

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

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻  
小児歯科学  
太田雪菜

（指導：清水 武彦教授）



## 目次

要 旨 .....	3
研究 1	
緒 言 .....	5
材料および方法 .....	6
結 果 .....	9
考 察 .....	10
研究 2	
緒 言 .....	24
材料および方法 .....	25
結 果 .....	27
考 察 .....	29
結 論 .....	31
参考文献 .....	39

本論文は、主となる参考論文「Association between *Candida albicans* and childhood dental caries in Japanese children.」(Pediatric Dental Journal, 掲載予定)と副となる参考論文「エナメル質形成不全症を示すエナメルリン遺伝子変異マウスのエナメル質形成の解析」(日大口腔科学, 第48巻, 第3号, 130~137項, 2022年)をまとめたものである。

## 要旨

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、ホスト側として 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。

### 研究 1

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。

Caries 群 55 組と Caries Free(CF)群 25 組の母子から歯垢試料を採取し、*Streptococcus mutans* (*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。

*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 ( $p < 0.05$ )。また、*Candida* 陽性児の 92.9%が重度早期小児う蝕(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%)。

*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、さらには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。

### 研究 2

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。研究 2 では、AI を呈するマウス系統 *Enam*<sup>Rgsc514</sup> 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。

マウス *Enam*<sup>Rgsc514/+</sup> を交配し *Enam*<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup>, *Enam*<sup>Rgsc514/+</sup> および *Enam*<sup>+/+</sup> を得た。3 および 6 日齢の第一臼歯の歯胚の観察、実体顕微鏡およびマイクロ CT による 10 週齢の臼歯部の観察と走査電子顕微鏡(SEM)による臼歯水平断の観察を行った。

3 日齢の *Enam*<sup>Rgsc514/+</sup> では規則的に配列したエナメル芽細胞と象牙質の形成を認め *Enam*<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup> においても密なエナメル芽細胞層を認めるが、わずかに細胞配列の乱れを認めた。6 日齢の *Enam*<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup> 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

則的な配列は見られずまた、象牙質に接した囊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 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。3 日齢の  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/Rgsc514}}$  でエナメル芽細胞の分化と基質の分泌が認められ、6 日齢で正常なエナメル質が認められないことから、3～6 日齢の間にエナメル芽細胞が崩壊したことが明らかとなった。

## 研究 1

### 緒言

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り、世界で約 5 億 3,000 万人の小児が罹患している<sup>1)</sup>。その中でも特に、重度早期小児う蝕(S-ECC)は、痛みや不快感を引き起こし、小児の健康、ウェルビーイング、生活の質に悪影響を及ぼす<sup>2)</sup>。本邦では S-ECC を含む小児う蝕の有病率が着実に減少している一方、3 歳児の早期小児う蝕(ECC)の有病率は 7.18%~20.65%と、地域によって格差が大きい<sup>3)</sup>。このような健康格差は階段状の「社会的勾配」を示し、「一部の人がだけ罹患する」という二極化ではなく、すべての人々に影響を与えているという点で、本邦でも大きな問題となっている<sup>4)</sup>。小児う蝕は軽症であっても罹患率が極めて高いため、発展途上国のみならず先進国においても公衆衛生上重要な問題のひとつである<sup>5,6)</sup>。

S-ECC の微生物学的病因は、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*)の感染と関連している。近年、多くの疫学的研究によって、*Candida albicans* (*C. albicans*) が主要なう蝕病原菌である *S. mutans* とともに、S-ECC 罹患児の歯垢から高頻度で検出されることが示されている<sup>7-9)</sup>。また、う蝕の無い小児と比較して ECC 罹患児は *C. albicans* の検出率が有意に高く、口腔内に *C. albicans* を保有する小児が ECC を経験する確率は、保有していない小児よりも 5 倍高いと報告されている<sup>7)</sup>。さらに、S-ECC 罹患児の母親も *C. albicans* の検出率が高く、母子の *C. albicans* 分離株の遺伝的類縁性も高い<sup>8)</sup>ことから、小児の早い時期に *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。

また、*C. albicans* は実験室レベルにおいて、物理的、生化学的、代謝的な仕組みを介し、*S. mutans* と協働しながら高齶蝕原性の複合バイオフィルムを形成することが報告されている<sup>10,11)</sup>。*S. mutans* 由来のグルコシルトランスフェラーゼ B は *C. albicans* の細胞表面に強く結合し、スクロースから多量の菌体外多糖(EPS)を真菌表面で合成する<sup>12,13)</sup>。*C. albicans* の表層で合成された EPS は酸の拡散を制限することで局所的な低 pH 環境を歯表面に形成し、その結果エナメル質と象牙質の脱灰を促進する<sup>10,14,15)</sup>。この *S. mutans* と *C. albicans* のユニークな相互作用はう蝕病原性を相乗的に増強し、ECC 動物モデルの平滑面う蝕数および重症度を著しく増加させることも明らかにされている<sup>16)</sup>。

*C. albicans* が強力なう蝕原性病原体であることは多くの先行研究から支持されているが、小児における *Candida* 保菌と小児う蝕の関連性を検討した研究は、本邦では行われていない。そこで研究 1 では、口腔内の *C. albicans* の存在が日本人集団におけるう蝕の微生物的危険因子の指標となり得る可能性を検証するため、日本人母子の *C. albicans* の検出率、遺伝的類縁性、および遺伝子型分類を調査した。

## 材料および方法

### 1. サンプルサイズの決定方法

サンプルサイズの算出は、予備研究において小児と母親が *C. albicans* の類似株を共有していると推定された割合(78%)と、母子の *C. albicans* 類似性を示した先行研究において報告された割合(14~61%)に基づいて行った<sup>8,17,18)</sup>。報告された比率の平均値(38%)を帰無仮説として設定し、 $\alpha = 0.05$  の片側  $z$  検定を行った。 $z$  検定は、統計ソフト R version 4.0.2 を用いて実施した。その結果、90%の検出力を得るために必要な母子のサンプルサイズは 13 組であった。

### 2. 対象

研究対象者は、2021 年 6 月から 2023 年 4 月までに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 80 組である。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。参加者は、う蝕に罹患した小児とその母親(Caries 群 55 組)、う蝕の無い小児とその母親(Caries Free (CF) 群 25 組)の 2 群に分類した。また、本研究に参加する前に、研究内容を十分に説明し、保護者から書面による同意を得た。なお、本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認を受けた(EC20-28)。

### 3. アンケート調査と DMFT の記録

対象と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)、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。

### 4. 歯垢採取方法

歯垢試料は、滅菌後の探針とスプーンエキスカベーターを用いて全歯面から採取し、1 ml の 0.89%生理的食塩水中に懸濁した。う窩が存在する場合はう窩中の歯垢も同時に採取した。Xiao ら<sup>8)</sup>の方法に基づき、採取した歯垢試料を攪拌、超音波処理(20 W で 10 秒間超音波処理後、氷上に 30 秒間静止、以上を 3 回繰り返す)後、生理食塩水で調製し、2 時間以内に培地へ植菌した。

### 5. *C. albicans* と *S. mutans* の培養

$10^1$ - $10^{-1}$  に調製した歯垢試料を CHROMagar™ Candida 培地(関東化学, 日本)に 50  $\mu$ L ずつ植菌し、37°C で 48 時間培養後 *C. albicans* を分離した。CHROMagar™ Candida 培地上の緑色のコロニーを、Odds ら<sup>19)</sup>の報告に基づき、*C. albicans* 候補として用いた。一方、*S. mutans* の分離には、 $10^{-2}$  から  $10^{-5}$  に段階的に希釈した歯垢試料を Mitis Salivarius



Bacitracin 寒天平板培地(MSB 培地)に 50  $\mu$ L ずつ植菌し, 37°Cで 48 時間培養後, MSB 培地上で生育したラフ型コロニーを *S. mutans* とした。

#### 6. *C. albicans* の同定と遺伝子型判定

CHROMagar™ Candida 培地上のコロニー色での識別が困難な 3 種類の *Candida* 属, *C. albicans* (薄緑色), *Candida dubliniensis* (濃緑色)<sup>20)</sup>, *Candida tropicalis* (濃青色)を同定可能なプライマーを Fukatsu ら<sup>21)</sup>の報告に基づき作成した(表 1)。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)において, *C. albicans* SC5314 株をポジティブコントロール, *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*) IFM54605 株と *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) JCM1541 株をネガティブコントロールとして使用した。Fukatsu ら<sup>22)</sup>の報告に基づき, コロニーを 1 mL の蒸留水に懸濁し, その懸濁液 5.6  $\mu$ L を PCR の鋳型とした。PCR 増幅条件は, 98°Cで 2 分間の熱変性と, 98°Cで 10 秒間, 68°Cで 1 分間の伸長反応を 30 サイクル行った。PCR 産物は 2.0%アガロースゲルを用い, 100V で 40 分間の電気泳動を行い, 増幅された断片長から *C. albicans* を同定した(図 1)。分子量マーカーとして 100 bp DNA Ladder Dye Plus (タカラバイオ, 日本)を用いた。遺伝子型判定は McCullough ら<sup>23)</sup>が記載した CA-INT-L および CA-INT-R プライマー (表 2) を用い, 同条件下で PCR および電気泳動を行い, 増幅された断片長から 5 つの遺伝子型 (A : 450 bp, B : 840 bp, C : 450,840 bp, D : 1080 bp, E : 1400 bp)に分類した(図 2)。

