

## 高齢者住民における保有歯数と認知機能

今井 剛<sup>1)</sup>, 西永正典<sup>3)</sup>, 中村知子<sup>4)</sup>  
奥宮清人<sup>5)</sup>, 松林公蔵<sup>6)</sup>, 土居義典<sup>3)</sup>  
松下健二<sup>2)</sup>

### Association with Lipid and Sugar Metabolism Parameters, Number of Teeth and Cognitive Function in Elderly Population

TAKESHI IMAI<sup>1)</sup>, MASANORI NISHINAGA<sup>3)</sup>, TOMOKO NAKAMURA<sup>4)</sup>  
KIYOTO OKUMIYA<sup>5)</sup>, KOZO MATSUBAYASHI<sup>6)</sup>, YOSHINORI TSUCHIYA<sup>3)</sup>  
and KENJI MATSUSHITA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Aging Intervention, <sup>2)</sup>Department of Oral Disease Research,  
National Institute for Longevity Science, National Center for Geriatrics  
and Gerontology, Aichi, Japan

<sup>3)</sup>Department of Medicine and Geriatrics, Kochi Medical School, Kochi, Japan

<sup>4)</sup>Hyogo Rehabilitation Center, Hyogo, Japan

<sup>5)</sup>Research Institute for Humanity and Nature, Kyoto, Japan

<sup>6)</sup>Center for Southeast Asian Studies Kyoto University, Kyoto, Japan

Dementia is one of the most popular neurological disorders in the elderly. Some longitudinal studies have found significant associations between some lifestyle-related diseases such as diabetes mellitus, hyperlipidemia, and dementia. It has also been reported that the number of teeth possessed is associated with cognitive function in elderly populations with dementia. However, little is known about these associations in an ordinary elderly population. We evaluated this relationship in a Japanese population of elderly people aged from 65 to 92 years (n = 339; 119 males and 220 females) residing in Kahoku-chou (now Kami City) in Kochi Prefecture, Japan. Blood and dental examinations were performed for all subjects using the Mini-Mental State Examination (MMSE) for assessing cognitive function. Associations were not found between total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL), triglyceride (TG), hemoglobin (Hb)-A1c, blood sugar (BS) in blood, and MMSE score in total subjects or in males or females. However, associations were found between the number of residual teeth and MMSE scores in males and females. These results suggest that cognitive function may be associated with the number of teeth in ordinary elderly people. In addition, the number of residual teeth might be useful for predicting cognitive function in the elderly.

Key words: cognitive function, dementia, diabetes, hyperlipidemia, teeth, elderly

<sup>1)</sup> 国立長寿医療センター研究所老化制御研究部

<sup>2)</sup> 同口腔疾患研究部

<sup>3)</sup> 高知大学医学部老年病科

<sup>4)</sup> 兵庫県立リハビリテーションセンター

<sup>5)</sup> 総合地球環境学研究所

<sup>6)</sup> 京都大学東南アジア研究所

(平成22年2月19日受付)

(平成22年4月13日受理)

## I. 緒 言

超高齢社会に突入した日本において、健康寿命の延伸は喫緊の課題である。特に、高齢者における認知機能の低下やうつ状態は、高齢者の生活の質 (Quality of Life; QOL) を著しく低下することが指摘されており、認知機能の改善、認知機能低下の予防対策は急務である。

現代日本人はそのライフスタイルの変化によって高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満などの生活習慣病危険因子の有病者が増加していることは周知の事実である。これらの疾患は加齢とともに発症率が高まるが、高齢者においてはそれらを重複して罹患しているケースが多い。一方、高齢者にみられる認知症も加齢に伴って増加する疾患であるが、近年の研究から認知症が生活習慣病およびその危険因子と相互に密接な関連があることが明らかにされつつある<sup>1-5)</sup>。脳の機能障害は脳組織における微小循環障害と深く関連している。脳内の細動脈は、高血圧、血清脂質、血糖の影響を受けやすい。従って、高血圧、高脂血症、糖尿病は認知機能障害と深く関わっている。これらの事実は、高齢者における生活習慣病およびその危険因子が単に脳血管障害のリスクであるというだけでなく、認知症のリスクとしてもきわめて重要であることを示唆している。

自分の歯で過ごすことは高齢者の栄養状態の維持に重要であるばかりでなく、全身状態にも良い影響を及ぼしていることが明らかにされつつある。我が国においては、1989年に厚生省（現厚生労働省）から“80歳で自分の歯を20本保持しよう”という8020運動が提唱され、それを機に自分の歯を残す意義について検証が始まった。そして、関連する疫学研究の結果から歯・咀嚼機能とQOL、咀嚼機能と日常生活動作（Activities of Daily Living; ADL）、咀嚼機能と運動能力、咀嚼機能と認知能力等との関連性が明らかになった<sup>6)</sup>。歯の喪失がAlzheimer病（AD）発症の危険因子の一つであるとの報告があり、ADでは保有歯数が少ないことが指摘されて

いる<sup>7,8)</sup>。また、咬合力と認知能力との正の相関も指摘されてきた<sup>9)</sup>。簡易認知機能検査法であるMini-Mental State Experiment (MMSE)<sup>10)</sup>を用いた保有歯数とMMSEとの間に有意な正の相関が認められることも報告されている<sup>11)</sup>。以上の結果は、保有歯数と認知能に関連性があることを示唆している。

本研究では、高知県香北町において1991年から2001年にかけて行われた高齢者の長期縦断疫学調査の調査結果<sup>12-28)</sup>の中から1994年のデータを抽出し、高脂血症や糖尿病といった生活習慣病のパラメータとなる血清中の脂質・糖代謝関連因子および歯の保有歯数と認知機能との関連性について検討した。

## II. 対象ならびに方法

本研究は、1991年から2001年にかけて高知県香北町において行われた縦断的検診事業「香北町健康長寿研究」(KAHOKU LONGITUDINAL AGING STUDY; “KALS”)の調査結果の内1994年度に行われたデータを分析した横断研究である<sup>12-28)</sup>。また、本調査は高知医科大学（現高知大学医学部）の倫理委員会において承認の得られた研究計画書に則って行われたものである。加えて、被験者の同意のもとにすべての検査が行われた。

### 1. 対象者

対象者は、同町在住の65歳以上の老年者1,488名のうち、血液検査、保有歯数検査、認知機能検査を受けた者で、低酸素性脳症、脳卒中後遺症等については除外した339名（男：女=119：220）である（図1）。平均年齢と標準誤差は男性78.9±0.45才で、女性は77.4±0.34

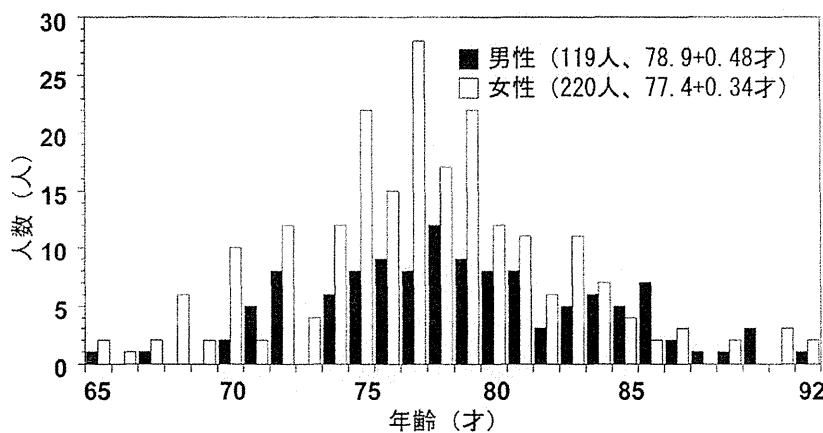


図1. 被験者の年齢分布

65歳から92歳までの男性（119人、平均年齢78.9±0.48才）、女性（220人、平均年齢77.4±0.34才）について、横軸に年齢を、縦軸にその人数を示した。

才である。

## 2. 検査項目

本結果で示されている保有歯数とは、齲蝕の有無あるいは処置の有無にかかわらず、口腔内に保有する歯の総数を表している。認知機能については、MMSEテスト、改訂長谷川式簡易知能評価スケール (HDS-R)、簡易板 Kohs テストを用いて評価した。また、検査した血液成分のうち、ヘモグロビン Alc (Hb-A1c)、血糖 (BS)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST)、総コレステロール (TC)、高比重リポ蛋白コレステロール (HDL)、中性脂肪 (TG) のデータを抽出し、認知機能との関連性を調べた。

## 3. 統計学的解析

ノンパラメトリックの相関・回帰解析として、相関分析はスピアマンの順位相関にて解析を行った。相関係数  $r$  及び  $p$  値を各グラフ中に記した。また、これらの解析は StatView5.0 を用いた。

## Ⅲ. 結 果

### 1. 各認知機能検査の相互関係

図2に、年齢と MMSE スコアの関係を示した。年齢、MMSE スコアの相関関係をノンパラメトリックのスピアマン相関分析法を用いて解析した結果、男女ともに統計学的に有意な両者の相関関係は認められなかった。

### 2. 各認知機能検査の相互関係

認知機能検査法には多くの種類がありそれぞれに特徴

があるが、本調査においては我が国においてもっとも使用頻度の高い検査である HDS-R および MMSE が導入されている。また、動作性認知機能の評価を細くするために簡易板 Kohs テストが同時に実施されている。我々は、それらの検査の相互関係について検討した。すなわち、被験男女を MMSE スコアと HDS-R スコア、あるいは Kohs スコアを比較した。その結果、それぞれのスコア間に有意な相関関係が認められ、MMSE スコアが高くなると HDS-R スコアも有意に高くなった (図3A, B)。また、MMSE スコアが高い値になると、Kohs スコアも有意に高い値を示した (図3C, D)。以上の結果から、MMSE スコアを指標にして、認知機能と血液データあるいは保有歯数との関連性を検討することとした。

### 3. 脂質・糖代謝関連パラメータと認知機能の関係

次に我々は、血液成分中の脂質代謝および糖代謝に関連するデータを抽出し、それらのデータと認知機能との関連性を検討した。すなわち、脂質代謝に関しては、総コレステロール (TC)、高比重リポ蛋白コレステロール (HDL)、中性脂肪 (TG) を、糖代謝についてはヘモグロビン Alc (Hb-A1c)、血糖 (BS) の各数値と MMSE スコアとの関連性についてそれぞれ検討した。その結果、TC、HDL、TG の脂質関連パラメータの数値と MMSE 値の間には有意な相関は認められなかった (図4A-F)。また、糖代謝の指標である Hb-A1c や BS についても MMSE スコアとの間で有意な相関関係はみられなかった (図4G-J)。

