歯周病原菌の酵素活性を指標とした迅速診断法 (SK-013)

—細菌叢における *B. gingivalis*, *B. forsythus*, *T. denticola* との関連性—

清 田 築 斎 藤 淳 山 田 了
角 田 正 健 佐 藤 徹一郎 石 原 和 幸*
内 藤 祐 子* 高 添 一 郎* 奥 田 克 爾*

東京歯科大学歯科保存学第二講座

(主任：佐藤徹一郎)

*東京歯科大学微生物学講座

(主任：高添一郎)

(平成元年12月20日受付)

A Rapid Diagnosis (SK-013) for Periodontitis Based on the Enzymatic Activity of Periodontopathic Bacteria

The Relationship between the Enzymatic Activity (SK-013) and *B. gingivalis*, *B. forsythus*, *T. denticola* in Subgingival Microflora

Kizuku SEIDA, Atsushi SAITO, Satoru YAMADA, Masatake TSUNODA,
Tetsuichiro SATO, Kazuyuki ISHIHARA*, Yuko NAITO*,
Ichiro TAKAZOE* and Katsuji OKUDA*

Department of Periodontics, Tokyo Dental College

1-2-2 Masago, Chiba-City Chiba 260, JAPAN

(Chief : Prof. Tetsuichiro SATO)

*Department of Microbiology, Tokyo Dental College

(Chief : Prof. Ichiro TAKAZOE)

SK-013 was developed for rapid detection of the peptidase activity in subgingival plaque samples. The purpose of this study was to determine whether SK-013 could be a marker for the presence of periodontopathic bacteria including *Treponema denticola*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides forsythus* which produce trypsin-like enzyme.

Subgingival plaque samples were taken with 3 paper points from 10 clinically healthy sites and 30 periodontal diseased sites. The SK-013 activity of plaque sample was assayed and the cells of *T. denticola*, *B. gingivalis* and *B. forsythus* in the sample

were counted by immunofluorescence technique. In diseased sites, both the SK-013 activity and the cell counts of these organisms were significantly higher than those in healthy sites. The proportions and cell counts of these organisms and the SK-013 activity were closely correlated with clinical parameters including Gingival Index, Plaque Index, and Probing depth. The correlation between the presence of these organisms and the SK-013 activity was significant. Correlation coefficients between the presence of *T. denticola* and the SK-013 activity were higher than those of others.

図 1 実験のプロトコル

1 ml 滅菌 PBS とガラスビーズの入ったバイアル瓶に移した。30 秒間 Vortex mixer にて分散後、0.5 ml を酵素活性測定に、残りを EKDS 算定板 (Bacteria 用、萱垣医理科工業 KK, 東京) を用いた菌数の算定と蛍光抗体法による特定菌種の検出に用いた。

3. 臨床的診査項目

試料採取後、各被験歯について表 1 に示す項目について調べた。Probing depth は Williams 型プローベを用いて手圧にて 6 点法で測定し、mm 単位で表した。歯齦の炎症程度は Løe & Silness¹⁷⁾ の Gingival index を、プラークの付着状態は Silness & Løe¹⁸⁾ の Plaque index の基準にしたがい 6 歯面測定した。Bleeding on probing は、probing 後 30 秒以内に出血をきたしたものを陽性として 6 部位測定した。

4. 酵素活性測定法

酵素活性測定は、SK-013 を用いた。すなわち、基質として CBz-Gly-Gly-Arg-DBHA, 酸化酵素 (Ascorbate oxidase : AOD) と色原体 (MCDP) を共存させた酵素活性測定液 0.5 ml によく分散した試料 0.5 ml を添加し、37°C, 15 分間で incubate 後、分光光度計 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) を用いて 666 nm でその吸光度を測定した。

本酵素活性値は、標準曲線から試料 1 ml あたりの trypsin unit (Try U/ml) に換算して表した。

5. 蛍光抗体法による *B. gingivalis*, *B. forsythus*, *T. denticola* 菌種の検出

蛍光抗体法による特定 3 菌種の検出は、清田¹⁰⁾の方法に準じて行った。すなわち、よく分散した試料を無蛍光スライドガラスに 10 μ l のせ、乾燥し蛍光抗体染色用試料とした。