#### 7. DNA 抽出

母子から分離した 118 株の *C. albicans* から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, オランダ)のグラム陽性菌プロトコルを用いて, DNA を抽出した。

#### 8. 系統樹の作成と *C. albicans* の遺伝的類縁性の評価

PCR は 5'-CCGGCGCG-3'プライマーを用いて行った。3  $\mu$ L Premix Taq (TaKaRa Taq  $\mu$ Version 2.0), 5 ng DNA, および 5  $\mu$ M プライマーからなる PCR 溶液を調製し, PCR グレードの水で 10  $\mu$ L に希釈した。PCR は Kimijima ら<sup>24)</sup>の報告に基づき行った。PCR 産物はキャピラリー電気泳動装置 MCE-202 MultiNA (島津, 京都, 日本)を用いて確認した。遺伝子型はバンドの有無によりそれぞれ 0 または 1 とした。統計ソフト R version 3.4.3 を用いて, 非荷重結合法(UPGMA 法)に基づいて系統樹を作成した(図 3)。系統樹は, 0.2(*C. albicans* と *C. dubliniensis* の分岐点)を目安に 5 つのクラスターに分類し, 同じクラスターに分類される *Candida* 菌株は, 遺伝的に類似と判断した。

#### 9. 統計学的解析

Welch の t 検定と dmft 値を目的変数とした重回帰分析にて *p* 値を算出した。また, う蝕の重症度に影響する食事因子を絞り込むために, dmft 値を目的変数とし, 砂糖を含む食品

(チョコレート, グミ, アメ・キャンディー, クッキー), 間食頻度, 毎日のジュース摂取を説明変数として重回帰分析を行った。さらに, ロジスティック回帰分析を行い, 小児の口腔内 *C. albicans* 保菌に対する砂糖を多く含む食品の影響を評価した。すべての統計学的処理は統計ソフト R version 4.0.2 を使用し, 統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。

## 結果

まず、対象者の背景情報をアンケート調査にて評価し、口腔内診査より母子の dmft(s)/DMFT(S)を記録した。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(表3)。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： $p=0.014$ )(表4)。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%)(表4)。CF 群の母親は、DT/S，MT/S，FT/S，DMFT/S 値が、Caries 群の母親よりも有意に低かった( $p<0.05$ )(表5)。

次に、う蝕に罹患した小児が口腔内に *C. albicans* を保菌する割合を確認するために、培養と PCR 法を組み合わせ *C. albicans* の同定を行った。表5に示すように、*C. albicans* は、Caries 群の母子より高頻度で検出された(母：47.3%，子：25.5%)。また、解析の結果、砂糖を含む食品の中でも特にチョコレートの摂取は、小児の口腔内 *C. albicans* 保菌に大きな影響を及ぼすことが示唆された(OR:8.96, CI:1.08-74.13,  $p=0.042$ )(表6)。さらに、*Candida* 陽性児(CA+児)の92.9%が S-ECC と診断され、*Candida* 陰性児(CA-児)に比べ、*S. mutans* の生菌数が約3倍多く、未処置歯数(dt 値)も有意に多かった(表7)。一方、背景情報(説明変数)はどの項目も、CA+児と CA-児の dmft 値(目的変数)とは関連性を認めなかった(重回帰分析； $p>0.05$ )。

*S. mutans* の生菌数もまた、Caries 群の母子で有意に多かった( $p<0.05$ ；表5)。これらの結果は、う蝕に罹患する小児の歯垢中に *S. mutans* とともに *C. albicans* が高頻度に存在するというこれまでの知見を支持するものであった<sup>7-9)</sup>。

*C. albicans* は Caries 群と CF 群の母親から検出されたが、Caries 群の母親は CF 群の母親に比べて *C. albicans* の検出率が2倍、生菌数が45倍高かった。口腔内の *C. albicans* 検出率は高い方から順に、Caries 群母親(47.3%)>Caries 群小児(25.5%)>CF 群母親(24.0%)>CF 群小児(0%)であった(表5)。このことから、母親の *C. albicans* 検出率が高いほど、子の *Candida* 検出率も高いことが示された。先行研究<sup>9)</sup>と同様、本研究でも CF 群小児から *C. albicans* は検出されなかった。

さらに、*C. albicans* の母子感染を確認するために、15組の母子から採取した118の *Candida* 分離株を用いて arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR 法)を行った。AP-PCR 法の結果、79.7%もの *C. albicans* 分離株が母子間で遺伝的に類似しており(表8)、母親がう蝕における *C. albicans* の感染源である可能性が示された。さらにこれらの知見を、26SrRNA 遺伝子を標的とした遺伝子型判定によって検証した。現在までに、*C. albicans* は5つの遺伝子型が確認されている(A, B, C, D, E)<sup>25)</sup>。遺伝子型判定の結果、Caries 群小児の69.5%が母親と同じ遺伝子型を共有していた(表8)。また、*C. albicans* 遺伝子型 A が最も優勢(70.6%)であり、遺伝子型 D(17.6%)がそれに続いた(表9)。

## 考察

本邦の疫学研究において小児の *C. albicans* 保菌と小児う蝕との関連性が取り上げられた形跡はなくその実態は未知である。本研究では、培養法と分子系統解析を併用し、CA+児のほぼ全員が S-ECC に罹患していること、母子の約 80% が菌株レベルで類似した *C. albicans* を共有していることを示した。

近年、*C. albicans* がう蝕の発症と密接な関連性を示す研究が増加している<sup>26, 27)</sup>。*C. albicans* は、う蝕のない小児とその母親よりも ECC に罹患する小児とその母親の歯垢中から多く検出される<sup>8)</sup>。また、*C. albicans* は ECC 患児の歯垢中において、*gtfB* mRNA の発現を誘導し<sup>28)</sup>、Gtf 酵素活性を増強することによって、*S. mutans* の菌量を増加させることが示されている<sup>29)</sup>。さらに、CA+児の 92.9% が S-ECC と診断され、CA+児は CA-児に比べて *S. mutans* の生菌数が約 3 倍多く、未処置歯数(dt 値)が有意に多かった。しかし、CA+児と CA-児の dmft 値と医学的・社会的・人口統計学的背景の関連性は認められなかった(表 7)。この結果は、少なくとも本研究において、微生物的要因が背景情報よりもう蝕の進行に関与し、真菌の存在が S-ECC の重症度を増加させることを示唆している。さらに、間食時のチョコレート摂取は、小児の口腔内 *C. albicans* 保菌の最も重大な危険因子であった(OR: 8.96, CI: 1.08-74.13,  $p=0.042$ )(表 6)。チョコレートは固形物で歯質への粘着性を持ち口腔内で停滞しやすい。また、これは「生態学的プラーク仮説」<sup>30)</sup>により説明がつく。つまり、糖への曝露が引き金となり、プラークの生態学的バランスは酸性環境へと移行する。その結果、酸産生能と耐酸性能をもつ微生物種(*S. mutans* や *C. albicans* など)の割合を急増させ、プラークのう蝕原性を高めるのである。しかし、本研究において、間食習慣(間食頻度、1 日のジュース摂取量)と dmft 値に有意な関連性は認められなかった(表 4)。本研究は、間食の摂り方(いつ、どのように、どのくらいの時間をかけて)に焦点を当てた訳ではなく、日本人集団の微生物プロファイルに重点を置いた研究デザインのためである。

また、母子が口腔微生物の組成と多様性を共有することから、小児の口腔微生物叢は母親の強い影響下にある<sup>8, 29, 31)</sup>。AP-PCR 法を用いて作成した系統樹より 118 株の *Candida* 菌を 5 つのクラスターに分類したところ、Caries 群小児の 79.7% が母親と類似した *C. albicans* 株を保有していることが明らかになった(表 8, 図 3)。さらに、CF 群母子と比較して、Caries 群母子は歯垢中の *C. albicans* 検出率が高かった(子: 25.5% 対 0%, 母: 47.3% 対 24.0%, 表 5)。*Candida* 菌母子感染に関する既存の報告と合わせると、本研究結果は、母親の口腔内の *C. albicans* 保菌が、日本人小児の *C. albicans* への感染と ECC 発症のリスク指標となる可能性を示した。したがって、母親への口腔保健指導の重要性が示唆された。

*C. albicans* は、26SrRNA 遺伝子を標的とした PCR 解析により 5 つの遺伝子型(A, B, C, D, E)に分類される<sup>24)</sup>。これらの中で遺伝子型 A が最も頻繁に検出される<sup>9, 32)</sup>。本研究結果では Caries 群小児の歯垢から *C. albicans* 遺伝子型 A が 70.6% と最も多く検出され、次いで遺伝子型 D が 17.6% 検出された(表 8, 表 9)。*C. albicans* 遺伝子型 D は *C. dubliniensis*<sup>22)</sup> と同一であり、1995 年に HIV 感染者の口腔から初めて分離された *Candida* 属のひとつ

である<sup>33)</sup>。興味深いことに、*C. dubliniensis* は全身疾患のない齲蝕罹患児において優勢な真菌とされ<sup>34)</sup>、小児の齲蝕重症度とともに存在量が増加することが報告されている<sup>35)</sup>。しかし、う蝕の発症と重症化における *C. dubliniensis* の役割に関して詳細なメカニズムを解明するためにはさらなる調査が必要である。

