成人性歯周炎患者の病変部歯肉組織からの歯周病原性細菌の検出

遠 藤 憲 行

岩手医科大学歯学部歯科保存学第二講座歯周病学教室

(2001 年 1 月 6 日受理)

Detection of Periodontopathic Microorganisms in Inflamed Gingival Tissues from Patients with Adult Periodontitis

Noriyuki Endoh

Department of Periodontology, Iwate Medical University School of Dentistry

Accepted for publication 6 January 2001

Using a PCR method, we detected periodontopathic microorganisms in inflamed gingival tissues from patients with adult periodontitis, which included the four *fimA* genotypes (types I to IV) of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), as well as *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Bacteroides forsythus* (*B. forsythus*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), and, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*). The inflamed tissues were taken during periodontal flap operations, while subgingival plaque samples at the same site were collected just prior to the operation or, in some cases, during the maintenance period. Our results indicated that all of the microbes examined in this study were detected in the gingival tissue samples. In particular, *P. gingivalis*, *T. denticola*, and *B. forsythus* were frequently detected (100%, 81.4%, and 64.3%, respectively). Similar results were obtained from the plaque samples taken just before the operation, suggesting that all of these microbes are able to exist in inflamed gingival tissues. As for the distribution of the four *fimA* genotypes of *P. gingivalis*, type II was most frequently detected in gingival tissues, followed by a co-existent combination of types I and II.

During the maintenance phase, the distribution of most of the microbes in the plaque samples decreased significantly. As for the four *fimA* genotypes of *P. gingivalis*, the positive rate of type II decreased markedly, when compared to just before the operation.

These results indicate that *P. gingivalis* type II *fimA* is predominant in the gingival tissues of periodontitis patients, suggesting it could play an important role in the onset and/or progression of adult periodontitis. J. Jpn. Soc. Periodontol., 43 : 33~42, 2001.

Key words : *P. gingivalis fimA* type, periodontopathic microorganisms, inflamed gingival tissues, PCR

要旨 : 4種の線毛タイプの *Porphyromonas gingivalis* を含む歯周病原性細菌の病変部歯肉における存在を検討する目的で、成人性歯周炎患者の病変部歯肉を採取し、PCR法を用いて各線毛タイプの *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* について検索した。また、歯周外科処置前後での歯肉縁下プラーク中の各歯周病原性細菌の動態についても検討した。その結果、今回調べたいいずれの歯周病原性細菌も、病変部歯肉サンプルから検出された。特に *P. gingivalis* (100%), *T. denticola* (81.4%), *B. forsythus* (64.3%) が高い検出率を示した。また、歯肉縁下プラークのそれと類似していたことから、特異的に歯肉組織から検出される細菌種のないことが示唆された。*P. gingivalis* の線毛タイプ別では、Type II線毛を有する *P. gingivalis* の検出率が最も高く、ついで Type I と Type II の共存例の率が高く、Type II線毛の *P. gingivalis* が単独で、あるいは Type I線毛との共存下で成人性歯周炎の病変部歯肉組織に存在する可能性の高いことが強く示唆された。

メンテナンス期の歯肉縁下プラーク中では、今回調べた全ての歯周病原性細菌の検出率も歯周外科処置前と

比較して有意に低下する事が明らかとなった。*P. gingivalis* の線毛タイプ別では Type II 単独例の検出率が歯周外科処置後著明に低下していた。この成績からも Type II 線毛を有する *P. gingivalis* が成人性歯周炎の発症・進行に密接に関連することが示唆された。

索引用語：*P. gingivalis* 線毛タイプ，歯周病原性細菌，病変部歯肉組織，PCR

緒 言

歯周炎がプラーク中に存在する細菌に起因する疾患であることは多くの基礎的研究，臨床的観察から示されており¹⁾，現時点では，*Porphyromonas gingivalis*，*Bacteriodes forsythus*，*Prevotella intermedia*，*Actinobacillus actinomycetemcomitans*，*Treponema denticola* をはじめとするある種のグラム陰性細菌が，成人性歯周炎や早期発症型歯周炎の各病型と関連する歯周病原性細菌として挙げられるに至っている²⁻⁹⁾。さらに歯周炎の罹患部位と健常部位を比較した研究からは，歯周炎病巣局所でこれらの歯周病原性細菌の存在比率が優位であることが明らかにされている^{8,10-15)}。藤本¹⁶⁾も種々の歯周病原性細菌の 16 S ribosomal RNA をコードする DNA に対するプライマーを用いた PCR 法により，成人性歯周炎患者の歯肉縁下プラークと臨床的パラメーターとの関連性を調べ，*P. gingivalis* および *B. forsythus* の陽性率が，歯肉炎指数 (Gingival Index : GI) および Bleeding on probing (BOP) と有意の正の相関を示すことを報告している。