B. gingivalis は、*B. gingivalis* 381 に対する直接蛍光抗体法を用い、*B. forsythus* は、*B. forsythus* ATCC 43037 に対するウサギ抗血清を、*T. denticola* は ATCC 35404 に対するウサギ抗血清を 1 次抗体として、Goat

表 1 臨床診査項目

プラークの付着状態	Plaque index (Silness & Løe)
歯齦の炎症状態	Gingival index (Løe & Silness)
Probing depth (PD)	
Bleeding on probing (BOP)	

表 2 抗 *T. denticola* 抗体の特異性

菌株名	抗 <i>T. denticola</i> (35404) 抗体
<i>T. denticola</i> 33520	+
35404	+
35405	+
<i>T. socranskii</i> 35534	—
35535	—
35536	—
<i>T. vincentii</i> 35580	—
<i>T. pectinovorum</i> 33768	—

anti-rabbit IgG FITC conjugate (Sigma, No. F-6005, St. Louis, MO, U.S.A.) を 2 次抗体として用いて間接法で調べた。染色後、落射型蛍光顕微鏡 (Nikon, Microphoto FX, 東京) にて検鏡した。

3 視野中で観察された特異蛍光の菌数をその総菌数で除して各菌種の試料中の割合とした。また、試料中の割合に EKDS 算定板を用いた菌数の算定結果を乗じて、それらの細菌数とした。

6. 統計学的処理

群間の比較には Wilcoxon の順位と検定および χ^2 検定を用いた。酵素活性値と各評価項目との単相関係数は t 分布にもとづき有意性を検討した。また、酵素活性値と特定 3 菌種間の線形モデルは重回帰分析により適合させた。

結 果

1. 蛍光抗体法の特異性試験

歯周局所の *B. gingivalis* と *B. forsythus*, および *T. denticola* の検索に用いた各抗体の特異性試験の結果を表 2, 3 に示した。抗 *T. denticola* ATCC 35404 抗体は口腔内 *Treponema* 属 4 菌種 8 株のうち *T. denticola* 3 株のみに陽性反応を示した。また、抗 *B. gingivalis* 381 抗体と抗 *B. forsythus* ATCC 43037 抗体についてグラム陽性および陰性の 110 菌株について検索したところ同菌種の供試株とのみに陽性反応を示し、各抗体とも菌種特異性が高かった。

表 3 抗 *B. gingivalis*, *B. forsythus* 抗体の特異性

菌株名	抗 <i>B. gingivalis</i> (381) 抗体	抗 <i>B. forsythus</i> (43037) 抗体
<i>B. gingivalis</i> 381	+	—
33277	+	—
W50	+	—
W83	+	—
Ando	+	—
1021	+	—
11	+	—
16-1	+	—
F-1	+	—
I-2	+	—
A7A1-28	+	—
S-2	+	—
<i>B. forsythus</i> 43037	—	+
Choi	—	+
その他 (96菌株)	—	—

表 4 被験歯の臨床診査所見

診査項目	罹患群	対照群	群間差
PII・A	1.32±0.60	0.27±0.37	a
PII・S	1.37±0.77	0.20±0.42	a
GI・A	1.63±0.26	0.35±0.35	a
GI・S	2.00±0.26	0.40±0.52	a
PD・A (mm)	4.71±1.18	2.12±0.35	a
PD・S (mm)	6.90±1.61	2.30±0.48	a
BOP・T	29/30	0/10	b
BOP・S	29/30	0/10	b

a : $p < 0.01$ Wilcoxon の順位検定b : $p < 0.01$ χ^2 検定

2. 被験歯の臨床診査所見

罹患群と対照群の各臨床診査所見を表4に示した。PII・Aは全ての被験歯面あたりの平均値を示し、PII・Sは試料採取部位の平均値を示した。GI, PD, BOPも同様に表した。また、BOP・Tは被験歯あたりの出血率を示した。罹患群はPII・Sは1.37, GI・Sは2.00, PD・Sは6.90 mmでBOP・Sは30部位中29部位が陽性であった。対照群のPII・Sは0.20, GI・Sは0.40, PD・Sは2.30 mmでBOP・Sはすべて陰性であった。全ての診査項目は、両群間に有意な差が認められた。

