

歯肉溝滲出液中の
Tannerella forsythia Forsythia Detaching Factor
に対する切断酵素活性の治療効果判定への応用

小野 裕貴

明海大学大学院 歯学研究科

歯学専攻

(指導：申 基喆 教授)

Application of Proteolytic Activity toward *Tannerella forsythia* Forsythia
Detaching Factor in Gingival Crevicular Fluid
to Determination of Therapeutic Effect

Yuki ONO

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor: Prof. Kitetsu SHIN)

要旨

本研究の目的は、歯周治療による慢性歯周炎患者由来歯肉溝滲出液（gingival crevicular fluid: GCF）中の FDF 切断酵素活性（FDF cleaving activity: FC activity）変化の検討を行い、歯周治療の評価指標としての FC activity の有効性を明らかにすることである。

慢性歯周炎患者20 人に歯周病検査を行い、適格性の得られた7 人に歯周治療を行った。GCF と歯肉縁下プラークは被験部位である clinically healthy sites (CH) , deep non-bleeding sites (DNB) , deep bleeding sites (DB) から歯周治療前 (BL)および歯周治療後 (PT) にそれぞれ採取し、FC activity の測定と *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) および *Treponema denticola* (*T. denticola*) 遺伝子の検出を行った。

その結果、被験歯平均値の比較において、FC activity は3群ともに PT において有意な減少が認められた。異なる2 つのパラメーター（PPD, CAL, GCF および FC activity）の減少率の相関分析では、PPD と CAL 間において有意な相関関係が認められた。プラーク中の3菌種の検出を行った結果、BL において DNB 群と DB 群の細菌検出率は 3菌種とも85.7 %であったが、PT においては、*T. forsythia* が検出された DB 群の1 部位を除いて検出されなかった。また BL および PT において、3菌種の検出部位と未検出部位における FC activity の比較を行った結果、3菌種とも有意差は

認められなかった. 一方で, 3菌種ともに BL と PT の比較では検出部位, 未検出部位ともに減少した.

本研究の結果より, FC activity が歯周治療評価の指標として有効である可能性が示唆された.

索引用語 : *Tannerella forsythia*, forsythia detaching factor, FC activity, GCF

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of periodontal treatment on forsythia detaching factor (FDF) cleaving activity (FC activity) in gingival crevicular fluid (GCF) derived from patients with periodontitis and to clarify the effectiveness of FC activity as an indicator of periodontal therapy evaluation.

Twenty patients were selected and periodontal treatment was conducted on 7 periodontitis patients who meet the inclusion criteria. GCF and subgingival plaque samples were collected from clinically healthy sites (CH), deep non-bleeding sites (DNB) and deep bleeding sites (DB) before (BL) and after (PT) treatment. Analyses were performed to measure FC activity and to detect *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Toreponema denticola*.

Comparisons of the average of site value indicated that there were significant reductions of FC activity in intra-group comparisons between BL and PT in all groups. Correlation analysis between two sets of parameters (the decreasing rate of PPD, CAL, GCF and FC activity) indicated that there was significant correlation between the decreasing rate of PPD and CAL.

As a result of PCR, the detection ratio of *T. forsythia*, *P. gingivalis* and *T. denticola* in DB and DNB group before treatment were 85.7 %, respectively. On the other hand, these bacteria were not detected post treatment with the exception of one DB site in which *T. forsythia* was

detected. There were no significant differences of the FC activity between the group with *T. forsythia*, *P. gingivalis* and *T. denticola* positive and those with negative at BL and PT. On the other hand, comparisons of the FC activity in the group with bacteria positive and negative indicated that there were reductions of FC activity in intra-group comparisons between BL and PT in all bacteria.

According to the results in this study, it was suggested possibility that FC activity might be effective as an indicator of periodontal therapy evaluation.

Keywords: *Tannerella forsythia*, forsythia detaching factor, FC activity, GCF

緒言

歯周ポケットには、500種類を超える細菌が存在し、そのうちの red complex と呼ばれる3種類の細菌が、歯周炎の発症、進行、増悪に重要な役割を担っていることが報告されている¹⁾。慢性歯周炎における歯周組織破壊は、連続的で緩慢な進行ではなく、比較的短期間に急激な組織破壊を生じる活動期と、長期間の非活動期を周期的に繰り返して進行する¹⁾。歯周組織破壊の程度は個人間においても異なり、また同一口腔内においても部位により大きく異なる。急激な組織破壊が生じる活動性期間として定義される歯周炎疾患活動性¹⁾は、プロービングポケット深さ(probing pocket depth : PPD) , クリニカルアタッチメントレベル(clinical attachment level : CAL) , プロービング時の出血 (bleeding on probing : BOP) , 排膿 などの臨床的な判断基準では十分に区別することは困難であることが指摘されているが^{2,3)} , 歯肉溝滲出液 (gingival crevicular fluid: GCF) 中のプロテアーゼ活性は、PPD , BOP , 排膿 , 歯周病原細菌数 , 歯周病原細菌に対する抗体レベルなどの臨床パラメーターと異なり、歯周炎疾患活動性を示すことが明らかとなっている^{4,7)}。さらに、GCF中に存在するプロテアーゼ活性を臨床的な判断基準に用いることで、歯周炎疾患活動性に関する信頼性の高い指標を提供することが可能となることが報告されている⁴⁾。プロテアーゼ活性は歯周炎の進行に伴って起こる歯周組織破壊に直接関連し、特にGCF中に存在する好中球エラスターゼとカテプシンGは歯周炎の状態と強い相関性を有していることが報告

されている⁸⁻¹³⁾。また Mailhot ら¹⁴⁾は、GCF 中に存在する好中球エラスターゼ、カタプシン G, さらに *P. gingivalis* が保有する Arg - gingipain (RGP activity) に対する歯周治療の効果を検討し、RGP activity が歯周炎疾患活動性を示すことを報告し、Eley と Cox ら¹⁵⁾もそれを支持する報告をしている。

歯周病原細菌の中で、*Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) は trypsin like protease¹⁶⁾, sialidase^{17, 18)}, bacteroides surface protein A¹⁹⁾, hemagglutinin²⁰⁾, S-layer^{21, 22)}, methylglyoxal²³⁾, apoptosis-inducing activity²⁴⁾, karilysin²⁵⁾, PrtH²⁶⁾, forsythia detaching factor (FDF)^{27, 28)}などの病原因子を保有することが報告されている。その中でも FDF は、536 アミノ酸残基から構成され、主要なフラグメントとして約 60 kDa の全長FDF フラグメントおよび、FDF Lys²⁶⁸ の C 末端側で切断された 28 kDa のフラグメントである FDFc が存在する²⁷⁾。

