高齢者における歯周病の唾液検査に関する研究

久野 彰子*¹ 仲谷 寛*¹ 佐藤 勉*² 鴨井 久一*¹

*¹日本歯科大学歯学部歯周病学講座

*²日本歯科大学歯学部衛生学講座

(2002年7月6日受理)

Study on a Saliva Test for Periodontal Disease in the Elderly

Akiko Hisano*¹, Hiroshi Nakaya*¹, Tsutomu Sato*² and Kyuichi Kamoi*¹

*¹Department of Periodontology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

*²Department of Preventive and Community Dentistry, School of Dentistry at Tokyo,
The Nippon Dental University

Accepted for publication 6 July 2002

We studied risk indicators in saliva for periodontal disease in the elderly. Thirty-six subjects over 65 years old (15 men and 21 women) were divided into 4 groups based on clinical evaluation: 7 with healthy gingiva or gingivitis, 11 with moderate periodontitis, 9 with severe periodontitis, and 9 edentulous subjects. Whole saliva samples were analyzed for the presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, and *Treponema denticola* using polymerase chain reaction (PCR) method. We studied the relationship of periodontal parameters to the presence of these periodontopathic bacteria, lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), and interleukin-1 (IL-1) gene polymorphism. The prevalence of *Bacteroides forsythus* in subjects with severe periodontitis was significantly higher than in those with healthy gingiva or gingivitis ($p < 0.05$). LDH activity increased proportionally with the advance of periodontitis ($p < 0.05$). AST and IL-1 polymorphism did not correlate significantly with periodontal status. This suggests that the presence of *Bacteroides forsythus* and LDH activity in whole saliva are possible to be risk indicators for periodontal disease in the elderly. J Jpn Soc Periodontol 44: 261~272, 2002.

Key words : elderly, saliva, PCR, LDH

要旨 : 本研究の目的は、高齢者の歯周病を診断する唾液中の因子について検討することである。65歳以上で、健常群7名、歯周炎の中等度群11名、重度群9名、また無歯顎群9名の計36名を被験者とした。全唾液を用いて、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*をPolymcrase chain reaction法(PCR法)にて検出、Lactate dehydrogenase (LDH)やAspartate aminotransferase (AST)の活性値測定、およびインターロイキン1 (IL-1)の遺伝子多型を検索し、各群の比較、および臨床パラメーターとの関連を調べた。その結果、*Bacteroides forsythus*の検出率が重度群で健常群より有意に高かった ($p < 0.05$)。また、LDH活性は歯周病が重度になるほど高くなった ($p < 0.05$)。AST活性とIL-1の遺伝子多型においては、歯周病との明らかな関連が認められなかった。よって、唾液から検出される*Bacteroides forsythus*の有無とLDHの値は、高齢者の歯周病診断に有用であることが示唆された。

索引用語 : 高齢者, 唾液, PCR, LDH

緒 言

高齢になると歯周病に罹患している者の割合が増加するが^{1,2)}、歯周病は急性期と慢性期を繰り返しながら慢性的に移行するため、自覚症状も比較的少なく、重度になるまで歯科医師の診断を受けないまま放置されることが多い。また一部の高齢者では、寝たきりや施設への入所によって歯科を受診する機会が減少し^{3,4)}、そのことが歯周病を悪化させる原因ともなっている。今後は「8020 運動」や「健康日本 21」の政策により歯を多く有する高齢者の増加が予測されるが、いかに歯をう蝕や歯周病に罹患させずに健全に保っていくかが大きな課題となる。近年、歯周病は血液の流動性や血栓の形成、また血糖のコントロールに影響を与え、虚血性心疾患や糖尿病のリスク因子の一つである可能性が報告されている^{5,6)}。高齢者にとって歯周病を予防、もしくは治療することは、歯の問題に留まらず、全身の健康を考えるうえにも重要なことである。

歯周病の診査では全顎的な口腔内診査が大切なことはいままでもない。しかし、スクリーニングを簡便な方法で行うことができれば、自覚症状が少ないために歯科を受診しなかった高齢者にも適切な処置を早期に行うことができる。唾液は非侵襲的に採取することができ、歯肉溝滲出液やプラークを採取するより簡便に、また歯科医師以外でも行うことができるという利点がある。唾液中の因子と歯周病との関連が明らかになれば、唾液試料の利点を生かしてスクリーニングへの応用も可能になると考えられる。

歯周病の発症と進行には *Actinobacillus actinomyces* *actinomycetemcomitans* (以下 *A. actinomycetemcomitans*)、*Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. gingivalis*)、*Prevotella intermedia* (以下 *P. intermedia*)、*Bacteroides forsythus* (以下 *B. forsythus*)、*Treponema denticola* (以下 *T. denticola*) などの細菌が関連することが報告されている⁷⁻¹¹⁾。本研究では、特異的、かつ感度の高い検出が可能な PCR 法を用いてこれらの細菌を唾液より検出した。また、細胞の傷害によって遊出する Lactate dehydrogenase (LDH) と Aspartate aminotransferase (AST)、宿主の遺伝的要因としてインターロイキン 1 (IL-1) の遺伝子多型を同一試料より検索し、高齢者の歯周病と関連する因子について検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. 被 験 者