3. 罹患群と対照群の酵素活性値と特定3菌種の菌叢

罹患群と対照群の酵素活性値と*B. gingivalis*, *B. forsythus*, *T. denticola*の菌叢を表5に示した。罹患群、対照群の酵素活性値は、それぞれ1.084, 0.105 (Try U/

ml)で両群間に有意な差がみられた。

B. gingivalis, *B. forsythus* および *T. denticola* の菌叢に占める割合は、罹患群と対照群でそれぞれ5.3と0.0%, 3.4と0.1%, 5.1と0.2%で、両群間に有意な差がみられた。また、各菌種の1 mlあたりの菌数および検出率にも両群間に有意な差がみられた。

4. 特定3菌種と臨床所見との関連性

B. gingivalis, *B. forsythus* および *T. denticola* の菌叢に占める割合、菌数とすべての臨床診査項目とのあいだに有意な相関がみられた(表6)。

5. 臨床所見と酵素活性値との関連性

全ての臨床診査項目と酵素活性値との間には有意な相関がみられた。特にGI・Aと酵素活性値との相関係数は0.708, GI・Sとは0.643, PD・Aとは0.712, PD・Sとは0.723と高い相関を示した(表7)。

6. 特定3菌種と酵素活性値との関連性

B. gingivalis, *B. forsythus* および *T. denticola* の菌叢に占める割合、菌数と酵素活性値との間に有意な相関がみられた。特に*T. denticola*の割合、菌数と酵素活性値間には相関係数0.606, 0.630と高い相関がみられた(表8)。

酵素活性値と3菌種の菌数との関係を重回帰分析したところ、その決定係数(相関係数)は0.618で、*T. denticola*と*B. gingivalis*および*B. forsythus*の酵素活性値に対する標準化偏回帰係数はそれぞれ0.493, 0.114, 0.129を示した(表9)。

表 5 歯周疾患罹患群と対照群の酵素活性値と特定 3 菌種の菌叢

検査項目	罹患群 (n=30)	対照群 (n=10)	群間差
SK-013 (Try U/ml)	1.084±0.494	0.105±0.068	a
<i>T. denticola</i> (%)	5.1±3.8	0.2±0.3	a
<i>B. gingivalis</i> (%)	5.3±3.9	0.0±0.0	a
<i>B. forsythus</i> (%)	3.4±1.5	0.1±0.2	a
<i>T. denticola</i> ($\times 10^6$ /ml)	5.69±3.83	0.04±0.09	a
<i>B. gingivalis</i> ($\times 10^6$ /ml)	6.59±5.84	0.00±0.00	a
<i>B. forsythus</i> ($\times 10^6$ /ml)	3.92±2.21	0.03±0.08	a
<i>T. denticola</i> (検出率)	30/30	2/10	b
<i>B. gingivalis</i> (検出率)	27/30	0/10	b
<i>B. forsythus</i> (検出率)	30/30	2/10	b

a : $P < 0.01$ Wilcoxon の順位検定b : $P < 0.01$ χ^2 検定

表 6 3 菌種と臨床所見との相関性

(n=40)						
菌種	PII・A	PII・S	GI・A	GI・S	PD・A	PD・S
<i>T. denticola</i> (%)	0.518**	0.485**	0.555**	0.503**	0.648**	0.538**
<i>B. gingivalis</i> (%)	0.634**	0.563**	0.538**	0.562**	0.631**	0.621**
<i>B. forsythus</i> (%)	0.616**	0.585**	0.657**	0.670**	0.714**	0.718**
<i>T. denticola</i>	0.564**	0.515**	0.616**	0.570**	0.627**	0.567**
<i>B. gingivalis</i>	0.486**	0.404*	0.439**	0.533**	0.498**	0.498**
<i>B. forsythus</i>	0.440**	0.436**	0.555**	0.610**	0.546**	0.612**

* : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

表 7 臨床所見と酵素活性値との相関性 (n=40)

診査項目	相関係数
PII・A	0.455**
PII・S	0.393*
GI・A	0.708**
GI・S	0.643**
PD・A	0.712**
PD・S	0.723**

* : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

表 8 3 菌種と酵素活性値との相関性 (n=40)

菌種	相関係数
<i>T. denticola</i> (%)	0.606**
<i>B. gingivalis</i> (%)	0.573**
<i>B. forsythus</i> (%)	0.576**
<i>T. denticola</i>	0.630**
<i>B. gingivalis</i>	0.477**
<i>B. forsythus</i>	0.501**

** : $p < 0.01$

考 察

歯周疾患の発症に特定のグラム陰性菌が密接に関与していることが明らかになってきてから、歯周疾患の診断や治療にあたり歯周局所の細菌学的検査が行われるようになってきた^{19,20)}。特に、菌種に特異的な酵素活性を利用した細菌検出法は簡便かつ迅速な方法として注目され

ている²¹⁾。

Syed ら²²⁾は、深さが 5 mm 以上の歯周ポケットより採取したサンプルの 85% に trypsin-like enzyme 活性があることを報告している。

次いで Loesche ら¹⁴⁾は様々な病態の歯周疾患患者からのプラーク試料の BANA 加水分解活性を測定し、全てのサンプル中の 53% に BANA 加水分解活性が認められ、そのうち *T. denticola* が 93% のサンプルで検出さ

表 9 酵素活性値と3菌種との重回帰分析

$$Y = aX_1 + bX_2 + \dots + C$$

酵素活性値 = $0.724 \times T. denticola$ 数 + $0.119 \times B. gingivalis$ 数 + $0.304 \times B. forsythus$ 数 + 0.381

決定係数
0.618

菌種	標準化偏回帰係数	F %点
<i>T. denticola</i>	0.493	99.6
<i>B. gingivalis</i>	0.114	44.4
<i>B. forsythus</i>	0.129	47.6

れ、*B. gingivalis*, *Capnocytophaga* はそれぞれ 27%, 6% しか検出されず、歯齦縁下プラークの *Spirochete* の存在と本活性に関連があることを報告した。彼らは、Probing depth の増加にともない BANA 加水分解活性の陽性部位が多くなる事実は、ポケットが深くなり酸素濃度の低下で *Spirochetes* 菌数の増加がもたらされるためと説明している。しかし、彼らの研究では、*B. gingivalis*, *Capnocytophaga* と BANA 加水分解活性との関係が明確ではなかった。

彼らの別の研究²³⁾では、BANA 加水分解活性を測定する Perioscreen Test の結果は、ELISA 法による *T. denticola* と *B. gingivalis* の検出結果や臨床診察所見と関連することを報告している。

Bretz ら²⁴⁾は歯齦縁下プラークの BANA 加水分解活性と *T. denticola* と *B. gingivalis* の存在を間接蛍光抗体法で検索し、健康な部位では 19 部位のうち 1 部位も BANA 加水分解活性がみられないが、罹患した 27 部位のうち 18 部位 (67%) で本活性がみられ、そのすべてで *T. denticola* または *B. gingivalis* が検出されたことから本活性に *T. denticola* と *B. gingivalis* の存在が関係することを報告している。

本研究では CBZ-Gly-Gly-Arg-DBHA を基質として用いて開発された SK-013 を用い、歯周局所材料中のペプチダーゼ活性を調べた。罹患群から採取した材料中の本活性値は、1.084 (Try U/ml)、対照群の活性値は 0.105 (Try U/ml) を示した。この結果は、SK-013 活性値をもとにして歯周炎罹患歯と健康歯とを明確に区別可能であることを示している。