これまでに、FDF は健常者の GCF や慢性歯周炎患者の PPD ≤ 3 mm の部位から採取した GCF 中に含まれるプロテアーゼにより、Lys²⁶⁸のC 末端において切断を受けて FDFc フラグメントが生じる一方で、重度な歯周炎患者の GCF 中に含まれるプロテアーゼにより部分的、あるいは完全に分解されることが明らかとなっている²⁹⁾。このことから健常者の歯肉溝や慢性歯周炎患者の 3 mm 以下の歯周ポケットにおける FDF および FDFc の存在は、歯周炎の発症、増悪への関与が示唆されている。また、60 kDaFDF の Lys²⁶⁸ から上流3アミノ酸残基を模した合成オリゴペプチド [Ac-Arg-Ala-Lys-para-nitroaniline (pNA)] を用いて、GCF 中の FDF 切断酵素活性

(FDF cleaving activity: FC activity) の定量と、その由来に関する検討を行った。その結果、 trypsin などの serine protease を含め、複数のプロテアーゼが存在する慢性歯周炎患者や健常者由来の GCF には、60kDa-FDF を 28kDa-FDF へと切断、分解する潜在的なプロテアーゼ活性が存在することを示した²⁹⁾。さらに、特に重度な歯周炎に関与する *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *T. forsythia* は、FC activity を保有するが、一方で宿主由来プロテアーゼとして GCF 中に存在し、歯周炎への関与が報告されている好中球エラスターゼは FC activity を保有しないことが明らかとなっている³⁰⁾。

また、歯周治療前の慢性歯周炎患者および健常者から採取した GCF 中の FC activity の検討を行った結果、前者より採取した GCF は、後者と比較して高い FC activity を示し、さらにその活性は PPD と有意な相関関係を示すことが明らかとなり³⁰⁾、FC activity が簡易な歯周病診断指標として有用である可能性が示唆されている。しかし、FC activity を臨床上、歯周治療評価の指標として用いるならば、FC activity が歯周治療による歯周組織変化と関連する有益な情報を含んでいることを示す必要がある。

本研究では、未治療の慢性歯周炎患者から採取した GCF 中の FC activity が、健常者から採取した GCF 中の当該活性より有意に高値を示したこれまでの研究結果を踏まえ、GCF 中の FC activity を歯周治療前後で比較することで、当該活性が歯周治療評価の指標として有用であることを明らかにする。

材料と方法

被験者

明海大学歯学部附属明海大学病院歯周病科へ来院し、本研究への参加に同意の得られた慢性歯周炎患者20人に歯周病検査を行い、以下の選択基準を満たす7人を対象とした。慢性歯周炎患者の選択基準は、ベースライン時にプロービングポケット深さ (probing pocket depth : PPD) が3 mm以下かつプロービング時の出血 (bleeding on probing : BOP) 陰性の部位、PPD が6 mm 以上かつ BOP 陰性の部位、PPD が 6 mm 以上かつ BOP 陽性の部位が存在する歯が、同一口腔内にそれぞれ1歯以上存在する者とした。また除外基準は、過去3か月以内に歯周治療および抗菌薬の投与を受けている者、免疫反応に影響を及ぼす全身疾患の既往がある者、妊娠中の者とした。また喫煙歴があった場合は記録を行った。本研究は本学倫理審査委員会の承認 (承認番号A1002) を受けて行った。

口腔内検査

全ての被験者に歯周病検査およびデンタルX線写真撮影を行った。歯周病検査項目は PPD, CAL, BOP, GCF 量とした。

被験部位の選択

本研究では、Grayson ら³¹⁾の方法に従い、被験部位として患者一人につき clinically healthy (CH) (デンタルX線写真で骨吸収の認められない PPD 3 mm 以下かつ BOP 陰性の部位), deep non bleeding (DNB) (デンタルX線写真で骨吸収が認められ、PPD 6 mm以上かつBOP 陰性の部位), deep bleeding (DB) (デンタルX線写真で骨吸収が認められ、PPD 6 mm以上かつBOP 陽性の部位) の3群を設定した。

慢性歯周炎患者の被験歯は上顎前歯部および小臼歯部から選出したが、上記の条件を満たす被験歯が存在しない場合は大臼歯部からも選出した。

歯周治療

日本歯周病学会の治療指針³²⁾に従い、口腔衛生指導、スケーリング、ルートプレーニング、歯周外科手術、口腔機能回復治療を含む歯周治療を、明海大学歯学部附属明海大学病院歯周病科に所属する歯科医師が行った。歯周治療終了後再評価を行い、1か月から6か月毎に定期的なメンテナンスを行った。

GCF採取

GCF は、患者毎にCH, DNB, DBの3か所から採取し、歯周治療前 (baseline: BL) と歯周治療終了後 (posttreatment : PT) に同一部位より採取した。採取方法は被験歯をコットンロールにて簡易防湿後、歯肉縁上プラークが認められた場合には滅菌綿球にて注意深く除去し、スリーウェイシリンジで乾燥を行った。GCF は、Perio paper

(Oraflow, Smithtown, NY, USA)を歯肉溝底部または歯周ポケット底部まで挿入し, 30秒間静置後に採取した. 血液が混入したサンプルは廃棄した. GCF 採取後, 直ちに Periotron-8000 reader (Oraflow) にて GCF unit を測定した. その後, Perio paper を25 μl の保存用バッファー [10 mM CaCl_2 , 0.25 % (v/v) Triton X-100, 0.35 % (w/v) Brij 35] 中に浸漬し, 解析を行うまで- 80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した. GCF unit をGCF 量に換算することを目的に, 滅菌精製水を標準液として0.1 μl から1 μl まで, 0.1 μl ごとに計測した標準液を Perio paper に滴下し, Periotron-8000で unit を計測した. 各標準液に対し3回ずつ計測し, その平均値を使用して検量線を作成した. GCF の抽出は, Perio paper を解凍後, Graysonら³¹⁾の方法に従い行った. 全ての GCF サンプルについて, タンパク質濃度をBCA キット (Pierce-Warriner, Warrington, UK) を用いて測定し, 標準タンパク質濃度 0.5 mg/ml になるよう反応バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl] にて希釈した. 得られたGCF サンプルは解析を行うまで- 80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した. GCF サンプル保存および反应用バッファーに使用した試薬はRoche Diagnostics (Basel, Switzerland), Sigma - Aldrich (St.Louis, MO, USA) およびWako (Osaka, Japan) より購入した.

FDF切断酵素活性 (FC activity) の測定

FC activity の測定は, 呂ら³⁰⁾の方法に従い, 合成オリゴペプチド (Ac-RAK-pNA) を用いて行った. FC activity 測定のための合成オリゴペプチドは Hokkaido System

Science (Hokkaido, Japan) に合成を依頼した.