本研究は日本人の母子集団における口腔内 *Candida* 保菌と小児う蝕の関連を調査した横断的研究であり、*C. albicans* の存在がう蝕の発症に及ぼす影響を分析するための母子コホート研究の枠組みとなる。しかし、本研究にはいくつかの限界点が存在する。第一に、*C. albicans* の保菌と S-ECC 発症との因果関係を示す証拠は得られていない。したがって、この限界は縦断的な追跡研究で解決する必要がある。また、ナノテクノロジーに基づく治療アプローチが、う蝕原性 *S. mutans*-*C. albicans* 複合バイオフィルムの阻害に有望な効果を示していることも意義深い<sup>36, 37)</sup>。第二の限界点は、得られた臨床分離株をバイオフィルム状態で評価していないことである。今後の展開として、臨床分離株でバイオフィルムモデルを構築し、その表現型を解析する。同時に、う蝕原性の細菌・真菌複合バイオフィルムの形成阻害と S-ECC の制御に向けて、これらの治療法が臨床分離バイオフィルムに対しても有効かどうかを検証していく必要がある。

表 1 *Candida* 属同定用PCRプライマー

	領域	名称	配列 (5'-3')	ポジション	サイズ
<i>C. albicans</i>	<sup>a</sup> IGS	CAO1	CGTTTTTGCAGTGTGAAACTGCG	1569-1591	624 bp
		CAO2	TCTTCCCGCGCCCAAGCCTC	2174-2193	
<i>C. dubliniensis</i>	IGS	CDO1	CTGACAATTCTAAATCCACCAGTG	727-750	405 bp
		CDO2	CCTGGTCACGTGACCGGAGTTGG	1110-1132	
<i>C. tropicalis</i>	IGS	CTO1	GGCTGATTTATAGTCGATCTCCT	675-697	139 bp
		CTO2	CACACCATAAAAATACCCTTCGG	792-814	

<sup>a</sup>IGS : intergenic spacer

表2 遺伝子型判定用PCRプライマー

名称	配列 (5'-3')
CA-INT-L	ATAAGGGAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAA
CA-INT-R	CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT

表3 背景情報の比較

		子供			母親		
		Caries (n = 55)	CF (n = 25)	p 値	Caries (n = 55)	CF (n = 25)	p 値
年齢: mean ± SD		4.6 ± 1.2	5.6 ± 1.7	0.062	35.9 ± 5.2	37.4 ± 6.3	0.592
性別: % (n)	男	61.8 (34)	64.0 (16)	0.637			
	女	38.2 (21)	36.0 (9)	0.637			
養育環境: % (n)	幼稚園	54.5 (30)	20.0 (5)	0.739			
	保育園	34.5 (19)	28.0 (7)	0.782			
	小学校	7.3 (4)	48.0 (12)	0.068			
	自宅	3.6 (2)	4.0 (1)				
歯磨き回数 (回/日): % (n)	≥2	78.2 (43)	76.0 (19)	0.670			
	1	21.8 (12)	24.0 (6)	0.670			
3か月以内の抗菌薬服用: % (n)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
低出生体重児: % (n)		7.3 (4)	0 (0)	0.260			

\*有意差あり (重回帰分析,  $p < 0.05$ )



表4 砂糖を含む食品とdmft値の関連性

	子供		
	Caries (n = 55)	CF (n = 25)	p値
チョコレート: % (n)	72.7 (40)	48.0 (12)	<0.01*
グミ: % (n)	52.7 (29)	12.0 (3)	0.014*
アメ・キャンディー: % (n)	25.5 (14)	12.0 (3)	0.944
クッキー: % (n)	18.2 (10)	24.0 (6)	0.306
間食回数 (回/日): % (n) ≥2	52.7 (29)	36.0 (9)	0.381
1	47.3 (26)	64.0 (16)	0.381
ジュース <sup>a</sup> 常飲率: % (n)	58.2 (32)	32.0 (8)	0.118

<sup>a</sup>ジュース：果実ジュース, 野菜ジュース, 炭酸飲料, 乳酸菌飲料  
 \*有意差あり (重回帰分析,  $p < 0.05$ )

表5 *C. albicans*・*S. mutans*の検出率、生菌数とう蝕状況の比較

	子供			母親		
	Caries (n = 55)	CF (n = 25)	<i>p</i> 値	Caries (n = 55)	CF (n = 25)	<i>p</i> 値
<i>C. albicans</i> 検出率 % (n)	25.5 (14)	0		47.3 (26)	24.0 (6)	0.06
<i>S. mutans</i> 検出率 % (n)	67.3 (37)	24.0 (6)	0.0002*	76.4 (42)	76.0 (19)	0.9
<i>C. albicans</i> (CFU/ml)	2.8 ± 18.5 × 10 <sup>4</sup>	0		5.7 ± 32.1 × 10 <sup>4</sup>	1.3 ± 3.2 × 10 <sup>3</sup>	0.2
<i>S. mutans</i> (CFU/ml)	3.7 ± 9.5 × 10 <sup>6</sup>	1.8 ± 7.8 × 10 <sup>5</sup>	0.008*	4.0 ± 10.2 × 10 <sup>6</sup>	9.5 ± 21.7 × 10 <sup>5</sup>	0.03*
う蝕状況	dt/DT	7.1 ± 4.1	0	1.4 ± 2.1	0.2 ± 0.5	0.0001*
	mt/MT	0.0 ± 0.1	0	0.7 ± 2.0	0.0 ± 0.2	0.02*
	ft/FT	2.4 ± 3.4	0	11.6 ± 5.0	9.3 ± 5.8	0.09
	dmft/DMFT	9.5 ± 4.7	0	13.7 ± 5.6	9.5 ± 6.0	0.005*
	ds/DS	11.1 ± 8.2	0	3.4 ± 7.5	0.2 ± 0.5	0.002*
	ms/MS	0.1 ± 0.7	0	3.5 ± 9.7	0.2 ± 1.0	0.02*
	fs/FS	6.7 ± 9.9	0	27.1 ± 16.6	21.3 ± 18.5	0.2
	dmfs/DMFS	17.8 ± 12.3	0	33.0 ± 21.1	22.7 ± 18.7	0.03*

\*有意差あり (Welch's *t*-test, *p* < 0.05)

表 6 砂糖を含む食品の *C. albicans* 保菌への影響

	オッズ比	95%信頼区間	<i>p</i> 値
チョコレート	8.96	1.08–74.13	0.042*
グミ	3.35	0.95–11.70	0.058

\*有意差あり ( $p < 0.05$ )

表7 *Candida*陽性児と陰性児の比較

		Caries群小児		
		CA+ (n = 14)	CA- (n = 41)	p値
<i>S. mutans</i> (CFU/ml)		7.2 ± 15.6 × 10 <sup>6</sup>	2.6 ± 6.2 × 10 <sup>6</sup>	0.294 <sup>a</sup>
う蝕状況	dt	8.6 ± 2.7	6.6 ± 4.4	0.047 <sup>a*</sup>
	mt	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.2	0.323 <sup>a</sup>
	ft	2.3 ± 2.8	2.4 ± 3.7	0.912 <sup>a</sup>
	dmft	10.9 ± 3.4	9.5 ± 5.0	0.114 <sup>a</sup>
	ds	14.4 ± 8.2	10.0 ± 8.0	0.096 <sup>a</sup>
	ms	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.8	0.323 <sup>a</sup>
	fs	6.8 ± 7.7	6.6 ± 10.6	0.947 <sup>a</sup>
	dmfs	21.1 ± 9.0	16.7 ± 13.2	0.167 <sup>a</sup>
S-ECC: % (n)		92.9 (13)	61.0 (25)	
年齢: 平均 ± SD		4.8 ± 1.3	4.5 ± 1.1	0.272 <sup>b</sup>
性別 % (n)	男	64.3 (9)	61.0 (25)	0.282 <sup>b</sup>
	女	35.7 (5)	39.0 (16)	0.282 <sup>b</sup>
養育環境: % (n)	幼稚園	57.1 (8)	53.7 (22)	0.926 <sup>b</sup>
	保育園	42.9 (6)	31.7 (13)	0.654 <sup>b</sup>
	小学校	0 (0)	9.8 (4)	0.536 <sup>b</sup>
	自宅	0 (0)	0 (0)	
歯磨き回数 (回/日): % (n)	≥2	78.6 (11)	78.0 (32)	0.461 <sup>b</sup>
	1	21.4 (3)	22.0 (9)	0.461 <sup>b</sup>
3か月以内の抗菌薬服用: % (n)		0 (0)	0 (0)	
低出生体重児: % (n)		7.1 (1)	7.3 (3)	0.358 <sup>b</sup>

\*有意差あり ( $p < 0.05$ )