日本歯科大学歯学部附属病院に来院した 65 歳以上の患者で、無歯顎の者 9 名 (以下無歯顎群)、歯周組織が健常もしくは歯肉炎のみの者 7 名 (以下健常群)、成人性歯周炎 (慢性歯周炎) のある者 20 名の計 36 名を対象とした。成人性歯周炎のある者 20 名のうち、4 mm 以上 6 mm 未満の歯周ポケットがあり、骨吸収が歯根の 1/2 未満の者 11 名を中等度群、6 mm 以上の歯周ポケットがあり、骨吸収が歯根の 1/2 以上である者 9 名を重度群とした。各群の平均年齢は無歯顎群 75.7 歳、健常群 70.6 歳、中等度群 74.4 歳、重度群 71.9 歳で統計学的な有意差は認められなかった。

患者には研究の目的、方法を説明し十分な同意を得た後、唾液の採取および歯周組織検査、および自覚症状についてのアンケート調査を行った。なお糖尿病などの歯周組織に影響を及ぼす疾患がある場合、過去 6 カ月間に抗菌剤の服用がある場合、1 カ月以内に観血処置している場合は除外した。また口腔粘膜に義歯などによる褥瘡、びらんがある場合も除外した。

2. アンケート調査

被験者には、歯の状態を説明する前にアンケート用紙を渡し、歯周病の症状に関連する以下の項目について、「ない」、「たまにある」、「時々ある」、「いつもある」の 4 段階で記入式の調査を行った。「ない」を 0 点、「たまにある」を 1 点、「時々ある」を 2 点、「いつもある」を 3 点として、合計を各人のスコアとした。

- 1) 現在、歯がぐらぐらしますか。
- 2) 現在、歯ぐきを押すと膿が出たりすることがあります。
- 3) 現在、歯ぐきがむずがゆく、歯が浮いた感じがありますか。
- 4) 現在、歯ぐきが赤く腫れてプヨプヨすることがありますか。
- 5) 現在、口臭があると思いますか。

3. 唾液試料の採取

5 分間のパラフィン咀嚼刺激による全唾液を滅菌スピッツ管に採取した。被験者には食事、たばこ、口腔内清掃は唾液採取の 1 時間前までに行うよう、また当日は含嗽剤を使用しないよう指導した。採取は静かな部屋で午前中に行った。

4. 口腔内診査

唾液の採取後、すべての歯について以下の項目を計測値 6 点法にて同一診査者が測定した。また、二等分

法にて全顎のエックス線撮影を行った。

1) プラーク指数 (以下 PII)

Silness & Løe のプラーク指数¹²⁾を準用した。

2) 歯肉炎指数 (以下 GI)

Løe & Silness の歯肉炎指数¹³⁾を準用した。

3) プロービングデプス (以下 PD)

約 25 g の圧力で N-2 プローブ (Nordent, USA) を挿入し, 1 mm 単位で測定した。

4) 臨床的アタッチメントレベル (以下 CAL)

PD に準じて 1 mm 単位で測定した。

5) プロービング時の出血 (以下 BOP)

5. 唾液試料の測定

1) 唾液中の細菌検出

唾液試料は 100°C 15 分間加熱後, -30°C にて保存した。唾液試料中の細菌の検索は, *A. actinomyces*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus*, *T. denticola* の 5 菌種について PCR 法を用いて行った。各細菌に特異的なプライマーは Ashimoto らの報告¹⁴⁾に基づき 16 s rRNA の遺伝子配列の一部を用いた。

PCR 法は, Ready-To-Go™ PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech, UK) を用いて行った。各ビーズには 1.5 U Taq DNA polymerase, 200 μmol/l dNTP, 10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l KCl, 1.5 mmol/l MgCl₂, と BSA が含まれている。この Ready-To-Go™ のチューブにプライマーと唾液試料を加え, 全体が 25 μl になるように調整した。その後サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems Japan, Japan) を用い, 95°C 30 秒, 60°C 1 分, 72°C 1 分を 36 サイクル行い, 各細菌の DNA の増幅を行った。増幅された DNA 産物を 5% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し, ゲルを 0.5 μg/ml のエチジウムブロマイドで染色後, 300 nm の紫外線ライト下でそれぞれの細菌の検出を行った。

2) 唾液中の LDH の測定

LDH 活性の測定は L タイプワコー LDH (和光純薬, 日本) を用いて Wroblewski-LaDue 法¹⁵⁾にて行った。測定には日立 7450 型自動分析装置 (日立製作所, 日本) を用いた。

アイソザイムの検出は電気泳動法により行った。支持体として, セルロースアセテート膜 Cellogel (Chemetron, Italy) を用い, 泳動用緩衝液は tris-HCl-ペロナール-EDTA 緩衝液 (pH 8.6) を用いた。4 μl の唾液を塗布し電圧 150 V で 50 分間泳動を行った後, 37°C, 30 分の染色を行った。デンシメトリーは 570 nm フィルターにて行った。

3) 唾液中の AST の測定

AST 活性の測定はピュアオート S AST (第一化学薬品, 日本) を用いて JSCC 標準化対応法¹⁶⁾にて行った。測定には日立 7450 型自動分析装置 (日立製作所, 日本) を用いた。

4) IL-1 遺伝子型の解析

唾液サンプルからのヒトゲノム DNA の抽出は, QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN K.K. Tokyo, Japan) を用いて行った。