FC activity の測定は, 96穴マルチウェルプレートを用い, 各サンプルに対し2ウェル使用し, その平均値を算出した. 反応系はGCF サンプル10 μ l と反応バッファー100 μ l [50 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl, 100 mM dithiothreitol (DTT)] および合成オリゴペプチド10 μ l (最終濃度400 μ M RAK-pNA) を 37 °Cにて60分間反応後, 5 M 酢酸120 μ l を用いて反応停止し, 405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Multiskan JX, Thermo Scientific, Slough, UK) で測定した. 合成オリゴペプチドからの遊離 pNA の定量は, pNA の標準溶液を作製し, 段階希釈を行い, これを測定した 405 nm の吸光度を用いて検量線を作成して行った. 本研究において, FC activity は 遊離 pNA μ M / h=unit で表記した.

歯肉縁下プラークDNAの採取

歯肉縁下プラーク採取は, Onishiら³³⁾の報告に準じ, 滅菌ペーパーポイントを使用した. 採取部位の歯面をコットンロールにて簡易防湿後, 歯肉縁上プラークを除去し, 歯肉溝もしくは歯周ポケット内に滅菌ペーパーポイントを挿入後, 30 秒間静置し歯肉縁下プラークを採取した. 取り出したペーパーポイントは, ただちに滅菌精製水が入った1.5 mlマイクロチューブに移し, 解析を行うまで- 80 °Cにて保存した. ペーパーポイントが入った1.5 ml チューブをボルテックスミキサーにて60 秒間攪拌させ, 100 °Cにて10 分間加熱処理し, 細菌 DNA を抽出した.

プラーク中の歯周病原細菌の検出

プラーク中の *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *Treponema denticola* (*T. denticola*) の検出は, Ashimoto ら³⁴⁾の報告に従い, polymerase chain reaction (PCR) 法にて行った. 本研究に用いた 16S rRNA 遺伝子に対するプライマーを Table 1 に示す. *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* の検出は, 5 μ l の細菌 DNA 抽出物にプライマー(各 1.0 μ M) を含む 45 μ l の反応液 [GoTaq Master Mix (Promega, Tokyo, Japan)] を加え, サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した. 反応温度, 時間およびサイクル数は, 95 $^{\circ}$ C にて 2 分間加熱後, 熱変性を 95 $^{\circ}$ C にて 30 秒間, アニーリングを 60 $^{\circ}$ C にて 1 分間, 伸長反応を 72 $^{\circ}$ C にて 1 分間を 1 サイクルとして 36 サイクル行い, さらに伸長反応を 72 $^{\circ}$ C にて, 2 分間行った. その後, PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動により分離し, 2% 臭化エチジウム (Sigma-Aldrich) で染色後, 上記 3 菌種の増幅された 16S rRNA 遺伝子の有無を 300 nm の紫外線下で観察した.

統計分析

CH 群, DNB 群, DB 群における歯周治療前後 (BL および PT) の各パラメーターの比較には Wilcoxon signed-rank test を用い, 各パラメーターの減少率の相関分析には Spearman 順位相関係数を用いた. さらに細菌検出の有無による FC activity の

比較には Mann-Whitney U test を用いた。統計分析は統計ソフト SPSS version 20 (SPSS Japan , Tokyo, Japan) を使用した。

また CH 群, DNB 群, DB 群の 3 群間における各パラメーターの多重比較検定には Steel-Dwass を用い, 統計分析はオープンソース統計ソフト R version 2.8.1 (<http://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/2.8.1/R-2.8.1-win32.exe>) を使用した。 P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

結果

被験者および歯周病検査項目

7人の慢性歯周炎患者（男性5人，女性2人，平均年齢 53.6 ± 5.8 歳）の歯周病検査結果の平均値をTable 2 に，被験部位の歯周病検査結果をTable 3 に示す．慢性歯周炎患者における BL の平均 PPD は 3.8 ± 0.4 mmであり，PT の平均 PPD は 2.5 ± 0.2 mmであった．また BL の平均 CAL は 5.2 ± 0.5 mmであり，PT の平均 CAL は 4.0 ± 0.6 mmであった．PT の平均 PPD ，平均 CAL および平均 BOP は，BL と比較して有意に低値 ($P < 0.05$) を示した (Table 2)．被験部位各群の BL と PT の比較を行った結果，CH 群では PPD と CAL に有意差は認められなかったが，GCF は PT において有意に低値を示した．また DNB 群では，PPD, CAL および GCF は，BL と比較して，PT で有意に減少した．DB 群では，PPD と GCF は，BL と比較して PT で有意に減少したが，CAL では BL と比較して PT で数値の減少傾向は認められたものの，統計的有意差は認められなかった (Table 3)．

FDF切断酵素活性 (FC activity)

各群の BL, PT における FC activity を定量した結果，CH 群ではそれぞれ BL : 4.71 ± 0.45 unit, PT : 1.10 ± 0.07 unit, DNB 群では BL : 5.09 ± 0.59 unit, PT : 1.05 ± 0.07 unit, DB 群では BL : 6.29 ± 0.33 unit, PT : 0.89 ± 0.05 unitであり，全ての群において歯周治

療後に FC activity の有意な減少が認められた(Fig. 1). BL 時における3群間のFC activity を比較したところ有意差は認められず, さらに PT 時においても FC activity に有意差は認められなかった.

歯周治療による歯周病検査項目とFDF切断酵素活性(FC activity) の変化量と減少率

各群のBL とPT における PPD, CAL, GCF および FC activity の変化量 Δ (BL-PT) と減少率(% of BL) を解析した. まず変化量についてCH 群では, Δ PPD: -0.5 ± 0.4 mm, Δ CAL: -0.2 ± 0.6 mm, Δ GCF: -0.36 ± 0.11 μ l, Δ FC activity: -3.61 ± 0.45 unit であった. またDNB 群では Δ PPD: -3.3 ± 0.3 mm, Δ CAL: -3.7 ± 0.8 mm, Δ GCF: -0.94 ± 0.18 μ l, Δ FC activity: -4.03 ± 0.61 unit, そしてDB 群では Δ PPD: -3.0 ± 0.4 mm, Δ CAL: -2.5 ± 1.2 mm, Δ GCF: -0.83 ± 0.15 μ l, Δ FC activity: -5.40 ± 0.38 unitであった. 3群間の比較において, Δ PPDと Δ GCF では, DB 群, DNB 群は CH 群と比較して有意に減少した. Δ CALでは DNB 群のみ CH 群と比較して有意に減少し, Δ FC activity では DB 群がCH 群よりも有意に減少した(Table 4).

