

lar DNA Fragmentation ELISA system (Boehringer GmbH) described above. The DNA fragmentation rate after each histatin 5 treatment was determined as a percentage of the value of HGF cells incubated with *P. gingivalis* PS without histatin 5.

#### STATISTICS

The Mann-Whitney U test was used to identify statistically significant differences. A level of  $p < 0.05$  was considered significantly different.

#### RESULTS

##### EFFECT OF *P. GINGIVALIS* CELL-SURFACE PREPARATIONS ON HGF CELL PROLIFERATION

The inhibition of cell proliferation was measured following stimulation with cell-surface components of LPS, PS or 57-kDa OMP from *P. gingivalis*. Results are summarized in Table 1. PS significantly inhibited proliferation of HGF ( $p < 0.05$ ), but LPS and 57-kDa OMP showed no effect at the concentrations used in this study.

##### APOPTOSIS INDUCED BY *P. GINGIVALIS* CELL-SURFACE COMPONENTS

The apoptosis inducing activity of *P. gingivalis* preparations was evaluated by measuring the cellular DNA

fragmentation by flow cytometric analysis. In the control fibroblasts, few apoptotic cells were found after 24 h incubation (Fig.1, A). Significant DNA fragmentation was found in the culture medium after treatment of the cells with PS of *P. gingivalis* (Fig.1, B). This apoptosis was confirmed with the Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit. To determine whether the PS of *P. gingivalis* caused apoptosis, we examined the extent of DNA fragmentation induced by PS. Intercellular DNA fragmentation of HGF was detected when stimulating the cells with PS at a concentration of 30 µg/ml (data not shown). These data suggest that PS of *P. gingivalis* induces apoptosis in HGF.

##### INHIBITORY ACTIVITY OF HISTATIN 5 ON CYTOTOXICITY OF *P. GINGIVALIS* PS

The ability of histatin 5 to prevent the anti-proliferation activity of *P. gingivalis* PS against HGF was evaluated. Preincubation with histatin 5 significantly prevented the proliferation-inhibitory activity of *P. gingivalis* PS stimulation ( $p < 0.05$ , Table 2). However, simultaneous incubation (i.e. no preincubation) failed to inhibit the cytotoxic activity of *P. gingivalis* PS significantly.

Fig. 2 shows the inhibition effect of histatin 5 on the DNA fragmentation induced by *P. gingivalis* PS in HGF cells. Histatin 5 significantly inhibited the PS apoptosis inducing activity ( $p < 0.05$ ) at a concentration of 20 µg/ml.

Table 1. Inhibition of HGF proliferation stimulated with cell-surface components of *P. gingivalis*.

<i>P. gingivalis</i> components	Concentration (µg per well)	HGF proliferation (OD at 490nm)
None	-	0.77 ± 0.020
LPS	5	0.72 ± 0.038
	10	0.70 ± 0.041
PS	5	0.59 ± 0.064*
	10	0.57 ± 0.021*
57-kDa OMP	5	0.71 ± 0.036
	10	0.75 ± 0.042

HGFs were stimulated with *P. gingivalis* components. \* $p < 0.05$  compared with unstimulated HGF. The data shown are mean values of four duplicate experiments with standard deviations.

Table 2. Inhibitory activity of histatin 5 on HGF anti-proliferation effect of *P. gingivalis* PS.

Histatin 5 (10 µg per well)	PS (10 µg per well)	HGF proliferation (OD at 490nm)	Proliferation rate (%)
-	-	0.77 ± 0.020	(100)
-	+	0.57 ± 0.021*	74.2
+			
(preincubation)	+	0.71 ± 0.059*	92.5
+			
(simultaneous incubation)	+	0.62 ± 0.037	80.0

HGFs were treated with or without *P. gingivalis* PS and histatin 5. Preincubation with histatin 5 significantly restrained the activity of the *P. gingivalis* PS that inhibits HGF proliferation (\* $p < 0.05$ ).

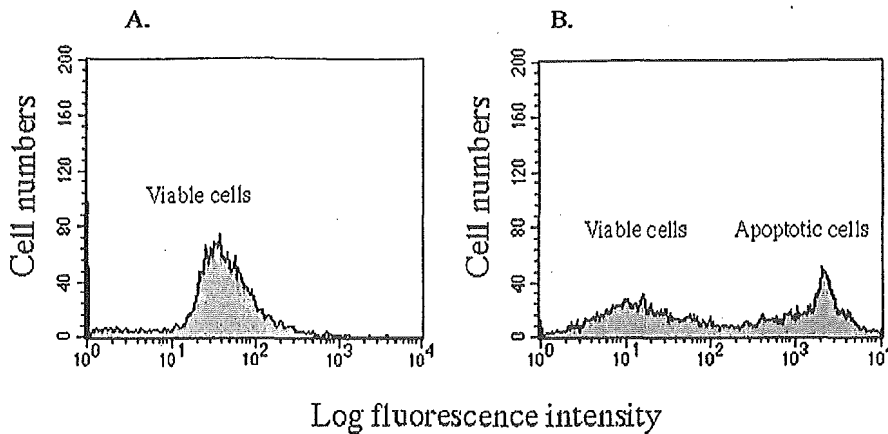


Fig. 1. Cytofluorimetric analysis of HGFs apoptosis. "A" is untreated HGF as negative control. "B" is treated with PS of *P. gingivalis*.

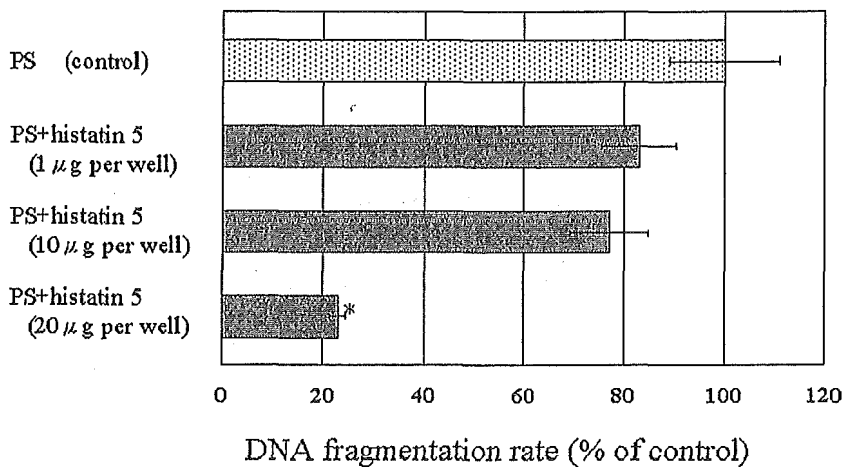


Fig. 2. Histatin 5 inhibition of DNA fragmentation of HGF cells stimulated with *P. gingivalis* PS (30 μg/ml). When the concentration of histatin 5 was 20 μg/ml, it inhibited the apoptotic cell death induced by PS of *P. gingivalis*. \*Significantly different from control at  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION

HGF produces many kinds of cytokines in response to stimulation by some bacterial antigens, and plays an important role in the cytokine network in oral lesions (Imatani et al., 2000; Imatani et al., 2001; Sugawara et al., 1998; Wang et al., 2000). Our previous study (Imatani et al., 2001) demonstrated that *P. gingivalis* PS induced the production of the inflammatory cytokines from HGF. *P. gingivalis* LPS or 57-kDa OMP showed the same effect. In this study, *P. gingivalis* PS inhibited HGF cell proliferation, but *P. gingivalis* LPS and 57-kDa OMP were without influence. Furthermore, we previously observed that *P. gingivalis* PS induced cell death by microscopic observations. In the present study, we confirmed that the PS preparation affected apoptosis. Apoptosis has been shown to play an important role in the control of the immune, hemopoietic, and developmental systems (Kerr et al., 1972). *P. gingivalis* LPS administration to mice was shown to induce apoptosis of lymphocytes in the spleen, lymph nodes, and thymus (Isogai et al., 1996). We detected intercellular DNA fragmentation of HGF after stimulation by PS at a concentration of 30 μg/ml. In contrast, a low dose of PS from *P. gingivalis* did not induce a significantly high rate of DNA fragmentation in HGF. In our previous paper, we demonstrated that the IL-1β and IL-8 production activity of *P. gingivalis* PS at low doses (1 μg and 10 μg) was higher than that of

the control (Imatani et al., 2001). *P. gingivalis* PS may exhibit cytokine inducing activity at low doses and may induce apoptosis at high doses. Recently, Hirai et al. (2003) reported that *P. gingivalis* LPS did not induce significant apoptosis in all tested doses (1 to 100 μg). We also clarified that the DNA fragmentation of HGFs was induced by PS stimulation, but not by the LPS of *P. gingivalis*. Our results suggest that the PS rather than LPS of *P. gingivalis* leads to the HGF apoptosis. The present study showed that apoptotic HGF cell death was induced mainly by PS.

