

デンタル・ドラッグ・デリバリー・システムによる *Porphyromonas gingivalis* の除菌

武内 博朗^{1,3)}, 横溝 明子¹⁾, 武内 伸賢¹⁾, 花田 信弘²⁾

Eradication of *Porphyromonas gingivalis* by dental drug delivery system

Hiroaki Takeuchi^{1,3)}, Akiko Yokomizo¹⁾, Nobumasa Takeuchi¹⁾, Nobuhiro Hanada²⁾

¹⁾ 医療法人社団武内歯科医院, ²⁾ 鶴見大学歯学部探索歯学講座, ³⁾ 日本大学歯学部衛生学講座

キーワード：デンタル・ドラッグ・デリバリー・システム (3DS)、歯周病、
Porphyromonas gingivalis、FISH

要 旨

歯周病と全身疾患との関係について多数の研究報告が行なわれている。デンタル・ドラッグ・デリバリー・システム (Dental Drug Delivery System : 3DS) は、口腔からのミュータンス連鎖球菌を除菌する系として知られている。この臨床研究は、歯周病に対する3DSを用いた除菌療法の効果を調査した。PCR検査により *Porphyromonas gingivalis* 菌 (以下 *P.g.* 菌) が0.01%以上検出された歯周病罹患者の成人117名を対象とした。

歯周組織検査及び唾液サンプルを用いた *P.g.* 菌および口腔総細菌のリアルタイムPCR定量評価を、初診時、スケーリング・ルートプレーニング処置後、3DSによる化学療法後にそれぞれ行った。

また、全被験者のうち2名の被験者の歯肉縁下バイオフィルムを初診時および3DS介入後に採取し、fluorescence insitu hybridization (FISH) 法を用いてバイオフィルム中の *P.g.* 菌および口腔総レンサ球菌の分布状況を観察した。

口腔総菌数に対する *P.g.* 菌比率、歯周病の進行度を示すポケットの深さ (PD) および出血ポケット比率 (BOP) の3項目について、(1) 初診時、(2) スケーリング・ルートプレーニング処置後、(3) 3DSと化学療法後の3点にて統計解析した。その結果、最大サンプル数での解析における *P.g.* 菌比率は (1) 0.36% (n=105)、(2) 0.01% (n=93)、(3) 0.00% (n=91、いずれも $P < 0.01$)、PDは (1) 37.2% (n=116)、(2) 16.4% (n=101)、(3) 12.3% (n=87、いずれも $P < 0.01$)、BOPは (1) 50.9% (n=115)、(2) 16.4% (n=101)、(3) 12.3% (n=85、いずれも $P < 0.01$) となり、いずれも治療介入後は初診時と比較して著明に減少した。

FISH画像では、*P.g.* 菌は3DS処置後に視覚的に減少した。これに対し総レンサ球菌は微増していた。

3DS法は歯周病治療に有効な除菌システムである可能性が示された。機械的バイオフィルム破壊後の3DSの併用は歯周病治療に有用である。

3DS法は、口腔総菌数を変化させずに歯周病関連菌である *P.g.* 菌を選択的に減少させる効果により、歯周病治療に有効な除菌システムとなる可能性が示された。

【著者連絡先】

〒252-1131 神奈川県綾瀬市寺尾北3-12-32

医療法人社団武内歯科医院

日本大学歯学部臨床教授

武内博朗

TEL : 0467-78-3020 FAX : 0467-78-6485

E-mail : hiro-214@xc4.so-net.ne.jp

受付日 : 2021年8月15日 受理日 : 2021年9月11日

I. 緒言

歯周病は、歯肉組織における*Porphyromonas gingivalis*（以下*P.g.*菌）、*Prevotella intermedia*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*などの口腔病原菌の感染と関連している。歯周病原性バイオフィームは、*P.g.*菌の比率が高いことが知られている^{1, 2)}。

近年、歯周病と心血管疾患や呼吸器疾患などの全身疾患との関係について多数の研究報告³⁻⁷⁾が行なわれている。歯周病および感染根管は、細菌や炎症性物質が血管系の中に入り続ける菌血症が生じ、エンドトキシン（内毒素：LPS）やLow Density Lipoprotein（LDL）が長期にわたって慢性炎症を惹起する。

