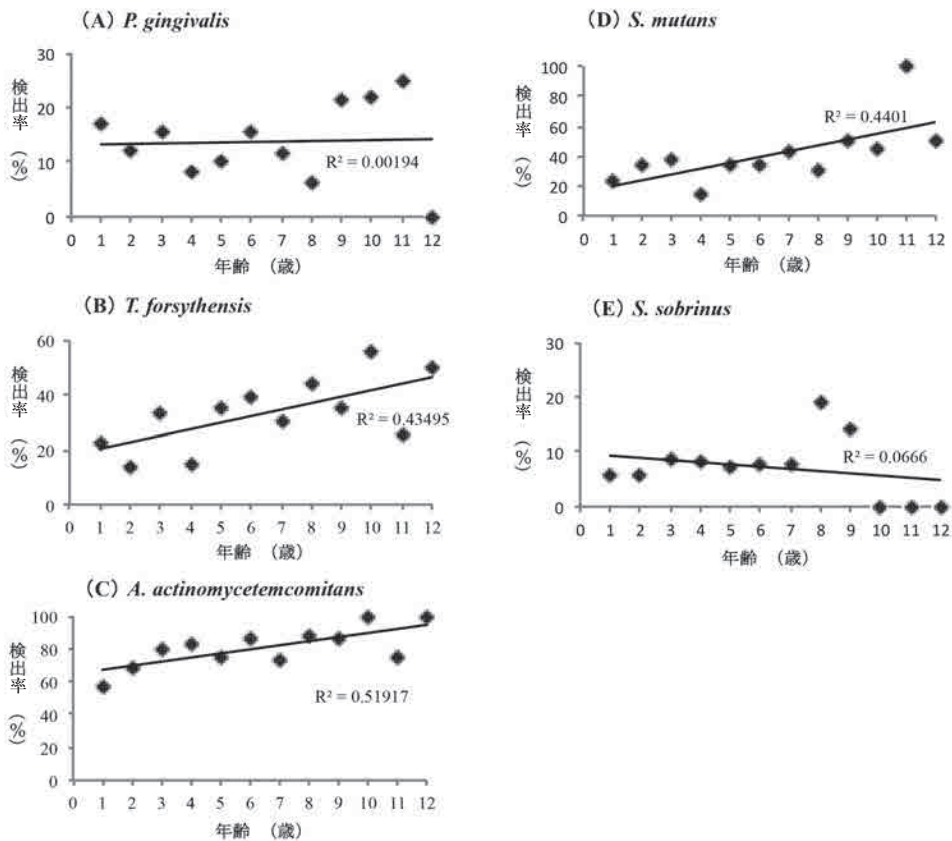


図2 増齢にともなう歯周病原性細菌およびMSの検出率の推移。

被検5菌種 *P. gingivalis* (A), *T. forsythensis* (B), *A. actinomycetemcomitans* (C), *S. mutans* (D), *S. sobrinus* (E) の検出率の増齢に伴う変動。

表3 小児群でのMSと歯周病原性細菌の感染状況の関連性

Sm・Ss ^a	対象者数	平均dmf/DMF 菌率(%)	年齢 (平均年齢 ± 標準偏差)	Red complex species ^b	<i>P. gingivalis</i> ^b	<i>T. denticola</i> ^b	<i>T. forsythensis</i> ^b	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ^b
+・+	11	38.5	5.1 ± 0.7	6 (54.5%)	3 (27.3%)	0 (0.0%)	5 (45.4%)	8 (72.7%)
+・-	110	15.0	5.3 ± 0.3	39 (35.5%)	16 (14.5%)	0 (0.0%)	27 (24.5%)	85 (77.3%)
-・+	15	10.0	4.6 ± 0.7	5 (33.3%)	2 (13.3%)	0 (0.0%)	4 (26.6%)	14 (93.3%)
-・-	191	9.0	5.1 ± 0.2	74 (38.7%)	22 (11.5%)	0 (0.0%)	57 (29.8%)	145 (76.0%)
総数	327	-	-	124	43	0	93	252

^a *S. mutans*と*S. sobrinus*の検出状況：+・+は*S. mutans*陽性-*S. sobrinus*陽性群，+・-は*S. mutans*陽性-*S. sobrinus*陰性群，-・+は*S. mutans*陰性-*S. sobrinus*陽性群，-・-は*S. mutans*陰性-*S. sobrinus*陰性群を示す。