<sup>a</sup> Welch's *t*-test, <sup>b</sup>重回帰分析

表8 Caries群母子の歯垢から分離された118株の*C. albicans*のクラスター分類と遺伝子型分布, う蝕状況

子供 No.	遺伝子型	クラスター	dmft	dmfs	母親 No.	遺伝子型	クラスター	DMFT	DMFS		
1	1	D	II	7	8	M1	1	D	IV	18	46
	2	D	II				2	D	II		
	3	D	II				3	D	II		
	4	D	IV				4	D	II		
2	1	D	II	20	65	M2	1	A	V	18	47
	2	D	II				2	A	III		
	3	D	II				3	A	V		
	4	D	II				4	D	II		
3	1	B	V	6	18	M3	1	B	V	21	82
	2	B	V				2	B	V		
	3	B	V				3	C	V		
	4	C	V				4	C	V		
4	1	A	V	7	8	M4	1	D	IV	28	108
	2	A	V				2	D	IV		
	3	A	V				3	D	IV		
	4	A	V				4	D	IV		
5	1	A	V	14	36	M5	1	D	IV	10	22
	2	A	V				2	D	IV		
	3	A	V				3	D	IV		
	4	A	V				4	D	IV		
6	1	A	V	9	24	M6	1	A	V	10	10
	2	A	V				2	A	V		
	3	A	V								
	4	A	V								
7	1	A	V	18	34	M7	1	A	V	19	57
	2	A	V				2	A	V		
	3	A	V				3	A	V		
	4	A	V				4	A	V		
8	1	A	V	11	27	M8	1	A	V	14	31
	2	A	V				2	A	V		
	3	A	V				3	A	V		
	4	A	V				4	C	V		
9	1	A	V	12	14	M9	1	A	V	17	28
	2	A	V				2	A	V		
	3	A	V				3	A	V		
	4	A	V				4	A	V		
10	1	A	V	13	30	M10	1	A	V	23	60
	2	A	V				2	A	V		
	3	A	V				3	A	V		
	4	A	V				4	A	V		
11	1	A	V	9	25	M11	1	A	V	8	15
	2	A	V				2	A	V		
	3	A	V				3	A	V		
	4	A	V				4	A	V		
12	1	A	I	8	9	M12	1	A	I	13	43
	2	A	I				2	A	I		
	3	A	I				3	A	I		
	4	A	I				4	A	I		
13	1	B	I	11	18	M13	1	A	I	17	31
	2	B	I				2	A	I		
	3	B	I				3	A	I		
	4	B	I				4	A	I		
14	1	D	I	4	6	M14	1	D	I	10	13
	2	D	I				2	D	I		
	3	D	I				3	D	I		
	4	D	I				4	D	I		
15	1	A	I	8	11	M15	1	A	I	13	18
	2	A	I				2	A	I		
	3	A	I				3	A	I		
	4	A	I				4	A	I		

遺伝子型母子一致率: 69.5% (82/118)

クラスター分類母子一致率: 79.7% (94/118)

表9 *C. albicans* 26SrRNA遺伝子型での分類

		遺伝子型分類				
		A	B	C	D	E
子供	Caries (%)	70.6 (12)	11.8 (2)	5.9 (1)	17.6 (3)	0 (0)
母親	Caries (%)	44.4 (16)	13.9 (5)	22.2 (8)	30.6 (11)	0 (0)
	CF (%)	42.9 (3)	28.6 (2)	14.3 (1)	14.3 (1)	0 (0)

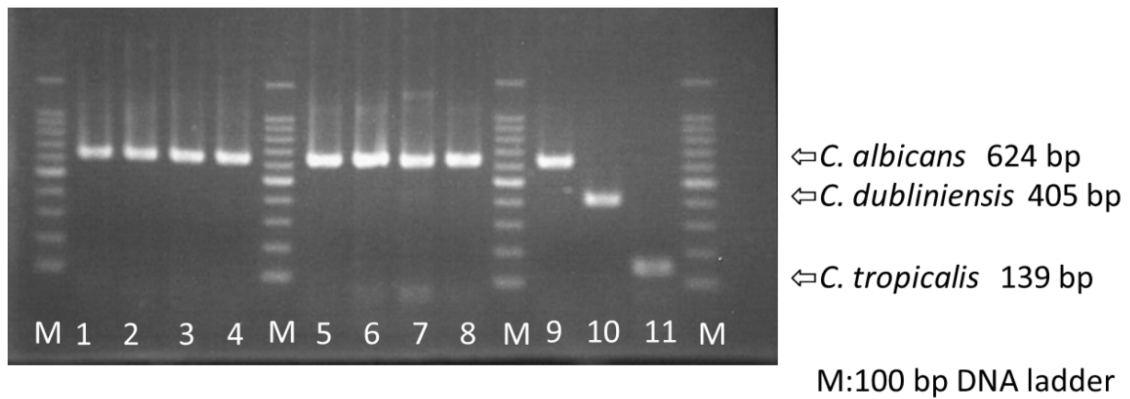


図 1 Multiplex PCR による *C. albicans* 同定の一例

PCR 産物のサイズは約 624bp で，バンド 1~8 は *C. albicans* である。分子サイズマーカーは M と表示したレーンに示し，対応するサイズを右側に示した。

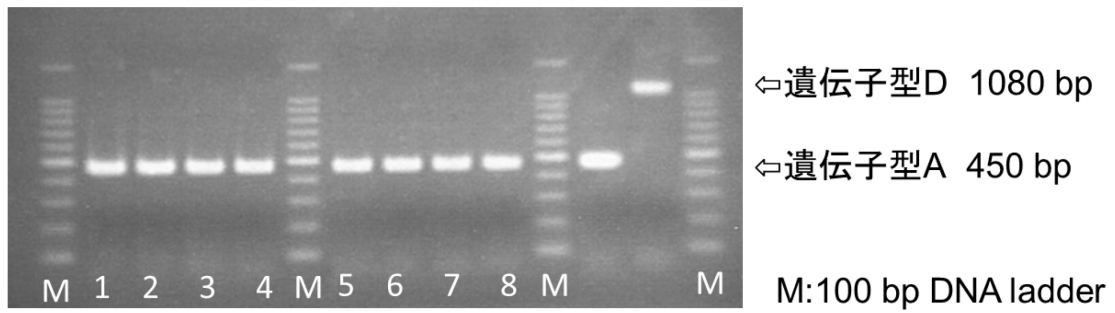


図 2 *C. albicans* 遺伝子型分類のための PCR 一例  
 バンド 1~8 は *C. albicans* 遺伝子型 A である。分子サイズマーカーは M と表示したレーン  
 に示し、対応するサイズは右側に示した。





## 研究 2

### 緒言

エナメル質形成不全症(amelogenesis imperfecta, AI)は遺伝性の疾患であり、歯の表面を覆う高度に石灰化・結晶化したエナメル質に全顎にわたる白濁や着色、実質欠損や形態異常を伴う疾患である<sup>38, 39)</sup>。近年、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<sup>40, 41)</sup>。AIの症状はエナメル質の様々な性状から、①形成不全型(薄いエナメル質)、②低成熟型(正常な厚み、易破折性)、③低石灰化型(急速な咬耗)、④タウロドンティズムを伴う低成熟・形成不全型の4つの型に分類されている<sup>42)</sup>。AIの発症率は報告により様々であるが、おおよそ1万人に1人程度と報告<sup>43, 44)</sup>されており、小児歯科臨床においては遭遇することが多い疾患である<sup>45, 46)</sup>。

AIはエナメル質の発生過程で異常が発生すると生じると考えられている。外胚葉由来の細胞から分化したエナメル芽細胞が、エナメル基質を分泌しエナメル質を形成する。エナメル芽細胞で特異的に発現する分子には、エナメル基質のアメロジェニン<sup>47)</sup>、エナメリン<sup>48)</sup>、アメロラスチン<sup>49)</sup>、アメロチン<sup>50)</sup>に加え、蛋白分解酵素であるエナメリシン(matrix metalloproteinase-20; MMP-20)<sup>51)</sup>や転写因子であるエピプロフィン<sup>52)</sup>などがある。これらはAIの原因遺伝子となっていることが多く<sup>53)</sup>、これら分子の解析がAI発症メカニズムの解明や、将来的な治療法開発への応用に寄与すると考えられる。

遺伝子機能や高次の生命現象を解明する手法の1つに、モデル生物の突然変異体の解析がある。1990年後半から点突然変異を高頻度に誘発するアルキル化剤のエチルニトロソウレア(ENU)をマウスに用いた突然変異体の作製(ミュータジェネシス)プロジェクトが国際的に行われた<sup>54)</sup>。本邦でも大規模ENUミュータジェネシスプロジェクトが行われ、ヒト遺伝性疾患のモデルとなる変異マウスが数多く作製された<sup>55)</sup>。このプロジェクトにおいて、歯科領域では遺伝性を有するAIモデルマウスが複数作製され、そのうち3系統の原因遺伝子が連鎖解析により、マウス第5番染色体に存在することが判明し、その表現型はヒトAIの形成不全型と低成熟型に相当する2種類に大別された。塩基配列解析から、これらの変異マウスはエナメリン遺伝子にDNAの塩基置換があることが確認されている<sup>56)</sup>。

研究2では、形態変化の観察とS-ECC動物モデル確立のため、AIを呈する変異マウスのうち形成不全型を示すマウス系統 Enam<sup>Rgsc514</sup>(M100514)を用い、これまでに報告のあったAIの表現型に加えて<sup>56, 57)</sup>、変異のホモ接合体およびヘテロ接合体において、エナメル芽細胞が基質分泌を開始する時期の歯胚状態および萌出後の白歯エナメル質の性状について検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

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  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/+}}$  (変異ヘテロ接合体) を購入し、交配によって  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/Rgsc514}}$  (変異ホモ接合体)、 $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/+}}$  および  $\text{Enam}^{+/+}$  (野生型) それぞれ6頭、合計18頭を得た。新生児マウスを用いた組織学的検討では、生後3日および6日齢のマウスを用い、実体顕微鏡、マイクロCTおよび走査電子顕微鏡(SEM)での観察には10週齢のマウスを用いた。固形飼料と滅菌蒸留水(DW)を自由摂取とした。なお本研究は日本大学松戸歯学部動物倫理委員会の承認を得、日本大学松戸歯学部実験動物指針に基づいて行った(AP15MD014-1)。