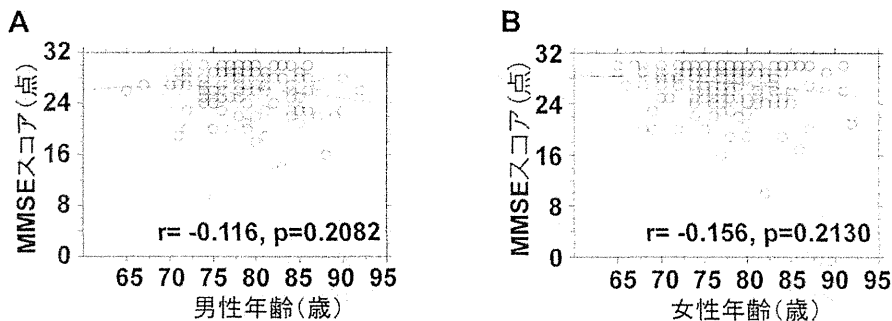


図2. 性別高齢者年齢と MMSE の関係  
男性 (A)、女性 (B) 別に各年齢 (横軸) に対して MMSE スコアを縦軸に表した回帰グラフを示した。年齢、MMSE スコアの相関関係はノンパラメトリックのスピアマン相関分析法にて解析した。相関係数  $r$ 、 $p$  値を各々グラフ内に表記した。男女とも相関関係はみられなかった ( $p > 0.05$ ,  $r < 0.4$ )。

## 4. 保有歯数と認知機能の関係

最後に、認知機能と保有歯数との関連性について MMSE スコアを指標にして解析した (図 5)。その結果、MMSE スコアと保有歯数との間に統計学的に有意な相関関係があることが明らかになった。すなわち、MMSE スコアと保有歯数の関係をノンパラメトリックのスペアマン相関分析法で解析した結果、MMSE スコアが高い者は保有歯数が多い傾向が認められ、男女ともに統計学的に有意な相関関係が存在した。

## IV. 考 察

香北町健康長寿研究のデータから血液中の脂質・糖代謝の指標を抽出し、それらと認知機能との関連性を調べた。その結果、脂質代謝の指標となる TC、HDL、および TG あるいは糖代謝の指標となる Hb-A1c および BS と認知機能との間には有意な相関関係は認められないことが明らかになった。一方、保有歯数と認知機能の間には有意な相関がみられたことから、高齢者において保有歯数は、認知機能の指標になる可能性が示唆された。

脳機能と脳の血液循環とは密接な関係があり、脳の大血管や中小血管に循環障害が発生した場合に起こる脳梗

塞では当然のことながら脳機能の高次障害が引き起こされるが、臨床的に顕著な症状の認められない微小循環の障害によっても脳機能障害が引き起こされることが知られている。脳内の微小血管は、二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) や一酸化窒素 (NO) による化学的調節を受ける一方で、血糖値、血清脂質、フリーラジカル、赤血球変形能、血液粘度、血小板凝集などの影響を受けやすい。拡張期血圧の高い高齢者は認知機能が低下していること、また高血圧は認知障害の発症に先行するので、認知障害予防には高血圧治療が有効であることが提唱されている<sup>29)</sup>。中年期における TC 値が 250mg/dl 以上であった場合、高年期以降に発症するアルツハイマー病発症リスクが 2 倍に増加するといったこと<sup>30)</sup> や、アルツハイマー病患者で高コレステロール血症を合併しているケースや ApoE4 タイプの Apo リポタンパク質を有する者において、認知機能の著しい増悪がみられることも報告されている<sup>31)</sup>。アルツハイマー病患者の脳内のアミロイド β 蛋白 (Aβ) 産生部位は、脳細胞膜上の脂質ラフトと呼ばれるコレステロールが豊富な部位であり、そこで生成される Aβ オリゴマーやその凝集に高コレステロールが重要な影響を及ぼしていることが明らかにされつつある<sup>32)</sup>。

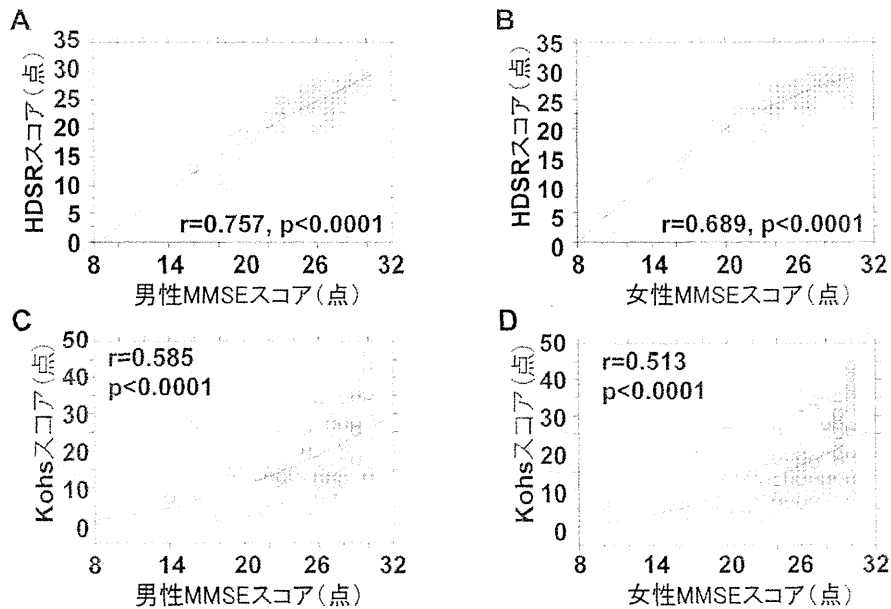


図 3. MMSE と HDSR 及び簡易版 Kohs テストの相互関係

65-92歳の男 (パネル A, C) 女 (パネル B, D) について MMSE, HDSR, 簡易版 Kohs テストを行った。MMSE スコアを横軸に、HDSR (パネル A, B)、簡易版 Kohs (パネル C, D) を縦軸に表した。MMSE スコアと HDSR ないしは Kohs スコアの相関関係はノンパラメトリックのスペアマン相関分析法にて解析した。相関係数  $r$ 、 $p$  値を各々グラフ内に表記した。男女とも、HDSR および Kohs スコアとの正の相関関係がみられた ( $p < 0.05$ ,  $r > 0.4$ )。

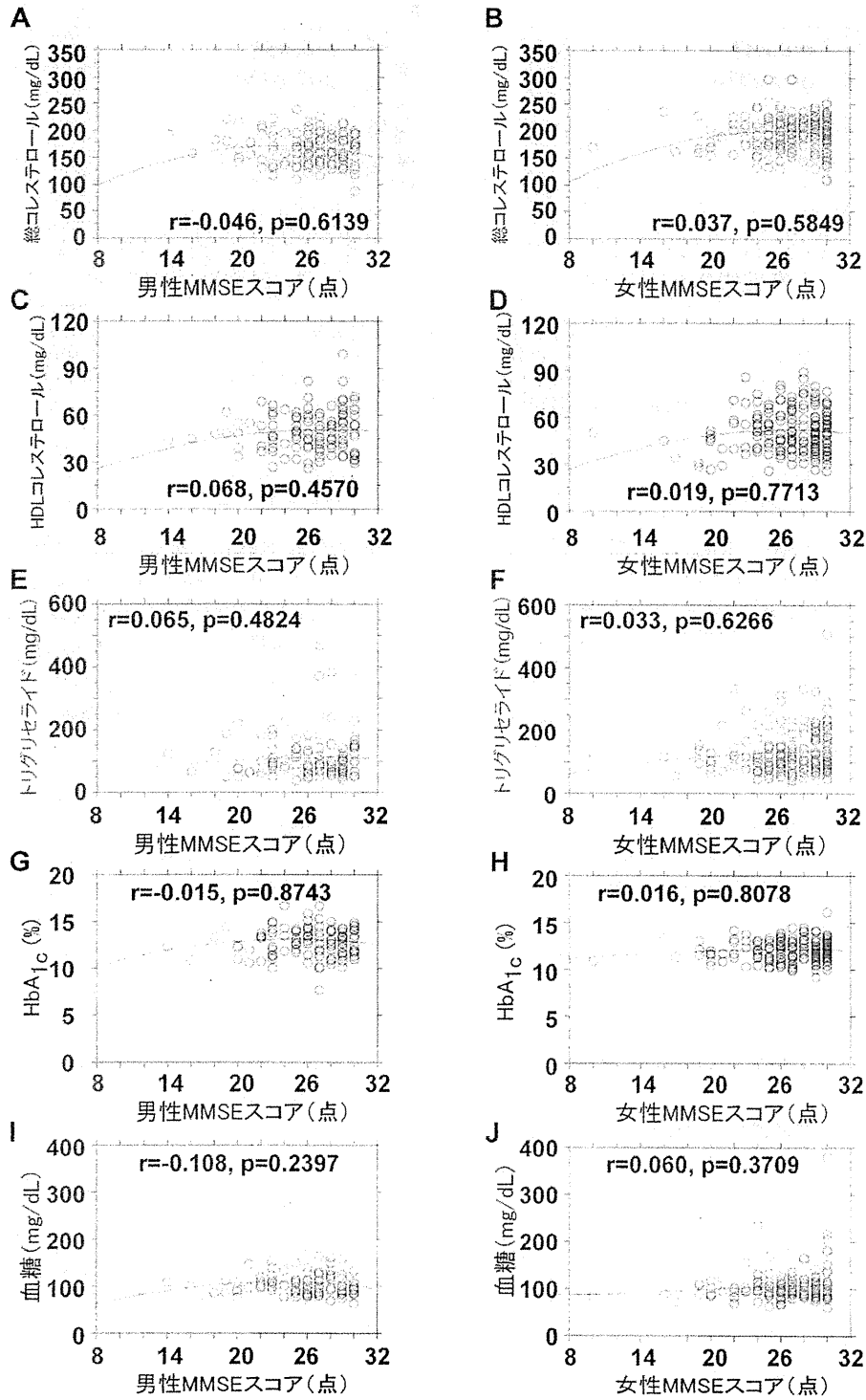


図4. 脂質・糖代謝関連パラメータと認知機能の関係  
MMSEスコアと脂質・糖代謝パラメータとの相関関係はノンパラメトリックのスパアマン相関分析法にて解析した。相関係数 $r$ 、 $p$ 値を各々グラフ内に表記した。男女とも相関関係はみられなかった ( $p > 0.05, r < 0.4$ )。

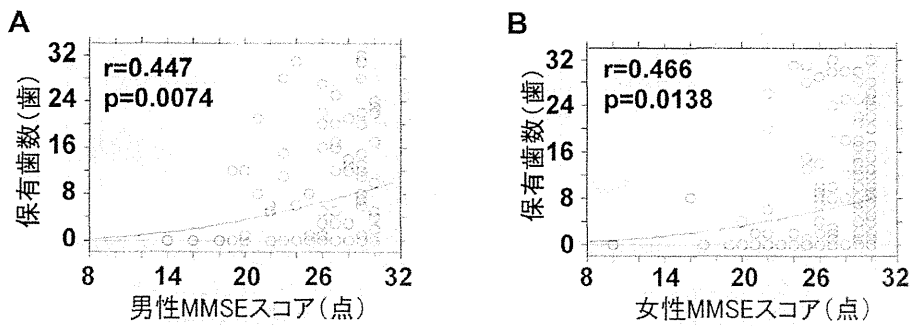


図5. 保有歯数と認知機能の相関関係

65-92歳の男女についてMMSEテスト、保有歯数の検定を行った。MMSEスコアと保有歯数の相関関係はノンパラメトリックのスペアマン相関分析法にて解析した。相関係数 $r$ 、 $p$ 値を各々グラフ内に表記した。男女とも、MMSEと保有歯数との正の相関関係がみられた ( $p<0.05$ ,  $r>0.4$ )。