今回我々は、*B. gingivalis*, *B. forsythus* および *T. denticola* の菌叢に占める割合、それらの菌数が各臨床所見と有意な相関性を示すことを明確にし、SK-013 活性がこの 3 菌種由来のペプチダーゼ活性を反映することも明らかにした。3 菌種の割合、菌数とも SK-013 活性と、有意な相関関係が認められた。特に高い相関関係を

示したのは *T. denticola* の菌数 ($r=0.630$) ならびに菌叢に占めるその割合 ($r=0.606$) であった。

また、重回帰分析による SK-013 活性と 3 菌種の菌数との関連性では *T. denticola* の本活性に対する標準化偏回帰係数は 0.493 と高く、次いで *B. forsythus* 0.129, *B. gingivalis* 0.114 であった。

また、本研究におけるそれらの菌の検出結果は、*T. denticola* と *B. gingivalis* の同定を蛍光抗体法や ELISA 法を用いて行った Bretz ら²⁴⁾や Loesche ら²³⁾の研究結果と類似している。ただし、本酵素活性値と 3 菌種の菌数との重回帰分析による決定係数は 0.618 であり、3 菌種のみが本活性に関与しているとはいえない。すなわち、本活性が認められた他の細菌たとえば *Capnocytophaga* などの関与も考えられる。Loesche ら¹⁴⁾は、BANA 加水分解活性と中型や大型の *spirochete* との関連性を示唆している。

以上のように SK-013 活性は、歯周局所の *B. gingivalis*, *B. forsythus* および *T. denticola* の存在と密接に関連していることが示唆された。SK-013 の incubate 時間は 15 分間と短時間なため、これら歯周疾患関連細菌の動態を簡便かつ迅速にチェアサイドでモニターする簡易同定試薬として有効であると思われる。今後、さらに歯周治療効果の判定やメンテナンスの良否に本検査法を組み込んだ長期的な検討を計画している。

結 論

T. denticola, *B. gingivalis*, *B. forsythus* が特異的に産生するペプチダーゼ活性を短時間で測定できる SK-013 活性が歯周局所の *T. denticola*, *B. gingivalis*, *B. forsythus* の存在を知るマーカーとなりうるかを検討するため、歯周炎罹患群と対照群の歯周局所の SK-013 活性、3 菌種の動態を検索し、次のような結論を得た。

1) 歯周炎罹患群と対照群間には GI, PII, Probing depth (PD), Bleeding on probing (BOP) の各臨床診査項目について有意な差がみられた。

2) *T. denticola*, *B. gingivalis*, *B. forsythus* の菌叢に占める割合と菌数は、GI, PII, PD, BOP の各臨床診査項目との間に有意な相関性が認められた。

3) GI, PII, PD の臨床診査項目と SK-013 活性との間に有意な相関性が認められた。特に PD, GI との相関性が高かった。

4) *T. denticola*, *B. gingivalis*, *B. forsythus* の菌叢に占める割合、菌数と、SK-013 活性との間に有意な相

関性がみられ、とくに *T. denticola* との相関性が高かった。

5) SK-013 活性と3菌種の菌数との関係を重回帰分析したところ、*T. denticola* の関与が最も大きいことが示唆された。

6) SK-013 活性は歯周局所の *T. denticola*, *B. gingivalis*, *B. forsythus* の存在と関連し、3菌種のマーカーとなりうる。

