

東南アジアにおける歯周疾患に関する国際共同研究 —特に日本、バングラデシュ、フィリピンの比較実態調査と文化的背景分析—



星野 悦郎 先生
新潟大学歯学部
口腔細菌学教室教授

はじめに

今回、財団法人ファイザーヘルスリサーチ振興財団の助成金を得て、国際共同研究（スライド1、2）を実施することができたことを深く感謝いたします。

（1）目的

従来、歯周疾患の直接的な原因が歯周ポケットに生育する細菌の作用によるものであり、

- 1) その細菌構成は、環境の栄養学的な要因に影響されることが多いこと、また、
- 2) 歯周病病原に関連深いとされている細菌菌種に、欧米と日本では食い違いを生じていること、が背景にあり、とすれば、
- 3) 日本と同様に米食を中心としている東アジアの患者の病原細菌分析により重要な示唆が得られる。

しかしながら、東アジアの国々における研究成果の報告は、極めて少ない、あるいは全く無い、のが実状です。

本研究では、歯周疾患について、その病原となる歯周ポケット内の細菌叢の細菌の、日本人における分析と、同様に米食を中心としているバングラデシュ、あるいはフィリピン人における分析によって、地域的な病原要素の有無を検討する事を目的としました。

また、本口腔細菌学講座のバングラデシュ留学生3名、フィリピン留学生1名も研究協力者として参加しています。本研究を足がかりに、自国における基礎研究を継続する基盤を作ること、あるいは関連する学術技術の紹介も、もう1つの目的です。

（2）我々の従来の取り組み

病態によって細菌性病原が異なることが示唆されているため、一般的な成人性歯周炎の患者に限り、それも成熟した細菌叢細菌構成を検索するため、試料採取日より6ヵ月以前に治療を受けていない、初診患者を対象とする検索を行いました。従来の結果とは異なっていました。

- 1) 偏性嫌気性菌の占める割合が極めて高い。
- 2) グラム陰性桿菌でなく、グラム陽性桿菌が主たる細菌であった。

スライド1

研究課題名：「東南アジアにおける歯周疾患に関する国際共同研究 特に日本、バングラデシュ、フィリピンの比較実態調査と文化的背景分析」

新潟大学歯学部口腔細菌学教室教授
星野悦郎

スライド2

研究代表者：星野悦郎
新潟大学歯学部口腔細菌学講座教授
共同研究者 佐藤拓一
新潟大学歯学部口腔細菌学教室 特別研究員
Dr.M.A.Kalam
ダッカ大学（バングラデシュ）
歯学部歯周病学副教授
研究協力者 Dr.A.Salahuddin Dr.M.A.Asgor M *
Dr.J.Huque * Dr.S.Poco Jr. **
何れも新潟大学大学院歯学研究科大学院生
*ダッカ大学（バングラデシュ）講師
**イースト大学（フィリピン）講師

3) *Porphyromonas gingivalis* は特に主要な細菌種ではなく、*Eubacterium*、*Wolinella* などが優勢菌であった。

主要な優勢菌の中には従来の基準では同定できない新しい菌種があり、新しい菌種を提示しています。これは、我々の研究が、偏性嫌気性菌に留意した、極めて厳密な実験系で行われた事、極めて小さいコロニーを作る菌種も実体顕微鏡を用いて分離していること、従って従来、分離、培養できなかったような嫌気性菌が回収されている可能性が高いこと、が考えられますが、欧米系の食習慣と異なる日本人の分析結果である可能性があります。肉汁等を食事の中心とする欧米系と、野菜汁や米食を中心とする日本人とで常在細菌叢の細菌構成が変わる事は予想されることです。現在までのところ疫学的な調査が行われたことがなく、バングラデシュ全土にわたる、あるいは地域的な調査結果を参照することができません。

(3) 研究方法と材料

被験者：上記の日本人の場合と同様な状況の患者で、歯周ポケット細菌叢の分析を行ったのが10名、血清学的検査のために採血を行ったのが20名で、ダッカ大学歯学部病院に来院した患者から了解を得て無作為に選択しました。さらに、口腔細菌叢の特徴を調べるために、それぞれ88人のバングラデシュ人、18人のフィリピン人、59人の日本人歯垢を採取しました。患者の口腔状況、食物調査、口腔清掃調査、また、レントゲン診査、血液採取など、必要事項の調査を行いました。

歯周ポケットの細菌叢細菌の分離と同定：既述の通りですが、今回は、ポータブルタイプの嫌気グローブボックス(スライド3)を分解して運搬し、現地で組み立てて使用しました。各希釈試料、100 μlをBHI血液寒天培地に接種し、嫌気グローブボックス内で嫌気ジャーに入れ、密封後嫌気条件を保ち、日本に運搬しました。