今回の解析結果では、高齢者の血清脂質と認知機能には有意な相関がみられなかった。その理由として、今回の被験者に血清脂質の数値が高い者がほとんど認められず、ほとんどの者が正常範囲内であったこと、高年期における血清脂質の異常は、認知機能低下のリスクにならない可能性などが考えられる。一方、中年期における高脂血症や肥満の有無は認知機能に影響を与えた可能性は考えられるが、それらの既往については調査されなかったため、過去の病歴との関連性を調べることはできなかった。糖尿病と認知機能との相関についても報告があり、特に2型糖尿病との関連性が指摘されている<sup>33,34)</sup>。加えて、中年期の糖尿病患者は将来的な認知機能低下のリスクが高いことが示されている<sup>35,36)</sup>。今回の解析結果では、血清脂質の結果と同様に糖代謝マーカーと認知機能との間に有意な相関関係は認められなかった。従って、高年期における糖代謝異常は認知機能に影響を及ぼしていない可能性が考えられた。

歯の保有歯数あるいは機能歯の数と認知機能との間には有意な相関関係があることが報告されている<sup>11,37,38)</sup>。本解析結果においても、被験高齢者の保有歯数とMMSEスコアとの間に有意な正の相関がみられた。本調査では検査項目が多岐にわたっていたことや時間の制約があったことから、口腔内の検査は保有歯数に限られており、齲蝕歯や健全歯の区別、義歯の有無、歯周病の有無等の検査が行われていない。従って、口腔疾患や口腔機能等との総合的な相関はみることができなかった。しかし、血液の各種指標と認知機能との相関はみられなかったにもかかわらず、認知機能と保有歯数との間に相関関係がみられたことは極めて興味深い。高齢者の歯数

は、高齢者の認知機能を押し量る、簡便なサロゲートマーカーとなり得る可能性がある。認知症患者あるいは認知機能が低下した高齢者は歯科を受診する機会が少なく、また自宅や施設における口腔清掃状態も不良であるケースが多くなるため、歯を喪失しやすくなることが考えられる。加えて、歯の喪失は咀嚼機能の低下に繋がり、それは脳血流の低下を引き起こして、認知機能の低下を助長するかもしれない。また、歯の喪失の大きな原因として歯周病や齲蝕が考えられるが、それらは食習慣をはじめとした生活習慣が深く関わる疾患である。特に、歯周病は糖尿病、肥満、心血管病等の生活習慣病との相関関係が指摘されている<sup>39,40)</sup>。従って、歯の喪失の背景には、生活習慣の問題が隠されており、それが認知機能の低下に直接あるいは間接的に関与した可能性も考えられる<sup>41,42)</sup>。本研究の結果は、歯を残すことが単に口腔のQOLの維持に重要であるばかりでなく、健やかに老いるための重要な要素となっていることを示唆しているものと考えられる。

## V. 結 論

高知県香北町の高齢者を対象とした疫学調査について解析した結果、認知機能と脂質・糖質代謝パラメータとの間に有意な相関関係は認められなかったが、認知機能と保有歯数との間には相関関係があることが明らかになった。

## 参考文献

- 1) Saunders AM, Schmeider K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D., Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N: Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions

- in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet*, **342**(8873):710-711, 1993.
- 2) Starr JM, Whalley LJ, Inch S, Shering PA: Blood pressure and cognitive function in healthy old people. *J Am Geriatr Soc*, **41**(7):753-756, 1993.
  - 3) Seux ML, Thijs L, Forette F, Staessen JA, Birkenhager WH, Bulpiitt CJ, Girerd X, Jaaskivi M, Vanhanen H, Kivinen P, Yodfat Y, Vanska O, Antikainen R, Laks T, Webster JR, Hakamaki T, Lehtomaki E, Lilov E, Grigorov M, Janculova K, Halonen K, Kohonen-Jalonen P, Kermowa R, Nachev C, Tuomilehto J: Correlates of cognitive status of old patients with isolated systolic hypertension: the Syst-Eur Vascular Dementia Project. *J Hypertens*, **16**(7):963-969, 1998.
  - 4) Brands AM, Biessels GJ, de Haan EH, Kappelle LJ, Kessels RP: The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care*, **28**(3):726-735, 2005.
  - 5) Allen KV, Frier BM, Strachan MW: The relationship between type 2 diabetes and cognitive dysfunction: longitudinal studies and their methodological limitations. *Eur J Pharmacol*, **490**(1-3):169-175, 2004.
  - 6) 森本 基: 8020 著データバンクの構築について日腔保健と全身的な健康状態の関係について. 厚生科学研究「日腔保健と全身的な健康状態の関係」運営協議会編 財団法人日腔保健協会(東京), 1-11, 2000.
  - 7) 重富俊雄: 日腔機能と老化に関する研究. 痴呆の危険因子に関する疫学的検討. *日腔誌*, **47**:403-407, 1998.
  - 8) 渡邊 誠, 伊藤進太郎: 歯の喪失とアルツハイマー型認知症. *サイエンスリサーチ*, **5**:36-39, 2006.
  - 9) Miura H: Relationship between cognitive function and mastication in elderly females. *J Oral Rehabil*, **30**:808-811, 2003.
  - 10) Tombaugh TN, McIntyre NJ: The mini-mental state examination: a comprehensive review. *J Am Geriatr Soc*, **40**:922-935, 1992.
  - 11) Takata Y, Ansai T, Soh I, Sonoki K, Awano S, Hamasaki T, Yoshida A, Ohsumi T, Toyoshima K, Nishihara T, Takehara T: Cognitive function and number of teeth in a community-dwelling elderly population without dementia. *J Oral Rehabil*, **36**(11):808-813, 2009.
  - 12) 「香北町健康長寿計画」報告書 1990-1995 年 香北町, 土佐山田保健所, 高知医科大学-老年科, 1996.
  - 13) 「香北町健康長寿計画」報告書 1996-2001 年 香北町, 土佐山田保健所, 高知医科大学-老年科, 2002.
  - 14) 松林公蔵, 小澤利男: 後期高齢者の地域における健康管理. *Geriatric Medicine*, **32**:671-675, 1994.
  - 15) 松林公蔵, 小澤利男: 老年者の起居, 動作, 運動機能の客観的評価. *Geriatric Medicine*, **32**:533-539, 1994.
  - 16) 松林公蔵, 小澤利男: 老年者の情緒に関する評価. *Geriatric Medicine*, **32**:541-546, 1994.
  - 17) 松林公蔵, 奥宮清人, 河本昭子, 木村茂昭, 和田知子, 藤澤道子, 土居義典, 島田和幸, 小澤利男: 地域在住者の自立度に関する経時的変化. *日老医誌*, **31**:214-220, 1994.
  - 18) Shimada K, Ozawa T, Matsubayashi K: Dependency of the aged in the community. *Lancet*, **342**:185, 1993.
  - 19) Matsubayashi K, Okumiya K, Wada T, Doi Y, Ozawa T: Secular improvement in self-care independence of old people living in community in Kahoku, Japan. *Lancet*, **347**:60, 1996.
  - 20) Matsubayashi K, Okumiya K, Wada T, Osaki Y, Fujisawa M, Doi Y, Ozawa T: Postural dysregulation in systolic blood pressure is associated with worsened scoring on neurobehavioral function tests and leukoaraiosis in the older elderly living in a community. *Stroke*, **28**:2169-2173, 1997.
  - 21) Matsubayashi K, Okumiya K, Wada T, Doi Y, Ozawa T: High blood-pressure control in Japanese hypertensive population. *Lancet*, **350**:290-291, 1997.
  - 22) Matsubayashi K: Sex and examination results. *Lancet*, **350**:1711, 1997.
  - 23) Matsubayashi K, Okumiya K, Osaki Y, Fujisawa M, Doi Y: Quality of life of old people living in the community. *Lancet*, **350**:1521-1522, 1997.
  - 24) Matsubayashi K, Okumiya K, Nakamura T, Fujisawa M, Osaki Y: Global burden of disease. *Lancet*, **350**:144, 1997.
  - 25) Matsubayashi K, Okumiya K, Osaki Y, Fujisawa M, Doi Y: Frailty in elderly Japanese. *Lancet*, **353**:1445, 1999.
  - 26) Okumiya K, Matsubayashi K, Nakamura T, Fujisawa M, Osaki Y, Doi Y, Ozawa T: The timed "Up & Go" test and manual button score are useful predictors of functional decline in basic and instrumental ADL in community-dwelling older people. *JAGS*, **47**:497-498, 1999.
  - 27) 西永正典: 総合機能評価 (CGA) の臨床応用とその意義. *日老医誌*, **37**:859-865, 2000.
  - 28) 西永正典: CGA ツールとその特徴. *老年医学*, **39**:1493-1499, 2001.
  - 29) Schwartz GL, Bailey KR, Mosley T, Knopman DS, Jack CR Jr, Canzanello VJ, Turner ST: Association of ambulatory blood pressure with ischemic brain injury. *Hypertension*, **49**(6):1228-1234, 2007.
  - 30) Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A: Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ*, **322**(7300):1447-1451, 2001.
  - 31) Evans RM, Hui S, Perkins A, Lahiri DK, Poirier J, Farlow MR: Cholesterol and APOE genotype interact to influence Alzheimer disease progression. *Neurology*, **62**(10):1869-1871, 2004.
  - 32) Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH, Younkin

- SG : Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **24**(15):3801-3809, 2004.
- 33) Strachan MW, Frier BM, Deary IJ: Cognitive assessment in diabetes: the need for consensus. *Diabet Med*, **14**(6):421-422, 1997.
- 34) Strachan MW, Deary IJ, Ewing FM, Frier BM: Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care*, **20**(3):438-445, 1997.
- 35) Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, Palumbo PJ: The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Ann N Y Acad Sci*, **826**:422-427, 1997.
- 36) Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM : Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*, **53**(9):1937-1942, 1999.
- 37) Grabe HJ, Schwahn C, Volzke H, Spitzer C, Freyberger HJ, John U, Mundt T, Biffar R, Kocher T : Tooth loss and cognitive impairment. *J Clin Periodontol*, **36**(7):550-557, 2009.
- 38) Avlund K, Holm-Pedersen P, Morse DE, Viitanen M, Winblad B : Tooth loss and caries prevalence in very old Swedish people: the relationship to cognitive function and functional ability. *Gerodontology*, **21**(1):17-26, 2004.
- 39) Tonetti MS : Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *J Clin Periodontol*, **36** Suppl 10:15-19, 2009.
- 40) Pischon N, Heng N, Bernimoulin JP, Kleber BM, Willich SN, Pischon T : Obesity, inflammation, and periodontal disease. *J Dent Res*, **86**(5):400-409, 2007.
- 41) Ship JA : Diabetes and oral health: an overview. *J Am Dent Assoc*, **134** Spee No:4S-10S, 2003.
- 42) Kamer AR, Craig RG, Dasanayake AP, Brys M, Glodzik-Sobanska L, de Leon MJ: Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. *Alzheimers Dement*, **4**(4):242-250, 2008.
- 43) Grabe HJ, Schwahn C, Völzke H, Spitzer C, Freyberger HJ, John U, Mundt T, Biffar R, Kocher T : Tooth loss and cognitive impairment. *J Clin Periodontol*, **36**:550-557, 2009.