^b 数値は陽性者数，括弧内はMS定着別の各群における割合(%)を示す。

表4 母子ペアでの'red complex species'と*A. actinomycetemcomitans*感染状況の類似性

<i>P. gingivalis</i>			<i>T. denticola</i>			<i>T. forsythensis</i>			<i>A. actinomycetemcomitans</i>		
		母親 ^a		母親 ^a		母親 ^a		母親 ^a		母親 ^a	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
小児 ^a	+	17	26	0	0	50	43	252	0		
	-	69	215	12	315	126	108	52	23		

^a 小児群および母親群での検出数：+は陽性者，-は陰性者を示す。

mycetemcomitans については *A. actinomycetemcomitans* 陽性の小児 252 名の母親はすべて *A. actinomycetemcomitans* 陽性であったが，*P. gingivalis* については陽性の小児 43 名中その母親も *P. gingivalis* 陽性のペアは 17 組のみであった（陽性一致率：5.2%）。*T. forsythensis* においても，*T. forsythensis* 陽性の小児 93 名中その母親も *T. forsythensis* 陽性のペアは 50 組のみであった（陽性一致率：15.3%）。

考 察

小児のプラークにも歯周病原性細菌の感染がみられる場合のあることは多くの研究者が報告しているが，その感染状況，特にMSの感染状況との関連性については明らかにはされておらず，また，歯周病原性細菌の感染源，感染様式についても明確にはなっていない^{1,33)}。そこで本研究では，乳歯列期または混合歯列期の小児 327 名を対象に，'red complex species' の 3 菌種および *A. actinomycetemcomitans* の小児プラークへの感染状況およびミュータンスレンサ

球菌の感染状況との関連性について横断的検討を行った。さらに，母親プラークへの歯周病原性細菌の感染状況を明らかにし，歯周病原性細菌の母子感染の可能性についても検討した。被験者とした小児 327 名，母親 239 名の平均 dmf/DMF 菌率は平成 23 年度歯科疾患実態調査³²⁾ から換算した値と有意の差はなかったことから（表 1），本研究の対象者は，少なくとも齲蝕の罹患性については偏りのない標本集団であることが示唆された。

小児プラークへの *A. actinomycetemcomitans* の感染率は，調べた歯周病原性細菌のうちでは最も高く，77.1%の小児プラークから検出された（図 1）。この成績は，*A. actinomycetemcomitans* が小児プラークへ早期に定着することを示唆するもので，これまでの報告^{2,34-36)} を支持する。*A. actinomycetemcomitans* の小児プラークでの検出率については低い（0-4.8%）とする報告^{10,37-39)} もあるが，119 名の小児を対象に 2 年間の長期的観察を行った Ooshima らの報告⁴⁾ では，小児プラーク

クでの *A. actinomycetemcomitans* の検出率は他の歯周病原性細菌と比較して高いこと (38-73%), 測定時期により大きく変動することが明らかにされている。これらを考え合わせると、歯周病原性細菌のうち *A. actinomycetemcomitans* については小児プラークへ早期に定着/感染するものと考えられる。

本研究で対象とした4種の歯周病原性細菌のうちでは、*A. actinomycetemcomitans* について、*T. forsythensis* の検出率が高かった (28.4%, 図1)。上記の Ooshima らの報告⁴⁾ では、*T. forsythensis* の小児プラークへの感染は持続的なものではなく、測定時点により変動する (0-36%) ことが示唆されている。実際、本研究同様、横断的検索を行ったこれまでの報告^{2, 40, 41)} に示されている *T. forsythensis* の検出率には相当な幅がある (9.3-29.0%)。

小児プラークへの *P. gingivalis* の感染については、比較的高率で起こっている (37.0-49.2%) とする報告^{11, 36, 42)} と感染が認められないまたはその検出率は極めて低い (0-4.8%) とする報告^{2, 10, 43)} があるが、本研究結果では13.1%の小児 (43/327) のプラークで *P. gingivalis* の感染が認められた (図1)。長期的観察⁴⁾ の結果 (0-20%) を踏まえると、小児プラークへの *P. gingivalis* の感染も、*T. forsythensis* 同様、持続的なものではなく、感染と非感染の状態間を変動するものと推察された。

'Red complex species' のうち *T. denticola* については、327名の小児のプラークへの感染は認められなかった (図1)。これまでの報告においても、小児プラークへの *T. denticola* 感染は認められないとする報告^{2, 4, 11)} がほとんどで、検出されたとする報告⁴³⁾ においてもその検出率は極めて低い (<5%) ことが示されている。

小児プラークへのMS感染に関する、検出率 (図1)、増齢にともなう検出率の変動 (図2)、dmf/DMF 歯率との関連性 (表3) についての本研究結果は、これまでの報告^{27, 44-46)} を支持するものであった。MSのうちでは *S. mutans* のみが増齢にともなって小児プラークからの検出

