

論文の内容の要旨

氏名：太田 雪菜

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：重度早期小児う蝕（S-ECC）に関連する宿主およびパラサイト要因の解析

う蝕は、最も頻繁に遭遇するバイオフィルム疾患のひとつである。特に重度早期小児う蝕（S-ECC）は痛みや不快感から、小児の健康や生活の質に影響を及ぼし問題となっている。本研究では S-ECC 発症に関して、パラサイト側として *Candida albicans* (*C. albicans*) 保菌との関連を、宿主側として S-ECC 動物モデル確立のため、エナメル質形成不全症 (amelogenesis imperfecta, AI) モデルを確立し、硬組織の形態変化を野生型と比較検討した。

近年、*C. albicans* 保菌と小児う蝕発症の関連性を示す報告が国外で相次いでおり、重度早期小児う蝕（S-ECC）に罹患する小児の歯垢からは *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) とともに *C. albicans* が高頻度で検出されている。さらに、歯垢から分離した *C. albicans* は母子間で遺伝的類縁性が高く、小児期に *C. albicans* が検出される一因として母子感染が有力視されている。しかし、小児の *Candida* 保菌とう蝕の関連性が本邦の疫学研究で取り上げられた形跡はなく、その実態は未知である。そこで、研究 1 では、日本人小児集団における *C. albicans* の検出率、母子間の遺伝的類縁性および遺伝子型分類を調査した。なお、本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認（EC-2028）を得た。

エナメル質形成不全は、う蝕を発症するリスクが健全歯よりも 15 倍高く、S-ECC 発症のリスク因子として報告されている。そこで、研究 2 では、AI を呈するマウス系統 *Enam*^{Rgsc514} を用い、変異のホモ接合体およびヘテロ接合体の、歯胚形成および萌出後のエナメル質の性状について形態変化の観察を行い、S-ECC 動物モデルの確立を試みた。本研究は、日本大学松戸歯学部動物倫理委員会の承認（AP15MD014-1）を得、日本大学松戸歯学部実験動物指針に基づいて行った。

研究 1 として、日本大学松戸歯学部付属病院小児歯科を受診した、乳歯列完成期から混合歯列期の 3 歳以上 10 歳未満の全身状態の良好な小児とその母親を対象に、う蝕に罹患した小児（Caries 群）の母子 55 組とう蝕の無い小児（Caries Free : CF 群）の母子 25 組を対照群として試料採取を行った。過去 3 ヶ月以内に抗菌薬または抗真菌薬を服用した小児およびその母親は除外した。

小児の背景情報（年齢、性別、1 日の歯磨き回数、3 ヶ月以内の抗菌薬の服用、低出生体重児）と食事情報（間食内容、間食頻度、1 日のジュース摂取量）に関して、記述式アンケートにて調査を行った。また、母子の口腔内診査を行い、dmft (s) /DMFT (S) を記録した。全ての母子より歯垢試料を採取し、*S. mutans* と *C. albicans* の微生物データ（検出率と生菌数）を解析した。さらに、歯垢から分離した 118 株の *Candida* 属を *arbitrarily primed polymerase chain reaction* (AP-PCR 法) を用いて評価した。

重回帰分析の結果、dmft (s) 値と 1 日の歯磨き回数との間に関連性は認められなかった。また、砂糖を含む食品の中でチョコレートとグミが dmft 値に有意に関連した（チョコレート： $p < 0.01$ 、グミ： $p = 0.014$ ）。さらに、Caries 群小児の半数以上が間食を 1 日 2 回以上摂り（52.7%）、ジュースを日常的に摂取していた（58.2%）。*C. albicans* 検出率は、Caries 群（子：25.5%、母：47.3%）が CF 群（子：0%、母：24.0%）よりも高く、*S. mutans* の生菌数は、Caries 群で有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。さらに、*Candida* 陽性児の 92.9% が S-ECC と診断され、Caries 群母子から分離された *Candida* 菌の 79.7% が菌株レベルで類似性を示した。Caries 群小児の歯垢中の *C. albicans* は遺伝子型 A が最も優勢（70.6%）であり、遺伝子型 D がそれに続いた（17.6%）。

研究 2 として、理化学研究所バイオリソース研究センターから 9 週齢のエナメル質形成不全マウス *Enam*^{Rgsc514/+}（変異ヘテロ接合体）を購入し、交配によって *Enam*^{Rgsc514/Rgsc514}（変異ホモ接合体）、*Enam*^{Rgsc514/+} および *Enam*^{+/+}（野生型）それぞれ 6 頭、合計 18 頭を得た。エナメル芽細胞が基質分泌を開始する時期の歯胚状態を、生後 3 日および 6 日齢のマウスを用い組織学的観察を行った。さらに、萌出後の白歯エナメル質の性状を 10 週齢のマウス用い、実体顕微鏡、マイクロ CT および走査電子顕微鏡（SEM）にて観察した。

3日齢の $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}+/+}$ では規則的に配列したエナメル芽細胞と象牙質形成を認め、 $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/Rgsc514}}$ においては野生型と同様に密なエナメル芽細胞層が観察できるが、わずかに細胞の配列に乱れを認めた。6日齢の $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/Rgsc514}}$ のエナメル芽細胞は、細胞極性および円柱状構造を失い、規則的な配列は認めなかった。また、象牙質に接した嚢胞様の構造体とその内部に泡沫状の空隙を認めた。実体顕微鏡による第一臼歯表面の観察では10週齢の $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}+/+}$ で僅かに粗造な面を認め $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/Rgsc514}}$ では明らかな粗造を認めた。マイクロCT画像から $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/Rgsc514}}$ にはエナメル質は認められず、SEM像から $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}+/+}$ のエナメル質の表層部に小柱配列の乱れと消失を認めた。 $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/Rgsc514}}$ では、小柱構造をもつエナメル質は存在しなかった。

結論として、本研究より、日本人小児の口腔内における *C. albicans* の存在が S-ECC 発症のリスク因子となることが示唆された。また、日本人小児の歯垢中の *C. albicans* は母親に由来する可能性が高く、う蝕の病因に基づく母子口腔保健指導に新たな知見を提供した。さらに、本研究で確立し、形態変化を観察した AI マウスは、S-ECC 発症の機序を見出す研究モデルとなることが示唆された。今後、*S. mutans* および *C. albicans* の AI 動物モデルへの感染実験を行い、S-ECC と AI との関連性をさらに検証していく。