これらの歯周病原性細菌が歯周炎の病巣歯肉組織内に侵入するか否かについては議論のあるところであるが，培養上皮細胞を用いた *in vitro* の研究からは，多くの歯周病原性細菌が歯肉組織内に侵入し得ることが強く示唆されている¹⁷⁾。しかし，*in vivo* でどのような歯周病原性細菌種が，あるいはどのような組み合わせの歯周病原性細菌群が病変部歯肉組織内に侵入するかについてはほとんど明らかにされていない。*P. gingivalis* 株をマウス皮下に注射し，その病原性を調べた研究からは，菌株により組織侵入力に違いのあることが示唆されている¹⁸⁻²¹⁾が，他の歯周病原性細菌については報告がなく，またヒト歯周組織への侵入性についての報告も少ない。わずかに，歯周外科処置時に採取した病変部歯肉組織より DNA を精製し，PCR 法により *P. gingivalis*，*B. forsythus*，*P. intermedia*，*T. denticola*，*A. actinomycetemcomitans* の存在を調べた報告¹⁶⁾からは，これらの歯周病原性細菌のいずれもが病変部歯肉組織中に存在し得ることが示唆されている。

成人性歯周炎の原因菌と考えられる *P. gingivalis*

には，最近，線毛をコードする遺伝子 (*fimA*) に対するプライマーを用いた PCR 法により，これまでの 4 つの線毛タイプには含まれない菌株群が存在することが明らかにされた²²⁾。さらにその報告によれば，対象とした 93 名の成人性歯周炎患者の歯肉縁下プラーク中では，Type II 線毛を有する *P. gingivalis* の存在比率が最も高いことが示唆されている。そこで本研究では，各線毛タイプの *P. gingivalis* を含む歯周病原性細菌の病変部歯肉における存在を検討する目的で，成人性歯周炎患者を対象に，歯周外科処置時に採取した病変部歯肉組織サンプル中での *B. forsythus*，*P. intermedia*，*T. denticola*，*A. actinomycetemcomitans*，および各線毛タイプの *P. gingivalis* の局在を PCR 法を用いて検索し，歯肉縁下プラークのそれと比較検討した。さらに，本研究では，メンテナンス期の歯肉縁下プラークについても調べ，歯周外科処置前後での各歯周病原性細菌の存在の有無についても検討を加えた。

材料および方法

1. 被験者と臨床的パラメーター

岩手医科大学歯学部附属病院第二保存科を受診し，歯周外科処置（フラップ手術）を行った成人性歯周炎患者 70 名（男性 32 名，女性 38 名，平均年齢 57.8 ± 1.1 歳）を被験者とした。被験者は重篤な全身疾患がなく，来院時の過去 6 カ月以内に歯周治療を受けておらず，過去 3 カ月以内に抗生物質の全身，局所投与を受けていないことを条件とした。被験者には本研究内容を説明し，同意を得た。

初診時に Probing Depth²³⁾（以下 PD），Gingival Index²⁴⁾（以下 GI），およびプロービング時の出血²³⁾（以下 BOP）の有無を測定した。初期治療終了後 4 mm 以上の歯周ポケットが残存し，再評価の結果，フラップ手術が必要と認められた箇所より被験者あたり一部位を無作為に選択し，被験部位とした。被験部位ごとの初診時における臨床症状については，被験者の性別にわけ表 1 にまとめて示した。

2. 歯肉縁下プラークおよび歯周炎病変部歯肉組織の採取

被験部位から，歯周外科処置直前に歯肉縁下プラークを採取するとともに，歯周外科処置時に病変部歯肉

表 1 被験者背景および初診時における被験部位の臨床症状

	男性	女性
患者数	32	38
年齢	58.8±1.7 ¹⁾	56.9±1.5
PD (mm) (%)		
4	18.8	15.8
5	9.4	10.5
6	37.5	39.5
7	12.5	10.5
8-10	21.9	23.7
GI (%)		
1	34.4	23.7
2	62.5	60.5
3	3.1	15.8
BOP (%)		
(-)	0	0
(+)	100	100