菌血症は全身に内毒素が回り、関節リウマチ、腎盂腎炎、アルツハイマー、脳梗塞、ガンなど様々な疾患の下地を作るという報告がある⁸⁻¹⁴⁾。

口腔病原細菌由来の慢性炎症制御のために薬物療法を加えることは、口腔のみならず全身の健康を維持するために重要である。しかし、*P.g.*菌を

含む特異的な病原体を除菌する口腔ケアの系はこれまでにも実施されていない。

デンタル・ドラッグ・デリバリー・システム（Dental Drug Delivery System：3DS）は、ミュータンスレンサ球菌（以下MS菌）に対するモノクローナル抗体を用いた受動免疫療法の研究¹⁵⁾から派生した技術である。口腔からミュータンス連鎖球菌を除去するためのプロトコールとして開発された¹⁶⁻²⁰⁾。3DSは、物理的方法の限界までバイオフィームを破壊・減量した後に、ドラッグ・リテーナーと呼ばれる個人トレー（マウスピース）を用いて抗菌薬を歯の表面に一定時間一定濃度局所輸送する除菌法である（図1）。個人トレーを用いることで、主たる口腔細菌叢を損なうことなく、歯の表面に付着するう蝕原性細菌*Streptococcus mutans*菌のみが、選択的に除菌できる。その有効性は臨床評価によって確認されている^{16, 19)}。

この本研究では、歯周病関連細菌*P.g.*菌を3DSで減らすことを計画した。歯周病患者を個人ト

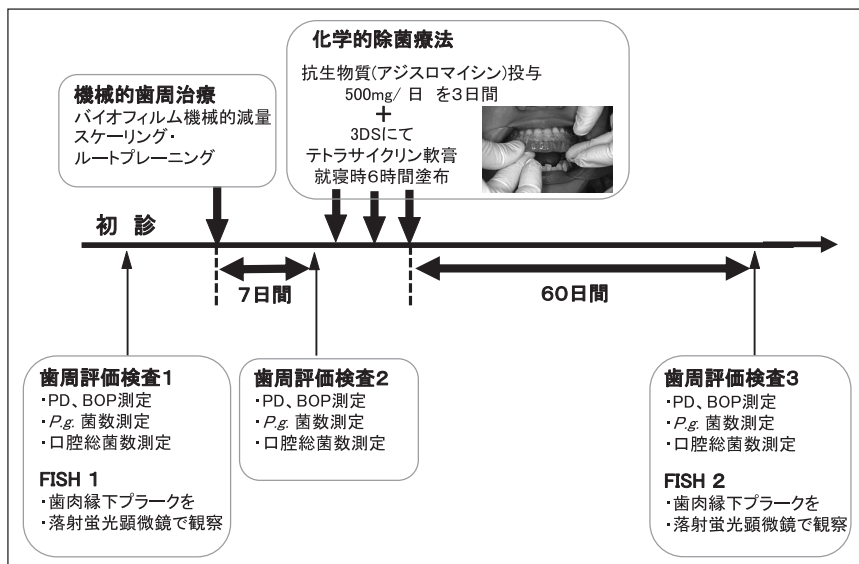


図1 研究プロトコール

P.g. : *porphyromonas gingivalis*, 3DS : dental drug delivery system, PD: pocket depth, BOP : breeding on probing, FISH : fluorescence in situ hybridization

レーを使用して除菌治療し、歯周病の推移、口腔総菌数に対する*P.g.*菌の比率について調査した。この研究は3DSを用いた歯周病治療に対する効果を検証することで、歯周病菌感染の制御および正常な口腔細菌叢の再生に有効なシステムを開発することを目的とした。

II. 対象および方法

A. 対象者

神奈川県綾瀬市にある武内歯科医院にて、2013年から2015年に、歯周病と診断された患者のうち、唾液サンプルのPCR検査により*P.g.*菌比率が0.01%以上検出された117名（男性47名、女性70名、年齢：50.1±12.1歳、DMFT：27.9±0.9）を対象とした（表1）。

重度の全身疾患患者、過去1か月以内に抗生物質を投与された感染症患者および喫煙者は除外した。研究全体のプロトコルを図1に示す。

臨床研究に先立ち、すべての被験者からインフォームドコンセントを得た。本臨床研究は、鶴見大学歯学部研究倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号811、利益相反関係：該当なし）。

B. 口腔内検査

全被験者に対し、4mm以上の歯周ポケットの数（PD：Pocket depth）および出血した歯周ポケットの数（BOP：Bleeding on Probing）の箇所を計測し記録した。PDおよびBOPは1歯あたり6箇所

で計測した（近心頬側、頬側、遠心頬側、近心舌側、舌側、遠心舌側）。この検査は初診時のほか、後述する機械的歯周治療（D-a）7日後、化学的除菌（D-b）60日後、の3回実施した。

C. 唾液採取と*P.g.*菌、口腔総菌数の測定

唾液中の*P.g.*菌、口腔総菌数のレベルを計測するために、摂食後および歯磨き後2時間以上経過した時点で、全歯列の歯頸部を右側上顎大白歯頬側から左側大白歯へ、左側下顎大白歯頬側から右側大白歯頬側へ、右側上顎大白歯口蓋側から左側大白歯へブラッシングし、洗口せずにパラフィンブロックを5分間咀嚼後、被験者から唾液を採取した。そのうち約1mlを株式会社ビー・エム・エルの院外外注細菌検査に提出した。

