

Statistical analysis indicated that there were significant positive correlations between the total IgG responses to the *P. gingivalis* sonic extract, r-Rgp 44, and r-Rgp 15-27, and mean probing depth ($r = 0.665$; $P < 0.001$, $r = 0.573$; $P < 0.01$, $r = 0.497$; $P < 0.01$, respectively). Figure 4 shows the relationship between the IgG responses to the catalytic domains of the gingipains with the mean probing depths. Interestingly, it was found that there was no significant correlation between the IgG responses to r-Rgp CAT or r-Kgp CAT and mean probing depth.

DISCUSSION

In the protection against colonization by microorganisms, the immune system plays an important role. In the process of colonization, secretory IgA protects against attachment of this microorganism. After adherence, activation of phagocytic cells, such as polymorphonuclear cells and an increase of serum IgG titers, was elicited by the stimulation of the microorganism. *P. gingivalis* can colonize in the deep areas of periodontal pockets.²⁸ The IgG in gingival crevicular fluid is an important defense factor in the gingival crevice because saliva does not completely affect the microorganisms in the deep periodontal pocket and phagocytic cells protect after invasion of the microorganism through the epithelial barrier. It has been reported that the antibody titer against *P. gingivalis* is increased in patients with periodontitis.²⁹ Recent reports have also shown that immunization by the components of gingipain induces a protective immune response.^{25,30} Booth et al. reported that passive immunization with monoclonal antibodies against *P. gingivalis* prevented recolonization of this microorganism in humans and that this antibody was shown to react with the hemagglutinin domain of Rgp A.^{31,32} Genco et al. have also reported that high levels of IgG have been obtained following immunization with gingipain in rats and protection against infection by *P. gingivalis* was observed.³³ However, the role of specific antibodies in the process of periodontitis has not been clearly delineated. In this study, we determined the antibody levels against each domain of gingipain in sera obtained from periodontitis patients. Responses against r-Rgp 44 and r-Rgps 15-27 were higher in periodontitis patients than in healthy subjects. This result suggests that an increasing IgG level against hag domains of gingipain contributed to the increase in *P. gingivalis*-specific IgG levels. It is likely that the higher antibody levels in periodontitis patients are induced by the infection by *P. gingivalis*. The 75-, 55-, and 43-kDa proteins have been reported to be immunodominant antigens in sonicates of *P. gingivalis*.³⁴ The complexes of the catalytic- and hag-domains of Rgp A are 110-, 95-, 70- to 90-, and 50-kDa in size, and that in Kgp is 60-kDa.⁶ The molecular masses of several of the components of these complexes are similar to that of the immunodominant

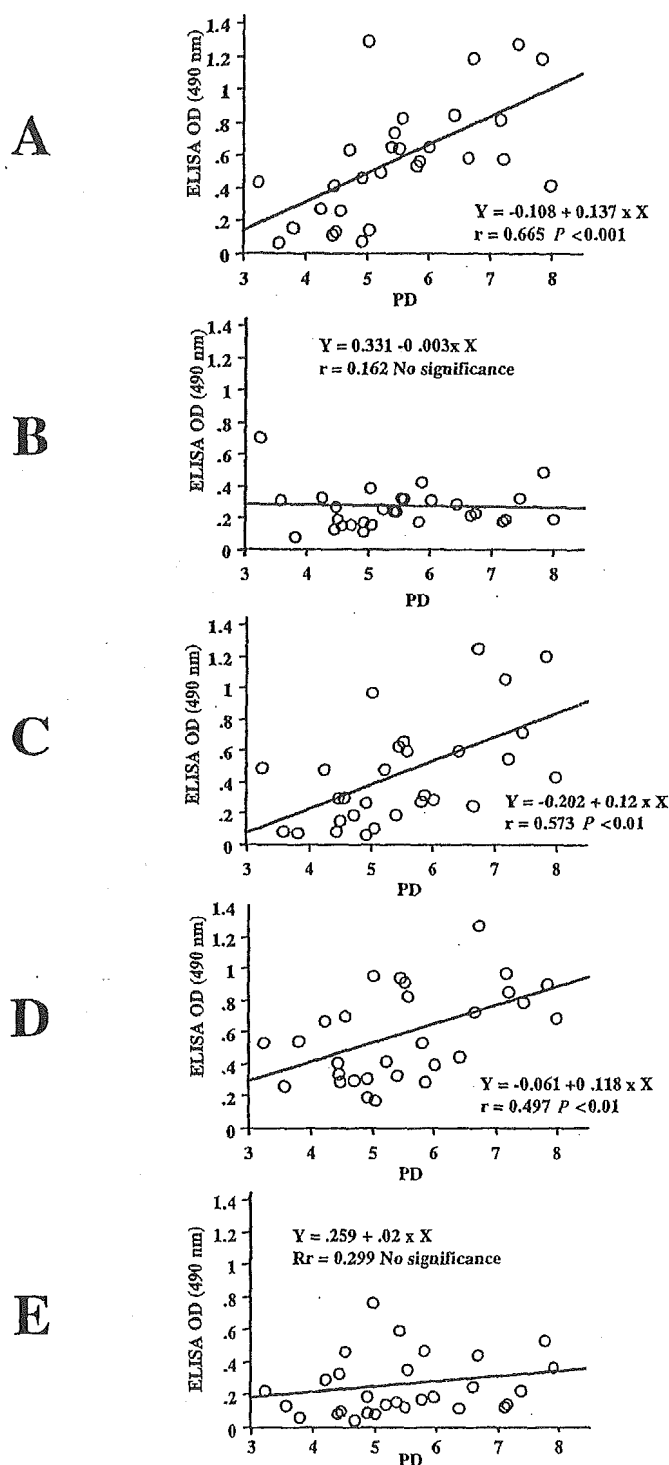


Figure 4. Relationship between serum IgG levels of the 29 periodontitis patients against functional domains of gingipains and mean probing depth. Antigen A: *P. gingivalis* sonic extract; B: r-Rgp CAT; C: r-Rgp 44; D: r-Rgps 15-27; E: r-Kgp CAT.

75- and 55-kDa proteins. These results suggest that the IgG responses to the hag-domain are potential indicators of infection by *P. gingivalis*.

Antibody responses against the catalytic subunits of Rgp A and Kgp did not increase in patients with periodontitis. The size of the common catalytic domain (45 kDa) is similar to that of the 43-kDa immunodominant protein. Murakami et al. reported that the catalytic domain of Rgp A is a major outer membrane protein.³⁵ The present study suggests that the catalytic domains of Rgp A and Kgp are not predominant antigens in periodontitis patients. In addition, the antibody levels against the catalytic domains of Rgp A and Kgp had no relationship to probing depth. As every patient had alveolar bone loss and bleeding on probing in this study, most of these patients must have had active periodontitis lesions. In our previous animal study, the antibody response against the catalytic subunit of Rgp A was low compared with that against the hag-domain in mice immunized with a DNA vaccine including the entire *rgp A* gene.²⁵ This finding suggested that the immunogenicity of the catalytic domain is low. It also indicated that the immunogenicity of the catalytic subunit is low compared with that of the hag-domains.^{36,37} It is possible that catalytic domain is not exposed on the surface of the gingipains complexes. It was observed that rabbit antisera to the catalytic domain did not recognize gingipain in membranes or cell preparations unless the samples were dissociated by boiling.³³ This report suggested that this epitope is not exposed in whole cells. However, further analysis is required to determine the location and three-dimensional structure of these proteases. These data emphasize the significance of our results and show that IgG against the catalytic domain of gingipain is difficult to induce in chronic periodontitis patients.

Genco et al. demonstrated that antibodies directed to the amino-terminal region of the catalytic domain of RgpA are capable of inducing a protective immune response against *P. gingivalis* infection in the mouse chamber model.²⁴ It was reported that antibodies generated to the catalytic domain are postulated to bind to sequences of progingipain transiently expressed on the cell surface. This would interfere with processing of progingipains, resulting in the inhibition of progingipain processing.³³ Kubonwa et al. also showed that a DNA vaccine encoding the catalytic subunit of Rgp A and Kgp induced protective effects against *P. gingivalis* infection in a mouse model.³⁰ O'Brien-Simpson et al. further reported that, in the murine lesion model, the active site peptides of the catalytic domains of RgpA and Kgp induce stronger protective effects against a challenge with *P. gingivalis* than do those from the hag-domain.³⁸ It appears that the catalytic activity of *P. gingivalis* plays a major role in the evasion of the host defense mechanisms. Many research groups demonstrated that the catalytic activity of gingipains extensively degrades immunoglobulins, and that the proteases have the ability to disrupt the functions

of polymorphonuclear leukocytes.³⁹ This activity also degrades C3-derived opsonin, thus rendering *P. gingivalis* resistant to phagocytosis.^{40,41}

In this report, many patients with periodontitis possessed high antibody levels against the hemagglutinin domain. However, Booth et al. reported the protective effect of antibody induced by the hemagglutinin domain against *P. gingivalis* colonization.^{31,32} There are two possibilities for this apparent discrepancy: A) increased antibody did not have protective effects; B) the effects of the anti-hemagglutinin domain antibody were influenced by the proteolytic activity of the gingipains. For the first possibility, further analysis is required to clarify the epitope of these antibodies.