次に変化量を減少率(% of BL)として解析した結果, CH 群では PPD 減少率: 22.2 ± 10.2 %, CAL 減少率: 16.4 ± 7.6 %, GCF 減少率: 66.7 ± 8.7 %, FC activity 減少率: 75.7 ± 2.4 %であった. またDNB 群では, PPD 減少率: 48.5 ± 8.7 %, CAL 減少率: 51.5 ± 8.7 %, GCF 減少率: 65.3 ± 11.5 %, FC activity 減少率: 77.9 ± 3.0 %で

あり，DB 群では，PPD 減少率： $47.6 \pm 5.1\%$ ，CAL 減少率： $34.8 \pm 12.3\%$ ，GCF 減少率： $71.0 \pm 10.2\%$ ，FC activity 減少率： $85.7 \pm 1.5\%$ であった．各群の比較では，FC activity 減少率においてのみ DB 群が CH 群よりも有意に高値を示した（Table 4）．

歯周病検査項目とFDF切断酵素活性（FC activity）減少率の相関関係

PPD，CAL，GCF，FC activity それぞれの減少率の相関関係を解析した結果，PPD 減少率とCAL 減少率との間に統計学的に有意な正の相関関係（ $R = 0.831$ ， $P < 0.001$ ）（Fig. 2A）が認められたが，PPD 減少率と FC activity 減少率（ $r = 0.142$ ， $P = 0.601$ ），PPD 減少率とGCF 減少率（ $R = 0.291$ ， $P = 0.274$ ），CAL 減少率と FC activity 減少率（ $R = 0.016$ ， $P = 0.954$ ），CAL 減少率とGCF 減少率（ $R = 0.180$ ， $P = 0.505$ ），FC activity 減少率と GCF 減少率（ $R = 0.354$ ， $P = 0.179$ ）との間には有意な相関性は認められなかった（Fig. 2B-F）．

歯周病原細菌の検出

各群の BL ， PT 時における*T. forsythia* 16S rRNAの検出率を検討した結果，CH 群ではそれぞれBL：0%，PT：14.3%，DNB 群ではBL：85.7%，PT：0%，DB 群ではBL：85.7%，PT：20.0%であった．また*P. gingivalis* 16S rRNA の検出率は，CH 群ではそれぞれBL：0%，PT：14.3%，DNB 群ではBL：85.7%，PT：0%，DB 群ではBL：

85.7%, PT: 0%であり, *T. denticola* 16S rRNAの検出率は, CH 群ではそれぞれBL: 0%, PT: 0%, DNB 群ではBL: 85.7%, PT: 0%, DB 群ではBL: 85.7%, PT: 0%であった (Table 5).

さらに細菌検出の有無による FC activity の比較を行ったところ, BLでは*T. forsythia* 陰性部位 (5.06 ± 0.34 unit), 陽性部位 (5.81 ± 0.41 unit), *P. gingivalis* 陰性部位 (5.06 ± 0.34 unit), 陽性部位 (5.81 ± 0.41 unit), および *T. denticola* 陰性部位 (5.07 ± 0.38 unit), 陽性部位 (5.75 ± 0.39 unit) であり, 3菌種全てで, 細菌検出部位では FC activity が高値を示す傾向があるものの, 未検出部位と比較して有意差は認められなかった (Fig. 3A-C), また PT では*T. forsythia* 陰性部位 (1.01 ± 0.04 unit), 陽性部位 (1.02 ± 0.11 unit), *P. gingivalis* 陰性部位 (1.02 ± 0.04 unit), 陽性部位 (0.93 unit), および *T. denticola* 陰性部位 (1.01 ± 0.03 unit) であり, *T. denticola* の検出は認められなかった. PT において *T. forsythia* と *P. gingivalis* 検出の有無による FC activity に有意差は認められなかった. PT 時, *T. denticola* は全てのサンプルで検出されなかったため, 未検出サンプルのみを平均値 ± 標準誤差で示した (Fig. 3D-F).

考察

これまでの一連の研究結果より，GCF 中の FC activity は，慢性歯周炎患者の歯周ポケットや健常者の歯肉溝における FDF 分子量変化の予測を可能とするだけでなく，GCF 中の歯周炎診断指標として有用である可能性が示唆されている．本研究ではこれまでの研究結果を踏まえ，当該活性が歯周治療結果の評価指標として有用であることを明らかにするため，合成オリゴペプチド Ac-Arg-Ala-Lys-pNA を用いて，慢性歯周炎患者より採取した歯周治療前後の GCF 中の FC activity を測定し比較した．

歯周治療の効果に関して，歯周治療前後の被験者平均値の比較で平均 PPD，平均 CAL，平均 BOP の有意な減少が認められた．また被験部位平均値による各群内の歯周治療前後の比較においても DB 群，DNB 群の PPD，CAL，GCF，CH 群の GCF で有意な減少が認められた．これらより本研究において，歯周治療が効果的に行われたことが確認された．

FC activity に関して，歯周治療前後の各群内の比較で3群ともにFC activity の有意な減少が認められた．この結果は，Eleyら³⁵⁾の報告した歯周治療によるGCF中のtrypsin-like activity の減少と一致している．一方で，歯周治療前の3群間の比較では，CH 群で低い FC activity の傾向が認められたものの，CH 群，DNB 群およびDB 群の3群間に有意差は認められなかった．また，歯周治療後の3群間の比較でも，FC activity に有意差は認められなかった．呂ら³⁰⁾は，歯周治療前のDB 群，DNB 群はCH 群よりも有意に FC activity が高値を示したと報告している．これは本研究の結果と異なるが，

サンプル数の違いが影響している可能性がある。本研究では、興味深いことに、歯周治療前後の各群内の比較において、DNB 群とDB 群だけでなく、CH 群でも有意な FC activity の減少が認められ、さらに治療後のCH群の値は呂ら³⁰⁾が報告している健常者の健常部位 (PPD \leq 3 mm) と同程度であった。Lamster ら³⁶⁾は慢性歯周炎患者の PPD 1-3 mm の群では、歯周治療後に PPD の有意な減少は認められなかったが、 β -glucuronidase は有意に減少したことを報告しており、この結果は本研究と一致している。これらの結果は、慢性歯周炎患者のプロビング時の出血が無い、PPD 3 mm 以下の部位は、FC activity を指標とした場合には、健常者の健常部位と比較して当該活性が上昇していることを示唆するものである。このことは、従来、臨床的に健常と評価していた、慢性歯周炎患者のプロビング時の出血のない PPD 3 mm 以下の部位にも、歯肉縁下の機械的プラークコントロールを行う必要性を示唆している。