IL-1 遺伝子多型の検査は Restriction fragment length polymorphisms (RFLP 法) により行った。IL-1 A+4845 と IL-1 B+3954 のプライマーは McDevitt ら¹⁷⁾の報告に準じたものを用いた。PCR 試薬として 1.25 U AmpliTaq Gold (Perkin Elmer, USA), 2 mmol/l dNTP (TAKARA Biolabs, Japan), 1.5 mmol/l MgCl₂ を用い, この PCR 試薬にプライマーと抽出した DNA を加え, 全体を 50 μl に調整した。その後サーマルサイクラー (PJ 2000, Perkin Elmer, USA) を用い, 95°C 30 秒, 67°C 30 秒, 72°C 30 秒を 45 サイクル行い, DNA の増幅を行った。IL-1 A+4845 では, 15 μl の PCR 産物に対して *Fnu4HI* (New England Biolabs, USA) を 0.25 μl 加え, 37°C で 16 時間以上消化した。また, IL-1 B+3954 は 15 μl の PCR 産物に対して *Taq I* (New England Biolabs, USA) を 0.25 μl 加え 65°C で 16 時間以上消化した。消化産物を 3% アガロースゲルを用いて, 電気泳動により分離した。

遺伝子型の判定は, IL-1 A+4845 は 29 bp, 78 bp, 124 bp に断片ペプチドが生じたものをアリル 1, 78 bp, 153 bp に断片ペプチドを生じたものをアリル 2 とした。また, IL-1 B+3954 では 12 bp, 85 bp, 97 bp に断片ペプチドが生じたものをアリル 1, 12 bp, 182 bp に断片ペプチドを生じたものをアリル 2 とした。

6. 統計学的分析

細菌検出率の群間での比較は比率の差の検定, 臨床パラメーターとの関連はフィッシャーの直接確率計算法を用いて判定した。臨床パラメーターにおいて, PII は全体の平均値である 0.6 を, GI は全体の平均値である 0.2 という値を 2 群に分ける際の基準値として用いた。また, PD は 4 mm 以上の部位の有無, CAL は 6 mm 以上の部位の有無, BOP は (+) の部位の有無で 2 群に分けて検討した。酵素活性値の群間での比較は一元配置分散分析法, 臨床パラメーターとの関連はピアソンの相関係数の検定を用いた。

結 果

1. 被験者の口腔内状態

健常群, 中等度群, 重度群のそれぞれの PII, GI, PD, CAL の平均値, および BOP (+) 部位の割合を表 1 に示す。PD の平均値は, 健常群 1.70 mm, 中等度群 1.95 mm, 重度群 2.46 mm で健常群と重度群, 中等度群と重度群との群間に統計学的な有意差が認められた ($p < 0.01$)。また BOP (+) 部位の割合は健常群と重度群, 中等度群と重度群との群間に統計学的な有意差が認められた ($p < 0.01$)。

図 1 各群における自觉症状の有無

2. 被験者の自觉症状

歯周病の症状に関連する, 歯の動揺, 排膿, 歯の浮いた感じ, 歯肉の発赤, 口臭の自觉についてアンケート調査したところ, 5 項目全てについて「ない」と答えたスコアが 0 点の者は図 1 に示すように, 健常群 7 名のうち 5 名 (71.4%), 中等度群 11 名のうち 6 名 (54.5%), 重度群 9 名のうち 2 名 (22.2%) であった。また, 各群のスコアの平均値は健常群 0.8 点, 中等度群 1.1 点, 重度群 5.0 点であった。

3. 細菌の検出

1) 群間の比較

無菌顎群, 健常群, 中等度群, 重度群における *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus*, *T. denticola* の検出率を表 2 に示す。*A. actinomycetemcomitans* の検出率は, 群間で統計学的な有意差は認められなかった。*P. gingivalis* の検出率は, 無菌顎群と健常群, 中等度群, 重度群との間に統計学的な有意差が認められた ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$)。*P. intermedia* の検出率は, 無菌顎群と健常群, 中等度群, 重度群との間に統計学的な有意差が認められた ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$)。*B. forsythus* の検出率は, 無菌顎群と中等度群, 重度群との間に統計学的な有意差が認められた ($p < 0.01$, $p < 0.01$)。また, *B. forsythus* は健常群と重度群との間に統計学的な有意差が認められた ($p <$

表 1 臨床パラメーターの平均値

	PII	GI	PD(mm)	CAL(mm)	BOP(+) 部位の割合(%)
全体	0.58±0.31	0.15±0.17	2.05±0.45	2.38±0.55	7.41±8.73
健常群	0.47±0.32	0.05±0.09	1.70±0.31	2.27±0.80	2.21±3.41
中等度群	0.56±0.34	0.15±0.17	1.95±0.27	2.24±0.35	4.52±3.66
重度群	0.66±0.27	0.23±0.19	2.46±0.44	2.63±0.48	14.98±11.07
平均値±標準偏差					** $p < 0.01$

表 2 細菌の検出率 (%)

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>B. forsythus</i>	<i>T. denticola</i>
全体	8.3	75.0	33.3	52.8	52.8
無菌顎群	0	22.2	0	11.1	0
健常群	14.3	85.7	42.9	42.9	71.4
中等度群	9.1	90.9	36.4	72.7	63.6
重度群	11.1	100.0	55.6	88.9	77.8

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

表 3 PII の平均値と細菌の検出

PII 平均	<i>A. actinomycetemcomitans</i>		PII 平均	<i>P. gingivalis</i>		PII 平均	<i>P. intermedia</i>	
	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)
0.6 以上	3	12	0.6 以上	15	0	0.6 以上	7	80
0.6 未満	0	12	0.6 未満	10	2	0.6 未満	5	7
p=0.156			p=0.188			p=0.552		