Histatins are small, histidine-rich salivary polypeptides which exhibit antimicrobial activity. Histatins 1, 3 and 5 are capable of killing *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* (Mackay et al., 1984). Our previous study (Imatani et al., 2000) demonstrated that histatin 5 plays a protective role in elimination of some of the virulence effects of *P. gingivalis* 57-kDa OMP on released inflammatory cytokines from HGF. In this study of the apoptosis-inducing activity of *P. gingivalis* PS, histatin 5 significantly inhibited its activity at 20 μg per well. A lower dose of histatin 5 (1 or 10 μg per well) showed only slight inhibition. In this study, the PS preparation was preincubated with histatin 5 for 20 min. A longer incubation time may be needed to induce an effective inhibitory activity with a lower dose of histatin 5. In this study, we also found that the protective effect of histatin 5 against cell proliferation inhibitory activity of *P. gingivalis* PS was effective at a

concentration of 20  $\mu$ g/ml per well. When PS and histatin 5 mixtures stimulated HGF without preincubation, the inhibitory activities were less effective (Table 2). Previously, Murakami et al. (1991) have reported that histatin 5 binds to the cell surface of *P. gingivalis* rapidly and that the process is capable of reaching saturation. In this study, we demonstrated that preincubation of PS with histatin 5 was important. This fact suggests that histatin 5 interacts with the PS of *P. gingivalis*, but not with HGF. The present study indicates that histatin is an important salivary peptide for protecting against virulence factors of periodontopathic bacteria. However, as the entire role of salivary histatin 5 in relation to other salivary proteins in oral defense mechanisms has not yet been clarified, further study is necessary to understand the roles of salivary proteins.

*Acknowledgments:* This study was supported by Nihon University Individual Research Grant (2002).

We wish to thank Dr. B. L. S. Pierce, a professional editor who is the Life Sciences Academic Director for the Asian Division of the Maryland University College for her critical reading of this manuscript.

#### REFERENCES

- Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE (1995) Differential expression of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J Dent Res* 74: 1057-1065.
- Beck JD, Koch GG, Roizer RG, Tudor GE (1990) Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community dwelling blacks and whites. *J Periodontol* 61: 521-528.
- Blake MS, Gostchlich EC (1982) Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 36: 277-283.
- Gibbons RJ (1989) Bacterial adhesion to oral tissue: a model for infectious disease. *J Dent Res* 68: 750-760.
- Gibson G, Barrett E (1992) The role of salivary function on oropharyngeal colonization. *Spec Care Dent* 12: 153-156.
- Hirai K, Yoshizawa H, Hasegawa H, Ueda O, Shibata Y, Fujimura S (2003) Comparison of ability of apoptosis induced by lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* with *Escherichia coli*. *Eur J Med Res* 8: 208-211.
- Imatani T, Kato T, Okuda K (2001) Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 16: 65-72.
- Imatani T, Kato T, Minaguchi K, Okuda K (2000) Histatin 5 inhibits inflammatory cytokine induction from human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 15: 378-382.
- Isogai E, Isogai H, Kimura K, Fuji N, Takagi S, Hirose K, Hayashi M (1996) In vivo induction of apoptosis and immune responses in mice by administration of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 64: 1461-1466.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Mackay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollock JJ (1984) Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 44: 695-701.
- Muir D, Varson S, Manthorpe M (1990) An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. *Anal Biochem* 185: 377-382.
- Murakami Y, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Nakashima K, Kato Y, Aimoto S (1991) Binding of histidine-rich peptides to *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 66: 253-256.
- Murakami Y, Takashita T, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Aimoto S (1990) Inhibitory effects of synthetic histidine-rich peptides on hemagglutination by *Bacteroides gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 35: 775-777.
- Nishikata M, Kanehira T, Oh H, Tani H, Tanizaki M, Kuboki Y (1991) Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 625-630.
- Ochiai KT, Fukushima K, Ochiai K (1997) Butyric acid-induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells. *Infect Immun* 65: 35-41.
- Ochiai KT, Fukushima K, Ochiai K (1999) Lipopolysaccharide stimulates butyric acid-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 67: 22-29.
- Okuda K (1993) Attachment mechanism and colonization. In: *Biology of the species Porphyromonas gingivalis*. (Shah, ed.) Boca Raton: CRC Press, pp. 139-157.
- Schifferle RE, Reddy MS, Zambon JJ, Genco RJ, Levine MJ (1989) Characterization of a polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. *J Immunol* 143: 3035-3042.
- Sugawara S, Sugiyama A, Nemoto E, Rikiishi H, Takeda H (1998) Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts: Characterization and CD14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun* 66: 3043-3049.
- Wang PL, Shirasu S, Shinohara M, Daito M, Oido M, Kowashi Y, Ohura K (1999) Induction of apoptosis in human gingival fibroblasts by a *Porphyromonas gingivalis* protease preparation. *Arc Oral Biol* 44: 337-342.
- Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K (2000) Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 1161-1167.

Received: February 18, 2004 / Accepted: March 23, 2004

Address for correspondence:

Tetsuo Kato  
Department of Microbiology  
Tokyo Dental College  
1-2-2 Masago, Mihama-ku, Chiba 261-8502, Japan  
Phone: +81 43/270-3743  
Fax: +81 43/270-3744  
E-mail: tekato@tdc.ac.jp

Y. Yamashita

Present address:

Department of Preventive Dentistry  
Kyushu University  
School of Dentistry, Fukuoka, Japan

## Development of Web-based intervention system for periodontal health: a pilot study in the workplace

MIKI OJIMA†\*, TAKASHI HANIOKA‡, MASAE KUBONIWA†, HIDEKI NAGATA† and SATOSHI SHIZUKUISHI†

†Department of Preventive Dentistry, Graduate School of Dentistry, Osaka University, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan

‡Department of Preventive and Public Health Dentistry, Fukuoka Dental College, Tamura 2-15-1, Sawara-ku, Fukuoka, 814-0193, Japan

(Received February 2003)

**Abstract.** *Background:* It has recently been accepted that periodontal disease is a risk factor for not only tooth loss but also systemic diseases. An effective system of public intervention for periodontal health to enable continuous intervention of dental professionals has been sought. We developed a Web-based intervention system regarding periodontal health and evaluated the effects of the system in the workplace.

*Methods:* The system was capable of storage and display of personalized oral health records including video images pertaining to toothbrush manipulation within their own oral cavities based on instructions by dental professionals. The system enabled clients to view movement of their own skill, and repeatedly. Thirteen workers of a company were randomized to either an experimental or control group. The control group received face-to-face toothbrushing instruction at the company and follow-up via telephone. The experimental group received follow-up through our system in addition to those components employed in the control group.

*Main results:* The workers in the experimental group benefited in terms of improvements of not only plaque removal but also periodontal health over 3 months.

*Conclusions:* These results indicate that implementation of a Web-based approach for periodontal health affords the possibility of remote instruction and produces additional public benefit.

*Keywords:* WWW; Periodontal health; Intervention; Teledentistry

### 1. Introduction

Prevalence of periodontal disease is high regardless of age or sex throughout the world [1]. It has recently been accepted that periodontal disease is a risk factor for not only tooth loss but also systemic diseases [2]. Appropriate oral self- and professional-care are necessary for prevention of periodontal disease [3]. Toothbrushing, which is the simplest oral self-care method, is essential to maintain health of teeth and gingiva; however, many people practice poor brushing techniques. One-off instruction and education regarding toothbrush use by dental professionals are practiced in the workplace or within communities in Japan. However, the system is not sufficient to change people's behaviour regarding oral self-care due to the transient attention focused on periodontal health during receipt of oral health instruction [4]. In addition, follow-up in the workplace or in communities requires much time and high cost. Therefore, a more effective system of public intervention to enable continuous intervention of dental professionals has been sought.

\*Author for correspondence; e-mail: ojima@dent.osaka-u.ac.jp

The Internet is rapidly becoming available to the public. More importantly, the Web has become a standardized infrastructure providing access to sophisticated telemedicine applications from virtually any machine and operating system [5]. Several experiments related to Web-based intervention were conducted in the medical field [6, 7]. Recently, the Web has emerged as a platform for computer-based oral health records [8]. To the best of our knowledge, although no reports have been published concerning a Web-based intervention system for periodontal health, the technology could also apply to the continuation of toothbrushing instruction. In the present study, a novel intervention system for periodontal health was developed based on Web technology. In addition, a pilot study was conducted in the workplace to evaluate the effect of the system in terms of intervention.

## 2. Methods

### 2.1. System design

Requirements for the success of chronic disease management intervention include: (1) efficient collection and use of data for personalization, (2) active involvement of patients and (3) follow-up phone contacts [9, 10]. We considered these requirements in relation to characteristics of the Web, such as multimedia, interactive user interface and telecommunications. Figure 1 exhibits the basic concept of this system. A Web server was activated at the Graduate School of Dentistry, Osaka University. The server executes a common gateway interface (CGI) program written in Perl, version 5.004. Minimal requirements for the use of this system are access to the Internet and an ordinary Web browser.

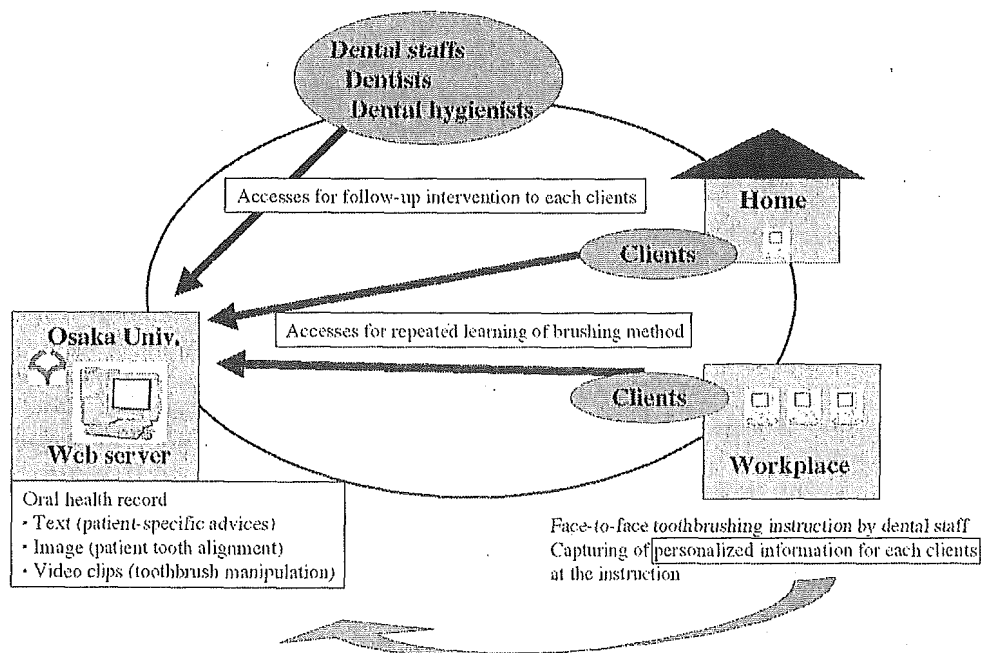


Figure 1. Basic concept of the system.