In addition to these findings, it is possible that periodontitis patients cannot neutralize gingipains because of the difficulty in producing sufficient antibody against the catalytic domain. However, it was reported that anti-gingipain antibody affected the proteolytic activity of *P. gingivalis*.³⁰ It is possible that the antibody against the catalytic domain inhibited the proteolytic activity of the enzymes and reduced the pathogenicity of this microorganism. In addition, gingipains may protect the antibody against the hemagglutinin domain from degradation. By contrast, the interaction of the anticatalytic domain antibody with the proteases may partially inhibit enzyme activity and allow for the preferential degradation of these antibodies, resulting in low titers of this antibody in the sera of diseased patients. Therefore, the data suggest the possibility that the inability to produce sufficient antibodies against the catalytic subunit of gingipains may be an etiological factor for chronic periodontitis.

In summary, the fact that the antibody levels against the catalytic subunits of the Arg- and Lys-gingipains are not elevated in periodontitis patients suggests that the lack of IgG antibody production against these domains may be a significant factor that allows for persistent infection by *P. gingivalis* under certain conditions.

REFERENCES

1. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 1984;63:412-421.
2. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 1988;52:134-152.
3. Ono M, Okuda K, Takazoe I. Purification and characterization of a thiol-protease from *Bacteroides gingivalis* strain 381. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:77-81.
4. Fujimura S, Nakamura T. Multiple forms of proteases of *Bacteroides gingivalis* and their cellular location. *Oral Microbiol Immunol* 1989;4:227-229.
5. Smalley JW, Birss AJ. Extracellular vesicle-associated and soluble trypsin-like enzyme fractions of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:202-208.

6. Potempa J, Pike R, Travis J. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun* 1995;63:1176-1182.
7. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1244-1263.
8. Nakayama K, Kadowaki T, Okamoto K, Yamamoto K. Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence. *J Biol Chem* 1995;270:23619-23626.
9. Pavloff N, Pemberton PA, Potempa J, et al. Molecular cloning and characterization of *Porphyromonas gingivalis* lysine-specific gingipain. A new member of an emerging family of pathogenic bacterial cysteine proteinases. *J Biol Chem* 1997;272:1595-1600.
10. Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M, et al. Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res* 1999;34:464-472.
11. Okamoto K, Misumi Y, Kadowaki T, Yoneda M, Yamamoto K, Ikehara Y. Structural characterization of argingipain, a novel arginine-specific cysteine proteinase as a major periodontal pathogenic factor from *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Biochem Biophys* 1995;316:917-925.
12. Pavloff N, Potempa J, Pike RN, et al. Molecular cloning and structural characterization of the Arg-gingipain proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. Biosynthesis as a proteinase-adhesin polyprotein. *J Biol Chem* 1995;270:1007-1010.
13. Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer TH, Travis J. Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 1996;178:2876-2882.
14. Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:177-281.
15. Cutler CW, Kalmaz JR, Genco CA. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol* 1995;3:45-51.
16. Travis J, Potempa J, Maeda H. Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol* 1995;3:405-407.
17. Tokuda M, Duncan M, Cho MI, Kuramitsu HK. Role of *Porphyromonas gingivalis* protease activity in colonization of oral surfaces. *Infect Immun* 1996;64:4067-4073.
18. Fishburn CS, Slaney JM, Carman RJ, Curtis MA. Degradation of plasma proteins by the trypsin-like enzyme of *Porphyromonas gingivalis* and inhibition of protease activity by a serine protease inhibitor of human plasma. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:209-215.
19. Mouton C, Hammond PG, Slots J, Genco RJ. Serum antibodies to oral *Bacteroides asaccharolyticus* (*Bacteroides gingivalis*): Relationship to age and periodontal disease. *Infect Immun* 1981;31:182-192.
20. Naito Y, Okuda K, Takazoe I, Watanabe H, Ishikawa I. The relationship between serum IgG levels to subgingival Gram-negative bacteria and degree of periodontal destruction. *J Dent Res* 1985;64:1306-1310.
21. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995;66:23-29.
22. Naito Y, Okuda K, Takazoe I. Detection of specific antibody in adult human periodontitis sera to surface antigens of *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 1987;55:832-834.
23. Yoshimura F, Sugano T, Kawanami M, Kato H, Suzuki T. Detection of specific antibodies against fimbriae and membrane proteins from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis* in patients with periodontal diseases. *Microbiol Immunol* 1987;31:935-941.
24. Genco CA, Odusanya BM, Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J. A peptide domain on gingipain R which confers immunity against *Porphyromonas gingivalis* infection in mice. *Infect Immun* 1998;66:4108-4114.
25. Yonezawa H, Ishihara K, Okuda K. Arg-gingipain a DNA vaccine induces protective immunity against infection by *Porphyromonas gingivalis* in a murine model. *Infect Immun* 2001;69:2858-2864.
26. Watanabe K, Frommel TO. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. *J Dent Res* 1993;72:1040-1044.
27. Dickinson DP, Kubiniec MA, Yoshimura F, Genco RJ. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol* 1988;170:1658-1665.
28. Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodont Res* 1995;30:332-341.
29. Guo S, Takahashi K, Kokeguchi S, Takashiba S, Kinane DF, Murayama Y. Antibody responses against *Porphyromonas gingivalis* infection in patients with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:769-777.
30. Kuboniwa M, Amano A, Shizukuishi S, Nakagawa I, Hamada S. Specific antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Lys-gingipain by DNA vaccination inhibit bacterial binding to hemoglobin and protect mice from infection. *Infect Immun* 2001;69:2972-2979.
31. Booth V, Ashley FP, Lehner T. Passive immunization with monoclonal antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in patients with periodontitis. *Infect Immun* 1996;64:422-427.
32. Booth V, Lehner T. Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* antigen recognized by a monoclonal antibody which prevents colonization by the organism. *J Periodont Res* 1997;32:54-60.
33. Genco CA, Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J. Role of gingipains R in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. *Clin Infect Dis* 1999;28:456-465.
34. Chen HA, Weinberg A, Darveau RP, Engel D, Page RC. Immunodominant antigens of *Porphyromonas gingivalis* in patients with rapidly progressive periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:193-201.
35. Murakami Y, Imai M, Nakamura H, Yoshimura F. Separation of the outer membrane and identification of major outer membrane proteins from *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Oral Sci* 2002;110:157-162.
36. O'Brien-Simpson NM, Black CL, Bhogal PS, et al. Serum immunoglobulin G (IgG) and IgG subclass responses to the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complex of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *Infect Immun* 2000;68:2704-2712.

37. Gibson FC III, Genco CA. Prevention of *Porphyromonas gingivalis*-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1. *Infect Immun* 2001;69:7959-7963.
38. O'Brien-Simpson NM, Paolini RA, Reynolds EC. RgpA-Kgp peptide-based immunogens provide protection against *Porphyromonas gingivalis* challenge in a murine lesion model. *Infect Immun* 2000;68:4055-4063.
39. Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K, Yamamoto K. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine protease (gingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 1994;19:21371-21378.
40. Wingrove JA, Discipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 1992;267:18902-18907.
41. Discipio RG, Duffern PJ, Kawahara M, Pike R, Travis J, Hugli TE. Cleavage of human complement component C5 by cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Prior oxidation of C5 augments proteinase digestion of C5. *Immunology* 1996;87:660-667.

Correspondence: Dr. Satoru Inagaki, Department of Periodontics, Tokyo Dental College, 1-2-2 Masago, Mihama-ku, Chiba 261-8502, Japan. E-mail: inagaki@tdc.ac.jp.

Accepted for publication March 15, 2003.