歯周治療による FC activity と歯周病検査項目の変化量と減少率に関して、全ての群で、歯周治療後に各パラメーターの改善が認められたが、変化量と減少率の両方で有意差が認められたのは FC activity におけるCH 群とDB 群の群間においてのみであった。DB 群はCH 群と比較して有意に FC activity 減少量が大きく、その減少率も有意に高値を示すことから、当該活性が特に重度な歯周炎に罹患した部位における歯周治療効果の評価に有用であることが示唆された。

また各パラメーターの減少率について、相関関係を解析した結果、PPD 変化量と CAL 変化量の間で有意な正の相関関係が認められた (Fig. 2A) 。その他のパラメータ

一の組み合わせでは有意な相関関係は認められなかったが、興味深いことにFig.2B, 2Dにおいて PPD , CAL 減少率 (X 軸) の変化に関わらず FC activity 減少率 (Y 軸) が60 % 以上を示していた. これは歯周治療後に PPD , CAL の減少が認められなくても, FC activity は減少していることを示しており, PPD , CAL の数値の減少として表れない歯周治療効果を FC activity を指標とした場合, 判断できる可能性が示唆される.

細菌検出に関して, 本研究では歯周病原細菌の検出率と, 細菌検出の有無による FC activity の比較を行った. まず, *T. forsythia*, *P. gingivalis* および *T. denticola* 遺伝子の検出を行った結果, 歯周治療前にDNB 群とDB 群の 85.7 % で検出された当該細菌は, 歯周治療後にはDB 群の1部位で *T. forsythia* が検出されたのを除き, 検出されなかった. この結果は, 歯周治療後に PCR 法による *T. forsythia*, *P. gingivalis* などの検出率が低下した Takamatsuら³⁸⁾の報告と一致している. 次に, 細菌検出の有無による FC activity の比較を行った結果, BL では *T. forsythia*, *P. gingivalis* および *T. denticola* の3菌種ともに, 検出部位では FC activity が高値を示す傾向があるものの, 有意差は認められなかった, また PT においても *T. forsythia* と *P. gingivalis* の検出部位と未検出部位に有意差はみとめられなかった. 呂ら³⁰⁾は歯周治療前において *T. forsythia* と *T. denticola* 検出部位の FC activity は, 未検出部位と比較すると, 有意に高値を示し, *P. gingivalis* についても統計学的に有意な差は認められなかったものの高い傾向を示したことを報告している. BL における本研究の結果は呂らの報告と

類似しており，GCF 中の FC activity は，本研究で検出した3菌種由来によるものであることを示唆しているが，一方で，呂らの報告と同様に3菌種の未検出部位にも当該活性が検出されており，GCF 中の当該酵素活性は当該細菌のみによるものではなく，複数の細菌によるものであることを示唆している．また PT において，3菌種が認められたプラークサンプルは少ないが，その FC activity は未検出部位と同程度であった．BL と比較して，PT において FC activity は，3菌種全てで有意に減少しているものの，当該細菌未検出の部位でも FC activity が検出されていることは，当該酵素活性が3菌種以外の細菌によるものも含まれていることが，この結果からも明らかとなった．Pederson³⁹⁾ は，*P. gingivalis* および *T. denticola* が未検出の慢性歯周炎患者の健常部位で，trypsin-like protease 活性が検出されることを報告し，これらのプロテアーゼ活性は *Bacteroides denticola* や *Capnocytophaga Sputigena* などの他の細菌に由来するものであると報告しており，本研究結果と一致している．一方で，細菌検出に関して Suido ら⁴⁰⁾ は，*P. gingivalis* が保有する酵素活性と細菌数の間に有意な相関関係があることを報告している．本研究では，当該細菌の定量は行っていないため，陽性部位と陰性部位による比較となっているが，より詳細な検討を行うため，今後は細菌数の定量的な評価方法を用いた相関性の検討を行う必要がある．

以上より，歯周治療後に PPD，CAL，GCF の減少を伴い，FC activity が有意に減少したことは，当該酵素活性が歯周炎の進行，重症化および治癒にとって重要な因子であり，歯周治療評価の指標として有効である可能性が示唆された．

本研究結果は、限られたサンプル数と期間によるものであるため、FC activity が歯周治療評価の指標や、将来的な歯周炎の進行を示す指標として有用であるかを示すため、今後は大規模で長期的な検討を行っていく予定である。

結論

FC activity の減少を伴う臨床パラメーターの有意な改善が認められたことより、当該酵素活性が歯周治療評価の指標として有効である可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました明海大学大学院歯学研究科歯学専攻再生再建医療系歯周病学 申 基詰教授に深甚なる謝意を表します．また御校閲を賜りました本学大学院歯学研究科歯学専攻機能系口腔微生物学 大森 喜弘教授，ならびに機能系生化学 友村 明人教授，機能発達医療系小児歯科学 渡部 茂教授に深く感謝致します．また種々の御教示と様々な御助言を下さった東京医科歯科大学大学院 荒川 真一教授，了徳寺大学健康科学部医学教育センター 中島 琢磨教授，またご協力いただいた明海大学歯学部口腔生物再生医工学講座歯周病学分野の各位に心より感謝申し上げます．

引用文献

- 1) Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM and Lindhe J: New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* **11**, 21-32, 1984
- 2) Fine DH and Mandel ID: Indicators of periodontal disease activity: an evaluation. *J Clin Periodontol* **13**, 533-546, 1986
- 3) Sandholm L: Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol* **13**, 19-26, 1986
- 4) Haffajee AD, Socransky SS and Goodson JM: Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* **10**, 257-65, 1983
- 5) Listgarten MA: Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* **13**, 418-30, 1986
- 6) Slots J, Rams TE and Listgarten MA: Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **3**, 47-52, 1988
- 7) Wilton JM, Johnson NW, Curtis MA, Gillett IR, Carman RJ, Bampton JL, Griffiths GS and Sterne JA: Specific antibody responses to subgingival plaque bacteria as aids to the diagnosis and prognosis of destructive periodontitis. *J Clin Periodontol* **18**, 1-15, 1991
- 8) Gustafsson A, Asman B, Bergström K and Söder PO: Granulocyte elastase in gingival crevicular fluid. A possible discriminator between gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* **19**, 535-40, 1992

