

O-5-06

難治性口内炎罹患後に重度歯周炎を発症した小児の1例

Treatment of severe periodontitis in child with intractable stomatitis—Case report

○平野慶子, 仲 周平, 仲野道代

Keiko Hirano, Shuhei Naka, Michiyo Nakano

Seiji Morishima, Kaori Takeda, Yuri Kono, Kazuma Yama, Yuto Aita,

Yuna Takimoto, Chik (岡大・医歯薬・小児歯)

Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】 小児における重度歯周炎は稀であり、その発症機序や治療については不明な点が多い。今回我々は難治性口内炎に罹患し、その後重度歯周炎を発症した小児の治療を経験したので報告する。

【症例】

主訴：口腔内の衛生状態の管理

現病歴：5歳1か月時に上顎口蓋側辺縁歯肉全体の発赤腫脹を中心とした口内炎を訴えて近医小児科を受診したが、原因不明のため当院小児科に紹介され、口腔外科、耳鼻科と併科にて治療を行った。壊死性侵襲性口内炎、単純ヘルペスウィルス感染症、水痘・帯状疱疹ウィルス感染症、天疱瘡、類天疱瘡等が疑われたがいずれも血液、病理、口腔細菌検査の結果より否定された。口内炎は一時的に治癒したが5歳4か月時に再発、5歳5か月時に臨床症状よりベーチェット病が疑われ、小児科にてコルヒチン投薬治療を開始し、口内炎は徐々に消退した。同時に口腔外科ではアズノールによるうがい、軟膏塗布、シーネの作成等を行っていたが、次第に乳臼歯部の歯肉の退縮と歯根の露出が顕著になったため、小児歯科での管理を依頼された。

全身的既往歴：なし

【処置および経過】

初診時の口腔内写真を図に示す。エックス線所見においては全顎的に歯槽骨の吸収を認めていたが、特に乳臼歯部の歯槽骨の吸収が著しく動搖を認めた。また口腔内細菌の状態を把握するために縁下ブラークを採取して細菌DNAを抽出し、主要な歯周病細菌10種、*Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Prevotella intermedia* (Pi), *Prevotella nigrescens* (Pn),

Eikenella corrodens (Ec), *Campylobacter rectus* (Cr), *Capnocytophaga ochracea* (Co), *Capnocytophaga sputigena* (Cs)のそれぞれに対する菌種特異的プライマーを用いたPCR法により、歯周病細菌の有無を検討した。

その結果、Pg, Td, Tf, Pn, Ec, Cr, Co, Csが陽性であり、Aa, Piが陰性であった。

Pg, Td, Tfが存在することより重度歯周炎と診断し¹⁾、抗菌剤の局所投与のため歯肉縁下にペリオクリン®歯科用軟膏0.5gを貼薬した。1~2か月に1度のメインテナンスを行い、現在、ブラークコントロールは良好であるが全顎的な歯槽骨の吸収は進行しており、新たに萌出した永久歯にも顕著な歯肉の発赤腫脹を認める。



<図>初診時の口腔内写真（6歳4か月）。

【考察】

本症例はベーチェット病の疑いがあり、全身的な免疫力の低下、それに伴う口内炎による衛生状態の悪化等の影響で多種の歯周病細菌が定着し、重度歯周炎に移行した可能が示唆される。さらに現在、混合歯列期であるが、顕著な歯槽骨の吸収が認められ、永久歯列への影響が予想されるため定期的なメインテナンスを続けていく予定である。

【文献】

- 三辺正人、吉野敏明編：細菌検査を用いた歯周治療のコンセプト、医学情報社、東京、2008, pp.32-34.

O-1-04

マウス歯胚の発育に対するアルキル化剤の影響についての
組織学的および生化学的検討Histochemical and biochemical examinations of effects of alkylating agents
on tooth germ development in mice

○角田陽子*, 仲周平*, 大川玲奈**, 高島由紀子*, 仲野和彦**, 仲野道代*
 Yoko Tsunoda*, Shuhei Naka*, Rena Okawa**, Yukiko Takashima*,
 Kazuhiko Nakano**, Michiyo Matsumoto-Nakano*

Dept. Pediatric Dent., Osaka Univ. Grad. Sch. of Dent.

(*岡大・医歯薬・小児歯, **阪大・院・小児歯)

Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent. and Osaka Univ. Dept. Pediatric Dent

【目的】

小児がん経験者において、永久歯胚の欠損、歯根あるいは歯冠の形成異常を起こす頻度が高いことが知られている。これらは、永久歯胚の形成時期におけるアルキル化剤の投与が原因であることが示唆されている。アルキル化剤は、DNA合成を阻害する抗がん剤の一種であるが、歯胚に対する作用機序については、十分に解明されていない。今回我々は、アルキル化剤の一つであるシクロフオスファミドを用いて、マウス歯胚の発育に対する影響について、組織学的および生化学的検討を行ったので、これを報告する。

