歯肉炎における *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* および *Porphyromonas gingivalis* の分離頻度および分布様式

石川 博之^{*1} 岡本 公彰^{*2}

^{*1}鶴見大学歯学部第2 歯科保存学教室

^{*2}鶴見大学歯学部口腔細菌学教室

(1999 年 7 月 10 日受理)

Incidence and Distribution of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis* Isolated from Gingivitis

Hiroyuki Ishikawa^{*1} and Masaaki Okamoto^{*2}

^{*1}Department of Periodontics and Endodontics,

^{*2}Department of Oral Bacteriology, Tsurumi University School of Dental Medicine

Accepted for publication 10 July 1999

Clinical evaluation was performed on 6 teeth in 18 generally healthy subjects. They were divided into the following 3 groups: healthy subjects, healthy sites and active sites of gingivitis. A total of 108 dental crevices or periodontal pocket samples were analyzed microbiologically.

The total number of cultivable bacteria, the number of black-pigmented anaerobic rods (BPRs), and the percentage of BPRs to the total number of bacteria in the active gingivitis sites (31 sites) were significantly higher ($p < 0.05$) than in those of the healthy subjects (36 sites) and in those of the healthy sites of gingivitis (41 sites). The percentage of *Prevotella intermedia* to the total number of BPRs in the healthy and active sites of gingivitis were 38.1 and 34.2%, respectively, and were higher than in the healthy subjects (7.1%). However, the percentage of *Prevotella nigrescens* to the total number of BPRs in the healthy and active sites of gingivitis were 18.6 and 24.3%, respectively, and were lower than in the healthy subjects (40.9%). The percentage *Porphyromonas gingivalis* to the total BPRs in the healthy and active sites of gingivitis were 0.2 and 5.2%, respectively, and this bacterium was not found in the healthy subjects. The numbers of *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *P. gingivalis* were the highest in the active site of gingivitis, and were higher in the healthy sites of gingivitis than in the healthy subjects.

Consequently, BPRs, especially, *P. intermedia* and *P. gingivalis* seemed to be the putative pathogens of gingivitis. These putative pathogens might be transmitted from the active to the healthy sites in gingivitis, because the numbers of *P. intermedia* and *P. gingivalis* in the healthy sites of the gingivitis were also higher than in the healthy subjects. J. Jpn. Soc. Periodontol., 41: 277~286, 1999.

Key words: gingivitis, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, multiplex PCR

要旨: 全身的に健康な成人 18 名を対象に、口腔内 6 歯の診査をし、健常者群、歯肉炎患者の健常部位群および歯肉炎部位の 3 群に分け、合計 108 部位の歯肉縁下プラークについて細菌学的検索を行った。その結果、歯肉炎患者群の歯肉炎部位 (31 部位) では総菌数、黒色集落形成性グラム陰性偏性嫌気性桿菌 (black-pigmented rods; BPRs) 数、および BPRs の総菌数に対する割合はいずれも健常者群 (36 部位) に比べ多く、その差は統計学的に有意 ($p < 0.05$) であった。また、歯肉炎患者群の健常部位 (41 部位) においても BPRs 数、BPRs の総菌数に対する割合は健常者群に比べ多く、その差は統計学的に有意 ($p < 0.05$) であった。

索引用語: 歯肉炎, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, multiplex PCR

緒 言

健康な被験者でも実験的に歯口清掃を停止すると、およそ3日後には歯肉炎が発症¹⁾するが、これはそのまま歯周炎に進展するわけではなく、起炎物質としてのプラークを除去することにより、もとの健康な歯肉の状態にもどる。以前はこのタイプの歯肉炎の原因は特定の細菌種というよりは、歯肉縁部のプラーク中の総菌数の増加によると考えられていたが、近年 *Prevotella intermedia*, *Actinomyces* 属、あるいは *Fusobacterium* 属など、特定の菌種との関係を示唆する報告が多くみられる²⁾。

一方、1980年代ごろから黒色集落形成性グラム陰性偏性嫌気性桿菌 (black-pigmented rods ; BPRs) である *Porphyromonas gingivalis* および *P. intermedia* と通性嫌気性グラム陰性桿菌の *Actinobacillus actinomycetemcomitans* などが歯周病原性のきわめて強い細菌種として認識され、この他にも *Bacteroides forsythus*, *Treponema* 属などが歯周病関連菌として知られている³⁾。

