

**研究者：鈴木 かい**（所属：北海道医療大学 口腔構造・機能発育系 小児歯科分野）

**研究題目：Black stain の構成および由来歯周病病原細菌の同定**

**目的：**

我が国の小児の齲罹患率は、年々減少傾向を示している。それにともない齲処置以外の主訴に、審美性に対する相談や処置の要望が多くなってきている。審美性の相談として、歯面に付着した色素沈着を齲と疑い来院する保護者を多く見受ける。

歯の病的変色には様々な要因があるが、原因不明の外来性黒色素沈着を認める場合がある。これは、Black stain と呼ばれており、齲の少ない口腔内に多く認められるとの報告があるものの、明確な原因は不明である。本研究は、小児における口腔内環境の状態から歯周病関連細菌の相違を比較することにより、Black stain 関連細菌の同定を行う事を目的とする。

**対象および方法：**

北海道医療大学大学病院小児歯科を受診し、本研究に対して保護者の理解と同意の得られた80名（男性41名、女性39名、平均年齢8.01 ± 3.38歳）を対象とし、以下の方法で実験を行った。なお本研究は倫理委員会の承認を得ている。（本学個別差医療科学センター倫理委員会承認第2011-012号）

1. PMA index の測定

対象者に口腔内診査を行い、PMA index を評価した。「+」と判定した部位を「炎症所見あり」と判断し、その部位数を個人のPMA index とした。得られたPMA index の分散分析し中央値を算出後、PMA index 高スコア群および低スコア群の2群間に振り分けた。

2. プラーク細菌叢と PMA index の関連性

簡易防湿下にて歯面を滅菌綿棒で拭い対象者のプラーク採取し、PMA index 高スコア群および低スコア群の2群間で比較を行った。

採取したプラークは、DNAを抽出した後 *Porphyromonas (P.) gingivalis*, *Tannerella (T.) forsythia*, *Treponema (T.) denticola*, *Fusobacterium (F.) nucleatum*, *Prevotella (P.) intermedia*, *Actinobacillus (A.) actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium (F.) nucleatum*, *Streptococcus (S.) mitis*, *Streptococcus (S.) sanguinis*, および *Streptococcus (S.) salivarius* を対象細菌とし、Real-time PCRにて解析を行った。プラーク中の総菌数を測定し、各細菌は段階希釈液を利用して作製した標準曲線をもとに算出した。

3. Black stain の分析

Black stain は滅菌エキスカバーターにて剥離し採取した。Black stain の含有物の元素分析は、エネルギー分散型分光器を用いて行った。またBlack stain をレジジン樹脂包埋後切り出し、薄膜切片を作製し透過電子顕微鏡にて観察した。

4. Black stain 関連細菌の同定

プラークと同様にBlack stain からDNAを抽出し、至適条件の下で反応・標的細菌DNAの

増幅を行った。標的細菌は、PMA index 高スコア群および低スコア群の2群間にて有意差を認められた細菌を対象とした。得られた産物は電気泳動を行い、当該バンドを検出した。

## 結 果：

### 1. PMA index における歯周病関連細菌の違い

PMA index 高スコア群および低スコア群において、歯周病関連細菌の比較を行った。PMA index 高スコア群において *S. sanguinis* および *P. intermedia* の有意な存在が認められた。また、PMA index 低スコア群では *P. nigrescens* の有意な存在が明らかになった。

### 2. Black stain の分析

Black stain を採取後、エックス線蛍光分析を行った。Black stain は、Ca が 52%、P が 30% と大部分を占めていた。また透過電子顕微鏡で観察した結果、Black stain は主に無機質な構造体から構成されており、深部では細菌様構造体を散見した。

### 3. Black stain の含有 DNA 解析

Black stain から通法に従い遺伝子を抽出して、特異的プライマーを使用して PCR 法により遺伝子解析を行った。電気泳動の結果 Black stain の内部に *P. nigrescens* の DNA が含まれていることが明らかになり、他の黒色色素産生細菌は認められなかった。