Original article

Mixed infections with *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* cause excessive inflammatory responses in a mouse pneumonia model compared with mono-infections

Ryuta Kimizuka *, Tetsuo Kato, Kazuyuki Ishihara, Katsuji Okuda

Department of Microbiology, Tokyo Dental College, 1-2-2 Masago, Mihama-ku, Chiba City, Chiba 261-8502, Japan

Received 7 July 2003; accepted 16 September 2003

Abstract

Periodontopathic anaerobes such as *Porphyromonas gingivalis* are frequently found in aspiration pneumonia and lung abscesses. However, defense mechanisms and responses to these bacterial infections in the lung in vivo remain poorly understood. The coexistence of *P. gingivalis* with *Treponema denticola* has been found at higher levels and proportions in periodontally diseased sites. We hypothesized that mixed infections with *P. gingivalis* and *T. denticola* can cause severe respiratory disease. In the present study, inflammatory responses to mono- and mixed inoculations with *P. gingivalis* and *T. denticola* in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were investigated. Acute pneumonia and lung abscesses in mice with the mixed infection resulted in a 40% mortality rate within 72 h, compared with only 10% mortality for the respective mono-infections. Pulmonary clearance of *P. gingivalis* was delayed in the mice with mixed infections with *P. gingivalis* and *T. denticola*. Tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) levels from BAL fluid of mice with mixed infections at 24 h after inoculation were significantly higher than those after *P. gingivalis* mono-infection (TNF α : $P < 0.05$, IL-1 β : $P < 0.001$, IL-6: $P < 0.05$). The chemokine KC level from BAL fluid of mice at 48 h ($P < 0.05$) and 72 h after mixed infection was also significantly increased when compared with that after *P. gingivalis* mono-infection ($P < 0.001$). The present study demonstrates that a mixed infection of *P. gingivalis* with *T. denticola* in mouse causes a marked bronchopneumonia and lung abscess in the mouse model.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*; *Treponema denticola*; Mixed infection; Pneumonia model; Mouse

1. Introduction

Respiratory infections are responsible for significant morbidity and mortality in the elderly [1]. It is possible that the typical biofilm of dental plaque can serve as a reservoir for respiratory infection [2]. Oral bacteria released from the oral biofilm are aspirated into the lower respiratory tract. Periodontopathic anaerobes such as *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, and *Fusobacterium nucleatum* from the oral cavity are common isolates in aspiration pneumonia and lung abscesses [3–5]. Periodontal disease is associated with significantly increased numbers of *P. gingivalis* and *Treponema denticola* [6]. *P. gingivalis* is a Gram-negative, anaerobic bacterium that has been strongly implicated in the etiology of adult periodontitis and that produces many virulence factors, including tissue attachment

factors, endotoxin, protease, and factors involved in evasion from host defense mechanisms [7–9]. *T. denticola* is a helically shaped, motile spirochete found in the periodontal pocket that also possesses several potential virulence properties, including the expression of attachment factors, immune suppressing factor, and proteases such as proinflammatory phenylalanine-specific protease (dentilisin) [10,11].

Nelson et al. [12] demonstrated that *Bacteroides gingivalis* causes a marked inflammation in the lung that progresses to severe bronchopneumonia and lung abscesses. Additional studies are necessary to document pulmonary inflammatory responses to an intratracheal periodontopathic anaerobic bacterial challenge. *P. gingivalis* and *T. denticola* have been detected in higher levels and portions in periodontally diseased sites [13]. We previously demonstrated the coexistence of *P. gingivalis* and *T. denticola* in periodontal pockets [14]. The coaggregation of these organisms contributes to the pathogenesis of periodontal disease [15]. It is possible that a mutual symbiosis between *P. gingivalis* and *T. denticola* is also responsible for some lung disease.

* Corresponding author. Tel.: +81-43-270-3742; fax: +81-43-270-3744.
E-mail address: kimizuka@tdc.ac.jp (R. Kimizuka).

This study examined the inflammatory responses to mono- and mixed infections of *P. gingivalis* and *T. denticola* in bronchoalveolar lavage (BAL) fluids.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and cultures

An invasive strain of *P. gingivalis* 16-1, which is encapsulated and can cause severe abscess formation in experimental animals, was used in this study [7]. *P. gingivalis* 16-1 was grown in trypticase soy broth (Difco Laboratories, Detroit, MI.) supplemented with hemin (5 µg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and menadione (0.5 µg/ml; Sigma Chemical Co.). *T. denticola* ATCC 33520 was cultured in TYGVS medium as described previously [16]. All bacteria used in this study were incubated anaerobically at 37 °C for 2–3 days.

2.2. Animals

Specific-pathogen-free, 50-week-old, BALB/c mice were used in these experiments. Elderly mice were chosen because the risk of pneumonia increases with aging. Female, 6-week-old, BALB/c mice were purchased from Sankyo Laboratory Service, Tokyo, Japan. All mice were housed until 50 weeks old and were given sterile food and water ad libitum in conventional conditions within the animal care facility at the Tokyo Dental College. Control and infected mice were housed in separate cages. Throughout the study 'A Guideline for the Treatment of Experimental Animals in Tokyo Dental College' was followed.

2.3. Bacterial inoculation

Mice were anesthetized with Ketalar R50 (Warner-Lambert, Tokyo), and an incision was then made above the sternum. The trachea was exposed by blunt dissection, and a 26-gauge needle was then inserted into the trachea above the carina [17]. Harvested cells from each culture were suspended in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 20% skim milk at an optical density (OD) of 1.5 at a wavelength of 660. The mice were separated into four groups; *P. gingivalis* inoculation (group 1), *T. denticola* inoculation (group 2), *P. gingivalis* with *T. denticola* inoculation (group 3), and controls (group 4); and 40 µl of each suspension was inoculated. Half of volume of the *P. gingivalis* and *T. denticola* suspensions were used for the mixed inoculation, and a sterile solution of PBS containing 20% skim milk was used for the control group. BAL fluid was obtained by washing five times with 1.6 ml PBS at 24, 48, and 72 h after the intratracheal inoculation.

2.4. Viable cell count

For viable cell counts of *P. gingivalis* in the BAL fluid from mice inoculated with *P. gingivalis* or *P. gingivalis* with

T. denticola, blood agar plates of trypticase soy agar (Difco Laboratories) supplemented with 10% defibrinated horse blood, hemin and menadione were used. The BAL fluids were collected at 24 h (group 1: $n = 6$, group 3: $n = 6$), 48 h (group 1: $n = 7$, group 3: $n = 7$), and 72 h (group 1: $n = 7$, group 3: $n = 7$) post-inoculation and were serially diluted 10-fold with reduced transport fluid prepared according to Syed and Loesche [18] with the addition of 0.8-mm glass beads. Each 100-µl sample was plated on a blood agar plate and spread evenly with a conrage stick. Plates were cultured for 7 days in an anaerobic chamber at 37 °C, after which colonies were counted as colony-forming units (CFU).

2.5. Quantification of cytokine

The inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor α (TNF α) and chemokine KC production at 24 h (group 1: $n = 4$; group 2: $n = 4$; group 3: $n = 6$; control: $n = 4$), 48 h (group 1: $n = 4$; group 2: $n = 4$; group 3: $n = 7$; control: $n = 4$), and 72 h (group 1: $n = 4$; group 2: $n = 4$; group 3: $n = 7$; control: $n = 4$) after inoculation of *P. gingivalis*, *T. denticola*, *P. gingivalis* with *T. denticola*, and control group were determined in BAL fluid by ELISA systems specific for these cytokine molecules, according to the manufacturer's recommended procedures (Quantikine™ Mouse Immunoassay kit, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN).

2.6. Abscess formation and mortality studies

The mice were bled under deep anesthesia, and their lungs were surgically removed at 24 h (group 1: $n = 3$; group 2: $n = 3$; group 3: $n = 6$; control: $n = 3$), 48 h (group 1: $n = 3$; group 2: $n = 3$; group 3: $n = 6$; control: $n = 3$), or 72 h (group 1: $n = 4$; group 2: $n = 4$; group 3: $n = 6$; control: $n = 3$) post-inoculation. The determination of the presence of formation of lung abscesses was made with the naked eye.

Mortality was assessed twenty-four hours after inoculation (group 1: $n = 6$; group 2: $n = 6$; group 3: $n = 5$; control: $n = 3$), 48 h (group 1: $n = 7$; group 2: $n = 7$; group 3: $n = 5$; control: $n = 3$), and 72 h (group 1: $n = 7$; group 2: $n = 7$; group 3: $n = 5$; control: $n = 3$).

2.7. Lung histology

The mice were bled under deep anesthesia, and the lungs were removed surgically at 24, 48, or 72 h after inoculation of *P. gingivalis* ($n = 5$) or a mixture of *P. gingivalis* with *T. denticola* ($n = 6$) and fixed in 10% formalin for 24 h. They were then embedded in paraffin, and sections were cut and stained with hematoxylin-eosin. The stained sections were examined by light microscopy.