*P.g.*菌と口腔総菌数の量は、唾液からDNAを抽出してテンプレートとし、リアルタイムPCRにて定量算出された。これらの検査は初診時のほか、機械的歯周治療（D-a）の7日後、化学的除菌（D-b）60日後、の3回実施した。

D. バイオフィルム除去と化学的除菌

a. 機械的歯周治療

- 歯ブラシとフロス・歯間ブラシを用いて歯面、歯間部、隣接面、歯肉溝、歯周ポケット周辺を清掃し、舌ブラシ等で舌苔も除去した。
- 回転機器、超音波機器、吹き付け機器等を用

表1 被験者

被験者数	n = 117	
M/F	47/70	
平均年齢	50.1歳(±12.1)	
DMFT	27.9±0.9	
慢性歯周炎レベル	中等度または重度	
侵襲性歯周炎 タイプ別被験者	限局型 広汎型	該当なし

いてPMTCを実施し、歯肉溝内および歯周ポケット内に蓄積・成熟した古いバイオフィルムを破壊・除去した。

- (3) 歯肉縁下の歯石やバイオフィルムについては、ハンドスケーラーや超音波スケーラーを用いてスケーリング・ルートプレーニングを行なった。

b. 化学的除菌療法

- (1) あらかじめ上下顎の印象を採得し、模型に合わせてEVAシートを加工しドラッグ・リテーナーを作製した。歯周病専用のトレーは、抗生物質を輸送するために、長時間口腔内に装着可能なように咬頭適合位がとれる設計である(図2)²⁰⁾。このトレーは歯の周囲の歯肉溝領域に抗生物質を浸透させるために、2mmの薬剤スパーサーが付与されている。
- (2) 外来でドラッグ・リテーナーに塩酸クロルヘキシジン0.05%含有ジェル(製品名ジェルコートF、ウェルテック株式会社)を注入して5分間歯列に装着し、薬剤を局所輸送した。
- (3) 除菌(2)の実施日より3日間、就寝前にミノサイクリン塩酸塩軟膏(製品名ペリオフィール歯科用軟膏2%、昭和薬品加工株式会社)をドラッグ・リテーナーに注入して、就寝直前に上顎・下顎一度に一晚(最低6時間以上)装着することで、歯周ポケットに局所的に輸送した。
- (4) (2)の実施日より3日間、抗生物質アジスロマイシン(製品名ジスロマック、ファイザー

株式会社)を総量で1,500mg(1日あたり500mg)内服投与した。

- (5) 朝、起床時にドラッグ・リテーナーを口腔から外したら、直ちに洗口と同時にブラッシングを行なって、ミノサイクリン塩酸塩軟膏(製品名ペリオフィール歯科用軟膏2%、昭和薬品加工株式会社)が口腔内に拡散しないように素早く落とし、残留しないように指導した。

E. 統計分析

正規分布しているデータは平均値±標準偏差(SD)で記載し、対応ありのT検定を用いて検定を行った。非正規分布しているデータは中央値[四分位範囲]で記載し、Wilcoxon signed-rank testを用いて検定を行った。被験者の初診時、スケーリング・ルートプレーニング処置後、3DSによる化学療法後の各時点における口腔総菌数に対する*P.g.*菌数の割合、歯周ポケット比率(4mm以上のポケットの数/測定した全てのポケットの数×100)、ならびにBOP比率(出血したポケット数/測定した全てのポケット管の数×100)を調べた。検定の多重性を避けるために、P値をBonferroni法で補正した。相関関係はピアソンの相関係数を用いて表した。統計的な有意性はP値0.05未満として設定した。ピアソンのカイ二乗検定、およびピアソンの相関係数による統計解析を、IBM社製のSPSS予測分析ソフト(バージョン22.0)を使って行なった。



図2 歯周病用3DSドラッグ・リテーナー(上顎)

F. FISH

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、蛍光色素で標識したDNAプローブを目的遺伝子とハイブリダイゼーションさせ、蛍光顕微鏡を用いて検出する方法であり、局所における複数の細菌叢の構成分布を同時に把握できる²²⁾。本研究では抗生物質を用いた3DSの*P.g.*菌感染に対する除菌効果を、FISH法を用いて視覚的に観察した。

被験者のうち2名(43歳男性および55歳女性)について、初診時および3DS介入後の歯肉縁下プラークをカリエス用の微小ヘッドのエキスカベーターにて採取した。*P.g.*菌および口腔常在性総レンサ球菌に対する特異的プローブ(図3)を作製し、*P.g.*菌プローブはCy3にて赤色に、総レンサ球菌プローブはfluorescein isothiocyanate (FITC)にて緑色に標識した。

