

初診時から歯周外科治療終了時におけるALP、LDHおよびF-Hbの推移

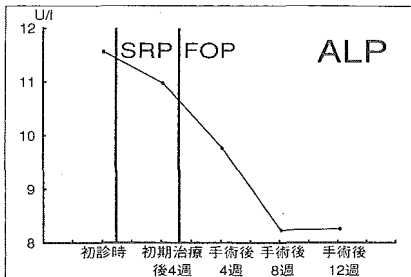


図3-a 初診時から歯周外科治療終了後12週までのALPの推移。

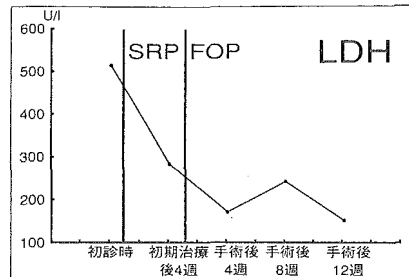


図3-b 初診時から歯周外科治療終了後12週までのLDHの推移。

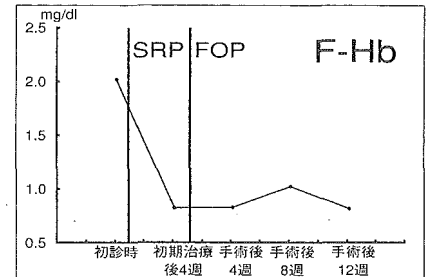


図3-c 初診時から歯周外科治療終了後12週までのF-Hbの推移。

6 他の検査との関連・連携は？

歯周病に関連する代表的な細菌には、

- *Porphyromonas gingivalis* (P.g)
- *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a)
- *Tannerella forsythensis* (T.f)*
- *Prevotella intermedia* (P.i)

などがあります。これらの検出状態および先述した臨床パラメーターとの関連を含めて総括的に検査をする必要があります。

* *Tannerella forsythensis* (T.f) の旧名称は、*Bacteroides forsythus* (B.f)



唾液検査のワンポイントアドバイス

検査はなぜ必要なのか、その検査で何が分かるのか、その結果は何を意味するのかなどについて患者さんへのインフォームド・コンセントが大切です。そして結果についても、歯周病とはどのような病気かということを加味して説明すると、患者さんの理解力もより高まり、我々の説明にも納得するようになります。

参考文献

1. 鴨井久—et al. 平成12、13、14厚生労働科学研究費補助金医療技術評価総合研究事業報告書—歯周疾患の予防、治療技術の評価に関する研究—エビデンスに基づいた歯周疾患の治療と予知について。東京：厚生労働科学研究費補助金医療技術評価総合研究事業，2003。

歯界展望

DENTAL OUTLOOK

<http://www.ishiyaku.co.jp/>

健康な心と身体は 口腔から

～ 東京 横浜 2004 ～

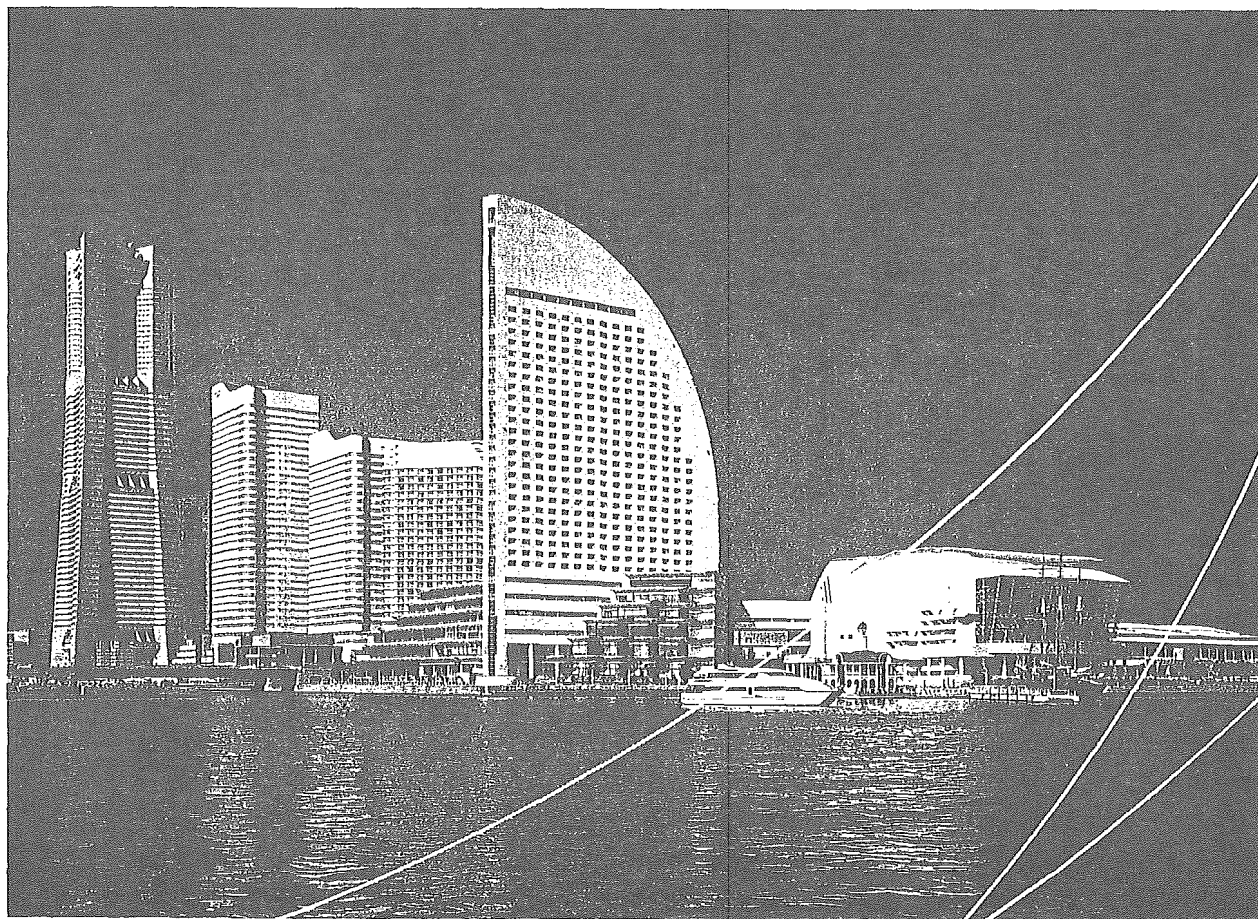
特別号
2005



Yokohama 2004

第 20 回日本歯科医学会総会

The 20th General Meeting
of the Japanese Association
for Dental Science



唾液検査から何がわかるか

■モデレーター 鴨井久一 日本歯科大学歯学部歯周病学講座

医科検査のなかで、血液検査はルーチン化している。歯科検査では視診が主体で、定形化した機能検査はわずかである。ヒトの検査のなかで、血液・尿・唾液検査は検体が比較的容易に入手でき、しかも病態を表現している。今回は唾液検査に焦点を合わせ、日常臨床検査のなかで歯周検査における生化学的マーカーとして、酵素の検出、さらに原因菌となる細菌の同定、リスク因子としての免疫マーカーの検討を行った。また口腔乾燥症やシェーグレン症候群の診断・診査、口腔細菌や皮膚疾患との関連についても言及した。

法歯学の立場から、唾液検査の必要性を提唱し、口腔科学としてエビデンスを確立した検査法を4名の演者が報告し、将来における唾液検査の有用性と予知性についてup to dateな知見を述べている。

第一席の「唾液の生化学マーカーによる歯周疾患診断」は、歯周病の診断、予後のモニタリングによる唾液検査の有用性を検討した結果、臨床症状および臨床パラメーターの改善に伴い、唾液中の遊離ヘモグロビン、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アルカリホスファターゼ (ALP)、アスパラギン酸トランスフェラーゼ (AST) などの生化学検査値が低下した。健常者、歯肉炎・歯周炎患者に分類し、これらの酵素値の基準値を設定した。

唾液検査の利点は検体採取が容易で無痛的であり、歯周病の診断や治療効果のモニタリング、集団検診時の歯周病患者のスクリーニングに有用であると思われる。

第二席の「唾液の細菌・免疫・遺伝子マーカー」は、口腔内の唾液中の歯周病原性細菌をPCR法で

検討を行った。その結果、健常者、歯肉炎・歯周炎患者の口腔内の歯周病原性細菌の存在および量的数は、歯周基本治療、外科治療、メンテナンス治療などの各段階で異なり、終了後にはほぼ一定の基準値にいたっていた。これらの状態より、歯周病原性細菌の変動にはバラツキがみられるものの、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A. a.), *Porphyromonas gingivalis* (P. g.), *Tannerella forsythensis* (T. f.) などでは基準数値が確認できた。遺伝子検査ではIL-1a, IL-16, ILRAの遺伝子多型を解析し、唾液との関連性を調べている。

第三席の「口腔外科における唾液検査」では、唾液の分泌検査から唾液腺疾患のみならず全身疾患との関係のなかで口腔乾燥症と全身疾患（特に関連のあるシェーグレン症候群）について述べている。唾液中の細菌とバイオフィルム中の細菌との関係を明らかにし、口腔細菌の気道や粘膜バリアの破壊を介して、全身への影響および口腔粘膜・皮膚疾患との関係についての報告がみられている。

