

早稲田大学審査学位論文

博士（スポーツ科学）

中等度強度の持久性運動が唾液中の歯周病原細菌
および歯周病関連酵素に与える影響

Effects of Moderate-intensity Endurance Exercise on Periodontal
Pathogenic Bacteria and Enzymes associated with
Periodontal Disease in Saliva

2019年1月

早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科

清水 寿男

SHIMIZU HISAO

研究指導教員：坂本静男 教授

目次

| | |
|---|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1.1 歯周病とは | 1 |
| 1.2 歯周病に影響を及ぼす要因 | 2 |
| 1.2.1 全身疾患が歯周病に影響を及ぼす機序とその予防としての運動の効果.... | 2 |
| 1.2.2 運動が歯周病に及ぼす影響..... | 4 |
| 1.3 運動が歯周病を予防・改善する機序の解明..... | 4 |
| 第2章 文献研究..... | 8 |
| 2.1 唾液中酵素による歯周病の評価..... | 8 |
| 2.2 歯周病原細菌と歯周病態の関係に影響を与える要因..... | 9 |
| 第3章 中等度強度の持久性運動が健常者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響（検討課題 I -1） | 12 |
| 3.1 緒言..... | 12 |
| 3.2 対象および方法 | 13 |
| 3.2.1 対象 | 13 |
| 3.2.2 実験プロトコール | 14 |
| 3.2.3 身体測定および運動負荷試験..... | 15 |
| 3.2.4 臨床診査 | 16 |
| 3.2.5 細菌検査 | 16 |
| 3.2.6 歯周病関連酵素検査..... | 17 |
| 3.2.7 統計処理 | 17 |
| 3.3 結果..... | 18 |
| 3.3.1 身体測定および唾液採取..... | 18 |
| 3.3.2 臨床診査 | 18 |
| 3.3.3 細菌検査 | 18 |

| | |
|---|----|
| 3.3.4 歯周病関連酵素 | 20 |
| 3.4 考察 | 23 |
| 3.4.1 歯周病原細菌 | 23 |
| 3.4.2 歯周病関連酵素 | 24 |
| 3.5 結論および限界点 | 26 |
| 第4章 安静時における繰り返しの唾液採取が健常者の唾液中歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響（検討課題 I -2） | 27 |
| 4.1 緒言 | 27 |
| 4.2 対象および方法 | 28 |
| 4.2.1 対象 | 28 |
| 4.2.2 実験プロトコール | 29 |
| 4.2.3 唾液採取 | 29 |
| 4.2.4 血液採取 | 30 |
| 4.2.5 身体測定 | 30 |
| 4.2.6 臨床診査 | 31 |
| 4.2.7 細菌検査 | 31 |
| 4.2.8 歯周病関連酵素検査 | 32 |
| 4.2.9 統計処理 | 32 |
| 4.3 結果 | 33 |
| 4.3.1 身体測定および唾液採取 | 33 |
| 4.3.2 臨床診査 | 33 |
| 4.3.3 血液検査 | 33 |
| 4.3.4 細菌検査 | 35 |
| 4.3.5 唾液中歯周病関連酵素検査 | 37 |
| 4.4 考察 | 39 |
| 4.5 結論 | 41 |

| | |
|---|----|
| 第5章 中等度強度の持久性運動が歯周炎患者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病 関連酵素に与える影響（検討課題Ⅱ） | 42 |
| 5.1 緒言 | 42 |
| 5.2 対象および方法 | 43 |
| 5.2.1 対象..... | 43 |
| 5.2.2 実験プロトコール..... | 44 |
| 5.2.3 身体測定および運動負荷試験..... | 44 |
| 5.2.4 臨床診査..... | 45 |
| 5.2.5 細菌検査..... | 46 |
| 5.2.6 歯周病関連酵素検査 | 46 |
| 5.2.7 統計処理..... | 47 |
| 5.3 結果 | 47 |
| 5.3.1 身体測定および唾液採取時間..... | 47 |
| 5.3.2 臨床診査..... | 47 |
| 5.3.3 細菌検査..... | 47 |
| 5.3.4 歯周病関連酵素検査 | 49 |
| 5.4 考察 | 52 |
| 5.4.1 歯周病原細菌 | 52 |
| 5.4.2 歯周病関連酵素..... | 53 |
| 5.5 結論..... | 54 |
| 第6章 総合討論..... | 55 |
| 6.1 本研究の成果..... | 55 |
| 6.2 本研究結果の応用、限界点および今後の課題..... | 57 |
| 第7章 結論..... | 60 |
| 参考文献..... | 63 |

第1章 序論

1.1 歯周病とは

歯周病は歯周病原細菌によって引き起こされる感染性炎症疾患である。歯周病は歯科用プローブで歯周ポケットの深さを測定するプロービングと呼ばれる歯周検査によって臨床的に診断され、歯肉炎と歯周炎に大別される。歯肉に限局した炎症があり、プロービング時に出血する状態を歯肉炎といい、歯肉炎が進行して歯肉、セメント質、歯根膜および歯槽骨などの歯周組織に炎症が波及した状態が歯周炎である。プロービング値が4mm以上であれば中等度の歯周炎と診断される。歯肉炎の多くは口腔内清掃やブラッシングによって容易に改善される。一方、歯周炎の改善には積極的な歯周治療や生活習慣の改善が必要となる。歯周病は生活習慣病や国民病ともいわれ、高齢化社会の現代において咀嚼・会話・審美に不可欠な歯を喪失する最大の原因となっている(1,2)。また、歯周病は糖尿病や循環器・呼吸器疾患などの進行にも密接に関係する(3-6)。それゆえ、歯周病の予防は生活の質(quality of life)を維持するために重要な課題である。

歯周病を予防するには、プラークコントロールと生活習慣の改善が重要である。プラークコントロールは歯の表面に付着した細菌の塊である歯垢(プラーク)を歯ブラシなどの口腔内清掃器具を使って除去し、局所的な危険因子である口腔内環境を整える方法である。歯科医師や歯科衛生士、または自分自身で物理的・直接的に歯周病原細菌を取り除くことで歯周病の予防となる。近年、間接的な歯周病予防として、生活習慣の改善が注目されている。喫煙やストレス、運動不足、不規則な食事、栄養の偏りなどの生活習慣が歯周病の危険因子として挙げられており、生活習慣の改善が歯周病を予防するために重要であることが多くの研究により報告されている(7)。生活習慣病の予防に運動が効果的であること

は、多くの研究で明らかにされており、運動習慣のある者では歯周病の罹患率が低いという研究がある(8)。運動による生活習慣の改善が歯周病を間接的に予防する可能性があるが、その詳細な機序は不明であり、解決すべき重要な課題である。

1.2 歯周病に影響を及ぼす要因

全身疾患や運動不足などの生活習慣が歯周病に大きく影響することが明らかとなってきた(9,10)。歯周病の直接的な要因は歯周病原細菌であるが、間接的な要因として宿主要因および環境要因が挙げられる。宿主要因には年齢、性別、糖尿病および肥満などの全身疾患が含まれ、環境要因には口腔内清掃状況、喫煙習慣、ストレス刺激、運動習慣が含まれる。歯周病は加齢により増加し、男性より女性が多いが、全身疾患を有する者では歯周病の発症リスクが高い(11)。また、ブラッシング頻度や喫煙習慣の有無は歯周病発症の危険因子だが、生活習慣、特に運動習慣は歯周病発症に独立して関与することが報告されている(12)。従来、歯周病の予防としてブラッシングや洗口剤による口腔内清掃、禁煙が強調されてきたが、全身疾患の改善や運動という観点から歯周病を予防することの重要性が増してきている。

1.2.1 全身疾患が歯周病に影響を及ぼす機序とその予防としての運動の効果

近年の疫学研究および細菌学的研究により、歯周病とさまざまな全身疾患の間に密接な関連のあることが実証されてきた(13)。歯周病に影響を与える全身的因子には遺伝、年齢および性別などの先天的因子と喫煙、ストレス刺激、糖尿病、肥満および常用薬などの環境及び後天的因子がある。慢性の全身疾患による免疫系機能障害、末梢血管循環障害、創傷治癒遅延などが歯周病態を悪化させ

ることが報告されている (14)。肥満の人では、多くのマクロファージが脂肪組織に浸潤して蓄積し、TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)、Interleukin-6 (IL-6) および単球走化性タンパク質-1 (monocyte chemoattractant protein-1: MCP-1) などの炎症性サイトカインの分泌が増加する。さらに、肥満者で増加の見られるレプチンは歯周病におけるアタッチメントロスに深くかかわっており、歯周病態を悪化させる要因の一つと考えられている (15)。また、糖尿病患者が歯周病になりやすいという報告もある (6)。歯周病巣はマクロファージ、繊維芽細胞、骨芽細胞から産生される炎症性サイトカインなどの生理活性物質の作用を受けて確立される。そのような進行過程に高血糖状態が加わると歯周病態は重症化する。先行研究によると、糖尿病患者に歯周病患者が多く、特に血糖値の不良な患者において重度の骨吸収を伴い歯を喪失する危険性が高まることが報告されている (16)。

運動は全身疾患を予防する有効な手段である。特に肥満や糖尿病の予防や改善に運動が有効であることは多くの研究で明らかにされている。重度肥満患者を対象に運動の影響を調べた先行研究では、運動によって内臓脂肪のマクロファージの発現が著しく減少し、血中 IL-6 が有意に減少しアディポネクチンが有意に増加したことが報告されている (17)。別の研究では、運動が内臓脂肪のレプチン遺伝子発現を減少させ、運動後血中レプチン濃度が減少することが示されている (18)。これらの研究結果から、運動が局所的な炎症性サイトカインを減少させることによって肥満や糖尿病などの全身疾患を予防・改善できると考えられる。また、習慣的な運動はマクロファージ、好中球およびリンパ球などの局所免疫担当細胞を活性化することにより全身の慢性炎症を改善する (19)。歯周病は歯周組織に炎症が生じた状態であり、運動による炎症改善効果は歯周組織にも有効かもしれない。しかしながら、運動による肥満等の改善や炎症改善に

より、歯周病の予防や改善にまで繋がるか否かは明らかではない。

1.2.2 運動が歯周病に及ぼす影響

運動が歯周病の予防や改善に有効であることは疫学的には明らかにされている。男性において持続的な運動は歯周炎の罹患率を引き下げることがわかっている (8)。非喫煙者において運動と歯周炎の罹患率に相関関係のあることも分かっている (8)。身体活動量の多い者は少ない者と比べて歯周炎罹患率が低い (20)。 $\dot{V}O_{2max}$ と歯周炎の関連性を分析した先行研究では、高い $\dot{V}O_{2max}$ を持つ者は重度歯周炎の危険性の低いことが報告されている (12)。また、別の先行研究では、 $\dot{V}O_{2max}$ と BMI の相互作用を分析した結果、 $\dot{V}O_{2max}$ が高く BMI の低い者が重度歯周炎の危険性が低かったと報告されており、高い $\dot{V}O_{2max}$ レベルと体力を持つことが歯周組織の健康維持と歯周病の予防につながると結論付けられている (21)。Merchant らは運動と歯周病の危険性に相関関係があり、運動習慣のある者はそうでない者に比べて歯槽骨の吸収量の少ないことを報告している (8)。適度な運動習慣の確立は、免疫機能の活性化および炎症性サイトカインの減少によって歯周病を改善する可能性があり、この効果は肥満者の非外科的歯周治療のそれと同様であると推定される。最近の臨床研究では、歯周治療前または歯周治療中に適切な運動療法を行い、肥満のコントロールや血糖値のコントロールをしておくことによって治療期間の短縮や良好な結果の得られることがわかっている (22)。以上の先行研究を鑑みると、運動は歯周病の予防や改善に有効である可能性が高い。

1.3 運動が歯周病を予防・改善する機序の解明

習慣的な運動によって歯周病態が改善されることがわかっているが、その改

善機序に関しては不明な点が多い。推察される機序の一つとして、運動による肝機能の改善がある。習慣的な運動によって肝機能が改善するが、肝機能の改善により歯周病が改善されるかもしれない。運動トレーニングにより、肝機能の指標である唾液中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（alanine aminotransferase: ALT）が有意に減少することが報告されている（23）。また、ALT は歯周組織が損傷したときに放出される逸脱酵素でもある。歯周炎患者を対象にした先行研究では、ALT の上昇と歯周炎の間に有意な相関関係が認められたことが報告されている（24）。女性を対象にした先行研究では、血清中の ALT が上昇したことにより歯周炎の発生率が有意に高値を示したと報告されている（25）。さらに、歯周ポケットの深さと ALT の間に有意な関連性のあることがわかっており（23）、これらの所見は歯周病が肝機能と密接に関連していることを示している。したがって、習慣的な運動を行って肝機能を改善することによって歯周病態を改善する可能性がある。

運動による血中脂質の改善が歯周病態に影響するかもしれない。運動は低比重リポ蛋白（low density lipoprotein: LDL）コレステロール値を改善させるが（23）、LDL の改善が間接的に歯周病態に変化を与える可能性がある。慢性歯周炎患者では、LDL コレステロールが高くなる傾向があり、歯周病が高脂血症の危険因子である可能性が示唆されている（23）。中等度強度の運動習慣が高脂血症を改善し、LDL コレステロールを低下させることが報告されている（23）。また、LDL コレステロールと歯周病原細菌との間に正の相関関係が認められたという先行研究がある（26）。

運動による免疫機能の向上が歯周病態を改善させる可能性がある。習慣的な運動はマクロファージ、好中球およびリンパ球などの局所免疫担当細胞を活性化する（19）。歯周病は歯周組織に炎症が生じた状態であるため、免疫機能を高

めることにより歯周組織の炎症を抑制できるかもしれない。長期の運動習慣が皮下および内臓脂肪を減少させ、TNF- α 、IL-6、MCP-1などの炎症性サイトカインの基礎レベルを低下させ、アディポネクチンなどの抗炎症性サイトカインを増加させることがわかっている(27-30)。重度肥満患者を対象に3週間のカロリー制限とウォーキングトレーニングを行った先行研究では、内臓脂肪のマクロファージの発現が著しく減少し、血中IL-6が有意に減少し、アディポネクチンが有意に増加したことが報告されている(29)。レプチンは歯周病におけるアタッチメントロスに深くかかわっており、歯周組織破壊が進行すると血中レプチン濃度が上昇する(31,32)。別の先行研究では、運動が内臓脂肪のレプチン遺伝子発現を減少させ、運動後血中レプチン濃度が減少することが示されている。これらの研究結果から、運動が局所的な炎症性サイトカインを減少させ、免疫担当細胞を活性化し、歯周炎の病態を改善し得る可能性が示されている(23,33)。

以上の結果から、運動が間接的に歯周病を予防・改善する機序はいくつか示されているが、確実な関係を確立するには至っていない。

運動と全身疾患および歯周病と全身疾患に関連のあることは多くの疫学的研究や介入研究により明らかにされている。しかし、運動と歯周病の関係については不明な点が多い。習慣的な中等度強度の運動と歯周病に関する疫学研究は多くあるものの、一過性の運動が歯周病に与える影響を研究した先行研究はまだない。そこで、本研究では4mm以上の歯周ポケットを有する歯周病患者と健常者を対象に中等度強度の一過性の持久性運動が唾液中の歯周病原細菌や歯周病関連酵素に及ぼす影響を検討することにより運動と歯周病の関係を調べることを目的とし、以下の検討課題I-1、I-2、IIを実施した。

検討課題Ⅰ-1 中等度強度の持久性運動が健常者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響

検討課題Ⅰ-2 安静時における時間経過が健常者の唾液中歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響

検討課題Ⅱ 中等度強度の持久性運動が歯周炎患者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響

第2章 文献研究

2.1 唾液中酵素による歯周病の評価

歯周病の評価には唾液中に含まれる酵素の検査が有用である。歯周病は歯肉の炎症、骨吸収など歯周組織の形態変化を惹起する疾患であるが、進行し始めあるいは進行しつつある歯周病では、視診でそうした形態変化を確認できないことが多い。先行研究によると、その段階で唾液中の酵素を検査すると、複数の酵素の濃度が上昇することが報告されている(34)。Nakamuraらの研究によると、健常者と慢性歯周炎患者の唾液中のアルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase: ALP)を比較した結果、慢性歯周患者で高い値を示したことが報告されている(35)。健常群と歯周病群の唾液中の酵素活性を比較した先行研究によると、乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase: LDH)とALTが歯周病群で有意に高値であったことが報告されている(36)。また、別の先行研究により、唾液中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(asparatate aminotransferase: AST)とALPがアタッチメントロスの有力な危険因子であることが示されている(37)。以上のことから、唾液を用いたAST、ALT、LDHおよびALP検査は歯周病のスクリーニングや予知に有用と思われる。

唾液中の酵素は様々な要因により変動する。個体間変動に関する先行研究によると、各酵素は加齢により上昇し、男女間で変動傾向に違いのあることがわかっている。肥満度(body mass index: BMI)に関しては、BMIの上昇に比例してALTが上昇したことが報告されている(38)。また、飲酒習慣によりALTが上昇することも報告されており、これは過食傾向の結果、脂肪肝になった結果として生じたものではないかと考えられる(39)。したがって、酵素の変化を調べる際には年齢、性別、体格、生活習慣など被験者の条件を統制して実験を行うこ

とが重要である。

AST、ALT、LDH、ALP は組織破壊に伴い細胞から放出される逸脱酵素である。唾液中のこれらの酵素を測定することによって、運動による筋のストレスや損傷の影響を評価することができる。高強度運動後の血清中の酵素の変動を調べた先行研究では、AST は運動後有意に増加したと報告されている (40)。高強度運動前後で唾液中の AST を測定した別の先行研究では、運動前と比較して運動直後で有意差は認められなかったが AST は減少したと報告されている (41)。被験者を中等度強度運動群と高強度運動群に分けて運動が免疫学的に有益であるかを調べた先行研究では、中等度強度運動群の方が免疫機能が有意に高かったことが実証されている (42)。唾液中の AST で有意差が認められなかったのは、運動強度の違いが影響しているのかもしれない。また、これらの結果は、血液中と唾液中の各指標に相関はなく、唾液中の酵素は口腔状態を独立して反映しているという先行研究の結果と一致する。

以上のことから、歯周病態を反映する酵素が運動前後で変化することから、運動が歯周病態に何らかの影響を及ぼす可能性のあることが示唆される。

2.2 歯周病原細菌と歯周病態の関係に影響を与える要因

歯周病に罹患する因子の主役は歯周病原細菌と考えられる。とりわけ、重症な歯周病態においては、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a)、*Porphyromonas gingivalis* (P.g)、*Tannerella forsythia* (T.f)、*Prevotella intermedia* (P.i)、*Treponema denticola* (T.d) などの菌種が注目されており、これらの菌種に感染すると歯周組織破壊の危険性が高まるといわれている。しかし、最終的に歯周組織を破壊させるものは細菌成分ではなく、自己の細胞から