¹⁾平均値±標準誤差

組織を採取した。また、一部の被験者（採取可能であった41名）では、歯周外科処置後2～4カ月を経過したメンテナンス期に被験部位から歯肉縁下プラークを採取した。

歯肉縁下プラークは、簡易防湿下で可及的に歯肉縁上プラークを除去後、滅菌ペーパーポイント（ZIP-PREER®, Germany）を歯周ポケットに1分間挿入して採取した。得られた歯肉縁下プラークは100 μ l の ABCM®broth（栄研，東京）に浸漬し，10 秒間 vortex mixer で攪拌後，その浮遊液を-80℃で保存した。

病変部歯肉組織は，歯周外科処置時に内縁上皮を含む炎症歯肉を採取し，滅菌生理食塩水で十分に洗浄後，直ちに組織培養用 Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM（日水，東京）に入れ，-80℃で保存した。

凍結保存した歯肉標本からの DNA の抽出には，試料を溶解後，滅菌リン酸緩衝液（以下 PBS；pH 7.0）で十分に洗浄後，PHYSCOTRON HANDY MICRO HOMOGENIZER NS 310-E（日音理科器械製作所，東京）を用いてホモジナイズ処理した。得られた病変部歯肉組織からの試料，および歯肉縁下プラークからの DNA の抽出は，DNA 抽出キット Puregene®（Gentra，USA）を用いて行った。

3. プライマーと PCR 法

PCR 法は Amano ら²²⁾および Ashimoto ら²⁵⁾の報告に準じて行った。すなわち，PCR 試薬は

GeneAmp PCR Core Reagents（AmpliTaq Gold，および dNTP，10×PCR Buffer；PERKIN ELMER，USA）を用い，増幅反応は PCR Thermal Cycler MP（TP 3000，Takara，東京）を用いて行った。*P. gingivalis* 特異的 16 S rRNA 遺伝子および Type I，II，III，および IV *fimA* は 94℃ 30 秒，58℃ 30 秒，72℃ 30 秒，30 サイクル，*T. denticola*，*B. forsythus* 特異的 16 S rRNA 遺伝子は 95℃ 30 秒，65℃ 1 分，72℃ 1 分，36 サイクル，*P. intermedia*，*A. actinomycetemcomitans* 特異的 16 S rRNA 遺伝子は 95℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 1 分，36 サイクルで増幅した。得られた PCR 産物は，0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含む 2.0% アガロースゲル電気泳動を行い，落射式蛍光読取装置 Epi-Light UV FA 1000（アイシン・コスモス研究所，東京）で検出した。

本研究では，Amano ら²²⁾および Ashimoto ら²⁵⁾の報告に基づき，以下のプライマーを用いた。(1) *P. gingivalis* プライマー：5'-TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC C-3'，5'-ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC-3'，(2) Type I *fimA* プライマー：5'-CTG TGT GTT TAT GGC AAA CTT C-3'，5'-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A-3'，(3) Type II *fimA* プライマー：5'-ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G-3'，5'-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A-3'，(4) Type III *fimA* プライマー：5'-ATT ACA CCT ACA CAG GTG AGG C-3'，5'-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A-3'，(5) Type IV *fimA* プライマー：5'-CTA TTG AGG TGC TAT TAC CCA A-3'，5'-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A-3'，(6) *T. denticola* プライマー：5'-TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T-3'，5'-TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA-3'，(7) *B. forsythus* プライマー：5'-GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA-3'，5'-TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T-3'，(8) *P. intermedia* プライマー：5'-TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG-3'，5'-TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T-3'，(9) *A. actinomycetemcomitans* プライマー：5'-AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC-3'，ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT-3'。

4. 統計解析

各歯周病原性細菌，各線毛タイプおよびサンプルごとの陽性率の比較の検討および歯周外科処置前後での各歯周病原性細菌，各線毛タイプの陽性率の比較にはカイ 2 乗検定を，クラスター分析は Ward 法を用いて分析を行った。

結 果

1. 歯肉縁下プラーク中の歯周病原性細菌および各線毛タイプの *P. gingivalis* の検出

歯周外科処置直前に採取した歯肉縁下プラーク中での各歯周病原性細菌の検出率は図1に示した。*P. gingivalis*, *T. denticola* の検出率はそれぞれ98.6%, 92.9%と高く, ついで *B. forsythus* と *P. intermedia* が高い割合で検出された。今回調べた70症例, 70部位では *A. actinomycetemcomitans* の検出率が最も低