The system is capable of storage and display of personalized oral health records based on instructions by dental staff. In order to create effective intervention [11], materials for oral self-care were tailored to each individual. The material contained three types of files: a text file, an image file and video files. Patient-specific advice based on instruction was written in the text file. The image file documents patient tooth alignment and indicates locations where patients should exercise greater caution. The video images demonstrated toothbrush use in areas that are difficult to clean. Two types of video formats were prepared: Quicktime for mainly Macintosh computers and Audio Video Interleaved (AVI) formats for mainly Windows. CGI program dynamically built and displayed a hypertext markup language (HTML) file based on the above files when it was executed. Figure 2 shows an example of the HTML page based on oral health record. Items based on instruction were listed in the table enabling clients to check their behaviours or brushing methods. Important items were also graphically displayed. Several items concerning toothbrush movements were hot links to the video images, which were recorded at workplace examination. When clients receive re-instruction, a new component for check-up will be added to the page.

Users were authenticated through a combination of identification code (ID) and password upon logging into the system. Authentication rules were embedded within a CGI program. Following successful log-in, dental staff were provided a list of

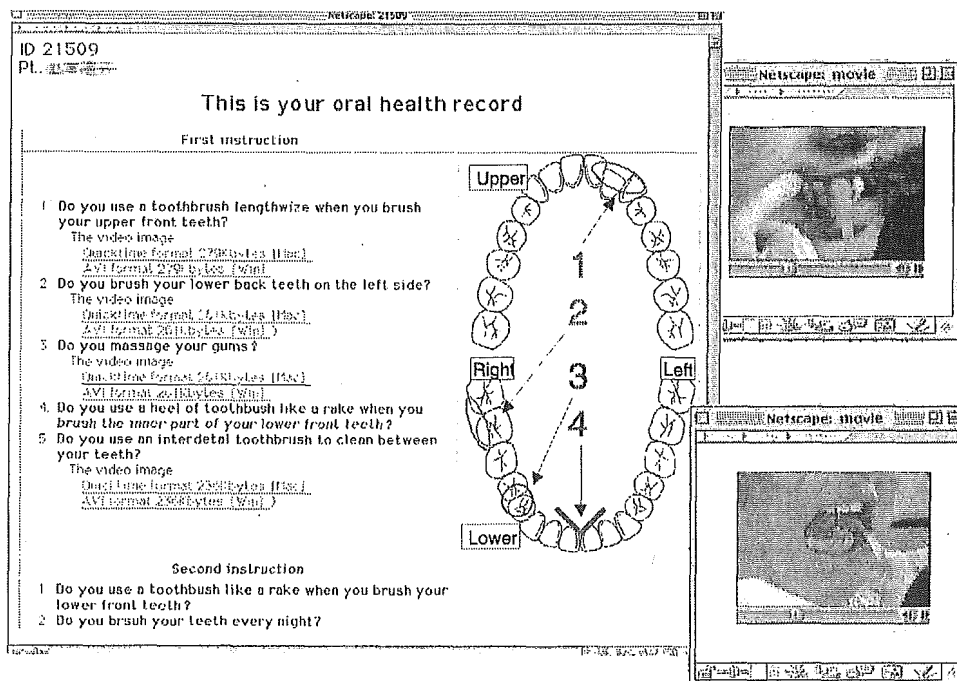


Figure 2. Presentation of an example of HTML page based on the oral health record. The record consists of text, picture and video files. The personalized information contains patient-specific advices (left of the large window), their tooth alignment (right of the large window) and suitable brushing methods (two small windows). This page was originally written in Japanese. The URL is an English page for the demonstration is <http://pinocchio.dent.osaka-u.ac.jp/ojima/occup/index-ed.html>.

clients assigned to him or her shown on the Web page. To view the record of any client, the dental staff clicked on any one of the hyperlinked patient names on the list. Clients could view only their record following log-in. Clients could access their oral health records on the Web server from their home and workplace. Clients could repeatedly learn effective brushing methods without restrictions in terms of location or time.

### 2.2. Experimental implementation of the system

Thirteen workers were randomly assigned to two groups: Control (group C) ( $n = 7$ ) or Experimental (group E) ( $n = 6$ ). The workers were familiar with Internet access. The subjects in the group E were not trained for use of the system. No differences in the mean age and sex ratio were found between the two groups. Subjects in the study did not have severe systemic disease and receive any periodontal and antibiotics therapy during the examination. Figure 3 depicts the schedule of intervention. Intervention for workers in group C consisted of two occasions of face-to-face toothbrushing instruction and telephone follow-up. The baseline intervention consisted of initial face-to-face instruction conducted by dental hygienists at the workplace for 15–20 min. Toothbrushing instruction included cleaning of teeth and gums with toothbrushes and plaque disclosure. Three weeks after the baseline examination, the second instructional meeting was conducted by dental hygienists at the workplace. The instruction consisted of a revision and confirmation of the first instruction. Two months after the baseline, the dental hygienists conducted follow-up by telephone to encourage each worker. Personalized information from each worker captured by dental hygienist at the instruction were converted a text file, an image file and video files, and stored in the Web server. Workers in group E received Web-based follow-up via our system in addition to that intervention described for clients in group C. Assessments of periodontal health with indices of periodontal destruction and gingival inflammation [12], and plaque removal with indices of plaque accumulation [13] and oral hygiene [14] were conducted at the baseline and at 3 months following the initial examination. Video images for each person were acquired with a digital video camera

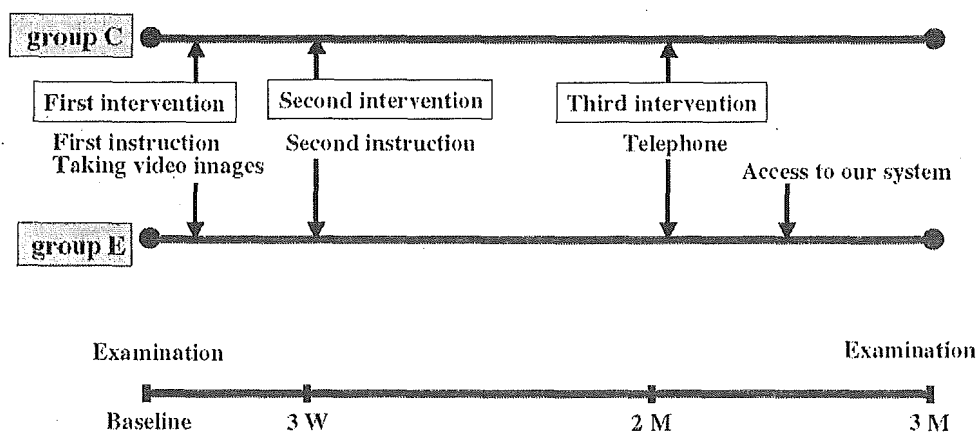


Figure 3. Schedule of intervention in this study.

(DCR-TRV10, Sony Co. Tokyo, Japan) at the time of baseline instruction. All workers, following explanation regarding the objective and use of the video images, provided informed consent.

### 2.3. Statistical analysis

Reduction rate of clinical parameters was calculated as  $([\text{measurements at baseline}] - [\text{measurements at 3 months after}]) / ([\text{measurements at baseline}] \times 100)$ . Differences with respect to reduction rate of clinical parameters were verified in each group at baseline examination and at 3 months after the baseline examination utilizing Wilcoxon test in order to evaluate the effect of Web-based intervention. These analyses were performed with the StatView Ver 4.5 statistical package (Abacus Concepts, Inc., CA, USA). The level of significance was set at 5%.

## 3. Results

### 3.1. Results of implementation

During the 1-month experimental period, the system received 33 total requests (5.5 requests per individual on average). The greatest number of requests per individual was seven. Approximately 75% of requests were received in the first 3 days of the experimental period. The time period characterized by the highest frequency of requests was noon to 6 pm.