P. intermedia は健康な口腔に常在する BPRs であるという報告³⁻⁵⁾がある一方で、妊娠性歯肉炎^{6,7)}、急性壊死性潰瘍性歯肉炎⁸⁾、HIV 感染者におけるきわめて急性の転帰をとる歯肉炎⁹⁾などのさまざまな特殊な歯肉炎との関係を示唆する報告が多い。近年、DNA の類似性を基準にした細菌の系統分類法の変更から、従来言われていた *P. intermedia* は、*P. intermedia* および新しい種として提唱された *Prevotella nigrescens* に再分類され¹⁰⁾、この分類法に従い、さまざまな歯周組織の状態の被験者を対象にして、疫学的に両者の分離頻度を調べる報告が相次いでいる。その結果、小児¹¹⁾あるいは感染根管¹²⁾では *P. nigrescens* が *P. intermedia* より多く検出され、一方、歯周疾患の進行と共に *P. intermedia* が増加し、逆に *P. nigrescens* の占める割合が減少することが報告されている¹³⁾。我々も、さまざまな歯周組織の状態の被験者を対象に BPRs の分離頻度に関する研究を行い、健康な歯肉溝では *P. nigrescens* が *P. intermedia* より多く、成人性歯周炎の歯周ポケットでは逆に *P. intermedia* が多く分離されることを報告している¹³⁾。

本実験では Ramfjord¹⁴⁾ の代表歯 6 歯について、健康な歯肉溝あるいは歯肉炎に罹患していると思われる歯周ポケットにおける BPRs を 16 S rDNA の菌種特異部分を検出する multiplex PCR (polymerase chain reaction) 法を用いて同定し、とくに口腔内 BPRs の大部分を占める *P. intermedia* と *P. nigres-*

cens および *P. gingivalis* の分離頻度と分布状況を詳細に検討し、歯肉炎発症から歯周炎への移行の可能性を考察した。

材料および方法

1. 被験者および被験歯

被験者は、口腔衛生指導を受けたことのない、6 か月以内に抗生物質の投与されていない、全身的に健康で歯列不整が認められない本学学生 18 人 (男子 10 名、女子 8 名、平均年齢 20.8 歳) を対象とした。被験者には、インフォームドコンセントを十分に行い、同意を得た。Ramfjord¹⁴⁾ の代表歯 ($\frac{6}{4} \frac{1}{1} \frac{4}{6}$)、補綴処置の無い歯を被験歯として選択した。

2. プラーク採取方法

被験歯をロールワッテにて簡易防湿後、歯肉縁上プラークを除去した後、被験歯 6 部位の近心舌側の歯肉溝に滅菌ペーパーポイント # 40 (PIERCE, 東京) を 30 秒間挿入し、1 ml の GAM 液体培地 (ニッスイ, 東京) 中に入れ、以下に述べる細菌の分離および同定の試料とした。

3. 口腔内診査

口腔内診査は Probing Depth (PD), Riviere ら¹⁵⁾ の報告した Löe and Silness¹⁶⁾ の Gingival Index 変法による Gingival Index (GI) (表 1)、および clinical attachment loss について 6 点法で行った。PD の測定は TSP probe (Vivadent, Schaan, Lichtenstein)¹⁷⁾ を用い、プロービング圧が 20 g と一定になるように行った。

4. 細菌の分離および培養

採取した試料は、ソニケーター (Branson Ultrasonic Co., Danbury, U.S.A.) を用いて 30 秒間の超音波処理を行った後、サーモミキサーを用いて GAM 液体培地中に拡散した。GAM 液体培地を用いて連続 10 倍希釈にて 10^{-5} まで希釈し、各希釈液 100 μ l を 5% 綿羊脱繊維素血液 (日本バイオテスト研究所, 東京), 5 μ g/ml ヘミン (和光純薬, 大阪), および 1 μ g/ml メナジオン (和光純薬) 添加ブルセラ HK 寒

表 1 Gingival Index の診査基準

スコア	基 準
0	probing 後 10 秒以内に出血なし, 炎症なし
1	probing 後 10 秒以内に出血なし, 炎症あり
2	probing 後 10 秒以内に出血あり
3	probing 時に出血あり