ELISA法による被験者末梢血液中の抗体検査：既述の方法によって行いました。

歯垢の抗酸染色による検討：口腔細菌について幅広く検討するために、年齢別として40歳以上と未満、男女別に歯垢を採取しました。塗抹標本の抗酸染色を行い、その菌数を数え、全菌数に対する割合を求めました。

スライド3



(4) 結果と考察

口腔内の現症：被験者のいずれも平均10本抜歯しています。理由については必ずしも明確ではないのですが、1回の受診で済む、抜歯中心の治療が原因であるという。被験歯の歯肉縁全縁に沿って歯垢の沈着が認められました。歯肉の炎症は軽度でしたが、歯周ポケットの殆ど全てが歯石で占められるほどの著しい歯石の沈着がみられ、歯肉の退縮が見られました。また、レントゲン診査により、歯槽骨の吸収が歯根長の半分以上進行し、定型的な成人慢性辺縁性歯周炎の病態を呈していました(表1)。

歯周ポケット細菌叢の細菌構成：被験者10名の歯周ポケット細菌叢の細菌構成解析結果を表2に示しました。偏性嫌気性菌の割合が28%と、低い値となっていますが、現時点で、

表1 バングラデシュ患者の臨床所見と分離菌数

患者	年齢	性別	歯種	ポケット深さ (mm)	総生育菌数	分離菌数
1	32	男	26	7	2.3 × 10 ⁴	16
2	54	男	36	7	3.7 × 10 ⁴	27
3	60	男	45	6	2.2 × 10 ⁶	6
4	28	男	42	6	3.0 × 10 ⁵	10
5	59	男	36	11	5.3 × 10 ⁶	7
6	60	男	16	9	2.7 × 10 ⁵	28
7	35	女	37	8	1.1 × 10 ⁷	5
8	c55	男	15	12	7.7 × 10 ⁷	12
9	c55	男	24	10	3.4 × 10 ⁶	36
10	40	女	37	11	5.2 × 10 ⁶	9
計						156

未同定となっている63株の中に偏性嫌気性菌が含まれます。菌属 (genus) が同定されたものでも、例えば、*Eubacterium*では、既存の菌種とは合致しないものがあり、新種としての報告の準備中です。

偏性嫌気性菌の構成を見ると、同様に主食が米食である日本人での我々の分析の結果と類似しており、興味ある結果となっています。詳細な細菌の分離同定には時間と労力がかかるため、明確な類似性について現時点では検討できませんが、今後の検討に大きな示唆を与える結果となっています。

末梢血中の歯周ポケット内生育細菌に対する抗体検査：歯周ポケット内の細菌は歯周組織を侵襲し、免疫反応を引き起こします。従って、末梢血液中の抗体産生を調べることにより、液性免疫を惹起している細菌菌種を推定することができます。20人の被験者のELISAによる特定の口腔細菌に対する抗体価を、表2に示しました。*P.gingivalis* に対する抗体価の高い患者が多く見られました。特に2人にかなり高い抗体価が検出されています。この2人は、その他に、*A.viscosus*、あるいは、*E.timidum* に対する抗体も検出されています。*Eubacterium* 菌種に対する抗体価は、やや高い患者数かずつ見られます (表3) (試料採取風景：スライド4)

歯垢中の抗酸染色陽性菌：あらかじめ予備的に、バングラデシュの留学生とその家族の歯垢を採取し、調べていたところ、日本人とは大きく異なり、抗酸染色で弱い陽性に染まる細菌が多く見られました。これは、鋭敏な、注意深い検出を行った結果と思われる。従来、口腔の細菌叢に抗酸性の細菌が多く見られることは報告されていません。

表2 バングラデシュ患者の歯周ポケット内優勢菌の細菌構成

全分離菌数 156 (被験者数) (10人)	
偏性嫌気性菌 (46株)	通性嫌気性菌 (47株)
<i>Eubacterium</i> 14	<i>Actinomyces</i> 16
<i>Peptostreptococcus</i> 13	<i>Streptococcus</i> 12
<i>Veillonella</i> 12	<i>Neisseria</i> 6
<i>Wolinella</i> 4	<i>Pseudomonas</i> 4
<i>Clostridium</i> 2	<i>Corynebacterium</i> 3
<i>Lactobacillus</i> 1	<i>Propionibacterium</i> 1
	<i>Lactobacillus</i> 1
	<i>Staphylococcus</i> 1
	Unidentified 3
Unidentified 63	