PII 平均	<i>B. forsythus</i>		PII 平均	<i>T. denticola</i>	
	(+)	(-)		(+)	(-)
0.6 以上	14	1	0.6 以上	12	3
0.6 未満	5	7	0.6 未満	7	5
p=0.006			p=0.212		

表 4 GI の平均値と細菌の検出

GI 平均	<i>A. actinomycetemcomitans</i>		GI 平均	<i>P. gingivalis</i>		GI 平均	<i>P. intermedia</i>	
	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)
0.2 以上	0	9	0.2 以上	9	0	0.2 以上	7	2
0.2 未満	3	15	0.2 未満	16	2	0.2 未満	5	13
p=0.279			p=0.436			p=0.019		

GI 平均	<i>B. forsythus</i>		GI 平均	<i>T. denticola</i>	
	(+)	(-)		(+)	(-)
0.2 以上	8	1	0.2 以上	8	1
0.2 未満	11	7	0.2 未満	11	7
p=0.149			p=0.149		

表 5 PD 4 mm 以上の部位の有無と細菌の検出

PD	<i>A. actinomycetemcomitans</i>		PD	<i>P. gingivalis</i>		PD	<i>P. intermedia</i>	
	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)
PD $\geq$ 4	2	18	PD $\geq$ 4	19	1	PD $\geq$ 4	9	11
PD<4	1	6	PD<4	6	1	PD<4	3	4
p=0.844			p=0.459			p=0.636		

PD	<i>B. forsythus</i>		PD	<i>T. denticola</i>	
	(+)	(-)		(+)	(-)
PD $\geq$ 4	16	4	PD $\geq$ 4	14	6
PD<4	3	4	PD<4	5	2
p=0.088			p=0.668		

0.05)。 *T. denticola* の検出率は、無歯顎群と健常群、中等度群、重度群との間に統計学的な有意差が認められた ($p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.01$)。

2) 歯周病の臨床パラメーターとの関連性

PII, GI, PD, CAL, BOP と細菌検出の有無、およびフィッシャーの直接確率計算法による p 値を表 3 から表 7 に示す。 *P. intermedia* の検出と GI との間

表 6 CAL 6 mm 以上の部位の有無と細菌の検出

CAL	<i>A. actinomycetemcomitans</i>		CAL	<i>P. gingivalis</i>		CAL	<i>P. intermedia</i>	
	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)
CAL $\geq$ 6	2	10	CAL $\geq$ 6	12	0	CAL $\geq$ 6	6	6
CAL<6	1	14	CAL<6	13	2	CAL<6	6	9
p=0.414			p=0.300			p=0.448		
CAL	<i>B. forsythus</i>		CAL	<i>T. denticola</i>				
	(+)	(-)		(+)	(-)			
CAL $\geq$ 6	11	1	CAL $\geq$ 6	10	2			
CAL<6	8	7	CAL<6	9	6			
p=0.038			p=0.186					

表 7 BOP (+) の有無と細菌の検出

BOP	<i>A. actinomycetemcomitans</i>		BOP	<i>P. gingivalis</i>		BOP	<i>P. intermedia</i>	
	(+)	(-)		(+)	(-)		(+)	(-)
BOP (+)	3	18	BOP (+)	20	1	BOP (+)	9	12
BOP (-)	0	6	BOP (-)	5	1	BOP (-)	3	3
p=0.455			p=0.402			p=0.557		
BOP	<i>B. forsythus</i>		BOP	<i>T. denticola</i>				
	(+)	(-)		(+)	(-)			
BOP (+)	17	4	BOP (+)	16	5			
BOP (-)	2	4	BOP (-)	3	3			
p=0.044			p=0.227					

に統計学的に有意な関連が認められた ($p<0.05$)。また, *B. forsythus* の検出と PII, CAL, BOP との間にそれぞれ統計学的に有意な関連が認められた ($p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.05$)。

4. 細菌の組み合わせおよび種類の数

1) 群間の比較

検出された細菌の組み合わせを表 8 に示す。無歯顎群では, 細菌が検出された 3 名が *P. gingivalis* および *B. forsythus* の単独の検出であった。重度群では *P. gingivalis* 単独の検出が 1 名にみられた他はすべて 3 菌種以上の組み合わせであり, 5 菌種の検出も 1 名に認められた。検出される細菌の種類数を検討した結果, 無歯顎群と健常群, 中等度群, 重度群との間で統計学的な有意差が認められた ($p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.01$)。

2) 歯周病の臨床パラメーターとの関連性

PII, GI, PD, CAL, BOP と検出された細菌の種類の数について検討を行った。PII と 3 菌種以上の細菌

の検出との間には統計学的に有意な関連が認められた ($p<0.05$)。

5. LDH の活性値

1) 群間の比較

各群の LDH 活性値を図 2 に示す。各群の平均値は無歯顎群で 284.3 U/l, 健常群で 297.3 U/l, 中等度群で 416.9 U/l, 重度群で 676.3 U/l であり, 歯周病が重度なほど活性値は有意に高くなった ($p<0.05$)。各群で活性値を比較すると, 無歯顎群と重度群, および健常群と重度群との間に統計学的な有意差が認められた ($p<0.05$, $p<0.05$)。アイソザイムのパターンは平均で LDH 1 が 1.6%, LDH 2 が 5.8%, LDH 3 が 12.7%, LDH 4 が 25.6%, LDH 5 が 54.6% であり, 各群において統計学的な有意差は認められなかった。