## 考 察：

小児の歯周疾患は、不潔性歯肉炎、萌出性歯肉炎および思春期性歯肉炎が大部分を占めているため、成人で認められるような重篤な歯周疾患は稀である。また *P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans* および *Bacteroides forsythus* が歯周疾患に顕著に関わりを持つ事が明らかになっているものの感染機序や定着時期については不明である。そのため、本研究では歯周疾患に関連するといわれている細菌の網羅的検索を行った。

### 1. PMA index とプラーク細菌叢の関連性

PMA index を測定し、PMA index 高スコア群と PMA index 低スコア群の2群に分けて口腔内細菌叢を検索したところ、PMA index 高スコア群において *S. sanguinis* および *S. mitis* の有意な存在が認められた。*S. sanguinis* および *S. mitis* は、ペリクルのタンパク質のレセプターに付着してコロニーを形成する初期定着菌群といわれている。その後、初期定着菌群のコロニーに *P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans* などの歯周病原因菌である後期定着菌群が付着し歯周病は発症する。小児では歯肉炎はあるものの歯周疾患は稀であることから、PMA index 高スコア群における初期定着菌群の有意な存在はこれらの報告を支持するものであると考えられた。また、PMA index 低スコア群では *P. nigrescens* の有意な存在が明らかになった。*P. nigrescens* は口腔内から分離される黒色色素産生細菌の1種である。Black stain は口腔内環境が良好なものに多く認められるとの報告があるため、*P. nigrescens* が Black stain 形成に関与している可能性が考えられた。

### 2. Black stain の分析

エックス線蛍光分析を行った結果、Ca と P が Black stain の大部分を占めていた。Black stain はエナメル質の歯面に強固に付着しておりブラッシングでは除去が不可能である。歯石も同様に

強固な付着を認め、プラークの細菌内および細菌間基質に唾液中のカルシウム塩とリン酸が沈着することで形成されており、大部分がCaとPからなっている。Black stainは歯肉縁上およびエナメル質表層で見られる。縁上歯石は付着部位による組成差があるが、色調は白色から黄色とされている。縁下歯石の色調は灰緑色であり、歯肉ポケット内の出血に由来する血性色素の沈着で暗褐色を示す場合もある。そのためBlack stainは組成から歯石と同様な形成過程をとるものの、部位および色調の違いから形成過程での黒色色素産生細菌の関与が考えられた。

黒色色素産生菌に分類される口腔内細菌として、糖分解能のない*Porphyromonas*属と、糖分解能を有する*Prevotella*属が知られている。これらの黒色由来細菌の口腔内の定着および増殖には生体由来の鉄イオンの利用が必要であり、黒色の由来は鉄イオンであるといわれている。しかしBlack stainのエックス線解析において鉄イオンは検出されなかった。Black stainは口腔内において着色を認めるが、歯面に強固に着色しており剥離が困難なものが多く、少量のためサンプルの採取が難しい。そのため、採取手段の改良および更なる分析を行うべきであると考えられた。

Black stainを採取後、透過電子顕微鏡により定性分析を行ったところ桿菌に似た細菌様構造体が認められた。口腔内における桿菌は*Fusobacterium*属、*Leptotrichia*属、*Porphyromonas*属、*Prevotella*属および*Tannerella*属などが挙げられる。Black stainの透過電子顕微鏡像において細菌様構造体は様々な断面から短桿菌様細菌像がほとんどであったため、短桿菌である*Porphyromonas*属、*Prevotella*属が考えられた。また*Porphyromonas*属、*Prevotella*属は黒色色素産生菌であるためBlack stainの形成に関与していることが示唆された。

### 3. Black stain 関連細菌の同定

Black stainからDNAを抽出しPMA indexにおいて低スコア群で有意差を認めた*P. nigrescens*、またPMA indexでは有意差がみられなかったが黒色色素産生菌である*P. intermedia*および*P. gingivalis*の特異的プライマーを用いPCRにて増幅を行った。その結果、Black stainから*P. nigrescens*の存在が明らかになった。

これまでの報告において、Black stainは黒色色素産生菌由来の可能性が示唆されていたが、原因菌の同定には至っていない。今回PCRにて*P. nigrescens*の存在を認めたことから*P. nigrescens*がBlack stainに関与していることが明らかになった。

**成果発表：**(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

現在論文作成中。投稿雑誌は未定。