- 9) Palcanis KG, Larjava IK, Wells BR, Suggs KA, Landis JR, Chadwick DE and Jeffcoat MK: Elastase as an indicator of periodontal disease progression. *J Periodontol* **63**, 237-42, 1992
- 10) Daranay. D. G. Beck. F. M. and Wahers. J.D: The relationship of gingival fluid leukocyte elastase activity to gingival fluid flow rate. *J Periodontol* **63**, 743-747, 1992
- 11) Kunimatsu K, Mine N, Kato I, Hase T, Aoki Y and Yamamoto K: Possible functions of human neutrophil serine proteinases, medullasin and cathepsin G, in periodontal tissue breakdown. *J Periodontal Res* **28**, 547-9, 1993
- 12) McCulloch CA: Host enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. *J Clin Periodontol* **21**, 497-506, 1994
- 13) Armitage GC, Jeffcoat MK, Chadwick DE, Taggart EJ Jr, Numabe Y, Landis JR, Weaver SL and Sharp T: Longitudinal evaluation of elastase as a marker for the progression of periodontitis. *J Periodontol* **65**, 120-8, 1994
- 14) Mailhot JM, Potempa J, Stein SH, Travis J, Sterrett JD, Hanes PJ and Russell CM: A relationship between proteinase activity and clinical parameters in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* **25**, 578-84, 1998
- 15) B.M. Eley and S.W. Cox: Correlation between gingivain/gingipain and bacterial dipeptidyl peptidase activity in gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss in chronic periodontitis patients. A 2-year longitudinal study. *J Periodontol* **67**, 703-716,

1996

- 16) Grenier D: Effect of proteolytic enzymes on the lysis and growth of oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* **9**, 224-228, 1994
- 17) Braham PH and Moncla BJ: Rapid presumptive identification and further characterization of *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* **30**, 649-654, 1992
- 18) Thompson H, Homer KA, Rao S, Booth V and Hosie AH: An orthologue of *Bacteroides fragilis* NanH is the principal sialidase in *Tannerella forsythia*. *J Bacteriol* **191**, 3623-3628, 2009
- 19) Sharma A, Sojar HT, Glurich I, Honma K, Kuramitsu HK and Genco RJ: Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infect Immun* **66**, 5703-5710, 1998
- 20) Murakami Y, Higuchi N, Nakamura H, Yoshimura F and Oppenheim FG: *Bacteroides forsythus* hemagglutinin is inhibited by N-acetylneuraminylactose. *Oral Microbiol Immunol* **17**, 125-128, 2002
- 21) Sabet M, Lee SW, Nauman RK, Sims T and Um HS: The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology* **149**, 3617-3627, 2003
- 22) Sakakibara J, Nagano K, Murakami Y, Higuchi N, Nakamura H, Shimozato K and Yoshimura F: Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of *Tannerella forsythensis*. *Microbiology* **153**, 866-876, 2007

- 23) Maiden MF, Pham C and Kashket S: Glucose toxicity effect and accumulation of methylglyoxal by the periodontal anaerobe *Bacteroides forsythus*. *Anaerobe* **10**, 27-32, 2004
- 24) Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I and Tsuchida N: Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*. a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **68**, 4611-4615, 2000
- 25) Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T, Dubin G, Jabaiah A, Daugherty PS, Thogersen IB, Enghild JJ, Nguyen KA and Potempa J: A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol Chem* **39**, 105-117, 2010
- 26) Saito T, Ishihara K, Kato T and Okuda K: Cloning, expression, and sequencing of a protease gene from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037 in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**, 4888-4891, 1997
- 27) Nakajima T, Tomi N, Fukuyo Y, Ishikura H, Ohno Y, Arvind R, Arai T, Ishikawa I and Arakawa S: Isolation and identification of a cytopathic activity in *Tannerella forsythia*. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 133-139, 2006
- 28) Tomi N, Fukuyo Y, Arakawa S and Nakajima T: Pro-inflammatory cytokine production from normal human fibroblasts is induced by *Tannerella forsythia* detaching factor. *J Periodontal Res* **43**, 136-142, 2008

- 29) Onishi H, Ro M, Hayashi J, Tatsumi J, Satomi N, Yatabe K, Arakawa S, Izumi Y and Shin K: Modification of forsythia detaching factor by gingival crevicular fluid in periodontitis. *Arch Oral Biol* **58**, 1007-13, 2013
- 30) 呂 宗彦, 大西英知, 小野裕貴, 石井麻紀子, 谷田部一大, 林丈一朗, 辰巳順一, 申基喆: 歯周炎患者歯肉溝滲出液中の *Tannerella forsythia* detaching factor 切断酵素活性の定量. *明海歯科医学* **42**, 87-97, 2013
- 31) Grayson R, Douglas CWI, Heath A and Rawlinson GS: Evans Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* **30**, 542-550, 2003
- 32) 吉江弘正, 川浪雅光, 池田雅彦, 坂上竜資, 高柴正悟, 角田正健, 三辺正人, 渡邊久, 菅谷 勉, 内藤 徹, 児玉利朗, 三上 格, 宮田 敦: 検査, 診断と治療の進め方. 歯周基本治療. 歯周外科治療. 口腔機能回復 (修復・補綴) 治療 - 固定・ブリッジ・義歯・インプラントの選択 -. サポートイブペリオドンタルセラピーとメンテナンス. In: 歯周病の検査・診断・治療計画の指針 2008. 特定非営利活動法人日本歯周病学会編, 医歯薬出版, 東京, pp1-40, 2009.
- 33) Onishi H, Arakawa S, Nakajima T and Izumi Y: Levels of specific immunoglobulin G to the forsythia detaching factor of *Tannerella forsythia* in gingival crevicular fluid are related to the periodontal status. *J Periodontal Res* **45**, 672-680, 2010
- 34) 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
- 35) Barry M. Eley and Stephen W. Cox: Cathepsin BL-, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* **19**, 333-339, 1992
- 36) Lamster IB, Vogel RI, Hartley LJ, DeGeorge CA and Gordon JM: Lactate dehydrogenase, beta-glucuronidase and arylsulfatase activity in gingival crevicular fluid associated with experimental gingivitis in man. *J Periodontol* **56**, 139-47, 1985
- 37) Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M and Ishikawa I: Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* **70**, 574-80, 1999
- 38) Pederson ED, Miller JW, Matheson S, Simonson LG, Chadwick DE, Covill PJ, Turner DW, Lamberts BL, Morton HE: Trypsin-like activity levels of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in adults with periodontitis. *J Clin Periodontol* **21(8)**, 519-25, 1994
- 39) Suido H, Zambon JJ, Mashimo PA, Dunford R and Genco RJ: Correlations between gingival crevicular fluid enzymes and the subgingival microflora. *J Dent Res* **67**, 1070-4, 1988

Figure legends

Fig. 1, Comparison of FC activity in CH, DNB and DB groups of patients with periodontitis.

GCF samples were assayed using Ac-RAK-pNA peptide. *The mean value of FC activity in three groups at BL were significantly higher than those of FC activity at PT ($P < 0.05$).

Fig. 2, Correlations between FC activity and clinical parameters.