第四席の「法歯学における唾液検査」では、事件や事故ではその被害者や加害者を特定しなければ解決しない。個人識別のために唾液が付着した資料が利用される。唾液蛋白の個人的変異や唾液付着資料から得られるDNAの個人的変異などがある。これらの多型は個人の同定、血縁関係の証明、集団の比較、対象人物の地理的由来の推定などに用いられる。このように変異は個人的情報を加え、ヒトの系統の推定や集団の比較が可能で、近年の犯罪の国際化への対応の必要性からきわめて有用な情報源として利用できるものである。

唾液の生化学マーカーによる歯周疾患診断

■シンポジスト 沼部幸博 日本歯科大学歯学部歯周病学講座

目的

8020の達成には歯周疾患への対応の強化が必要であり、そのためには歯周疾患の早期発見、早期治療、そして治療終了後のメンテナンスを的確に行う検査手技が不可欠である。

本発表では、歯周疾患の診断、予後のモニタリングにおける唾液検査の有用性について報告した。

方法

歯周疾患を主訴として来院した、成人性歯周炎(慢性歯周炎)患者のうち、本研究の主旨を理解し、協力を得られた患者の協力を得た。歯周治療前後の各設定時期で歯周病の臨床診査(PII, GI, PD, CAL, X線写真)を行うとともに、唾液検査、血液検査を行った。唾液中の成分の検索は、遊離ヘモグロビン、総蛋白、AST(GOT), ALT(GPT), ALP(アルカリホスファターゼ), LDH(乳酸脱水素酵素)などの項目について行った。

結果

健常者と歯周疾患患者とを比較すると、明らかに歯周疾患患者で唾液中の各検索成分の値が高値を示した。特に1口腔内での歯周ポケットの部位数が多い患者において、LDH, ALPの値が高く、LDHでは、歯周ポケット0部位の群と60部位以上の群との間に危険率5%で有意差が認められた。歯周疾患の臨床パラメーター値のPII, GI, PD, CAL, BOPは歯周治療後に低下したが、それに伴い遊離ヘモグロビン, AST, ALT, ALP, LDHの値も経時的に低下し、メンテナンス移行後12週で最低値を示した。

考察および結論

歯周組織の臨床症状の改善に伴い、唾液中の遊離ヘモグロビンやAST, ALT, ALP, LDHなどの生化学成分などの値も同時に低下したことから、唾液検査は、検体の採取法が容易であり、無痛下で採

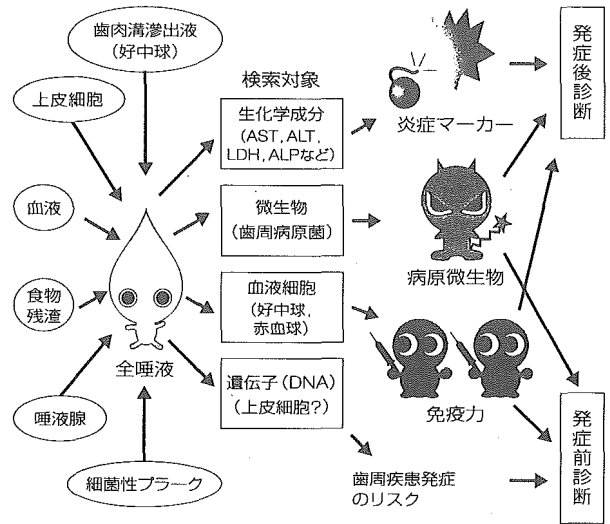


図 唾液より得られる情報

表 健常者と軽度歯周炎*を区別する基準値と感度・特異度

生化学物質	基準値	感度	特異度
遊離ヘモグロビン (f-Hb)	0.5 (U/l)	0.35	0.76
AST (GOT)	45.5	0.51	0.51
ALT (GPT)	18.5	0.53	0.53
ALP	8.5	0.50	0.57
LDH	352	0.59	0.59
<i>P. g.</i>	945 (copy/tube)	0.53	0.53
<i>T. f.</i>	135,000	0.40	0.44
<i>A. a.</i>	32.5	0.60	0.60
<i>P. i.</i>	22,500	0.51	0.51

n = 978

* 軽度歯周炎は6mm以上の歯周ポケットが1カ所もない歯周疾患患者

取が可能、生体への侵襲は皆無などの利点を有していることなどから、歯周疾患の診断や治療効果のモニタリング、集団検診時の歯周疾患患者のスクリーニングなどに役に立ち、発症前診断や発症後診断応用への有用性も示唆された(図)。

本発表では、平成12~14年度、厚生科学研究費補助金、医療技術評価総合研究事業、歯周疾患の予防、治療技術の評価に関する研究(主任研究者: 鴨井久一)の結果の一部を報告した。また得られた結果として、歯周組織の健常者と歯周炎患者とを区別するための基準値を示す(表)。

唾液の細菌・免疫・遺伝子マーカー

■シンポジスト 吉江弘正 新潟大学大学院医歯学総合研究科

唾液中には50種類ほどの蛋白が同定され、また混合唾液中には各種疾患に関連する細菌、細胞、組織破壊成分が含まれている。すなわち、歯周病、カリエス、口腔外科疾患に関連した多くの情報がある唾液は、歯科医院において容易に採取できる唯一の材料である。この唾液を使用した検査は、かかりつけ歯科医師であっても、歯科の各分野の専門医であっても、近未来的にきわめて重要なことである。

細菌マーカー

5分間パラフィンを噛んだときに得られる唾液(刺激混合唾液)中には、歯肉溝・歯周ポケットに存在する歯周病原細菌がわずかに混入している。この混入した細菌のDNAを、歯周病原細菌それぞれの遺伝子に特異的プライマーを使用してPCR法(ポリメラーゼ連鎖反応)で増幅して検出することが可能である。この検査法は日本の検査会社がすでに確立しており、日本中の歯科医院からインターネット、郵送で実施することが可能である。この唾液中の細菌と歯周ポケット内の細菌とにはある程度の相関性が示されている。また、図に示すように、歯周炎を有する患者において、歯周病原細菌である、*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella (Bacteroides) forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*が存在し、スケーリングおよび歯周手術を行うことで、減少していることがわかる。さらに、健康者ならびに歯肉炎患者においては、検出されないか、ごくわずかである。これを利用することにより、歯周病の細菌学的診断が可能となり、患者さんへのモチベーション、歯周薬物治療の薬剤選定基準、歯周基

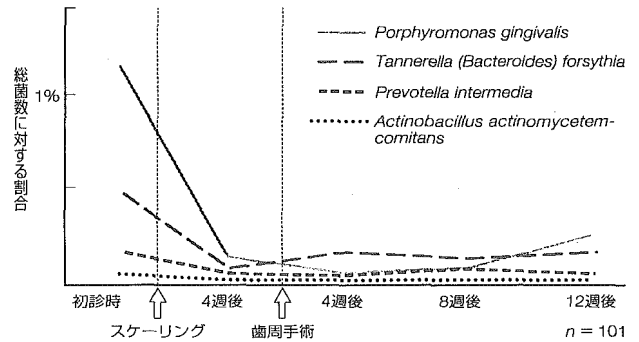


図 歯周治療による歯周病原細菌の割合の変動

本治療の効果判定、歯周外科処置への判定基準を決めることができる。さらに、メンテナンス間隔の決定、歯周炎の治癒・治療完了の判定に利用したり、予防戦略における地域住民のスクリーニングに使用することも可能である。

免疫・遺伝子マーカー

混合唾液中には、粘膜上皮や歯肉溝滲出液中の好中球が存在し、これらの細胞のDNAを抽出し、歯周病感受性遺伝子解析を行うことが現在研究段階として可能である。歯周病になりやすい候補遺伝子は、侵襲性歯周炎に関連するものと慢性歯周炎の重症度に関連するものに大別でき、現在まで10種類前後の候補遺伝子が報告されており、その多くは、免疫応答に関連した遺伝子である。代表的なものとして、インターロイキン1遺伝子と免疫グロブリンFc部受容体遺伝子である。これらの遺伝子を有する人は、歯周病になりやすいばかりでなく、歯周治療の効果にも影響することが報告されている。今後、歯周炎感受性遺伝子が特定され、検査法が確立、普及することが期待される。

限局型若年性歯周炎(侵襲性歯周炎)の長期臨床的観察

○緒方智壽子, 上田雅俊, 今井久夫 (大阪歯科大学歯周病学講座)

われわれは、1989(平成元)年3月28日に上下顎切歯部と第一大臼歯部の歯の動揺と歯肉部腫脹を主訴に来院した15歳の患者について15年にわたり、その臨床的経緯の観察を行ってきた。各種臨床診査・検査結果から本症を限局型若年性歯周炎と診断した。そこで、診査・診断・予後の判定を踏まえて治療計画を立案し、歯周基本治療から着手した。歯周基本治療後の再評価で、上下顎切歯部と上顎左側臼歯部の改善が芳しくなく、歯周外科手術(フラップ手術:歯肉被弁剥離搔爬術)を実施した。

フラップ手術中の直視下での骨欠損形態から、近年頻用されている組織再生誘導術(GTR)が適応であったかもしれないが、15年前ではGTRそのものも途についたところで

あり、GTR手術の自信もなく、フラップ手術のみにとどめ、今日までその経緯について追跡観察を行ってきた。その結果、来院時には悲観視された歯も現存し、十分に機能を営んでいる。

今回の供覧症例から、華やかな近代的治療法も必要かつ重要ではあるが、地味ながらも旧態依然的なフラップ手術も、基本に則り正確かつ入念に行えば、良好な結果が得られることを臨床体験し、フラップ手術の効果と患者のコンプライアンスを得ることの重要性の再認識につながればと考え、今回の発表にいたった。ただし、現代に行われている組織再生療法を否定しているのではないことを付記しておく。