### 3.2. Changes in clinical parameters during the 3-month period

Figure 4 displays the mean reduction rate of clinical parameters in groups C and E during the 3-month post-baseline examination. Differences in indices of

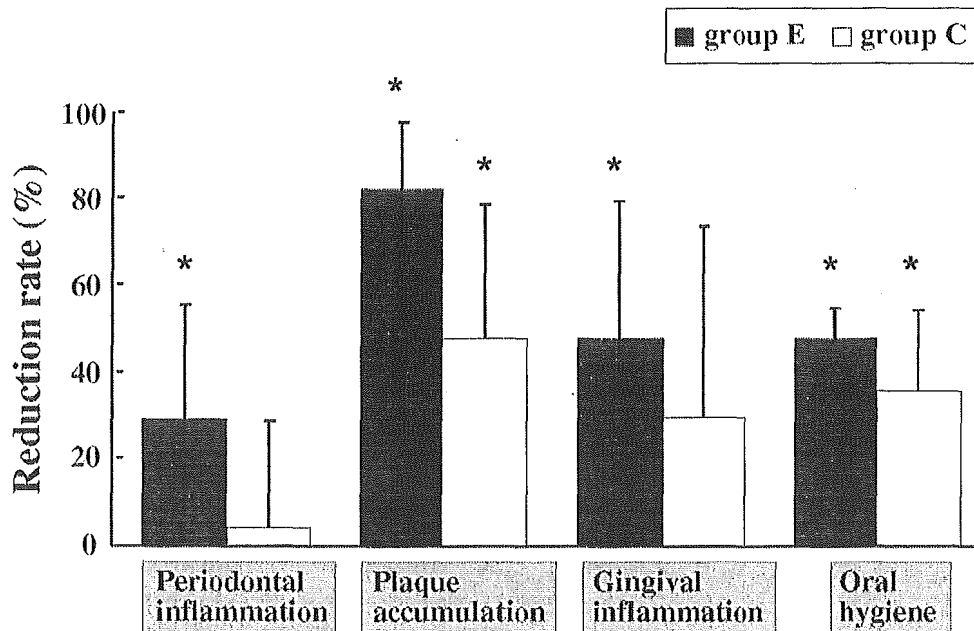


Figure 4. Reduction rate of all clinical parameters during the 3-month period. \*Significantly different between the baseline and the 3-month examination in the group ( $p < 0.05$ ).



periodontal destruction, plaque accumulation, gingival inflammation and oral hygiene between the baseline and the 3-month examination were significant in group E ( $p = 0.046, 0.027, 0.028$  and  $0.028$ , respectively), whereas in group C, only differences in indices of plaque accumulation and oral hygiene were significant ( $p = 0.026$  and  $0.018$ , respectively).

### 3.3. *User's comments after the system trial*

The following comments were obtained from workers of group E in a questionnaire conducted after the trial: (1) I think that this system is useful for checking how to brush my gums later without restrictions in place and time. (2) I hope the system will have greater interactive user interface. (3) Functions using audio will make the instruction on the Web more effective.

## 4. Conclusions

### 4.1. *Use of the system*

Workers accessed their tailored records on the Web approximately five times on average; most requests occurred in the first 3 days. These findings indicate that workers utilize the on-line service to review suitable brushing methods. Thus, an Internet-based system could allow remote support by dental professionals. The system may also compensate for the lack of instruction time. However, since users easily tend to lose interest in the materials, additional interactive functions should be added to the system in order to appeal to users continuously and to make the follow-up more effective.

### 4.2. *Effect of Web-based intervention*

Improvement in plaque removal was observed in group C during the 3-month period. This finding agrees with the report regarding the effectiveness of re-instruction with respect to improvement of plaque removal compared to one-off instruction [15]. Intervention applied in group E included a Web-based follow-up in addition to those components in group C. Intervention was effective in terms of improvement not only in indices of plaque accumulation and oral hygiene (plaque removal) but also in indices of gingival inflammation and periodontal destruction (periodontal health). These results indicate that the Web-based approach is more effective than conventional intervention. Further studies should consider longer-term and behavioural effects on periodontal health using the Web-based intervention.

### 4.3. *Utility of video images*

A simple and efficient manner by which to improve plaque removal involves provision of educational materials related to toothbrushing instruction. Video images have the advantage of depicting movements of a brush on the gums and teeth; as a result, this instruction provided an additional benefit to written instruction [16]. Video images available in this study presented the actual movements of toothbrushing taught by the dental hygienist. In addition, the system was designed such that workers could refer to images on the Web. Repeated viewing of images pertaining to toothbrush manipulation within their own oral cavities could motivate clients to change their brushing behaviour.

#### 4.4. Limitation of study and future overview

Implementation was conducted at a small company; consequently, the number of subjects was limited in the present investigation. Therefore, we are now planning a longitudinal follow-up study involving a larger population. The outcome of this study could serve as evidence of the effectiveness of Web-based intervention and support the future work for the application to the public.

Increasing interest exists regarding public health intervention involving low-cost, self-help materials and minimal support from professionals [17]. Teledentistry, which is a new field in dentistry, possesses the two advantages of improvement in accessibility of health care and reduced health care costs [18]. A Web-based intervention system for periodontal health may serve as a novel concrete example of teledentistry.

The experimental implementation of our system suggested that the Internet, especially the Web, could provide the public with health information, as well as effective intervention. The Web is a low-cost multimedia technology and is available as a telecommunication tool [8]; consequently, the system may enable the creation of supportive environments and the strengthening of community action for oral health promotion in ways that few other innovations have. Information technology, which can function as a communication builder for dental researchers or practitioners, also has the potential for providing the public with better health services.

#### Acknowledgement

The authors thank Kiyoharu Iwata, Jyunko Hashimoto (Association for Preventive Medicine of Japan) and Ryoichi Matsuse (Kyoto Medical Science Laboratory Inc.) for assistance with the implementation of the system, and Dr. Hiroo Tamagawa (Osaka University Dental Hospital) for his helpful comments.

#### References

1. <http://www.dent.niigata-u.ac.jp/prevent/perio/contents.html>.
2. SCANNAPIECO, F.A., 1998, Position paper of the American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *Journal of Periodontology*, **69**, 841–850.
3. US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, 1997, *Guide to Clinical Preventive Services, 2nd edn* (McLean: International Medical Publishing, Inc.)
4. AINAMO, J. and AINAMO, A., 1996, Risk assessment of recurrence of disease during supportive periodontal care. Epidemiological considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, **23**, 232–239.
5. BELLAZZI, R., MONTANI, S., RIVA, A. and STEFANELLI, M., 2001, Web-based telemedicine systems for home-care: technical issues and experiences. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, **64**, 175–187.
6. OENEMA, A., BRUG, J. and LECHNER, L., 2001, Web-based tailored nutrition education: results of a randomized controlled trial. *Health Education Research*, **16**, 647–660.
7. STARREN, J., HRIPCSAK, G., SENGUPTA, S., ABRUSCATO, C.R., KNUDSON, P.E., WEINSTOCK, R.S. and SHEA, S., 2002, Columbia University's Informatics for Diabetes Education and Telemedicine (IDEATel) project: technical implementation. *Journal of American Medical Informatics Association*, **9**, 25–36.
8. SCHLEYER, T.K. and DASARI, D.R., 1999, Computer-based oral health records on the World Wide Web. *Quintessence International*, **30**, 451–460.
9. CLARK, N.M., BECKER, M.H., LORIG, K., RAKOWSKI, W. and ANDERSON, L., 1991, Self-management of chronic disease by older adults: a review and questions for research. *Journal of Aging Health*, **3**, 3–27.
10. WASSON, J., GAUDETTE, C., WHALEY, F., SAUVIGNE, A., BARIBEAUN, P. and WELCH, H.G., 1992, Telephone care as a substitute for routine clinic follow-up. *Journal of American Medical Association*, **267**, 1788–1793.

11. BROWN, S.J., LIEBERMAN, D.A., GERMENY, B.A., FAN, Y.C., WILSON, D.M. and PASTA, D.J., 1997, Educational video game for juvenile diabetes: results of a controlled trial. *Medical Informatics*, **22**, 77–89.
12. LOBENE, R.R., WEATHERFORD, T., ROSS, N.M., LAMM, R.A. and MENAKER, L., 1986, A modified gingival index for use in clinical trials. *Clinical Preventive Dentistry*, **8**, 3–6.
13. SILNESS, J. and LÖE, H., 1964, Periodontal disease in pregnancy. II Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica*, **22**, 121–135.
14. O'LEARY, T.J., DRAKE, R.B. and NAYLOR, J.E., 1972, The plaque control record. *Journal of Periodontology*, **43**, 38.
15. ANELSSON, P. and LINDHE, J., 1981, Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. Results after 6 years. *Journal of Clinical Periodontology*, **8**, 239–248.
16. ADDY, M., RENTON-HARPER, P., WARREN, P. and NEWCOMBE, R.G., 1999, An evaluation of video instruction for an electric toothbrush. Comparative single-brushing cross-over study. *Journal of Clinical Periodontology*, **26**, 289–293.
17. ABRAMS, D.B., ORLEANS, C.T., NIAURA, R.S., GOLODSTEIN, M.G., PROCHASKA, J.O. and VELICER, W., 1996, Integrating individual and public health perspectives for treatment of tobacco dependence under managed health care: a combined stepped-care and matching model. *Annals of Behavioral Medicine*, **18**, 290–304.
18. GOLDER, D.T. and BRENNAN, K.A., 2000, Practicing dentistry in the age of telemedicine. *Journal of American Dental Association*, **131**, 734–744.