ハイブリダイゼーション緩衝液の構成はNaClが0.9M、Tris/HCLが20mM、pHは7.3、SDSは0.01%である。Stringencyは使われたオリゴヌクレオチド・プローブによってホルムアミドの濃度を0から30%(v/v)の範囲で変えることにより調整した。予熱したハイブリダイゼーション緩衝液(20ml)を、適切なオリゴヌクレオチド・プローブ約5pモルと混ぜ、組織切片に慎重に滴下した。遮光した加湿器で46度に設定し3.5時間インキュベートした後、スライドはそれぞれ無菌の再蒸留水ですすぎ、遮光下で乾燥させてマウントした。

G. 落射蛍光顕微鏡法と共焦点レーザー顕微鏡 CLSM

FISH用に加工された、ハイブリダイズした切片の細菌を観察するために、落射蛍光顕微鏡(カールツァイス社製Axioskop)を使用した。

狭帯域のフィルターセットHQ-F41-007およびHQ-F41-001(Analysentechnik社製AHF)を使用してDAPI、FITCおよびCy3シグナルをそれぞれ61000倍の拡大率で解析した。

顕微鏡写真はコダック社のEktachrome HC400フィルムを使用して撮影した。アルゴンイオンレーザー(488nm)とヘリウムネオンレーザー(543nm・633nm)を装備したカールツァイス社の共焦点レーザー走査顕微鏡を使って、光学切片を記録した。画像処理は、機器に付属の標準的なソフトを使用した(カールツァイス社製SLM、バージョン1.6)。画像はスライドフィルム上に復元加工した(コダック社製Professional)。

III. 結果

口腔総菌数に対する*P.g.*菌比率、歯周病の進行度を示すポケットの深さ(PD)および出血ポケット比率(BOP)の3項目について、(1)初診時、(2)スケーリング・ルートプレーニング処置後、(3)3DSと化学療法後の3点にて統計解析した。総数(n=117)のうち、データの得られなかった部分を含めた最大サンプル数での解析および、(1)(2)(3)の3点のデータが全て揃ったサンプル数での解析を行った(表2)。

Porphyromonas gingivalis 菌 特異的 DNAプローブ

5' - CAA TAC TCG TAT CGC CCG TTA TTC -3' 24mer cy3

口腔常在性総レンサ球菌 共通 DNAプローブ

5' -TAG CCG TCC CTT TCT GGT -3' 15mer FITC

図3 FISHに用いた各菌に対するDNAプローブの塩基配列

表2 *P.g.* 菌比率、口腔総菌数 (log10)、PD比率、BOP比率について (1) 初診時、(2) スケーリング・ルートプレーニング後、(3) 3DS除菌療法後の3点で解析した結果。最大サンプル数および、(1) (2) (3) の3点のデータが揃ったサンプル数での2種類の解析を行った。データ表示は* : 中央値 [四分位範囲]、その他は平均値 ± 標準偏差。a : paired t test (Bonferroni補正)、b : Wilcoxon signed-rank test (Bonferroni補正)、*P.g.* : *porphyromonas gingivalis*、SRP : スケーリング・ルートプレーニング、3DS : dental drug delivery system、PD : pocket depth、BOP : breeding on probing

	(1) Pre		(2) SC + SRP		(3) Chemi or Post		P-value (Bonferroni補正)			※補正前のP値			
	n	Data	n	Data	n	Data	(1)vs.(2)	(1)vs.(3)	(2)vs.(3)	(1)vs.(2)	(1)vs.(3)	(2)vs.(3)	
最大サンプル数													
<i>P.g.</i> (%)	105	0.36 [0.04, 1.17]	93	0.01 [0.00, 0.10]	91	0.00 [0.00, 0.00]	0.000	0.000	0.000	b	0.000	0.000	0.000
log ₁₀ TB	104	7.9 ± 0.6	93	8.0 ± 0.6	90	8.1 ± 0.6	0.439	>0.999	>0.999	a	0.146	0.371	0.485
ポケット (%)	116	37.2 ± 23.2	101	16.4 ± 14.5	87	12.3 ± 13.2	0.000	0.000	0.000	a	0.000	0.000	0.000
BOP (%)	115	50.9 ± 24.6	101	21.9 ± 14.7	85	12.6 ± 9.9	0.000	0.000	0.000	a	0.000	0.000	0.000
3点揃い													
<i>P.g.</i> (%)	59	0.53 [0.20, 1.46]	59	0.02 [0.00, 0.12]	59	0.00 [0.00, 0.00]	0.000	0.000	0.000	b	0.000	0.000	0.000
log ₁₀ TB	59	8.0 ± 0.6	59	8.0 ± 0.6	59	8.1 ± 0.7	>0.999	0.752	>0.999	a	0.386	0.251	0.612
ポケット (%)	73	33.5 ± 19.8	73	17.4 ± 14.6	73	9.9 ± 10.0	0.000	0.000	0.000	a	0.000	0.000	0.000
BOP (%)	72	50.7 ± 24.0	72	23.7 ± 15.7	72	11.9 ± 9.6	0.000	0.000	0.000	a	0.000	0.000	0.000

データ表示は mean ± sd.