2.8. Statistical analysis

The data were expressed as means and standard errors. Statistical comparison of cytokine production and viable cell numbers was performed using the Mann-Whitney test. The

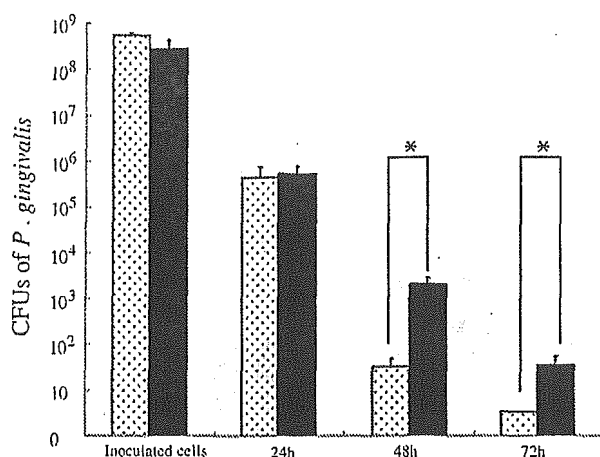


Fig. 1. The CFU of *P. gingivalis* from BAL fluid infected mice after inoculation of *P. gingivalis* monoinfection (▨) and mixed infection with *T. denticola* (■). The BAL fluids were collected at 24, 48, and 72 h post-inoculation (Mann–Whitney test: $P < 0.05$ * vs. *P. gingivalis*).

ratios of abscess formation and mortality were compared by chi-square test.

3. Results

3.1. Bacterial numbers in the BAL fluid

When the mice were inoculated with a mixture of *T. denticola* and *P. gingivalis* at a dose of 2.8×10^8 , the *P. gingivalis* in the BAL fluid steadily declined; at 24, 48, and 72 h, 5.2×10^5 , 2.1×10^3 , and 3.5×10^1 CFU were recovered, respectively (Fig. 1). The viable cell numbers of *P. gingivalis* at 48 and 72 h after inoculation of a mixed suspension with *T. denticola* were significantly higher than after monoinfection ($P < 0.05$) (Fig. 1). After 1 week, no viable *P. gingivalis* cells were recovered from the lungs of mice with either mono- or mixed infection (data not shown).

3.2. Cytokine production in the BAL fluid

We investigated the release of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α and KC from BAL fluid infected animals (Fig. 2). Mice with mixed infections of *P. gingivalis* and *T. denticola* exhibited significant increases in the TNF α level at 24 h after inoculation, and then the levels decreased until 48 h. The TNF α level with mixed infection at 24 h after inoculation was significantly higher than with monoinfection of *P. gingivalis* ($P < 0.001$) or *T. denticola* ($P < 0.05$). Compared with *P. gingivalis* or *T. denticola* monoinfection, the IL-1 β level in BAL fluid from mice with mixed infection was increased at 24 h post-challenge ($P < 0.05$). The IL-1 β level with mixed infection decreased with time, but the IL-6 level increased with time. However, the IL-6 level with *T. denticola* monoinfection was higher than that with mixed infection at 24 and 48 h post-challenge. The KC level in mice with mixed infection was significantly higher than that with

P. gingivalis monoinfection at 48 h ($P < 0.05$) and 72 h ($P < 0.001$). KC production peaked at 24 h in all infected mice.

3.3. Pneumonia induced by *P. gingivalis* and *T. denticola*

Lung abscesses and mortality induced by *P. gingivalis* and *T. denticola* are shown in Table 1. Six out of 20 mice (40%) with mixed infections by *P. gingivalis* and *T. denticola* died of pneumonia within 72 h ($P < 0.05$, compared with infection by *P. gingivalis*). One out of 10 mice died with *P. gingivalis* or *T. denticola* monoinfection. Six out of 20 mice with mixed infection with *P. gingivalis* and *T. denticola* formed lung abscesses within 72 h, but only one out of 10 mice with *P. gingivalis* monoinfection formed lung abscesses. Histopathologic studies are shown in Fig. 3. The lung tissue from a mouse after 72 h inoculated with both *P. gingivalis* and *T. denticola* showed a severe acute bronchopneumonia with dense aggregates of neutrophils and peribronchial and alveolar hemorrhage at 72 h (Fig. 3C,D). The lung tissue from a mouse 72 h post-inoculation with *P. gingivalis* monoinfection showed mild pneumonia with less hemorrhage and alveolar destruction (Fig. 3B). No significant pathological findings were seen in control mice (Fig. 3A).

4. Discussion

It has been reported that some respiratory infection pathogens are oral bacteria [2–4,19,20]. Bacterial infections of the lower respiratory tract are usually related to host factors such as depressed defense mechanisms, dysphagia, thrombophlebitis, pulmonary infarction, and bronchiectasis [1–3,21–23]. In this study, we tried to induce experimental pneumonia in mice by mono- and mixed infections with *P. gingivalis* and *T. denticola*. Mixed infections with these periodontopathic bacteria caused a more severe bronchopneumonia and high mortality and delayed pulmonary clearance of *P. gingivalis*. Several studies have demonstrated the mechanisms by which periodontopathogens affect host defense. The S-layer of *Campylobacter rectus* and the capsular material of *Prevotella melaninogenica* inhibit phagocytosis by leukocytes [24,25]. *T. denticola* also produces factors that suppress both fibroblast and lymphocyte proliferation [26,27]. The growth-stimulating factors produced by *P. gingivalis* and *T. denticola* have been identified as isobutyric acid and succinic acid, respectively [28]. Mixed infection with *P. gingivalis* and *T. denticola* appears to favor growth enhancement in the lung.

Cytokines play a key role in resistance to pulmonary infection [29,30]. However, excessive production of cytokines can lead to shock, lung damage, and tissue dysfunction. It was of interest to determine the levels of cytokines such as IL-1 β , IL-6, TNF α , and KC produced in response to a mixed infection by *P. gingivalis* and *T. denticola*. The amount of TNF α progressively increased within 24 h after the inoculation of mixtures of *P. gingivalis* and *T. denticola* and then diminished by 48 h, although the organisms serving as the

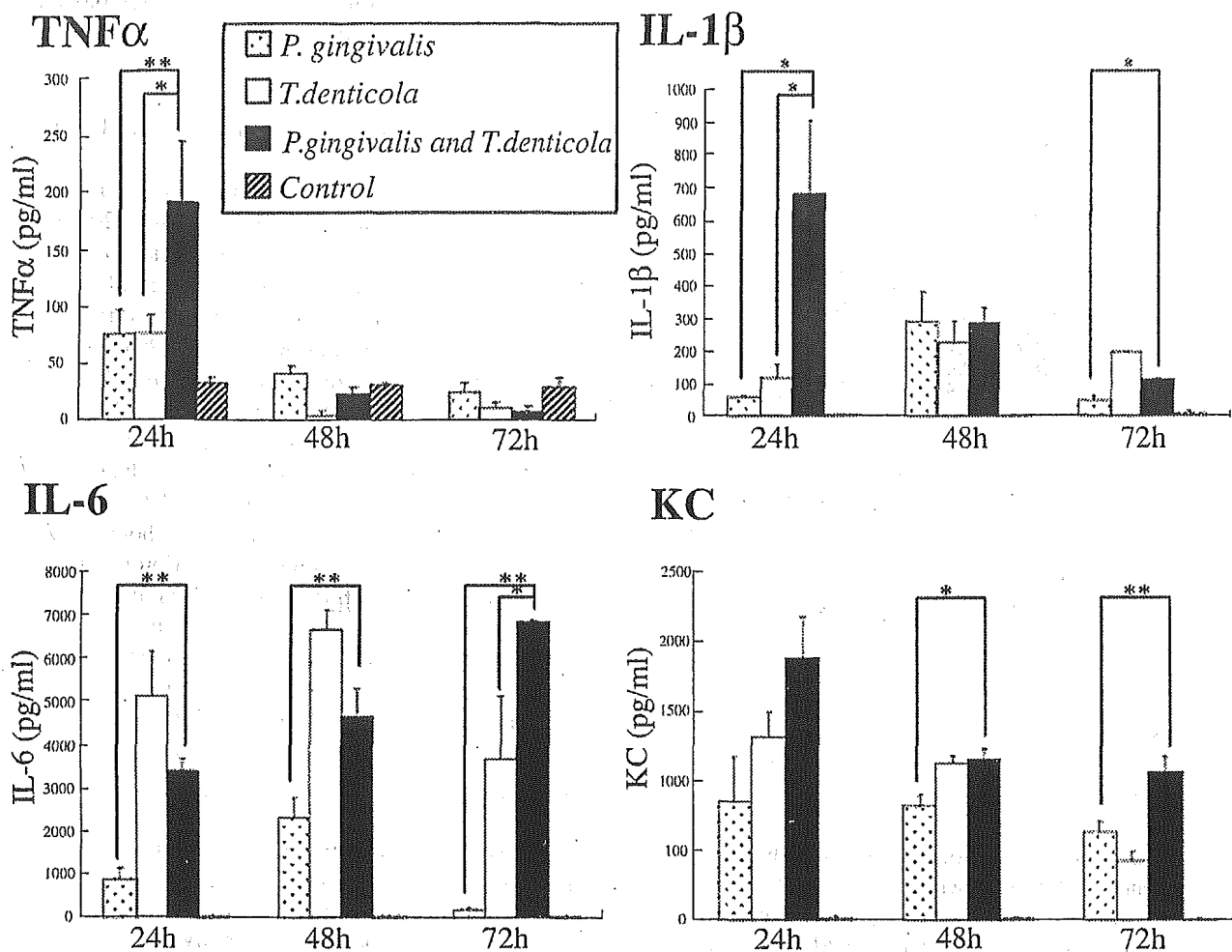


Fig. 2. Kinetics of cytokines in the BAL fluid challenged by mono-infection with *P. gingivalis* or *T. denticola* or by mixed infection with *P. gingivalis* and *T. denticola*. The BAL fluids were collected at 24, 48, and 72 h post-inoculation. The results are means with standard errors (Mann-Whitney test: $P < 0.05$ *, $P < 0.001$ **).