2) 歯周病の臨床パラメーターとの関連性

PII, GI, PD, CAL, BOP と LDH の活性値との関連性を検討したところ, 図 3 に示すように BOP

表 8 各群の細菌の組み合わせ

		無歯顎群	健常群	中等度群	重度群
未検出		6	0	0	0
1 菌種検出	<i>P. g.</i>	2	1	1	1
	<i>P. i.</i>	0	1	1	0
	<i>B. f.</i>	1	0	0	0
2 菌種検出	<i>P. g.</i> , <i>T. d.</i>	0	2	1	0
	<i>P. g.</i> , <i>B. f.</i>	0	0	2	0
3 菌種検出	<i>P. g.</i> , <i>B. f.</i> , <i>T. d.</i>	0	0	2	3
	<i>P. g.</i> , <i>P. i.</i> , <i>B. f.</i>	0	0	0	1
4 菌種検出	<i>A. a.</i> , <i>P. g.</i> , <i>B. f.</i> , <i>T. d.</i>	0	1	1	0
	<i>P. g.</i> , <i>P. i.</i> , <i>B. f.</i> , <i>T. d.</i>	0	2	3	3
5 菌種検出	<i>A. a.</i> , <i>P. g.</i> , <i>P. i.</i> , <i>B. f.</i> , <i>T. d.</i>	0	0	0	1

A. a. : *A. actinomycetemcomitans*

P. g. : *P. gingivalis*

P. i. : *P. intermedia*

B. f. : *B. forsythus*

T. d. : *T. denticola*

図 2 各群における LDH の活性値

図 3 LDH の活性値と BOP (+) の部位数

図 4 LDH の活性値と PD ≥ 4 mm の部位数

(+) の部位数と LDH の活性値との間に相関係数 0.58 で統計学的に有意な正の相関が認められた ($p < 0.01$)。また図 4 に示すように PD 4 mm 以上の部位数と LDH の活性値との間にも相関係数 0.70 で統計学的に有意な正の相関が認められた ($p < 0.01$)。

3) カットオフ値の設定

LDH と臨床パラメーターとの間に相関が認められたため、健常群を疾患のない群、中等度群および重度群を疾患のある群としてカットオフ値の検討を行った。200 U/l, 300 U/l, 400 U/l, 500 U/l の値における敏感度および特異度を表 9 に示す。

6. AST の活性値

1) 群間の比較

AST の活性値は平均で 52.5 U/l であった。各群

表 9 各 LDH の活性値における敏感度と特異度

	200 U/l	300 U/l	400 U/l	500 U/l
敏感度	90.0%	70.0%	50.0%	40.0%
特異度	14.3%	57.1%	85.7%	100.0%

の平均値は無歯顎群で 41.5 U/l, 健常群で 37.7 U/l, 中等度群で 57.6 U/l, 重度群で 51.3 U/l であった。各群で AST の活性値において統計学的な有意差は認められなかった。

2) 歯周病の臨床パラメーターとの関連性

PII, GI, PD, CAL, BOP と AST の活性値との関連性を検討したところ, 図 5 に示すように BOP (+) の部位数と AST の活性値の間には相関係数 0.43 で統計学的に有意な正の相関関係が認められた ($p < 0.05$)。

7. IL-1 遺伝子多型の解析

IL-1 A+4845 アリル 1 とアリル 2 のヘテロの遺伝子 (1/2) を持つ者は全被験者 36 名中 3 名で 8.3% であった。残りの 33 名, 93.7% は IL-1 A+4845 アリル 1 のホモの遺伝子 (1/1) を持っていた。IL-1 B+3954 は全被験者の遺伝子型がアリル 1 のホモの遺伝子 (1/1) であった。IL-1 A+4845 のヘテロの遺伝子 (1/2) を持つ 3 名は健常群に 1 名と中等度群の 2 名で, 無歯顎群および重度群には認められなかった。この 3 名について, 特徴的な事項は見いだせなかった。

考 察

歯を失う主な原因はう蝕と歯周病であり, それらが感染症であることは周知の事実である。感染症は一般に『細菌, 宿主, 環境』の 3 つの因子が絡み合って起こるとされている。う蝕に関しては, 唾液中の *Mutans streptococci* や *Lactobacillus* の培養結果と唾液の分泌速度や緩衝能の検査, 食事調査などを組み合わせ, 個人のう蝕リスクの判定やスクリーニングを行う方法が確立されている¹⁸⁾。一方, 歯周病においては, エックス線写真やプローブを用いた診査以外に, 病態の指標となるものが日常臨床で用いるまでには確立されていないのが現状である。歯周病では重度になるまで自覚症状が出現しにくく, 本研究でも重度群では 78% の者に自覚症状があるものの, 中等度群では自覚症状のある者が 45% であり, 残りの 55% は全く自覚症状のない状態であった。今回, 各患者の予後についての検索は行っていないが, 実際重度群と判定された 9 名のうち 4 名が検査後に抜歯を余儀なくされており, 自覚症状のないうちから歯周病を診断し, 適切