率が上昇したが、*T. forsythensis* および *A. actinomycetemcomitans* の検出率も増齢とともに有意に上昇した (図2)。そこでその関連性について検討を行ったが、いずれもMSの感染状況とは有意の関連性は認められなかった。この成績は、'red complex species' の小児の頬粘膜への定着が齶蝕経験とは関連しないことを示唆した Shimomura-Kuroki らの報告⁴⁷⁾ を支持するもので、歯周病原性細菌が母子感染するMSとは異なった感染経路で小児プラークに定着する可能性を示唆するものかもしれない。

歯周病原性細菌の母子感染の可能性を検討する目的で、小児とその母親の母子ペア327組について解析を行なった結果、*P. gingivalis* の陽性一致率は5.2%、*T. forsythensis* の陽性一致率は15.3%であった (表4)。これらの成績は歯周病原性細菌、特に 'red complex species' については、垂直 (母子) 感染の起こる可能性が低いことを示唆しており、米国、北欧で多数の家族を調査した報告²¹⁻²³⁾ を支持する。しかし、BANA-positive の歯周病原性細菌としてはあるが垂直感染の可能性を強く示唆した Watson らの報告¹⁸⁾ をはじめ 'red complex species' の垂直感染を示唆する報告^{19, 20)} もある。それは一つには、これらの報告 (垂直感染を否定する報告も支持する報告も) はすべて細菌種レベルでの検索であることによると考えられる。*A. actinomycetemcomitans* を含め、今後、生物型あるいは遺伝子型の検索を行い、歯周病原性細菌の母子感染についてより詳細な検討を行う必要がある。

謝辞ならびに利益相反について

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座小児歯科学分野 田中光郎教授、微生物学講座分子微生物学分野 木村重信教授に深く感謝致します。さらに、本研究に際し、ひとかたならぬ御指導、御助言をいただきました微生物学講座分子微生物学分野 下山佑博士、口腔医学講座予防歯科学分野 岸光男博士に心

から感謝の意を表します。最後に、絶えず暖かい御支援ならびに御協力を頂きました小児歯科学分野、分子微生物学分野の皆様方に深謝致します。

尚、本研究において、公表すべき利益相反はありません。

引用文献

- 1) Kimura, S. and Ohara-Nemoto, Y.: Early childhood caries and childhood periodontal diseases. *In* Pediatric Infectious Diseases Revisited (H. Schroten and S. Wirth, eds), Birkhäuser-Verlag AG, Basel, p. 177-197, 2007.
- 2) Kimura, S., Ooshima, T., Takiguchi, M., Sasaki, Y., Amano, A., Morisaki, I. and Hamada, S.: Periodontopathic bacterial infection in childhood. *J. Periodontol.*, 73: 20-26, 2002.
- 3) Tannar, A. C. R., Milgrom, P. M., Kent, R. Jr., Mokeen, S. A., Page, R. C., Liao, S. I. A., Riedy, C. A. and Bruss, J.: Similarity of the microbiota of preschool children with that of their caregivers in a population-based study. *Oral Microbiol. Immunol.*, 17: 379-387, 2002.
- 4) Ooshima, T., Nishiyama, N., Hou, B., Tamura, K., Amano, A., Kusumoto, A. and Kimura, S.: Occurrence of periodontal bacteria in healthy children: a 2-years longitudinal study. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 31: 417-425, 2003.
- 5) Papaioannou, W., Gizani, S., Haffajee, A. D., Quirynen, M., Mamai-Homata, E. and Papagiannoulis, L.: The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol. Immunol.*, 24: 183-189, 2009.
- 6) Cortelli, J. R., Fernandes, C. B., Costa, F. O., Cortelli, S. C., Kajiji, M., Howell, S. C. and Kawai, T.: Detection of periodontal pathogens in newborns and children with mixed dentition. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 31: 1041-1050, 2012.
- 7) Mayrand, D. and Holt, S. C.: Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.*, 52: 134-152, 1988.
- 8) Slots, J. and Listgarten, M. A.: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.*, 15: 85-93, 1988.
- 9) Socransky, S. S. and Haffajee, A. D.: Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000, 28: 12-55, 2002.
- 10) Okada, M., Hayashi, F. and Nagasaka, N.: 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, 2000.
- 11) Okada, M., Hayashi, F. and Nagasaka, N.: 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, 2001.
- 12) Ooshima, T., Nishiyama, N. and Tamura, K.: Accidentally induced periodontitis in primary dentition: longitudinal examinations of periodontal bacteria and clinical conditions. *Int. J. Pediatr. Dent.*, 13: 193-197, 2003.
- 13) Tamura, K., Nakano, K., Hayashibara, T., Nomura, R., Fujita, K., Shintani, S. and Ooshima, T.: Distribution of 10 periodontal bacteria in saliva samples from Japanese children and their mothers. *Arch. Oral Biol.*, 51: 371-377, 2006.
- 14) Alaluusua, S., Asikainen, S. and Lai, C. H.: Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.*, 62: 207-10, 1991.
- 15) Berkowitz, R. J.: Mutans streptococci: acquisition and transmission. *Pediatr. Dent.*, 28: 106-109, 2006.
- 16) Berkowitz, R. J., Turner, J. and Green, P.: Maternal salivary levels of *Streptococcus mutans* and primary oral infection of infants. *Arch. Oral Biol.*, 26: 147-149, 1981.
- 17) Kishi, M., Abe, A., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S. and Yonemitsu, M.: Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of mutans streptococci in plaque in their 2.5-year-old children. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 37: 241-249, 2009.
- 18) Watson, M. R., Bretz, W. A. and Loesche, W. J.: Presence of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in children correlated with periodontal disease of their parents. *J. Dent. Res.*, 73: 1636-1640, 1994.
- 19) Asikainen, S. and Chen, C.: Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000, 20: 65-81, 1999.
- 20) Umeda, M., Miwa, Z., Takeuchi, U., Ishizuka, M., Huang, Y., Noguchi, K., Tanaka, M., Takagi, Y. and Ishikawa, I.: The distribution of periodontopathic bacteria among Japanese children and their parents. *J. Periodontal Res.*, 39: 398-404, 2004.
- 21) Asikainen, S., Chen, C. and Slots, J.: Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 11: 387-394, 1996.
- 22) Tuite-McDonnell, M., Griffen, A. L., Moeschberger, M. L., Dalton, R. E., Fuerst, P. A. and Leys, E. J.: Concordance of *Porphyromonas gingivalis* colonization in families. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 455-461, 1997.
- 23) Okada, M., Hayashi, F., Soda, Y., Zhong, X., Miura, K. and Kozai, K.: Intra-familial distribution of nine