## 高齢者の残存歯数と認知機能との関連性

今井 剛, 西永 正典, 松下 健二

鹿児島大学医学雑誌 第61巻 第3号  
2010年1月発行

## 高齢者の残存歯数と認知機能との関連性

今井 剛<sup>1)</sup>, 西永 正典<sup>3)</sup>, 松下 健二<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 国立長寿医療センター研究所老化制御研究部

<sup>2)</sup> 同口腔疾患研究部

<sup>3)</sup> 高知大学医学部老年病科

(原稿受付日 2009年10月26日)

## Association of Number of Teeth with Cognitive Function in the Elderly

Takeshi IMAI<sup>1)</sup>, Masanori NISHINAGA<sup>3)</sup>, Kenji MATSUSHITA<sup>2)</sup>

Department of Aging Intervention<sup>1)</sup>, Department of Oral Disease Research<sup>2)</sup>, National Institute for Longevity Science, National Center for Geriatrics and Gerontology, Aichi, Japan

<sup>3)</sup> Department of Medicine and Geriatrics, Kochi Medical School, Kochi, Japan

### Abstract

It has been reported that number of teeth is associated with cognitive function in elderly populations with dementia. However, little is known about this association in an ordinary elderly population. We evaluated this relationship in a Japanese population of elderly people aged from 65 to 92 years (n = 345; 122 males and 223 females) residing in Kahokuchou (now Kami City) in Kochi Prefecture of Japan. Dental examinations were performed all subjects with the Mini-Mental State Examination (MMSE) and Kohs task test for assessing cognitive function. Associations were not found between number of residual teeth and MMSE in total subjects or in males or females. However, associations were found between number of residual teeth and Kohs score in males. These results suggest that cognitive functions, especially, motor cognition, may be associated with number of teeth in ordinary elderly males.

**Key words:** cognitive function, dementia, teeth, oral health, elderly, longevity

### 緒 言

高齢者における認知機能の低下やうつ状態は、高齢者の生活の質 (Quality of Life: QOL) を著しく低下することが指摘されており、今後我が国において高齢化社会が進行するにあたって、認知機能の改善、認知機能低下の予防対策は急務である。

最近の疫学調査の結果から、自分の歯でよくかむこと

は高齢者の栄養状態の維持に重要であるばかりでなく、全身状態にも良い影響を及ぼしていることが解明されつつある。我が国においては、1989年に厚生省 (現厚生労働省) が“80歳で自分の歯を20本保持しよう”という8020運動が提唱され、自分の歯を残す意義について検証が始まった。厚生労働省も1997年度から厚生科学研究事業の1テーマとして“高齢者の口腔保健と全身的な健康状態の関係についての総合研究”を課題に掲げ、福岡県、

Corresponding author: Kenji Matsushita, DDS, PhD

Department of Oral Disease Research<sup>1)</sup>, National Institute for Longevity Science, National Center for Geriatrics and Gerontology 36-3 Gengo, Morioka-cho, Obu, Aichi 474-8511, Japan

E-mail: kmatsu30@nils.go.jp

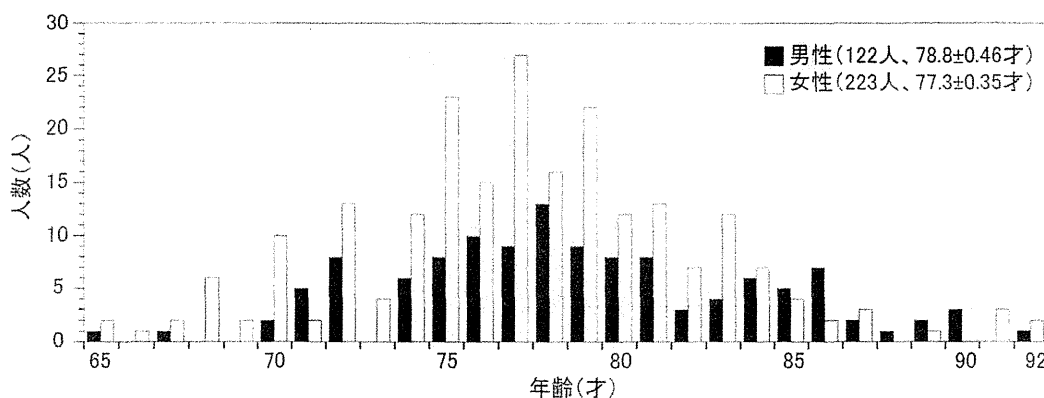


図1. 被験者の年齢分布. 65歳から92歳までの男性 (122人, 平均年齢 $78.8 \pm 0.46$ 才), 女性 (223人, 平均年齢 $77.3 \pm 0.35$ 才) について, 横軸に年齢を, 縦軸にその人数を示した.

愛知県, 新潟県などで疫学研究が実施された. それらの研究の結果から, 歯・咀嚼機能とQOL, 咀嚼機能と日常生活動作 (Activities of Daily Living; ADL), 咀嚼機能と運動能力, 咀嚼機能と認知能力等との関連性が明らかになった<sup>1)</sup>. 歯の喪失がAlzheimer病 (AD) 発症の危険因子の一つであるとの報告があり, ADでは残存歯数が少ないことが指摘されている<sup>2, 3)</sup>. また, 咬合力と認知能力との正の相関も指摘されてきた<sup>4)</sup>. 簡易認知機能検査法である Mini-Mental State Examination (MMSE)<sup>5)</sup>を用いた, 福岡県において1998年に始まった疫学調査の結果では, 60歳および65歳住民の残存歯数とMMSEとの間に有意な正の相関が認められている<sup>6)</sup>. 以上の結果は, 残存歯数と認知能に関連性があることを示唆している.

本研究では, 高知県香北町において1991年から2001年にかけて行われた高齢者の長期縦断疫学調査の調査結果をもとに<sup>7-23)</sup>, 高齢者の残存歯数と認知機能, 特に動作性認知機能との関連性について検討した.

## 対象および方法

本研究は, 1991年から2001年にかけて高知県香北町において行われた縦断的検診事業「香北町健康長寿研究」(KAHOKU LONGITUDINAL AGING STUDY; “KALS”)の調査結果の内1994年度に行われたデータを統計学的に解析したものである<sup>7-23)</sup>.

対象者は, 同町在住の65歳以上の老年人1,488名のうち, 残存歯数検査および簡易版Kohsテスト, MMSEテスト等の認知機能テストを受けた被験者で, 低酸素性脳症, 脳卒中後遺症等については除外した345名 (男: 女 = 122: 223)である (図1). 平均年齢 + 標準誤差は男性 $78.8 \pm 0.46$ 才で, 女性は $77.3 \pm 0.35$ 才である. 特に, 簡易

版Kohs立方体テストに関しては, 今回は時間を短縮し効率を上げるために, 原版の課題1, 2, 4, 7, 10, 11, 14の7題を選択して実施した (47点満点)<sup>7)</sup>. なお, KALSにおける簡易版Kohsテストでも認知機能を評価できることが既に確認されている<sup>7, 10, 12)</sup>.

統計学的解析にあたっては, 分散分析 (analysis of variance: ANOVA)を用いて解析を行った. 有意差のあるものに関してはFisher's exact testを用い, またp値をSTATVIEWを用いて計算した. 有意水準は $p < 0.05$ とした. 図2から図4の棒グラフには平均値と標準誤差を示した.

## 結 果

### 1. 残存歯数と年齢, 性差との関係

図2に, 年齢と残存歯数の関係を示した. 65歳から92歳の被験者を4つの群 (A群: 65-74才, B群: 75-80才, C群: 80-85才, D群: 86-92才)にわけ, 男女別に残存歯数の平均値を算出した. その結果, 男性においてはA群 (65-74才)とD群 (86-92才)に有意な差がみられた ( $p = 0.0080$ ). 女性においてはA群 (65-74才)に対してC群 (81-85才)及びD群 (86-92才)との間に有意差がみられた (共に $p < 0.0001$ ).

更には, 1993年度の厚生労働省口腔疾患実態調査のデータ (70-74才: 14.41本, 75-79才: 9.01本, 80-84才: 7.41本)<sup>24)</sup>と高知県香北町における高齢者の歯の残存歯数のデータと本調査による高知県香北町のデータ (70-74才: 8.49本, 75-79才: 6.69本, 80-84才: 3.64本)を比較すると, 前期高齢者, 後期高齢者とも全国平均を下回っていた.

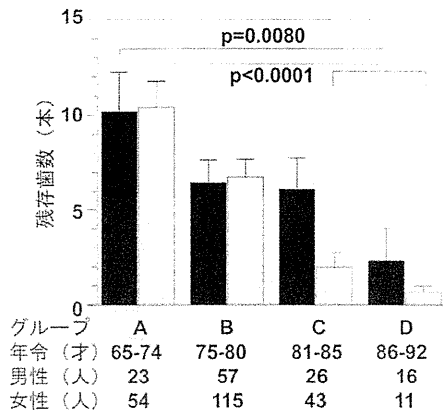


図2. 性別高齢者年齢と残存歯数の関係。年齢別に4群(A, B, C, D)に分けて、各群における残存歯数の平均値および標準誤差を示した。A群: 65-74才(男性23人, 女性54人), B群: 75-80才(男性57人, 女性115人), C群: 81-85才(男性26人, 女性43人), D群: 86-92才(男性16人, 女性11人)。A群男性に比べてD群男性は有意に低く(p=0.0080), A群女性(レーン2)に比べてC, D群の女性(レーン8, 10)は共に有意に低かった(p<0.0001)。

## 2. 残存歯数と認知機能の関係

次に、認知機能と残存歯数との関連性について、MMSEと簡易版Kohs立方体テスト等と残存歯数との関連を解析した(図3)。図2の結果より加齢により(男性D群, 女性CおよびD群)平均残存歯数が有意に下がるため、男性・女性ともに有意差がみられない65歳から80歳に設定した(男性80人, 平均年齢75.8±0.37才, 女

性169人, 平均年齢75.2±0.27才)。歯がない男性は32人(平均年齢76.9±0.45才), 歯がある男性は48人(平均年齢75.1±0.48才), 歯がない女性は80人(平均年齢76.2±0.35才), 歯がある女性は89人(平均年齢74.4±0.36才)であった。歯のある男性の平均歯数は12.5±1.44本で、歯のある女性の平均歯数は15.2±1.07本であった。