図 5 AST の活性値と BOP (+) の部位数

な処置を行うことが歯を健全に保つうえで重要であると考えられた。スクリーニングはそのための一手段であり, 歯周病の病態を反映する適切な指標の選択が望まれている。

歯周病に関わる細菌は, 主にグラム陰性の偏性嫌気性菌または通性嫌気性菌が知られている。培養法でそれらの細菌を検出するには, サンプルを嫌気的な状態に保つための特殊な器具が必要である。一方, PCR 法では細菌が死滅していても微量の DNA さえあれば感度よく細菌を検出できるため, サンプルの採取や取り扱いが容易である¹⁹⁻²¹⁾。近年, この PCR 法を用いて細菌と歯周病の臨床パラメーターとの関連を調べた報告が多くなされており^{14,22-25)}, *A. actinomycetemcomitans* が歯周ポケットから除去されると PD の改善が得られやすいという報告²²⁾や *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *T. denticola* が BOP (+) の部位と関連して検出されたという報告²³⁾などがある。これらの報告では, ペーパーポイントを用いて歯周ポケットからサンプルを採取し, その部位の歯周組織の状態や予後を予測するために細菌を検索している。本研究では, 各部位の歯周組織の状態を診断するよりむしろ, 口腔内全体における歯周病の診断やスクリーニングを目的としているため, 唾液をサンプルとして用いた。Umeda ら²⁶⁾は唾液のサンプルと, ペーパーポイントにより歯周ポケットから採取したサンプルにおいて, PCR 法による細菌検出率を比較している。それによると *B. forsythus* や *A. actinomycetemcomitans* は唾液サンプルと歯周ポケットからのサンプル間で有意差がないものの, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola* に関しては, 唾液の方が高い検出率であったことを報告している。唾液サンプルの方が細菌の検出率が高かったことに関しては, 一部の歯周ポケットからのサンプル採取では, 全ての歯周組織に存在する細菌の検出ができないことを理由として述べている。

唾液をサンプルとして用いた場合は、部位特異性に関しては劣るが、一歯一歯の採取を行うより一回で口腔内全体における細菌について判定できるという利点がある。

本研究で調べた5種類の細菌のうち *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola* の4種類の細菌は、歯周病の重度分類間で検出率に有意な差は認められなかった。いずれも健常群での検出率が高く、特に *P. intermedia*, *P. gingivalis* の健常群における42.9%, 85.7%という検出率は、プライマー等の違いはあるが、藤本²³⁾の歯周炎患者から採取したプラークにおける36.0%, 65.8%という検出率よりも高い値であった。今回このように健常群においても細菌の検出率が高い結果となったのは、唾液サンプルに歯周組織以外の部位の細菌も含まれていることがその原因のひとつとして考えられた。歯周組織以外の部位の細菌については、本研究の無歯顎群において *P. gingivalis* や *B. forsythus* が検出され、歯が無くても舌や粘膜面などにこれらの細菌が存在することが示されている。また、総義歯装着者の舌背から黒色色素産生性嫌気性桿菌が検出されたとの報告²⁷⁾や歯周病患者の舌背から *P. gingivalis* や *P. intermedia* が検出されたとの報告²⁸⁾もある。今回、被験者が高齢であるために、健常群においても抜歯の既往があり、その原因は問診などによる診査では特定できなかったが、抜歯となった歯の歯周ポケットに生息していた細菌がそのまま口腔内に存在していることも考えられた。*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola* は、PDの深さやBOPとの関連があるという報告もあるが^{22,23)}、高齢者において唾液をサンプルとした場合には、歯周病の病態の指標とはならなかった。しかし、唾液中にこれらの細菌が存在することは、宿主の免疫能や細菌数の変動によっては将来的な歯周病のリスク因子となる可能性があり、このことは、高齢者において歯周病の罹患率が高いことにも一部関与していると考えられた。また、今後歯周病と全身疾患との関連がさらに明らかになれば、これらの細菌を虚血性心疾患や糖尿病のリスク因子として捉える必要もあると考えられた。

本研究で歯周病の重度分類と関連して検出されたのは *B. forsythus* であり、PIIやCAL, BOPという臨床パラメーターとの関連も認められた。矢野²⁹⁾は *B. forsythus* が歯周ポケットの深さやBOPと関連のあることを報告しており、清田ら³⁰⁾は *B. forsythus* が歯周炎の活動期に多く検出されることを報告している。今回、唾液中の *B. forsythus* が歯周病の病態と関連して検出された理由として、*B. forsythus* は舌や粘膜面に

存在することが少なく、歯周組織に比較的限局して存在することが予測された。これは、5種類の細菌のうち唯一 *B. forsythus* とPIIとの間に関連性が認められたことから予測できる。また、*B. forsythus* は単独で検出されることがほとんどなかったことから、他の細菌と共に歯周ポケットに存在し、歯周ポケットがなくなれば他の4種類の細菌より口腔内から排除されやすいことも考えられた。

本研究では細菌の有無だけではなく、酵素活性の測定や宿主の感受性に関わる遺伝的要因も唾液によって検討した。LDHやASTは歯肉溝滲出液中の活性値が歯周病の臨床パラメーターと関連することが報告されているが³¹⁻³⁴⁾、唾液での報告は少ない。LDHとASTは、細胞の傷害によって遊出する酵素である。LDHにおいては、LDH1からLDH5までのアイソザイムパターンによって酵素が遊出した部位を予測することが可能であるため、アイソザイムの検討も行った。唾液のLDHのアイソザイムパターンはLDH5やLDH4が多く、一方細菌のLDHのアイソザイムパターンはLDH1やLDH2が多いことを三橋ら³⁵⁾が報告している。今回の結果では、唾液のLDHはLDH4とLDH5が全体の80.2%を占めていることや、LDHの活性値とPIIとの間に関連が認められなかったことから、唾液のLDHは細菌の影響をほとんど受けないことが考えられた。本研究ではLDHの活性値とPD4mm以上の部位数、およびBOP(+)の部位数との間に正の相関が認められた。このことより、LDHは歯周病により組織の傷害があった部位から多く遊出して、歯周病の指標として有用であると考えられた。LDHでは200 U/l, 300 U/l, 400 U/l, 500 U/lの4種類の値において歯周病をスクリーニングする際の敏感度および特異度を算出した。4種類の値のうち、敏感度が高いのは200 U/lであるが、特異度は14.3%と低く、一方400 U/lでは特異度は高くなるが、敏感度が50%で歯周病の人の半数を見逃すこととなる。敏感度と特異度が共になるべく高く、かつ検査による見逃しを少なくするには、本研究の結果からは300 U/lが適当な値であると考えられたが、このことは対象人数を増やしてさらに検討する必要がある。