- putative periodontopathogens in dental plaque samples analyzed by PCR. *J. Oral Science.*, 46: 149-156, 2004.
- 24) Van Winkelhoff, A. J. and Boutaga, K.: Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *J. Clin. Periodontol.*, 32 (suppl. 6): 16-27, 2005.
- 25) Kimura, S., Koga, T., Fujiwara, T., Kontani, M., Shintoku, K., Kaya, H. and Hamada, S.: Tyrosine protein phosphorylation in murine B lymphocytes by stimulation with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 130: 1-6, 1995.
- 26) Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Kimura, S., Kon, A., Haraga, H., Ono, T. and Nemoto, T. K.: Asp- and Glu-specific novel dipeptidyl peptidase 11 of *Porphyromonas gingivalis* that ensures utilization of proteinoous energy sources. *J. Biol. Chem.*, 286: 38115-38127, 2011.
- 27) 原田利佳子：ミュータンスレンサ球菌およびその他の口腔レンサ球菌の小児プラーク中への定着と齲蝕との関連性。小児歯誌, 44: 8-15, 2006.
- 28) Oral health surveys: basic methods/World Health Organization. - 4th ed. - World Health Organization, 1997.
- 29) Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, I. and Hamada, S.: Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1426-1430, 1999.
- 30) Amano, A., Kishima, T., Kimura, S., Takiguchi, M., Ooshima, T., Hamada, S. and Morisaki, I.: Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J. Periodontol.*, 71: 249-255, 2000.
- 31) Ryan, T. A.: Significance tests for multiple comparison of proportions, variances, and other statistics. *Psychol. Bull.*, 57: 318-328, 1960.
- 32) 歯科疾患実態調査報告解析検討委員会 編:平成23年歯科疾患実態調査. 口腔保健協会, 東京, 2011.
- 33) Kimura, S., Ohara-Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. and Sasaki, M.: Pathogenic factors of *P. gingivalis* and host defense mechanisms. In *Pathogenesis and treatment of periodontitis* (N. Buduneli, ed.), InTech, Rijeka, Croatia. p. 3-18, 2012.
- 34) Delaney, J. E. and Kornman, K. S.: Microbiology of subgingival plaque from children with localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2: 71-76, 1987
- 35) Sweeney, E. A., Alcoforado, G. A. Nyman, S., Slots, J.: Prevalence and microbiology of localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2: 65-70, 1987
- 36) Gafan, G. P., Lucas, V. S., Roberts, G. J., Petrie, A., Wilson, M. and Spratt, D. A.: Prevalence of periodontal pathogens in dental plaque of children. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 4141-4146, 2004
- 37) Frisken, K. W., Higgins, T. and Palmer, J. M.: The incidence of periodontopathic microorganisms in young children. *Oral Microbiol. Immunol.*, 5: 43-45, 1990
- 38) Kononen, E., Ashikainen, S., Jousimies-Somer, H.: The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. *Oral Microbiol. Immunol.*, 7: 28-31, 1992
- 39) Conrads, G., Muttuers, R., Fischer, J., Brauner, A., Lutticken, R. and Lampert, F.: PCR relation and Dot-Blot Hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. *J. periodontol.*, 67: 994-1003, 1996
- 40) Yang, E. Y., Tanner, A., C., R., Milgrom, P., Mokeem, S. A., Riedy, C. A., Spadafora, A. T., Page, R. C. and Bruss, J. O. N.: Periodontal pathogen detection in gingiva/tooth and tongue flora samples from 18- to 48-month-old children and periodontal status of their mothers. *Oral Microbiol. Immunol.*, 17: 55-59, 2002.
- 41) Hayashi, F., Okada, M., Soda, Y., Miura, K. and Kozai, K.: Subgingival distribution of *Campylobacter rectus* and *Tannerella forsythensis* in healthy children with primary dentition. *Arch Oral Biol.*, 51: 10-14, 2006.
- 42) McClellan, D., Griffin, A. L. and Leys, E. J.: Age and prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in children. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 2017-2019, 1996
- 43) Miyamoto, E., Nakano, K., Fujita, K., Nomura, R., Okawa, R., Matsumoto, M. and Ooshima, T.: Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva specimens from Japanese subjects. *Arch. Oral Biol.*, 54: 374-379, 2009.
- 44) Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., Doi, T., Suzuki, J., Miura, K. and Kozai, K.: PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. *J. Med. Microbiol.*, 51: 443-447, 2002.
- 45) Hoshino, T., Kawaguchi, M., Shimizu, N., Hoshino, N., Ooshima, T., Fujiwara, T.: PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 48: 195-199, 2004.
- 46) Okada, M., Kawamura, M., Oda, Y., Yasuda, R., Kojima, T. and Kurihara, H.: Caries prevalence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Japanese school children. *Int. J. Pediat. Dent.*, 22: 342-348, 2012.
- 47) Shimomura-Kuroki, J., Yamashita-Matsuda, K., Miyagata, Y. and Shimooka, S.: Prevalence of cariogenic and periodontopathic bacteria in the primary and mixed children. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, 36: 31-36, 2011