多血小板血漿(platelet rich plasma: PRP)による歯周組織再生に関する臨床的研究

○小村尚徳 (明海大学歯学部歯周病学講座)

多血小板血漿(PRP)は、自己末梢血を濃縮し得られた、血小板を多く含む血漿である。血小板は、軟組織の治癒促進、骨の形成や成熟を促進するような成長因子を含むことがわかっており、すでにPRP移植による組織再生に関するさまざまな研究や臨床応用が報告され、有効であることが示唆されている。しかし、臨床PRPを調製するにあたり、多量の採血を必要としたり、高価な専用消耗品を用いるなどの一般臨床応用での難点がある。さらに、PRPの活性化には血液製剤(ヒトあるいはウシトロンビン)を用いる必要があった。そこでわれわれは、必要に応じた任意の採血量で、血小板の濃度も任意に調節できるPRP調製方法を開

発した。この方法では自己血のみでPRPを活性化することを可能にした。この方法によって調製されたPRPの血小板数、成長因子量、あるいはPセレクトリン量について調べたところ、既存のPRP調製方法によるものと比較して、いずれも同等以上であることが確認された。さらに、この調製法で得られたPRPの有用性について動物実験を行った結果、PRP群ではより早期に歯槽骨の再生が認められた。さらに臨床応用をしたところ、軟組織の治癒促進が認められた。以上の結果から、新たに開発された調製法は、臨床上的操作性に優れているだけでなく、調製されたPRPが歯周組織の再生に有用であることが示唆された。

唾液検査の歯周病診断と治療効果判定への応用

○沼部幸博^{*1}, 鴨井久一^{*1}, 吉江弘正^{*2}, 伊藤公一^{*3}, 栗原英見^{*4}

(^{*1}日本歯科大学歯学部歯周病学講座, ^{*2}新潟大学大学院医歯学総合研究科摂食環境制御学講座歯周診断・再建学分野, ^{*3}日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座, ^{*4}広島大学大学院医歯学総合研究科先進医療開発科学講座歯周病態学分野)

8020の達成には歯周疾患の早期発見、早期治療、そしてメンテナンスを的確に行う検査手技が不可欠である。本発表では、歯周疾患治療後のモニタリングにおける唾液検査の有用性について報告した。

各担当施設に来院した成人性(慢性)歯周炎患者のうち、同意が得られた患者129名を対象とした。歯周基本治療前後で歯周病の臨床診査と唾液検査を行った。唾液中の成分検索は、乳酸脱水素酵素(LDH)、アルカリホスファターゼ(ALP)、遊離ヘモグロビンなどの項目を行い、さらに唾液中の4種類の歯周病原性細菌をreal time PCR法で検索した。

歯周炎の部位が多い患者ではLDH、ALPの値が高い傾向にあった。臨床パラメーターの各値は基本治療後に低下し、

それに伴い唾液中遊離ヘモグロビン、ALP、LDHの値も経時的に低下、治療終了後12週で最低値を示した。各歯周病原性細菌の総細菌数に占める割合も治療後低下し12週で最低値を示した。

このように歯周組織の臨床症状改善に伴い、唾液中の生化学成分の値も同時に低下すること、検体採取が容易、無痛、生体への侵襲は皆無などの利点から、唾液検査は歯周疾患の診断や治療効果のモニタリング、集団検診時の歯周疾患患者のスクリーニングなどに役立つと考えられた。

本研究は、平成12~14年度、厚生科学研究費補助金、医療技術評価総合研究事業、歯周疾患の予防、治療技術の評価に関する研究(主任研究者 鴨井久一)の一部として行った。

日本歯科評論 and Dental Review / 増刊2005

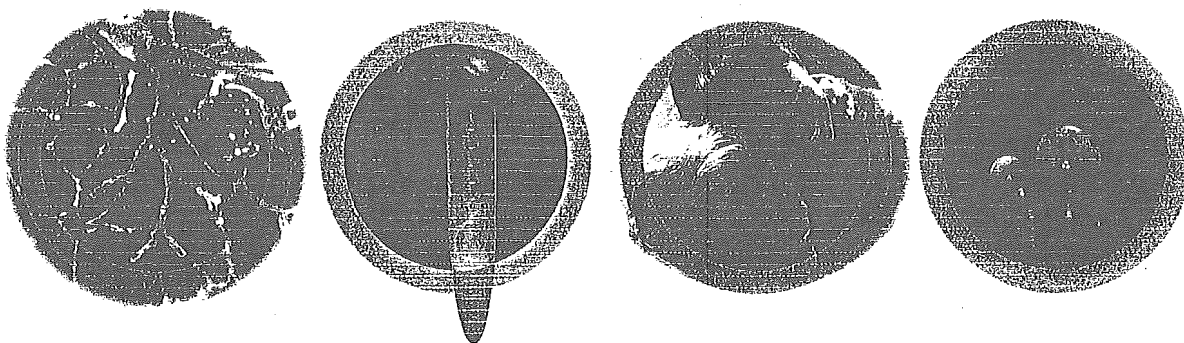
唾液による 健康づくり

—明日からの臨床に取り組む—

編著

下野正基 (東京歯科大学病理学講座 教授)

奥田克爾 (東京歯科大学微生物学講座 教授)



HYORON

2-9

唾液で診る歯周病

かも い きゅういち¹ さとう つとむ はなだ のぶひろ³
鴨井久一¹ 佐藤 勉² 花田信弘³

¹ 日本歯科大学 名誉教授 ² 日本歯科大学歯学部衛生学講座 助教授

³ 国立保健医療科学院口腔保健部 部長

^{1, 2} 〒102-8159 東京都千代田区富士見1-9-20 ³ 〒351-0197 埼玉県和光市南2-3-6

はじめに

歯周病は、局所における歯周病原性細菌による感染症と言われ、生体の防御機能（免疫機能）や環境因子（リスク因子）などが関与し、相互作用による多因子性疾患と言われている。

歯周病はう蝕とともに歯科の二大疾患と言われ、歯周治療における治療体系は、診査、診断、予後判定、治療計画の立案、歯周基本治療、再評価、歯周外科治療、SPT（メンテナンス治療）などで補完されている。しかし治療体系を見ると、歯科は口腔内を視するという「視診」で安易な診断を下し、治療を行ってきたのが現状である。

医科領域では、まず検査があり、その結果、診断、治療につながっているが、歯科領域では残念ながら処置が先行し、検査や診断が後まわしになっている例が多く見られる。昭和60年の歯科医療保険点数改正時に、歯周疾患はP-I型とP-II型に区分され、必要な検査事項が保険に導入されたが、当時の多く

の識者は検査が繁雑過ぎるということでP-I型を敬遠される方が多かったようである。この状況を平成の現在に置き換えて考えてみると、検査そのものは形態的検査が主体であったが、検査をして再評価を行い、次のステップへ移行するという発想は合理的であり、この概念を十分に活用する必要がある。

内科では、血液検査、尿検査、X線検査、心電図検査などはルーチンで行われ、検査が当たり前と考えられているが、歯科の場合、口腔内に存在している唾液というものに関心があまり向けられていなかったようである。唾液は口腔内に固有のものとして存在し、健常者なら1日に1～1.5l強が分泌されている。

周知のように唾液には、咀嚼時の消化作用をはじめ、抗菌作用、食片などを洗い流す洗浄作用、会話や発音を円滑にする作用、pHの緩衝作用、硬組織の再石灰化作用など多くの利点を有する作用が見られている。また、最近ではHIVの検査キットも発売されており、さらに認知症としてのアルツハイマー、糖尿病、B型肝炎、胃潰瘍、喫煙、ストレスな

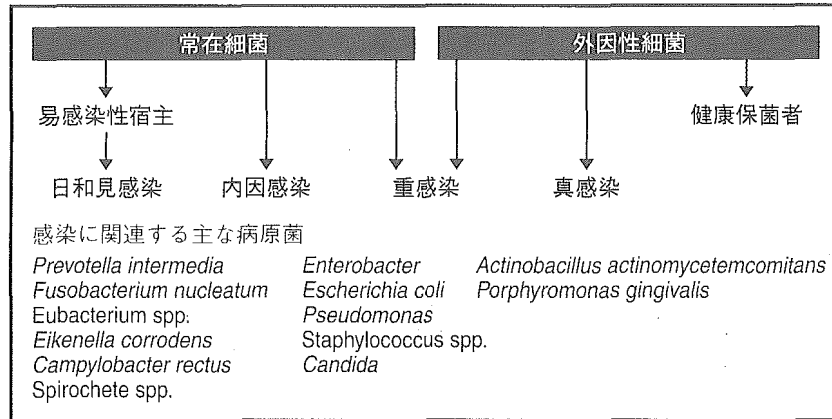


図1-a 歯周病の種々の感染タイプと主な病因菌。

どの検査にも唾液検査が行われ、全身疾患での唾液検査は市民権を得て活用されている。

しかし歯科領域では、残念ながら口腔固有の唾液はいろいろな症状を表現しているにもかかわらず、あまり利用されていないのが実状である。筆者らの研究班は平成12年度よりこれまで、唾液検査が歯周病の検査に利用できないか、多角的に研究を進めてきた。その一端として、歯周病は歯周病原性細菌による感染症という立場から、口腔内での歯周病原性細菌の消長や組織炎症に伴うサイトカインが放出する特定酵素の同定を行ってきた。その中で、唾液と歯周病原性細菌の関係について述べる。