### 2. 遺伝子型の判定

実体顕微鏡、マイクロCTおよびSEMでの観察では、4~5週齢でマウス尾組織を採取し遺伝子型の判定を行った。DNeasy Tissue Kit (QIAGEN社)を用いてDNAを抽出後、エナメルリン遺伝子内に設定したプライマー(表10)およびQIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN社)を用いてPCRで増幅し、電気泳動後の基準(表11)に従って遺伝子型の判定を行った(図4)。PCR増幅条件は1サイクル94°C, 64°C, 72°Cをそれぞれ20秒, 90秒, 60秒で30サイクル行った。

### 3. 組織学的検討

3日齢および6日齢の  $\text{Enam}^{+/+}$ ,  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/+}}$  および  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/Rgsc514}}$  から頭部を摘出した。得られた組織は4%パラホルムアルデヒドに4°Cで24時間浸漬後、10%EDTAで3日間脱灰した。エタノール脱水後、パラフィン包埋し、4 $\mu\text{m}$ の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、上顎左側第一臼歯の歯胚を観察した。

### 4. 実体顕微鏡による観察

10週齢の  $\text{Enam}^{+/+}$ ,  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/+}}$  および  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514/Rgsc514}}$  から頭部を摘出し、軟組織を除去後に上下顎臼歯部を実体顕微鏡下で観察した。

### 5. マイクロCTによる観察

実体顕微鏡の観察で用いた顎骨をマイクロCT(R<sub>m</sub>CT2<sup>®</sup>; Rigaku)にて撮影した。撮影条件は管電圧90kV, 管電流160mA, FOV10mm, 測定時間3分で行った。得られた画像は3D骨形態測定ソフトウェア(TRI/3D-BON; ラトックシステムエンジニアリング)にて観察した。

### 6. SEMによる観察

実体顕微鏡の観察で用いた顎骨から下顎左側第一臼歯を摘出した。得られた臼歯をレジ

ンに包埋し，歯冠の咬頭頂側 1/3 の横断面を耐水ペーパー(#2000)およびダイヤモンドペー  
ストを用いて鏡面研磨した。研磨表面に 40%リン酸ゲル(K エッチャント GEL；クラレノリ  
タケデンタル)を 10 秒間作用させ脱灰後，水洗乾燥した。通法に従い，白金蒸着後に SEM(S-  
3400N；日立ハイテクノロジーズ)を用いて加速電圧 15kV で観察した。

## 結果

### 1. 組織学的検討

3日齢および6日齢の  $\text{Enam}^{+/+}$ ,  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/+}$  および  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/\text{Rgsc514}}$  の上顎第一臼歯歯胚の組織像を図5に示す。3日齢の  $\text{Enam}^{+/+}$  および  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/+}$  では規則的に配列したエナメル芽細胞に接してエオジンに濃染するエナメル基質と象牙質の形成が認められた(図5 AB EF)。  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/\text{Rgsc514}}$  においても密なエナメル芽細胞層とエナメル基質を認めるが、わずかに細胞配列の乱れを認めた(図5 I)。また、  $\text{Enam}^{+/+}$  および  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/+}$  と比較しエナメル芽細胞がエナメル基質から剥離する像が見られた(図5 J)。

6日齢では  $\text{Enam}^{+/+}$  および  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/+}$  ともにエナメル芽細胞の規則性に変化はなく、エナメル質および象牙質の形成が認められた(図5 CD GH)。  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/+}$  では  $\text{Enam}^{+/+}$  と比較しわずかにエナメル質の形成量が少なく(図5 CG), エナメル芽細胞がエナメル質表面から剥離する像が見られた(図5 H)。  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/\text{Rgsc514}}$  では形成され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(図5 KL)。嚢胞様構造体は歯冠近心部に広範囲に認められた(図5 K)。エナメル芽細胞は嚢胞様構造体の外部に存在するが、細胞極性および円柱状構造を失い規則的な配列は認められなかった(図5 L)。

なお3日齢および6日齢ともに象牙芽細胞および象牙質に異常は見られなかった。

### 2. 実体顕微鏡による観察

10週齢の上下顎左側第一臼歯の頬側面観を図6に示す。  $\text{Enam}^{+/+}$  の歯冠部は上下顎とも滑沢なエナメル質で覆われていた(図6 AB)。  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/+}$  では、下顎第一臼歯の表面が  $\text{Enam}^{+/+}$  と比較し僅かに粗造であった(図6 D)。  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/\text{Rgsc514}}$  では、上顎第一臼歯に僅かに光沢面を認めるものの全体に粗造であり、また咬頭は細い形態を示した(図6 E)。下顎第一臼歯の表面に光沢はなく粗造であり、  $\text{Enam}^{+/+}$  および  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/+}$  と比較して近遠心的に小さく、また咬頭頂は咬耗により平坦な形状を示した(図6 F)。

### 3. マイクロCTによる観察

$\text{Enam}^{+/+}$  および  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/+}$  では上下顎とも歯冠表層にエナメル質による不透過領域を認めた(図7 ABCD)。  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/+}$  ではエナメル質の厚さに明瞭な違いは認めなかったが、部分的にエナメル質の欠損を認めた(図7 CD)。  $\text{Enam}^{\text{Rgsc514}/\text{Rgsc514}}$  では、上下顎ともエナメル質は認められなかった(図7 EF)。いずれも象牙質、歯髓腔、歯根および歯根周囲の歯槽骨に特記すべき異常は認められなかった。

### 4. SEMによる観察

10週齢の下顎左側第一臼歯歯冠中央部付近の水平断面のSEM像を図8に示す。  $\text{Enam}^{+/+}$  では象牙質周囲に厚さが均一なエナメル質を認める(図8 A)。強拡大像において、エナメル-象牙境付近から外側に向かい、密に配列した小柱構造がエナメル質表面まで規則正しく

認められた(図 8 B)。Enam<sup>Rgsc514/+</sup>のエナメル質は Enam<sup>+/+</sup>と同様の厚みを示すが、一部厚さが薄く(図 8 C)、同部のエナメル小柱はエナメル-象牙境付近では規則的かつ密に配列しているが、表層部では小柱配列の乱れと消失を認め、エナメル質表層は粗造であった(図 8 D)。Enam<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup>では、小柱構造をもつエナメル質は存在せず、象牙質表層に結晶構造のない一層の被膜様構造を認めるのみであった(図 8 EF)。象牙質には Enam<sup>+/+</sup>、Enam<sup>Rgsc514/+</sup>および Enam<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup>すべてにおいて均質な象牙細管を認めた。

## 考察

エナメル質はアパタイト結晶から成る生体内で高度に石灰化した組織であり、萌出後のエナメル質に存在するタンパク量は0.1~0.3%とごく微量とされている。一方で形成期の幼若なエナメル質には約25~30%のタンパク質が存在し、これらはエナメル質の成熟が進行するにつれ、次第に減少していく。これらのエナメルタンパクの約85%がアメロジェニン、約10%がアメロブラスチンであり、エナメリンは約5%と少ない含有量である<sup>58)</sup>。しかしながら、ヒトAIと関連する遺伝子変異ではアメロジェニンに次いでエナメリンの報告が多い<sup>53)</sup>。今回ヒトAIのモデル動物となるエナメリン遺伝子変異を有するマウス系統Enam<sup>Rgsc514</sup>を用いたが、この変異マウスはエナメリン遺伝子(GenBank: AF303737.1)にA6495Gの点突然変異を有し、Glu<sup>57</sup>からGly<sup>57</sup>のアミノ酸置換を生じる<sup>56)</sup>。この置換は1,274アミノ酸からなるエナメリンのN末端側に存在している。この変異がヘテロ接合体およびホモ接合体でエナメル質にどのような表現型を示すか、歯胚形成期および萌出後のエナメル質の状態を調査した。

歯胚の分化は開始期、蕾状期、帽状期、鐘状期、歯根形成期と進行し、歯冠および歯根が形成される。帽状期の歯胚はエナメル器、歯乳頭、歯小囊から成り、次の蕾状期にかけて、エナメル器の歯乳頭と接する細胞が内エナメル上皮へと分化し、内エナメル上皮がエナメル芽細胞へと分化する。分化の過程で、エナメル芽細胞は次第に高さを増した円柱状となり、核が基底膜と反対方向に移動し極性を持つようになる。象牙芽細胞が先行して分化し、象牙質(象牙前質)の形成が開始されたのちエナメル質の形成が始まる<sup>59)</sup>。

マウスの第一臼歯では系統により若干前後するものの、胎生13日頃に歯堤が形成され、胎生15日頃に帽状期、胎生17日頃に鐘状期初期、生後1、2日頃に象牙質の形成が始まり、生後3日で鐘状期後期に移行しエナメル質の形成が始まる<sup>60)</sup>。今回、組織学的検討で確認した3日齢は、エナメル質および象牙質の形成開始直後であり、6日齢はエナメル質の形成が進行している時期である。Enam<sup>Rgsc514</sup>のエナメル芽細胞の状態とエナメル質の形成状況を確認したところ、Enam<sup>+/+</sup>、Enam<sup>Rgsc514/+</sup>およびEnam<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup>ともにエナメル芽細胞の分化が進み、円柱状の細胞層と基底膜と反対側に核の極性配列が認められ、エナメル基質の分泌が行われていた(図5 BFJ)。このことは、エナメリンの変異によりエナメル芽細胞の初期の分化に影響はなく、石灰化前のエナメル基質の分泌が行われていることを示している。Yanら<sup>55)</sup>は6日齢のEnam<sup>Rgsc514</sup>ホモおよびヘテロ接合体の下顎第一臼歯において、イムノブロット法でアメロジェニンとアメロブラスチンが、正常と若干異なるパターンを示すものの存在していることを報告している。本報告の3日齢の組織像と合わせ、エナメル質形成のごく初期には、変異したエナメリンとアメロジェニンおよびアメロブラスチンの分泌が行われていると考えられる。