【対象と方法】

本研究は、動物実験は岡山大学動物実験委員会の承認 (OKU-2015112) を得て行った。

1. 器官培養：胎生 16 日齢のマウスより下顎第一臼歯の歯胚を採取後、通法を用いて器官培養を行った。培養 1 日目にシクロフオスファミドを 0.11mg/ml, 0.21mg/ml, 0.42mg/ml の濃度で添加し、培養 7 日目、14 日目および 21 日目における歯胚を実験に供試した。

2. 病理組織学的評価：下顎第一臼歯歯胚を中性ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋ブロックを作製して薄切切片を作製後、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を行った。

3. 蛍光免疫組織学的解析：CK14, ビメンチン, I 型コラーゲン, フィブロネクチンの各タンパク発現の確認のため、蛍光二重染色法による蛍光免疫組織学的解析を行った。

4. 関連遺伝子発現の評価：培養後の歯胚より、全 RNA を抽出し、cDNA の合成を行い、得られた

cDNA を錆型とし、Real-time qRT-PCR 法によって、CK14, ビメンチン, I 型コラーゲン, フィブロネクチンをコードする遺伝子の発現を調べた。

【結果】

HE 染色の結果より、0.21mg/ml 添加群では培養 21 日目において、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の配列の乱れが認められた。0.42mg/ml 添加群では歯胚全体が発育不全であり、基底膜の破壊、エナメル芽細胞および象牙芽細胞の極性の低下や配列の乱れが顕著であった。また、蛍光免疫染色の結果より、CK14 と I 型コラーゲンは培養 14 日目において、ビメンチンとフィブロネクチンは培養 21 日目において添加群で発現の低下が認められた。qRT-PCR の結果から、CK14 の発現は有意に増加し、ビメンチンの発現は培養 21 日目で有意に低下した。I 型コラーゲンの発現は培養 7 日目、14 日目で有意に低下したが、21 日目では低下したものとの有為差はなかった。フィブロネクチンの発現は、培養 21 日目で有意に低下した。

【考察】

本研究から、シクロフオスファミドが歯胚に作用することにより、分裂増殖期にある内エナメル上皮細胞と歯乳頭細胞の DNA 合成が阻害され、正常な増殖と分化が阻害されたと考えられる。その結果、各タンパクの産生が障害され、内エナメル上皮細胞と歯乳頭細胞から分化するエナメル芽細胞と象牙芽細胞の極性や配列に組織学的变化を生じ、歯の形態異常が引き起こされている可能性が示唆された。今後は、他の抗がん剤や歯の形成に関与するその他の遺伝子への影響について検討を行う予定である。

O-1-03

Streptococcus mutans のバイオフィルム形成におけるサイクロデキストランの影響Effects of Cycloisomaltooligosaccharide on biofilm formation by *Streptococcus mutans*The evaluation of structural morphology about the influence of cycloisomaltooligosaccharide on biofilm formation by *Streptococcus mutans*

○浅海春華, 松三友紀, 高島由紀子, 仲周平, 仲野道代

Haruka Asaumi, Yuki Matsumi, Yukiko Takashima, Shuhei Naka, Michiyo Matsumoto-Nakano

Kuniomi Nakamura, Maiko Ito, Yukiko Takashima, Shuhei Naka, Michiyo Matsumoto-Nakano

Yoko Taniguchi, Katsuji Kubo, Kanagawa Dental Univ. Div. Pediatric Dent.

Yoko Taniguchi, Katsuji Kubo, Kanagawa Dental Univ. Div. Pediatric Dent.

【目的】

齲歯原性細菌である *Streptococcus mutans* が产生するグルカン合成酵素 (GTF) は、スクロースから不溶性グルカンを合成する。このグルカンが歯面に菌とともに付着することによって、バイオフィルムが形成され齲歯の原因となる。これまでも齲歯を誘発しない様々な代用糖が開発されたものの、熱に弱い、糖度が低いなどの性質から、スクロースよりも優れた代用糖はいまだ存在しない。環状イソマルトオリゴ糖であるサイクロデキストラン (Cycloisomaltooligosaccharide; CI) は、7~12 個のグルコースが $\alpha\text{-}1,6$ 結合で環状に連結した構造を示す。これまでに CI が存在すると、GTF によるスクロースからの不溶性グルカンの合成を阻害することが明らかになっている。本研究では CI の齲歯抑制効果についてさらに検討したのでこれを報告する。

【対象と方法】

- 供試菌: 日本人小児由来の *S. mutans* MT8148 株 (血清型 c) を実験に用いた。
- 増殖能: 供試菌を CI を最終濃度が 0~2% となるように段階希釈し添加した 1% スクロース含有 TH 液体培地に播種した後、1 時間毎に波長 600 nm の吸光度を測定した。
- バイオフィルム形成能: CI を最終濃度が 0~10% となるように段階希釈し添加した 1% スクロース含有 TH 液体培地に播種した後、プレートにて 37°C で 48 時間培養した。底面に付着した菌体をクリスタルバイオレット溶液にて染色し、波長 570 nm における吸光度を測定した。
- バイオフィルム構造の観察
(1) バイオフィルム構造の観察: ヘキシジウムイオダイドを用いて染色した供試菌を、上記と同じ濃度で CI を添加した 1% スクロース含有化學合成培地に懸濁した後、この菌液を 25% ヒト