歯の有無と簡易版Kohsスコアとの関連性を調べた結果、男性にのみ有意差が認められ、歯のある65-80歳の男性は歯のない男性に比べKohsスコアが有意に高かった(p=0.0252)。一方、女性に関しては歯の有無と簡易版Kohsスコアの間には有意な差は認められなかった(p=0.1008)(図3A)。また、男性群において年齢、MMSEスコアと歯の有無との関連を調べた結果、歯のある男性と歯のない男性の平均年齢には有意差がみられないこと(図3B, 各々p=0.1190)さらにはMMSEスコアと歯の有無との間にも有意な相関関係は認められなかった(0.1039)。従って、高齢者の男性において歯の有無と簡易版Kohsスコアとの間に特異的に有意差が見られることが明らかになった。

最後に各個人の数値の相関を解析した(図4)。MMSEと残存歯数(図4B)との間ならびに年齢と残存歯数(図4C)の間には有意な相関はみられなかった。同様の解析をKohsスコアについても行った(図4A)。その結果、図3と同様、歯のない群に比べて歯のある群はKohsスコアが高い傾向にあったが、残存歯数との間に有意な相関関係は認められなかった。

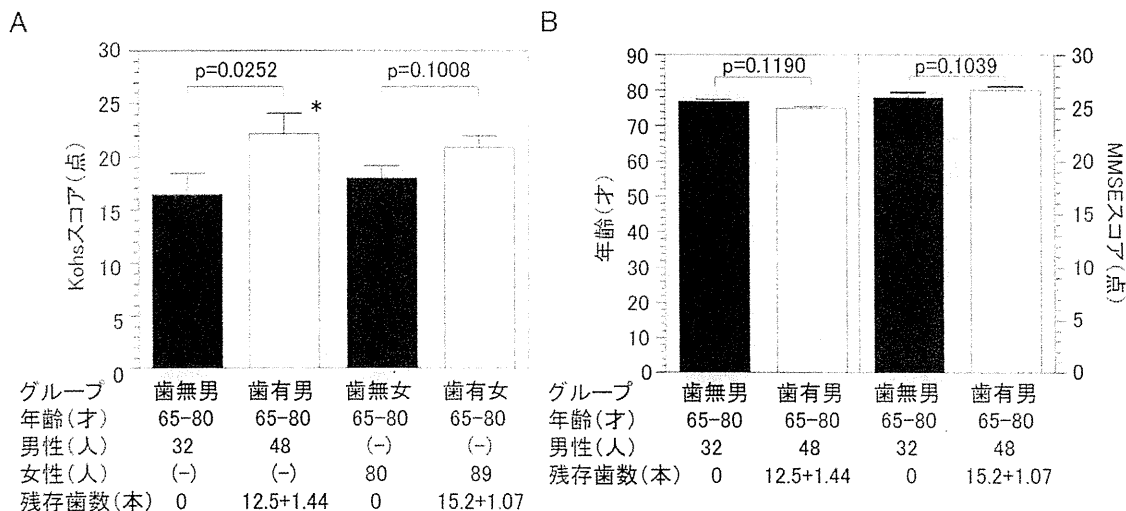


図3. 認知機能と歯の有無の関係。65-80歳の男女について簡易版Kohsテスト(パネルA)、年齢およびMMSEテスト(パネルB)を行った。歯のない群とある群に分けて、その平均値および標準偏差を表した(歯のない男性32人, 歯のある男性48人で残存歯数12.5±1.44本, 歯のない女性80人, 歯のある女性89人で残存歯数15.2±1.07本)。A) Kohsスコアに関しては男性のみ歯の有無で有意差がみられた(\*, p=0.0252), 女性はみられなかった(p=0.1008)。B) 年齢およびMMSEスコアに関しては有意差がみられなかった(各々p=0.1190, 0.1039)。

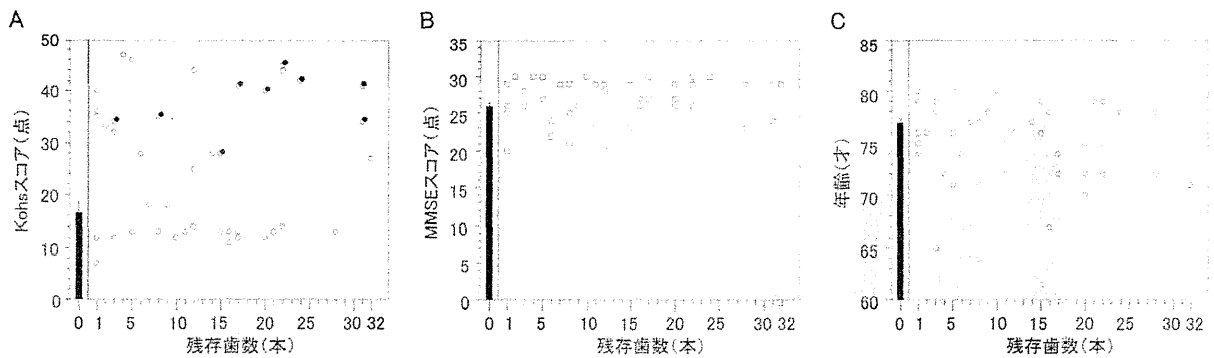


図4. 認知機能と残存歯数の関係. 65-80歳の男女についてKohsテスト (パネルA), MMSEテスト (パネルB), 年齢 (パネルC)を行った. 残存歯数とKohsスコアをプロットし, 両者の相関関係を示した. 特に歯のない群の値は棒グラフにすることで歯のある群と差別化した.

## 考 察

高齢者の歯の残存歯数に関しては, 1993年度の厚生労働省口腔疾患実態調査のデータと本調査による高知県香北町のデータを比較すると, 前期高齢者, 後期高齢者ともに全国平均を大きく下回っており, 高齢者口腔の健康状態は良好とは言いがたいことが判明した. 同地域におけるオーラルヘルスプロモーションの推進が必要である可能性が考えられた.

認知機能を調べるために, 香北町の調査では MMSE, 長谷川式簡易知能評価スケール改訂版 (Revised Hasegawa Dementia Scale; HDSR), 簡易版Kohs立方体テスト等を行っている. 本研究では, MMSEスコアあるいはKohsスコアと残存歯数の関連性について検討した. その結果, 残存歯の有無とMMSEスコアとの間には相関はみられなかったものの, 残存歯の有無とKohsスコアとの間には有意な相関が認められた. MMSEは, 記憶, 見当識, 計算能力などを質問形式で行うもので, 総合的な認知機能を評価することができる. これまでも, 健全歯数あるいは残存歯数とMMSEスコアとの有意な相関が示されている<sup>6, 26, 27)</sup>. 本研究においても歯の健康状態を考慮して関連性を検討すれば, 関連性が浮き彫りになった可能性が考えられるが, 本調査では齲蝕の程度について解析がなされていなかったため, 相関関係を明らかにすることができなかつた. 一方, Kohs 立方体テストの結果と健全歯数あるいは残存歯数等との関連性を調べた報告はこれまでにない. Kohs立方体テストは, 4種の色に塗り分けられた約3cm立方の積み木を4個から16個使い, 指示された図版の模様と同じ模様になるように積み木を組み合わせていくものであるため, 空間および運動認知機能に特化した試験であるといえる. 本研究の結果から, 高齢の男性において歯の有無は空間や

運動認知機能に影響を及ぼす可能性が示唆された. 一般に, 認知機能は男性の方が女性より高いことが知られており, これは男性の方が高度な教育を受けていることによることが推察されているが, 今回男性に限定して歯の有無と認知機能に相関がみられたことは非常に興味深い. また, 咬合関係や咀嚼能力等との関係も非常に興味のあるところであり, 今後別の疫学調査において検討していきたいと考えている.

## 結 論

高齢者の残存歯の有無は高齢者の空間認知機能および運動性認知機能と相関があることが明らかになった.

## 参考文献

- 1) 森本 基. 8020者データバンクの構築について 口腔保健と全身的な健康状態の関係について (厚生科学研究「口腔保健と全身的な健康状態の関係」運営協議会編). 財団法人口腔保健協会, 東京, 2000: 1-11.
- 2) 重富俊雄. 口腔機能と老化に関する研究. 痴呆の危険因子に関する疫学的検討. 口科誌 1998; 47: 403-407.
- 3) 渡邊 誠, 伊藤進太郎. 歯の喪失とアルツハイマー型認知症. サイエンスリサーチ 2006; 5: 36-39.
- 4) Miura H. Relationship between cognitive function and mastication in elderly females. J Oral Rehabil 2003; 30: 808-811.
- 5) Tombaugh TN, McIntyre NJ. The Mini-Mental State Examination: a comprehensive review. J Am Geriatr Soc. 1992; 40: 922-935.
- 6) Takata Y, Ansai T, Soh I, Sonoki K, Awano S, Hamasaki T, Yoshida A, Ohsumi T, Toyoshima K.

- Nishihara T, Takehara T. Cognitive function and number of teeth in a community-dwelling elderly population without dementia. *J Oral Rehabil*. 2009; 36: 808-813.
- 7) 「香北町健康長寿計画」報告書1990-1995年 香北町, 土佐山田保健所, 高知医科大学老年科, 1996.
- 8) 「香北町健康長寿計画」報告書1996-2001年 香北町, 土佐山田保健所, 高知医科大学老年科, 2002.
- 9) 松林公蔵, 小澤利男. 後期高齢者の地域における健康管理. *Geriatric Medicine* 1994; 32: 671-675.
- 10) 松林公蔵, 小澤利男. 老年者の起居, 動作, 運動機能の客観的評価. *Geriatric Medicine* 1994; 32: 533-539.
- 11) 松林公蔵, 小澤利男. 老年者の情緒に関する評価. *Geriatric Medicine* 1994; 32: 541-546.
- 12) 松林公蔵, 奥宮清人, 河本昭子, 木村茂昭, 和田知子, 藤澤道子, 土居義典, 島田和幸, 小澤利男. 地域在住者の自立度に関する経時的変化. *日本老年医学会雑誌* 1994; 31: 214-220.
- 13) Shimada K, Ozawa T, Matsubayashi K. Dependency of the aged in the community. *Lancet* 1993; 342: 185.
- 14) Matsubayashi K, Okumiya K, Wada T, Doi Y, Ozawa T. Secular improvement in self-care independence of old people living in community in Kahoku, Japan. *Lancet* 1996; 347: 60.
- 15) Matsubayashi K, Okumiya K, Wada T, Osaki Y, Fujisawa M, Doi Y, Ozawa T. Postural dysregulation in systolic blood pressure is associated with worsened scoring on neurobehavioral function tests and leukoaraiosis in the older elderly living in a community. *Stroke* 1997; 28: 2169-2173.
- 16) Matsubayashi K, Okumiya K, Wada T, Doi Y, Ozawa T. High blood-pressure control in Japanese hypertensive population. *The Lancet* 1997; 350: 290-291.
- 17) Matsubayashi K. Sex and examination results. *Lancet* 1997; 350: 1711.
- 18) Matsubayashi K, Okumiya K, Osaki Y, Fujisawa M, Doi Y. Quality of life of old people living in the community. *Lancet* 1997; 350: 1521-1522.
- 19) Matsubayashi K, Okumiya K, Nakamura T, Fujisawa M, Osaki Y. Global burden of disease. *Lancet* 1997; 350: 144.
- 20) Matsubayashi K, Okumiya K, Osaki Y, Fujisawa M, Doi Y. Frailty in elderly Japanese. *Lancet* 1999; 353: 1445.
- 21) Okumiya K, Matsubayashi K, Nakamura T, Fujisawa M, Osaki Y, Doi Y, Ozawa T. The timed "Up & Go" test and manual button score are useful predictors of functional decline in basic and instrumental ADL in community-dwelling older people. *J Am Geriatr Soc* 1999; 47: 497-498.
- 22) 西永正典. 総合機能評価 (CGA) の臨床応用とその意義. *日老医誌* 2000; 37: 859-865.
- 23) 西永正典. CGAツールとその特徴. *老年医学* 2001; 39: 1493-1499.
- 24) 厚生省健康政策局歯科衛生課編. 平成5年歯科疾患実態調査報告. 東京: 口腔保健協会; 1995.
- 25) Kohs SC. The Block-Design Tests. *J Ex Psychol*. 1920; 3: 357-376.
- 26) Grabe HJ, Schwahn C, Völzke H, Spitzer C, Freyberger HJ, John U, Mundt T, Biifar R, Kocher T. Tooth loss and cognitive impairment. *J Clin Periodontol*. 2009; 36: 550-557.
- 27) Avlund K, Holm-Pedersen P, Morse DE, Viitanen M, Winblad B. Tooth loss and caries prevalence in very old Swedish people: the relationship to cognitive function and functional ability. *Gerodontology*. 2004; 21: 17-26.