図1 歯周病原性細菌の歯肉縁下プラークからの検出
歯肉縁下プラークにおける各歯周病原性細菌の検出率を示した。

図2 歯肉縁下プラークにおける *P. gingivalis* 各線毛タイプの分布

い値を示した。

P. gingivalis の各線毛タイプ別陽性率については図2に示した。本研究では1サンプル中に単独の線毛タイプが存在する場合と複数の線毛タイプが同時に存在する場合が認められたため, 図2では認められたすべての組み合わせにわけて示した。結果は, Type II 単独の検出率が最も多く (43.5%), ついで Type I と Type II の共存例の検出率が高かった。また, 今回用いた4つの線毛タイプのプライマーとは反応しない untypeable (UT) の線毛タイプの *P. gingivalis* が 5.8% 認められた。

2. 病変部歯肉組織での歯周病原性細菌および各線毛タイプの *P. gingivalis* の検出

病変部歯肉組織での各歯周病原性細菌の検出率は, 歯肉縁下プラーク同様, *P. gingivalis* が最も高く (100%), *A. actinomycetemcomitans* が最も低かった (25.7%) (図3)。歯肉サンプルでの検出率は, 歯肉縁下プラークサンプルと比較して, *P. gingivalis* の検出率が高く ($p < 0.05$), *B. forsythus* と *P. intermedia* の検出率が有意に低い値を示した (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$)。

歯肉サンプルでの *P. gingivalis* の各線毛タイプ別の検出率を, UT を含む各タイプ別の陽性率から検討した結果では, 歯肉サンプルは, 歯肉縁下プラークサンプルと同様の検出結果を示し, Type II 線毛を有する *P. gingivalis* の検出率が最も高く, ついで Type

図3 歯周病原性細菌の分布

病変部歯肉組織と歯肉縁下プラークにおける各歯周病原性細菌の分布を示している。■は病変部歯肉組織の, □は歯肉縁下プラークでの検出率である。

(** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$ by Chi Square test)

I 線毛の *P. gingivalis* の検出率が高かった。しかし、歯肉縁下プラークサンプル同様、1 サンプル中に単独の線毛タイプが存在する場合と複数の線毛タイプが共存する場合が認められた。そこで、複数の線毛タイプが存在する場合を別個のものとしてすべての組み合わせで検討した結果 (図 4)、歯肉サンプルでは歯肉縁下プラークサンプルと比較して、Type II 線毛を有する *P. gingivalis* 単独症例の率がやや高く、逆に Type I と Type II の *P. gingivalis* が共存する率が低い傾

図 4 サンプルごとの *P. gingivalis* 線毛タイプの分布
サンプルごとにおける *P. gingivalis* 線毛タイプの分布を示している。■は病変部歯肉組織の、□は歯肉縁下プラークでの検出率である。

向が観察された。また、歯肉縁下プラークサンプル同様、UT の線毛タイプの *P. gingivalis* が歯肉サンプルにおいても存在することが明らかとなった。図 5 には歯肉サンプルおよび歯肉縁下プラークでの PCR 電気泳動像の代表例を示した。

歯肉縁下プラークおよび病変部歯肉組織での各歯周病原性細菌および各線毛タイプの *P. gingivalis* の陽性率についてクラスター分析を行った結果、5 つのクラスターに分けられることが示唆された (図 6)。各歯周病原性細菌と *P. gingivalis* の線毛タイプの組み合わせは各群で異なっていたが、いずれの群においても歯肉縁下プラークと病変部歯肉組織でほぼ同様の像を示すことが明らかとなった。しかし、クラスター分類での各群間で、初診時の臨床症状 (PD, GI, BOP) を比較した結果からは、有意の差は認められなかった。

3. 歯周外科処置前後での比較

歯周外科処置が各歯周病原性細菌および各線毛タイプの検出率に及ぼす影響を検討する目的で、歯周外科処置後 2~4 カ月のメンテナンス期に 41 名の被験者の同被験部位から歯肉縁下プラークの採取を行い、歯周外科処置直前のそれと比較検討した (図 7)。その結果、各歯周病原性細菌の検出率については、歯周外科処置後、いずれも低下しており、*A. actinomycetemcomitans* を除く 4 菌種で有意差が認められた (すべて $p < 0.01$)。歯周外科前後における Type I, II, III, および IV の各線毛タイプ別の分布は、歯周外科処置前後で類似し、Type II が最も高い検出率を示した (図 8)。しかし、複数の線毛タイプが存在する場合を別個のものとしてすべての組み合わせで検討した結果