産生される物質（酵素、サイトカイン）による。それゆえ、歯周病発症の要因である歯周病原細菌や、歯周組織の破壊に関与する酵素や炎症性サイトカインを調べることは歯周病の危険性を診断するうえで重要である。

歯周病態に影響を与える要因は直接的要因と間接的要因に分けられる。先行研究によると、歯周組織が健康であっても過体重もしくは肥満の者の歯肉縁下バイオフィルム中では T.f が増殖し、結果として歯周炎の罹患および進行につながる事が報告されている (38)。P.g 菌に感染した肥満の被験者と健康で痩せた被験者を比較した先行研究では、肥満の被験者の方が有意に歯槽骨の吸収が認められ、これは肥満が P.g 感染を処理する免疫能力を妨げたためであると推測されている (43)。これらの研究結果から、歯周病原細菌が歯周病態に影響を与える直接的要因であり、肥満が間接的要因であることが推測される。また、肥満患者の食生活、生活様式、口腔内衛生状態、遺伝的な背景も歯周病態に影響を与える間接的な要因と考えられる。

運動習慣は歯周病の改善に有効であるかもしれない。特に歯周病原細菌に対して運動の効果を認めた研究がある。運動介入の影響を検討した先行研究によると、歯周ポケット 4mm 以上でかつ歯肉出血を有する歯数および T.d、T.f の菌数が運動介入後に有意に減少した (23,44)。運動介入により歯周病原細菌が減少したことから、運動習慣が歯周病態に影響を与える間接的要因であることが推測される。

運動は歯周組織の破壊に関わる炎症性サイトカインにも有効である。習慣的な運動は好中球およびリンパ球などの局所免疫担当細胞を活性化する。対象者を非運動群、中等度強度運動群および高強度運動群に分けた先行研究では、長期中等度強度運動群では他のグループよりも末梢血中好中球およびリンパ球濃度は有意に高かったことがわかっており、このことは中等度強度の運動は免疫学

的に有益であることが示された(42)。非外科的歯周治療を受けた慢性歯周炎患者において、炎症性サイトカインおよび血中レプチン濃度が低下し、運動によって達成される効果と同様の結果が得られたという先行研究がある。この研究結果から、運動習慣が局所的な炎症性サイトカインを減少させ、免疫担当細胞を活性化し、歯周病態を改善する間接的要因である可能性が示唆された。

したがって、特に中等度強度の運動は唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素を変化させる可能性がある。しかしながら、一過性の運動が唾液中の歯周病原細菌や歯周病関連酵素に及ぼす影響は明らかではない。運動が歯周病態を改善するという疫学研究の生理学的背景を検討する上で、中等度強度運動と歯周病態および歯周病関連酵素の関係を調べることは重要な課題である。

第 3 章 中等度強度の持久性運動が健常者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響（検討課題 I-1）

3.1 緒言

唾液は口腔機能の維持にとって不可欠な液体であり、口腔内情報の宝庫である。唾液は採取が容易で、口腔内では齶蝕リスクの判定や歯周病検査への応用に使用されている。近年、歯周病の臨床症状と唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素の状態との間に関連が見出された (45)。宿主の間質細胞、上皮細胞が損傷を受けたときには、AST、ALT、ALP などの酵素が放出される。健常人、歯肉炎患者、慢性歯周炎患者の唾液中のこれらの酵素の関連性について分光測定を用いて行った先行研究によると、慢性歯周炎患者は歯肉炎患者、健常人に比べ統計学的に明らかに各酵素が高値を示したという報告がある (35)。これは歯周病による歯周組織や口腔環境の変化が唾液成分の変化に反映されることを意味する (45)。

運動は唾液の分泌や唾液中の歯周病関連酵素に影響を与えることが知られている (20, 12, 41, 46.)。特にピーク時酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2peak}$) の 40~70% の負荷強度で約 1 時間行う中等度強度運動は、唾液中免疫グロブリンを増加させる (47)。高強度間欠運動においては、交感神経の興奮と副交感神経の抑制のため唾液分泌量は低下し、唾液中の α -アミラーゼとコルチゾール濃度を増加させたという研究結果がある (48)。一方、被験者を中等度強度運動群および高強度運動群に分け比較した先行研究では、中等度強度運動群において末梢血中好中球およびリンパ球濃度が有意に高く、IL-6 などの炎症性サイトカインの基礎レベルを低下させ、アディポネクチンなどの抗炎症性サイトカインを増加させることがわかっており、中等度強度の運動は高強度の運動に比べて免疫学的に有益

であることが示唆されている (42)。

運動習慣のある者はない者と比べて自律神経系の活動が高く、唾液分泌量が多いことがわかっている。先行研究では、運動習慣のある高齢者は、運動習慣のない高齢者と比べて唾液中の分泌型免疫グロブリン A (secretary immunoglobulin A: sIgA) の分泌量が多いことが報告されている。唾液の分泌量の調節には主に副交感神経が関与しており、運動中は副交感神経活動が低下することによって唾液分泌量が低下する。一過性の中等度強度の運動後の唾液分泌量および唾液中 sIgA 分泌量を検討した先行研究では、どちらも運動前と比較して運動中に有意に低下し運動終了後に運動開始前のレベルに回復したと報告されている (47, 49)。

唾液の分泌量の増加や歯周病関連酵素の増加は歯周病原細菌の減少に有効であるが、一過性の運動による唾液分泌量の減少や歯周病関連酵素の増加が歯周病原細菌にどのような影響を与えるかは明らかではなく、それについて検討した研究も少ない。そこで、本研究では中等度強度の持久性運動が健常者における唾液中の歯周病原細菌や歯周病関連酵素に及ぼす影響について検討した。

3.2 対象および方法

3.2.1 対象

27~52 歳 (平均年齢 41 ± 9 歳) で週 2 回以上の運動習慣を持つ健常男性 12 名を対象とした。本研究は早稲田大学人を対象とする研究に関する倫理委員会にて承認 (承認番号 2014-210) を得て行い、あらかじめ被験者全員に本研究の趣旨や内容を書面にて十分に説明し同意が得られた方のみを対象とした。また、以下の条件を満たす者は対象から除外した。

- 1) 重篤な全身疾患を有する。
- 2) 本実験開始前 3 カ月以内に抗生物質などの投薬を受けている。
- 3) 現在歯周病の治療を受けている。
- 4) 4mm 以上の歯周ポケットを有する歯牙を持つ。

3.2.2 実験プロトコール

初回測定時（安静試行）に対象者の身体測定および口腔内検査、 $\dot{V}O_2\text{peak}$ 測定を行った。対象者には測定の 2 日前から疲労が残るような激しい運動を控え、前日はアルコール摂取を禁止するよう指示した。測定当日は起床後に食事および歯磨きをせず、早朝空腹時という条件下で行った。対象者は実験室への来室後、身長および体重、体脂肪率を測定した。安静時の歯周病原細菌および歯周病関連酵素検査のため Bio Medical Laboratories (BML) 製のキットを用いて 5 分間ガムベース咀嚼刺激による全唾液をポリスピッツ管に歯周病関連酵素用に 5ml、歯周病原細菌用に 5ml、計 10ml 採取した。5 分経過しなくても 10ml に達したところで採取終了とした。1 時間後に 2 回目の唾液採取を 1 回目と同量行った。その後、 $\dot{V}O_2\text{peak}$ 測定のためトレッドミルによる心肺運動負荷試験を行った。1~4 週間後、前回と同条件下で同実験室内にて安静時の唾液採取を行った。その後、本試行（運動試行）として中等度強度の持久性運動（60% $\dot{V}O_2\text{peak}$ ）を 1 時間実施した。運動負荷終了直後、30 分後、60 分後の 3 回唾液を採取した。歯周病原細菌および歯周病関連酵素のすべての項目は BML (Tokyo, Japan) に依頼して分析を行った。

3.2.3 身体測定および運動負荷試験

身体測定は身長計 (sanwa 社製)、体組成計 (TANITA 社製インナースキャン 50V BC-622) を使用した。

$\dot{V}O_2\text{peak}$ 測定のための運動負荷試験ではトレッドミル (FUKUDA 電子社製 MAT-2700) を使用した。運動負荷試験中は呼気ガス分析器 (ミナト医科学社製 AERO MONITOR AE300S) を用い、呼気ガス分析 (breath by breath 法) を行った。運動負荷心電図装置 (FUKUDA 社製 STRESS TEST SYSTEM ML-9000) により Mason-Likar 誘導法を用いて 12 誘導心電図を記録し、心拍数を測定した。左側上腕部には血圧測定用のカフを巻き、運動負荷試験用自動血圧計 (Sun Tech Medical 社製 Tango2) を使用し血圧を測定した。運動負荷プロトコールは 1 分毎に傾斜と速度が増加するトレッドミル用ランプ負荷法により実施した。 $\dot{V}O_2\text{peak}$ は、1) 酸素摂取量のプラトー、2) 呼吸交換比 (respiratory exchange ratio: RER) が 1.1 以上、3) 心拍数が年齢別予測最高心拍数 (220-年齢) の 90% に到達することの 3 つの条件のうち 2 つ以上を満たすことを条件とし、決定した。運動中の $\dot{V}O_2$ 、RER、心拍数は 30 秒毎の平均値を算出し、解析に使用した (50)。

本試行では中等度強度の持久性運動 (60% $\dot{V}O_2\text{peak}$) を 1 時間実施した。運動強度の設定は、負荷開始から 5~10 分間にトレッドミルの傾斜を調整することにより行った。運動負荷前の 5 分間、運動負荷中の 60 分間、運動負荷終了後 (60 分間) に呼気ガス分析および心拍数測定を行い、酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$)、二酸化炭素排出量 ($\dot{V}CO_2$)、RER を算出した (51)。

3.2.4 臨床診査

全ての被験者を対象に、以下の項目について歯周組織検査を行った。

- 1) Probing Depth (PD) : 約 25 g の圧力でプローブ (PDT Sensor Probe, USA) を挿入し、1 mm 単位で測定した。1 歯につき 4 点計測した。
- 2) Clinical Attachment Level (CAL) : PD と同様に測定した。
- 3) Bleeding on Probing (BOP) : プロービングにより出血の有無を判定した (52)。出血がみられた部位数を全被験部位数で割った部位陽性率で示した。

3.2.5 細菌検査

唾液採取後に PCR-Invader 法を用いて細菌検査を行った。全細菌、A.a、P.g、P.i、T.f を実数値にて測定した。PCR-Invader 法とは、各菌種のインバーダーのターゲット領域を含むプラスミドを既知コピー数 (菌数に相当) に段階希釈した DNA 溶液を用いる。一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) 部位の前後それぞれの塩基配列と相補的な配列を持つ Invader oligo と Signal Probe (5'側にシグナル検出のための配列“Flap”を併せ持つ) が targetDNA とハイブリタイズする際に、SNP 部位で形成される 3 重鎖構造を Cleavase Enzyme が特異的に認識し、Signal Probe 上の Flap を切断する (第一反応)。遊離した Flap は蛍光検出用の FRET Probe とハイブリタイズし、そこで再び 3 重構造を Cleavase Enzyme が認識し、蛍光物質を遊離させる。この蛍光の増加量をリアルタイムで測定することで定量的に測定する方法である (53)。すべての項目は BML (Tokyo, Japan) に依頼して分析を行った。

3.2.6 歯周病関連酵素検査

AST および ALT の測定は、それぞれピュアオート S AST-L または S ALT-L (ともに積水メディカル) を用いて UV 法 (JSCC 標準化対応法) にて行った。LDH の測定は、L タイプワコー LDH・J (和光純薬工業) を用いて UV 法 (JSCC 標準化対応法) にて行った。ALP の測定は、L タイプワコー ALP・J2 (和光純薬工業) を用いて比色法 (JSCC 標準化対応法) にて行った。測定にはともに LABOSPECT008K および BioMajesty JCA-BM8060 (日立ハイテクノロジー・日本電子) を用いた。すべての項目は BML (Tokyo, Japan) に依頼して分析を行った。

3.2.7 統計処理

すべての測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。統計解析は、SPSS statistics21.0 を用いて行った。細菌、歯周病関連酵素のすべての測定項目について安静試行の実験前と実験後、運動試行の実験前の 3 点で一元配置分析を行い、有意差のないことを確認した。有意差のなかった項目のみ運動前、運動直後、運動後 30 分、運動後 60 分の群内変動を一元配置分析により比較し、事後検定として Bonferroni 法を用いて比較検討を行った。本研究では統計学的な有意水準を 5% とした。

3.3 結果

3.3.1 身体測定および唾液採取

身体測定の結果は身長 174.2 ± 6.3 cm、体重 72.5 ± 12.4 kg、BMI 23.9 ± 6.3 kg/m²、体脂肪率 $20.2 \pm 6.4\%$ であった。唾液は安静試行の実験前と実験後、運動試行の運動前と運動後において5分以内で全員規定量に達した。

3.3.2 臨床診査

口腔内診査の結果、PD 2.1 ± 0.7 mm、CAL 2.4 ± 0.6 mm、BOP $5.1 \pm 4.1\%$ 、PD = 4 mm 以上の部位の割合が0%であり歯周炎は認められなかった。

3.3.3 細菌検査

総細菌数は運動直後に比較して、運動後30分、運動後60分で有意に減少していた ($P < 0.05$, Figure 1a)。A.a、P.i、P.g は本被験者からは検出されなかった。T.fについても有意差は認められなかった (Figure 1b)。