## 口腔疾患のリスクファクター： 喫煙習慣

大阪大学大学院歯学研究科 予防歯科学 雫石 聡 Satoshi SHIZUKUISHI  
大阪大学大学院歯学研究科 予防歯科学 小島美樹 Miki OJIMA



### 喫煙習慣が口の健康に与える悪影響

現在、全国的に展開されている「21世紀における国民健康づくり運動（健康日本21）」での「歯の健康」の目標のひとつに、歯周病予防のため、喫煙が及ぼす健康への影響に関する知識の向上や禁煙プログラムの普及などが挙げられている。さらに、平成15年5月に施行された「健康増進法」では、医療機関など公共の場での受動喫煙対策などを強力に推進することを求めている。したがって、今後、国民の口の健康を維持・増進する責務をもつ歯科医や歯科衛生士などいろいろな形で喫煙対策に関与する機会があると思われる。

近年、喫煙の口腔への健康影響については、国内外において多くのエビデンスが示されつつある。歯肉メラニン色素沈着（図1）は疾患ではないが、喫煙者に多くみられるため、

喫煙者、とくに未成年者や女性が自分自身で直接喫煙の影響を確認できるよい例である。口腔癌（図2）や前癌病変である白板症（図3）も喫煙と関連することはよく知られており、男性喫煙者の口腔癌発症のリスクは約4倍といわれている<sup>1)</sup>。

歯科医が日常よく接する疾患のひとつである歯周病（図4）の発症・進行が、喫煙により強い悪影響を受けることが最近明らかにされている。また、喫煙者は、歯周治療、インプラント処置や抜歯後の創傷治療などの予後が不良で、歯科医の処置に対して期待した結果が得られない場合が多い。

### 歯周病のリスクファクターと喫煙習慣

歯周病は歯周病原性細菌による感染症と考えがちであるが、実際に歯周病の予防や治療を行うと、さまざまな要因が複雑に重なって

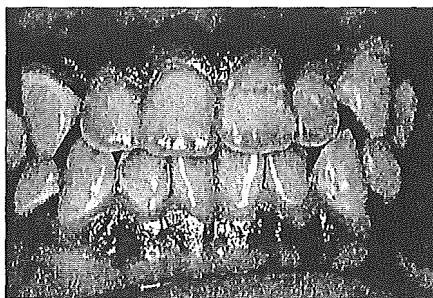


図1 歯肉メラニン色素沈着

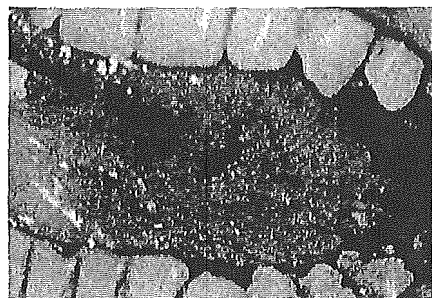


図2 口腔癌

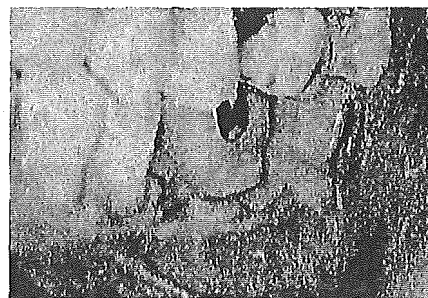
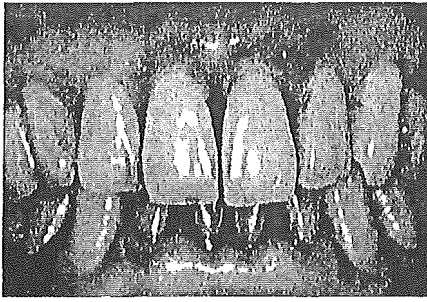


図3 白板症

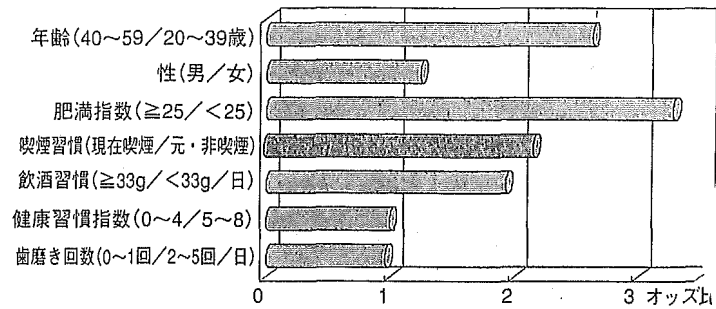


図④ 喫煙関連性歯周病

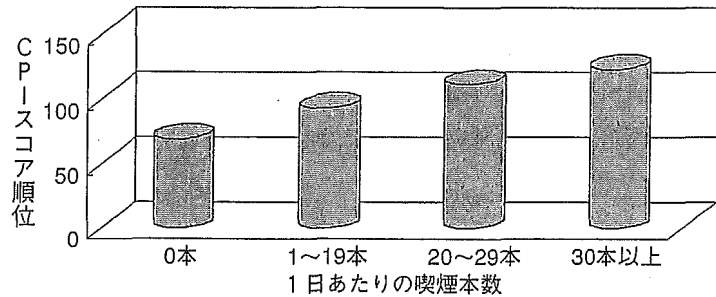
生じる生活習慣病であると実感させられる。歯周病の予防、治療には直接的な原因を除去するとともに、ライフスタイル要因など歯周病のリスクファクターを取り除くことが不可欠である。リスクファクターとは、病気の発症・進行が起こる確率を高める因子をいい、原因因子である必要はない。病気の真のリスクファクターであることを証明するためには、さまざまな因果関係の証明や基礎的研究によるメカニズムの解明を行わなければならない。現在のところ、歯周病のリスクファクターとしては喫煙をはじめ、糖尿病、プラークと歯石、歯周病原性細菌などが挙げられている<sup>2)</sup>。

歯周病と喫煙との因果関係は疫学調査によって証明される。われわれも、某企業メーカーの従業員を対象に歯周診査とライフスタイルに関する質問票による調査を行い、その結果、肥満指数、喫煙、飲酒、総合的な健康習慣指数や歯磨き回数が歯周ポケット4mm以上を有する歯周病の有病率と関連していることを明らかにし、歯周病が生活習慣病であることを示した<sup>3)</sup>(図5)。この調査時の歯周病に対する喫煙のリスクの程度は、オッズ比で2.2であり、このことから、喫煙者は非喫煙者に比べて歯周病のリスクが2.2倍高いといえる。

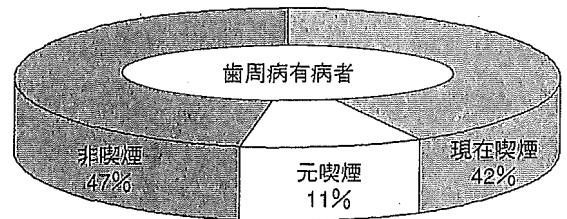
世界各地で行われた多くの調査では、歯周病に対する喫煙のリスクは2~14倍であると報告されている<sup>4)</sup>。また、1日の喫煙本数が増えるに従い、歯周病の程度も悪化し、30本以上喫煙する者は非喫煙者に比べて2倍以上



図⑤ 歯周病有病に対するライフスタイルのリスク

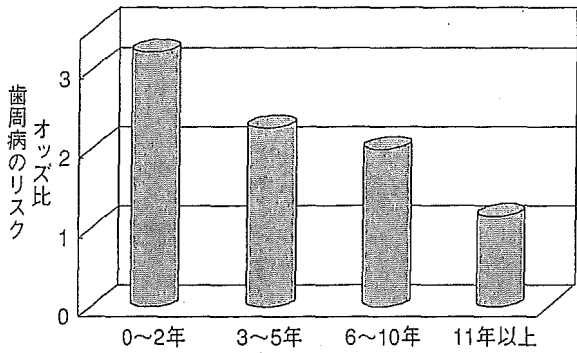


図⑥ 喫煙量と歯周病との関係



図⑦ 喫煙習慣が歯周病に寄与する割合

のリスクがあり、量-反応関係がみられる<sup>5)</sup>(図6)。歯周病に罹患している者のなかで、何%の者が喫煙が原因で歯周病になっているのかを示す指標として集団寄与危険度が用いられる。アメリカでの大規模な疫学研究「NHANES III」<sup>6)</sup>では、歯周病有病者の42%(640万人)が現在吸っているタバコで、11%(170万人)が以前に吸っていたタバコが原因で歯周病に罹患したと推定されている(図7)。一方、禁煙することにより、歯周病のリスクが低下することが示されており、11年以上禁煙を続けると、そのオッズ比は1.2まで低下し、非喫煙者と同じレベルとなり、喫煙の影響がほぼなくなることを示している(図8)。また、喫煙習慣を調べた後、数年後に歯周病の進行を診査した研究でも、喫煙がリスクとなって歯周ポケットや歯槽骨の吸収を進行さ