Table 1

Abscess formation and mortality after inoculation with *P. gingivalis*, *T. denticola*, or a mixture of the two

Inoculum	Lung abscess (%), number of abscesses formed/total number of mice	Mortality (%), number of dead/total mice
<i>P. gingivalis</i> (group 1)	10 (1/10)	10 * (2/20)
<i>T. denticola</i> (group 2)	0 (0/10)	10 (2/20)
<i>P. gingivalis</i> and <i>T. denticola</i> (group 3)	33.3 (6/18)	40 * (6/15)
Control (group 4)	0 (0/3)	0 (0/3)

Chi-square test: * $P < 0.05$.

Formation of lung abscesses and mortality were evaluated for 72 h post-inoculation.

proximal stimuli remained in the lungs during the entire time course studied. These data suggest that TNF α is an early signal for neutrophil migration into the lungs in this pneumonia model. The IL-1 β level in the BAL fluid in mice with mixed infection at 24 h post-inoculation significantly increased compared with the levels after *P. gingivalis* or *T. denticola* mono-infection. Bacterial products of *P. gingivalis* and *T. denticola* strongly induce the production of IL-1 β . This cytokine has been found at high levels in the gingival tissues and gingival crevicular fluids of patients with periodontal disease [31], and it has been correlated with tissue

destruction [32]. The IL-1 β increase in the BAL fluid may be attributed to tissue destruction in the lung. The BAL fluid KC level was significantly higher in mice infected with both *P. gingivalis* and *T. denticola* than mono-infected with *P. gingivalis*. KC is a chemoattractant specific for neutrophils [33]. It is well known that the KC gene is expressed in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages in response to various cytokines and bacterial components [34–36]. The present data indicate that the excessive production of inflammatory cytokines induced by mixed infection of *P. gingivalis* with *T. denticola* initiates a severe bronchopneumonia.

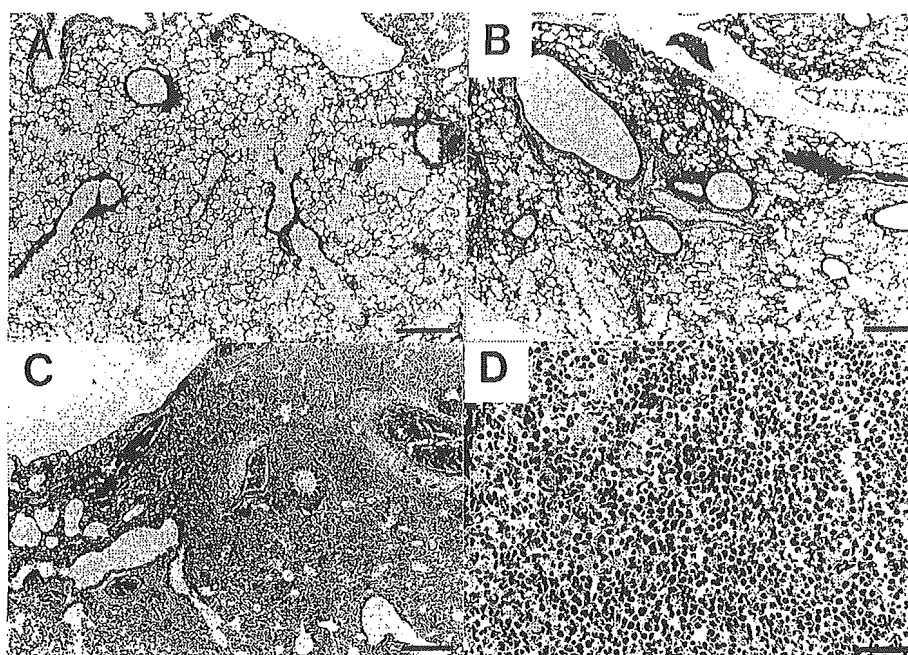


Fig. 3. Comparative pulmonary histology of lung sections at 72 h from mice inoculated with *P. gingivalis* alone or with a mixture of *P. gingivalis* and *T. denticola*. Histologic section from an uninfected mouse (A), histologic section from mice infected with *P. gingivalis* (B), histologic section from mice infected with a mixture of *P. gingivalis* and *T. denticola* (C and D). Hematoxylin and eosin were applied. Bar = 580 μ m (A–C), bar = 160 μ m (D).

Acknowledgements

We thank K. Oishi for valuable comments and technical advice. We also thank Yurika Kawahara and Katsumi Tadokoro for excellent technical assistance. This study was supported by grant 11470381 from the Japan Society for the Promotion of Science and from the Grant-in-Aid for Research supported by Tokyo Dental College.

References

- [1] F.A. Scannapieco, Role of oral bacteria in respiratory infection, *J. Periodontol.* 70 (1999) 793–802.
- [2] M. Terpenning, W. Bretz, D. Lopatin, S. Langmore, B. Dominguez, W. Loesche, Bacterial colonization of saliva and plaque in the elderly, *Clin. Infect. Dis.* 16 (1993) S314–S316.
- [3] J.G. Bartlett, S.L. Gorbach, S.M. Finegold, The bacteriology of aspiration pneumonia, *Am. J. Med.* 56 (1974) 202–207.
- [4] S.M. Finegold, C.A. Strong, M. McTeague, M. Marina, The importance of black pigmented gram negative anaerobes in human infections, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 6 (1993) 77–82.
- [5] E.J. Goldstein, B.D. Kirby, S.M. Finegold, Isolation of *Eikenella corrodens* in humans, *Am. Rev. Respir. Dis.* 119 (1979) 55–58.
- [6] G.R. Riviere, K.S. Smith, N. Carranza Jr., E. Tzagaroulaki, S.L. Kay, M. Dock, X. Zhu, T.A. DeRouen, Associations between *Porphyromonas gingivalis* and oral treponemes in subgingival plaque, *Oral Microbiol. Immunol.* 11 (1996) 150–155.
- [7] K. Okuda, T. Kato, Immunity to infection by periodontopathic bacteria in experimental animals, in: S. Hamada, S. Holt, R.J. McGhee (Eds.), *Periodontal Disease: Pathogens and Host Parasite Responses*, Quintessence, Tokyo, 1991, pp. 237–250.
- [8] S.C. Holt, L. Kesavalu, S. Walker, C.A. Genco, Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*, *Periodontol.* 20 (2000) 168–238.
- [9] R.J. Lamont, H.F. Jenkinson, Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 124–163.
- [10] K. Ishihara, K. Okuda, Molecular pathogenesis of the cell surface proteins and lipids from *Treponema denticola*, *FEMS Microbiol. Lett.* 181 (1999) 199–204.
- [11] M.N. Sela, Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12 (2001) 399–413.
- [12] S.B. Nelson, E. Laughon, W.R. Summer, M.A. Eckhaus, J.G. Bartlett, G.J. Jakab, Characterization of the pulmonary inflammatory response to an anaerobic bacterial challenge, *Am. Rev. Respir. Dis.* 133 (1986) 212–217.
- [13] L.A. Ximénez-Fyvie, A.D. Haffajee, S.S. Socransky, Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis, *J. Clin. Periodontol.* 27 (2000) 648–657.
- [14] T. Kigure, A. Saito, K. Seida, S. Yamada, K. Ishihara, K. Okuda, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods, *J. Periodontol. Res.* 30 (1995) 332–341.
- [15] M. Onagawa, K. Ishihara, K. Okuda, Coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*, *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 35 (1994) 171–181.
- [16] K. Ishihara, T. Miura, H.K. Kuramitsu, K. Okuda, Characterization of the *Treponema denticola* prtP gene encoding a prolyl-phenylalanine-specific protease (dentilisin), *Infect. Immun.* 64 (1996) 5178–5186.
- [17] F. Sonoda, K. Oishi, A. Iwagaki, K. Matsumoto, Endogenous tumor necrosis factor (TNF α) mediates neutrophil accumulation at the mid-phase of a murine model of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiol. Immunol.* 41 (1997) 601–608.
- [18] S.A. Syed, W.J. Loesche, Survival of human dental plaque flora in various transport media, *Appl. Microbiol.* 24 (1972) 638–644.
- [19] S. Abe, K. Ishihara, K. Okuda, Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of elderly patients and effects of professional oral care, *Arch. Gerontol. Geriatr.* 32 (2001) 45–55.
- [20] T. Yoneyama, K. Hashimoto, H. Fukuda, M. Ishida, H. Arai, K. Sekizawa, M. Yamaya, H. Sasaki, Oral hygiene reduces respiratory infections in elderly bed-bound nursing home patients, *Arch. Gerontol. Geriatr.* 22 (1996) 11–19.