## Morrionside cinnamic acid conjugate as an anti-inflammatory agent

Yoshinori Takeda<sup>a</sup>, Naomi Tanigawa<sup>b</sup>, Fortunatus Sunghwa<sup>c</sup>, Masayuki Ninomiya<sup>d</sup>, Makoto Hagiwara<sup>b</sup>, Kenji Matsushita<sup>b</sup>, Mamoru Koketsu<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

<sup>b</sup> Department of Oral Disease Research, National Institute, National Center for Geriatrics & Gerontology, Obu, Aichi 474-8511, Japan

<sup>c</sup> Department of Chemistry, College of Natural and Applied Sciences, University of Dar es Salaam, Tanzania

<sup>d</sup> Department of Materials Science and Technology, Faculty of Engineering, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 April 2010

Revised 15 June 2010

Accepted 17 June 2010

Available online 20 June 2010

#### Keywords:

Morrionside

7-*O*-Cinnamoylmorrionside

Anti-inflammatory activity

### ABSTRACT

A morrionside cinnamic acid conjugate was prepared and evaluated on E-selectin mediated cell–cell adhesion as an important role in inflammatory processes. 7-*O*-Cinnamoylmorrionside exhibited excellent anti-inflammatory activity ( $IC_{50} = 49.3 \mu M$ ) by inhibiting the expression of E-selectin; further, it was more active than another cinnamic-acid-conjugated iridoid glycoside (harpagoside;  $IC_{50} = 88.2 \mu M$ ), 7-*O*-methylmorrionside, and morrionside itself. As a result, 7-*O*-cinnamoylmorrionside was observed to be a potent inhibitor of TNF- $\alpha$ -induced E-selectin expression.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Inflammations are associated with the extravasation of leukocytes from blood into tissue. Selectins are carbohydrate-binding type-1 membrane glycoproteins that act as adhesion molecules involved in the development of different inflammatory reactions. E-selectin is particularly noteworthy in the case of inflammatory diseases owing to its expression in activated endothelium and bone-skin microvascular linings, and to its role in cell rolling, cell signaling, and chemotaxis.<sup>1</sup> E-selectin mediates cell tethering and rolling interactions through the recognition of sialofucosylated Lewis carbohydrates expressed on structurally diverse protein–lipid ligands on circulating leukocytes; this phenomenon serves as an important trigger in inflammatory response.<sup>2</sup> Pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), secreted by macrophages, induce expression of E-selectin in human endothelial cells and enhance vascular inflammation.<sup>3</sup> Therefore, compounds that exhibit the ability to regulate expression of E-selectin in endothelial cells may be useful as therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases.

Harpagoside, which is a phenylpropanoid-conjugated iridoid glycoside, is known to be a natural anti-inflammatory agent.<sup>4</sup> This compound is a major constituent of *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw), and was found to be one of the active agents in the extract, inhibiting the production of COX-2,<sup>5–7</sup> IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  by RAW 264.7 cells.<sup>8</sup> The structural characteristic of this compound is that cinnamic acid attached to iridoid moiety (Fig. 1). This

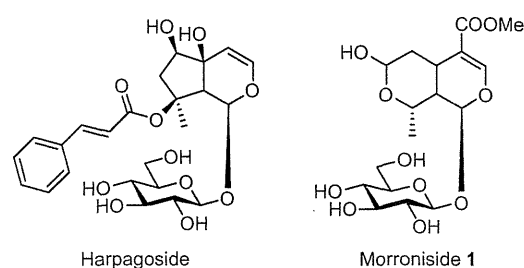


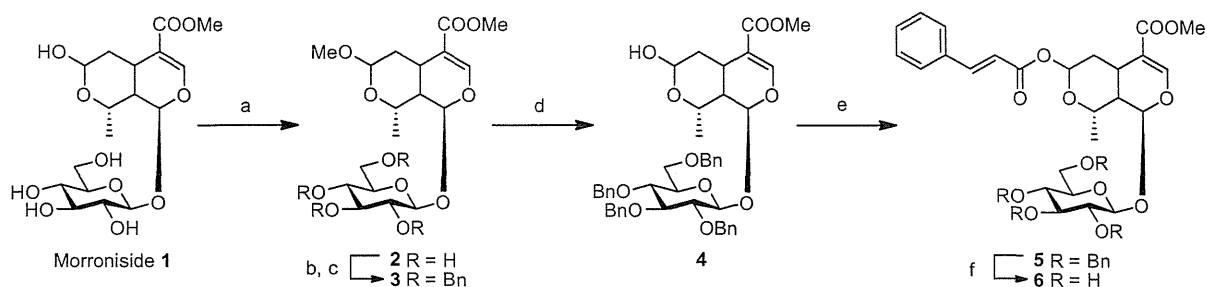
Figure 1. Chemical structures of harpagoside and morrionside.

structure is considered to be not only chemically interesting, but also medically important.

Morrionside (**1**) (Fig. 1), which is one of the iridoid glycoside, has been isolated from several plant families (for e.g., Cornaceae,<sup>9,10</sup> Caprifoliaceae,<sup>11,12</sup> Sarraceniaceae,<sup>13</sup> and Hydrangeaceae<sup>14</sup>); this compound is reported to exhibit antioxidative,  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory, and anti-inflammatory activities.<sup>15–17</sup> The use of such natural products as starting materials for the synthesis of biologically active compounds has received considerable attention. Recently, we reported a highly chemoselective etherification of unprotected **1**, catalyzed by molecular iodine. A series of alkyl ether derivatives were obtained and tested for their cytotoxic activity in a colon 26-L5 cell line. Among the tested compounds, 7-*O*-dodecylmorrionside showed moderated cytotoxic activity, having  $IC_{50}$  values of 20.9  $\mu M$ ; this value was higher than that of morrionside **1**.<sup>18</sup> These results motivated us to investigate synthetic approaches for deriving

\* Corresponding author. Tel./fax: +81 58 293 2619.

E-mail address: koketsu@gifu-u.ac.jp (M. Koketsu).



**Scheme 1.** Synthesis of morroniside cinnamic acid conjugate **6**. Reagents and conditions: (a) iodine, MeOH, acetone, rt, 15 min, 84%; (b) BnBr, NaH, DMF, 0 °C → rt, 1 h; (c) MeI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 1 h, 99% in two steps; (d) concd HCl, AcOH, H<sub>2</sub>O, –10 °C → rt, 6 h, 44%; (e) cinnamoyl chloride, Et<sub>3</sub>N, DMAP, THF, 60 °C, 5 h, 79%; (f) DDO, 1,2-dichloroethane, H<sub>2</sub>O, rt, 4 days, 64%.

bio-active compounds from **1**. We now report both the preparation and biological activity of such derivatives.

Morroniside (**1**) was isolated from the methanolic root extract of *Strychnos cocculoides* (Loganiaceae) by repeated silica gel vacuum liquid chromatography eluting with dichloromethane/methanol (80:20).<sup>19</sup> The <sup>1</sup>H NMR spectrum of this compound revealed it to be a mixture of anomeric forms.<sup>12,20</sup>

We developed a five-step synthesis route for obtaining a morroniside cinnamic acid conjugate **6**. As a key step, we adapted chemoselective etherification of unprotected **1** using molecular iodine.<sup>18</sup> In other words, the treatment of **1** in acetone with methanol in the presence of molecular iodine at room temperature yielded 7-*O*-methylmorroniside (**2**)<sup>18</sup>; this compound was used as a key intermediate for the subsequent reactions. The hydroxy group of the glucoside of **2** was benzyl-protected. On the process of benzylation, methyl ester of 7-*O*-methylmorroniside (**2**) was deprotected. Therefore, methyl esterification by iodomethane was carried out to obtain 2',3',4',6'-tetra-*O*-benzyl-7-*O*-methylmorroniside (**3**) in two steps.<sup>21</sup> The hydroxy group at C-7 in 2',3',4',6'-tetra-*O*-benzylmorroniside (**4**) was obtained by the reaction of **3** with concentrated hydrochloric acid in acetic acid/water.<sup>22</sup> Conjugation of cinnamic acid to **4** was achieved by reaction of **4** in THF with cinnamoyl chloride in the presence of DMAP.<sup>23</sup> For deprotection, we first attempted to perform debenylation by employing Hanessian's method,<sup>24</sup> Lewis acid,<sup>25</sup> and catalytic hydrogenation (using Pt-C<sup>26</sup> and Lindlar's catalyst<sup>27</sup>). However, the desired compound **6** was not obtained as there was no reaction or decomposition. Finally, 2',3',4',6'-tetra-*O*-benzyl-7-*O*-cinnamoylmorroniside (**5**) was debenzylated using DDO<sup>28</sup> in 1,2-dichloroethane/water mixture to yield the corresponding 7-

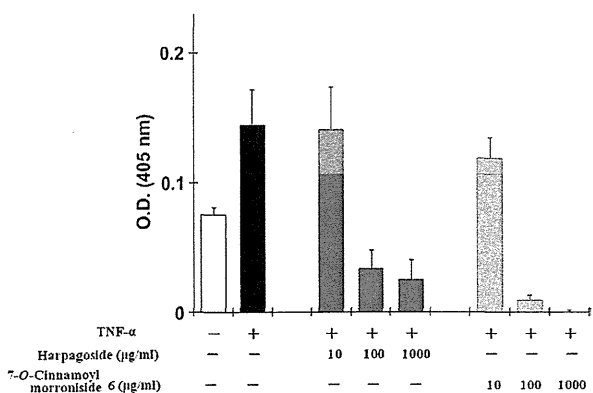
*O*-cinnamoylmorroniside (**6**) as a morroniside cinnamic acid conjugate (Scheme 1).<sup>29</sup>

In order to examine the anti-inflammatory effects of the tested compounds (harpagoside, **1**, **2**, and **6**), human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were stimulated with TNF- $\alpha$  in the presence and absence of these compounds, and the expression level of E-selectin was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).<sup>30</sup> E-selectin was induced by stimulation with TNF- $\alpha$  in HUVECs. The induction was inhibited by addition of tested compounds (harpagoside and **6**). However, **1** and **2** did not inhibit the expression of E-selectin by the stimulation with TNF- $\alpha$ . Harpagoside selected as a reference anti-inflammatory agent showed IC<sub>50</sub> values of 88.2  $\mu$ M; in contrast, **6**, found to be a potent inhibitor of TNF- $\alpha$ -induced E-selectin expression, showed IC<sub>50</sub> values of 49.3  $\mu$ M. To determine if the treatment of HUVECs with these compounds induced cell death and influenced TNF- $\alpha$ -induced E-selectin expression, we investigated the effects of harpagoside, **1**, **2**, and **6** on the viability of HUVECs using a lactose dehydrogenase (LDH) assay. The viability of the cells was not affected by treatment with these compounds (data not shown).