ASTもLDHと同じく細胞の傷害によって細胞から遊出する酵素であるが、臨床パラメーターとの相関はBOP(+)の部位数との間に若干認められるに過ぎず、有用性は低いと考えられた。これはもともとASTがLDHより遊出してくる酵素の活性値が低く、歯肉溝滲出液中のASTの変化が唾液にまで反映されなかった、もしくは唾液によって酵素活性が阻害され

たことによると予測された。

IL-1 の遺伝子多型については、Kornman ら³⁶⁾は非喫煙者において IL-1 A-889 アリル 2 と IL-1 B+3953 アリル 2 の組み合わせを持っている者、Gore ら³⁷⁾は IL-1 B+3953 アリル 2 を持っている者がそれぞれ重度成人性歯周炎に罹患する危険性が高いことを報告している。日本人については加藤ら³⁸⁾が IL-1 A-889 のアリル 1 と 2 の組み合わせが早期発症型歯周炎において多いこと、また伊佐津ら³⁹⁾が 20~23 歳を対象に IL-1 A-889 アリル 1 のホモと IL-1 B+3953 アリル 2 のホモの組み合わせが歯周病変を有している者で有意に多いことを報告している。本研究の結果では、歯周病のリスク因子とされている IL-1 A+4845 のアリル 1 とアリル 2 のヘテロの遺伝子型を持つ者が 3 名 (8.3%) であった。IL-1 A+4845 においてアリル 2 を持つ者の割合は Kornman ら³⁶⁾の報告では 44%、日本人においても約 30% と報告されており^{38,39)}、それらと比較すると 8.3% という値は低い値である。この 3 名については歯周病の病態において特に重度であるといった特徴はみられず、これは Armitage ら⁴⁰⁾の中国人における報告と似た結果であった。本研究では IL-1 A-889 と IL-1 B+3953 ではなく、IL-1 A+4845 と IL-1 B+3954 を調べているが、IL-1 A+4845 は IL-1 A-889 と 99% 以上対応しているもので、IL-1 B+3954 は IL-1 B+3953 と同一のものであるため^{17,40,41)}、検索した遺伝子の部位の違いが結果に影響したとは考えられなかった。本研究の被験者は高齢であっても比較的健康な人であるという特徴を有しており、それが結果に影響している可能性もあるが、IL-1 の遺伝子多型の分析は、高齢者における成人性歯周炎のスクリーニングといった用途では有用性に乏しいと考えられる。

本研究ではアンケート調査によって、自覚症状が重度歯周炎を示唆する一つの因子であった。しかし、中等度では歯周炎の病態があるにも関わらず自覚症状のないことが多く、自覚症状に関するアンケート調査だけでは歯周病のスクリーニングに不十分であった。しかし、歯周病の自覚症状がない場合でも、唾液から PCR 法によって検出される *B. forsythus* や細菌の種類の数、および LDH の値によって歯周病を診断し、スクリーニングが行える可能性が本研究によって示唆された。今後さらに対象を増やすと共に、各因子の組み合わせなどについても検討する必要があると考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の推進にあたりご協力頂いた元本学高齢者歯科診療科（歯科補綴学第Ⅲ講座）教授、稲葉繁先生をはじめ医局員各位、衛生学講座の田中とも子先生、歯周病学教室の大澤銀子先生、医局員各位に心からお礼申し上げます。

本論文の要旨は、第 44 回日本歯周病学会秋期学術大会 (2001 年 10 月 18 日) において発表した。

文 献

- 1) 厚生労働省医政局歯科保健課編：平成 11 年歯科疾患実態調査報告，財団法人口腔保健協会，東京，2001，149-150.
- 2) Burt BA : Periodontitis and aging : Reviewing recent evidence. J Am Dent Assoc, 125 : 273-279, 1994.
- 3) 金 容善，渋谷 徹，丹羽 均，神吉利美，久山 健，松浦英夫：特別養護老人ホームにおける歯科診療—第 1 報 全身状態と口腔内状況の関連について—。老年歯学，11 : 52-61, 1996.
- 4) 久保金弥，伊藤正樹，岩久文彦：老人保健施設入所中に歯科受診した老年患者の実態。老年歯学，15 : 288-292, 2001.
- 5) Beck JD, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S : Periodontal disease and cardiovascular disease. J Periodontol, 67 : 1123-1137, 1996.
- 6) Grossi SG, Genco R : Periodontal disease and diabetes mellitus : A two-way relationship. Ann Periodontol, 3 : 51-61, 1998.
- 7) Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G : The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodontol, 13 : 570-577, 1986.
- 8) Lai C-H, Listgarten MA, Shirakawa M, Slots J : *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. Oral Microbiol Immunol, 2 : 152-157, 1987.
- 9) Christersson LA, Fransson CL, Dunford RG, Zambon JJ : Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. J Periodontol, 63 : 418-425, 1992.
- 10) Haffajee AD, Socransky SS : Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000, 5 : 78-111, 1994.
- 11) Riviere GR, DeRouen TA, Kay SL, Avera SP, Stouffer VK, Hawkins NR : Association of oral spirochetes from sites of periodontal health with development of periodontitis. J Periodontol, 68 :