I. 歯周病原性細菌の検出法

歯周病は局所の細菌感染と言われながら、その細菌の検出法が臨床でルーチン化されていないのは、操作が繁雑というだけでなく確立したエビデンスが見られないことにも起因している。歯周病原性細菌を大別すると、外因性感染による細菌に *Porphyromonas gingivalis* や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* など、内因性感染による細菌として *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium* sp., *Spirochete* sp. などが挙げられている。これらの細菌は、増殖して菌数が多くなると感染が生じると言われている。い

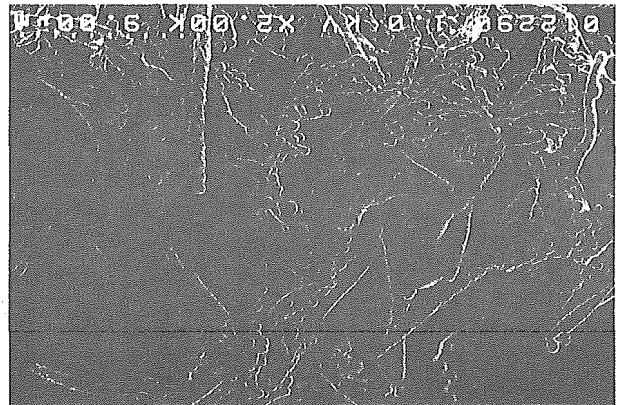


図1-b デンタルプラーク（バイオフィルム）の走査電顕像。

ずれにしても外因性の歯周病原性細菌であれば除去が必要であり、内因性細菌であれば、その細菌を減少することで細菌感染を抑制することが可能である（図1-a・b）。

従来、筆者らがルーチンで行ってきた細菌検査の方法を示した後、唾液検査による方法を呈示する。

歯肉縁下の細菌検査

1) 位相差および暗視野顕微鏡による検査（図2）

歯肉縁下の細菌検査法として、従来行われていた方法を用い、滅菌綿球で被験歯の歯肉縁上のプラークを除去し、その後ペーパーポイント#40を歯周ポケット内に挿入して30秒間放置し、同様な操作でさらに2本挿入してから滅菌蒸留水100μlに浸漬する。

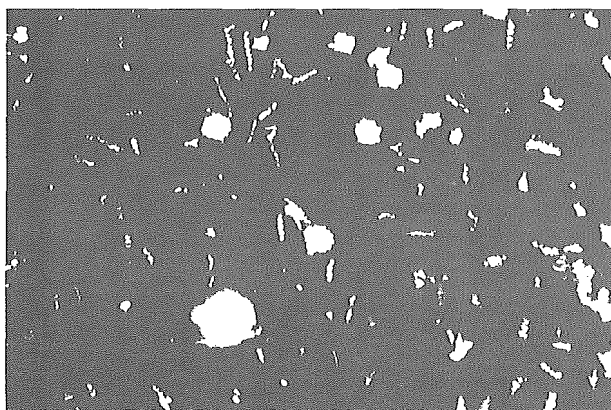


図2 暗視野顕微鏡による細菌検査. 46歳の女性. 6の歯周ポケット5mmより採取.

- MRSA (*Staphylococcus aureus*)
- MSSA (*Staphylococcus aureus*)
- 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)
- β溶連菌 (*Streptococcus pyogenes*)
- 肺炎球菌 (*Klebsiella pneumoniae*)
- *Haemophilus influenzae*
- *Serratia marcescens*
- *Branhamella catarrhalis*
- カンジダ (*Candida albicans*)
- その他

図3-b 日和見菌検査における検出菌の一覧.

試料を vortex mixer で60秒間攪拌し, 浮遊中の細菌数を位相差顕微鏡で算定する. 菌数の算定は, 形態上から球菌, 桿菌, 運動性桿菌, スピロヘータ, その他と分類し, 総菌数および総菌数中の各種細菌の割合を算定する.

2) 培養法 (図3-a)

縁下細菌を培養して培養可能な総菌数を測定し, 得られるコロニーより各細菌の割合を算定する. 近年, 高齢者の免疫機能の低下と感染防御力の低下により口腔内感染が多く見られている. 特に, 口腔に見られる日和見菌が全身疾患の発症に関与しているというエビデンスが多くなってきた. 通常, 上顎右側臼歯部の頬側歯頸部を滅菌綿棒で5往復擦過し, キャリブレーション・チューブに入れ, 培養を行う (図3-b). 日和見検査菌 (真菌) の一例を示すと

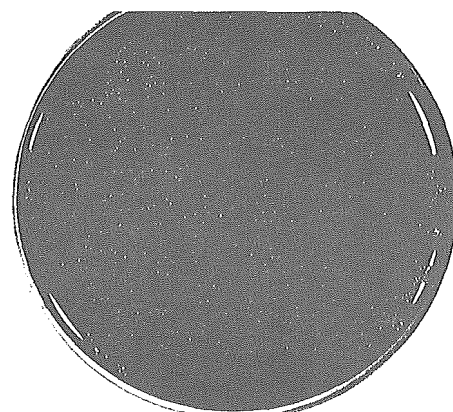


図3-a *Porphyromonas gingivalis* の培養.

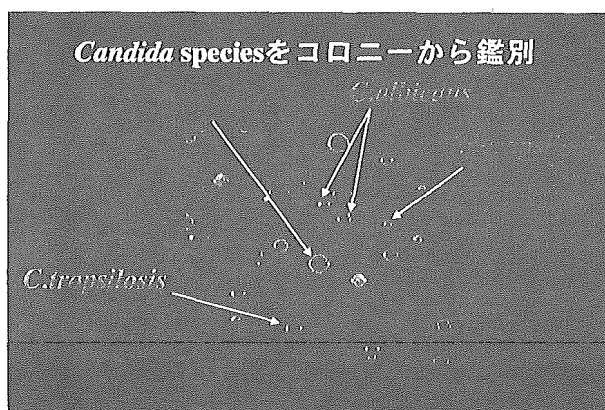


図3-c *Candida* sp. の培養.

図3-cのごとくである.

3) 蛍光抗体法

特定細菌に対する特異抗体を用いて, 特定細菌を蛍光抗体法により検出する.

4) DNAプローブ (図4-a)

DNAプローブとは, DNAを用いる診断法の1つで, DNAの塩基配列を調べ, その存在を検出する方法である. 放射性同位元素で標識としたものや酵素系で標識したものがあり, 後者が一般的に用いられている.

原理は, 細菌の染色体遺伝子の塩基配列を検出するハイブリダイゼーションの原理を応用し, ヌクレチオド鎖が対応する塩基間の相同性を利用し, 由来の異なる2種類のDNAから得られた単鎖の間に2本鎖をつくる方法である. 臨床的にも利用されてお

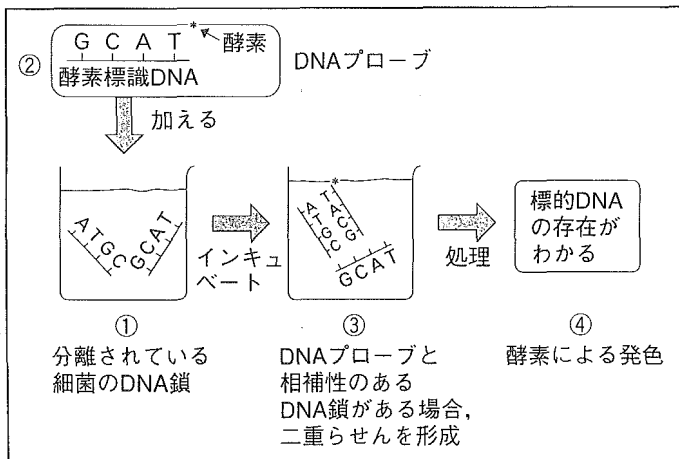


図4-a DNAプローブの原理図.

	PATHOGEN LEVELS			
	NEGATIVE	LOW	MODERATE	HIGH
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	NEGATIVE			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		LOW		
<i>Prevotella intermedius</i>		LOW		

<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	NEGATIVE			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	NEGATIVE			
<i>Prevotella intermedius</i>	NEGATIVE			

<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	NEGATIVE			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	NEGATIVE	LOW		
<i>Prevotella intermedius</i>	NEGATIVE			

<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	NEGATIVE			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	NEGATIVE			
<i>Prevotella intermedius</i>	NEGATIVE			

図4-b DNAプローブによる細菌の判定 (臨床例).

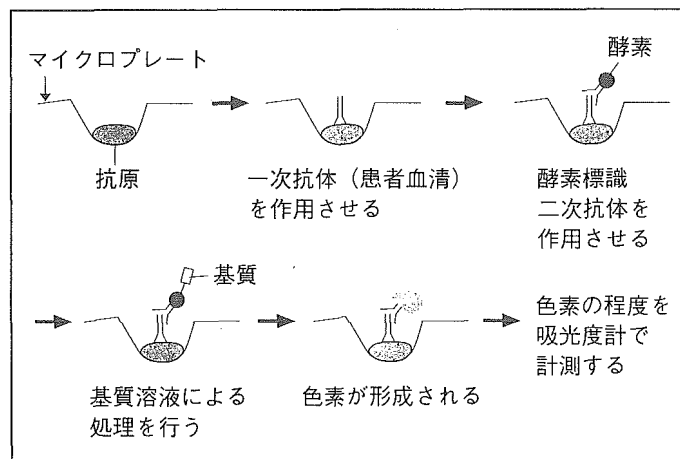


図5 ELISA法の原理.