P-value : a, paired t test (Bonferroni補正) ; b, Wilcoxon signed-rank test (Bonferroni補正).

※ 最大サンプル数での集計および3点揃っているデータのみの解析の2種類を行った

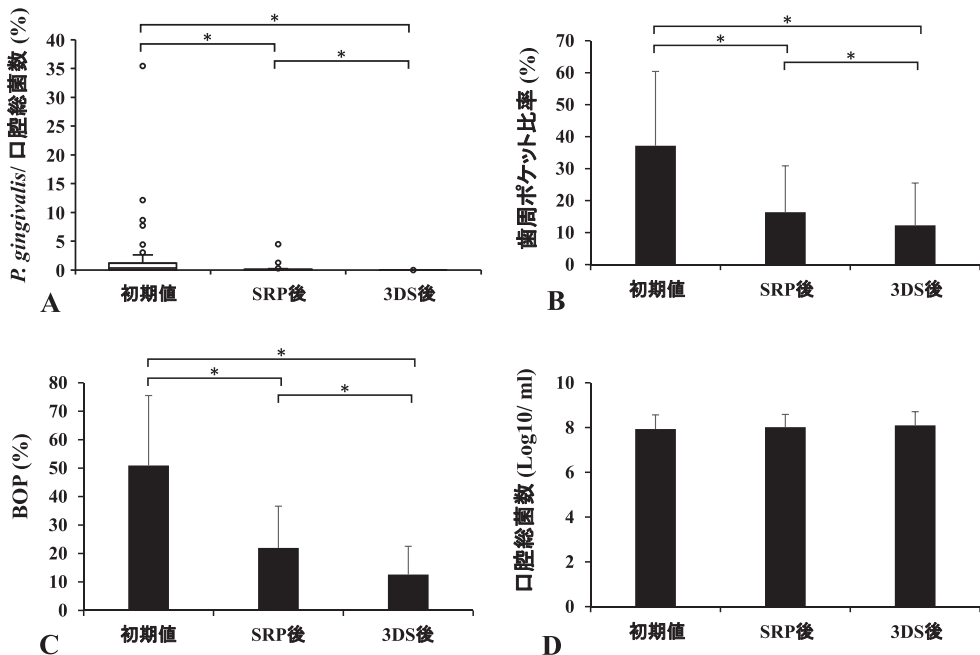


図4 初診時、スケーリング・ルートプレーニング後、3DS除菌療法後のA : 口腔総菌数に対する *P.g.* 菌の割合、B : 歯周ポケット比率、C : BOP比率、D : 口腔総菌数、それぞれの推移をグラフで示す。Aは箱ひげ図で表示し、また各グラフは各測定時点での最大サンプル数で作図した。

* : $P < 0.01$ 、*P.g.* : *porphyromonas gingivalis*、SRP : スケーリング・ルートプレーニング、3DS : dental drug delivery system、BOP : breeding on probing

その結果、*P.g.* 菌比率は、最大サンプル数での解析では (1) 0.36% (n=105)、(2) 0.01% (n=93)、(3) 0.00% (n=91、いずれも $P < 0.01$) であった。3点揃っているデータでの解析 (n=59) では (1) 0.53%、(2) 0.02%、(3) 0.00% (いずれも $P < 0.01$)

であった。

PDは、最大サンプル数での解析では (1) 37.2% (n=116)、(2) 16.4% (n=101)、(3) 12.3% (n=87、いずれも $P < 0.01$) であった。3点揃っているデータでの解析 (n=73) では (1) 33.5%、(2)