These results indicated that harpagoside and **6** exhibited anti-inflammatory activity by inhibiting the expression of E-selectin. In addition, **6** is the best anti-inflammatory agent in comparison with the others (Fig. 2).

It is well known that iridoid glycosides exhibit anti-inflammatory activity, but the mechanism by which they exhibit this activity remains unclear.<sup>31</sup> In this study, our data shows that unconjugated iridoid glycosides (morroniside (**1**) and 7-*O*-methylmorroniside (**2**)) do not inhibit the expression of E-selectin in endothelial cells. However, cinnamic-acid-conjugated iridoid glycosides (harpagoside and 7-*O*-cinnamoylmorroniside (**6**)) exhibit anti-inflammatory activity by inhibiting the expression of E-selectin by stimulation with TNF- $\alpha$ . This fact suggests that the cinnamoyl moiety in iridoid glycoside derivatives contributes to the anti-inflammatory activity in such compounds. As **6** is the most potent among the tested compounds, it may be useful as a therapeutic agent for the regulation of vascular inflammation.

In conclusion, we have shown that **6** indicates its impressive activity. It is anticipated that further structural modifications would result in products that will enhance anti-inflammatory activity. These investigations on chemical modification using morroniside **1** are ongoing. The results of these investigations will be reported in the near future.



**Figure 2.** Inhibitory effects of tested compounds on TNF- $\alpha$ -induced E-selectin expression in HUVECs. HUVECs were incubated with 10 ng/ml of TNF- $\alpha$  in the presence and in the absence of the test specimens for 2 h. The expression level of E-selectin in HUVECs was measured by an ELISA. (Mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .)

## References and notes

- Lasky, L. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 113.
- Bevilacqua, M. P.; Nelson, R. M. *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 379.
- Bevilacqua, M. P.; Pober, J. S.; Mendrick, D. L.; Cotran, R. S.; Gimbrone, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 9238.
- Eich, J.; Schmidt, M.; Betti, G. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1998**, *8*, 75.



5. Jang, M. H.; Lim, S.; Han, S. M.; Park, H. J.; Shin, I.; Kim, J. W.; Kim, N. J.; Lee, J. S.; Kim, K. A.; Kim, C. J. *J. Pharmacol. Sci.* **2003**, *93*, 367.
6. Kundu, J. K.; Mossanda, K. S.; Na, H. K.; Surh, Y. J. *J. Cancer Lett.* **2005**, *218*, 21.
7. Abdelouahab, N.; Heard, C. J. *Nat. Prod.* **2008**, *71*, 746.
8. Inaba, K.; Murata, K.; Naruto, S.; Matsuda, H. *J. Nat. Med.* **2010**, *64*, 219.
9. Endo, T.; Taguchi, H. *Yakugaku Zasshi* **1973**, *93*, 30.
10. Yokozawa, T.; Yamabe, N.; Kim, H. Y.; Kang, K. S.; Hur, J. M.; Park, C. H.; Tanaka, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 1422.
11. Bailleul, F.; Leveau, A. M.; Durand, M. J. *Nat. Prod.* **1981**, *44*, 573.
12. Calis, I.; Sticher, O. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2539.
13. Hu, J. F.; Starks, C. M.; Williams, R. B.; Rice, S. M.; Norman, V. L.; Olson, K. M.; Hough, G. W.; Goering, M. G.; O'Neil-Jonson, M.; Eldridge, G. R. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 273.
14. Sakai, H.; Kakuda, R.; Yaoita, Y.; Kikuchi, M. *J. Nat. Med.* **2007**, *61*, 226.
15. Wang, W.; Huang, W.; Li, L.; Ai, H.; Sun, F.; Liu, C.; An, Y. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2008**, *28*, 293.
16. Yin, M.; Lou, F.; Cao, Q.; Han, J.; Ji, H. *China Patent* CN 1839869, 2006.
17. Park, C. H.; Yamabe, N.; Noh, J. S.; Kang, K. S.; Tanaka, T.; Yokozawa, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 1734.
18. Sunghwa, F.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Koketsu, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 112.
19. Sunghwa, F.; Koketsu, M. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23*, 1408.
20. Jensen, S. R.; Nielsen, B. J. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 517.
21. *Procedure for synthesis of 2',3',4',6'-tetra-O-benzyl-7-O-methylmorroniside (3):* A solution of **2** (195.6 mg, 0.465 mmol) in anhydrous DMF (5.0 ml) containing benzylbromide (440.9 mg, 3.722 mmol) and sodium hydride (60% oil suspension, 123.0 mg, 2.05 mmol) was stirred under N<sub>2</sub> on ice for few minutes, and then at room temperature for 1 h. Methanol (10 ml) was added to this mixture and the reaction mixture was stirred for 10 min. The resultant solution was partitioned with EtOAc, washed with H<sub>2</sub>O, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to obtain a residue; this residue was then dissolved in anhydrous DMF (5.0 ml) containing methyl iodide (86.9 μl, 1.39 mmol) and potassium carbonate (191.9 mg, 1.39 mmol), and was stirred for 1 h. This resultant reaction mixture was thereafter partitioned with EtOAc, washed with H<sub>2</sub>O, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to obtain another residue; this residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/*n*-hexane = 1:4–1:2) to afford **3** (360.0 mg, 99%) as a white amorphous solid. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 1.36 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-10β), 1.43 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-10α), 1.70–1.74 (1H, m, H-9β), 1.76–1.79 (1H, m, H-9α), 1.92–1.96 (2H, m, H-6β), 2.04–2.07 (2H, m, H-6α), 2.82 (1H, dt, J = 4.5, 13.0 Hz, H-5α), 3.07–3.12 (1H, m, H-5β), 3.47–3.77 (4H, m, H-2', H-3', H-4', and H-5'), 3.36 (3H, s, 7-OMe), 3.72 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.74–3.75 (1H, m, H-8α), 3.78–3.80 (1H, m, H-8β), 4.26 (1H, dd, J = 3.0, 7.5 Hz, H-6'α), 4.42–4.45 (1H, m, H-6'β), 4.61–4.93 (8H, m, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.85 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-1'), 4.95 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-7), 5.84 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-1), 7.20–7.36 (20H, m, Ar of Bn), 7.48 (3H, s, H-3); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 19.3 (C-10), 26.6 (C-5β), 29.8 (C-6β), 30.4 (C-5α), 32.7 (C-6α), 39.8 (C-9), 51.4 (COOCH<sub>3</sub>), 54.7 (7-OMe), 68.9 (C-6'), 72.6 (C-8), 75.7 (C-2'), 73.6, 75.1, 75.2, and 75.8, (4C, Ph-CH<sub>2</sub>), 77.9 (C-4'), 82.2 (C-5'), 84.7 (C-3'), 94.8 (C-7), 98.0 (C-1), 99.3 (C-1'), 111.2 (C-4), 127.6–129.0 (20C, Ar of Bn), 138.2–138.7 (4C, Ar of Bn), 153.1 (C-3), 167.1 (C=O); [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> –40.1 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>); FABMS *m/z* 804 [M+H]<sup>+</sup>.
22. *Procedure for synthesis of 2',3',4',6'-tetra-O-benzylmorroniside (4):* A solution of **3** (116.5 mg, 0.149 mmol) in AcOH (2.5 ml) and H<sub>2</sub>O (0.15 ml) was treated with concd HCl (20 μl) at –10 °C, and stirred for 6 h at room temperature. The resultant solution was partitioned with EtOAc, washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> aq, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to obtain a residue; this residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/*n*-hexane = 1:3–1:1) to afford **4** (50.0 mg, 44%) as a white amorphous solid. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 1.34 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-10β), 1.42 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-10α), 1.69–1.72 (1H, m, H-9β), 1.77–1.81 (1H, m, H-9α), 1.93–1.97 (2H, m, H-6β), 2.11–2.14 (2H, m, H-6α), 2.81 (1H, dt, J = 4.6, 12.6 Hz, H-5α), 3.16 (1H, dt, J = 4.9, 13.6 Hz, H-5β), 3.45–3.71 (4H, m, H-2', H-3', H-4', and H-5'), 3.73 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.76–3.78 (1H, m, H-8α), 3.79–3.80 (1H, m, H-8β), 3.87–3.89 (1H, m, H-6'α), 4.52–4.54 (1H, m, H-6'β), 4.56–4.94 (8H, m, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.84 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-1'), 4.95 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-7), 5.82 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-1), 7.21–7.35 (20H, m, Ar of Bn), 7.48 (3H, s, H-3); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ 19.3 (C-10), 26.6 (C-5β), 29.8 (C-6β), 30.4 (C-5α), 32.7 (C-6α), 39.8 (C-9), 51.5 (COOCH<sub>3</sub>), 68.8 (C-6'), 72.9 (C-8), 75.7 (C-2'), 73.7, 75.1, 75.2, and 75.8, (4C, Ph-CH<sub>2</sub>), 77.8 (C-4'), 82.1 (C-5'), 84.7 (C-3'), 95.1 (C-7), 96.1 (C-1), 99.3 (C-1'), 111.1 (C-4), 127.6–128.5 (20C, Ar of Bn), 138.2–138.7 (4C, Ar of Bn), 153.2 (C-3), 167.0 (C=O); [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> –36.0 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>); FABMS *m/z* 767 [M+H]<sup>+</sup>.
23. *Procedure for synthesis of 2',3',4',6'-tetra-O-benzyl-7-O-cinnamoylmorroniside (5):* A solution of **4** (50.0 mg, 0.0652 mmol) in anhydrous THF (2.0 ml) containing cinnamoylchloride (26.2 mg, 0.157 mmol), triethylamine (27.3 μl, 0.196 mmol), and *N,N*-dimethylaminopyridine (8.0 mg, 0.0655 mmol) stirred at 60 °C for 5 h. The resultant solution was concentrated in vacuo to obtain a residue; this residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/*n*-hexane = 1:4–1:3) to afford **5** (58.5 mg, 79%) as a white amorphous solid. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz): δ 1.37 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-10β), 1.46 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-10α), 1.78–1.81 (1H, m, H-9β), 1.85–1.88 (1H, m, H-9α), 2.04–2.08 (2H, m, H-6β), 2.17–2.20 (2H, m, H-6α), 2.94 (1H, dt, J = 4.8, 12.8 Hz, H-5α), 3.20 (1H, dt, J = 4.8, 13.2 Hz, H-5β), 3.46–3.69 (4H, m, H-2', H-3', H-4', and H-5'), 3.71–3.72 (1H, m, H-8α), 3.74 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.77–3.81 (1H, m, H-8β), 4.05 (1H, dd, J = 2.1, 9.0 Hz, H-6'α), 4.41 (1H, dd, J = 2.7, 7.5 Hz, H-6'β), 4.58–4.97 (8H, m, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.85 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-1'), 5.85 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-1α), 5.90 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-1β), 5.93 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-7), 6.31 (1H, d, J = 15.5 Hz, H-8''), 7.16–7.43 (25H, m, Ar), 7.52 (3H, s, H-3), 7.68 (1H, t, J = 15.5 Hz, H-7''); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz): δ 19.3 (C-10), 26.6 (C-5β), 29.8 (C-6β), 30.4 (C-5α), 32.7 (C-6α), 39.8 (C-9), 51.5 (COOCH<sub>3</sub>), 68.8 (C-6'), 72.9 (C-8), 75.7 (C-2'), 73.7, 75.1, 75.2, and 75.8, (4C, Ph-CH<sub>2</sub>), 77.8 (C-4'), 82.1 (C-5'), 84.7 (C-3'), 95.1 (C-7), 96.1 (C-1), 99.3 (C-1'), 111.1 (C-4), 112.5 (C-8''), 127.6–128.5 (24C, Ar of Bn, C-2'', C-3'', C-5'', and C-6''), 131.6 (C-4''), 136.0 (C-1''), 138.2–138.7 (4C, Ar of Bn), 140.4 (C-7''), 153.2 (C-3), 165.3 (C-9''), 167.0 (C=O); FABMS *m/z* 880 [M+H–H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.
24. Nicolaou, K. C.; Pavia, M. R.; Seitz, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2027.
25. Williams, D. R.; Brown, D. L.; Benbow, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1923.
26. Chong, J. M.; Sokoll, K. K. *Org. Prep. Proced. Int.* **1993**, *25*, 639.
27. Heathcock, C. H.; Ratcliffe, R. J. *Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1746.
28. Ikemoto, N.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2524.
29. *Procedure for synthesis of 7-O-cinnamoylmorroniside (6):* A solution of **5** (5.0 mg, 0.00574 mmol) in 1.65 ml of 1,2-dichloroethane and H<sub>2</sub>O = (10:1) containing 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (25.2 mg, 0.111 mmol) was stirred at room temperature for 4 days. The resultant solution was partitioned with EtOAc, washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> aq, NaHSO<sub>4</sub> aq, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo to obtain a residue; this residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/*n*-hexane = 1:3–1:1 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 10:1–10:2) to afford **6** (1.9 mg, 64%) as a white amorphous solid. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>OD, 600 MHz): δ 1.30 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-10β), 1.36 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-10α), 1.68–1.72 (1H, m, H-9β), 1.74–1.78 (1H, m, H-9α), 1.87–1.91 (2H, m, H-6β), 2.01–2.04 (2H, m, H-6α), 2.82 (1H, dt, J = 4.1, 12.4 Hz, H-5α), 3.18 (1H, t, J = 8.6 Hz, H-5β), 3.26–3.49 (4H, m, H-2', H-3', H-4', and H-5'), 3.72 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.86 (1H, dd, J = 2.0, 6.3 Hz, H-8α), 3.94 (1H, dd, J = 2.0, 6.3 Hz, H-8β), 4.09 (1H, dd, J = 6.9, 14.3 Hz, H-6'α), 4.52–4.56 (1H, m, H-6'β), 4.82 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-1'), 5.82 (1H, d, J = 9.2 Hz, H-1α), 5.87 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-1β), 5.96 (1H, d, J = 12.4 Hz, H-7), 6.36 (1H, d, J = 14.9 Hz, H-8''), 7.24–7.31 (3H, m, H-3'', H-4'', H-5''), 7.37 (d, J = 6.9 Hz, H-2'', H-6''), 7.51 (3H, s, H-3), 7.60 (1H, t, J = 14.9 Hz, H-7''); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz): δ 19.9 (C-10), 27.5 (C-5β), 32.0 (C-5α), 34.5 (C-6β), 37.2 (C-6α), 40.2 (C-9α), 41.0 (C-9β), 51.8 (COOCH<sub>3</sub>), 62.8 (C-6'), 66.0 (C-8β), 71.7 (C-2'), 74.0 (C-4'), 75.6 (C-8α), 77.6 (C-5'), 78.4 (C-3'), 96.0 (C-7), 97.1 (C-1), 100.1 (C-1'), 111.4 (C-4), 112.3 (C-8''), 128.5 (C-2''), C-6''), 129.2 (C-3'', C-5''), 131.4 (C-4''), 135.7 (C-1''), 140.1 (C-7''), 154.4 (C-3), 165.4 (C-9''), 168.6 (C=O); [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> –11.2 (c 1.0, MeOH); FABMS *m/z* 519 [M+H–H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.
30. *ELISA analysis:* For quantification of E-selectin protein expression, an ELISA-based method was used. 4 × 10<sup>4</sup> cells of HUVEC were seeded into a 96-well microtiter plate and grown with EBM-2 overnight. Medium was replaced to DMEM before the cells were pretreated with 10 ng/ml of TNF-α. Two hours after the addition of TNF-α, the medium was removed and the cell layer was washed three times with ice-cold PBS/1% BSA and fixed with 4% paraformaldehyde phosphate buffer. After being washed with PBS five times, the cells were incubated with PBS/1% BSA for 60 min. After being washed with PBS three times, the cells were incubated with an anti-E-selectin antibody at 4 °C overnight (1:1000 in PBS/1% BSA). After being washed with PBS three times, the AP-conjugated secondary antibody (1:500 in PBS/1% BSA) was added for 120 min. After the addition of *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) solution, the enzymatic reaction was allowed to proceed for 60 min at room temperature; the optical density (OD: 405 nm) was measured using the ELISA plate reader. At least three independent experiments (each performed in triplicate) were used for the statistical interpretation of the data (means ± SEM).
31. Recio, M. C.; Giner, R. M.; Manez, S.; Rios, J. L. *Planta Med.* **1994**, *60*, 232.