- [21] M. Marina, C.A. Strong, R. Civen, E. Molitoris, S.M. Finegold, Bacteriology of anaerobic pleuropulmonary infections: Preliminary report, *Clin. Infect. Dis.* 16 (1993) S256–S262.
- [22] T.J. Marrie, K.L. Slayter, Nursing home-acquired pneumonia treatment options, *Drugs Aging* 8 (1996) 338–348.
- [23] F.A. Scannapieco, Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia, *J. Periodontol.* 67 (1996) 1114–1122.
- [24] K. Okuda, T. Kigure, S. Yamada, T. Kaneko, K. Ishihara, T. Miura, T. Kato, I. Takazoe, Role for the S-layer of *Campylobacter rectus* ATCC33238 in complement mediated killing and phagocytic killing by leukocytes from guinea pig and human peripheral blood, *Oral Dis.* 3 (1997) 113–120.
- [25] K. Okuda, I. Takazoe, Antiphagocytic effects of the capsular structure of a pathogenic strain of *Bacteroides melaninogenicus*, *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 14 (1973) 99–104.
- [26] H. Boehringer, N.S. Taichman, B.J. Shenker, Suppression of fibroblast proliferation by oral spirochetes, *Infect. Immun.* 45 (1984) 155–159.
- [27] B.J. Shenker, M.A. Listgarten, N.S. Taichman, Suppression of human lymphocyte responses by oral spirochetes: a monocyte-dependent phenomenon, *J. Immunol.* 132 (1984) 2039–2045.
- [28] D. Grenier, Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*, *Infect. Immun.* 60 (1992) 5298–5301.
- [29] P.T. Reid, J.M. Sallenave, Cytokines in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 25–38.
- [30] I. Sabroe, C.M. Lloyd, M.K. Whyte, S.K. Dower, T.J. Williams, J.E. Pease, Chemokines, innate and adaptive immunity, and respiratory disease, *Eur. Respir. J.* 19 (2002) 350–355.
- [31] J. Honig, C. Rordorf-Adam, C. Siegmund, W. Wiedermann, F. Erard, Increased interleukin-1 β concentration in gingival tissue from periodontitis patients, *J. Periodontol. Res.* 24 (1989) 362–367.
- [32] P. Stashenko, P. Fujiyoshi, M.N. Obermesser, L. Probst, A.D. Haffajee, S.S. Socransky, Levels of interleukin-1 beta in tissue from sites of active periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.* 18 (1991) 548–554.
- [33] S. Hanazawa, Y. Murakami, A. Takeshita, H. Kitami, K. Ohta, S. Amano, S. Kitano, *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce expression of the neutrophil chemotactic factor KC gene of mouse peritoneal macrophages: role of protein kinase C, *Infect. Immun.* 60 (1992) 1544–1549.
- [34] D.J. Hall, C. Brownlee, C.D. Stiles, Interleukin-1 is a potent regulator of JE and KC gene expression in quiescent BALB/c fibroblasts, *J. Cell. Biol. Physiol.* 141 (1989) 154–159.
- [35] M. Introna, R.C. Bast Jr., C.S. Tannenbaum, T.A. Hamilton, D.O. Adams, The effect of LPS on expression of the early competence genes JE and KC in murine peritoneal macrophages, *J. Immunol.* 138 (1987) 3891–3896.
- [36] T. Koerner, T.A. Hamilton, M. Introna, C.S. Tannenbaum, R.C. Bast Jr., D.O. Adams, The early competence genes JE and KC are differentially regulated in murine peritoneal macrophages in response to lipopolysaccharide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149 (1987) 969–974.

高齢社会であって禁煙は歯科の重要テーマ

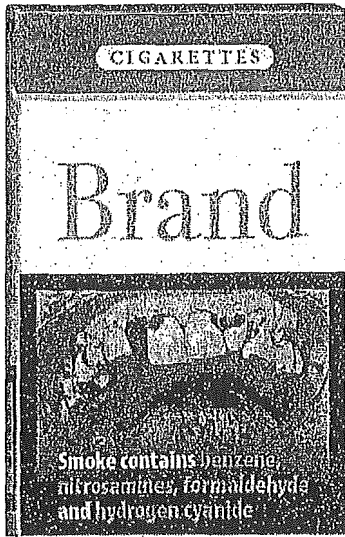
福岡歯科大学 口腔保健学教授 埴岡隆

喫煙は8020運動の大きな壁

1. 家族で守る口の健康
 全身の健康は口の健康から
 歯科の最近の話題に、口腔
 と全身の健康がある。高齢社
 会が到来して、口の健康の大
 切さが高齢者に接する医療者
 に再認識されるようになった。
 口腔の不潔は、抵抗力が
 低下している高齢者の健康に
 は脅威である。

て、咀嚼や嚥下といった日常
 生活に不可欠な機能の維持も
 高齢者のQOLには欠かせな
 い。適切な口腔ケアにより口
 鼻が消え、施設の臭いがなく
 なり、口腔の重要性が実感さ
 れるようになった。

高齢者の例とは別に、最近
 になって歯周病が、糖尿病、
 心疾患、呼吸器疾患、妊娠出
 産異常、骨粗鬆症といった全
 身の疾患と関係があること
 がわかってきた。歯周ボケッ
 たることは、本人はもとより、
 親、親戚の共通の関心
 事であり、歯が生える
 たびに歯を大切にしま
 うと健康感を再認識さ
 せられる。



●EU諸国でタバコ箱に採用される口腔画像警告表示
 (この画像は無煙タバコの使用頻度が高い東南アジア諸国でも採用)

歯の着色はもともとわかり
 やすい。前歯の詰め物があれ
 ば、その周りが黒くなる。歯
 茎も喫煙で着色することがわ
 かってきた。歯とは違って、
 煙草の煙が沈着するのではな
 い。歯肉の色素細胞が喫煙の
 刺激でメラニン色素という茶
 褐色の色素を生成して、歯茎
 が黒く見える。禁煙すると

家族が気遣う生活の場面であ
 る。
 そして、喫煙が歯周病の原
 因であることが最近わかっ
 た。歯周病は歯が抜けること
 につながるのだ。「8020
 運動」にも大きな壁となる。
 喫煙は全身の健康に脅威であ
 るが、口腔の健康も脅かすの
 で禁煙は歯科の重要なテーマ
 になってきた。

ところが、口腔への影響は
 医師・保健師・養護教諭など
 の歯科以外の保健専門家から
 も注目されはじめている。と
 いふのは、口腔は目に見える
 からである。
 喫煙は身体に様々な影響を
 及ぼす。が、残念ながら、喫
 煙者や医療者本人にはその影
 響を見たり見せたりする機会
 は少ない。そして、若い喫煙者
 が自覚できるものも少ない。
 口は見ることもできず、
 同時に、自覚できるといっ
 特徴がある。

歯や歯茎の着色、舌の苔・口臭

2. 口の健康はタバコの煙に
 敏感
 口は異物の体内侵入に敏感
 である。おおよそのタバコ
 の健康はタバコの煙に敏感
 である、といっても過言でな
 いだろう。

また、舌に苔がつくことが
 ある。この苔は口臭の原因に
 なるが、喫煙者には特有の口
 臭がある。生命に直結する口
 腔癌は喫煙が原因である。ア
 ルコール摂取と同時に喫煙を
 すると、発癌物質が溶解して
 粘膜に吸収されやすくなり、
 口腔癌の危険性が高まる。
 そこで、米国では、毎日鏡
 で粘膜をセルフチェックする
 ことが勧められている。口腔
 癌は、舌、頬の粘膜、歯肉な
 どの粘膜が周囲と違って白色
 が増すと要注意である。

親の喫煙による影響

受動喫煙も口の健康に影響
 する。米国の大規模な研究で
 は受動喫煙と歯周病に關連が
 あり、子どもの齲蝕との間に
 も關連があることが発表され
 た。厚生労働省科学研究班は、
 子どもへの歯茎の色素沈着は、
 親の喫煙により増加してい
 ることを明らかにした。この
 ようにタバコの煙は口の健康
 に大きな悪影響をもたらす。
 喫煙は口腔の健康を脅かす
 だけでなく、歯科治療の効果
 を少なくする。歯周病の治療の
 効果を少なくしたり、インプ
 ラントの成功率が低下したり
 なる。