- 1210-1214, 1997.
- 12) Silness J, Löe H : Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odont Scand, 22 : 121-135, 1964.
- 13) Löe H, Silness J : Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. Acta Odont Scand, 21 : 533-551, 1963.
- 14) Ashimoto A, Chen C, Bakker I, 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.
- 15) Wroblewski F, LaDue JS : Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc Soc Exper Biol & Med, 90 : 210-213, 1955.
- 16) 日本臨床化学会 : ヒト血清中酵素活性測定の勧告法—アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ—. 臨床化学, 18 : 226-230, 1989.
- 17) McDevitt MJ, Wang H-Y, Knobelmann C, Newman MG, diGiovine FS, Timms J, Duff GW, Kornman KS : Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. J Periodontol, 71 : 156-163, 2000.
- 18) Bratthall D : 柳沢いづみ, 鈴木 章, 眞木吉信 (訳編) : カリエスリスク判定のてびき, エイコー, 1994, 17-40.
- 19) Watanabe K, Frommel TO : Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. J Dent Res, 72 : 1040-1044, 1993.
- 20) Watanabe K, Frommel TO : *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. J Clin Periodontol, 23 : 212-219, 1996.
- 21) Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D : Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in sub-gingival plaque samples. J Periodont Res, 31 : 496-501, 1996.
- 22) 高松伸博 : 歯周初期治療における *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の変動—DNA プローブと PCR 法による測定—. 口病誌, 64 : 534-543, 1997.
- 23) 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および歯肉縁下プラークからの検出—. 日歯周誌, 40 : 389-399, 1998.
- 24) Tran SD, Rudney JD, Sparks BS, Hodges JS : Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. J Periodontol, 72 : 1-10, 2001.
- 25) Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J : Risk indicators for harboring periodontal pathogens. J Periodontol, 69 : 1111-1118, 1998.
- 26) Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I, Slots J : The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodonto-pathic bacteria. J Periodontol, 69 : 828-833, 1998.
- 27) Könönen E, Asikainen S, Alaluusua S, Könönen M, Summanen P, Kanervo A, Jousimies-Somer H : Are certain oral pathogens part of normal oral flora in denture-wearing edentulous subjects? Oral Microbiol Immunol, 6 : 119-122, 1991.
- 28) Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, Clement M, De Graaff J : Intra-oral distribution of black-pigmented *Bacteroides* species in periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol, 3 : 83-85, 1988.
- 29) 矢野和子 : 細菌培養と DNA プローブによるヒト歯肉縁下細菌叢の *Bacteroides forsythus* の検索とその歯周疾患との関連性について. 日歯周誌, 39 : 1-11, 1997.
- 30) 清田 築, 齊藤 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 : 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—. 日歯周誌, 32 : 233-240, 1990.
- 31) Lamster IB, Mandella RD, Gordon JM : Lactate dehydrogenase activity in gingival crevicular fluid collected with filter paper strips : Analysis in subjects with non-inflamed and mildly inflamed gingiva. J Clin Periodontol, 12 : 153-161, 1985.
- 32) Smith QT, Au GS, Freese PL, Osborn JB, Stoltenberg JL : Five parameters of gingival crevicular fluid from eight surfaces in periodontal health and disease. J Periodont Res, 27 : 466-475, 1992.
- 33) Rutger Persson G, Page RC : Diagnostic characteristics of crevicular fluid aspartate aminotransferase (AST) levels associated with periodontal disease activity. J Clin Periodontol, 19 : 43-48, 1992.
- 34) Smith AJ, Alexander M, Mackenzie D, Lennon A, Riggio MP, MacFarlane TW : Microbial factors and gingival crevicular fluid aspartate aminotransferase levels. A cross-sectional study. J Clin Periodontol, 25 : 334-339, 1998.
- 35) 三橋百合子, 藤吉 令, 須藤尚紀, 植田伸夫 : 唾液

- の乳酸脱水素酵素の検討. 帝京医学雑誌, 18 : 263-268, 1995.
- 36) Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson Jr TG, Higinbottom FL, Duff GW : The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 24 : 72-77, 1997.
- 37) Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GMP : Interleukin-1 β^{+3953} allele 2 : association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, 25 : 781-785, 1998.
- 38) 加藤葉月 : 日本人における歯周炎患者および健常者のインターロイキン1遺伝子の多型について. *日歯周誌*, 42 : 1-12, 2000.
- 39) 伊佐津恭子, 小林 誠, 相内敏弘, 鈴木崇夫, 中谷一泰, 長谷川紘司 : 日本人の若年成人におけるインターロイキン-1遺伝子多型と歯周病変との関連性. *日歯周誌*, 42 : 200-207, 2000.
- 40) Armitage GC, Wu Y, Wang H-Y, Sorrell J, diGiovine FS, Duff GW : Low prevalence of a periodontitis associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol*, 71 : 164-171, 2000.
- 41) Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, diGiovine FS, Hart TC : Genetic polymorphisms of the IL-1 α and IL-1 β genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol*, 71 : 723-728, 2000.

連絡先 :

日本歯科大学歯学部歯周病学講座

〒102-8158 東京都千代田区富士見 2-3-16