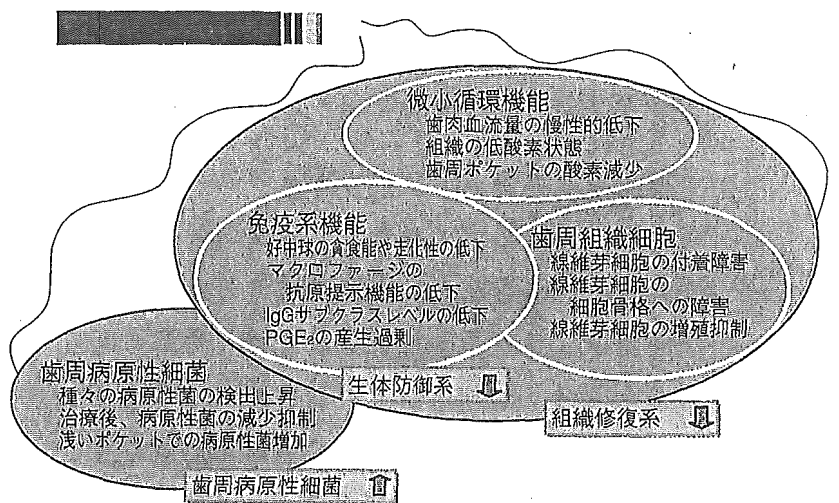


図⑧ 禁煙による歯周病リスクの低下

せることが証明されている。

### 喫煙による歯周組織破壊のメカニズム

喫煙による歯周組織破壊機序については、宿主（歯周組織）と病因（歯周病原性細菌）の両面から考えられている<sup>7)</sup>(図9)。喫煙によって、一般に末梢の血管の収縮や血流の低下が生ずることはよく知られているが、歯周組織でも同様の変化が起こっていると考えられ、歯肉の血流量や酸素飽和度が慢性的に低下し、低酸素状態となっている<sup>8)</sup>。また、歯周ポケット内の酸素分圧も低下することが示され、このことが歯周病原性細菌の歯周ポケットでの定着・増殖を促進するかもしれない<sup>9)</sup>。免疫系に対しても、喫煙のおもにニコチンが作用する。喫煙者の好中球では、貪食能や走化性が低下し、マクロファージによる抗原提示機能も抑制される。血清中のIgG量の減少、歯周病原性細菌に特異的なIgG<sub>2</sub>や唾液IgAレベルの低下がみられるという。また、喫煙はPGE<sub>2</sub>の過剰な産生や、種々のサイトカインの生成にも影響するといわれているが、一定の結果は得られていない。これら免疫系に及ぼす喫煙の影響は、歯周組織での防御能力の低下を招いていると考えられる。歯周組織を構成する線維芽細胞は、喫煙中のニコチン、アクロレイン、アセトアルデヒドなどの影響を受け、増殖能や付着能、コラーゲンの産生能などの機能が低下したり、細胞骨格が障害さ



図⑨ 喫煙が歯周組織に与える悪影響

れたりするといわれている。したがって、喫煙は歯周組織の再生・修復に障害を及ぼしていると考えられる。

過去の多くの研究では、喫煙習慣はプラーク量や口腔清掃度とあまり関連しないという。しかし最近、喫煙が歯周病原性細菌に及ぼす影響について、さまざまな知見が得られている。喫煙量と *Bacteroides forsythus* との間に量依存的な関連がみられることや、喫煙によって *Treponema denticola* の定着リスクが高まることが報告されている<sup>10)</sup>。また、喫煙者からは、非喫煙者に比べて多種類の歯周病原性細菌が検出され、とくに < 4 mm や ≤ 5 mm の浅いポケットで、また下顎よりも上顎で顕著であったという<sup>11,12)</sup>。さらに、歯周治療を行っても、喫煙者ではいくつかの歯周病原性細菌が依然として多く検出されるという<sup>13)</sup>。喫煙者の歯周ポケットには歯周病原性細菌が多く定着し、さらに浅い歯周ポケットに多くみられることから、喫煙者では初期の歯周病変がさらに進行すると思われる。また、歯周病原性細菌のもつ内毒素(LPS)とニコチンを線維芽細胞に作用させると、細胞障害性が増強したり、サイトカインの産生が上昇したりする<sup>14)</sup>。このことは、喫煙者では歯周病原性細菌の病原性をより強く受けることを示している。

## 喫煙習慣が歯周治療に及ぼす影響

喫煙が歯周病の確立されたリスクファクターとして実証されていることから、喫煙関連性歯周炎という独立した診断名を用いることが推奨されている<sup>15)</sup>。喫煙者に対して歯周治療を行う際には、喫煙者特有の歯周の状態や反応をよく観察しながらアプローチする必要がある。喫煙者の歯周病の診査においては、自覚症状や歯肉所見で著明な炎症が認められなくても、歯周組織検査によって歯周組織の破壊の程度を確認する必要がある。

歯周ポケットは、とくに前歯部や口蓋側で深い傾向にある。治療計画の立案の段階では、喫煙者の歯周治療の効果は非喫煙者に比べて劣る、すなわち予後が悪いということを考慮する。たとえば、難治性歯周炎とされた対象者の90%以上が喫煙者であったという。スクレーピングおよびルートプレーニングなどの非外科的治療法では、喫煙者の歯周ポケットの減少は非喫煙者や元喫煙者に比べて少なかった。しかし、非外科的処置に加えて、歯周ポケットにドキシサイクリンを投与した場合は、喫煙習慣があっても治療効果に差は認められなかった<sup>16)</sup>(図10)。外科的治療法においても同様に喫煙者のほうが予後が悪く、フラップ手術の術後に、喫煙者は非喫煙者に比べてアタッチメントの獲得が少ないことが示されている<sup>17)</sup>(図11)。さらに、喫煙者は非喫煙者に比べて、インプラント治療に失敗するリスクも1.5～6.0倍と高い。たとえば、喫煙者ではインプラント施術後3年間の合併症の発症率が15%も高いという報告もある<sup>18)</sup>(図12)。サポータティブケアの効果にも影響があり、喫煙者では歯周病の再発率が高い。この場合、歯周治療直後にみられた喫煙者と非喫煙者の治

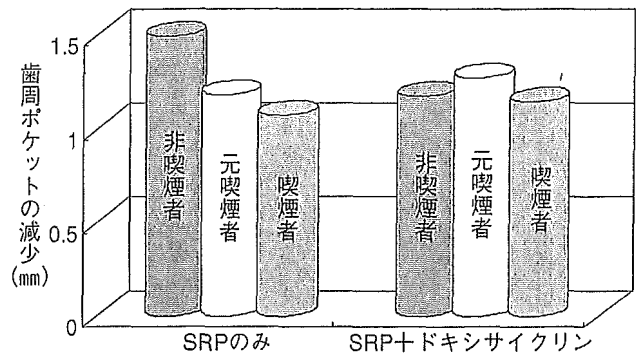


図10 非外科的処置の効果への喫煙の影響

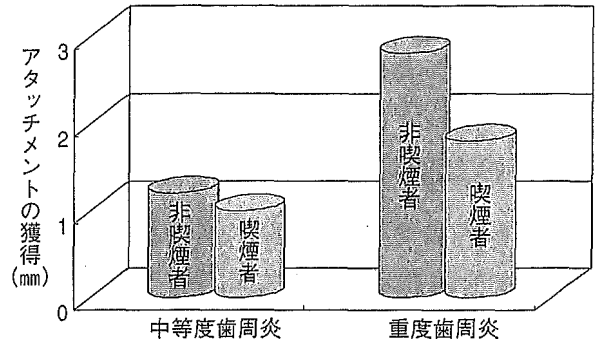


図11 フラップ手術の効果への喫煙の影響

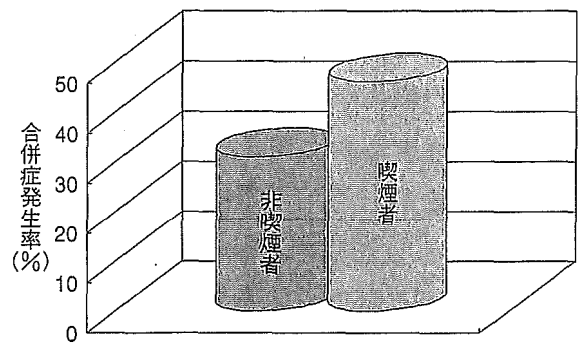


図12 インプラント施術の予後(3年)への喫煙の影響

療効果の差以上に、その差は顕著になる。サポータティブケアの時期においては、喫煙とコンプライアンスが低いことが重要なリスクファクターとなる。

以上のように、喫煙者に対して歯周治療を行う場合、いろいろな問題が生じることが多いが、喫煙者は歯周治療の禁忌症例ではない。喫煙者には、歯周治療開始前に治療効果が期待どおりに得られないこと、治療回数・期間が非喫煙者に比べて増すことなどの可能性について、十分な説明と同意が必要である。元喫煙者の歯周治療に対する反応性は非喫煙者と同じくらいであるといわれており、禁煙によって歯周組織の治癒機構が正常に戻るこ

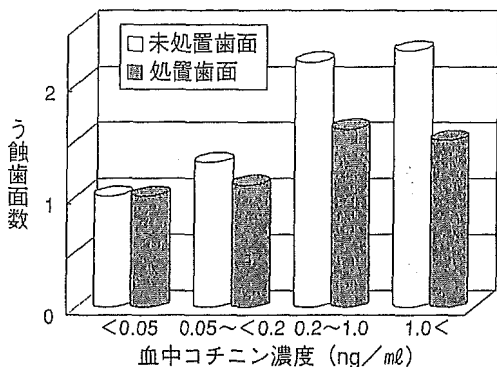


図13 う蝕有病に対する受動喫煙のリスク

を示している。このことから、喫煙による歯周組織への悪影響を説明することに加えて、禁煙についての助言を行うことが必要である。

### 受動喫煙が口腔疾患に及ぼす悪影響

受動喫煙（環境中タバコ煙）が口腔に及ぼす健康影響については、まだあまり多くの報告はみられないが、受動喫煙によりう蝕が増加したり、歯周病の程度が悪くなるという。英国での3～4.5歳の幼児を対象とした調査では、父親の喫煙より母親の喫煙の影響が強く、う蝕に対する母親の喫煙のリスクは、そのオッズ比が1.54であったという<sup>19)</sup>。

最近のNHANES IIIのデータを解析した研究では、4～11歳の子供を対象に調査が行われている<sup>20)</sup>。タバコの煙を吸うと、吸収したニコチンが代謝されてコチニンとなるので、受動喫煙の指標として血清中のコチニン量がよく用いられる。この研究では、血清中のコチニンレベルで受動喫煙の有無を調べ、未処置歯面乳歯う蝕に対するオッズ比は1.8で、処置歯面乳歯う蝕のオッズ比は1.4であったと報告している。さらに、受動喫煙の曝露を多く受けると、血清中のコチニン量が増加するが、その増加とともに未処置歯面や処置歯面の乳歯う蝕のリスクは高くなることを明らかにした(図13)。しかし、現在のところ、なぜ受動喫煙によってう蝕のリスクが高くなるの