図 5 歯肉縁下プラークと病変部歯肉組織からの PCR 産物の電気泳動像の代表例

左はプラークサンプル、右は歯肉サンプルにおける各歯周病原性細菌および *P. gingivalis* 各線毛タイプの検出結果を示した。

C. control 1. *P. gingivalis* 2. *T. denticola* 3. *B. forsythus* 4. *P. intermedia* 5. *A. actinomycetemcomitans* 6. Type I *fimA* 7. Type II *fimA* 8. Type III *fimA* 9. Type IV *fimA*

図 6 各歯周病原性細菌および *P. gingivalis* 各線毛タイプの組合せ

左に歯肉縁下プラークの、右に病変部歯肉組織での各歯周病原性細菌および *P. gingivalis* 各線毛タイプのクラスタ分析の結果を示した。

■ : >67% positive ▨ : 34~66% positive □ : 0~33% positive

図 7 FO 前後での歯周病原性細菌の検出率

■はFO前の、□はFO後の各歯周病原性細菌の検出率を示している。(** : $p < 0.01$ by Chi Square test) $n = 41$

(図 9), 歯周外科処置前と比較して, メインテナンス期においては Type II 単独例の率が低下し (38.9% → 12.5%), 逆に Type I と Type II が共存する例の率は増加していた (38.9% → 50.0%)。なお, 今回調べ

図 8 FO 前後での *P. gingivalis* 線毛タイプの検出率

■はFO前の、□はFO後の *P. gingivalis* 線毛タイプの検出率を示している。FO 前 $n = 36$, FO 後 $n = 8$

た 41 の被験部位の歯肉縁下プラークサンプル中では, UT の *P. gingivalis* は歯周外科処置前後のいずれにおいても検出されず, また, Type I 単独例も認められなかった (図 8, 9)。

考 察

成人性歯周炎の原因菌と考えられる *P. gingivalis* には, その菌株により病原性が異なることが示唆され

図 9 FO 前後でのサンプルごとの *P. gingivalis* 線毛タイプの検出率

■は FO 前の、□は FO 後のサンプルごとの *P. gingivalis* 線毛タイプの検出率を示している。FO 前 n=36, FO 後 n=8

ている。マウスを用いて皮下注射を行った一連の研究からは、蜂窩織炎や壊死を誘導してしばしば致命的な全身症状を惹起する *P. gingivalis* 菌株と、注射局所に膿瘍形成を起こすものの重篤な全身症状を惹起しない *P. gingivalis* 菌株のあることが示されている^{18~21)}。これらの報告では、前者を組織侵入力の強い病原性菌株、後者を非病原性菌株としているが、一方ラットを用いた口腔への感染実験からは、逆に、皮下注射実験で病原性菌株とされた *P. gingivalis* 菌株の歯周病原性が低いことが示されている^{26,27)}。これらの成績は、*P. gingivalis* の菌株により口腔への定着能と組織侵入性に違いのあることを示唆するとともに、*P. gingivalis* の定着能が歯周病原性に深く関わることを示唆する。

P. gingivalis の歯周組織への定着には、本菌の線毛が重要な役割を果たすことが明らかにされている^{28,29)}。*P. gingivalis* の線毛はこれまでその遺伝子 (*fimA*) の解析から 4 種に分けられていた^{30,31)}が、最近、Amano ら²²⁾は *fimA* に対するプライマーを用いた PCR 法により、これまでの 4 つの線毛タイプには含まれない (untypeable の) 菌株群が存在することを明らかにした。さらに彼らは、成人性歯周炎患者の歯肉縁下プラーク中における (untypeable を含む) 5 種の線毛タイプの *P. gingivalis* の分布を検索した結

果、Type II 線毛を有する *P. gingivalis* が優勢であったと報告している。そこで本研究では、成人性歯周炎患者の病変部歯肉組織中での *P. gingivalis* の各線毛タイプの分布を、*fimA* に対するプライマーを用いた PCR 法により検討した。