スライド4



スライド5

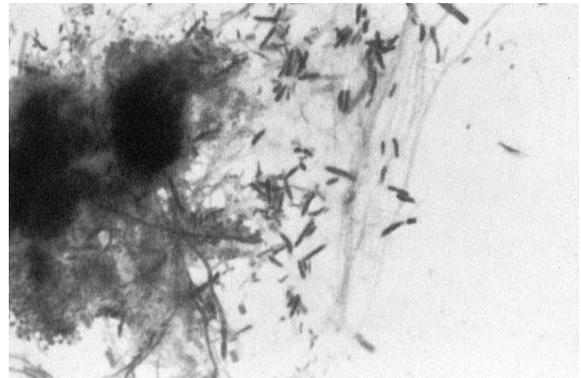


表3 口腔細菌に対する末梢血液中の抗体価 (ELISA)

患者名	細菌属種						
	P.g	E.t	E.sub	E.sap	E.n	E.b	A.v
A	0.728	0.305	0.118	0.134	0.145	0.121	0.282
B	0.699	0.157	0.082	0.101	0.093	0.054	0.054
C	0.377	0.139	0.133	0.116	0.152	0.111	0.093
D	0.383	0.114	0.093	0.087	0.064	0.061	0.059
E	0.359	0.254	0.214	0.183	0.100	0.222	0.218
F	0.291	0.154	0.083	0.116	0.097	0.085	0.115
G	0.280	0.156	0.120	0.110	0.136	0.045	0.100
H	0.250	0.129	0.133	0.117	0.100	0.031	0.144
I	0.209	0.141	0.176	0.154	0.142	0.080	0.141
J	0.184	0.174	0.102	0.114	0.087	0.066	0.087
K	0.169	0.231	0.179	0.121	0.185	0.060	0.130
L	0.168	0.226	0.090	-	0.165	0.030	0.048
M	0.171	0.207	0.137	0.119	0.161	0.010	0.177
N	0.145	0.107	0.120	0.079	0.076	0.050	0.250
O	0.158	0.117	0.128	0.139	0.124	0.02	0.109
P	0.097	0.105	0.092	0.121	0.107	0.015	0.033
Q	0.110	0.099	0.080	0.100	0.098	0.033	0.060
R	0.121	0.108	0.159	0.100	0.097	0.035	0.05
S	0.153	0.100	0.100	0.110	0.104	0.070	0.130
T	0.153	0.096	0.090	0.094	0.080	-	-
対照	0.130	0.100	0.080	0.081	0.136	0.069	0.110
P.g	: <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain 381						
E.t	: <i>Eubacterium timidum</i> ATCC 33092						
E.sub	: <i>Eubacterium subbreum</i> ATCC 33271						
E.sap	: <i>Eubacterium saphenum</i> ATCC 49989						
E.n	: <i>Eubacterium nodatum</i> ATCC 33099						
E.b	: <i>Eubacterium brachy</i> ATCC 33089						
A.v	: <i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 19246						

染色による評価なので、あらかじめ染色技術、条件の検討すると共に、試薬の調整法、保存法についてもその影響を調べました。

バングラデシュ人、日本人についての結果を表4に示しました。フィリピン人では平均10%でした。日本人についても、従来考えられていた以上に、抗酸性の細菌が検出されていますが、バングラデシュあるいはフィリピンの方がかなり多い抗酸性陽性細菌を保持していました。男女別、年齢に関わらず、ほぼ同じ割合の抗酸性陽性細菌が観察されました。明確な国民差については、さらに検討する必要がありますが、食習慣等が関与することが考えられます。Bangladesh Bureau of Statistics (Ministry of Planning) によれば、バングラデシュでは、年間1人あたり、160kgの米を消費する日本同様の米食中心ですが、

- 1) 他種類の香辛料を用いた、いわゆるカレー料理を常食している (Turmericの消費量は年間1人あたり約0.4kg、Chilliesが約0.5kg)
- 2) 熱帯産のフルーツ、Bananaを5.6kg、Mangoを1.5kg、Pineappleを1.4kg、Jackfruitsを2.3kg、その他の果物を2.3kg、を消費しているが、気温が高いため場合によって多少発酵したのもも食している。
- 3) 精製した砂糖の消費量は少なく、1989 - 1990で1人あたり2.6kgであり、他の甘味料、未精製糖 Molassesが、0.7kg、原材料の絞り汁であるGurが4.6kgの消費となっている。