Löe and Silness の Gingival Index 変法

天平板培地 (極東製薬工業, 東京) に塗抹し, 嫌気ボックス (MIP-1025, Forma Scientific Inc., Marietta, U.S.A.) にて N_2 80%, CO_2 10%, H_2 10% の条件下で7日間, $37^\circ C$ で培養を行った。試料採取より嫌気培養開始までは1時間以内に行った。嫌気培養後, 100個前後のコロニーが発育している寒天平板を選び, 総菌数およびBPRs数を計測し, さらに培地上に生育するすべての黒色コロニーを純培養した。

5. 菌種の同定

P. intermedia, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* の同定は16S rDNAの菌種特異部分を検出する multiplex PCR法を用いた。使用したプライマーの塩基配列はAshimotoら¹⁸⁾の報告に従い, *P. gingivalis* については5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCGおよび5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT, *P. intermedia* については5'-TTTGTGGGGAGTAAAGC-GGGおよび5'-TCAACATCTCTGTATCCTGCGT, *P. nigrescens* については5'-ATGAAACAAA-GGTTTTCCGGTAAGおよび5'-CCCACGTCTCTGTGGGCTGCGAを用い, サワデーテクノロジー (東京) に合成を依頼し, 購入した。純培養された細菌はさらに5 $\mu g/ml$ ヘミン, 1 $\mu g/ml$ メナジオン, 0.5% イーストエキストラクト (DIFCO Laboratories, Detroit, U.S.A.) および0.05% 塩酸システイン (和光純薬) 添加 brain heart infusion 液体培地 (DIFCO Laboratories) にて2日間培養した。培養菌液100 μl および400 μl の滅菌水をエッペンドルフチューブに入れ, 沸騰水中でボイルし, テンプレートとして用いた。上記6種のプライマー全てとテンプレートおよび反応試薬 Sawaday premix (サワデーテクノロジー) を混合し, 遺伝子増幅装置 (Perkin Elmer 9700, PEバイオシステムジャパン, 東京) を用いてDNAを増幅した。反応温度およびサイクル数は, $95^\circ C$ で1分, さらに $95^\circ C$ で30秒, $60^\circ C$ で1分, $72^\circ C$ で2分の一連の反応を35サイクル, および $72^\circ C$ で5分反応させた。反応液は0.5 $\mu g/ml$ のエチジウムブロマイドを含む1.5% アガロースゲル電気泳動にて分離し, 紫外線トランスイルミネーター (アトー, 東京) を用いて菌種特異的なバンドを検出した。対照として *P. intermedia* ATCC 25611^T, *P. nigrescens* ATCC 33563^T および *P. gingivalis* ATCC 33277^T の基準菌株を用いた。コロニーに長波長紫外線を照射した時, 赤色の蛍光を発し¹⁹⁾, かつ上記のPCR法で判定出来ない菌を *Prevotella* spp. とし, 菌株を純培養していく過程で死滅した菌を不明菌として分類した。

6. 統計分析

各群の統計分析について, 総菌数は1元配置分散分

析とBonferroniの多重比較を行った。BPRs数および培養可能な総菌数に対するBPRsの割合, BPRsのうち *P. intermedia*, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* の菌数とそれぞれのBPRs数に対する割合の統計分析はKruskal-Wallisの検定および多重比較を行った。

結 果

1. 口腔内診査の結果

GIが1未満の者は6名 (男子3名, 女子3名) で, これを健常者群とし, 合計36部位について細菌学的検索をした。1部位でもGIが2以上の者は歯肉炎患者群とし, 12名 (男子7名, 女子5名) であった。歯肉炎患者群のなかでGIが1未満の部位を健常部位群とし, また, GIが2以上の部位を歯肉炎部位群として, それぞれ合計41部位および31部位であった (表2)。

2. 菌種の multiplex PCR 法による同定

P. intermedia ATCC 25611^T, *P. nigrescens* ATCC 33563^T, *P. gingivalis* ATCC 33277^T の基準菌株および分離株の multiplex PCR 法によるゲル電気泳動像を図1に示す。類属的な反応の結果できたと思われる濃度の薄いバンドが観察されたが, *P. gingivalis* では404 bp, *P. intermedia* では575 bp および *P. nigrescens* では804 bp の主なバンドが認められ, 基準菌株および分離株において菌種の同定が可能であった。