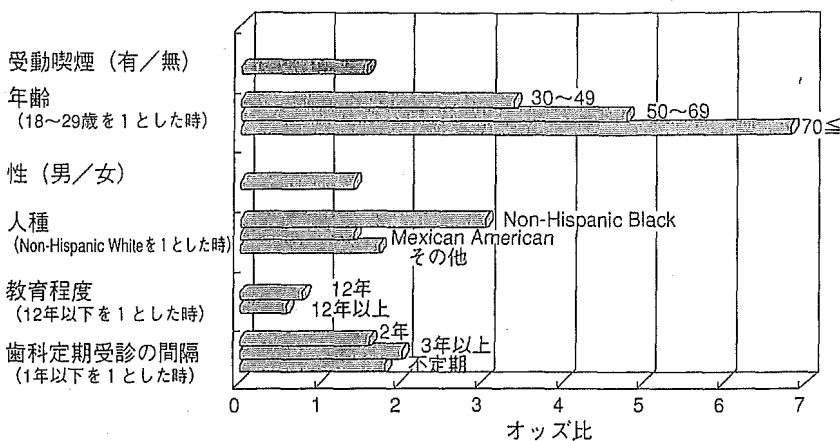


図14 歯周病有病に対する受動喫煙のリスク

かはよくわかっていない。

一方、受動喫煙の歯周病に及ぼす悪影響についても、NHANES IIIのデータ解析がなされている<sup>21)</sup>。受動喫煙については、家庭や職場で他人のタバコ煙を吸う機会のある者を受動喫煙者として歯周病のリスクを調べたところ、オッズ比は1.57であったという(図14)。これらのことから、さらに今後詳細な研究を行う必要はあるが、受動喫煙は口腔の健康に悪影響を及ぼす可能性があることも広く情報提供する必要がある。

### 口腔疾患を予防するための喫煙対策

喫煙の口腔への健康影響について、さまざまな角度から述べてきたが、その対策は禁煙につきるといっても過言ではない。そこで、この総説に引き続いて、三上直一郎先生と羽田房子先生には実際の禁煙指導の取り組みを、また、高橋裕子先生には禁煙サポートのノウハウを示していただく。そのなかでも述べられると思うが、喫煙にはタバコをやめにくくする3つの依存、つまり、精神的依存、社会的依存と薬物依存があり、長期的に禁煙することは言うほど簡単ではなく、何回かトライしてやっと成功するものである。したがって、禁煙にまで至らない喫煙者への口腔ヘルスケアも重要である。喫煙者の歯周病の特徴から、



歯周病が進行しているにもかかわらず、歯肉出血などの自覚症状が少なく、歯周病の発見が遅れることが多い。また、喫煙者は非喫煙者と比較して歯石沈着が多いので、喫煙者には定期健診や歯石除去のための定期的受診を勧めるべきである。

一方、ビタミンCをあまり摂取していない喫煙者は歯周病のリスクが高くなると報告されている<sup>22)</sup>。喫煙者の歯肉溝滲出液中や血中のビタミンC量は低下しており、このことは、たばこ煙成分に含まれる種々の過酸化物によってビタミンCが過剰に消費されることによるものと思われる。そのため、喫煙者ではビタミンCやビタミンEなどを十分に摂取することにより、歯周病の進行を抑制できるという<sup>23)</sup>。

歯科医院では、幅広い年齢層の比較的健康な人々に対し、定期健診や保健指導を行ったりする機会が多い。これらの機会を利用して国民の口の健康を守るために、できる限り多くの歯科医や歯科衛生士が禁煙サポートを手掛けられることを心から願う次第である。

#### 【参考文献】

- 1) 藤内 祝：口腔癌の疫学－日本と中国における喫煙、飲酒との関連、医学のあゆみ、188：206～207、1999.
- 2) Novak, K.F. et al. : Chapter 32. Risk assessment, In : Carranza's Clinical Periodontology 9th edition, Eds., Newman, M.G. et al., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp469～474, 2002.
- 3) Nishida, N. et al. : Association of ALDH2 genotypes and alcohol consumption with periodontitis, 投稿中.
- 4) 雫石 聰、埴岡 隆：喫煙と歯周病、臨床栄養、7：831～837, 1999.
- 5) Shizukuishi, S. et al. : Lifestyle and periodontal health status of Japanese factory workers. Ann. Periodontol., 3 : 303～311, 1998.
- 6) Tomar, S.L. and Asma, S. : Smoking-attributable periodontitis in the United States : Findings from NHANES III, J. Periodontol., 71 : 743～751, 2000.
- 7) Kinane, D.F. and Chestnutt, I.G. : Smoking and periodontal disease, Crit. Rev. Oral Biol. Med., 11 : 356～365, 2000.

- 8) Hanioka, T. et al. : Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease, J. Periodontol., 71 : 1846～1851, 2000.
- 9) Hanioka, T. et al. : Pocket oxygen tension in smokers and non-smokers with periodontal disease, J. Periodontol., 71 : 550～554, 2000.
- 10) Umeda, M. et al. : Risk indicators for harboring periodontal pathogens, J. Periodontol., 69 : 1111～1118, 1998.
- 11) Haffajee A.D. et al. : Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota, J. Clin. Periodontol. 28 : 377～388, 2001.
- 12) Eggert, F.M. et al. : Effects of smoking and treatment status on periodontal bacteria : Evidence that smoking influences control of periodontal bacteria at the mucosal surface of the gingival crevice, J. Periodontol., 72 : 1210～1220, 2001.
- 13) van Winkelhoff, A.J. et al. : Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis, J. Periodontol., 72 : 666～671, 2001.
- 14) Wendell, K.J. and Stein, S.H. : Regulation of cytokine production in human gingival fibroblasts following treatment with nicotine and lipopolysaccharide, J. Periodontol., 72 : 1038～1044, 2001.
- 15) Burgan, S.W. : The role of tobacco use in periodontal diseases : a literature review, Gen. Dent., 45 : 449～460, 1997.
- 16) Ryder, M.I. et al. : Effects of smoking on local delivery of controlled-release doxycycline as compared to scaling and root planing, J. Clin. Periodontol., 26 : 683～691, 1999.
- 17) Scabbia, A. et al. : Cigarette smoking negatively affects healing response following flap debridement surgery, J. Periodontol., 72 : 43～49, 2001.
- 18) Schwartz-Arad, Devorah. et al. : Smoking and complications of endosseous dental implants. J. Periodontol., 73 : 153～157, 2002.
- 19) Williams, S.A. et al. : Parental smoking practices and caries experience in pre-school children, Caries Res., 34 : 117～122, 2000.
- 20) Aligne, C.A. et al. : Association of pediatric dental caries with passive smoking, JAMA, 289 : 1258～1264, 2003.
- 21) Arbes Jr, S.J. et al. : Environmental tobacco smoke and periodontal disease in the United States, Am. J. Public Health, 91 : 253～257, 2001.
- 22) Nishida, M. et al. : Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease, J. Periodontol., 71 : 1215～1223, 2000.
- 23) Nagata, H. et al. : Vitamin C and E supplements suppress periodontal disease in smokers, 未発表.

大阪大学大学院歯学研究科 分子病態口腔科学専攻 口腔分子免疫制御学講座 予防歯科学分野  
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-8

原 著

## 喫煙者の歯周病に対するビタミンC およびビタミンE摂取の有効性の検討

永田 英樹 小島 美樹 零石 聰 武村あかね\*  
日野出大輔\*\* 福井 誠\*\* 中村 亮\*\*

概要：喫煙習慣は、歯周病の危険因子の1つとして認識されてきている。本研究では、喫煙習慣を有する歯周病罹患患者において、ビタミンC (VC) とビタミンE (VE) の摂取が歯周病に及ぼす作用を検討することを目的とし、無作為化比較対照試験を実施した。65名 (平均年齢 49.5±10.5 歳、女性3名を含む) の被験者はVC群、VE群、その併用群およびプラセボ群の4群に分かれ、24週間タブレット状の試験製剤の摂取を行った。その結果、VC群、VE群およびその併用群は、プラセボ群と比較して、歯周病の臨床パラメータである臨床的アタッチメントレベル (CAL) と歯周ポケット深さ (PD) において、有意な進行の抑制作用を示した ( $p<0.05$ )。また、歯周組織破壊の生化学的マーカーである歯肉溝滲出液中のI型コラーゲンC末端テロペプチド (ICTP) についても測定を行った。ベースライン時と比較して24週時点でICTPの改善・維持が認められた部位の割合を群間で比較検討したところ、併用群はプラセボ群と比べ有意に高かった ( $p<0.05$ )。一方、血中のVCレベルはVC群と併用群 ( $p<0.01$ ) で、VEレベルはVE群と併用群で、それぞれ有意に上昇していた ( $p<0.05$ )。これらの結果は、VC、VEおよびその併用摂取が、喫煙者の歯周病のリスクを低減し、歯周組織の維持に効果を及ぼす可能性を示唆している。