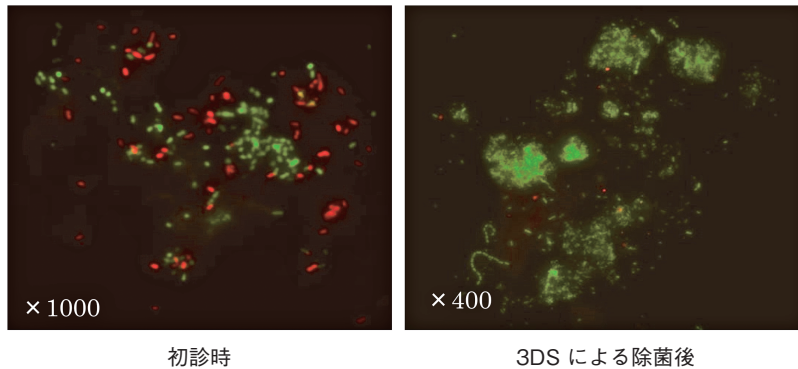


図5 歯肉縁下バイオフィルム（43歳男性）のFISH法による顕微鏡画像。*P.g.*菌はCY3（赤色）、総レンサ球菌はFITC（緑色）で標識されている。

17.4%、(3) 9.9%（いずれも $P<0.01$ ）であった。

BOPは、最大サンプル数での解析では（1）50.9%（ $n=115$ ）、（2）16.4%（ $n=101$ ）、（3）12.3%（ $n=85$ 、いずれも $P<0.01$ ）であった。3点揃っているデータでの解析（ $n=73$ ）では（1）33.5%、（2）17.4%、（3）9.9%（いずれも $P<0.01$ ）であった。それぞれ治療介入後は初診時と比較して著明に減少し、機械的歯周治療に加えて、抗生物質による3DSも有意な抑制効果を示した。最大サンプル数での解析結果を（図4A～C）に示す。

これに対し、口腔総菌数（ \log_{10} にて算出）は最大サンプル数での解析では（1）7.9（ $n=104$ ）、（2）8.0（ $n=93$ ）、（3）8.1（ $n=90$ 、（1）（2）間は $P=0.439$ 、（1）（3）間および（2）（3）間は $P>0.999$ ）、3点揃っているデータでの解析（ $n=59$ ）でも（1）8.0、（2）8.0、（3）8.1（（1）（2）間は $P>0.999$ 、（1）（3）間は $P=0.752$ 、（2）（3）間は $P>0.999$ ）となり、大きな変化は認められなかった。最大サンプル数での解析結果を（図4D）に示す。

FISHによる評価では、2例とも、初診時のバイオフィルムには*P.g.*菌（Cy3・赤色標識）が著明に認められた。同時に総レンサ球菌（FITC・緑色標識）も観察された。抗生物質を用いた3DSによる除菌処置後のバイオフィルムは、*P.g.*菌が著しく減少していた。これに対し、総レンサ球菌は増加して観察された（図5：43歳男性由来サンプルの画像）。

IV. 考 察

歯周病は病原性バイオフィルムが増殖した後に歯周組織が破壊されるので、歯周ポケットが形成される前の予防的バイオフィルム除去が重要である。しかし、現在のところ細菌を対処した根源的方法はない。うがい、歯ブラシ、SRPやスクレーピングでは、*P.g.*菌を根源的に減少させることは困難である。

3DS法のメリットは、病原細菌の存在する箇所薬剤を一定時間一定濃度輸送できるため、病原性バイオフィルム制圧と口腔常在性細菌叢への移行を超短期的に可能にしている。本臨床研究では、3DS実施前後で口腔総菌数を減少させることなく、選択的に*P.g.*菌比率をリスク値以下まで抑制することができた。3DS実施後は*P.g.*菌の占める割合が減少することで、高病原性バイオフィルムから、健全な口腔常在菌で構成される歯垢へと移行したと思われる。

3DSは主たる口腔細菌叢を破壊しない歯周病関連菌制御法として推奨できる。インプラントを施された患者に対しても、インプラント周囲炎予防のために3DSを行うことが望ましい。加えて、セルフケアが困難な手術前後の患者や、寝たきりの人にも3DSは有効である。さらに、重度の歯周炎や口臭症の患者も3DS処置の対象候補者である。生活習慣改善のみによる原因菌の制御には長い時間を要し、病態が進行する危険性がある。短期間