り、診断キットとして3種類の歯周病原性細菌の定性および定量などが可能である (図4-b).

5) ELISAによる抗体価の測定 (図5)

細菌感染によって生体に免疫反応が生じ、抗体産生が持続されるので、抗体価を判定することができる。

6) 酵素活性による測定

(1)歯肉縁下の歯周病原性細菌である、*Tannerella denticola*, *P. gingivalis*, *Tannerella forsythensis* 由来のペプチダーゼより、トリプシン様酵素活性を測定する。N-carbobenzoxy-glycyl-glycyl-Arginyl 1-3, 5-dibromo-4-hydroxyaniline (CBz-Gly-Gly-Arg-DBHA) を基質とし、ペプチダーゼ活性は生成されたメチレンブルーの着色程度より判定する (ペ

リオチェック®, 図6-a)。

(2)歯肉縁下プラーク中のN-ベンゾイル-DL-アルギニルペプチダーゼ活性の検出を目的とし、*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythensis* はトリプシン様活性により特定のペプチドを分解するBANA基質から、着色程度により、前述の3菌種の判定ができる (バナペリオ®, 図6-b)。

以上は、歯周ポケット内の歯肉溝滲出液中に介在する歯周病原性細菌の検出を目的としたものである。これらの方法では、個々の歯周ポケット内の細菌の同定は可能であるが、口腔内全体の歯周病原性細菌の状態を把握することが困難である。歯周ポケットを介して口腔内に歯肉溝滲出液が流出するエビデンスは、多形核白血球 (PMNs) の貪食機能をフロー

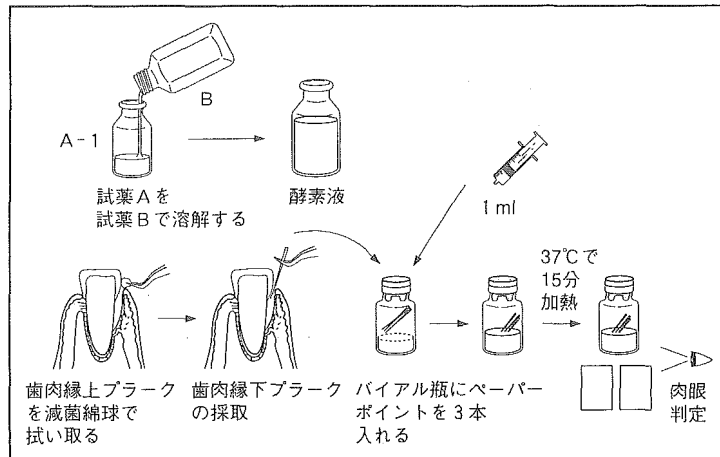


図 6-a ペリオチェック®の測定法.

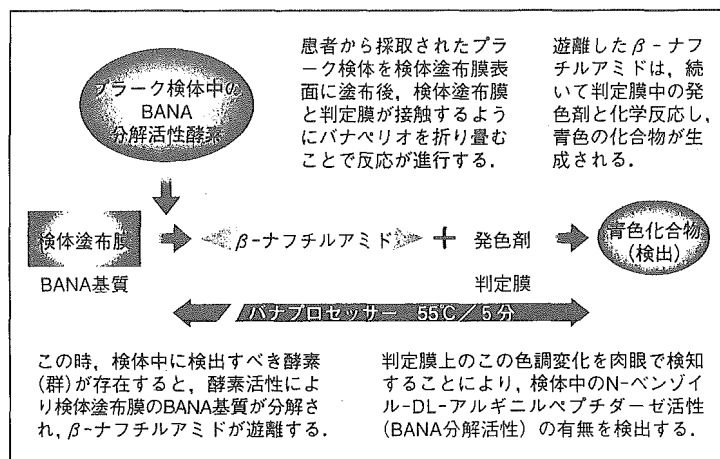


図 6-b パナペリオ®の測定原理.

サイトメーターで検討した結果，歯肉溝滲出液からの細胞生存率は87.4%，唾液中からの細菌生存率は64.9%であった．このことは，唾液中に65%の細胞状態を口腔内で再現できるということを示している．

そこで，口腔内の清掃・衛生状態を把握する方法として唾液に注目し，唾液を用いてその口腔内の状態を検査する方法を考案した．PCR法を応用して，唾液によりトータルの口腔状態，またペーパーポイントにより局所のポケットの状態を把握できる利点がある．

● PCR (polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応) 法

①定性検査 (図 7-a)

二本鎖 DNA を鋳型として，基質である 4 種類の

dNTP の存在下で DNA ポリメラーゼを作用させると，プライマーの 3' 末端に鋳型の塩基配列に従ってヌクレオチドが添加され，鎖が伸長する．この反応による二本鎖 DNA を加熱して相補鎖に分離し，過剰に存在するプライマーを再び該当位置にハイブリット結合させ，DNA ポリメラーゼ反応で新しい DNA 鎖を合成する．そして，特定の塩基配列の領域を試験管内で人為的に 2 n で増幅させ，目的領域の DNA 断片を大量に得ることができる．

得られた増幅産物をアガロースゲルを用いて電気泳動し，既知の菌を対照として目的の菌の判定をすることが可能である．

②定量検査 (図 7-b)

定量分析にはさまざまな PCR 定量法が試みられ

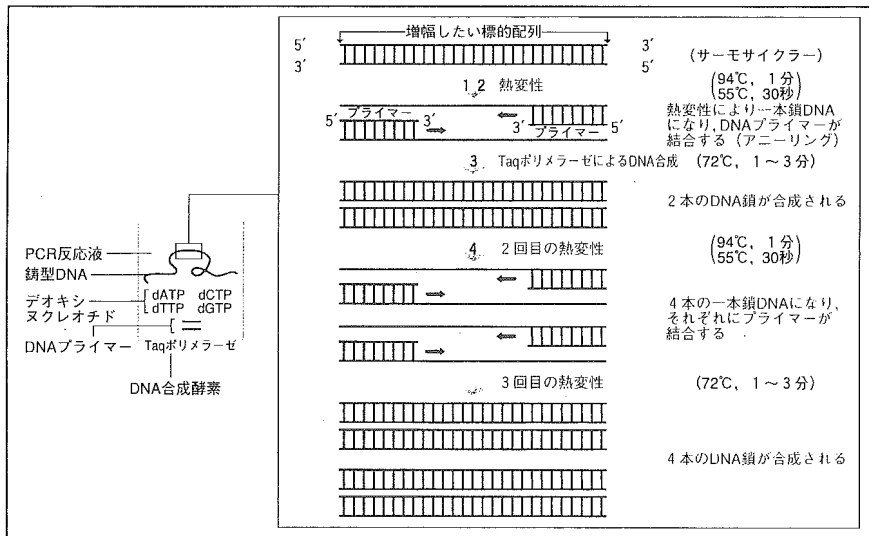


図7-a PCR法の原理.

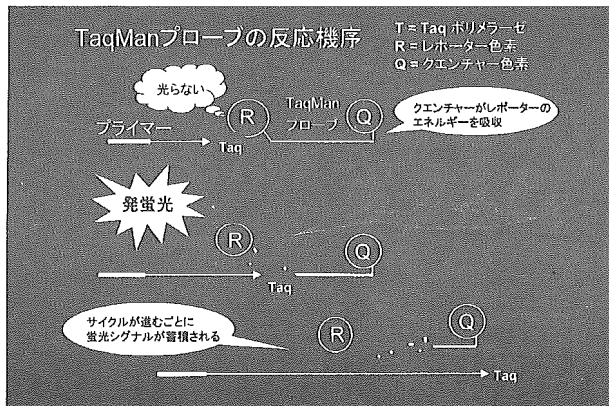


図7-b Taq Man プローブの測定法.

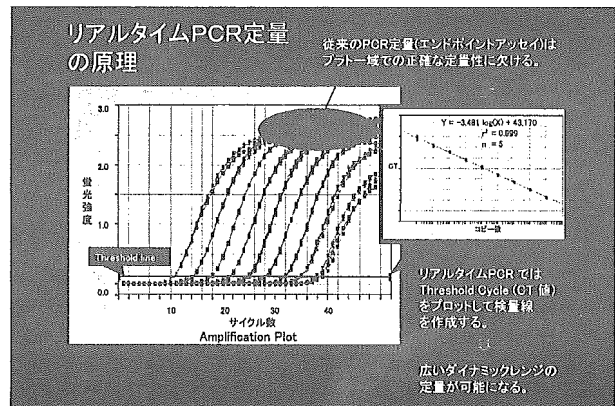


図7-c 定量用のスタンダードの増幅曲線.