3. 総菌数, BPRs 数および総菌数に対する BPRs の割合

各群の総菌数の平均 $\pm$ SD (log CFU) を図2に示す。健常者群では 5.11 ± 0.74 ($n=36$), 歯肉炎患者群の健常部位 ($n=41$) では 5.47 ± 0.56 であったが, 歯肉炎部位 ($n=31$) では 5.62 ± 0.71 であり, 歯肉炎患者群の歯肉炎部位は健常者群より多く, 両者の差は統計学的に有意 ($p<0.05$) であった。

BPRs数の平均 $\pm$ SD (log CFU) は健常者群では 1.92 ± 1.47 , 歯肉炎患者群の健常部位および歯肉炎部位ではそれぞれ 3.04 ± 1.69 および 3.85 ± 1.71 であり, 健常者群と歯肉炎患者群の健常部位および歯肉炎部位との差は統計学的に有意 ($p<0.05$) であった。健常者6名のうち2名はBPRsが全く検出されなかった。また, 健常者群の歯肉溝36部位中9部位からBPRsが分離され, その分離頻度は25.0%であった。一方, 歯肉炎患者群の健常部位では41部位中26部位 (63.4%), および歯肉炎部位31部位中26部位 (83.9%) といずれも健常者に比べ高い検出率を示した (図3)。総菌数に対するBPRs数の割合は, 健常

表 2 健常者と歯肉炎患者の被験者と被験部位

被験者	人数 (男性:女性)	被験部位	年齢 (平均±SD)	Probing Depth (mm)	Gingival Index
健常者	6 (3:3)	健常部位: 36	20.4±1.1	≤3.5	≤1
歯肉炎患者	12 (7:5)	健常部位: 41	21.7±2.7	≤3.5	≤1
		歯肉炎部位: 31		≤3.5	≥2

図 1 *P. intermedia*, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* の multiplex PCR 法による同定

1. 100 bp マーカー 2. *P. intermedia* ATCC 25611^T 3. *P. nigrescens* ATCC 33563^T
4. *P. gingivalis* ATCC 33277^T 5~16. 分離株

図 2 総菌数

図 3 BPRs 数および分離頻度

図 4 BPRs の総菌数に対する割合

者群では 2.1%, 歯肉炎患者群の健常部位および歯肉炎部位では 6.4% および 11.7% で, 健常者群と歯肉炎患者群の健常部位および歯肉炎部位との差は統計学的に有意 ($p < 0.05$) であった (図 4)。

4. *P. intermedia*, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* の BPRs に対する割合

健常者群から分離された BPRs に対する *P. intermedia* および *P. nigrescens* の占める割合は, 7.1% および 40.9% で, *P. nigrescens* が多かった。また, *P. gingivalis* は全く検出されなかった。歯肉炎患者群

図 5 *P. intermedia*, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* の BPRs に対する割合

の健常部位では *P. intermedia* の占める割合は、34.2%、*P. nigrescens* は 24.3% で、*P. intermedia* が若干多い傾向を示した。*P. gingivalis* の占める割合は 0.2% であった。一方、歯肉炎患者群の歯肉炎部位では、*P. intermedia* の BPRs 中に占める割合は、38.1%、*P. nigrescens* は 18.6% であり、*P. intermedia* が優勢であった。また、*P. gingivalis* は 5.2% の割合で検出され、各群中最も高い値を示した (図 5)。健常者群、歯肉炎患者群の健常部位および歯肉炎部位における *Prevotella spp.* および不明菌の割合は、それぞれ 12.4, 19.5, 16.8% および 39.6, 21.8, 21.4% であった。

5. *P. intermedia*, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* の菌数

P. intermedia, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* の菌数の平均 $\pm$ SD (log CFU) を調べた。その結果、いずれの菌種でも歯肉炎患者群の歯肉炎部位で最も値が高く、歯肉炎患者群の健常部位では健常者群との中間の値を示した。健常者群、歯肉炎患者群の健常部位および歯肉炎部位における *P. intermedia* の菌数は、 0.19 ± 0.82 , 1.67 ± 2.16 および 2.00 ± 2.39 であった、また健常者群と歯肉炎患者群の健常部位、健常者群と歯肉炎患者群の歯肉炎部位との間に統計学的に有意 ($p < 0.05$) な差が認められた。同様に、*P. nigrescens* はそれぞれ 0.58 ± 1.53 , 0.99 ± 1.68 および 1.16 ± 2.10 で、各群間の間に統計学的な有意差は認