索引用語：歯周病の危険因子、喫煙、ビタミンC、ビタミンE、無作為化比較対照試験

口腔衛生会誌 53 : 544-553, 2003

### 結 言

近年、喫煙は、歯周病の発症や進行、治療への反応性に対し影響を及ぼす危険因子の1つとして考えられている<sup>1)</sup>。Grossiら<sup>2,3)</sup>は、生涯の喫煙量が多いほど歯周病へのリスクが高く、喫煙習慣が歯周病に与えるリスクとして、2.0~7.0のオッズ比を報告している。多数の報告から、喫煙は歯周病に対する真の危険因子である可能性が高い<sup>4)</sup>。

喫煙が歯周病の危険因子として及ぼす作用機序については、さまざまな角度から検討がなされている。現在までに、炎症性サイトカイン産生などの炎症性細胞の宿主応答に対する作用、歯肉線維芽細胞などの細胞増殖機能への作用、歯周ポケット内の菌叢への影響や、歯肉微小循環系の異常などがその機序として推定されている<sup>5)</sup>。また、喫煙によって好中球など炎症性細胞から活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) の産生が惹起され

ることから<sup>6,7)</sup>、たばこ煙に直接含まれるROSとともに、これらが組織に対し傷害を及ぼすことが注目されている。

一方、Nishidaら<sup>8)</sup>は米国において実施された第3回全国健康・栄養調査 (The Third National Health and Nutrition Examination Survey : NHANES III) の横断研究から、ビタミンC (VC) の低摂取が歯周病の危険因子となりうることを示した。VCは、水溶性の抗酸化物質で、体内に生じたフリーラジカルを消去し<sup>9)</sup>、また、脂溶性抗酸化物のビタミンE (VE) と相乗的に働いて、脂質膜の酸化による細胞傷害を抑制する働きをもっている<sup>10)</sup>。歯周組織の破壊には、宿主応答によって産生された組織内のROSによる酸化ストレスが関与していると考えられることから<sup>11)</sup>、VCやVEおよびそのほかの組織内の抗酸化物は、歯周病の発症や進行に予防的な作用を及ぼす可能性がある。臨床研究においてはVC欠乏状態で発症した歯肉の出血が、その後のVCの補充によって

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座予防歯科学教室

\* サンスター株式会社オーラルケア事業本部

\*\* 徳島大学歯学部予防歯科学講座

受付：平成15年6月4日，受理：平成15年7月20日

表 1 試験群

群	摂取製剤	被験者数
VC群	VC 1,000 mg/日	17
VE群	VE 135 mg/日	16
VC/VE群	VC 1,000 mg+VE 135 mg/日	17
プラセボ群	VC, VE 含まず	15

有意に改善したという報告<sup>12,13)</sup>が、また VE については、動物実験において歯周組織の創傷治癒を促したという報告<sup>14)</sup>がある。さらに最近では、VC のほかに葉酸、ビタミン B<sub>12</sub>などを配合したサプリメントの 60 日間の摂取によって、歯周病患者の歯肉の炎症指標が有意に改善された例がある<sup>15)</sup>。

これらのことから、抗酸化物は酸化ストレス抑制という点において、現在喫煙者の歯周病の状態に何らかの予防的・治療的作用を及ぼす可能性が考えられる。本研究では以上の点をふまえ、タブレット状に製剤化した VC や VE、あるいは両方の摂取が、喫煙習慣をもつ歯周病罹患患者に対して、特に健常に近い歯周部位に対して、及ぼす影響について検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 対象

被験者は、大阪大学および徳島大学歯学部附属病院にメンテナンスのため来院中の歯周病患者および本試験のためリクルートされた歯周病有病者で、現在喫煙者を対象とした。被験者はその選定にあたり、重篤な全身的基礎疾患がなく、過去 3 カ月以内に外科的な歯周治療や抗生物質の投与などを行っていないことを確認した。研究目的および方法を説明し、文書にて同意が得られた女性 3 名を含む 65 名(大阪大学 37 名、徳島大学 28 名、年齢 27~75 歳、平均 49.5±10.5 歳)を表 1 に示すプラセボ群を含む 4 群に、無作為割り付けを行った。

試験を実施するにあたり、被験者の群割り付けおよび製剤の配布は、各歯学部附属病院の薬剤部に依頼し、二重盲験試験を実施した。なお、本研究を行うにあたり、大阪大学および徳島大学歯学部の治験審査委員会の審査を受け承認を得た。

### 2. 試験方法

被験者は、24 週間にわたりタブレット状の試験製剤を摂取した。試験製剤の処方表 2 に示した。製剤摂取開始時(以下ベースライン)、製剤摂取開始後 12、24 週目には、問診、歯周病学的臨床パラメータの測定のための口腔内診査、生化学的マーカーの測定のための歯肉溝滲

表 2 試験製剤の処方

成分	配合量*
ビタミン C	500
ビタミン E ( $\alpha$ -トコフェロール当量)	67.5
糖アルコール	959.5
その他(ブドウ種子エキス、酸味料、甘味料、香料、乳化剤など)	373
計	1,900

\*: VC/VE 群の試験製剤の配合量を示している。そのほかの群の試験製剤は、VC と VE のいずれか、または両方を除き、糖アルコールを主としたその他の成分で補填している

出液(Gingival crevicular fluid: GCF)の採取および採血を実施した。被験者は必要があれば、プラーク、辺縁部のステイン除去などの縁上処置および簡単な口腔衛生指導を受けた。また、試験期間中の被験者の食事などによる VC と VE の摂取量は、計 4 回(延べ日数 12 日間)の食事記録より管理栄養士が算出した。

### 3. 歯周病に関連する臨床パラメータの測定

1) 歯周ポケット深さ(Probing pocket depth: PD)  
ノースカロライナプローブを用い、第三大臼歯を除く全歯を 6 点法にて 0.1 mm 単位で測定した。測定は通法に従った。

2) 臨床的アタッチメントレベル(Clinical attachment level: CAL)

セメントエナメル境から歯肉辺縁までの距離を、ノースカロライナプローブを用い、第三大臼歯を除く全歯を 6 点法にて 0.1 mm 単位で測定し、得られた距離と PD により CAL の算出を行った。

3) 歯垢指数(Plaque index: PI)

Silness と Løe の基準<sup>16)</sup>に準じて、代表歯 6 歯(16, 21, 24, 36, 41, 44)に対し 4 点法にて測定した。

### 4. GCF 中の生化学的マーカーの測定

GCF は Periopaper<sup>®</sup> (PRO FLOW<sup>™</sup>, USA) を用いて、3 臼歯(第三大臼歯除く)ずつを、上顎右側および下顎左側の歯から選択し、計 6 歯の頬側近心部より、計 6 試料を採取した。臼歯部から採取できない場合は、前歯部を被検歯とした。Periopaper<sup>®</sup> はポケット底部まで挿入し、10 秒間放置した後取り出して、PERIOTRON<sup>®</sup> (Harco Electronics, USA) で GCF 量を測定した。Periopaper<sup>®</sup> はマイクロチューブに入れた後、-80°C で保存して、歯周病の生化学的マーカーである I 型コラーゲン C 末端テロペプチド (Cross-linked carboxyterminal

表 3 被験者の背景因子

背景因子	群	被験者数	平均	標準偏差
年齢	VC群	17	50.2	± 12.6
	VE群	16	46.4	± 9.2
	VC/VE群	17	51.9	± 9.4
	プラセボ群	15	49.3	± 10.4
	全体	65	49.5	± 10.5
喫煙本数 (本/日)	VC群	17	25.3	± 15.0
	VE群	16	25.2	± 15.3
	VC/VE群	17	27.4	± 8.3
	プラセボ群	15	25.2	± 13.4
	全体	65	25.8	± 13.0
喫煙歴 (年)	VC群	17	29	± 12.3
	VE群	16	24	± 9.0
	VC/VE群	17	31	± 7.6
	プラセボ群	15	28	± 10.3
	全体	65	28	± 10.1
Packyear	VC群	17	39.8	± 30.8
	VE群	16	32.7	± 31.8
	VC/VE群	17	43.2	± 16.4
	プラセボ群	15	34.7	± 20.6
	全体	65	37.8	± 25.5
現在歯数	VC群	17	26.0	± 4.9
	VE群	16	27.2	± 2.9
	VC/VE群	17	26.8	± 2.8
	プラセボ群	15	25.7	± 2.8
	全体	65	26.4	± 3.5
食事からの平均 VC 摂取量 (mg/日)	VC群	17	99.7	± 34.9
	VE群	16	91.4	± 38.3
	VC/VE群	17	86.7	± 35.5
	プラセボ群	15	85.9	± 29.7
	全体	65	91.1	± 34.5
食事からの平均 VE 摂取量 (mg/日)	VC群	17	9.2	± 2.0
	VE群	16	9.7	± 3.0
	VC/VE群	17	8.7	± 2.3
	プラセボ群	15	8.9	± 1.7
	全体	65	9.1	± 2.3

各群間の比較：有意差は認められなかった (ANOVA)

telopeptide of type I collagen : I CTP) の測定に供した。I CTP は, Giannobile ら<sup>17)</sup>の方法にて抽出処理後, SRL 株式会社 (東京) に測定を委託した。

#### 5. 血液中の生化学的マーカーの測定

被験者より採血で得られた血液試料中の VC および VE は, SRL 株式会社 に委託して測定した。

#### 6. 統計解析

本研究では, サプリメントによる緩徐な作用を, 限られた被験者数で解析する目的から, CAL, PD および I CTP については, 被験者単位だけでなく, 各部位単位または各測定単位のデータ解析を行った。被験者の背景因子, 臨床パラメータの CAL, PD, PI および血中生化学的マーカーの VC, VE はすべて一元配置分散分析