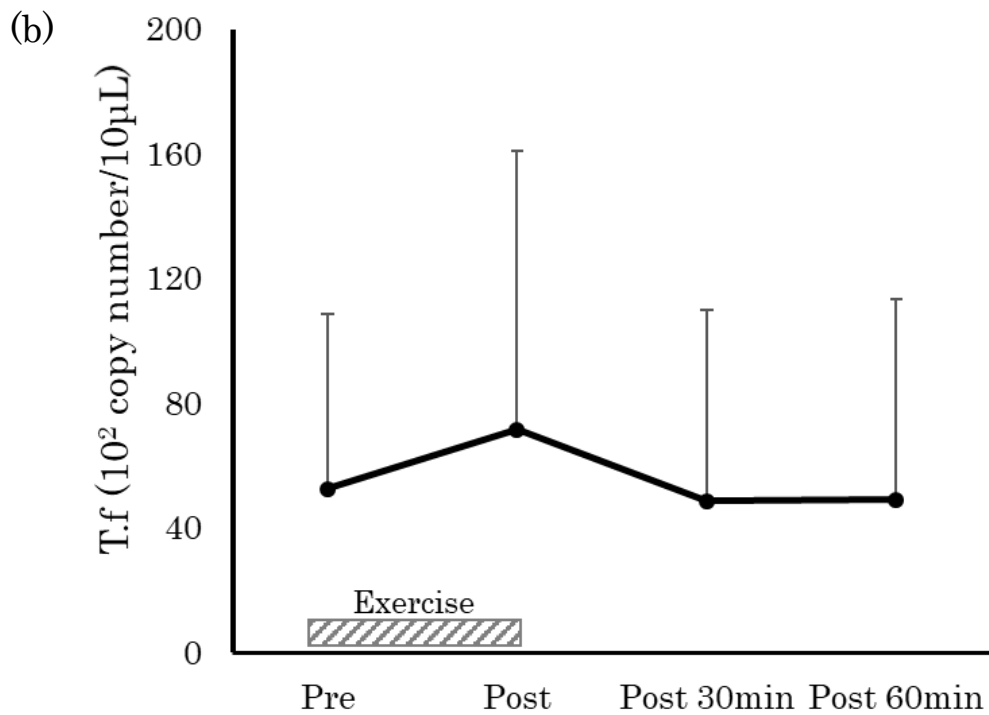
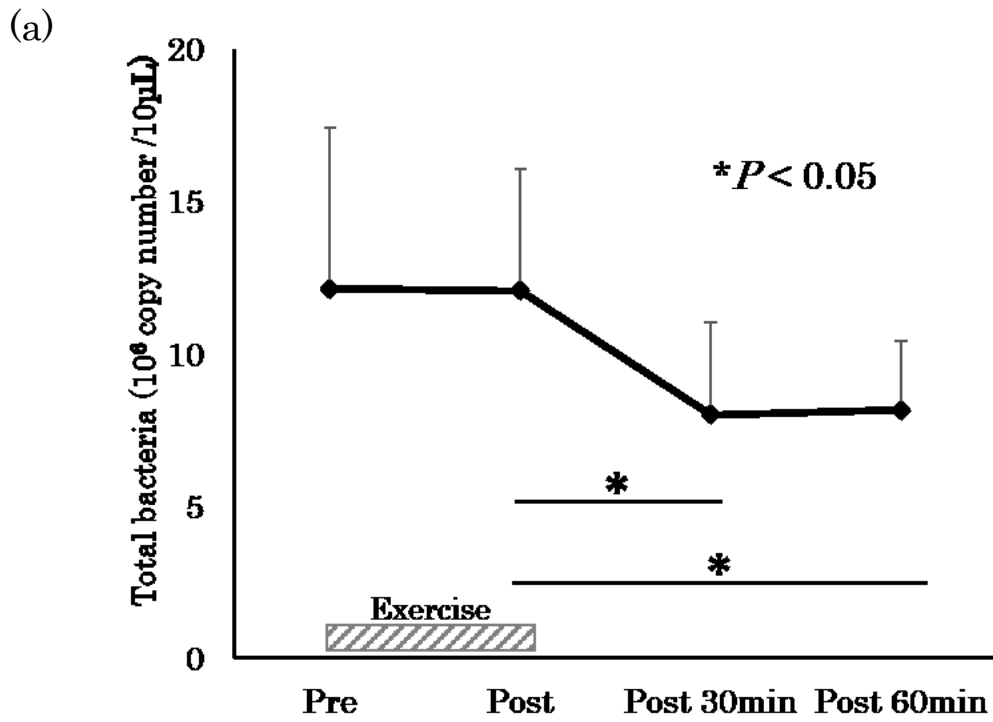
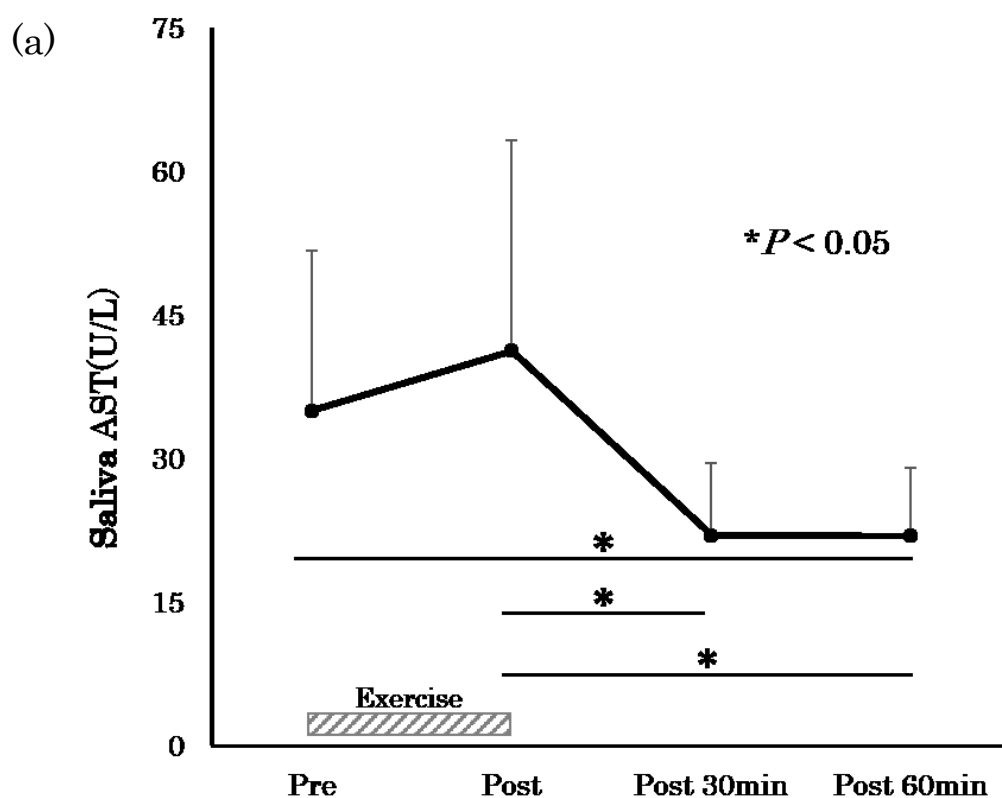
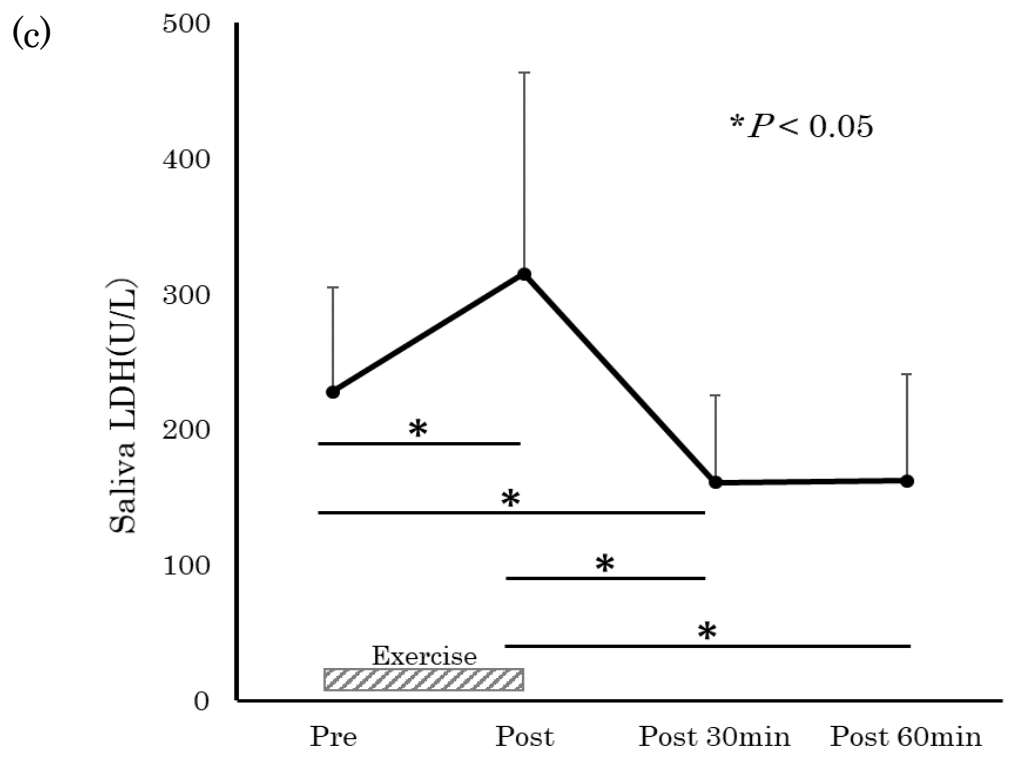
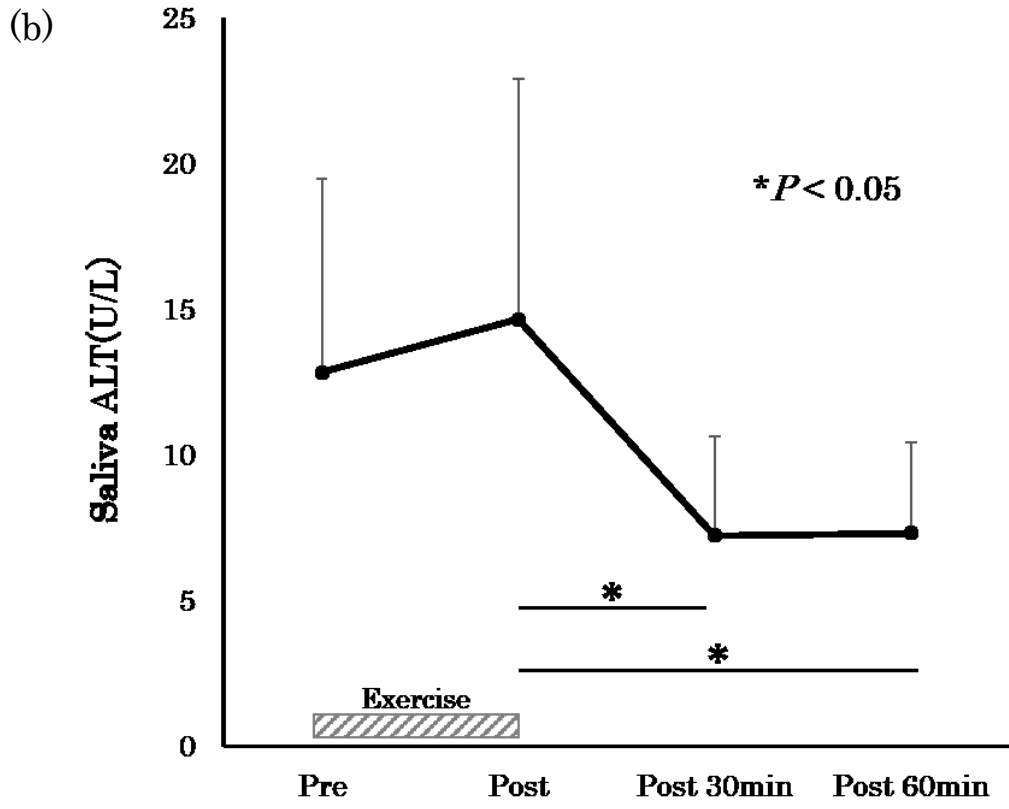


Fig. 1 運動前後の唾液中の総細菌 (a) および *Tannerella forsythia* (T.f) (b) の変化。 * $P < 0.05$.

3.3.4 歯周病関連酵素

ASTは運動前に比較して運動後60分、運動直後に比較して運動後30分、運動後60分で有意に減少した ($P < 0.05$, Figure 2a)。ALTは運動直後に比較して運動後30分、運動後60分で有意に減少した ($P < 0.05$, Figure 2b)。LDHは運動前に比較して運動直後で有意に増加し、運動前に比較して運動後30分、運動直後に比較して運動後30分、運動後60分で有意に減少した ($P < 0.05$, Figure 2c)。ALPは運動前に比較して運動直後で有意に増加し、運動直後に比較して運動後30分で有意に減少した ($P < 0.05$, Figure 2d)。





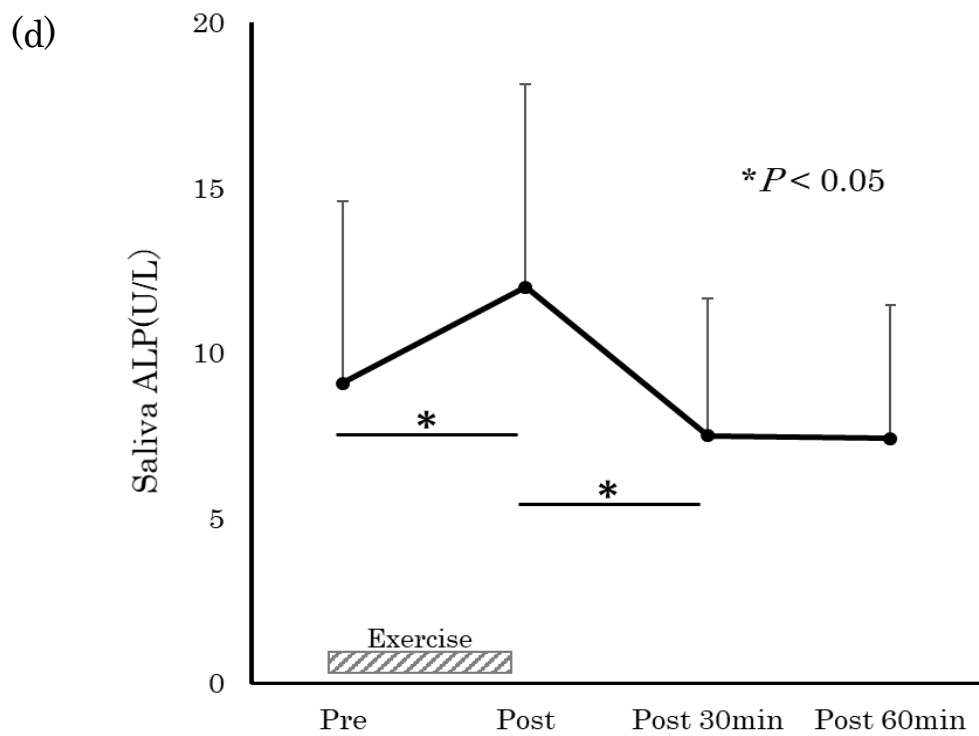


Fig. 2 運動前後の唾液中の aspartate aminotransferase (AST) (a)、alanine aminotransferase (ALT) (b)、lactate dehydrogenase (LDH) (c) および alkaline phosphatase (ALP) (d) の変化。 * $P < 0.05$.

3.4 考察

本研究では健常成人男性に対し中等度強度の持久性運動を行い、運動前、運動直後、運動後 30 分、運動後 60 分の唾液中の歯周病原細菌、歯周病関連酵素を調べることにより、運動が唾液成分に与える影響を検討した。その結果、歯周病原細菌においては運動前後で有意な減少は認められなかったものの、歯周病関連酵素では AST、LDH において運動前後で有意な減少が認められた。

3.4.1 歯周病原細菌

持久性運動を行った結果、唾液中の総細菌数は運動直後に比較して 30 分後、60 分後で減少し、有意差が認められた。運動前に比較して運動直後でも減少したが有意差は認められなかった。T.f は運動直後に比較して 30 分後、60 分後で減少したが有意差は認められなかった。これは、全唾液検査では菌の変化は捕捉しにくいとする先行研究の報告と一致した (54)。つまり、全唾液を使用したことで歯周ポケット内に少なくとも生息すると信じられている T.f 菌を捕捉できなかった可能性もあり、またペーパーポイント法で検出する場合と異なり感度が劣ることも一因であろう。歯周病原細菌が活発に活動することにより、歯周組織の侵襲が始まる。歯周病原細菌の主たる病原性因子はリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) である。LPS レセプターがマクロファージ上にあり、cluster of differentiation14 を介してシグナル伝達が行われる。その結果、IL-6、TNF- α 、トランスフォーミング増殖因子 β などの各種サイトカインが発現し、またプロスタグランジン E₂ を誘導し、破骨細胞を活性化して歯槽骨吸収をもたらす。あるいは炎症性反応を増強する。そのように引き起こされた歯周炎急性症状部位において、T.f の割合が有意に高くなるという報告がある (55)。唾

液中の歯周病原細菌検査については菌量が多くても必ずしも歯周組織が健康な状態から病的な状態へと形態変化を起こすとは限らないが、いったん歯周ポケット形成など歯周組織に形態変化が生じた場合、歯周病原細菌は病態の進行速度を急速に早めるという研究結果もある (56, 57)。また Arimatsu らは最近、動物実験ではあるが歯周病原細菌が全身の炎症にかかわることを報告した (58)。歯周病原細菌を減少させ、活動性をコントロールすることが歯周炎の改善につながると考えられる。本研究では有意差は認められなかったが、中等度強度の持久性運動を行ったことにより唾液中の総細菌数が運動後に減少した。また、運動直後に比べて運動後 30 分および 60 分後に総細菌数が有意に減少した。しかし、本実験では被験者数が少なかったこと、細菌数のばらつきの多かったこと、対象が歯周病患者ではなかったことを考慮すると、運動が唾液中の細菌数に及ぼす影響は今後のさらなる検討が必要である。

3.4.2 歯周病関連酵素

本実験では AST、ALT、LDH、ALP を歯周病関連酵素として使用した。これらは通常血液マーカーとして、AST、ALT は肝疾患、LDH は肝炎、心筋梗塞、悪性腫瘍、ALP は胆石、胆道癌、癌の骨転移のスクリーニング、モニタリングに使用される。進行し始めあるいは進行しつつある歯周炎では、視診で歯周組織の形態変化が確認できない場合が多いが、その段階で唾液中の歯周病関連酵素を検査すると濃度の上昇がみられる。すなわち、歯周炎に罹患し進行しつつあるがまだ歯周組織の炎症や破壊による形態変化が起こっていない、または視認できない時に唾液検査を行えば歯周炎を早期に発見することが可能になる。例えば、歯周炎の進行に伴い歯肉細胞が損傷を受け、LDH が唾液中に遊出し基準値 (270U/L) 以上の場合約 55%が歯周炎とされる (59)。しかし、血液中と唾液

中の各指標に相関はなく、唾液中のこれらの酵素は口腔状態を独立して反映している。血液中の AST、ALT、LDH は運動を行うことにより上昇することが明らかになっている。これは、細胞の崩壊または細胞膜の透過性の亢進によるものと考えられている (60)。

本実験では、AST は運動前に比較して運動後 60 分、運動直後に比較して 30 分後、60 分後で有意に減少した。ALT は運動直後に比較して 30 分後、60 分後で有意に減少した。LDH と ALP は運動前に比較して運動直後で有意に増加した。増加した原因は、運動により交感神経が刺激され唾液の分泌が減少し、汗の分泌が促進されたことにより軽度の高張性脱水状態を起し、唾液中の歯周病関連酵素の濃縮が起こったためと考えられる。AST、ALT、LDH、ALP は組織破壊に伴い細胞から放出される逸脱酵素で、組織破壊マーカーである。歯肉溝滲出液あるいは唾液中のこれらの酵素レベルは、歯周組織破壊の予知マーカー、あるいは歯周疾患活動度 (disease activity) を示すマーカーとして有用性が報告されている (61)。また ALP と LDH は歯周疾患の治療効果のモニタリングに有用であるとの報告もある (62)。両者の比較では LDH は ALP より繊細に反映すると考えられている (63)。唾液中の歯周病関連酵素と歯周炎のスクリーニングテストに関する先行研究によると、LDH が最も高い感受性を示した (64)。各逸脱酵素中 LDH で有意な減少が本研究で認められたことは、それと関係あるのかもしれない。中等度強度の持久性運動が唾液中の AST および LDH を減少させることが示された。限界点として、歯周組織に損傷を受けている歯周病患者では健常者よりも大きな影響があるかもしれない。

3.5 結論および限界点

歯周病のない健常者に対し中等度強度の持久性運動を行った結果、唾液中の歯周病関連酵素が有意に減少したが歯周病原細菌は変化しなかった。このことは、運動が口腔内の環境を改善する可能性のあることを示唆している。ただし、本検討課題では安静条件を設定しておらず、運動そのものの影響であるか、時間経過による影響であるかを区別することができない。安静状態での時間経過が歯周病原細菌や唾液中歯周病関連酵素に及ぼす影響を検討したうえで、健常者に対する運動の影響を結論付ける必要がある。

第 4 章 安静時における繰り返しの唾液採取が健常者の唾液中歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響 (検討課題 I-2)

4.1 緒言

唾液は1日を通して分泌されているが、唾液分泌量には日内変動がある(65)。唾液分泌量は睡眠中に最も低下し、飲食時に最も増加する(65)。飲食の条件を統制した場合、唾液分泌量は午前6時に最低値、午後6時に最高値を示す(66)。唾液分泌量だけでなく、唾液中に含まれる細菌や生化学指標も日内変動を有する。唾液中に含まれる細菌の半数以上が24時間の周期で変動することが報告されており、歯周病原細菌も含まれる(67)。歯周病原細菌である P.g.および P.i. は午前中に、A.a.は午後に多くなる日内変動を有している(67)。生化学指標も日内変動を示すことが報告されており、唾液中の代表的な生化学指標であるコルチゾールやメラトニンは明確な日内変動がある(68)。しかしながらより短時間での変化、例えば午前の中での1~2時間の変動は不明であり、ASTやALT、LDH、ASPのような唾液中歯周病関連酵素の日内変動は明らかでない。歯周病の臨床現場において、検査項目の日内変動の有無を把握することは重要である。

唾液の採取方法は唾液中の歯周病原細菌や歯周病関連酵素に影響する可能性がある。唾液中に含まれる様々な指標を評価する際には、可能な限り洗口した後に唾液を採取することが推奨されている(69)。しかしながら日本歯周病学会の歯周病治癒判定プロジェクト報告書には、歯周病原細菌の検査時における洗口の必要性は言及されていない(70)。歯周病原細菌の検査は歯周病の有無や進行の度合い、治療の効果を判定する目的でおこなわれており、洗口により細菌が洗い流されることは好ましくない。そのため、歯周病検査に唾液を用いる際には洗口が必要とされていなかったと推察される。唾液中の歯周病原細菌の日内変動

を報告した先行研究でも唾液採取の前に洗口はおこなわれていない (67)。しかしながら健常者であっても、唾液中細菌数は起床時に最も多く食後に低下することから (71)、洗口や繰り返しの唾液採取により唾液中の細菌数は減少すると考えられる。1日に複数回の唾液採取をおこない、一過性の運動介入等の影響を検討する場合には、洗口により口腔内の環境条件を統制する方が望ましい可能性がある。ただし、臨床における歯周病検査では洗口をおこなわないため、洗口なしで唾液中歯周病原細菌がどのように変化するか、つまり短時間に繰り返し唾液を採取した際の細菌数の変化を検討する必要がある。安静時に洗口なしで繰り返し唾液を採取した場合に、歯周病原細菌が変化するか否かが明らかになれば、歯周病に関する生理学研究や臨床現場に有用な情報となり得る。また検討課題 I-1 で検討した「中等度強度の持久性運動が健常者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響」の結論を正しく導くうえで、洗口せずに繰り返し採取した唾液中の歯周病原細菌や歯周病関連酵素の変化を明らかにすることは重要である。