その結果、Type II 線毛を有する *P. gingivalis* の検出率が最も高く (78.6%)、ついで Type I 線毛を有する *P. gingivalis* の検出率が高い (32.9%) ことが明らかとなった。この病変部歯肉サンプルにおける結果は歯肉縁下プラークのそれと同様であった。さらに本研究では、*P. gingivalis* 以外にも *B. forsythus*, *P. intermedia*, *T. denticola* および *A. actinomycetemcomitans* についても検討した。その結果、今回調べたいずれの歯周病原性細菌も成人性歯周炎患者の病変部歯肉サンプルから有意の率で検出されること、特に *P. gingivalis* (100%)、*T. denticola* (81.4%)、*B. forsythus* (64.3%) が高い検出率を示すこと、またこれは歯周外科処置直前に採取した歯肉縁下プラークの結果と類似することが明らかとなった (図 1 および 3)。*P. gingivalis* の各線毛タイプの検索結果を含むこれらの成績は、Amano ら²²⁾および藤本¹⁶⁾の成績を支持するとともに、各線毛タイプの *P. gingivalis*、および今回調べた歯周病原性細菌種がいずれも病変部歯肉に存在することを強く示唆する。

歯周炎の病変部歯肉組織に歯周病原性細菌が侵入することは、進行した歯周炎病変部歯肉組織中に細菌が存在することを示した Frank³²⁾ の報告, 免疫蛍光法で *A. actinomycetemcomitans* を同定した Saglie ら³³⁾ および Christersson ら³⁴⁾ の報告から示唆されている。また, *in vitro* で培養上皮細胞に対する侵入性を検討した研究からも, 少なくとも *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola* が病変部歯肉組織に侵入し得ることが強く示唆されている^{22,35,36)}。しかし, *in vivo* でどのような歯周病原性細菌種が, あるいはどのような組み合わせの細菌群が病変部歯肉組織内に侵入するかについてはほとんど検討されていない。わずかに, 藤本¹⁶⁾ の報告で, 歯周外科処置時に採取した病変部歯肉組織より DNA を精製し, PCR 法により *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* の存在を調べ, これらの歯周病原性細菌が病変部歯肉組織中に存在することが示唆されている。この研究では, 得られた病変部歯肉組織を十分に洗浄した後 DNA の抽出を行っており, 本研究ではこの方法に準じた。また本研究では, 予備実験として, 洗浄液中に細菌の存在が確認されなくなるまで病変部歯肉組織の洗浄を繰り返しても歯肉組織サンプル中から同様に標的細菌が検出されることを確認している。しかし, 今回調べた歯周病原性細菌が病変部歯肉組織表面に強固に付着している可能性は完全には否定できない。実際, *T. denticola* は, 標的とする培養上皮細胞株に付着するものの侵入しない場合のあることが報告されている¹⁷⁾。それゆえ, *P. gingivalis* の各線毛タイプを含め今回対象とした歯周病原性細菌はいずれも, 成人性歯周炎患者の病変部歯肉組織に強固に付着しないしは侵入し, 特異的に病変部歯肉組織サンプル中に存在する歯周病原性細菌種のないことが示唆された。

P. gingivalis の各線毛タイプ別検索結果からは, 病変部歯肉サンプル, 歯肉縁下プラークサンプルのいずれにおいても, Type II 線毛を有する *P. gingivalis* が深く関わっていることが明らかとなった。さらに, 線毛タイプ別検索で次に検出率の高かった Type I 線毛を有する *P. gingivalis* も, 単独例 (7.1%) よりも Type II 線毛を有する *P. gingivalis* との共存下の検出率 (24.3%) が高かったこと (図 4) から, Type II 線毛を有する *P. gingivalis* が成人性歯周炎の発症・進行に重要であることが示唆された。

歯周炎の症状が改善したメンテナンス期の歯肉縁下プラークサンプル中では, 今回調べたいずれの歯周病原性細菌もその検出率が低下しており, *A. actinomycetemcomitans* を除いていずれもが有意の低下を

示した (図 7)。この結果は, 今回調べたいずれの歯周病原性細菌も成人性歯周炎の発症・進行に関わる可能性を示唆するものと思われる。歯周外科処置前後の *P. gingivalis* の各線毛タイプ別検索においては, 4 種の線毛タイプの検出率からは Type II 線毛を有する *P. gingivalis* の検出率の低下はわずかであった (図 8) が, 複数の線毛タイプが存在する場合を別個のものとしてすべての組み合わせで検討した結果では Type II 単独例の検出率が著明に低下していた (図 9)。この成績もまた, 成人性歯周炎に Type II 線毛を有する *P. gingivalis* が深く関わることを示唆するものと思われる。