6日齢ではEnam<sup>+/+</sup>およびEnam<sup>Rgsc514/+</sup>のエナメル芽細胞の形態は維持されエナメル質の結晶化の進行が認められるが、Enam<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup>では正常なエナメル質は見られず、また、エナメル芽細胞の円柱状形態および極性が失われていた(図5 L)。生後3から6日の間に

エナメル芽細胞の崩壊が生じている。エナメルインはアメロゲニンやアメロブラスチンと同様に分泌後、MMP-20 や Kallikrein4 によって C 末端から連続的に切断され低分子化し、エナメル質結晶の成熟と共に分解・脱却される<sup>61, 62)</sup>。これら低分子のエナメルイン断片のうち変異を生じた断片がエナメル質の結晶化を阻害したため、正常なエナメル質結晶が生成されないこと、エナメル芽細胞内での分解・脱却が進行せずに変異エナメルイン断片が蓄積することで、細胞形態に異常を引き起こしたと考えられる。萌出後の実体顕微鏡、マイクロ CT および SEM による下顎第一臼歯の観察から変異ホモ個体ではエナメル質が認められなかったため、形成中に結晶化できなかつたエナメル質は歯の萌出後に象牙質表面から脱落したと考えられる。

Enam<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup> でエナメル質の欠如が認められた一方で、Enam<sup>Rgsc514/+</sup> ではマイクロ CT 画像からエナメル質の厚さには変化がないが(図 7 CD)、実体顕微鏡による観察からエナメル質表面の粗造を認めた(図 6 D)。SEM 画像から、エナメル-象牙境付近のエナメル小柱の構造は比較的明瞭であるが、表層に向かうに従い小柱配列の乱れと消失を認めている(図 8 D)。このようなエナメル質表層の小柱構造の異常は、エナメルイン遺伝子の N 末端側に変異を有するマウス(Enam<sup>p.S551</sup>)およびヒト(ENAM<sup>p.I31R</sup>)において同様の症状を示す報告がある<sup>63)</sup>。この変異を持つマウスおよびヒトの解析から、エナメル質表層の異常には小胞体ストレスおよび小胞体ストレス応答が関与していると考えられている<sup>63)</sup>。すなわちヘテロ変異ではエナメル質形成の初期段階で正常アレルから翻訳されるタンパク質の機能が優位に働くが、エナメル質形成後期に変異タンパクの蓄積により小胞体ストレスが生じ、このストレスが小胞体ストレス応答の回避能力を越えたため、エナメル芽細胞のアポトーシスを惹起し、主に表層のエナメル質の形成不全が生じると考えられている<sup>63)</sup>。Enam<sup>Rgsc514/+</sup> においてもエナメルインの N 末端側に変異を有するため、同様の機構でエナメル質表面の異常が生じたことが予測される。

これらの結果から、エナメルインはエナメル質形成初期段階から末期にかけて、エナメル質の結晶化に関与するため、変異ホモ個体ではエナメル芽細胞分化後の初期段階からエナメル質形成に障害を生じ、ヘテロ個体では正常な遺伝子からの作用でエナメル質形成が進行するが、変異を有するエナメルイン断片の蓄積により、表層に異常が現れたと考えられる。ヒト AI では両親ともに変異を有し変異がホモとなることは非常に稀であり、ほとんどの変異がヘテロ由来の異常である。ヘテロの変異では正常なエナメルインアレルによるエナメル質形成が進む過程で、エナメルイン遺伝子の変異が影響し、変異部位が異なることによって形成不全型、低成熟型または低石灰化型など異なる表現型を取る可能性がある。ENU ミュータジェネシスにより作製された変異マウスには、他に 2 系統のエナメルイン遺伝子変異マウスが存在する<sup>56)</sup>。今後、Enam<sup>Rgsc514</sup> マウスのみならず異なる複数の変異体の解析によりエナメルインの機能解析が進むと考えられる。



## 結論

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、*C. albicans* と *S. mutans* が共存する場合、砂糖の豊富な食生活が S-ECC 発症の一因となる可能性が示された。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。

表 10 エナメリン遺伝子増幅用 PCR プライマー

Primer No.	配 列
1: 正常配列	5'- CTCCGGTACAGAATATAATACATACCT -3'
2: 変異配列	5'- CTCCGGTACAGAATATAATACATACCC -3'
3: 共通配列	5'- CTCTTTAGAGTTCTGAACTCTGACAG -3'

表 11 遺伝子型の判定

	Enam <sup>Rgsc514/Rgsc514</sup>	Enam <sup>Rgsc514/+</sup>	Enam <sup>+/+</sup>
A: Primer 1+3	−	+	+
B: Primer 2+3	+	+	−

+ : 増幅あり    − : 増幅なし

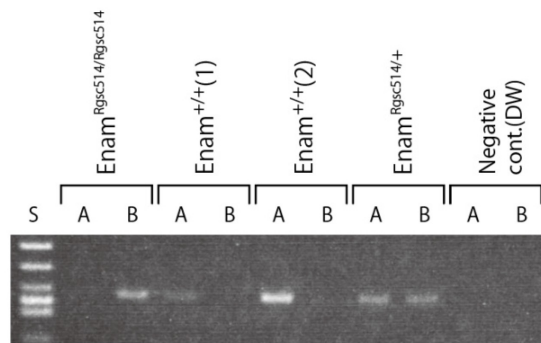


図 4 遺伝子型判定の一例

Enam<sup>+/+</sup>, Enam<sup>Rgsc514/+</sup>および Enam<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup> の遺伝子型判定の結果の一例を示す。369 base pair のバンドの増幅が見られる。

A: Primer 1+3, B: Primer 2+3, S: size marker ( $\phi$  X174-*Hinc* II digest)

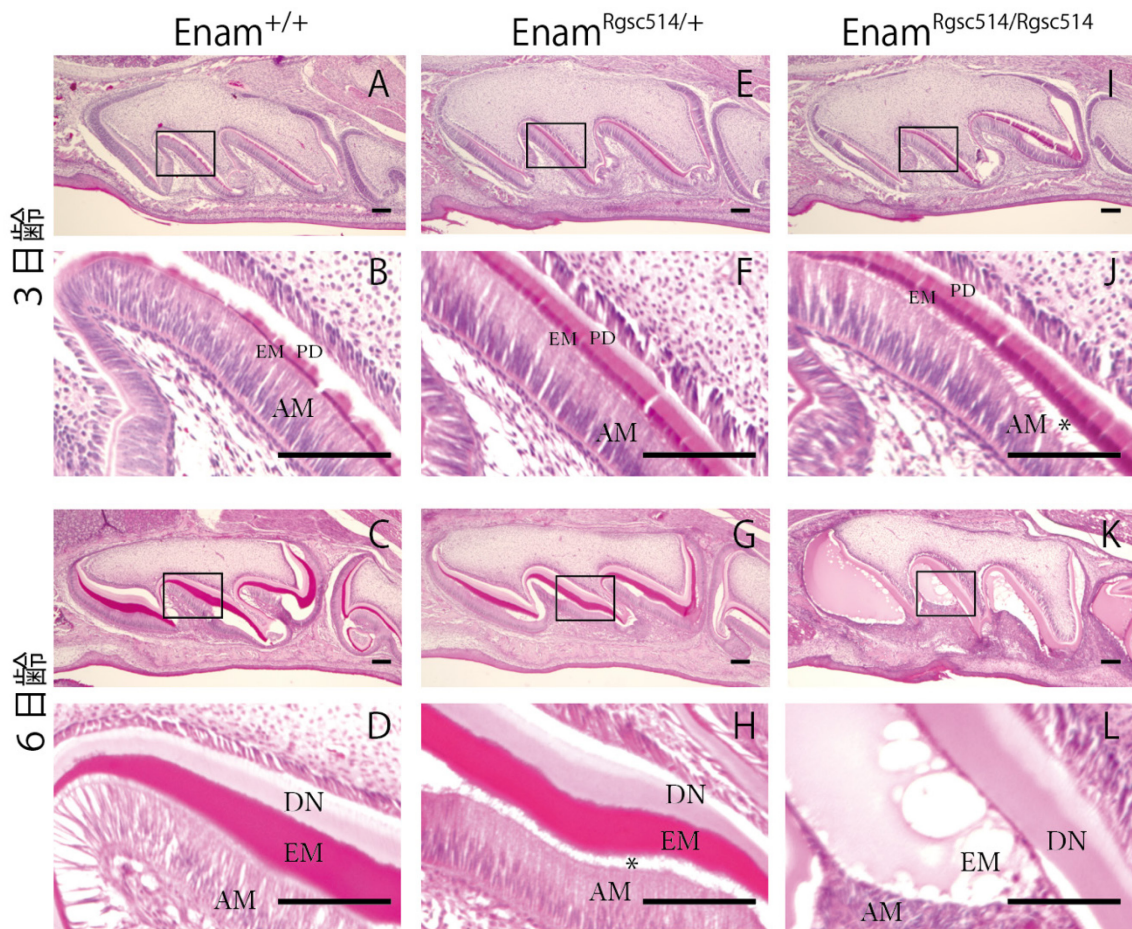


図 5 3日齢および6日齢における上顎第一臼歯歯胚の組織像

3日齢および6日齢の  $Enam^{+/+}$ ,  $Enam^{Rgsc514/+}$  および  $Enam^{Rgsc514/Rgsc514}$  の上顎第一臼歯歯胚部の弱拡大および強拡大像を示す。6頭観察したうちの典型像を示す。 $Enam^{+/+}$  では3日齢で規則的に配列したエナメル芽細胞(AM), エナメル基質(EM)および象牙前質(PD)を認め、6日齢でエナメル質(EN)と象牙質(DN)の形成を認める(A~D)。 $Enam^{Rgsc514/+}$  は  $Enam^{+/+}$  と比較し明瞭な違いはないが、6日齢でエナメル芽細胞がエナメル質表面から剥離する像が見られた(H\*印)。 $Enam^{Rgsc514/Rgsc514}$  では、3日齢においてエナメル基質を認めるが、エナメル芽細胞の一部がエナメル基質から剥離する像を認める(J\*印)。6日齢で囊胞様の構造体とその内部に泡沫状の空隙を認めた。エナメル芽細胞は囊胞様構造体の外部に存在するが、細胞極性および円柱状構造を失い規則的な配列は認められない。