ており、Invader 法や Taq Man 法などがあるが、本稿では自動分析器 PCRSM 7700 (Taq Man) で行う方法を呈示する。

目的とする増幅 DNA に特異的ハイブリダイズした Taq ポリメラーゼのヌクレアーゼ活性により、結合したプローブが加水分解で剥離し、クエンチャーと分離し蛍光が発色する。増幅サイクルを重ねるごとに蛍光チューブの外からリアルタイムにモニターを継続し、設定した蛍光強度の閾値に到達するのに要したサイクル数 (CT 値) を各試料に対して自動的に計測する方法である。鎖型の DNA が多ければ早いサイクル数で閾値ラインを超え、少なければ CT 値が大きくなっていく。

図7-cの増幅曲線 (S字曲線) と検量線 (コピー数と CT 値) は逆相関を示し、未知の試料より CT 値より検量線と共にコピー数を求めることができる。

II. 唾液検査による歯周病検査

ヒトに対する唾液検査により歯周病原性細菌の推移を調べ、臨床検査の有用性を調べた。対象は177名の外来患者で、慢性歯周炎と診断された男性78名、女性99名、年齢は35歳以上65歳以下 (平均50.2±8.2歳) で、本調査の主旨を十分に理解し、文書により協力と同意を得られた患者さんとした。歯周炎の程度は、歯周ポケットの深さ、動揺度、骨吸収度など

表1 歯周病原性関連細菌とそのプライマー (Ashimoto ら)

【歯周病関連菌】			
(1)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	(16s rRNA) 166-608	(443bp)
	f primer	5'-GCTAATACCGCGTAGAGTCGG-3'	
	r primer	5'-ATTCACACCTCACTTAAAGGT-3'	
(2)	<i>P. gingivalis</i>	(16s rRNA) 729-1132	(404bp)
	f primer	5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3'	
	r primer	5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3'	
(3)	<i>P. intermedia</i>	(16s rRNA) 209-467	(259bp)
	f primer	5'-CGTGGACCAAAGATTCATCG-3'	
	r primer	5'-CCGCTTACTCCCCAACAAA-3'	
(4)	<i>T. forsythensis</i>	(16s rRNA) 120-760	(641bp)
	f primer	5'-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3'	
	r primer	5'-TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT-3'	

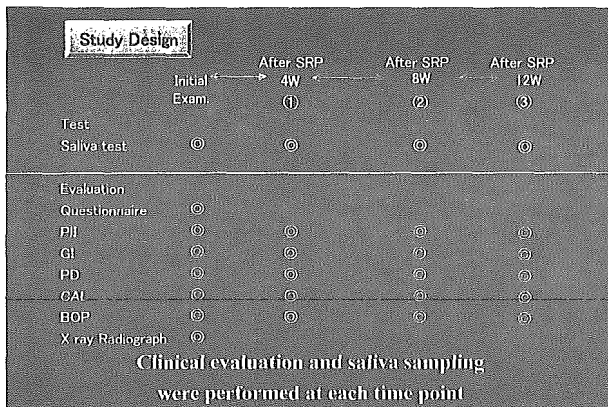


図8-a 歯周基本治療のプロトコル.

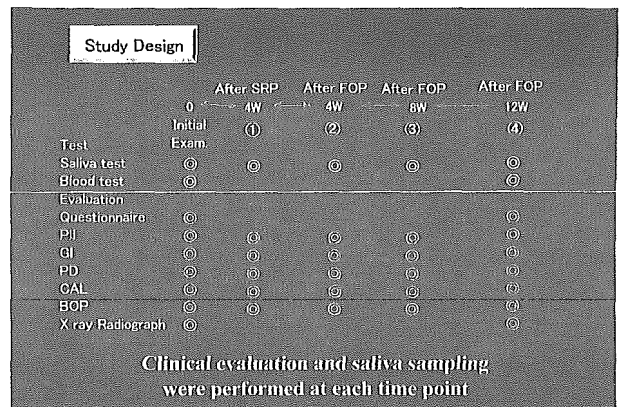


図8-b 歯周外科治療のプロトコル.

により軽度・中等度・重度の各群に分類した。また、抗菌剤を3カ月以内に投与された者、全身疾患により投薬を受けている者、喫煙者などは除外した。

臨床パラメーターと生化学的酵素を関連して調査したが、今回は歯周病原性細菌に焦点を当て、他は割愛した。代表的な歯周病原性細菌と細菌検出に使用したプライマーの塩基配列を示すと表1のごとくである。研究プロトコルは各3段階に分け、第1相は初診から歯周基本治療終了まで(図8-a)、第2相は初診から歯周外科治療終了まで(図8-b)、第3相は積極的治療の終了からメインテナンス治療(SPT)までで、第3相は現在調査途中のため症例呈示により代替する。

1. 唾液の採取法

パラフィンを5分間咀嚼させ分泌した刺激唾液を滅菌スピッツに採取した。食後2時間を目途に、口腔清掃後は唾液採取までに1時間は間隔を開けるように指示し、洗口剤や合嗽剤等の使用は禁止した。

2. 唾液試料中の細菌の測定(定性的試み)

唾液試料は、採取後100℃・15分加熱後、-30℃にて保存した。歯周病原性細菌は表2で見られる *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* の4菌種について、PCR法を用いて検査した。サンプリングした唾液またはペーパーポイントに付着している細菌からDNAを分離する操作を最初に行った。これはPCR法に対して

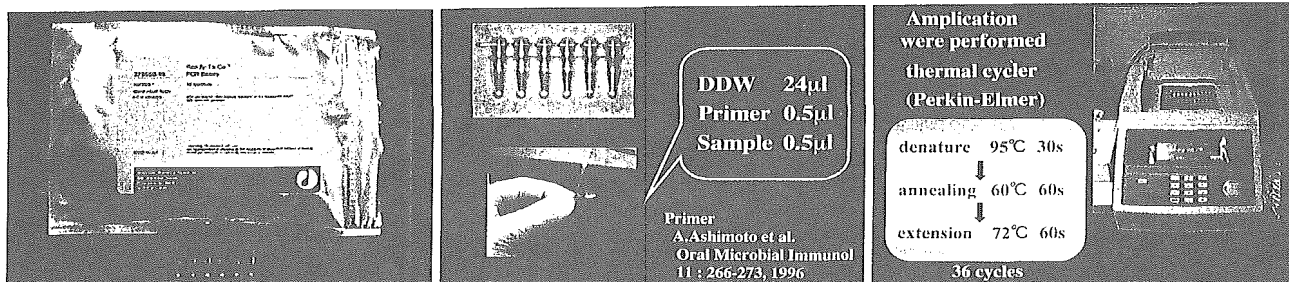


図9-a PCR法. Ready-To-Go™ PCR Beads. 図9-b PCR法. 唾液試料の採取. 図9-c PCR法. サーマルサイクリング.

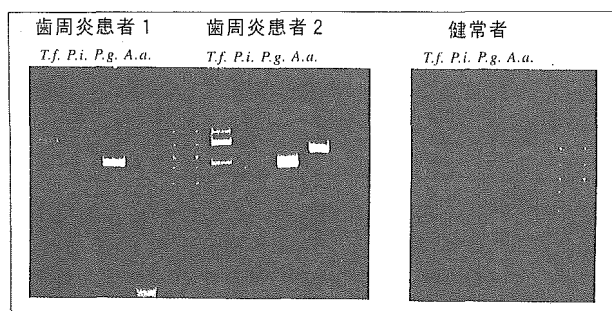


図9-d PCR法. 電気泳動上の歯周病原性細菌.

阻害的に作用する夾雑物をできる限り除去するため、DNA抽出キットを用いた。蛋白質分解酵素、界面活性剤などによる菌体蛋白質の変性、可溶化と核酸の単離、プラス荷電シリカフィルターへのDNAの選択的吸着など、PCR増幅反応による純度の高いDNAの抽出を目的とした。

次いでPCR増幅操作を行うが、DNAの鎖が2nと指数関数的に増加する原理(図7-a)により、増幅反応に必要な試薬コンポーネントを混ぜ、プライマーの塩基配列はAshimotoらの方法(表1)により、Ready To-Go™ PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, 図9-a)を用いて95℃・30秒、60℃・1分、72℃・1分を36サイクルで行い、各細菌のDNA増幅を行った。

95℃に加熱することで二本鎖(ATPとGTP, CPTとTTPの相補的塩基が水素結合している)が一本鎖に解離する。次いで60℃に下げるとまた二本鎖に戻るものもあるが、短い一本鎖のDNA断片が入っているので相補部分で特異結合する。72℃に上昇させると耐熱性ポリメラーゼの作用でDNAの合

成が急速に進行し、60秒以内で二本鎖構造に戻り、1分子が2分子へと増加する。温度サイクルを繰り返すことで二本鎖DNAが4分子へと増加していく(図9-b・c)。

増幅されたDNAの産物を5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動で流したゲルをエチジウムブロマイド(EB)で染色後、300nmの紫外線照射で各歯周病原性細菌を検出した(図9-d)。また、定量的試みについては、リアルタイムによる自動分析装置を参照されたい。

3. 臨床結果

初診時のP.g.菌; A.a.菌, P.i.菌, T.f.菌の存在と歯周ポケットの深さの関連を示したものが表2である。相関が見られたのはP.g., A.a., T.f.菌であったが、定性的・定量的結果の関係は必ずしも一致していなかった。

1) 第1相: 歯周基本治療における細菌検査結果

初診から12週までの歯周基本治療における結果を示すと、総細菌数の推移は図10-aのようである。患者へのコンプライアンス、モチベーション、口腔衛生指導、スケーリング・ルートプレーニング(SRP)を行い、その経過を12週まで観察した。一方の歯周病原性細菌の推移は、SRPにより一度減少するグループ(T.f., P.g.菌), 上昇するP.i.菌, 変化のないA.a.菌などの3群に分けられるが、12週後にはいずれも減少している様子が見られる(図10-b)。