# ***Porphyromonas gingivalis* is widely distributed in subgingival plaque biofilm of elderly subjects**

**Yuki Abiko, Takuichi Sato, Kenji Matsushita, Reiko Sakashita, and Nobuhiro Takahashi**

**Abstract.** The frequency of periodontal diseases appears to increase with age. *Porphyromonas gingivalis* is widely regarded as major periodontal pathogens. This study aimed to quantify *P. gingivalis* in subgingival plaque biofilm of elderly subjects by real-time polymerase chain reaction (PCR). Subgingival plaque was obtained from 198 periodontally healthy (mean age, 70.3 years) and 176 subjects with periodontitis (70.6 years). Quantification of total bacteria and *P. gingivalis* was performed by real-time PCR using universal and *P. gingivalis*-specific primers based on 16S rRNA genes, respectively. Both the detection frequency and mean proportion of *P. gingivalis* were significantly higher in subjects with periodontitis than in periodontally healthy subjects ( $p < 0.0001$ ). Nevertheless, *P. gingivalis* was detected frequently both from subjects with periodontitis and periodontally healthy subjects. These results suggest that *P. gingivalis* is widely distributed in subgingival plaque biofilm of elderly subjects.

**Key words.** elderly subjects, plaque biofilm, *Porphyromonas gingivalis*, quantitative polymerase chain reaction, 16S ribosomal RNA

## **1 Introduction**

Qualitative and quantitative changes of the subgingival plaque biofilm microflora in periodontal pockets are thought to be associated with the development and progression of periodontitis. The frequency of periodontal diseases appears to increase

---

Y. Abiko (✉), T. Sato, and N. Takahashi  
Division of Oral Ecology and Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry,  
Sendai 980-8575, Japan  
e-mail: abiko@mail.tains.tohoku.ac.jp

K. Matsushita  
Department of Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology,  
Obu, Aichi 474-8522, Japan

R. Sakashita  
Nursing Foundation, College of Nursing Art and Science, University of Hyogo,  
Akashi 673-8588, Japan

with age. However, few studies have been investigated on subgingival microflora in elderly subjects. *Porphyromonas gingivalis* is widely regarded as major periodontal pathogens. This study aimed to quantify *P. gingivalis* in subgingival plaque biofilm of elderly subjects by real-time polymerase chain reaction (PCR).

## **2 Relationship Between Periodontal Status and *P. gingivalis* in Subgingival Plaque Biofilm of Elderly Subjects**

Subgingival plaque was obtained from independent elderly subjects (60 years and over,  $n=374$ ) from gingival crevices with the deepest probing depths. Gender, probing depth, bleeding on probing (BOP) and wearing of denture were examined and recorded. Quantification of total bacteria and *P. gingivalis* was performed by real-time PCR using universal and *P. gingivalis*-specific primers based on 16S rRNA genes [1], respectively. According to the deepest probing depths, 198 (mean age, 70.3 years) were considered as periodontally healthy, while 176 (70.6 years) were considered as subjects with periodontitis. Both the detection frequency and mean proportion of *P. gingivalis* were significantly higher in subjects with periodontitis than in periodontally healthy subjects ( $p<0.0001$ ). The proportion of *P. gingivalis* was significantly higher in subjects with BOP-positive ( $p<0.05$ ), but not related to subjects' gender, wearing of denture and age.

## **3 Inhabitation of *P. gingivalis* in Subgingival Plaque of Elderly Subjects**

It has been reported that *P. gingivalis* is generally detected from subjects with periodontitis [1, 2]. However, in this study, *P. gingivalis* was detected frequently both from subjects with periodontitis and periodontally healthy subjects, suggesting that the inhabitation of *P. gingivalis* is a specific feature of subgingival plaque biofilm of elderly subjects. Amano et al. [3] reported that the pathogenicity of *P. gingivalis* was different among strains, suggesting the possibility that low pathogenic *P. gingivalis* strains colonized in periodontally healthy elderly subjects in this study.

## **4 Clinical Implication**

This study suggests that the inhabitation of *P. gingivalis* in subgingival plaque biofilm of elderly subjects is one of the risk factors of periodontitis, as well as the decrease of host defense mechanism with age, although further study is required to elucidate the pathogenicity of *P. gingivalis* found in periodontally healthy elderly

subjects. The findings of this study support the necessity and importance of periodontal control, especially in elderly subjects.

## References

1. Abiko Y, Sato T, Mayanagi G et al (2010) Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodontal Res* 45 (in press)
2. Kuboniwa M, Amano A, Kimura RK et al (2004) Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol* 19:168–176
3. Amano A, Nakagawa I, Kataoka K et al (1999) Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol* 37:1426–1430