スケールバー：100  $\mu$  m

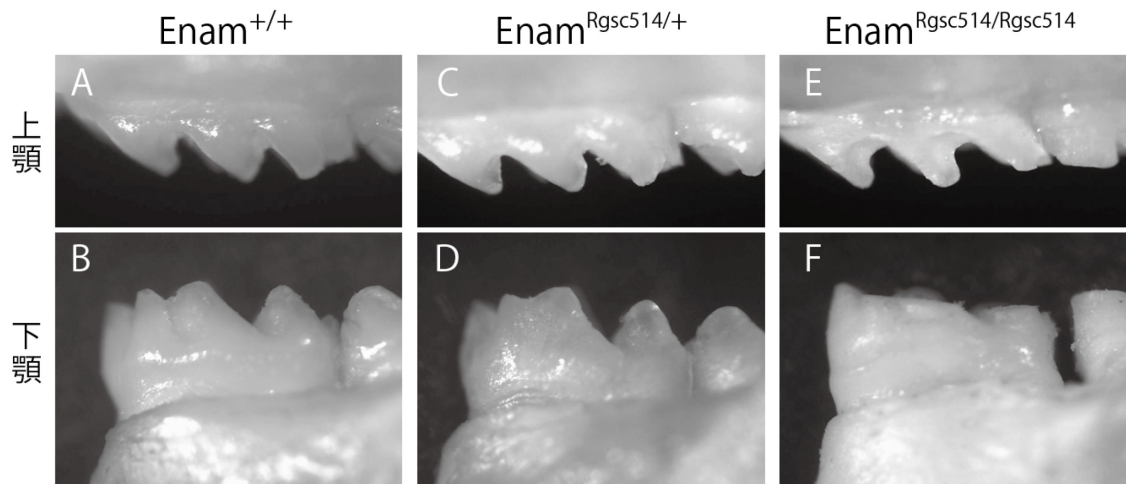


図 6 実体顕微鏡による上下顎左側第一白歯の頬側面観  
6頭観察した典型像を1頭示す。

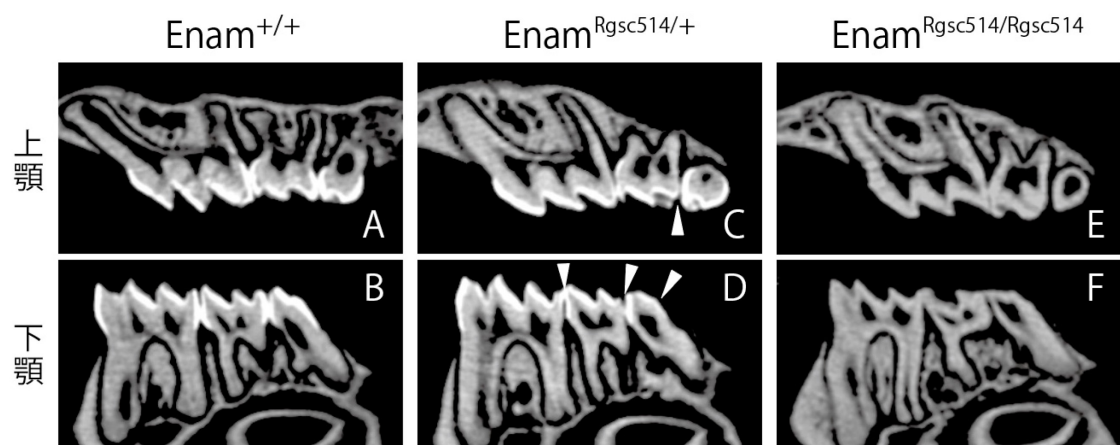


図 7 マイクロ CT による上下顎左側第一白歯の矢状断画像  
 6 頭観察した典型像を 1 頭示す。Enam<sup>Rgsc514/+</sup>では部分的にエナメル質の欠損を認める(矢頭)。Enam<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup>では、上下ともエナメル質は認められない。

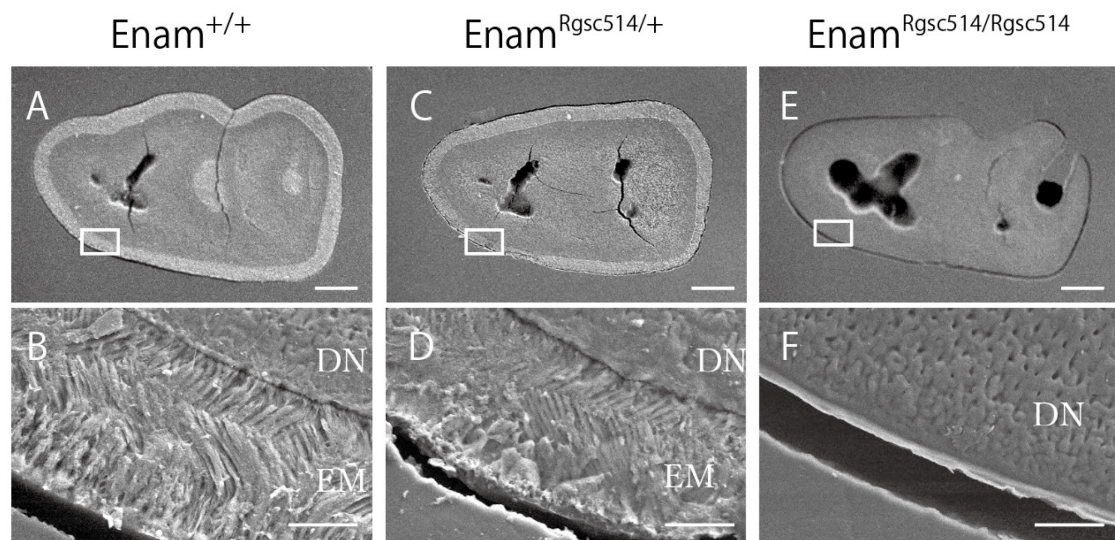


図 8 下顎左側第一臼歯の SEM 像

Enam<sup>+/+</sup> (AB) , Enam<sup>Rgsc514/+</sup> (CD)および Enam<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup> (EF)の下顎第一臼歯の弱拡大および強拡大像を示す。6頭観察した典型像を1頭示す。Enam<sup>+/+</sup>では象牙質(DN)周囲に厚さが均一なエナメル質(EN)を認めるが、Enam<sup>Rgsc514/+</sup>では一部厚さが薄く、エナメル質表層部では小柱配列の乱れと消失を認める。Enam<sup>Rgsc514/Rgsc514</sup>では、小柱構造をもつエナメル質は認められない。

スケールバー(ACE : 200  $\mu$ m, BDF : 20  $\mu$ m)



## 参考文献

- 1) GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390:1211–1259, 2017.
- 2) Schroth RJ, Harrison RL, Moffatt ME. Oral Health of indigenous children and the influence of early childhood caries on childhood health and well-being. *Pediatr Clin North Am*, 56:1481–1499, 2009.
- 3) Prevalence of tooth decay among 3-year-old children in each prefecture in 2020 (in Japanese), [https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?stat\\_infid=000032184564](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?stat_infid=000032184564). Ministry of Health, Labour and Welfare, "Report on Community Health and Health Promotion Programs in 2020 (Community Health Section)". [Accessed 19 July 2023]
- 4) Japan Dental Association. The current evidence of dental care and oral health for achieving healthy longevity in an aging society 2015, Tokyo, Fukai K, editor-in-chief, [https://www.jda.or.jp/en/world\\_congress\\_2015/read\\_more\\_information/publication.html](https://www.jda.or.jp/en/world_congress_2015/read_more_information/publication.html) [Accessed 27 July 2023].
- 5) Colak H, Dülgergil CT, Dalli M, et al. Early childhood caries update: a review of causes, diagnoses, and treatments. *J Nat Sci Biol Med*, 4:29–38, 2013.
- 6) Dye BA, Tan S, Smith V, et al. Trends in oral health status: United States, 1988–1994 and 1999–2004. *Vital Health Stat* 11, 248:1–92, 2007.
- 7) Xiao J, Huang X, Alkhers N, et al. *Candida albicans* and Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res*, 52:102–112, 2018.
- 8) Xiao J, Moon Y, Li L, et al. *Candida albicans* carriage in children with severe early childhood caries (S-ECC) and maternal relatedness. *PLOS ONE*, 11:e0164242, 2016.
- 9) Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, et al. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol*, 57:1048–1053, 2012.
- 10) Kim HE, Liu Y, Dhall A, et al. Synergism of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* reinforces biofilm maturation and acidogenicity in saliva: an in vitro study. *Front Cell Infect Microbiol*, 623980, 2020.
- 11) Koo H, Andes DR, Krysan DJ. *Candida*-streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLOS Pathog*, 14:e1007342, 2018.
- 12) Gregoire S, Xiao J, Silva BB, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 77:6357–6367, 2011.