謝 辞

実験に供した SK-013 を供試いただいたサンスター株式会社の協力に感謝します。

文 献

- 1) Slots, J. : The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. Scand. J. Dent. Res., 85 : 114-121, 1977.
- 2) Slots, J. : Subgingival microflora and periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 6 : 351-382, 1979.
- 3) Tanner, A.C.R., Haffer, C., Bratthall, G.T., Visconti, R.A. and Socransky, S.S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J. Clin. Periodontol., 6 : 278-307, 1979.
- 4) Loesche, W.J., Syed, S.A., Schmidt, E. and Morrison, E.C. : Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J. Periodontol., 56 : 447-456, 1985.
- 5) Dzink, J.L., Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. : The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 15 : 316-323, 1988.
- 6) Haffajee, A.D., Socransky, A.A., Dzink, J.L., Taubman, M.A. and Ebersole, J.L. : Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 15 : 390-398, 1988.
- 7) Choi, J.I., Nakagawa, T., Yamada, S., Takazoe, I. and Okuda, K. : Clinical, microbiological and immunological studies on recurrent periodontal disease. J. Clin. Periodontol., (in press)
- 8) Listgarten, M.A., Lindhe, J. and Hellden, L. : Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. Clinical, microbiological, and histological observations. J. Clin. Periodontol., 5 : 246-271, 1978.
- 9) Slots, J., Mashimo, P., Levine, M.J. and Genco, R.J. : Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. J. Periodontol., 50 : 495-509, 1979.
- 10) 清田 築 : 蛍光抗体法による歯周炎局所細菌叢の検討および初期治療効果の評価について. 日歯周誌, 31 : 29-42, 1989.
- 11) Polson, A.M. and Goodson, J.M. : Periodontal diagnosis. Current status and future needs. J. Periodontol., 56 : 25-34, 1985.
- 12) Laughon, B.E., Syed, S.A. and Loesche, W.J. : API ZYM System for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp. and spirochetes of oral origin. J. Clin. Microbiol., 15 : 97-102, 1982.
- 13) Tanner, A.C.R., Strzempko, M.W., Belsky, C.A. and McKinley, G.A. : API-ZYM and API-ANADENT reactions of fastidious gram negative species. J. Clin. Microbiol., 22 : 333-335, 1985.
- 14) Loesche, W.J., Syed, S.A. and Stoll, J. : Trypsin-like activity in subgingival plaque. A diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease ? J. Periodontol., 58 : 266-273, 1987.
- 15) Suido, H., Zambon, J.J., Mashimo, P.A., Dunford, R. and Genco, R.J. : Correlations between gingival crevicular fluid enzymes and subgingival microflora. J. Dent. Res., 67 : 1070-1074, 1988.
- 16) 石原和幸, 内藤祐子, 加藤哲男, 高添一郎, 奥田克爾, 江口 徹, 中島光一, 松田尚樹, 山崎恭子, 長谷川健二, 水道裕久, 杉原邦夫 : 歯周病原菌の酵素活性を指標とした迅速診断法. SK-013 の特性と酵素特異性の検討. 日歯周誌, 32 : 224-232, 1990.
- 17) Le, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I. prevalence and severity. Acta

- Odontol. Scand., 21 : 533-551, 1963.
- 18) Silness, J. and Le, H. : Periodontal disease in pregnancy. II. correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol. Scand., 22 : 121-135, 1964.
 - 19) 高添一郎 : 歯周病診断のための臨床検査システムの確立. 歯医学誌, 7 : 86-102, 1988.
 - 20) 村山洋二 : 歯周病の臨床に応用できる嫌気性細菌検査システムの確立. 歯医学誌, 6 : 56-74, 1987.
 - 21) Loesche, W.J. : The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. Oral Microbiol. Immunol., 1 : 65-70, 1986.
 - 22) Syed, S.A., Gusberti, F.A., Loesche, W.J. and Lang, N.P. : Diagnostic potential of chromogenic substrates for rapid detection of bacterial enzymatic activity in health and disease associated periodontal plaques. J. Periodont. Res., 19 : 618-621, 1984.
 - 23) Loesche, W.J., Bretz, W., Clark, W., Killoy, W., Rau, C., Weber, H.P. and Lopatin, D. : Detection of *T. denticola* and *B. gingivalis* in plaque with Perioscreen. J. Dent. Res. abstract 482, 68 : 241, 1989.
 - 24) Bretz, W.A., Lopatin, D., Hujoel, P., Taylor, C. and Loesche, W.J. : BANA hydrolysis and *T. denticola* and/or *B. gingivalis* in periodontal plaques. J. Dent. Res. abstract 481, 68 : 241, 1989.

連絡先 :

東京歯科大学歯科保存学第二講座

〒 260 千葉県千葉市真砂 1-2-2