そこで検討課題 I-2 では、洗口せずに唾液を採取し、安静時における繰り返しの唾液採取が健常者の唾液中歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響を検討することを目的とした。また洗口による唾液中歯周病原細菌および歯周病関連酵素の影響、および血中と唾液中の歯周病関連酵素の関連も併せて検討した。

4.2 対象および方法

4.2.1 対象

27~55 歳（平均年齢 37 ± 10 歳）の健常男性 11 名を対象とした。本研究は

早稲田大学人を対象とする研究に関する倫理委員会にて承認（承認番号 2014-210）を得て行い、あらかじめ被験者全員に本研究の趣旨や内容を書面にて十分に説明し同意が得られた方のみを対象とした。また、以下の条件を満たす者は対象から除外した。

- 1) 重篤な全身疾患を有する。
- 2) 本実験開始前 3 カ月以内に抗生物質などの投薬を受けている。
- 3) 現在歯周病の治療を受けている。
- 4) 4mm 以上の歯周ポケットを有する歯牙を持つ。

4.2.2 実験プロトコール

対象者の身体測定および口腔内検査を行った後、120 分間座位安静前中後で唾液採取、血液採取を行った。唾液採取、血液採取のタイミングを Figure 3 に示す。対象者には測定の 2 日前から疲労が残るような激しい運動を控え、前日はアルコール摂取を禁止するよう指示した。測定当日は起床後に食事および歯磨きをせず、早朝空腹時という条件下で行った。対象者は実験室への来室後、身長計（sanwa 社製）、体成分分析装置（インボディ・ジャパン社製 InBody720）を用いて身長および体重、体脂肪率を測定した。座位安静中はパソコン、携帯電話の使用、読書、簡単な軽作業を許可した。

4.2.3 唾液採取

歯周病原細菌および歯周病関連酵素検査のため Bio Medical Laboratories (BML) 製のキットを用いてガムベース咀嚼刺激による全唾液をポリスピッツ管に歯周病関連酵素用に 4ml、歯周病原細菌用に 4ml、計 8ml 採取した。安静

60分後、90分後、120分後に同様に唾液採取を行い、120分後には洗口ありの唾液採取も行った。洗口は口腔内を水で30秒間十分にゆすぎ、この作業を3回実施した。洗口後座位安静を5分間保ち、口腔内の唾液をすべて嚥下したのち同様にガムベース咀嚼刺激による全唾液を採取した。歯周病原細菌および歯周病関連酵素のすべての項目はBML (Tokyo,Japan) に依頼して分析を行った。

4.2.4 血液採取

安静前、安静60分後、90分後、120分後に肘正中静脈から血液を10ml採取した。血液採取後、真空採血管へ分注し30分間室温で静置した後、遠心分離機(KUBOTA社製卓上小型遠心分離機)にて3500rpmで10分間遠心分離し血清を抽出した。抽出した血清は測定まで冷凍(-80°C)保存した。すべての項目はBML (Tokyo,Japan) に依頼して分析を行った。

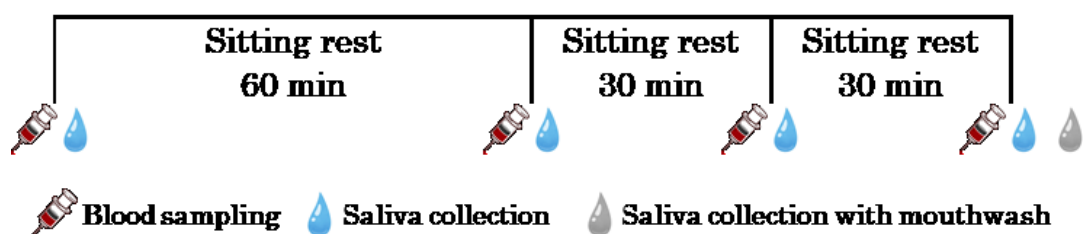


Fig.3 実験プロトコル

4.2.5 身体測定

身体測定は身長計 (sanwa 社製)、体組成計 (TANITA 社製インナースキャン 50V BC-622) を使用した。

4.2.6 臨床診査

全ての被験者を対象に、以下の項目について歯周組織検査を行った。

- 1) PD: 約 25 g の圧力でプローブ (PDT Sensor Probe, USA) を挿入し、1 mm 単位で測定した。1 歯につき 4 点計測した。
- 2) CAL: PD と同様に測定した。
- 3) BOP: プロービングにより出血の有無を判定した (52)。出血がみられた部位数を全被験部位数で割った部位陽性率で示した。

4.2.7 細菌検査

唾液中の全細菌、A.a、P.g、P.i、T.f を PCR-Invader 法を用いて実数値にて測定した。PCR-Invader 法とは、各菌種のインバーダーのターゲット領域を含むプラスミドを既知コピー数 (菌数に相当) に段階希釈した DNA 溶液を用いる。一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) 部位の前後それぞれの塩基配列と相補的な配列を持つ Invader oligo と Signal Probe (5'側にシグナル検出のための配列“Flap”を併せ持つ) が targetDNA とハイブリタイズする際に、SNP 部位で形成される 3 重鎖構造を Cleavase Enzyme が特異的に認識し、Signal Probe 上の Flap を切断する (第一反応)。遊離した Flap は蛍光検出用の FRET Probe とハイブリタイズし、そこで再び 3 重構造を Cleavase Enzyme が認識し、蛍光物質を遊離させる。この蛍光の増加量をリアルタイムで測定することで定量的に測定する方法である (53)。すべての項目は BML (Tokyo, Japan) に依頼して分析を行った。

4.2.8 歯周病関連酵素検査

歯周病に関連する生化学指標として、唾液および血液中の AST、ALT、LDH、ALP を測定した。AST および ALT の測定は、それぞれピュアオート S AST-L または S ALT-L（ともに積水メディカル）を用いて UV 法（JSCC 標準化対応法）にて行った。LDH の測定は、L タイプワコーLDH・J（和光純薬工業）を用いて UV 法（JSCC 標準化対応法）にて行った。ALP の測定は、L タイプワコーALP・J2（和光純薬工業）を用いて比色法（JSCC 標準化対応法）にて行った。測定にはともに LABOSPECT008K および BioMajesty JCA-BM8060（日立ハイテクノロジーズ・日本電子）を用いた。すべての項目は BML（Tokyo,Japan）に依頼して分析を行った。歯周病関連酵素は唾液分泌速度で補正を行った。

4.2.9 統計処理

すべての測定値は平均値 ± 標準偏差で示した。統計解析は、SPSS statistics21.0 および 24.0（日本 IBM）を用いて行った。安静前、安静 60 分後、安静 90 分後、安静 120 分後の細菌検査、歯周病関連酵素検査のすべての測定項目について一元配置分析を用いて検討し、事後検定として Bonferroni 法を用いて比較検討を行った。また、安静後 120 分後において洗口なしの唾液と洗口ありの唾液とで唾液中の細菌および歯周病関連酵素について対応のある t 検定を用いて検討した。本研究では統計学的な有意水準を 5%とした。

4.3 結果

4.3.1 身体測定および唾液採取

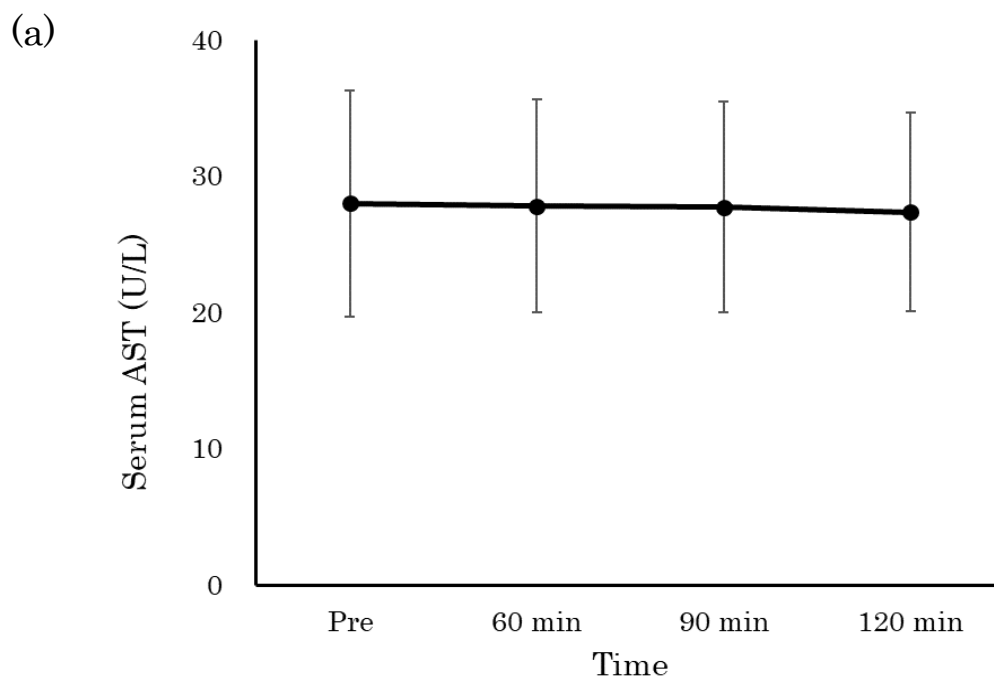
身体測定の結果は身長 174.7 ± 6.8 cm、体重 76.5 ± 13.3 kg、BMI 25.1 ± 4.3 kg/m²、体脂肪率 $22.5 \pm 7.4\%$ であった。

4.3.2 臨床診査

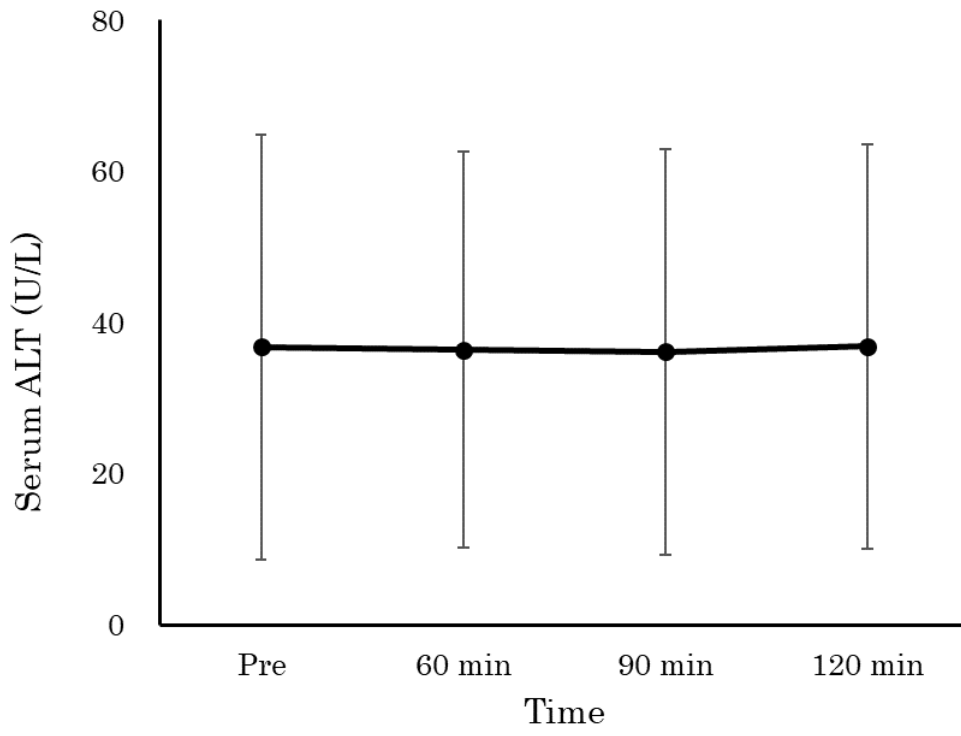
口腔内診査の結果、PD 1.8 ± 0.4 mm、CAL 1.9 ± 0.5 mm、BOP $3.2 \pm 7.5\%$ であった。PD = 4 mm 以上の部位の割合が 0%であり全ての対象者に歯周炎は認められなかった。

4.3.3 血液検査

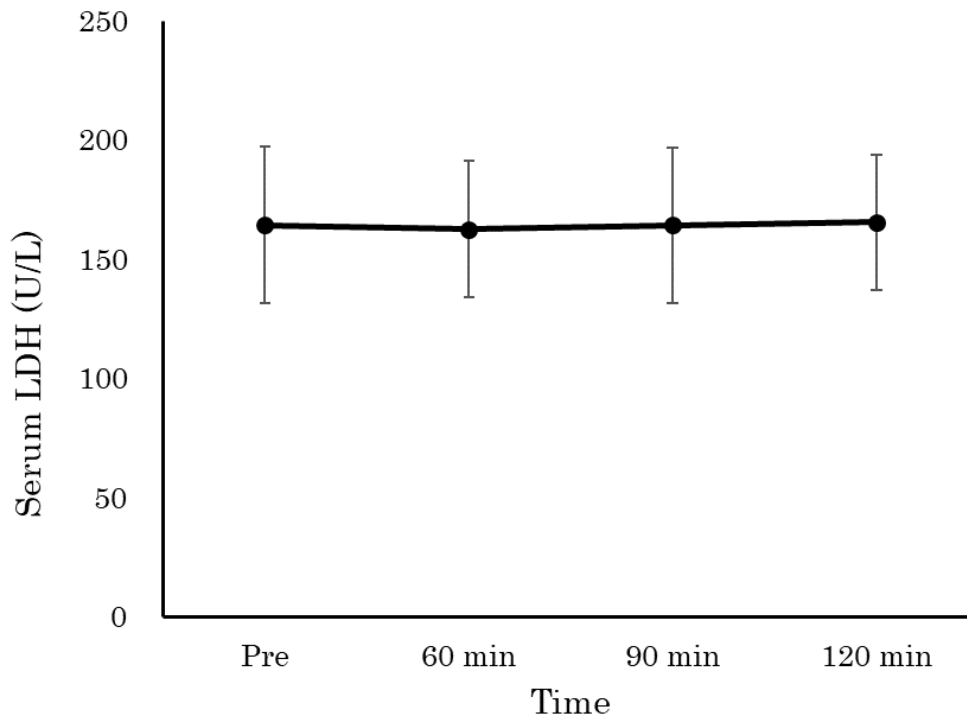
血中 AST、ALT、LDH、ALP はいずれも時間経過により変化しなかった (Figure 4a-d)。



(b)



(c)



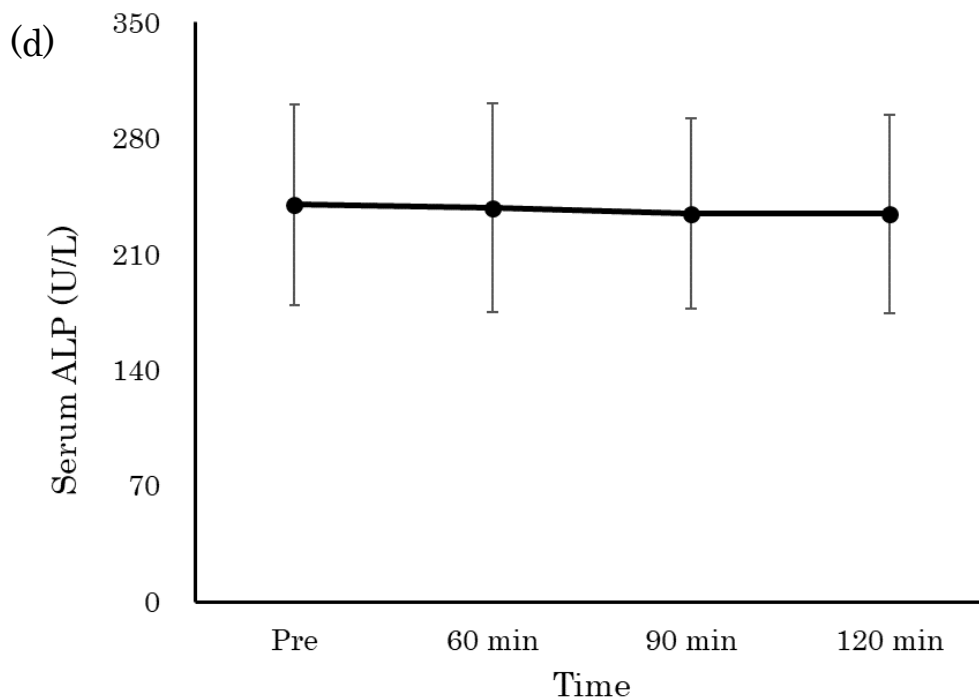


Fig.4 安静 120 分間の血中の aspartate aminotransferase (AST) (a)、alanine aminotransferase (ALT) (b)、lactate dehydrogenase (LDH) (c) および alkaline phosphatase (ALP) (d) の変化

4.3.4 細菌検査

唾液中総細菌は時間経過により有意に低下した ($P < 0.05$, Figure 5a)。T.f は時間経過により低下する傾向を示した ($P < 0.1$, Figure 5b)。洗口後には洗口前と比較し、唾液中総細菌および T.f は有意に低下した ($P < 0.05$, Figure 6-a, b)。ただし、T.f は 1 名の対象者からは検出されなかった。A.a および P.i、P.g は本対象者からは検出されなかった。