められなかった。*P. gingivalis* は、健常者群で検出されず、歯肉炎患者群の健常部位で 0.07 ± 0.47 および歯肉炎部位で 0.65 ± 1.52 であり、健常者群と歯肉炎患者群の歯肉炎部位の間に統計学的に有意 ($p < 0.05$) な差が認められた (図 6)。

考 察

歯周疾患の原因菌を特定することは、一般の感染症と異なり難しい。Socransky²⁰⁾ は歯周疾患の原因菌を特定する為に、Koch の 4 条件を変更して、以下の 5 項目の条件を提唱している。1. 疾患部位でその微生物がより多く存在する。2. その微生物を排除すると病気の進行が阻止される。3. その微生物は病原因子を持つ。4. その微生物に対する免疫学的な反応がみられる。5. 動物実験でその病気を再現できる。本研究では、この中で第 1 項目に着目し、疾患部位で特定の細菌が多いかどうかについて検討した。

健常者群、歯肉炎患者の健常部位および歯肉炎部位における総菌数、BPRs 数および総菌数に対する BPRs の割合について比較してみると、健常者より歯肉炎患者の方が総菌数、BPRs 数および BPRs の割合も多く、歯肉炎患者の中でも健常部位より歯肉炎部位の方が多い結果となった。このことから歯肉炎の発症にはプラーク中の総菌数の増加が関与し、とくに BPRs 数と総菌数に対するその割合が深い関わりを持

図 6 *P. intermedia*, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* の菌数

つことが示唆された。

歯肉溝あるいは歯周ポケットから分離される BPRs の菌種は、*P. intermedia*, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* の 3 菌種が大部分を占め、その他の菌種としては *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. denticola* などがある^{10,13}。そこで、上記 3 種の菌を multiplex PCR 法で同定した。通常の PCR 法は、一対のプライマーを用いて、1 菌種についてのみ同定するが、今回用いた multiplex PCR 法では数種類のプライマー対を用いて、複数の菌に対して同定が可能である。このような方法は、通常の PCR 法^{18,21}や、DNA-DNA hybridization 法^{11,22,23}などに比べ、簡便かつ迅速に同定できる利点があり、近年、歯周疾患関連細菌の同定にも応用されはじめている^{24~26}。

Multiplex PCR 法による同定の結果、*P. intermedia*, *P. nigrescens* および *P. gingivalis* のいずれの菌種も、健康者、歯肉炎患者の健康部位、歯肉炎患者の歯肉炎部位の順で菌数が多く、*P. intermedia* の菌数は健康者群と歯肉炎患者群間の差は統計学的に有意 ($p < 0.05$) であったが、*P. nigrescens* の菌数は各群の間に統計学的に有意差は認められなかった。また、*P. gingivalis* は健康者群では全く検出されず、その数は歯肉炎患者の歯肉炎部位との間に統計学的に有意の差が認められた。

P. gingivalis は歯周炎の原因菌の 1 つであるが、健康者では検出されず歯肉炎患者からのみ検出されると

いう報告¹¹がある。逆に Rivier ら²⁷は、歯肉縁下プラークを培養せず、菌種特異的な抗体を作成し、蛍光抗体法による細菌の同定の結果、*P. gingivalis* が健康者の健康部位からも検出されるという報告をしている。今回の詳細な口腔内診査と細菌学的検索の結果では、歯肉炎が全くみられない健康な被験者からは *P. gingivalis* は検出されなかった。今後、ペーパーポイントで採取した試料を培養せずに直接 PCR 法で菌種を同定する等の検討も必要かと思われた。

P. intermedia, *P. nigrescens*, および *P. gingivalis* の BPRs に対する割合を調べて見ると、*P. intermedia* は健康者では小さく、逆に歯肉炎患者の歯肉炎部位では大きかった。一方、*P. nigrescens* の BPRs に対する割合は逆に健康者よりも歯肉炎患者の歯肉炎部位で小さかった (図 5)。*P. nigrescens* が健康者の口腔に数多く存在することを考慮すると^{4,11,13,28,29}、*P. nigrescens* の歯肉炎発症に関しての役割は、*P. gingivalis* および *P. intermedia* と比べて、強くはないことが以上の結果より示唆される。

Chen ら²⁸や van Steenberg ら²⁹は、4 歳以下の小児の縁下プラークあるいは口腔内からは、*P. nigrescens* が検出されるが、*P. intermedia* は検出されなかったことを報告している。