唾液タンパクでコーティングしたチャンバースライドに分注し、嫌気下で 37°C 18 時間培養後、共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察し、さらに ImageJ® を用いて密度を算定した。

(2) バイオフィルム中のグルカンおよび菌量の検討: 供試菌を SYTO® 9 green fluorescent nucleic acid で染色した後、Alexa Fluor® 647 にてラベルしたデキストランを添加した 1% スクロース含有化學合成培地にて培養し、形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察した。

【結果】

MT8148 の増殖速度は、CI の添加により、非添加群と比較して対数増殖期において速度の低下が認められたが、8 時間以降の最終的な増殖には有意な差はなかった。また、バイオフィルム形成量は、濃度依存的に減少し、10% 添加群では CI 非添加群の約 70% 程度であった。またその構造は、CI の非添加群と 10% 添加群を比較すると、密度は 28% の低下が認められ、厚みも 55% 減少していた。さらに、CI の濃度が上昇するにつれバイオフィルム中のグルカン量は著明に減少していた。

【考察】

以上の結果より、CI は細菌の増殖速度を低下させ、さらにグルカンの合成を抑制していることから、バイオフィルム形成の初期段階における菌の歯面への付着を抑制していることが示唆される。今後は CI の他の様々な齲歯抑制効果について検討する予定である。

P-5

非アルコール性脂肪肝炎患者口腔における *Streptococcus mutans* の分布に関する検討

Oral cavity distribution of *Streptococcus mutans* in non-alcoholic steatohepatitis patients

○田畠佳子，仲 周平，仲野道代

Keiko Tabata, Shuhei Naka, Michiyo Matsumoto- Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯)

(ライオン株式会社) www.oktaiheo.com Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、病態が進行することが稀な非アルコール性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver; NAFL) と肝硬変や肝細胞癌に進行することができる非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) からなる。我々はこれまでに、齧歯原性細菌 *Streptococcus mutans* の中で、コレラゲン結合能に関与する菌体表層タンパクである Cnm および歯面への初期付着に関与する Protein Antigen (PA) を保有する株が、動物モデルを用いた検討により、NAFL から NASH への病態の進行に関与している可能性を明らかにしてきた。本研究では、NAFLD 患者の唾液サンプルより分離した *S. mutans* に関して、これらのタンパクの保有率およびその性状について検討したので報告する。

【対象と方法】

- 対象：市立奈良病院で、生検により NAFLD と診断された 40 名の患者 (NASH は 20 名, NAFL は 20 名) を対象とした。なお本研究は、同病院倫理委員会および岡山大学病院倫理委員会の承諾を得た後、同意の得られた対象から唾液の採取を行い研究に使用した。
 - NAFLD 患者の唾液中に存在する *S. mutans* の分離と同定：唾液サンプルを *Mitis-Salivarius* (MS) 寒天培地に播種し、37°C で 48 時間培養後、コロニー数をカウントした。また、MS プレートから分離した株を Brain Heart Infusion 液体培地にて 37°C で 24 時間培養した後、細菌 DNA を抽出し、*S. mutans* の特異的プライマーを用いた polymerase chain reaction (PCR) 法により、菌を同定した。さらに *S. mutans* と同定された菌は、Cnm をコードする遺伝子 *cnm* に特異的なプライマーを用いた PCR 法によって *cnm* の有無を調べた。また、Western

blotting 法により PA の発現の有無を確認した。同時に *S. mutans* の血清型の特定も行った。

3. 統計学的分析：得られた結果の統計学的有意差の検定は、Fisher の正確確率検定法と t 検定を用いた。また、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

【結果】

NASH および NAFL 患者における *S. mutans* の検出率はそれぞれ 85.0% と 80.0% で有意差は認められなかった。しかしながら NASH 患者の唾液サンプル中の *S. mutans* の菌数は、NAFL 患者と比較して有意に高かった (9.5×10^3 vs. 1.2×10^3 CFU/mL, $P < 0.05$)。

一方、Cnm および PA を保有する *S. mutans* の割合は NASH 患者において有意に高い値を示した(52.9% vs. 18.7%, $P < 0.05$)。また、NASH 患者における Cnm および PA を保有する *S. mutans* の血清型については、*c* 型が 75.0%，*e* 型が 12.5%，*f* 型が 0%，*k* 型が 12.5% で、*c* 型の占める割合が多い結果であった。

【考察】

本研究の結果から, NAFL 患者と比較して NASH 患者から高頻度に Cnm および PA を保有する *S. mutans* が検出されることが明らかとなり, これらの菌株が, NAFL から NASH への病状の増悪化に関与している可能性が示唆された. 今後は, これら菌株をこれまで確立した動物モデルに使用し, 病理組織学的な観点から NASH 発症の可能性に関して検討していく予定である.

【会員外共同研究者】

殿村修一 (市立奈良病院神経内科)