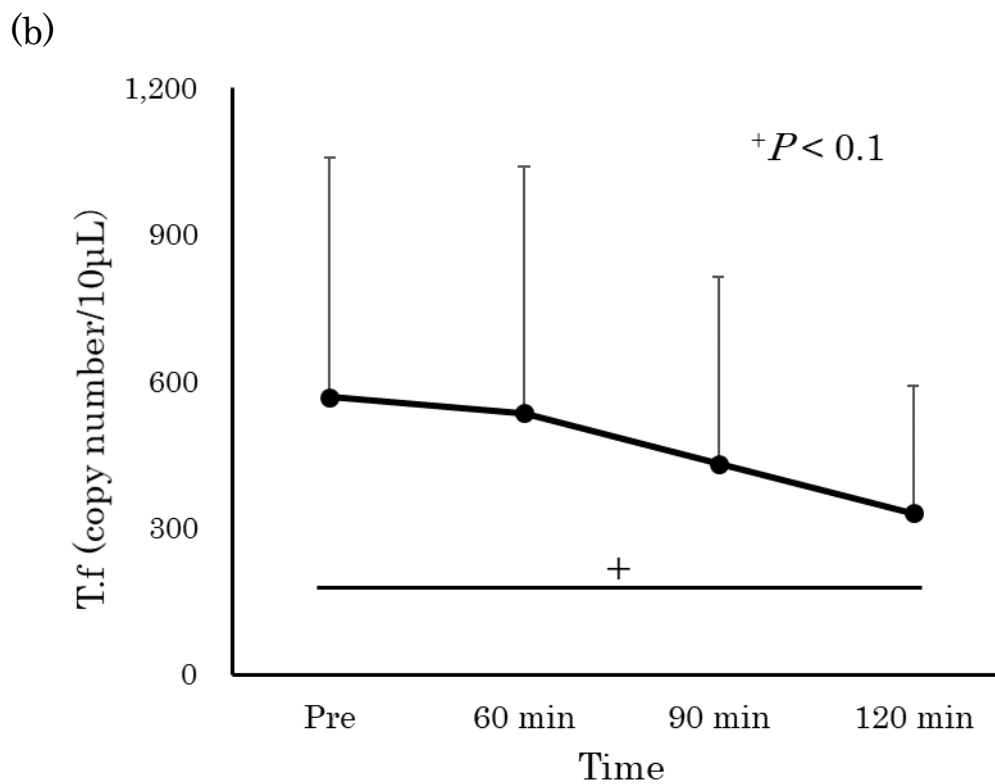
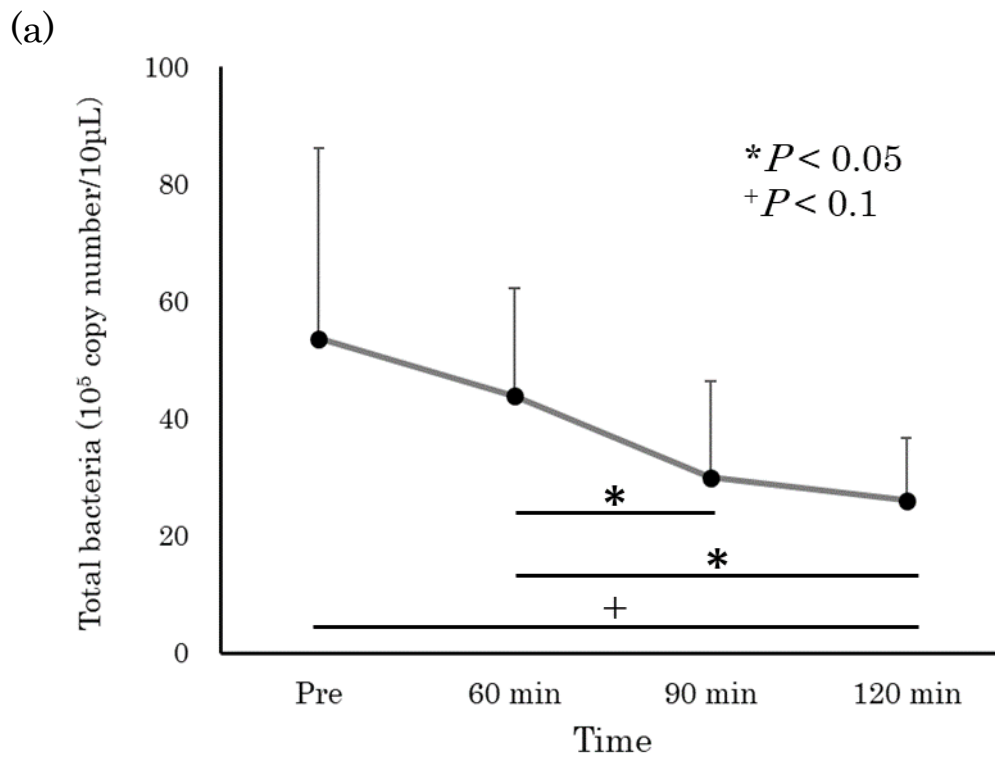


Fig.5 安静 120 分間の唾液中の総細菌(a)、Tannerella forsythia (T.f) (b)の変化 (T.fのみ $n = 10$)

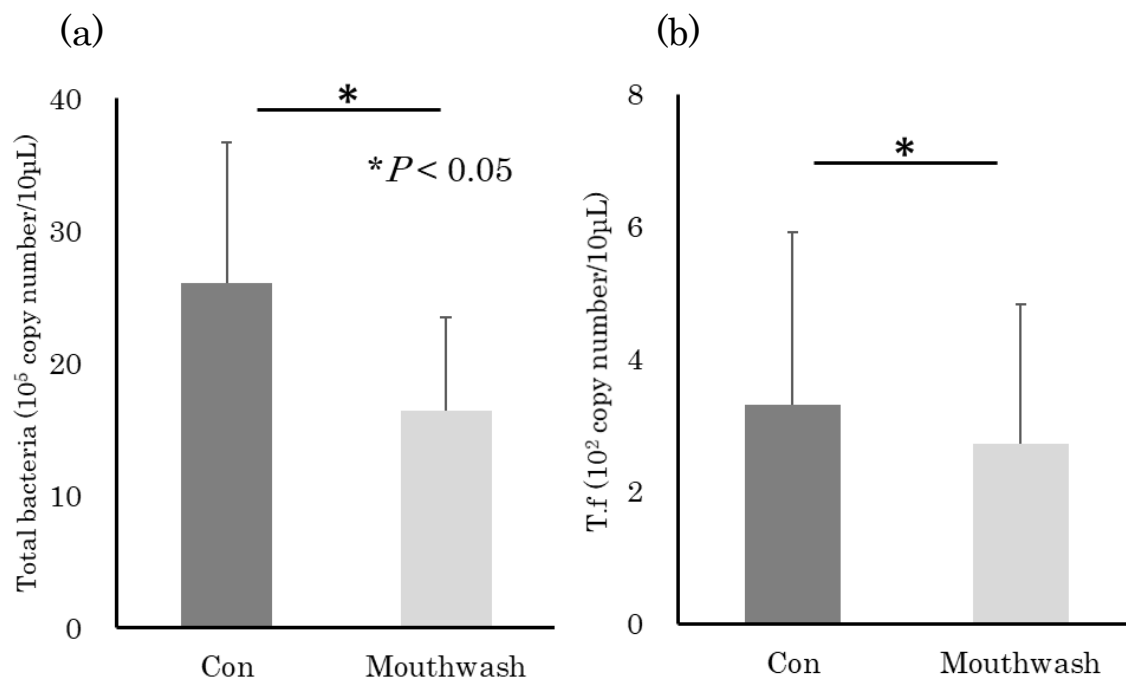


Fig.6 唾液中の総細菌(a)、Tannerella forsythia (T.f) (b)の洗口あり・なしの比較

4.3.5 唾液中歯周病関連酵素検査

歯周病関連酵素のうち AST、LDH、ALP は時間経過により有意に低下し (P < 0.05、Table 1)、ALT は低下傾向を示した (P < 0.1、Table 1)。唾液分泌速度で補正した場合には全ての項目で時間経過により有意に低下した (P < 0.05、Table 1)。洗口後には AST および LDH は有意に低下した (P < 0.05、Table 2)。唾液分泌速度で補正した場合、AST および LDH は洗口により有意に低下し (P < 0.05、Table 2)、ALT は低下傾向を示した (P < 0.1、Table 2)。

Table1. 唾液中歯周病関連酵素の安静120分間の変化

| | Pre | 60 min | 90 min | 120 min |
|---|--------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| AST (U/L) | 65.5 ± 40.7 | 45.7 ± 24.1 | 33.6 ± 16.2 ^{ab} | 29.8 ± 12.0 ^{Ab} |
| ALT (U/L) | 40.1 ± 36.1 | 24.4 ± 22.1 | 16.5 ± 13.5 | 12.6 ± 8.4 ^a |
| LDH (U/L) | 238.6 ± 97.7 | 220.7 ± 104.6 | 145.6 ± 54.0 ^{AB} | 146.0 ± 66.1 ^{Ab} |
| ALP (U/L) | 18.9 ± 11.4 | 15.2 ± 9.3 | 13.5 ± 6.8 ^a | 11.5 ± 7.6 ^A |
| Adjusted for salivary secretion rate | | | | |
| AST (U/min) | 0.13 ± 0.10 | 0.10 ± 0.07 | 0.07 ± 0.05 ^A | 0.06 ± 0.03 ^A |
| ALT (U/min) | 0.08 ± 0.08 | 0.05 ± 0.06 | 0.03 ± 0.03 ^A | 0.03 ± 0.02 ^A |
| LDH (U/min) | 0.47 ± 0.30 | 0.44 ± 0.29 | 0.29 ± 0.20 ^{AB} | 0.29 ± 0.21 ^{AB} |
| ALP (U/min) | 0.04 ± 0.03 | 0.03 ± 0.03 | 0.03 ± 0.02 ^{AB} | 0.02 ± 0.03 ^{AB} |

means ± SD, ^A vs Pre; $P < 0.05$, ^a vs Pre; $P < 0.1$, ^B vs 60 min; $P < 0.05$,
^b vs 60 min; $P < 0.1$

Table2. 唾液中歯周病関連酵素の洗口あり・洗口なしの比較

| | Con | Mouthwash |
|---|--------------|--------------------------|
| AST (U/L) | 29.8 ± 12.0 | 25.1 ± 15.5* |
| ALT (U/L) | 12.6 ± 8.4 | 11.2 ± 10.9 |
| LDH (U/L) | 146.0 ± 66.1 | 112.6 ± 66.1* |
| ALP (U/L) | 11.5 ± 7.6 | 8.2 ± 4.1 |
| Adjusted for salivary secretion rate | | |
| AST (U/min) | 0.06 ± 0.03 | 0.04 ± 0.03* |
| ALT (U/min) | 0.03 ± 0.02 | 0.02 ± 0.02 ⁺ |
| LDH (U/min) | 0.29 ± 0.21 | 0.20 ± 0.15* |
| ALP (U/min) | 0.02 ± 0.03 | 0.01 ± 0.01 |

means ± SD, * $P < 0.05$, ⁺ $P < 0.1$

4.4 考察

検討課題 I -2 では、洗口せずに唾液を採取し、安静時における繰り返しの唾液採取が健常者の唾液中歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響を検討した。また洗口により唾液中歯周病原細菌および歯周病関連酵素が減少するか否か、および血中と唾液中の歯周病関連酵素が時間経過により同様に変化するか否かも併せて検討した。その結果、唾液中総細菌および歯周病原細菌である T.f は時間経過により低下し、歯周病関連酵素も時間経過により低下した。歯周病関連酵素は唾液分泌速度で補正した場合にも同様の結果であった。血中 AST、ALT、LDH、ALP はいずれも時間経過により変化しなかった。さらに洗口後には唾液中総細菌、歯周病原細菌および歯周病関連酵素は低下あるいは低下傾向を示した。以上より、洗口せずに唾液を採取した場合には時間経過とともに歯周病原細菌および唾液中歯周病関連酵素は低下すること、唾液中歯周病関連酵素は血中の同酵素とは異なる動きをすることが示唆された。また洗口後には細菌数や歯周病関連酵素は低下する可能性が高い。したがって、繰り返し唾液を採取するような生理学実験では、洗口により口腔内の環境条件を統制する方が望ましいかもしれない。

唾液中歯周病原細菌は繰り返しの唾液採取により減少する可能性がある。本研究では洗口をおこなわずに、2 時間で 4 回の唾液採取をおこなった。総細菌数は明確に時間経過とともに減少し、歯周病原細菌である T.f は減少傾向にあった。2 時間という短時間での細菌数の減少は日内変動ではなく、繰り返しの唾液採取の影響が強いと推察される。先行研究によると、食後に唾液中細菌数が減少することから (71)、ガム咀嚼による繰り返しの唾液採取により細菌数が徐々に減少したと考えられる。本研究ではガム咀嚼により唾液分泌を促進させ唾液を採取

したが、自然分泌による唾液採取 (passive drool) であれば細菌数の減少は抑えられたかもしれない。ただいずれの方法を採っても、時間経過に伴い唾液による口腔内の浄化作用が働き (72)、2 時間の安静により細菌数は減少する可能性が高い。短時間に繰り返し唾液を採取し細菌数を検討する場合には、洗口をおこなったうえで口腔内の環境条件を統制し、比較する方が望ましいであろう。

唾液中歯周病関連酵素も歯周病原細菌同様に、繰り返しの唾液採取の影響を受けることが示唆された。唾液中歯周病関連酵素は時間経過により低下あるいは低下傾向を示し、唾液分泌速度で補正した場合には全ての項目で時間経過により有意に低下した。ただし、いずれも安静開始から 60 分時点では低下しておらず、安静開始 90 分後または 120 分後において低下、あるいは低下傾向を示した。洗口をせずに繰り返し唾液を採取する場合、おおよそ 60 分以内であれば安定した測定が可能と考えられる。ただし AST および LDH は洗口により洗口なしと比較し低下したことから、値そのものを重視する検査では洗口の有無に注意が必要である。また唾液と血液では時間経過に伴う各酵素の変化が異なっていた。血清中の各酵素は 2 時間で変化はしていないが、唾液中の各酵素は低下あるいは低下傾向を示した。先行研究においても、唾液と血液の各酵素にはほとんど相関関係が認められないことが報告されている (73、74)。唾液中の AST や LDH 等の酵素は歯周病関連酵素として注目されていることから (75)、歯周病検査を目的とする場合には唾液から各酵素を評価することが望ましいと考えられる。唾液を採取する際に洗口するか否かは、研究や検査の目的に応じて判断する必要がある。

本研究の結果より、洗口せずに繰り返し唾液を採取した際には唾液中の細菌や歯周病関連酵素が減少する可能性が示された。しかしながら、洗口をおこなったうえで繰り返し唾液を採取した際に、唾液中の細菌や歯周病関連酵素が変化

するか否かは不明である。歯周病原細菌を含む口腔内細菌の日内変動を検討した先行研究でも、唾液採取の前に洗口はおこなわれていない(67)。洗口後に採取した唾液中の細菌や歯周病関連酵素の日内変動については今後の検討が必要である。また、洗口により細菌や歯周病関連酵素が低下する可能性は高いものの、洗口の影響ではなく繰り返しの唾液採取の影響である可能性も残されている。本実験では、全ての対象者において洗口なしでの唾液採取のあとに洗口後の唾液採取をおこなっており、2試行の順番がランダムではない。洗口の影響を明確にするためには、ランダム化クロスオーバー試験を用い、同条件下にて別日に洗口あり・洗口なしで唾液を採取する必要がある。

4.5 結論

本研究では健常者に対し、洗口をせずに繰り返し唾液を採取した際の唾液中心周病原細菌および歯周病関連酵素の変化を検討した。その結果、唾液中の総細菌や歯周病原細菌および歯周病関連酵素は繰り返しの唾液採取により低下する可能性が示された。また洗口により細菌数は減少すること、血液と唾液では歯周病関連酵素は関連しないことが示唆された。短時間に繰り返し唾液を採取し、運動等の一過性の介入の影響を検討する場合には、洗口をおこなう方が望ましいであろう。

検討課題 I-1 と I-2 の結果を総合すると、検討課題 I-1 において健常者に対する一過性の運動時に見られた総細菌や歯周病関連酵素の低下は、運動そのものの影響というよりも繰り返しの唾液採取の影響が強いと推察される。検討課題 I-1 および I-2 の対象が健常者であったことや年齢が 27~55 歳と幅広かったことから、歯周病の罹患率の高まる 30 歳以上および歯周炎患者を対象にし、唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素を調べ、運動と歯周病態の関係性をさらに詳しく研究していく必要がある。

第 5 章 中等度強度の持久性運動が歯周炎患者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響（検討課題Ⅱ）

5.1 緒言

肥満・糖尿病などの全身疾患が歯周炎の病態を悪化に導くことが報告されている。BMI と歯周炎の関係を調べた横断研究によると、過体重や肥満になると歯周炎のリスクが増加する (76)。また、糖尿病患者には歯周炎患者が多く、特に血糖コントロールの不良な患者において重度の骨吸収を伴うという報告がある (77)。それは、持続的な血糖の増加により終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGE) が生成され、その結果として生じる炎症性反応がアタッチメントロスや歯槽骨の吸収につながるという先行研究 (16, 78) や、インスリン抵抗性や高血糖が AGE を生成するという先行研究 (79) により説明できる。さらに、P.g に感染させた肥満のマウスは肥満でないマウスと比して歯槽骨の吸収が著明であり、肥満が P.g の感染に対する免疫系の能力を妨げたと報告されている (43)。また、先行研究によると、T.f は肥満でありかつ歯周組織が健康な者の歯肉溝の浅部で過増殖すると示されている (38)。よって、過体重や肥満が歯肉縁下の細菌叢の組成や歯周病原細菌の変化に影響を与える可能性があり、肥満や糖尿病などの全身疾患の予防、改善が歯周炎および歯周病態の予防、改善につながると推察される。

運動は歯周病態の予防や改善に有効かもしれない。1160 人を対象とした疫学研究によると、運動習慣のある者はない者と比較して歯周炎の罹患率が低かった (12)。定期的な運動実践は糖尿病、肥満に対して予防・改善効果があるため (80)、糖尿病や肥満の改善を介して運動が歯周病態の改善につながる可能性がある。また運動は抗炎症作用を持つ IL-6 の産生を促進するため (81)、歯周炎による炎症を抑制するかもしれない。しかしながら、運動自体が歯周炎を予防・

改善するのか、運動が肥満や糖尿病などの全身疾患を予防・改善する結果として歯周炎に有効であるのかは不明である。検討課題 I では、一過性の中等度強度の運動を行うことによって、健常者において運動前後で唾液中の歯周病関連酵素に有意な減少が認められたが、安静条件でも同様の結果であった。しかし歯周病原細菌や歯周病関連酵素の多い歯周炎患者でも同様の結果が得られるかは不明である。そこで本研究では一過性の中等度強度の運動が歯周炎患者の唾液中の歯周病原細菌や歯周病関連酵素に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。ただし、歯周病原細菌は検討課題 I-1、I-2 でほとんど検出されなかった A.a、P.g、P.i を除き、T.f のみ検査対象とした。

5.2 対象および方法

5.2.1 対象

32~64 歳（平均年齢 51.4 ± 10.4 歳）で深さ 4mm 以上の歯周ポケットを有する男性慢性歯周炎患者 10 名を対象とした。本研究は早稲田大学人を対象とする研究に関する倫理委員会にて承認（承認番号 2014-210）を得て行い、あらかじめ被験者全員に本研究の趣旨や内容を書面にて十分に説明し同意が得られた方のみを対象とした。また、以下の条件を満たす者は対象から除外した。