病変部歯肉サンプル, 歯肉縁下プラークサンプルのいずれにおいても, 今回用いた 4 種の *P. gingivalis* の線毛プライマーとは反応しない *P. gingivalis* が, 少ないながら存在することが明らかとなった。歯周外科処置直前の歯肉縁下プラーク中での UT の検出率は 5.8% (4/70) で, Amano ら²²⁾ の報告 (6.8%) を支持する結果が得られた。

今後, 早期発症型歯周炎を含めた他の病型の歯周炎についても検索し, 今回行った成人性歯周炎患者での成績と比較検討する予定である。また症例ごとに, 初診時, 再評価時, 歯周外科処置直後およびメンテナンス期に経時的モニタリングを行い, 臨床的有用性を検討したいと考えている。

本研究の一部は平成 11 年度日本私立学校振興・共済事業団特別補助 (大学院重点特別経費) によって実施された。

謝 辞

稿を終えるに当たり, 終始ご丁寧なご指導とご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科保存学第二講座上野和之教授ならびに, 直接のご指導を賜りました歯科保存学第二講座八重柏隆講師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岩手医科大学歯学部口腔微生物学教室木村重信教授に厚く御礼申し上げます。さらに本研究に際し, 種々のご助言を下された岩手医科大学歯学部口腔微生物学教室根本優子講師, 予防歯科学講座岸光男講師に深く感謝いたします。最後に本研究の遂行に際し, ご指導ご助力いただきました岩手医科大学歯学部第二保存科医局員の皆様に心から御礼申し上げます。

本論文の要旨は第 42 回春期日本歯周病学会学術大会 (1999 年 4 月 23 日), および第 43 回春期日本歯周病学会学術大会 (2000 年 5 月 13 日) において発表した。

文 献

- 1) van Winkelhoff, A.J. and Graaff, J. : Microbiology in the management of destructive periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 18 : 406-410, 1991.
- 2) Asikainen, S., Jousimies-Somer, H., Kanervo, A. and Summanen, P. : Certain bacterial species and morphotypes in localized juvenile periodontitis and matched controls. J. Periodontol., 58 : 224-230, 1987.
- 3) Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Dzink, J.L., Taubman, M.A., Ebersole, J.L. and Smith, D.J. : Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. J. Clin. Periodontol., 15 : 240-246, 1988.
- 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) Newman, M. and Socransky, S. : Predominant cultivable microbiota in periodontitis. J. Periodont. Res., 12 : 120-128, 1977.
- 6) Ranney, R.R., Best A.M., Breen, T.J., Moore, W.E. C. and Moore, L.V.H. : Bacterial flora of progressing periodontitis lesion. J. Periodont. Res., 22 : 205-206, 1987.
- 7) Slots, J., Zambon, J.J., Rosling, B.G., Reynolds, H. S., Christersson, L.A. and Genco, R.J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Association, serology, leukotoxicity, and treatment. J. Periodont. Res., 17 : 447-448, 1982.
- 8) Slots, J. and Listgarten, M. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. J. Clin. Periodontol., 15 : 85-93, 1988.
- 9) Tanner, A. and Bouldin, H. : The microbiota of early periodontitis lesions in adults. J. Clin. Periodontol., 16 : 461-471, 1989.
- 10) Bragd, L., Dahlén, G., Wikström, M. and Slots, J. : The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis ; a retrospective study. J. Clin. Periodontol., 14 : 95-99, 1987.
- 11) Dzink, J.L., Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. : The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J. Clin. Periodontol., 15 : 316-323, 1988.
- 12) Genco, R.J., Zambon, J.J. and Christersson, L.A. : Use and interpretation of microbiological assays in periodontal diseases. Oral microbiol. Immunol., 1 : 73-79, 1986.
- 13) Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Smith, C. and Dibart, S. : Microbial risk indicators for periodontal attachment loss. J. Periodont. Res., 26 : 293-296, 1991.
- 14) Hamada, S., Holt, S.C. and McGhee J.R. : Periodontal Disease : Pathogens and Host Immune Responses., Quintessence Publishing, Tokyo, 1991.
- 15) Simonson, L.G. Robinson, P.J., Pranger, R.J., Cohen, M.E. and Morton, H.E. : *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. J. Periodontol., 63 : 270-273, 1992.
- 16) 藤本 淳 : 成人型歯周炎における歯周病関連細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組織および歯肉縁下プラークからの検出—. 日歯周誌, 40 : 389-399, 1998.
- 17) Fives-Taylor, P.M., Mayer, D.H., Sreenivasan, P. K. and Mintz, K.P. : Invasion of cultured epithelial cells by periodontopathogens., Genco, R., Hamada, S., McGhee, T.L.J. and Mergenhausen S., Molecular pathogenesis of periodontal disease, American society for microbiology, Washington, DC 20005, 1994, 57-68.
- 18) Genco, C.A., Cutler, C.W., Kapczynski, D., Maloney, K. and Arnold, R.R. : Novel mouse model to study the virulence of and host response to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. Infect. Immun., 59 : 1255-1263, 1991.
- 19) Neiders, M.E., Chen, P.B., Suido, H., Reynolds, H. S., Zambon, J.J., Shlossman, M. and Genco, R.J. : Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodont. Res., 24 : 192-198, 1989.
- 20) Sundqvist, G., Fidgor, D., Hanstrom, L., Sorlin, S. and Sandstrom, G. : Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. Scand. J. Dent. Res., 99 : 117-129, 1991.
- 21) van Steenberg, T.J., Delemarre, F.G., Namavar, F. and De Graaff, J. : Differences in virulence within the species *Bacteroides gingivalis*. Antonie Leeuwenhoek, 53 : 233-244, 1987.
- 22) Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, I. and Hamada, S. : Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. J. Clin. Microbiol., 37 : 1426-1430, 1999.
- 23) 岡田 宏, 木村重信, 石川 烈, 萩原さつき, 長谷川紘司, 小林 誠, 山岡 昭, 上田雅俊, 青野正男, 前田勝正 : オフロキサシン配合徐放性歯周ポケット挿入材 (PT-01) の歯周治療への応用—臨床症