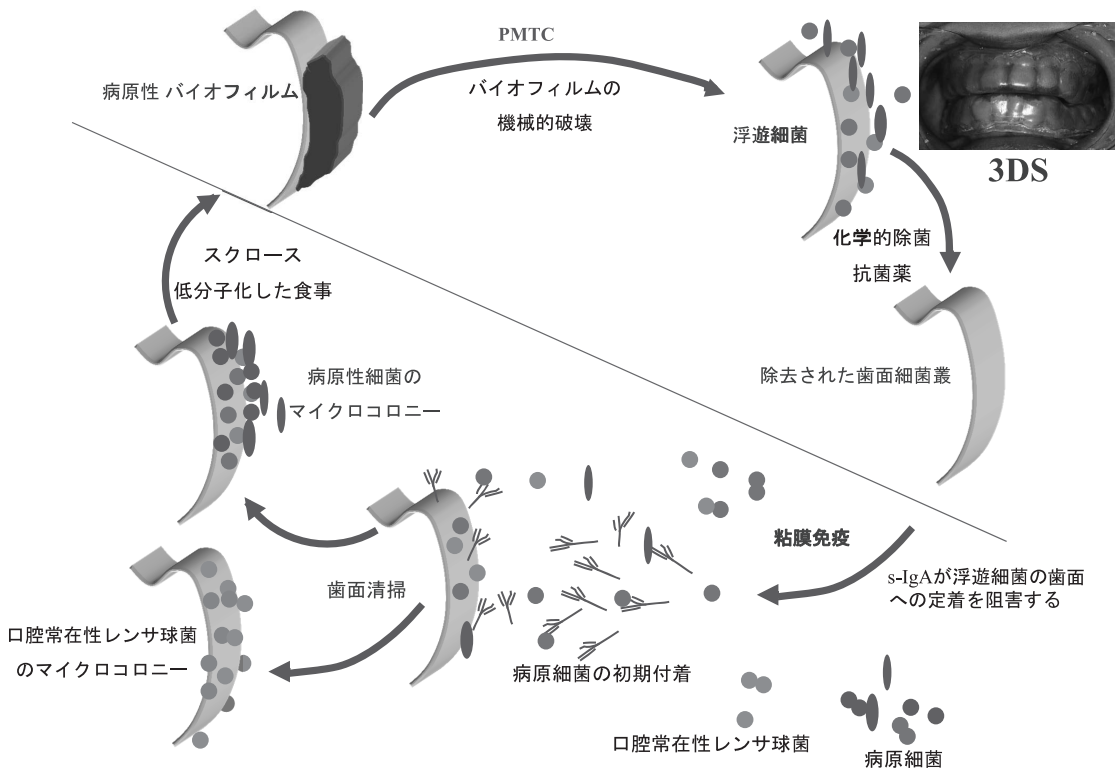


図6 口腔病原性バイオフィーム感染と除菌サイクル

で感染リスクを下げる手段として3DSなどを活用し、その後生活習慣改善指導や、病原性バイオフィーム形成に到る要因排除に取り組むと合理的と考えられる。

また、唾液検査では菌周病菌比率の減少は把握できるが、一方でどのような菌群が優勢になっているのかは不明であった。

唾液検査で*P.g.*菌比率の高い検体では、FISH法においても同菌が多く検出された。また、3DS除菌後は*P.g.*菌が減少した一方で、口腔総レンサ球菌群である*S. mitis*や総レンサ球菌グループが優勢になることが確認された。

3DSは歯面バイオフィームを短期的に除菌する方法であって、再感染を防止する過程には無効であり、本法の限界といえる(図6)。

再感染に対しては、唾液中のS-IgA阻害抗体等

が浮遊細菌を吸着凝集し、歯面への再付着を阻害する。しかしこの阻害抗体も、細菌が増殖してマイクロコロニーを形成したり、既にバイオフィームが形成された後では、抗体分子がバイオフィーム内に浸透できないため、その効果は疑わしい。従って能動免疫による唾液中の阻害抗体誘導と3DSとの組み合わせが望ましい¹⁹⁾。プロバイオティクスなどを利用して、外部から口腔常在菌を補充する技術も必要と思われる。本研究ではこうした過程を観察する手法として、FISH法が有効であることが示された。

歯科口腔領域の保健・医療は疾患形成の上流部分のアプローチに相当し、本法は効果的な除菌療法となりえる。我々歯科医療の専門家は自らの手でその特性を余すところなく活かせるように、工夫を重ねていかなければならない。

V. 結 論

3DS法は、口腔総菌数を変化させずに歯周病関連菌である*P.g.*菌を選択的に減少させる効果により、歯周病治療に有効な除菌システムとなる可能性が示された。またFISH法は、PCR・インベーター法・培養法などでは解析できなかった事象が観察可能となる方法であり、口腔バイオフィルムの構成細菌叢の新しい観察法として有用と考えられる。