- 1) 重篤な全身疾患を有する。
- 2) 本実験開始前 3 カ月以内に抗生物質などの投薬を受けている。
- 3) 現在歯周病の治療を受けている。

5.2.2 実験プロトコール

初回測定時（安静試行）に対象者の身体測定および口腔内検査、 $\dot{V}O_2\text{peak}$ 測定を行った。対象者には測定の前日から疲労が残るような激しい運動を控え、前日はアルコール摂取を禁止するよう指示した。測定当日は起床後に食事および歯磨きをせず、早朝空腹時という条件下で行った。対象者は実験室への来室後、身長および体重、体脂肪率を測定した。唾液の採取にあたり、対象者は口腔内を水で 30 秒間十分にゆすぎ、この作業を 3 回繰り返した後、1 分間座位安静にして口腔内の唾液をすべて嚥下したのち採取を始めた。安静時の歯周病原細菌および歯周病関連酵素検査のため BML 製のキットを用いてガムベース咀嚼刺激による全唾液をポリスピッツ管に歯周病関連酵素用に 4ml、歯周病原細菌用に 4ml、計 8ml 採取した。8ml に達したところで採取終了とした。1 時間後、2 時間後に唾液採取を 1 回目と同量行った。その後、 $\dot{V}O_2\text{peak}$ 測定のためトレッドミルによる心肺運動負荷試験を行った。1~4 週間後、前回と同条件下で同実験室内にて安静時の唾液採取を行った。その後、本試行（運動試行）として中等度強度の持久性運動（60% $\dot{V}O_2\text{peak}$ ）を 1 時間実施した。運動負荷終了直後、1 時間後の 2 回唾液を採取した。歯周病原細菌および歯周病関連酵素のすべての項目は BML (Tokyo, Japan) に依頼して分析を行った。

5.2.3 身体測定および運動負荷試験

身体測定は身長計（sanwa 社製）、体組成計（TANITA 社製インナーキャン 50V BC-622）を使用した。

$\dot{V}O_2\text{peak}$ 測定のための運動負荷試験ではトレッドミル（FUKUDA 電子社製 MAT-2700）を使用した。運動負荷試験中は呼気ガス分析器（ミナト医科学社製

AERO MONITOR AE300S) を用い、呼気ガス分析 (breath by breath 法) を行った。運動負荷心電図装置 (FUKUDA 社製 STRESS TEST SYSTEM ML-9000) により Mason-Likar 誘導法を用いて 12 誘導心電図を記録し、心拍数を測定した。左側上腕部には血圧測定用のカフを巻き、運動負荷試験用自動血圧計 (Sun Tech Medical 社製 Tango2) を使用し血圧を測定した。運動負荷プロトコールは 1 分毎に傾斜と速度が増加するトレッドミル用ランプ負荷法により実施した。 $\dot{V}O_2\text{peak}$ は、1) 酸素摂取量のプラトー、2) RER が 1.1 以上、3) 心拍数が年齢別予測最高心拍数 (220-年齢) の 90% に到達することの 3 つの条件のうち 2 つ以上を満たすことを条件とし、決定した。運動中の $\dot{V}O_2$ 、RER、心拍数は 30 秒毎の平均値を算出し、解析に使用した。

本試行では中等度強度の持久性運動 (60% $\dot{V}O_2\text{peak}$) を 1 時間実施した。運動強度の設定は、負荷開始から 5~10 分間にトレッドミルの傾斜を調整することにより行った。運動負荷前の 5 分間、運動負荷中の 60 分間、運動負荷終了後 (60 分間) に呼気ガス分析および心拍数測定を行い、 $\dot{V}O_2$ 、 $\dot{V}CO_2$ 、RER を算出した。

5.2.4 臨床診査

全ての被験者を対象に、以下の項目について歯周組織検査を行った。

- 1) PD: 約 25g の圧力でプローブ (PDT Sensor Probe, USA) を挿入し、1mm 単位で測定した。1 歯につき 4 点計測した。
- 2) CAL: PD と同様に測定した。
- 3) BOP: プロービングにより出血の有無を判定した。出血がみられた部位数を全被験部位数で割った部位陽性率で示した。
- 4) PCR: O'Leary のプラークコントロールレコードを準用し 1 歯 4 点計測した。

5.2.5 細菌検査

唾液採取前に洗口し、その後唾液を採取した。そしてその後その唾液に対し PCR-Invader 法を用いて細菌検査を行った。全細菌、T.f を実数値にて測定した。PCR-Invader 法とは、各菌種のインバーダーのターゲット領域を含むプラスミドを既知コピー数（菌数に相当）に段階希釈した DNA 溶液を用いる。一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）部位の前後それぞれの塩基配列と相補的な配列を持つ Invader oligo と Signal Probe（5'側にシグナル検出のための配列“Flap”を併せ持つ）が targetDNA とハイブリタイズする際に、SNP 部位で形成される 3 重鎖構造を Cleavase Enzyme が特異的に認識し、Signal Probe 上の Flap を切断する（第一反応）。遊離した Flap は蛍光検出用の FRET Probe とハイブリタイズし、そこで再び 3 重構造を Cleavase Enzyme が認識し、蛍光物質を遊離させる。この蛍光の増加量をリアルタイムで測定することで定量的に測定する方法である。すべての項目は BML（Tokyo,Japan）に依頼して分析を行った。

5.2.6 歯周病関連酵素検査

AST および ALT の測定は、それぞれピュアオート S AST-L または S ALT-L（ともに積水メディカル）を用いて UV 法（JSCC 標準化対応法）にて行った。LDH の測定は、L タイプワコー LDH・J（和光純薬工業）を用いて UV 法（JSCC 標準化対応法）にて行った。ALP の測定は、L タイプワコー ALP・J2（和光純薬工業）を用いて比色法（JSCC 標準化対応法）にて行った。測定にはともに LABOSPECT008K および BioMajesty JCA-BM8060（日立ハイテクノロジー・日本電子）を用いた。すべての項目は BML（Tokyo,Japan）に依頼して分析を行った。歯周病関連酵素は唾液分泌速度で補正を行った。

5.2.7 統計処理

総細菌、T.fの測定値は、平均値 ± 標準誤差で示し、その他のすべての測定値は、平均値 ± 標準偏差で示した。統計解析は、SPSSstatistics21.0を用いて行った。細菌、歯周病関連酵素のすべての測定項目について二元配置分散分析により比較し、事後検定には Bonferroni 法を用いた。本研究では統計学的な有意水準を 5%とした。

5.3 結果

5.3.1 身体測定および唾液採取時間

身体測定の結果は身長 170.6 ± 4.8 cm、体重 68.1 ± 9.9 kg、BMI 23.4 ± 3.1 kg/m²、体脂肪率 $20.7 \pm 5.0\%$ であった。唾液は安静試行で 278.2 ± 89.1 秒、運動試行で 308.2 ± 136.1 秒でそれぞれ規定量に達した。

5.3.2 臨床診査

口腔内診査の結果、PD 3.4 ± 1.1 mm、CAL 4.0 ± 1.5 mm、BOP $28.9 \pm 16.7\%$ 、PCR $44.2 \pm 13.2\%$ であった。

5.3.3 細菌検査

安静試行と運動試行の間に有意差は認められなかった。両試行において総細菌数は1時間の安静または運動前に比較し、1時間の安静または運動直後、さらに運動後1時間で有意に減少していた ($P < 0.05$, Figure 7a)。T.fについては有意差は認められなかった (Figure 7b)。

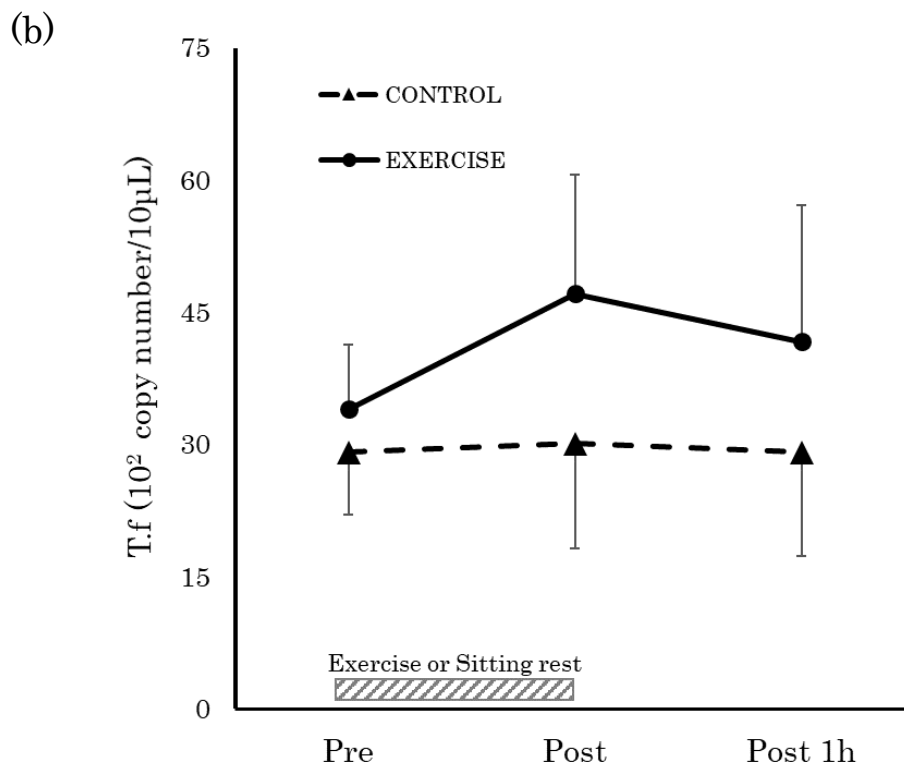
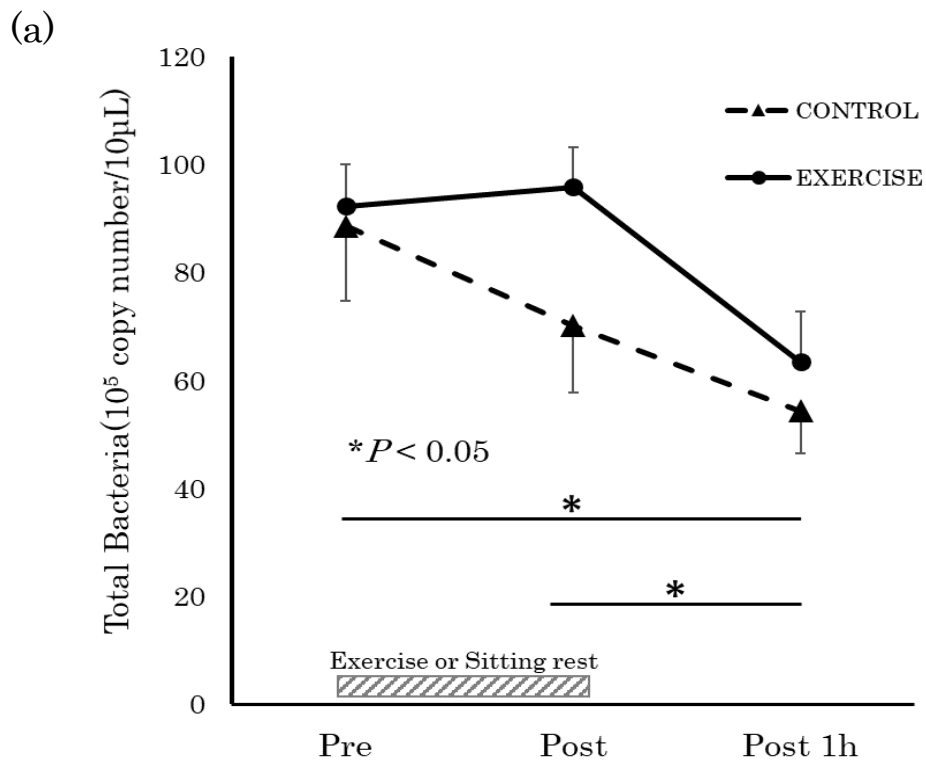
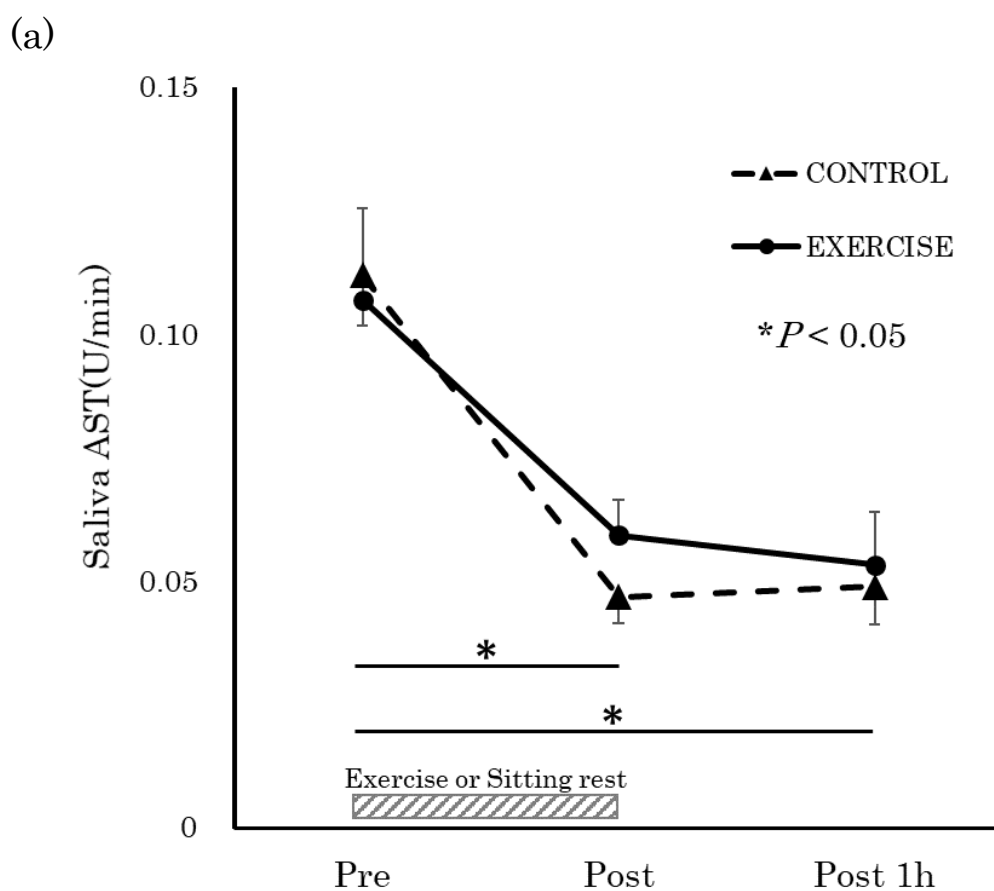
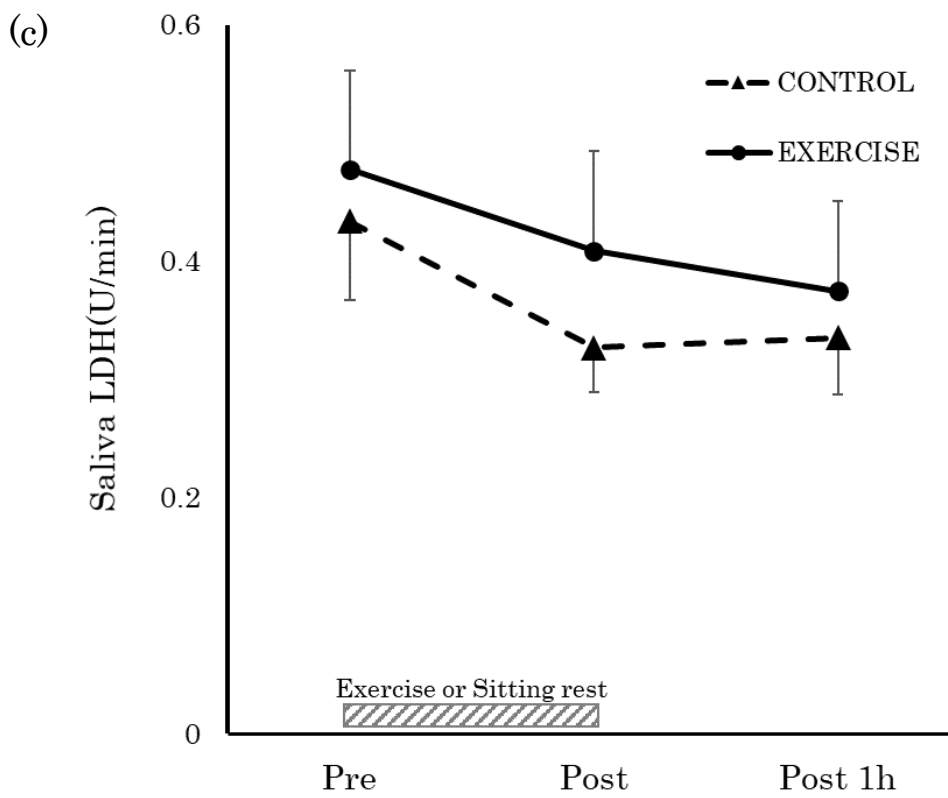
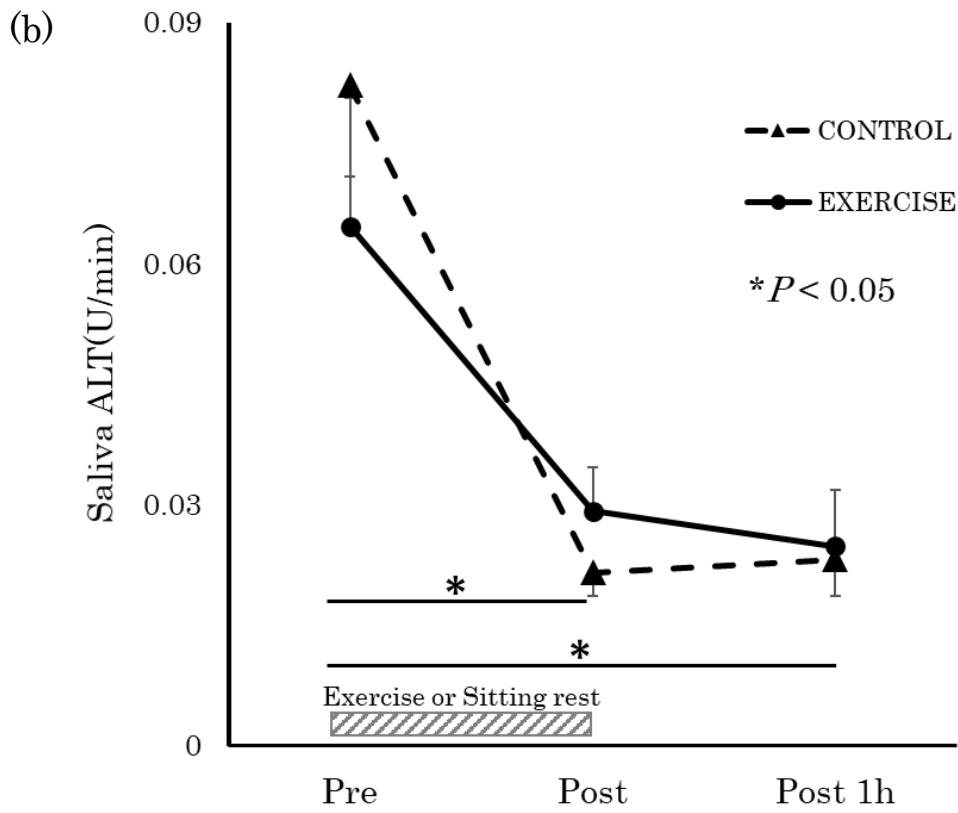


Fig.7 運動前後の唾液中の総細菌(a)および Tannerella forsythia (T.f) (b) の変化 * $P < 0.05$.