- 状に与える影響一. 日歯周誌, 30 : 1141-1155, 1988.
- 24) Löe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. Acta Odontol. Scand., 21 : 533-551, 1963.
 - 25) 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.
 - 26) Evans, R.T., Klausen, B., Ramamurthy, N.S., Golub, L.M., Sfintescu, C. and Genco, R.J. : Periodontopathic potential of two strains of *Porphyromonas gingivalis* in gnotobiotic rats. Arch. Oral Biol., 37 : 813-819, 1992.
 - 27) Klausen, B., Evans, R.T. and Genco, R.J. : Vaccination against *P. gingivalis* in experimental animals., Shah, H.N., Mayrand, D. and Genco, R.J., Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*., CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1993, 341-349.
 - 28) Hamada, S., Amano, A., Kimura, S., Nakagawa, I., Kawabata, S. and Morisaki, I. : The importance of fimbriae in the virulence and etiology of some oral bacteria. Oral microbiol. Immunol., 13 : 129-138, 1998.
 - 29) Okuda, K. : Attachment mechanisms and colonization., Shah, N., Mayrand, D. and Genco, R.J., Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*., CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1993, 139-158.
 - 30) Fujiwara, T., Nakagawa, I., Morishima, S., Takahashi, I. and Hamada, S. : Inconsistency between the fimbrillin gene and the antigenicity of lipopolysaccharides in selected strains of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol. Lett., 124 : 333-342, 1994.
 - 31) Hamada, S., Fujiwara, T., Morishima, S., Takahashi, I., Nakagawa, I., Kimura, S. and Ogawa, T. : Molecular and immunological characterization of the fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. Immunol., 38 : 921-930, 1994.
 - 32) Frank, R.M. : Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. J. Periodont. Res., 15 : 563-573, 1980.
 - 33) Saglie, F.R., Carranza, Jr., F.A., Newman, M.G., Cheng, L. and Lewin, K.J. : Identification of tissue-invasive bacteria in human periodontal disease. J. Periodont. Res., 17 : 452-455, 1982.
 - 34) Christersson, L.A., Albin, B., Zambon, J.J., Wikesjö, U.M.E. and Genco, R.J. : Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light immunofluorescence and culture techniques. J. periodontol., 58 : 529-539, 1987.
 - 35) Weinberg, A., Belton, C.M., Park, Y. and Lamont, R.J. : Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infect. Immun., 65 : 313-316, 1997.
 - 36) Lamont, R.J., Chan, A., Belton, C.M., Izutsu, K.T., Vasel, D. and Weinberg, A. : *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infect. Immun., 63 : 3878-3885, 1995.

連絡先 :

岩手医科大学歯学部歯科保存学第二講座歯周病学教室

〒020-8505 岩手県盛岡市中央通 1-3-27