The correlation coefficient between PPD decreasing rate and CAL decreasing rate was 0.831 ($P < 0.001$), between PPD decreasing rate and FC activity decreasing rate was 0.142 ($P = 0.601$), between PPD decreasing rate and GCF decreasing rate was 0.291 ($P = 0.274$), between CAL decreasing rate and FC activity decreasing rate was 0.016 ($P = 0.954$), between CAL decreasing rate and GCF decreasing rate was 0.180 ($P = 0.505$) and between FC activity decreasing rate and GCF decreasing rate was 0.354 ($P = 0.179$).

Fig. 3, Comparison of FC activity between periodontopathic bacteria positive and negative sites at BL and PT.

Sampling sites at BL and PT were divided into two groups based on the presence or absence of the 16S rRNA gene. There were no significant differences between periodontopathic bacteria positive and negative sites ($p > 0.05$).

Table 1

Table 1. PCR primers used in this study.

Gene target	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>Tannerella forsythia</i> 16S rRNA	Forward: GCG TAT ACC TGC CCG CA Reverse: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 16S rRNA	Forward: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG Reverse: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404
<i>Treponema denticola</i> 16S rRNA	Forward: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T Reverse: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316

Table 2

Table 2. Clinical characteristics of patients with chronic periodontitis at baseline and posttreatment.

	BL	PT	<i>P</i> value
Age (years)	53.6 ± 5.8	—	—
Gender (male : female)	5:2	—	—
Number of teeth	24.8 ± 1.3	22.5 ± 1.5	NS
Mean PPD (mm)	* 3.8 ± 0.4	2.5 ± 0.2	< 0.05
Mean CAL (mm)	* 5.2 ± 0.5	4.0 ± 0.6	< 0.05
Mean BOP (%)	* 43.4 ± 8.7	7.1 ± 3.0	< 0.05

BL: baseline, PT: posttreatment, PPD: probing pocket depth, CAL: clinical attachment level

BOP: bleeding on probing

Data are expressed as mean ± standard error.

* There were significant differences between BL and PT regarding mean PPD and mean CAL (Wilcoxon signed-rank test; *P* < 0.05).

Table3

Table 3. Clinical characteristics of sampling sites at baseline and posttreatment.

Parameters	CH		DNB		DB	
	BL (n= 7)	PT (n= 7)	BL (n= 7)	PT (n= 6)	BL (n= 7)	PT (n= 5)
PPD (mm)	2.1 ± 0.3	1.8 ± 0.2	6.1 ± 0.2	* 2.6 ± 0.5	7.6 ± 0.8	* 3.3 ± 0.3
CAL (mm)	2.5 ± 0.4	2.8 ± 0.3	7.1 ± 0.5	* 3.7 ± 0.6	9.0 ± 0.9	5.0 ± 0.8
GCF (µl)	0.54 ± 0.10	* 0.15 ± 0.04	1.38 ± 0.07	* 0.40 ± 0.11	1.34 ± 0.09	* 0.38 ± 0.10

CH: PPD ≤ 3 mm and BOP negative, DNB: PPD ≥ 6 mm and BOP negative, DB: PPD ≥ 6 mm and BOP positive

BL: baseline, PT: posttreatment, PPD: probing pocket depth, CAL: clinical attachment level, GCF: gingival crevicular fluid

Data are expressed as mean ± standard error.

* There were significant differences between BL and PT (Wilcoxon signed-rank test; $P < 0.05$, intra-group comparison).

Table4

Table 4. Changes and decreasing rate in clinical parameters and FC activity after treatment.

Parameters	CH	DNB	DB
Change in PPD (mm)	-0.5 ± 0.4	¶-3.3 ± 0.3	* -3.0 ± 0.4
Change in CAL (mm)	-0.2 ± 0.6	¶-3.7 ± 0.8	-2.5 ± 1.2
Change in GCF (µl)	-0.36 ± 0.11	¶-0.94 ± 0.18	*-0.83 ± 0.15
Change in FC activity (unit)	-3.61 ± 0.45	-4.03 ± 0.61	*-5.40 ± 0.38
PPD decreasing rate (%)	22.2 ± 10.2	48.5 ± 8.7	47.6 ± 5.1
CAL decreasing rate (%)	16.4 ± 7.6	51.5 ± 8.7	34.8 ± 12.3
GCF decreasing rate (%)	66.7 ± 8.7	65.3 ± 11.5	71.0 ± 10.2
FC activity decreasing rate (%)	75.7 ± 2.4	77.9 ± 3.0	*85.7 ± 1.5

* DB was significantly higher than CH (Steel-Dwass test; $P < 0.05$).

¶ DNB was significantly higher than CH(Steel-Dwass test; $P < 0.05$).

Negative sign indicates a reduction in score.

Data are expressed as mean ± standard error.

Table5

Table 5. No. of positive sites (% of site) of periodontopathic bacteria in patients with chronic periodontitis.

Target genes	BL				PT			
	CH n=7	DNB n=7	DB n=7	CH n=7	DNB n=6	DB n=5		
<i>Tannerella forsythia</i> 16S rRNA	0 (0 %)	6 (85.7 %)	6 (85.7 %)	1 (14.3 %)	0 (0 %)	1 (20.0 %)		
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 16S rRNA	0 (0 %)	6 (85.7 %)	6 (85.7 %)	1 (14.3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)		
<i>Treponema denticola</i> 16S rRNA	0 (0 %)	6 (85.7 %)	6 (85.7 %)	0 (0%)	0 (0 %)	0 (0 %)		