文 献

- 1) Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, et al: Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. J Immunol Res, 2014 : 476068, 2014.
- 2) Socransky SS, Haffajee AD: Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000, 38 : 135-87, 2005.
- 3) Herrera D, Molina A, Buhlin K, et al: Periodontal diseases and association with atherosclerotic disease. Periodontol 2000, 83 (1) : 66-89, 2020.
- 4) Sanz M, Marco Del Castillo A, et al: Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. J Clin Periodontol, 47 (3) : 268-288, 2020.
- 5) Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, et al: Association between periodontal pathogens and systemic disease. Biomed J. 42 (1) : 27-35, 2019.
- 6) Carrizales-Sepúlveda EF, Ordaz-Farías A, Vera-Pineda R, et al: Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. Heart Lung Circ, 27 (11) : 1327-1334, 2018.
- 7) Cardoso EM, Reis C, Manzaneres-Céspedes MC: Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. Postgrad Med, 130 (1) : 98-104, 2018.
- 8) Kumar PS: Oral microbiota and systemic disease. Anaerobe, 24 : 90-3, 2013.
- 9) Maddi A, Scannapieco FA: Oral biofilms, oral and periodontal infections, and systemic disease. Am J Dent, 26 (5) : 249-54, 2013.
- 10) Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. PLoS Pathog, 10 (3) : e1003933, 2014.
- 11) Atanasova KR, Yilmaz Ö: Prelude to oral microbes and chronic diseases: past, present and future. Microbes Infect, 17 (7) : 473-83, 2015.
- 12) Olsen I, Yilmaz Ö: Modulation of inflammasome activity by Porphyromonas gingivalis in periodontitis and associated systemic diseases. J Oral Microbiol, 8 : 30385, 2016.
- 13) Nemeč A, Verstraete FJ, Jerin A, et al: Periodontal disease, periodontal treatment and systemic nitric oxide in dogs. Res Vet Sci, 94 (3) : 542-4, 2013.
- 14) Pischon N, Heng N, Bernimoulin J-P, et al: Obesity, inflammation, and periodontal disease. J Dent Res, 86 (5) : 400-409, 2007.
- 15) Ma JK, Hikmat BY, K Wycoff K, et al: Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. Nat Med, 4 (5) : 601-6, 1998.
- 16) Takeuchi H, Senpuku H, Matin K, et al: New dental drug delivery system for removing mutans streptococci from the oral cavity, effect on oral microbial flora. Jpn J Infect Dis, 53 (5) : 211-2, 2000.
- 17) Takeuchi H, Fukushima K, Senpuku H, et al. Clinical study of mutans streptococci using 3DS and monoclonal Antibodies. Jpn J Infect Dis, 54 : 34-36, 2001.
- 18) 武内博朗他：初期う蝕のマネージメント う蝕を進行させないために。クインテッセンス出版, 117-138, 2004.
- 19) Takeuchi H, Hanada N: Physicochemical and immunological research to reduce the dental caries epidemic - a paradigm shift in the role of a caries vaccine -. J. Oral Biosci. 47 (3) : 243-252, 2005.
- 20) 武内博朗：う蝕細菌制御技術の科学と臨床 - Dental Drug Delivery System (3DS) とは何か -。日本歯科医師会雑誌, 2007 ; 60 (5) : 15-26.
- 21) 武内博朗, 早川浩生：最新3DS環境 う蝕ステージ・ペリオステージ。デンタルダイヤモンド社, 31-60, 2009.
- 22) Sunde PT, Olsen I, Göbel UB et al: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. Microbiology, 149 (Pt 5) : 1095-1102, 2003.

Eradication of *Porphyromonas gingivalis* by dental drug delivery system

Hiroaki Takeuchi^{1,2,3)}, Akiko Yokomizo¹⁾, Nobumasa Takeuchi¹⁾, and Nobuhiro Hanada²⁾

¹⁾ Takeuchi Dental Clinic, Kanagawa, Japan

²⁾ Department of Translational Research, School of Dental Medicine, Tsurumi University, Kanagawa, Japan

³⁾ Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

Key Words : dental drug delivery system (3DS), periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*,
fluorescence in situ hybridization (FISH)

Many studies have been reported on the relationship between periodontal disease and systemic diseases. This study investigated the effect of eradication therapy using a dental drug delivery system (3DS) on periodontal disease. The subjects were 117 adults with periodontitis in which 0.01% or more of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) was detected by PCR testing. *P. gingivalis* and total oral bacteria in saliva samples were quantitatively evaluated by real-time PCR. Statistical analysis of the ratio of *P. gingivalis* against total oral bacteria, pocket depth (PD), and bleeding on probing (BOP) were performed (1) at baseline, (2) after scaling and root planing, and (3) after 3DS, respectively. As a result, the ratio of *P. gingivalis* in the analysis with the maximum number of samples was (1) 0.36% (n = 105), (2) 0.01% (n = 93), (3) 0.00% (n = 91, P < 0.01 for all), PD was (1) 37.2% (n = 116), (2) 16.4% (n = 101), (3) 12.3% (n = 87, P < 0.01 for all), and BOP was (1) 50.9 % (n = 115), (2) 16.4% (n = 101), (3) 12.3% (n = 85, P < 0.01 for all), all of which were significantly reduced after the intervention compared to each baseline. Moreover, subgingival biofilms of two subjects were collected at baseline and after 3DS, and the distribution of *P. gingivalis* and all streptococci in the biofilm was observed using the method of fluorescence in situ hybridization (FISH). In the images obtained by the FISH method, the flora of *P. gingivalis* was visually reduced after 3DS. Total streptococci did not change in contrast. The results suggest that 3DS may be a potent preventive system for *P. gingivalis* infection against oral biofilms. The combined use of 3DS after mechanical destruction of biofilms should be useful in the prevention of periodontal disease.

Health Science and Health Care 21 (1) : 27–36, 2021