表2 各歯周病原性細菌の存在と歯周ポケットの深さとの関係

歯周ポケットの深さ	3 mm 以下	3 mm 以上～6 mm 以下	合 計
<i>P. g.</i> あり	12	23	35
<i>P. g.</i> なし	4	61	65
合 計	16	84	100
x ² =13.40 p=0.0003 オッズ比：7.96 → <i>P. g.</i> と 3 mm 以下, および 3 mm 以上～6 mm 以下のポケットの深さとは関連がある。			
<i>A. a.</i> あり	16	67	83
<i>A. a.</i> なし	0	17	17
合 計	16	84	100
x ² =3.90 p=0.0384 オッズ比：INF → <i>A. a.</i> と 3 mm 以下, および 3 mm 以上～6 mm 以下のポケットの深さとは関連がある。			
<i>P. i.</i> あり	14	68	82
<i>P. i.</i> なし	2	16	18
合 計	16	84	100
x ² =0.390 p=0.4143 オッズ比：1.6			
<i>T. f.</i> あり	12	24	36
<i>T. f.</i> なし	4	60	64
合 計	16	84	100
x ² =12.57 p=0.0004 オッズ比：7.5 → <i>T. f.</i> と 3 mm 以下, および 3 mm 以上～6 mm 以下のポケットの深さとは関連がある。			

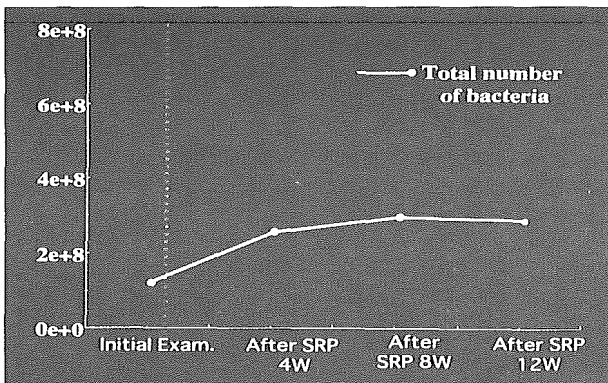


図10-a 歯周基本治療におけるSRPによる総細菌数の推移。

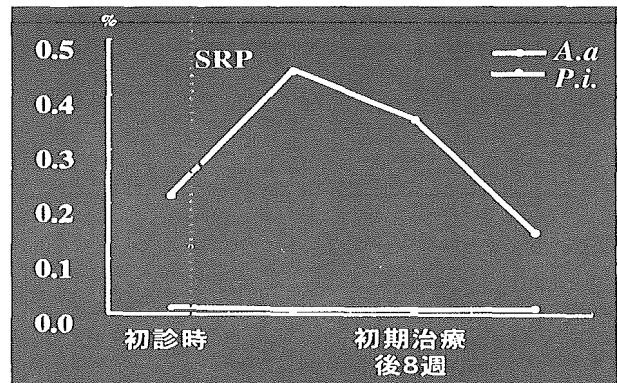


図10-b 歯周基本治療におけるSRPによる歯周病原性細菌の総細菌数に対する割合の推移。

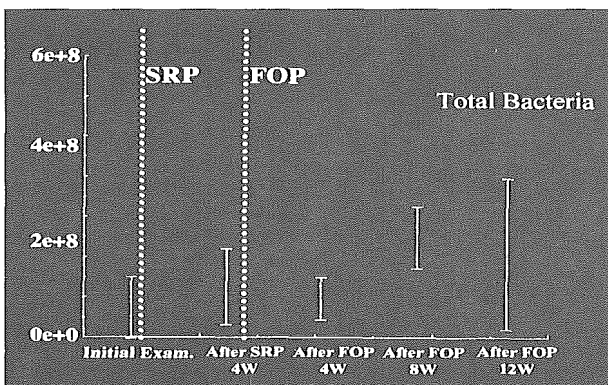


図11-a 歯周外科治療におけるFopによる総細菌数の推移。

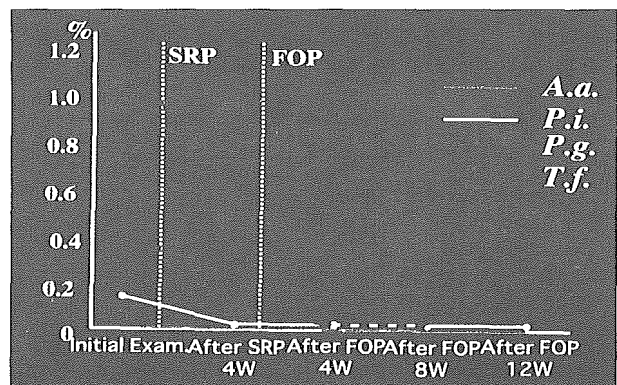


図11-b 歯周外科治療におけるFopによる歯周病原性細菌の総細菌数に対する割合の推移。

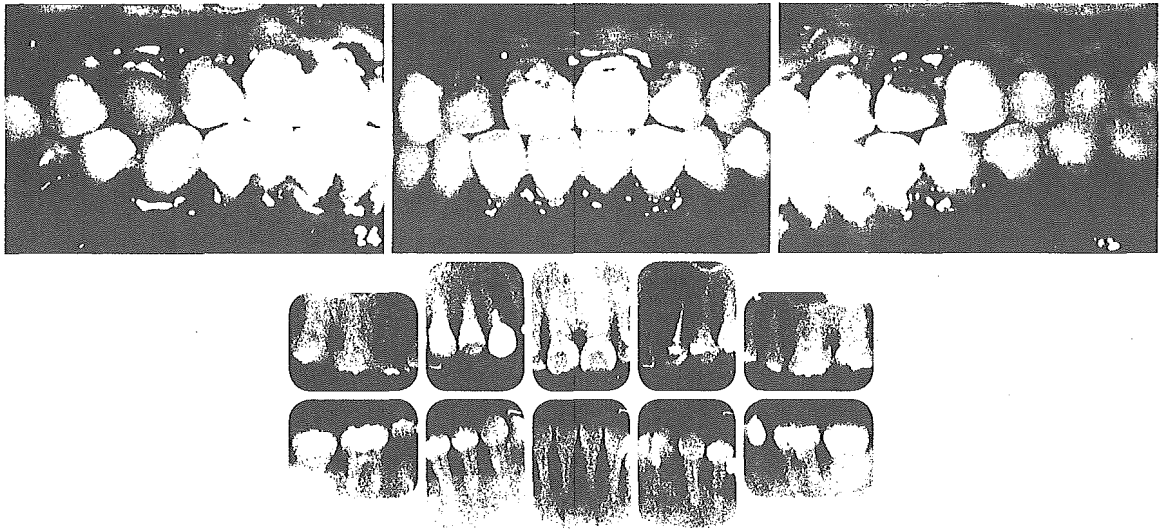


図12- a ~ d 初診時 (1981年 6 月) の口腔内所見と X 線写真像。

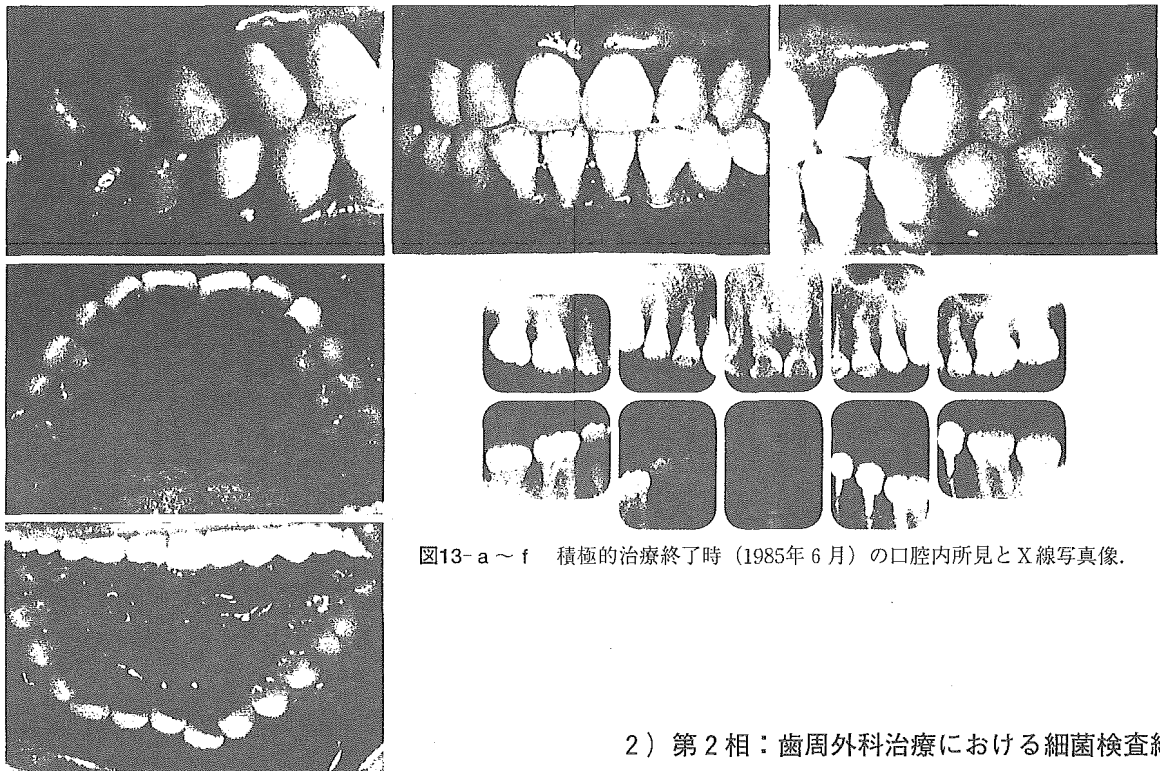


図13- a ~ f 積極的治療終了時 (1985年 6 月) の口腔内所見と X 線写真像。

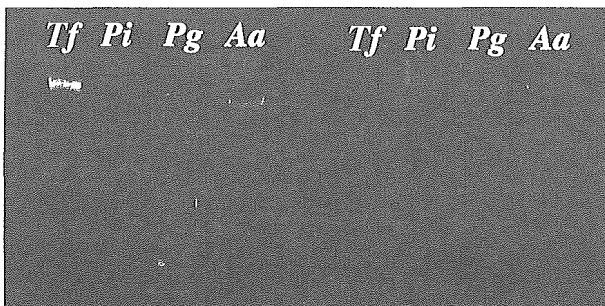


図14 治療前 (左) と治療終了時 (右) の唾液による歯周病原性細菌の検査。

2) 第 2 相：歯周外科治療における細菌検査結果

第 2 相試験は、SRP 後再評価を行い、歯周ポケットから 4 mm 以上残存しているグループに歯周外科処置 (代表的なウイドマン改良型フラップ手術) の推移を示したものである。外科治療を行った総菌数の推移は図11-a、各歯周病原性細菌の推移は図11-bのごとくである。歯周基本治療 4 週後に再評価を行い、Fop により各細菌数は 0.2% 前後のプラトウ曲線の展開が見られている。外科的治療により、歯周