BL: baseline, PT: posttreatment

Figure 1

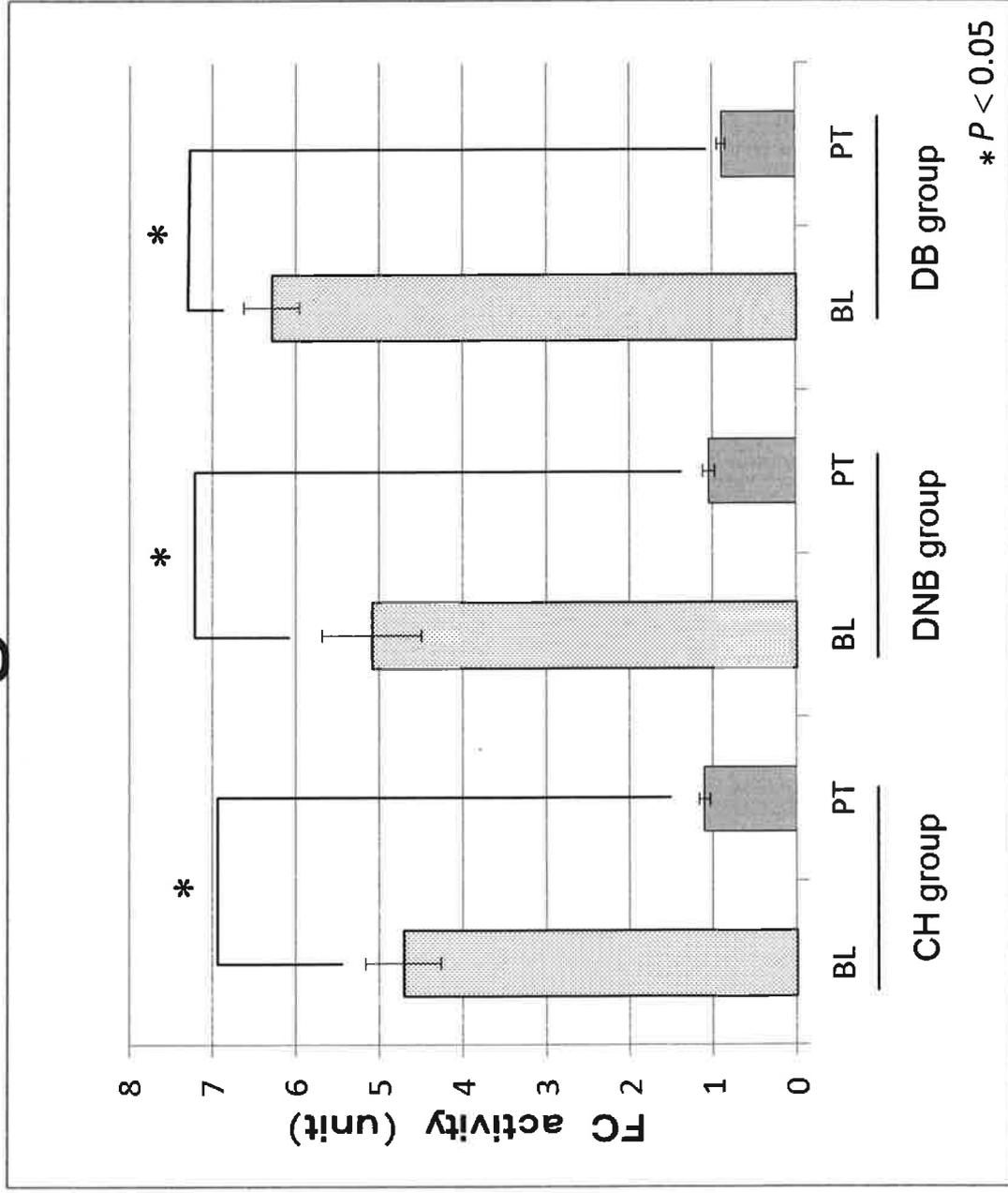


Figure 2

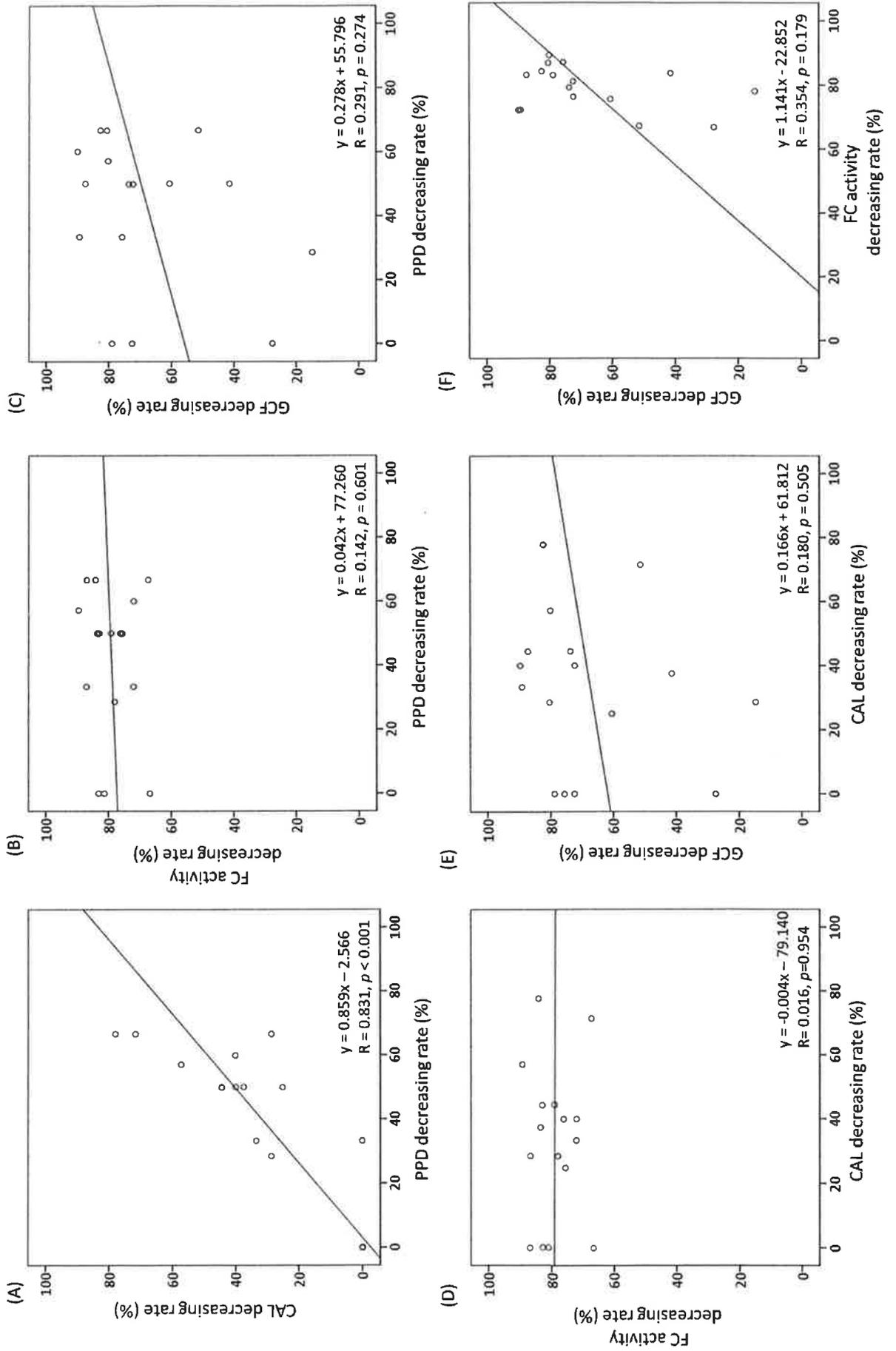


Figure 3