歯周炎に関しては、Conrads ら¹¹、Mättö ら⁴および我々の報告¹³と同様に、*P. nigrescens* は健康者に多く、歯肉炎患者では *P. intermedia* が多いことを報

告している。一方, Teanpaisan ら³⁰⁾は両者の比は疾患によりそれほど変わりがなかったという結果を報告している。また, 感染根管からは *P. nigrescens* が多く検出されるという報告¹²⁾に対し, 長田ら³¹⁾は, 歯髄処置を行っていない感染根管からは *P. nigrescens* より *P. intermedia* が優勢に分離されることを報告している。今回の歯肉炎の結果は, 我々が以前に歯周炎について報告したものと同様¹³⁾, 炎症が増加すると *P. intermedia* の検出頻度およびその数が増加することが分かった。*P. intermedia* と *P. nigrescens* の比は, 健常者で約 1:6, 歯肉炎患者群の健常部位で約 1.4:1, および歯肉炎患者群の歯肉炎部位で約 2:1 であった (図 5)。歯周炎患者の BPRs の分離頻度のみを検索した報告^{21,29)}はあるが, 今回の結果から, BPRs の分離頻度に加えて, その菌数および *P. intermedia* と *P. nigrescens* の比が口腔内の状況を表すのではないかと考えられた。さらに歯周局所から分離される BPRs 中で *P. intermedia* が多い場合, 歯肉炎が歯周炎へと進行し, あるいは *P. nigrescens* が多いと健康な歯肉へ戻る可能性も仮説として考えられた。

Tsuruda ら³²⁾は思春期の子供と大人の健常者と歯肉炎患者を調べ, *P. intermedia* (昔の分類で *P. nigrescens* を含むと考えられる) は歯肉炎患者の方が多いことを報告している。

P. intermedia の生化学的性状は *P. nigrescens* のそれと比べて類似しており, これらの病原因子の違いについては今だに明確ではない。しかし, 両者の病原因子の差を解明する目的で Stubbs ら³³⁾は各種水解酵素あるいは分解酵素について, Jansen ら³⁴⁾は IgG 分解酵素について, 中村ら³⁵⁾は赤血球凝集因子, および糸永ら³⁶⁾は溶血活性について両者の違いを調べている。彼らの結果によると, 両菌種ともこれら検査項目について強い陽性反応が認められ, このことは両菌種が歯周病原性をもつことを示唆するが, *P. intermedia* と *P. nigrescens* の間に明確な違いは認められなかったと報告している。一方, Beem ら³⁷⁾は, *P. intermedia* と *P. nigrescens* ATCC 基準菌株の赤血球に対する溶血活性について調べ, *P. intermedia* が *P. nigrescens* よりはるかに強い溶血活性を持つことを報告している。彼女らは, 炎症部位では赤血球が豊富に存在するため, 口腔内 BPRs の生育に必要な鉄イオンは, 炎症部位では溶血によるヘモグロビンあるいはヘミンから得られ, *P. intermedia* がこれらの一連の過程において重要な役割を果たしているものと考察している。

van Steenberg ら²⁹⁾は歯周疾患患者 7 名と, その配偶者および子供について *P. intermedia* と *P. ni-*

grescens の口腔内の分布状況およびその感染経路について調べている。細菌の DNA フィンガープリンティング法を用いて歯周ポケットの細菌を調べると舌, 頬粘膜, 扁桃および唾液から同じタイプの細菌が検出され, 口腔内に広く伝搬する様子が示唆され, さらに一部の家族では親子間で同一のタイプの細菌が検出されることから, 親子間の感染も示唆された。また, Mättö ら³⁸⁾も同様に唾液と歯周ポケットの細菌を調べ, 唾液等を介する口腔内感染があることを報告している。Teanpaisan ら³⁰⁾も, 歯周疾患患者において *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* の DNA リボタイピング法を用いて, これらの菌が, 疾患部位とそうでない部位に, 共通して存在することを報告している。

今回の結果では, 歯肉炎患者の健常部位でも *P. intermedia* が多く, また, *P. gingivalis* が検出された人では健常部位からも *P. gingivalis* が検出されたことから, その原因として疾患部位の BPRs が健常部位に伝搬することが考えられる。しかし, このような伝播が口腔内で起きているのか, 今後リボタイピング法などを用いて確かめる必要がある。