研 究

Periodontopathic bacterial colonization in plaques of children

Misumi KIMURA

Division of Pediatric Dentistry, Iwate Medical University School of Dentistry

(Chief : Prof. Mitsuro TANAKA)

[Received : December 17, 2013 : Accepted : December 28, 2013]

Abstract : Although 'red complex species' [*Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) and *Tannerella forsythensis* (Tf)] and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) are the major pathogens in adults of chronic and aggressive periodontitis, respectively, it is also evident that the putative periodontopathic bacteria can be detected in the plaques from periodontally healthy children. To elucidate the relationship to the colonization of mutans streptococci (MS) and the maternal transmission, in this study, the periodontal pathogens were detected in the plaque samples from 327 periodontally healthy children, and compared to 239 mothers' plaques. After oral examination, plaque samples were collected and the bacterial DNA was purified. The periodontal pathogens and MS were detected by the species-specific PCRs. The results indicated a positive correlation between MS colonization and the caries score (dmf/DMF) in the children. Among the periodontopathic bacteria, Aa was most frequently detected in both the children and mothers, followed by Tf, and the percentages of Aa- and Tf-positive subjects increased with age. Pg was detected in 13.1% of children's and 23.0% of mothers' plaques, whereas Td was not found in the children and was detected in only 7/239 mothers. The statistical analysis revealed no significant correlation between MS and periodontal-bacterial colonizations. Further, the mother-and-child pair-based analysis indicated that the concordance in colonization was observed in 50 out of 93 Tf-positive children and in 17 out of 43 Pg-positive children. Thus, the present findings strongly suggested that some periodontal pathogens including Aa, Tf and Pg, but not Td, can colonize in children's plaques without relation to MS colonization. It was also suggested that the vertical (maternal) transmission, especially of 'red complex species' rarely occurs.

Key Words : Periodontopathic bacteria, plaques of children, colonization, mutans streptococci, maternal transmission