5.3.4 歯周病関連酵素検査

安静試行と運動試行の間に有意差は認められなかった。ASTは1時間の運動または安静前に比較して1時間の運動または安静直後、1時間後で有意に減少した ($P < 0.05$, Figure 8a)。ALTは1時間の運動または安静前に比較して1時間の運動または安静直後、1時間後で有意に減少した ($P < 0.05$, Figure 8b)。LDHについては有意差は認められなかった ($P < 0.05$, Figure 8c)。ALPは1時間の運動または安静前に比較して1時間の運動または安静直後、1時間後で有意に減少した ($P < 0.05$, Figure 8d)。





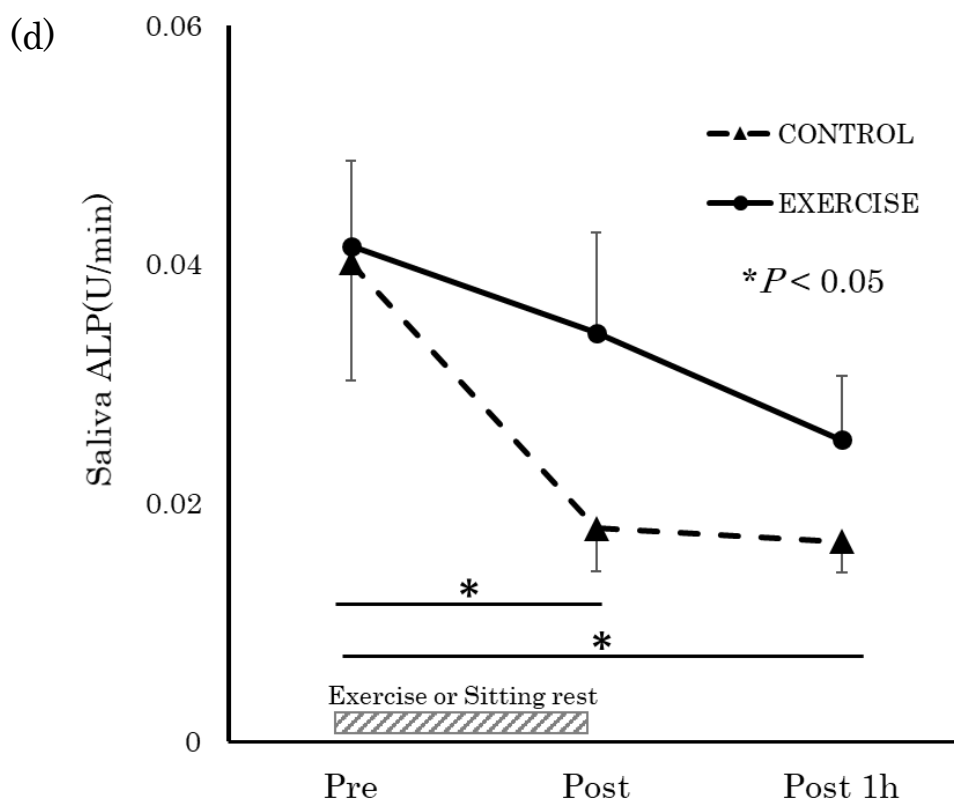


Fig.8 運動前後の唾液中の aspartate aminotransferase (AST) (a)、alanine aminotransferase (ALT) (b)、lactate dehydrogenase (LDH) (c)および alkaline phosphatase (ALP) (d)の変化。 * $P < 0.05$ 。

5.4 考察

本研究は 4mm 以上の歯周ポケットを 1 歯以上持つ歯周炎患者を対象に中等度強度の持久性運動を行い運動前、運動直後、運動後 1 時間の唾液中の歯周病原細菌、歯周病関連酵素に与える影響を検討した。その結果、歯周病原細菌においては、運動前と運動直後、運動前と運動後 1 時間、運動直後と運動後 1 時間で総細菌数が有意に減少した。歯周病関連酵素においては、運動前と運動直後、運動前と運動後 1 時間で AST、ALT および ALP が有意に減少した。ただし、安静試行においても同様の結果が示され、安静試行と運動試行に差はなかった。

5.4.1 歯周病原細菌

歯周炎は、歯肉縁下バイオフィーム中の歯周病原細菌がさまざまな危険因子によって影響を受けて歯周組織内の免疫反応の変化が誘発されることによっておこる破壊的な疾患である。肥満の慢性歯周炎患者の歯肉縁下バイオフィーム中には標準体重の慢性歯周炎患者と比べて P.i および T.f の割合が高いことや、BMI30 以上の歯肉炎患者の歯肉縁下バイオフィーム中には標準体重の歯肉炎患者と比べて T.f の割合が高いことが報告されている (38)。肥満患者において歯肉縁下バイオフィーム中の T.f の割合と BMI の間には相関関係が認められており、歯肉縁下バイオフィーム中の T.f の割合が高いほど歯周病の発病や進行の危険性が増加することがわかっている。

本研究では、総細菌数は有意に減少したものの、T.f には有意な変動が認められなかった。12 週間の運動介入を行った先行研究では、T.f に有意な減少が認められたことから習慣的な運動が歯周病原細菌に影響を与える可能性があることが報告されている (23)。また、唾液中の歯周病原細菌と運動習慣について調べ

た先行研究によると、中等度強度の習慣的な運動の確立は歯周病を改善する可能性があり、その効果は非外科的歯周治療による効果と同様であったと報告されている(17,18)。しかしながら、本実験で行った一過性の中等度強度の持久性運動では T.f は減少しなかった。一過性の中等度運動は歯周病原細菌に影響しない可能性がある。総細菌数は安静試行でも減少しており、唾液採取の際の洗口により細菌が洗い流されたのかもしれない。運動が歯周病原細菌に及ぼす影響については、唾液の採取方法や長期的なトレーニングによる影響を考慮し、今後の検討が必要である。

5.4.2 歯周病関連酵素

本実験では AST、ALT および ALP が運動前と運動直後、運動前と運動後 1 時間で有意に減少した。歯周組織が病的状態になり、細胞が損傷を受けたときに AST、ALT、LDH、ALP などの細胞内酵素が歯肉溝滲出液内や唾液中に放出され、特に LDH は歯周病によって引き起こされる細胞壊死によって唾液中にその割合が増加することがわかっている。AST および ALT は肝機能のスクリーニング、モニタリングに使用され、組織破壊に伴い細胞から放出される逸脱酵素である。歯周病と肝機能の間には関連があることがいくつかの研究で報告されている。成人の歯周炎患者を対象にした研究では、ロジスティック回帰分析において、ALT の増加と歯周炎の間に相関関係のあったことが報告されている(24)。女性においては、AST および ALT の上昇と歯周炎の発生率に相関関係のあることが報告されている(25)。歯周ポケットの深さと ALT の上昇に相関関係のあることも報告されている(39,82)。これらの所見は歯周病が肝機能と密接に関連していることを示している。運動と肝機能に関する先行研究では、一過性の運動を 3 週間続けた結果、皮下および内臓脂肪が減少し、内臓脂肪のマクロファージおよ

び血中 IL-6 が有意に減少し肝機能の改善が認められたと報告されている (29)。別の先行研究では、運動が内臓脂肪のレプチン遺伝子発現を減少させ、運動後血中レプチン濃度が減少し内臓機能が改善したと報告されている (33)。ただし、安静試行でも AST 等は運動試行と同様に低下していた。この理由としては唾液採取の際の洗口により歯周病関連酵素が洗い流されたことが考えられる。また、唾液の分泌は自律神経によって支配されており、早朝および夜間は副交感神経が優位であり日中は交感神経が優位であるため午前から午後にかけて唾液分泌量が減少するという日内変動も関係しているかもしれない

5.5 結論

中等度強度の持久性運動を行った結果、唾液中の歯周病原細菌と歯周病関連酵素に有意な減少が認められた。ただし、安静時でも歯周病原細菌と歯周病関連酵素は同様に減少しており、運動そのものの効果は認められなかった。

第6章 総合討論

6.1 本研究の成果

本研究では、健常者と歯周炎患者を対象に、中等度強度の持久性運動が唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響を明らかにすべく、検討課題 I-1、I-2、II を実施した。

中等度強度の持久性運動が唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響を明確にすることは、一過性の運動が歯周病態に与える影響を明らかにするうえで重要である。そこで検討課題 I-1 では、4mm 以上の歯周ポケットを有する歯牙を持たない健常人を対象に運動前後での唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素の変動を比較することを目的とし検討を行った。その結果、総細菌数は運動直後に比較して、運動後 30 分、運動後 60 分で有意に減少していた。A.a、P.i、P.g は本被験者からは検出されなかった。T.f については有意差は認められなかった。一方、歯周病関連酵素では、AST は運動前に比較して運動後 60 分、運動直後に比較して運動後 30 分、運動後 60 分で有意に減少した。ALT は運動直後に比較して運動後 30 分、運動後 60 分で有意に減少した。LDH は運動前に比較して運動直後で有意に増加し、運動前に比較して運動後 30 分、運動直後に比較して運動後 30 分、運動後 60 分で有意に減少した。ALP は運動前に比較して運動直後で有意に増加し、運動直後に比較して運動後 30 分で有意に減少した。歯周組織が健康な者を対象に中等度強度の持久性運動を行った結果、唾液中の歯周病関連酵素が有意に減少した。本実験の対象試行として、安静時における繰り返しの唾液採取が健常者の唾液中歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響を調べる目的で検討課題 I-2 を行った。その結果、唾液中総細菌および歯周病原細菌である T.f は時間経過により低下し、歯周病関連

酵素も時間経過により低下した。血中 AST、ALT、LDH、ALP はいずれも時間経過により変化しなかった。さらに洗口後には唾液中総細菌、歯周病原細菌および歯周病関連酵素は低下あるいは低下傾向を示した。その結果、唾液中の総細菌や歯周病原細菌および歯周病関連酵素は繰り返しの唾液採取により低下する可能性が示された。また洗口により細菌数は減少すること、血液と唾液では歯周病関連酵素は関連しないことが示唆された。健常者に対する一過性の運動時に見られた総細菌や歯周病関連酵素の低下は、運動そのものの影響というよりも繰り返しの唾液採取の影響が強いと推察される。

次に、4mm 以上の歯周ポケットを有する歯牙を持つ歯周炎患者を対象に同様の実験を検討課題Ⅱとして行った。測定ポイントは検討課題Ⅰでは運動後 30 分と 60 分で測定したが、両者の間では数値の変動は少なく有意差も認められなかったため、検討課題Ⅱでは運動後は運動直後と運動後 60 分のみで測定を行った。

歯周病診断を行う際に、P.g、T.f、P.i、A.a の測定が推奨されているが、歯周病の罹患・進行には P.g と T.f が深く関連している。検討課題Ⅰでは A.a と P.i、P.g は検出されなかったため、検討課題Ⅱでは測定を行わなかった。実験の結果、安静試行と運動試行の間に有意差は認められなかった。両試行において総細菌数は 1 時間の運動または安静前に比較して、1 時間の運動または安静直後、1 時間後で有意に減少し、1 時間の運動または安静直後に比較して、1 時間後で有意に減少していた。T.f については有意差は認められなかった。口腔内の細菌数は朝起床時に最も多いことがわかっている。就寝中は唾液の分泌が減少し、細菌が口腔内で繁殖するためである。細菌数が有意に減少したということから、運動が総細菌数を減少させた可能性が考えられるが、安静試行でも同様の結果が認められたため、唾液採取の際の洗口により総細菌が洗い流された可能性が高く、運動が歯周病原細菌を減少させた結論付けることは出来ない。

歯周病関連酵素は、安静試行と運動試行の間に有意差は認められなかった。ASTは1時間の運動または安静前に比較して1時間の運動または安静直後、1時間後で有意に減少した。ALTは1時間の運動または安静前に比較して1時間の運動または安静直後、1時間後で有意に減少した。LDHについては有意差は認められなかった。ALPは1時間の運動または安静前に比較して1時間の運動または安静直後、1時間後で有意に減少した。これは、中等度強度の習慣的な運動を行った結果、唾液中のASTおよびALTが有意に減少したことから、運動が歯周病を改善する可能性があることが推測されたという先行研究の結果と一致する。しかし、本研究では安静時でも歯周病関連酵素は同様に減少しているため、運動そのものの効果は認められなかった。

本研究では歯周炎患者に対して中等度強度の持久性運動を行った結果、唾液中の歯周病原細菌と歯周病関連酵素に有意な減少が認められたが、その結果は運動そのものの効果によるものと結論付けるには至らなかった。一過性の運動は歯周炎患者の唾液中の細菌や歯周病関連酵素に影響を与えないことが示唆された。

6.2 本研究結果の応用、限界点および今後の課題

本研究の結果は、今後のスポーツ歯学研究や臨床現場に有用な情報となり得ると考えられる。本研究の結果を総合的に検討し、修正および改善して応用することにより、運動による歯周病の予防や改善機序を解明することに繋げることが重要である。

歯周病は歯周病原細菌によって引き起こされる感染症である。歯周病を予防・改善するうえで患者個人の生活習慣の改善、自助努力、さらに医療連携などが必要である。本研究では、運動を生活習慣のひとつとして考察した。運動により唾

液中の歯周病関連酵素の変化を調べることは、運動と全身疾患の関係を調べるうえで重要である。運動による歯周病関連酵素の変化を調べる際に血液を使用することがある。採血は肉体に対して侵襲を伴うが、唾液は非侵襲的に得ることができ、血液採取がしばしば困難な被験者、例えば、小児、障害のあるもの、あるいは採血に不安の強い患者にも適用できる。多数の検体に対して、安価に検査できるという長所もあるため唾液は歯周疾患の診断のために重要な検査手段である(83)。しかし、唾液を診断材料として活用するための短所も指摘されている。例えば、唾液中の歯周病関連酵素には日内変動がみられる。唾液成分は、採取法や分泌刺激の程度によって影響を受ける場合もある。就寝中、唾液の分泌は抑制され、舌の動きも少なくなるため口腔内の自浄作用が減少し、細菌の格好の繁殖の場となる。本研究で早朝を実験時間帯としたのはそのような理由から唾液中の細菌の状態を把握するのに適していると考えたからである。実際に、検討課題Ⅰ、Ⅱともに時間経過とともに唾液中の細菌や歯周病関連酵素は減少すること、および洗口の影響を受けることが明らかとなった。研究や臨床検査の目的に合わせ、測定の間時間帯や唾液採取方法を十分に考慮する必要がある。

本研究は一過性持久性運動であったため、対象者の唾液中の歯周病原細菌の変化を特定するには至らなかったと推察される。歯周炎は主原因である歯周病原細菌の長期間にわたる持続的な刺激によっておこる。これには、歯周病原細菌を増加させ、歯周病原細菌の除去を困難にする因子であるプラークリテンションファクターや患者の生活習慣が大きく関与する。歯周炎が進行する速度は比較的緩慢で、数年単位で進行する。いわゆる慢性疾患である。慢性疾患の病態を一過性の運動の結果から判断するのは難しいと推察される。過体重、肥満、体重増加やウエスト周囲径の増加が歯周病進行の危険因子であり、臨床パラメータを悪化させるという先行研究から判断すると、運動により肥満を改善し、体重

の維持・管理を行うことによって歯周病の改善につながる可能性がある(82)。運動療法を通じた肥満の予防・改善のためには、運動の効果および持続可能な運動強度を考慮することは重要であると考えられる。中高年になるほど歯周炎の罹患率が高くなるという事実を考慮すると、中等度強度の運動を行えない患者も多いと予想される。それゆえ、異なる運動強度および運動期間が唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響をより明確にするためには、介入研究による検討が必要であろう。

本研究の対象者は成人男性であったので、得られた結果を成人女性には必ずしも適用できないかもしれない。先行研究によると、歯周炎の進行および歯牙喪失は、肥満症の遺伝子型と不顕性の炎症および C-反応性蛋白 (C-reactive protein: CRP) の影響を受け、男女差においては特に男性にその傾向が顕著にみられ、同じ病態の肥満症では男性の方が女性よりもより多くの歯牙を喪失すると報告されている (27,84-87)。それゆえ、本研究の結果をすべての対象に適用できるとは限らない。したがって、女性を対象にしたさらなる検討が必要である。

本研究では、対象者の歯周病罹患の有無を判別するために実験前に PD、CAL、BOP、PCR の各臨床パラメーターの測定を行った。肥満や体重増加が臨床パラメーターに影響を与えるという先行研究 (15) を考慮すると、定期的に臨床パラメーターの測定をすることによって運動による歯周病態の変化をより正確に把握できる可能性があると考えられる。

最後に、本研究では実験前の食事の統制は行ったものの、実験前日の睡眠時間の正確な評価は行っていない。睡眠不足は内分泌、代謝、心血管系、免疫系などの機能および唾液の分泌に負の影響を与えることが報告されている (88)。睡眠不足が齶蝕や歯周炎を悪化させるという報告もある (89)。今後、睡眠時間の統制を実施したうえでのさらなる検討も必要と考えられる。

第7章 結論

本研究では、中等度強度の持久性運動が歯周炎に罹患していない健常者と罹患している慢性歯周炎患者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響を解明するための基礎データを蓄積することを目的とし、1) 中等度強度の持久性運動が健常者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響、2) 安静時における繰り返しの唾液採取が健常者の唾液中歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響、3) 中等度強度の持久性運動が歯周炎患者の唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素に与える影響、を検討した。

検討課題 I-1 では総細菌数は運動直後に比較して、時間経過により減少した。A.a、P.i は本被験者からは検出されず、P.g、T.f は運動前後で変化は認められなかった。AST、ALT は運動後、時間経過により減少し、LDH、ALP は運動直後に増加した後、時間経過により減少した。