本研究の一部は平成 10 年度文部省科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (1) 課題番号 10470402) によって実施された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始ご丁寧なご指導とご校閲を賜りました鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室新井 高教授に深甚なる感謝の意を表します。また, 本研究の遂行に際し, 終始適切なご指導とご校閲を賜りました本学歯学部口腔細菌学教室前田伸子助教授に厚くお礼申し上げます。また, ご校閲を賜りました本学歯学部第二歯科保存学教室中村治郎教授に厚くお礼申し上げます。

さらに本研究に際し, 種々のご助言をくださった本学歯学部口腔細菌学教室, 藤田 浩名誉教授, 口腔細菌学教室医局員の皆様に深く感謝いたします。最後に本研究の遂行に際し, ご指導ご協力頂きました本学第二歯科保存学教室医局員の皆様に心からお礼申し上げます。

本論文の要旨は, 第 41 回秋季日本歯周病学会学術大会 (1998 年 10 月 16 日) において発表した。

文 献

- 1) Theilade, E., Wright, W.H., Jensen, S.B. and Løe, H.: Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J.

- Periodont. Res., 1 : 1-13, 1966.
- 2) Slots, J. and Rams, T.E. : Microbiology of periodontal disease, Slots, J. and Taubman, M.A., Contemporary oral microbiology and immunology, Mosby Year Book, St. Louis, 1992, 425-443.
 - 3) Könönen, E. : Pigmented *Prevotella* species in the periodontally healthy oral cavity. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 6 : 201-205, 1993.
 - 4) Mättö, J., Saarela, M., von Troil-Lindén, B., Könönen, E., Jousimies-Somer, H., Torkko, H., Alaluusua, S. and Asikainen, S. : Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral. Microbiol. Immunol., 11 : 96-102, 1996.
 - 5) Teanpaisan, R., Douglas, C.W.I. and Walsh, T. F. : Characterization of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy sites. J. Periodont. Res., 30 : 245-251, 1995.
 - 6) Muramatsu, Y. and Takaesu, Y. : Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. Bull. Tokyo Dent. Coll., 35 : 139-151, 1994.
 - 7) Kornman, K.S. and Loesche, W.J. : The subgingival microbial flora during pregnancy. J. Periodont. Res., 15 : 111-122, 1980.
 - 8) Loesche, W.J., Syed, S.A., Laughon, B.E. and Stoll, J. : The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J. Periodontol., 53 : 223-230, 1982.
 - 9) Murray, P.A., Grassi, M. and Winkler, J.R. : The microbiology of HIV-associated periodontal lesions. J. Clin. Periodontol., 16 : 636-642, 1989.
 - 10) Shah, H.N. and Gharbia, S.E. : Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 42 : 542-546, 1992.
 - 11) Conrads, G., Mutters, R., Fischer, J., Brauner, A., Lutticken, R. and Lampert, F. : PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. J. Periodontol., 67 : 994-1003, 1996.
 - 12) Gharbia, S.E., Haapasalo, M., Shah, H.N., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Pearce, M.A. and Devine, D.A. : Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. J. Periodontol., 65 : 56-61, 1994.
 - 13) Maeda, N., Okamoto, M., Kondo, K., Ishikawa, H., Osada, R., Tsurumoto, A. and Fujita, H. : Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. Microbiol. Immunol., 42 : 583-589, 1998.
 - 14) Ramfjord, S.P. : Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. J. Periodontol., 30 : 51-59, 1959.
 - 15) Riviere, G.R., Smith, K.S., Carranza, N., Tzagaroulaki, E., Kay, S.L. and Dock, M. : Subgingival distribution of *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, and pathogen-related oral spirochetes : Prevalence and relationship to periodontal status of sampled sites. J. Periodontol., 66 : 829-837, 1995.
 - 16) Löe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. Acta Odontol. Scand., 21 : 533-551, 1963.
 - 17) Perry, D.A., Taggart, E.J., Leung, A. and Newbrun, E. : Comparison of a conventional probe with electronic and manual pressure-regulated probes. J. Periodontol., 65 : 908-913, 1994.
 - 18) Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I. and Slots, J. : Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral. Microbiol. Immunol., 11 : 266-273, 1996.
 - 19) Slots, J. and Reynolds, H.S. : Long-wave UV light fluorescence for identification of black-pigmented *Bacteroides* spp. J. Clin. Microbiol., 16 : 1148-1151, 1982.
 - 20) Socransky, S.S. : Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 6 suppl : 16-21, 1979.
 - 21) 藤本 淳 : 成人型歯周炎における歯周病関連菌と臨床的パラメーターとの関連—PCR法による病変部歯肉および歯肉縁下プラークからの検出—. 日歯周誌, 40 : 389-399, 1998.
 - 22) Papapanou, P.N., Madianos, P.N., Dahlén, G. and Sandoros, J. : "Checkerboard" versus culture : a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. Eur. J. Oral. Sci., 105 : 389-396, 1997.
 - 23) 澤田聡子, 荅口 進, 宮本 学, 澤田弘一, 藤本千代, 綿城哲二, 弘末 勝, 清水明美, 周 幸華, 栗原英見, 新井英雄, 高柴正悟, 村山洋二. : 細菌 16 S リボソーム RNA 遺伝子に基づく DNA プローブを用いた歯周病細菌の同定—コロニーハイブリダイゼーション法—. 日歯周誌, 40 : 475-485, 1998.
 - 24) Tran, S.D. and Rudney, J.D. : Multiplex PCR using conserved and species-specific 16 S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. J. Clin. Microbiol., 34 :