口腔の健康を通して全身の健康づくり

3. 健康な身体(からだ)は
 口腔ケアと禁煙
 喫煙は口腔の健康を蝕み、
 口腔の健康は全身の健康と關
 係があり、口腔と關連する全
 身の健康は喫煙と關連があ
 る。喫煙は、口腔の健康を通
 じてQOL・全身の健康を脅
 かす。そして、口腔の健康は、
 本人が見ることができ、専門
 家が見ることができ、口
 腔の健康を通じて、健康を自
 覚してもらうことができる。

する。また、歯を抜いた後の傷
 の治りが悪く、ドライソケット
 の状態になり痛みが続く。
 喫煙すると歯が抜け易くな
 ることから、せつかく補綴や
 充填治療をしても、その歯自
 体が長持ちしない。義歯は残
 った歯に負担をかけているの
 で、義歯を支える歯が長持ち
 しなくなると、作りなおさな
 いといけない。歯が全部
 なくなると総義歯になった人
 でも、喫煙は關係する。タバ
 コのヤニが義歯に沈着し口臭
 の原因になる。

このように、歯の治療にと
 つても、喫煙は大きな負担に
 なる。
 日本では、健康増進法によ
 り、喫煙場所が制限され、そ
 して、タバコ規制条約の発効
 に伴って、喫煙の規制が格段
 に進む。その過程で煙の出な
 いチューイングタバコが発売
 された。ガムの形状をしてい
 るため、子どもによる使用は
 要注意であるが、インターネ
 ットで販売されている。
 無煙タバコ使用は、煙が出
 ないので学校現場では発見さ
 れない。米国では大リーガー
 の選手が広告塔になって子ど
 もにあってという間に広がって
 しまった。今、日本の關係者
 の取組みの動向が世界から注
 目されている。

さらに、誰もが人生の早い
 時期から口腔の保健行動を日
 常的に行っている。口腔ケア

女性ホルモンと歯周病との関係について
日本歯科歯槽膿漏学会 嶋井 久二氏



女性ホルモンと歯周病との関係について
日本歯科歯槽膿漏学会 嶋井 久二氏

ホルモンが歯周病の因子 電動歯ブラシに高い効果

歯周病は、歯を支える歯槽骨が溶けていく病気です。歯槽骨が溶けると、歯がぐらぐら揺れ、最終的には歯が抜け落ちてしまいます。歯周病の原因は、歯垢（プラーク）の蓄積による炎症です。ホルモンは、歯周病の発症に関与する因子の一つです。特に、女性ホルモン（エストロゲン）の減少は、歯周病のリスクを高めます。電動歯ブラシは、歯垢を効果的に除去し、歯周病の予防に高い効果があります。



喫煙と歯周病との関係について 日本歯科歯槽膿漏学会 清水 史郎氏

喫煙は、歯周病のリスクを高める要因の一つです。タバコに含まれるニコチンやタールは、歯肉に炎症を引き起こし、歯槽骨の吸収を促進します。また、喫煙は唾液の分泌を減少させ、口腔内の細菌叢を変化させ、歯周病の原因菌を増殖させます。喫煙者は、歯周病の発症率が高く、治療後の回復も遅い傾向があります。喫煙を禁煙することは、歯周病の予防と治療に非常に効果的です。

喫煙者に歯周病の高リスク 治療・予防には禁煙が鍵

喫煙者は、歯周病の高リスクにさらされています。喫煙による歯肉の炎症や歯槽骨の吸収は、歯周病の進行を加速させます。治療を行う際には、まず喫煙を禁煙することが不可欠です。禁煙することで、歯肉の炎症が軽減され、歯槽骨の吸収も遅くなります。また、禁煙は口腔内の細菌叢を正常化し、歯周病の原因菌の増殖を抑えます。喫煙者は、歯科受診の際には禁煙の指導を受け、積極的に禁煙に取り組むことが、歯周病の予防と治療の鍵となります。

2005年 歯の健康シンポジウム オトコの口、オンナの口

～性差で考える口腔ケア～ 紙上探検

主催：日本歯科歯槽膿漏学会、朝日新聞社 協賛：厚生労働省、日本医師会、東京歯科歯槽膿漏学会、財団法人DQ20歯周病協会、日本口腔衛生学会、日本歯科歯槽膿漏学会

オトコの口、オンナの口、性差で考える口腔ケア
朝日新聞社 編集局 朝日新聞社 編集局



早乙女 智子氏
札幌医科大学 歯学部 歯周病学講座 准教授

ホルモンの変化により、口腔内も変化しやすくなる

ホルモンの変化は、口腔内の環境にも大きな影響を与えます。特に、女性ホルモンの減少は、歯肉の炎症を引き起こし、歯槽骨の吸収を促進します。また、ホルモンの変化は、唾液の分泌を減少させ、口腔内の細菌叢を変化させ、歯周病の原因菌を増殖させます。ホルモンの変化は、歯周病の発症率を高め、治療後の回復も遅い傾向があります。ホルモンの変化を考慮した口腔ケアが、歯周病の予防と治療に非常に効果的です。



早見 健二氏
札幌医科大学 歯学部 歯周病学講座 准教授

歯の健康の大切さを考えたい時です

歯の健康は、私たちの生活の質を大きく左右します。歯が健康であれば、食事を美味しく楽しむことができ、笑顔で生活することができます。しかし、歯が健康でなくなると、生活の質は大きく低下します。歯の健康を維持するためには、毎日の歯磨きと定期的な歯科受診が不可欠です。歯の健康を考えた時、歯の健康の大切さを考えたい時です。歯の健康を維持するためには、毎日の歯磨きと定期的な歯科受診が不可欠です。



札幌医科大学 歯学部 歯周病学講座 准教授

口を健康に保つには、大切な歯をしっかりと守らねばなりません。歯の健康を維持するためには、毎日の歯磨きと定期的な歯科受診が不可欠です。歯の健康を考えた時、歯の健康の大切さを考えたい時です。歯の健康を維持するためには、毎日の歯磨きと定期的な歯科受診が不可欠です。



早乙女 智子氏
札幌医科大学 歯学部 歯周病学講座 准教授

朝日新聞 意見広告 松下電工ほか
2005年6月4日

報 告

ガムたばこの蔓延阻止に向けて
—禁煙から脱たばこへ—

平成17年7月21日

日本学術会議

口腔機能学研究連絡委員会
齲蝕学・歯周病学研究連絡委員会
咬合学研究連絡委員会

この報告は、平成16年度日本歯学系学会連絡協議会における審議を受けて、

第 19 期日本学術会議口腔機能学研究連絡委員会、齶蝕学・歯周病学研究連絡委員会、咬合学研究連絡委員会がとりまとめ、公表するものである。

第 19 期日本学術会議

口腔機能学研究連絡委員会

- 委員長 瀬戸 皖一（鶴見大学歯学部教授）
幹事 伊藤 学而（第 7 部会員、鹿児島大学名誉教授）
 覚道 健治（大阪歯科大学教授）
委員 飯田順一郎（北海道大学大学院歯学研究科教授）
 白川 正順（日本歯科大学歯学部教授）
 中田 稔（九州大学名誉教授）
 山内 六男（朝日大学歯学部教授）
 山根 源之（東京歯科大学教授）
 脇田 稔（北海道大学大学院歯学研究科教授）

齶蝕学・歯周病学研究連絡委員会

- 委員長 堀内 博（第 7 部会員、東北大学名誉教授）
幹事 須田 英明（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授）
 薬師寺 仁（東京歯科大学副学長）
委員 石川 烈（東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科教授）
 田中 昭男（大阪歯科大学教授）
 寺下 正道（九州歯科大学教授）
 中垣 晴男（愛知学院大学歯学部教授）
 永田 俊彦（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授）
 平井 義人（東京歯科大学教授）

咬合学研究連絡委員会

- 委員長 小林 義典（第 7 部会員、日本歯科大学歯学部教授）
幹事 赤川 安正（広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授）
 相馬 邦道（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授）
委員 市川 哲雄（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス部教授）
 西山 實（日本大学歯学部教授）
 野首 孝祠（大阪大学大学院歯学研究科教授）
 山田 好秋（新潟大学大学院医歯学総合研究科教授）
 渡辺 誠（東北大学大学院歯学研究科教授）

要 旨

1 背 景

我が国で「たばこ」と聞けば煙の出るものを思い浮かべるが、大リーグ中継などで目にする「噛みたばこ」やお菓子のような「ガムたばこ」も存在する。

「ガムたばこ」は我が国で既に販売されているが、その害について十分な周知がされておらず、子供や青少年の健康が損なわれる危険性が迫っている。

欧米では、口に含む「ガムたばこ」のほか、鼻に詰める「嗅ぎたばこ」も愛好されていて、がんなどの様々な病変が局所の粘膜に生じ、命を失う危険性も報告されている。また、南アジアでは、ビンロウと共に「たばこ葉」を噛む習慣があり、そのような地域では口腔がんの死亡率が全てのがん死亡率の第1位となっている。