検討課題 I-2 では唾液中総細菌および歯周病原細菌である T.f は時間経過により低下し、歯周病関連酵素も時間経過により低下した。血中AST、ALT、LDH、ALP はいずれも時間経過により変化しなかった。さらに洗口後には唾液中総細菌、歯周病原細菌および歯周病関連酵素は低下あるいは低下傾向を示した。検討課題 I-1 と I-2 の結果を総合すると、検討課題 I-1 において健常者に対する一過性の運動時に見られた総細菌や歯周病関連酵素の低下は、運動そのものの影響というよりも繰り返しの唾液採取の影響が強いと推察される。検討課題 I-1 および I-2 の対象が健常者であったことや年齢が 27~55 歳と幅広かったことから、歯周病の罹患率の高まる 30 歳以上および歯周炎患者を対象にし、唾液中の歯周病原細菌および歯周病関連酵素を調べ、運動と歯周病態の関係性をさらに詳しく研究していく必要がある。

3) 安静試行と運動試行の間に有意差は認められなかった。両試行において総細菌数は時間経過により減少した。P.g、T.f については変化は認められなかった。歯周病関連酵素は、安静試行と運動試行の間に有意差は認められなかった。両試行とも歯周病関連酵素は LDH を除いて運動後に減少した。運動の前後において唾液中の歯周病原細菌と歯周病関連酵素に有意な減少が認められたが、安静時でも歯周病原細菌と歯周病関連酵素は同様に減少しており、運動そのものの効果は認められなかった。

以上の結果から、疫学研究で報告されている運動と歯周炎の関連は、一過性の運動では機序を説明できないことが示唆された。また洗口の有無により唾液中の細菌や酵素が影響を受けるという結果から、研究や臨床検査の目的に応じて唾液採取方法を選択する必要があることを示唆した。これらの知見は、今後のスポーツ歯学研究および臨床現場に重要な情報となり得る。

謝辞

稿を終えるにあたり、社会人大学院生として迎え入れて研究の機会を与えてくださった早稲田大学に感謝いたします。また、研究経験の少ない私を導き種々にわたりご指導ご鞭撻を賜りました早稲田大学スポーツ科学学術院 坂本静男教授に深く感謝いたします。また、大変お忙しい中、快く副査を引き受けてくださいました同スポーツ科学学術院 樋口満教授、赤間高雄教授に心より感謝の意を表します。さらに、博士論文だけでなく投稿論文執筆に多くの助言をいただきましたスポーツ科学学術院 講師 小西真幸先生に心より御礼申し上げます。そして、実験に参加・協力いただいた友人、その他の被験者の皆様、田端宏樹様および坂本研究室の皆様に感謝申し上げます。研究室に通うために時間の調整をしてくれた清水歯科医院のスタッフの皆様にも感謝申し上げます。また、叱咤激励してくれた家族にも感謝いたします。

参考文献

- (1) Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*. 1976; 34: 235-249.
- (2) 厚生労働省. 平成 23 年度歯科疾患実態調査. 2011; 34-36.
- (3) Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hietaniemi K, Jokinen MJ. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*. 1989; 298: 779-781.
- (4) Bahekar AA, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *American Heart Journal*. 2007; 154: 830-837.
- (5) Senba T, Kobayashi Y, Inoue K, Kaneto C, Inoue M, Toyokawa S, Suyama Y, Suzuki T, Miyano Y, Miyoshi Y. The association between self-reported periodontitis and coronary heart disease from MY Health Up Study. *Journal of Occupational Health*. 2008; 50: 283-287.
- (6) Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Annals of Periodontology*. 1998; 3: 51-61.

- (7) Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2002; 29: 177-206.
- (8) Joao Augusto P, Carolina B, Maximiliano S, Fabiana S, Alex N. Periodontal disease as a risk indicator for poor physical fitness: a cross-sectional observation study. *Journal of periodontology*. 2015; 86: 44-52.
- (9) Gortmaker SL, Dietz WH Jr, Cheung LW. Inactivity, diet, and the fattening of America. *Journal of American Dietetic Association*. 1990; 90: 1247-1252, 1255.
- (10) Saito T, Shimazaki Y, Koga T, Tsuzuki M, Ohshima A. Relationship between upper body obesity and periodontitis. *Journal of Dentistry*. 2001; 80: 1631-1636.
- (11) Saito T, Shimazaki Y, Sakamoto M. Obesity and periodontitis. *The New England Journal of Medicine*. 1998; 339: 482-483.
- (12) Shimazaki Y, Egami Y, Matsubara T, George K, Sumio A, Sumie J, Yoshihisa Y. Relationship between obesity and physical fitness and periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2010; 81: 1124-1131.
- (13) Sunstar-Chapel Hill Symposium' 97. *Periodontal Diseases and Human Health*. 1997.

- (14) 日本歯周病学会. 歯周治療の指針. 2015; 13-17.
- (15) Gorman A. E. K, Apovian C, Fung T. T, Nunn M, Garcia, R. I. Over weight and obesity predict time to periodontal disease progression in men. *Journal of Clinical Periodontology*. 2012; 39: 107-114.
- (16) Lalla E, Lamster IB, Schmidt AM. Enhanced interaction of advanced glycation end products with their cellular receptor RAGE: Implications for the pathogenesis of accelerated periodontal disease in diabetes. *Annals of Periodontology*. 1998; 3: 13-19.
- (17) Papageorgiou SN, Reichert C, Jäger A, Deschner J. Effect of overweight/obesity on response to periodontal treatment: systematic review and a meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015; 42: 247-261.
- (18) Acharya A, Bhavsar N, Jadav B, Parikh H. Cardioprotective effect of periodontal therapy in metabolic syndrome: a pilot study in Indian subjects. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 2010; 8: 335-341.
- (19) Murphy EA, Davis JM, Brown AS, Carmichael MD, Rooijen NV, Ghaffar A, Mayer EP. Role of lung macrophages on susceptibility to respiratory infection following short-term moderate exercise training. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004; 287: R1354-R1358.

- (20) Anwar T. Merchant, Waranuch Pitiphat, Eric B, Rimm, Kaumudi Jshipura. Increased physical activity decreases periodontitis risk in men. *European Journal of Epidemiology*. 2003; 18: 891-898.
- (21) Al-Zahrani MS, Borawski EA, Bissada NF. Increased physical activity reduces prevalence of periodontitis. *Journal of Dentistry*. 2005; 33: 703-710.
- (22) Akram Z, Safii SH, Vaithilingam RD, Baharuddin NA, Javed F, Vohra F. Efficacy of non-surgical periodontal therapy in the management of chronic periodontitis among obese and non-obese patients: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*. 2016; 20: 903-914.
- (23) Shoei O, Fumihiko U, Sechang ,Rina S,Takehiko T,Toru Y, Satoshi S,Junichi S,Kiyoji T,Hiroki B. Exercise habitation is effective for improvement of periodontal disease status: a prospective intervention study. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2018; 14: 565-574.
- (24) Furuta M, Ekuni D, Yamamoto T, Irie K, Koyama R, Sanbe T, Yamanaka R, Morita M, Kuroki K, Tobe K. Relationship between periodontitis and hepatic abnormalities in young adults. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2010; 68: 27-33.
- (25) Saito T, Shimazaki Y, Koga T, Tsuzuki M, Ohshima A. Relationship between periodontitis and hepatic condition in Japanese women. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2006; 8: 89-95.
- (26) Després JP, Lamarche B. Low-intensity endurance exercise training, plasma lipoproteins and the risk of coronary heart disease. *Journal of Internal Medicine*. 1994; 236: 7-22.
- (27) Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology (1985)*. 2005; 98: 1154-1162.

- (28) Sakurai T, Izawa T, Kizaki T, Ogasawara JE, Shirato K, Imaizumi K, Takahashi K, Ishida H, Ohno H. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 379: 605-609.
- (29) Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism*. 2006; 290: E961-E967.
- (30) Trøseid M, Lappegård KT, Claudi T, Damas JK, Morkrid L, Brendberg R, Mollnes TE. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *European Heart Journal*. 2004; 25: 349-355.
- (31) Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6: 772-783.
- (32) Zimmermann GS, Bastos MF, Dias Goncalves TE, Chambrone L, Duarte PM. Local and circulating levels of adipocytokines in obese and normal weight individuals with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2013; 84: 624-633.
- (33) Berggren JR, Hulver MW, Houmard JA. Fat as an endocrine organ:

- influence of exercise. *Journal of Applied Physiology* (1985). 2005; 99: 757-764.
- (34) Numabe Y, Hisao A, Kamoi K, Yoshie H, Ito K, Kurihara H. Analysis of saliva for periodontal diagnosis and monitoring. *Periodontology*. 2004; 40: 115-119.
- (35) Nakamura M, Slots J: Salivary enzymes. Origin and relationship to periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*. 1983; 18: 559-569.
- (36) Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2000; 27: 453-465.
- (37) Yan F. Alkaline phosphatase level in gingival cervical fluid of periodontitis before and after periodontal treatment. *Chung Hua Kou Chiang Hseueh Tsa Chin*. 1995; 30: 255-266.
- (38) Haffajee, A.D. & Socransky, S. S. Relationship of body mass index, periodontitis and *Tnnerella forsythia*. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009; 36: 89-99.
- (39) Ahmad A, Furuta M, Shinagawa T, Takeuchi K, Takeshita T, Shimazaki Y, Yamashita Y. Association of periodontal status with liver abnormalities and metabolic syndrome. *Journal of Oral Science*. 2015; 57: 335-343.
- (40) Barranco T, Tvarijonaviciute A, Tecles F, Carrillo JM, Sanchez-Resalt C, Jimenez-Reyes P, Rubio M, Garcia-Balletbo M, Ceron JJ, Cugat R. Changes in CK, LDH and AST in saliva samples after an intense exercise: a pilot study. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 2018; 58: 910-916.

- (41) Wakai K, Kawamura T, Uemura O, Hara Y, Machida J, Anno T, Ichibara Y, Mizuno Y, Tamakoshi A, Lin Y, Nakayama T, Ohno Y. Association of medical status and physical fitness with periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 1999; 26: 664-672.
- (42) Saygin O, Karacabey K, Ozmerdivenli R, Zorba E, Ilhan F, Bulut V. Effect of chronic exercise on immunoglobulin, complement and leukocyte types in volleyball players and athletes. *Neuro Endocrinology Letters*. 2006; 27: 271-276.
- (43) Amar S, Zhou Q, Shaik-Dasthagirisahab Y. & Leeman S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial change. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 2007; 104: 20466-20471.
- (44) Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998; 25: 134-144.
- (45) Luke R, Nubesh S, Safar P, Roopak S, Chakkarayan J, Krishnan V. Estimation of specific salivary enzymatic biomarkers in individuals with gingivitis and chronic periodontitis: a clinical and biochemical study, *Journal of International Oral Health*. 2015; 7: 54-57.
- (46) Gorman A, Kaye E.K, Nunn M, Garcia R.I. Changes in body weight and adiposity predict periodontitis progression in men, *Journal of Dental Research*. 2012; 91 : 921-926.

- (47) 朱博, 高橋真, 濱田泰伸. 中強度運動負荷中の唾液中分泌型免疫グロブリン A の変化, 広島大学保健学ジャーナル. 2011; 10 : 20-25.
- (48) 内藤祐子, 松本高明, 室増男. 高強度間欠 Cycling 運動および回復方法の違いが唾液成分に及ぼす影響について. The annual reports of health, physical education and sport science. 2006; 25: 85- 88.
- (49) Yuko N, Takaai M. Salivary secretion rate and sIgA output in subjects with habitual sports. The annual reports of health, physical education and sport science. 2007; 26: 33-36.
- (50) Pillard F, Van Wymelbeke V, Garrigue E, Moro C, Crampes F, Guiland JC, Berlan M, de Glisezinski I, Harant I, Riviere D, Brondel L. Lipid oxidation in overweight men after exercise and food intake. Metabolism. 2010; 59: 267- 274.
- (51) 金鉉基, 小西真幸, 坂本静男. 運動実施時間帯の違いが一過性持久性運動時における代謝関連指標ならびにホルモン応答に及ぼす影響. 日本臨床スポーツ医学会誌. 2014; 22: 497- 504.
- (52) 清水寿男, 小林哲夫, 吉江弘正. クロールヘキシジンポケット内投与による臨床および細菌学的変化. 日本歯科保存学雑誌. 2005; 48: 137- 143.
- (53) Tadokoro K, Yamaguchi T, Kawamura K, Shimizu H, Egashira T, Minabe M, Yoshino T, Oguchi H. Rapid quantification of periodontitis-related bacteria using a novel modification of Invader PLUS

technologies, Microbiological Research. 2010; 165: 43- 49.

- (54) 久保田健彦, 両角俊哉, 吉江弘正. 禁煙による歯周炎罹患喫煙者の血清イムノグロブリン G およびイムノグロブリン G2 の増加, 日本歯科保存学雑誌. 2004; 47: 770- 778.
- (55) 吉江弘正, 宮田隆 編著. 歯周病診断のストラテジー. 医歯薬出版, 東京. 1999; 34-47.
- (56) 鴨井久一, 花田信弘, 佐藤勉, 野村義明. プリベンティブペリオドントロジー. 医歯薬出版, 東京. 2007; 2-185
- (57) Tomita S, Komiya- Ito A, Imamura K, Kita D, Ota K, Takayama S, Makino-Oi A, Kinumatsu T, Ota M, Saito A. Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. *Microbial Pathogenesis*. 2013; 61-62: 11- 15.
- (58) Arimatsu K., Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota, *Scientific Reports*. 2014; 4: 1- 9.
- (59) 鴨井久一, 花田信弘 監修. 唾液検査ハンドブック. ヒョーロンパブリ

ッシャーズ. 2008; 1 : 105- 137.

- (60) 大野秀樹, 寺山和幸, 平田史子. 運動ストレスに関する研究 第 1 報
運動負荷における種々ヒト血漿酵素活性の変動について, 日本衛生学雑誌.
1981; 36 : 801- 810.
- (61) 喜多美智子, 中島貴子, 吉江弘正. 有病高齢者における PMTC が歯周組
織および唾液, 血清成分に与える効果. 日本歯科保存学雑誌. 2005; 48: 629-
636.
- (62) 久野彰子, 中谷寛, 佐藤勉. 高齢者における歯周病の唾液検査に関する
研究. 日本歯周病学会会誌. 2002; 44: 261- 272.
- (63) 山口人巳, 久保田健彦, 吉江弘正. 植物タンニン配合シュガーレスガム
が歯周健康へ与える影響. 日本歯科保存学雑誌. 2006; 49: 739- 748.
- (64) Nomura Y, Takami Y, Tanaka T, Arakawa H, Tsurumoto A, Kirimura
K, Sato T, Hanada N, Kamoi K. Screening of periodontitis with salivary
enzyme tests, Journal of Oral Science. 2006; 48: 177- 183.
- (65) Gordon B. Proctor. The physiology of salivary secretion,
Periodontology 2000. 2016; 70: 11-25.
- (66) C.Dawes. Circadian rhythms in human salivary flow rate and
composition, Jurnal of Physiology. 1972; 220: 529-545.

- (67) Lena T, Wataru S, Kageyasu T, Erica L, Rina K, Chie S, Yasue H, Naoko Y, Suguru N, Kenshiro O, Masahira H. Circadian oscillations of microbial and functional composition in the human salivary microbiome, *DNA Research*. 2017; 24: 261-270.
- (68) Dolores C, Juan A, Francisco N, Marta G. Daily profile in two circadian markers “melatonin and cortisol” and associations with metabolic syndrome components, *Physiology & Behavior*. 2014; 123: 231-235.
- (69) 井澤修平, 城月健太郎, 菅谷渚, 小川奈美子, 鈴木克彦, 野村忍. 唾液を用いたストレス評価-採取及び測定手順と各唾液中物質の特徴-. *日本補完代替医療学会誌*. 2007; 4: 91-101.
- (70) 両角俊哉, 中川種昭, 野村義明, 吉江弘正. 歯周炎進行を唾液中細菌検査と血清抗体価検査から予知する～SPT 期治癒判定プロジェクト最終報告書～. *日本歯周病学会会誌*. 2016; 58: 254-258.
- (71) 山本美紀, 村林宏, 大森行雄, 休波茂子. *日本看護研究学会雑誌*. 2012; 35: 47-53.
- (72) Jorma T. 唾液-口腔の健康に必須な液体. *日本ヘルスケア歯科学会誌*. 2002; 4: 45-55.
- (73) 三橋百合子, 植田伸夫. *帝京短期大学紀要*. 2012; 17: 115-120.
- (74) Tina P, Justin C, Peter B, Karam K, Chamindie P. Diagnostic

- Potential of Saliva : Current State and Future Applications. *Clinical Chemistry*. 2011; 57: 675-687.
- (75) 兼平孝. 日本口腔検査学会雑誌. 2011; 3: 13-20.
- (76) Saito T, Yamaguchi N, Shimazaki Y. Serum levels of resistin and adiponectin in women with periodontitis: the Hisayama study. *Journal of Dental Research*. 2008; 87: 1631- 1636.
- (77) Nelson RG, Shlossman M, Budding LM. Periodontal disease and NIDM in Pima Indians. *Diabetes Care*. 1990; 13: 836- 840.
- (78) Lalla E, Lamster IB, Feit M, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, Kislinger T, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2000; 105: 1117- 1124.
- (79) Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. A single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International*. 2000; 58: S26- S30.
- (80) US Department of Health and Human Services. Physical activity and health: report of the Surgeon General. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion; 1996.
- (81) Kato T, Kaneko S, Kimizuka R, Okuda K. Periodontopathic bacteria endotoxin-induced tumor necrosis factor α production was inhibited by

- exercise in mice. *FEMS Medical Microbiology and Immunology*. 2006; 47: 262.
- (82) Todorovic T, Dozic I, Vicente-Barrero M, Ljuskovic B, Pejovic J, Marjanovic M, Knezevic M. Salivary enzymes and periodontal disease. *Medical Oral Patologia Oral Cirugia Bucal*. 2006; 11: E 115-E119.
- (83) Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K & Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clinical Chemistry*. 2011; 57: 675-687.
- (84) Boesing F, Patino J. S, da, S. V. & Moreira, E. A. The interface between obesity and periodontitis with emphasis on oxidative stress and inflammatory response. *Obesity Reviews*. 2009; 10: 290-297.
- (85) Abramson JL, Vaccarino V. Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults. *Archives of Internal Medicine*. 2002; 162: 1286-1292.
- (86) Ford ES. Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among US adults *Epidemiology*. 2002; 13: 561-568.
- (87) Yates T, Davies M, Brady E, Webb D, Gorely T, Bull F, Talbot D, Sattar N, Khunti K. Walking and inflammatory markers in individuals screened for type 2 diabetes. *Preventive Medicine*. 2008; 47: 417-421.

- (88) 土井由利子: 日本における睡眠障害の頻度と健康影響. 保健医療科学. 2012; 61: 3-10.
- (89) Clarke NG, Hirsch RS. Personal risk factors for generalized periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 1995; 22: 136-145.