- 2674-2678, 1996.
- 25) Premaraj, T., Kato, N., Fukui, K., Kato, H. and Watanabe, K. : Use of PCR and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis techniques for differentiation of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. J. Clin. Microbiol., 37 : 1057-1061, 1999.
- 26) Conrads, G., Flemmig, T.F., Seyfarth, I., Lampert, F. and Lutticken, R. : Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16 S rRNA gene-directed multiplex PCR. J. Clin. Microbiol., 37 : 1621-1624, 1999.
- 27) Riviere, G.R., Smith, K.S., Tzagaroulaki, E., Kay, S.L., Zhu, X., DeRuen, T.A. and Adams, D.F. : Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. J. Periodontol., 67 : 109-115, 1996.
- 28) Chen, C., Ashimoto, A., Sangsurasak, S., Flynn, M.J. and Slots, J. : Oral food consumption and subgingival microorganisms : Subgingival microbiota of gastrostomy tube-fed children and healthy controls. J. Periodontol., 68 : 1163-1168, 1997.
- 29) van Steenberg, T.J.M., Bosch-Tijhof, C.J., Petit, M.D.A. and van der Velden, U. : Intra-familial transmission and distribution of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. J. Periodont. Res., 32 : 345-350, 1997.
- 30) Teanpaisan, R., Douglas, C.W.I., Eley, A.R. and Walsh, T.F. : Clonality of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from periodontally diseased and healthy sites. J. Periodont. Res., 31 : 423-432, 1996.
- 31) 長田玲子, 岡本公彰, 石川博之, 山口博康, 中村治郎, 前田伸子 : 根管から分離された *Prevotella intermedia* と *Prevotella nigrescens* について. 日歯内療誌, 19 : 24-30, 1998.
- 32) Tsuruda, K., Miyake, Y., Suginaka, H., Okamoto, H. and Iwamoto, Y. : Microbiological features of gingivitis in pubertal children. J. Clin. Periodontol., 22 : 316-320, 1995.
- 33) Stubbs, S., Lewis, M.A.O., Waddington, R.J. and Embury, G. : Hydrolytic and depolymerising enzyme activity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral. Diseases., 2 : 272-278, 1996.
- 34) Jansen, H.J., Grenier, D. and van der Hoeven, J. S. : Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral. Microbiol. Immunol., 10 : 138-145, 1995.
- 35) 中村真一, 福島久典 : *Prevotella intermedia* から分離した赤血球凝集因子と溶血因子の性状. 歯科医学, 59 : 333-343, 1996.
- 36) 糸永雄二郎, 福島久典 : *Prevotella intermedia* と *Prevotella nigrescens* の溶血活性について. 歯科医学, 59 : 137-145, 1996.
- 37) Beem, J.E., Nesbitt, W.E. and Leung, K.-P. : Identification of hemolytic activity in *Prevotella intermedia*. Oral. Microbiol. Immunol., 13 : 97-105, 1998.
- 38) Mättö, J., Saarela, M., von Troil-Lindén, B., Alaluusua, S., Jousimies-Somer, H. and Asikainen, S. : Similarity of salivary and subgingival *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Oral. Microbiol. Immunol., 11 : 395-401, 1996.

連絡先 :

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室

〒230-8501 神奈川県横浜市鶴見区鶴見2-1-3