我が国では煙が出るたばこの害については禁煙運動などによって広く知られているが、新たな「ガムたばこ」の害についてはほとんど知られていないので、全国的に販売される前に警鐘を鳴らす必要がある。

2 我が国における「ガムたばこ」の現状

我が国ではたばこを噛む習癖は一般的でなく、煙の出ない無煙たばこ (smokeless tobacco) も発売されていなかった。しかし、スウェーデン製のガムたばこが「たばこ製品」として 2003 年に輸入販売され、新たな嗜好品として若者の間に広まろうとしている。この「ガムたばこ」一粒には、通常のとばこ 1 本分に相当するニコチン 1 mg とたばこの葉そのものが含まれている。「たばこ製品」であるので未成年者が喫することは禁止されているが、一箱 (10 個入り) 280 円で手軽に買える値段であり、チューイングガムそっくりで甘く、たばこを初めて吸うよりは抵抗が少なく、通常のガムと見分けがつきにくいいため子供や若者などが手を出しやすい商品である。

なお、医薬品として薬局などで販売されている禁煙補助剤ニコチンガムにもニコチンが含まれているが、一箱 2,000 円以上もするのでたばこの代用品にはなりにくい。ただし一粒にニコチンが 2 mg も含まれているので、使用を誤れば「ガムたばこ」以上に危険である。

これらの製品は、たばこ代用品あるいは禁煙補助剤として販売されているがいずれもニコチン等の成分を含むため、新たな嗜癖を呼んで健康障害につながる危険性がある。

3 諸外国における「ガムたばこ」の使用と健康被害

アメリカ公衆衛生局の報告によれば、無煙たばこには 28 種類の発ガン物質が含まれていて歯肉退縮や口腔粘膜の白板症の原因となり、口腔がんのリスクを増加させていると指摘されている。また、アメリカがん学会の 2003 年の報告によれば、毎年 31,000 人以上の人が口腔がんにも冒され、約 8,500 人が命を落としているが、口腔がんの 90%はたばこ使用によるもので、その 46%は「噛みたばこ」によるということである。

また、南アジアには噛みたばこの習慣があるが、口腔がんの頻度は他部位のがんに比べて際立って高いという事実が証明されている。

我が国には無煙たばこ (smokeless tobacco) の習慣はなかったが、喫煙に代わって「ガムたばこ」が蔓延することになれば、歯周病の増悪や口腔がん誘発の危険性が高まり、国民の健康が大きく損なわれることが懸念される。

4 「ガムたばこ」の子供や青少年への影響

我が国で「ガムたばこ」が販売された場合、最も恐れるのは子供や青少年に甚大な健康被害をもたらす危険性についてである。「ガムたばこ」は煙が出ないので、子供や青少年が使用していても見ただけでは判断ができず、注意をすることも困難である。しかも子供が使用した場合にはより大きな健康障害が起こり、死に至ることも考えられる。

少子化が問題となっている我が国にとって、子供や青少年への「ガムたばこ」の蔓延を防ぐことは極めて大きな意味を持つ。たばこ規制枠組み条約 (FCTC) が発効して禁煙の意識が高まっているときでもあり、煙の出ない「ガムたばこ」も含めてすべての「たばこ」から国民の健康被害を防ぐことが望ましい。

5 禁煙から脱たばこへ [提言]

- 1) 「ガムたばこ」使用による健康危害研究推進及び研究結果を国民に公表する。
- 2) 「ガムたばこ」の発売には医学的・歯学的評価を義務付け、その結果を明示する。
- 3) 「たばこ製品」の販売を規制する。
- 4) 禁煙から卒煙までの教育体制を充実する。
- 5) 家庭・学校・職場におけるガムたばこを含めた脱たばこ運動を展開する。

目次

1. はじめに	5
2. 現状の課題	5
3. 具体的方策（提言）	8
4. 期待される効果	9
参考資料	1
0	
参考文献	1
3	
用語の解説	1
4	

1. はじめに

1984年のたばこ事業法は、日本におけるたばこ事業の発展を促進し、たばこ販売は政府に大きな税収をもたらしてきた。しかし、健全な産業の発展と安定した財政収入の確保という「たばこ事業法」の概念は、20年余を経過した今日、たばこは健康被害を引き起こすという科学的根拠のもとに、日本は「たばこ規制枠組み条約」に批准し、「たばこ事業法」に変わる抜本的政策転換が求められている。

2004年から始まった「第3次対がん10か年総合戦略」では「がん罹患率と死亡率の激減を目指して」をキャッチフレーズとしており、これまでの研究成果を予防と治療に結び付けていくことを目指している。このがん対策、たばこ対策が、たばこ事業法とどう整合するか、またそのなかで、ガムたばこの出現はどう説明されるかが、問題提起の動機である。

我が国では煙の出るたばこ (smoked tobacco) の害についてはあらゆる角度から指摘されているが、煙の出ないたばこ (smokeless tobacco) についてはその習慣がなかったために科学的データが殆どない。しかしこれらが、喫煙に代わって若者を中心に蔓延すれば、歯周病の増悪や口腔がん誘発の危険性があり、しかも口腔粘膜の透過性が高いことから喫煙と同程度の循環器障害が懸念される。

欧米の報告によるとニコチンの毒性は噛みたばこでも変わらない。喫煙や噛みたばこによる口腔疾患として、口腔がん、歯周病、口腔粘膜病変があり、たばこ常用者では非用者の数倍のリスクがある。また、喫煙や噛みたばこの習慣がある者では、歯周病、歯肉退縮、齲蝕の治癒が遅延する。これまでの研究によれば、喫煙量が多いと口腔がんと歯周病のリスクは増大するが、喫煙を中止すれば低下し、噛みたばこも止めれば口腔粘膜病変は治癒すると報告されている。

FCTCに基づく禁煙運動はガムたばこ等 (smokeless tobacco) も含めて進めるべきであり、禁煙から脱たばこに向けて国家プロジェクトを推進することが求められる。

2. 現状の課題

我が国ではたばこを噛む習癖が全くなかったところ 2003年突然スウェーデン製のガムたばこが「たばこ製品」として輸入販売されるようになり、若者の間に広まろうとしている。これはガム一粒にニコチン1mgを含むもので、嗜

好品として扱われているため人体の安全性のチェックがされていない。一方、これより先に薬局などで販売されている禁煙補助剤のニコチンガムは一粒にニコチン 2 mg を含んだ医薬品である。

上記 2 種類のガムの一方は「たばこ製品」であり他方は「禁煙促進薬品」として位置づけられているが、双方ともニコチンを含むガムであり、新たな嗜癖を呼び健康障害につながる危険性がある。特に未成年者が用いる場合には両者を区別することができず、煙が出ないため補導は殆ど不可能である。

たばこ製品には、有害物質であるニコチンが含まれている。スウェーデン製のガムたばこに含有されているニコチンは、毒物及び劇物取締法別表第 1 の 19 に記載されている毒物で、致死性と依存性がある。本製品 1 粒はたばこ 1 本分に相当すると記載されているが、たばこ 1 本に含まれるニコチンは小児の致死量に相当し、2 本分で大人の致死量に相当する。この記載が事実であれば、誤飲した場合は致死の結果を招くおそれもある。「たばこ製品」であるので未成年者が喫することは禁止されているが、一箱（10 個入り）280 円で手軽に買える値段であり、チューイングガムそっくりで甘く、たばこを初めて吸うよりは抵抗が少なく、通常のガムと見分けがつきにくいいため子供や若者などが手を出しやすい商品である。

一旦包装から出せば、1 粒 1 粒の形状は他の市販されているガムと全く区別がつかないため、大人にとっても危険であるだけでなく、包装の文字が理解できない小児や幼児が通常のガムと誤認して本製品を食べ、重大な結果を招く危険性も大きい。

一方、医薬品であるニコチンガムは、1994 年より禁煙補助剤として我が国の医薬品市場に出されているが、当初は医師の処方のみで販売され、いくつかの制約があったが、2001 年より一般医薬品（OTC）として販売制限が大幅に緩和された。これにより 5 万人であった使用者が急速に 80 万人に増え、市場が拡大された。ニコチンガムによって禁煙がどれだけ促進されているか、逆にたばこ成分が口腔粘膜を刺激して口腔がんの原因となっていないか、副作用はないか、新たな嗜癖を誘発している例はないか、などの点をいま検証する必要がある。ニコチンガムは医薬品であるので正規の治験を経ているが、その内容は通常の 3 か月のデータであり、その時の副作用は 41%と出ているため、遅延性の害について 10 年の臨床再調査が急務である。また、医師の指導のもとに 6 か月の使用を限度としていたにもかかわらず、発売 10 年後に薬局等での販売が許可された根拠も学術的に確かめる必要がある。

厚生労働省によれば、未成年者の薬物乱用の始まりには喫煙開始が契機とな