- 13) Hwang G, Marsh G, Gao L, et al. H. Binding force dynamics of *Streptococcus mutans*-glucosyltransferase B to *Candida albicans*. J Dent Res, 94:1310–1317, 2015.
- 14) Sampaio AA, Souza SE, Ricomini-Filho AP, et al. *Candida albicans* increases dentine demineralization provoked by *Streptococcus mutans* biofilm. Caries Res, 53:322–331, 2019.
- 15) Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLOS Pathog, 8:e1002623, 2012.
- 16) Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. Infect Immun, 82:1968–1981, 2014.
- 17) Bliss JM, Basavegowda KP, Watson WJ, et al. Vertical and horizontal transmission of *Candida albicans* in very low birth weight infants using DNA fingerprinting techniques. Pediatr Infect Dis J., 231-235, 2008.
- 18) Waggoner-Fountain LA, Walker MW, Hollis RJ, et al. Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. Clin Infect Dis., 803-808, 1996.
- 19) Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol, 32:1923–1929, 1994.
- 20) Yu N, Kim HR, Lee MK. The first Korean case of candidemia due to *Candida dubliniensis*. Ann Lab Med, 32:225–228, 2012.
- 21) Fukatsu A, Tsuzukibashi O, Suzuk H, et al. One-step multiplex PCR for simultaneous detection and identification of eight medically important *Candida* species. Open J Stomatol, 11:14–24, 2021.
- 22) Fukatsu A, Tsuzukibashi O, Fuchigami M, et al. Study on the Distribution at Species Level of Genus *Candida* in Human Oral Cavities, Using Culture and Multiplex PCR Methods. Open J Stomatol, 12:119-12, 2022.
- 23) McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and phenotypic *Candida stellatoidea*. J Clin Microbiol, 37:417–421, 1999.
- 24) Kimijima M, Mandokoro K, Ichikawa Y, et al. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* from commercially available honey and its application in natto fermentation. Food Sci Technol Res, 28:267–273, 2022.
- 25) Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, et al. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group I intron. J Clin Microbiol, 39:4309–4315, 2001.

- 26) Menon LU, Scoffield JA, Jackson JG, et al. *Candida albicans* and Early Childhood Caries. *Front Dent Med*, 3, 2022.
- 27) Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, et al. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Dis*, 24:518–526, 2018.
- 28) Bachtiar EW, Bachtiar BM. Relationship between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in early childhood caries, evaluated by quantitative PCR. *F1000Res.*, 7:1645, 2018.
- 29) Xiao J, Grier A, Faustoferrri RC, et al. Association between oral *Candida* and bacteriome in children with severe ECC. *J Dent Res*, 97:1468–1476, 2018.
- 30) Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology (Reading)*, 149:279–294, 2003.
- 31) Caufield PW, Li Y, Dasanayake A. Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Compend Contin Educ Dent* 2005;26:10–6.
- 32) Qiu R, Li W, Lin Y, et al. Genotypic diversity and cariogenicity of *Candida albicans* from children with early childhood caries and caries-free children. *BMC Oral Health*, 15:144, 2015.
- 33) Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology (Reading)*, 141:1507–1521, 1995.
- 34) de Jesus VC, Shikder R, Oryniak D, et al. Sex-based diverse plaque microbiota in children with severe caries. *J Dent Res*, 99:703–712, 2020.
- 35) O’Connell LM, Santos R, Springer G, et al. Site-specific profiling of the dental mycobiome reveals strong taxonomic shifts during progression of early-childhood caries. *Appl Environ Microbiol*, 86:e02825-19, 2020.
- 36) Ito T, Sims KR Jr, Liu Y, et al. Farnesol delivery via polymeric nanoparticle carriers inhibits cariogenic cross-kingdom biofilms and prevents enamel demineralization. *Mol Oral Microbiol*, 37:218–228, 2022.
- 37) Ibrahim MS, Balhaddad AA, Garcia IM, et al. Tooth sealing formulation with bacteria-killing surface and on-demand ion release/recharge inhibits early childhood caries key pathogens. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 108:3217–3227, 2020.
- 38) Weinmann JP, Svoboda JF, Woods RW: Hereditary Disturbances of Enamel Formation and Calcification, *J Am Dent Assoc*, 32: 397-418, 1945.
- 39) Johns Hopkins University: AMELOGENESIS IMPERFECTA, TYPE IB; AI1B, <https://www.omim.org/entry/104500?search=104500&highlight=104500> (Accessed 2022-05-02)

- 40) A.F.B. Oliveira, A.M.B. Chaves, A. Rosenblatt: The Influence of Enamel Defects on the Development of Early Childhood Caries in a Population with Low Socioeconomic Status: A Longitudinal Study, *Caries Res*, 40 : 296-302, 2006.
- 41) Caufield PW, Li Y, Bromage TG. Hypoplasia-associated severe early childhood caries--a proposed definition, *J Dent Res*, 91 :544-50, 2012.
- 42) Witkop CJ Jr: Amelogenesis Imperfecta, Dentinogenesis Imperfecta and Dentin Dysplasia Revisited: Problems in Classification, *J Oral Pathol* 17: 547-53, 1988.
- 43) Witkop CJ: Hereditary Defects in Enamel and Dentin, *Acta Genet*, 7: 236-239, 1957.
- 44) Chosack A, Eidelman E, Wisotski I, et al.: Amelogenesis Imperfecta Among Israeli Jews and the Description of a New Type of Local Hypoplastic Autosomal Recessive Amelogenesis Imperfecta, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 47: 148-156, 1979.
- 45) 林原哲之：前歯部開咬を伴うエナメル質形成不全症の一症例，*小児歯誌*, 53: 169-170, 2015.
- 46) 樋口將，須藤健太郎，須藤洋一：遺伝性エナメル質形成不全症の1症例，*小児歯誌*, 52: 179, 2014.
- 47) Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP: The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix, *Struct Biol*, 126: 270-99, 1999.
- 48) Rajpar MH, Harley K, Laing C, et al.: Mutation of the Gene Encoding the Enamel-specific Protein, Enamelin, Causes Autosomal-dominant Amelogenesis Imperfecta, *Hum Mol Genet*, 10: 1673-1677, 2001.
- 49) Fukumoto S, Yamada A, Nonaka K, et al.: Essential Roles of Ameloblastin in Maintaining Ameloblast Differentiation and Enamel Formation, *Cells Tissues Organs*, 181: 189-95, 2005.
- 50) Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-Ganss E, et al.: Amelotin--a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein, *J Dent Res*, 84: 1127-1132, 2005.
- 51) Fukae M, Tanabe T, Uchida T, et al.: Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): Localization in the Developing Tooth and Effects of pH and Calcium on Amelogenin Hydrolysis, *J Dent Res*, 77: 1580-1588, 1998.
- 52) Nakamura T, de Vega S, Fukumoto S, et al.: Transcription Factor Epiprofin is Essential for Tooth Morphogenesis by Regulating Epithelial Cell Fate and Tooth Number, *J Biol Chem*, 283: 4825-4833, 2008.
- 53) 三好圭子：エナメル質形成不全症の新規責任遺伝子変異の発見とその意義 転写因子 Sp6 をめぐるパズル，*四国歯会誌*, 26: 1-10, 2013.
- 54) 権藤洋一：マウスの大規模 ENU ミュータジェネシスの現状と展望，*医学のあゆみ*, 203: 559-563, 2002.

- 55) Wakana S, Suzuki T, Furuse T, et al.: Introduction to the Japan Mouse Clinic at the RIKEN BioResource Center, *Exp Anim*, 58: 443-450, 2009.
- 56) Masuya H, Shimizu K, Sezutsu H, et al.: Enamelin (Enam) is Essential for Amelogenesis: ENU-induced Mouse Mutants as Models for Different Clinical Subtypes of Human Amelogenesis imperfecta (AI), *Hum Mol Genet*, 14: 575-83, 2005.
- 57) Yan W-J, Ma P, Tian Y, et al.: The Importance of a Potential Phosphorylation Site in Enamelin on Enamel Formation, *Int J Oral Sci*, 9, 1-6, 2017.
- 58) 高橋信博ほか：口腔生化学，第6版，140-146，医歯薬出版，東京，2018.
- 59) 田畑純：エナメル質形成の細胞生物学，鹿歯紀要，22: 33-40, 2002.
- 60) Gaete M, Lobos N, Torres-Quintana MA: Mouse Tooth Development Time Sequence Determination for the ICR/Jcl Strain, *J Oral Sci*, 46: 135-141, 2004.
- 61) 山田垂矢，岩本勉，中村卓史ほか：エナメル芽細胞の分化制御機構，小児歯誌，48: 374-380, 2010.
- 62) Smith CEL, Poulter JA, Antanaviciute A, et al.: Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways, *Front. Physiol*, 8: Article 435, 2017.
- 63) Brookes SJ, Barron MJ, Smith CEL, et al.: Amelogenesis Imperfecta Caused by N-terminal Enamelin Point Mutations in Mice and Men Is Driven by Endoplasmic Reticulum Stress, *Hum Mol Genet*, 26: 1863-1876, 2017.