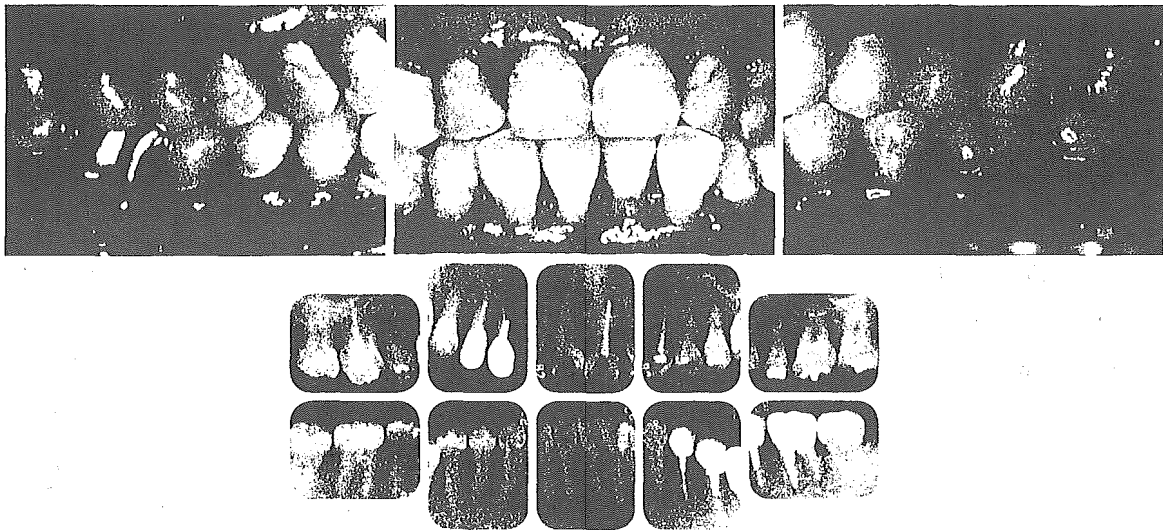


図15- a ~ d メインテナンス治療時（1997年6月）の口腔内所見とX線写真像.

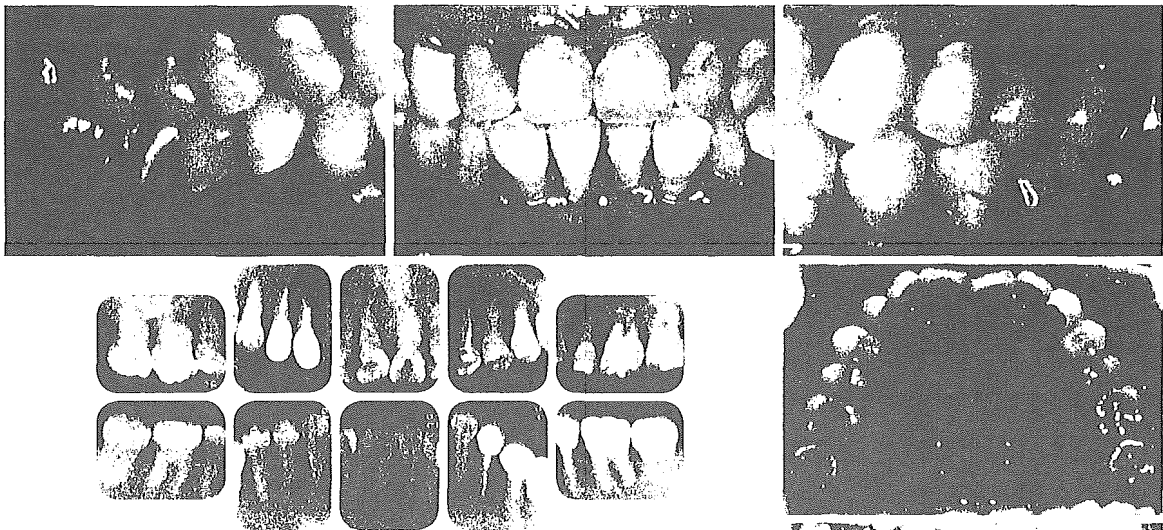


図16- a ~ f メインテナンス治療時（2000年6月）の口腔内所見とX線写真像.

病原性細菌の減少が有意に見られ、口腔内の環境が改善されたことを示している。現在、外科治療後のポケットの残存数、深さなどを調査し、臨床パラメーターの関連も調査している。

3) 第3相：メインテナンスにおける細菌検査結果

第1相，第2相臨床検査と同様なプロトコルで6カ月，12カ月，18カ月の期間を追跡調査している。

4) 症例呈示

初診：1981年6月来院。

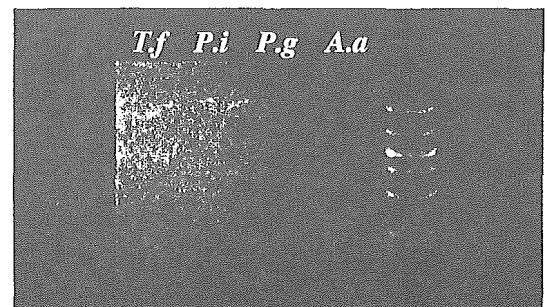


図17 同時に行った唾液検査の結果.

患者：42歳の女性。慢性歯周炎（図12）。

診断：中等度歯周炎。

治療法：歯周基本治療，モチベーション，プラークコントロール，SRP，歯周外科治療（211 FOP），再評価，積極的治療終了。

SPT（1） 1985年6月（図13・図14）

SPT（2） 1997年6月（図15）

SPT（3） 2000年6月（図16・図17）

おわりに

歯周病は細菌感染症と言われていながら，細菌検査が確立されていない。その原因は，歯数が28歯あると1歯の検査に時間と費用がかかること，そしてその検査値から治療効果が見られたのか，それらを明確に位置づけるエビデンスに不明な点が多いことである。

細菌検査では口腔内全体を把握し，各歯については歯周ポケットが深い，たとえば6 mm以上あるような部位に応用する。慢性歯周炎では必ずしも全症例に検査が必要とは思わないが，歯肉の処置に対する反応がはっきりしない場合，侵襲性歯周炎においては特に細菌検査が必要とされる。また，SPTにおいて細菌検査を行い，初回，半年後に変化がないようであれば通常のホームケアで口腔清掃の生活習慣

の強化をすれば，予後は良好な状態をたどるものである。前項で示した症例のごとく，約20年にわたって1本の歯の喪失も見られない。

いずれにしても，歯周治療に細菌検査を導入し，予後判定に用いると，慢然とSPTを行うのとは異なり治療費，効果の点から効率性の高い治療が期待できる。平成8年の古い資料であるが，歯科医療費のトータル2兆5千億円前後に対し，医科における検査費は3兆2千億円前後であり，一般診療医療費24兆円のうち13%は検査費用で占めている。この事実，歯科の検査費用は歯科医療費全体の割合から見ると微々たるものであることを示しており，検査・診断・治療法の選択を歯科医療の本質に則り，国民への検査を明確にする義務と説明とが要求されている。

参考文献

- 1) 歯周疾患の予防 治療技術の評価に関する研究—中等度・重度歯周疾患の治療技術研究—。平成12年度厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）分担研究報告書，2001。
- 2) 歯周疾患の予防 治療技術の評価に関する研究—中等度・重度歯周疾患の治療技術研究—。平成13年度厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）分担研究報告書，2002。
- 3) 歯周疾患の予防 治療技術の評価に関する研究—中等度・重度歯周疾患の治療技術研究—。平成14年度厚生科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）分担研究報告書，2003。
- 4) 歯周病のリスク判定および予防体系の開発。平成15年度厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）分担研究報告書，2004。
- 5) 歯周病のリスク判定および予防体系の開発。平成16年度厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）分担研究報告書，2005。

*

*

*

厚生労働科学研究

「効果的な歯周疾患のリスク判定法および予防体系の開発」(H15-医療-15150101)

「フッ化物応用による歯科疾患の予防技術評価に関する総合的研究」(H15-医療-020)

合同公開シンポジウム

21世紀における歯科疾患の予防体系の構築

抄 録 集

主 催

主任研究者 花田信弘 (国立保健医療科学院口腔保健部長)

主任研究者 眞木吉信 (東京歯科大学衛生学講座教授)