また、イスラム教徒が殆どであるため、食事の際などにアルコール類を摂取しない。食後などに、ピンロウ樹の実と種々の香料などをベターの葉で巻いた「パン」と称するものを、口に含み、噛み、かじり、嚼る習慣がある。男性が主であるが、古くからの習慣となっている。

今回の調査で、バングラデシュ人の歯垢に抗酸性陽性細菌が多い事実が明らかとなりましたが、その理由は未だ解明されていません。抗酸性を与えている細菌壁の構造については、*Mycobacterium* 属 (結核菌など) の長鎖の脂肪酸であるミコール酸が知られており、遅延性の過敏症、細胞性免疫を惹起します。今回の弱い抗酸性を示すものは *Corynebacterium* や *Actinomyces* などと思われます。一部の菌株について分離し、その同定と細菌壁構成化学成分について分析を進めています。歯周疾患にしる、根尖性歯周炎にしる、細胞性免疫の関与の病理所見が示されており、口腔疾患との関与の解明が必要となっています。現在、種々の方面からの解析を進行させています。

スライド6



(5) おわりに

今回の研究助成により、多大な成果を得ることができましたことを感謝します。その成果は、上記のような科学的成果のみでなく、研究者を育成し、技術協力に貢献するという国際交流の面の成果も大きいものです。さらに、従来、日本および欧米を中心として歯周疾患の病原性の研究が進められて来たため、東アジアにおける口腔疾患、とりわけ歯周疾患の実態が明らかでないまま、現在に至っています。東アジアの学者らとそれぞれに地域の患者の標本、試料を用いることにより、東アジアにおける口腔疾患の特殊性を加味した研究成果を得ることができます。この点からもこの国際共同研究の大きな成果の1つであったと考えています。

なお、バングラデシュにおける研究遂行

表4 歯垢内抗酸性染色陽性細菌 (AFB) の割合
- バングラデシュ人、日本人における性別、年齢別比較 -

	バングラデシュ人		日本人		P Value
	人	%	人	%	
全被験者	88	12	59	5	0.001
男性	50	12	23	5	0.001
女性	38	14	36	5	0.001
40歳以上	35	14	31	5	0.001
40歳未満	53	12	28	5	0.001

に当たっては、ダッカ大学歯学部長、フセイン教授をはじめとする教官諸氏、病院職員、ダッカ市内の開業歯科医、ダッカ工業技術大学 (BUET) の協力を得ました。また、フィリピンにおける研究遂行に当たっては、イースト大学歯学部長リム教授 (歯周病学) 及びマニラ市内の開業歯科医の協力を得ました。(スライド6はダッカ大学歯学部病院前で。歯学部長らと。)

質疑応答

Q : 私も抗酸菌をやってるので、ものすごく興味があるのですが、先生が示された抗酸菌は培養ができる菌ですか。

A : そういう意味で先生方のらい菌とは大分違うと思います。報告した分離菌種は実際に培養していますので、試料中の多くの抗酸菌は培養可能と思われるのですが、全てが培養できるかは確信がありません。

Q : 自然界の抗酸菌というのは知られないものがたくさんあります。私達はらい菌の特異性というものを一生懸命やっていますけれども、知らない抗酸菌とらい菌とクロスするようなDNAを持っているものがあつたりすると、データが全部ひっくり返りますので非常に興味があつたんですけども。

A : 我々の分離した菌では、*Mycobacterium* の様な長鎖の脂肪酸、ミコール酸を持っていません。従って、らい菌とはかなり違っていると思います。あれだけいますと、先生のおっしゃるようなものも混ざっている可能性はあるかな、とも思います。培養できないとすれば、PCRとかその他を検討しなければならないと思います。

Q : 歯周炎が国によって、ヨーロッパとかアメリカとか日本とかバングラデシュで、incidence とか prevalence は相当違うわけですか。

A : 今の状態ですと、その罹患率はあまりに高すぎ、要因などを分析しても同じように出てしまう。う蝕も同じなんです、歯科疾患のこの2つは罹患率が高すぎるという状況にあります。

Q : 40才過ぎるとどこの国の人も全部かかるという...

A : ただ日本ほど国民全体について調査の行き届いているところはありませんので、厳密に比較することは出来ません。

Q : 先生は血清の抗体価を調べましたですね。その考え方というのは、炎症があると、バクテリアの数、抗原量が増えたからその抗体価が上がるというような、何か印象があつたからで、それを測定することによって、何菌による炎症だという形の診断につながるということでしょうか。

A : はい、その通りです。細菌は粘膜によって隔てられている歯周ポケットの中にいますが、生体組織である歯周組織に炎症を起こす、あるいは上皮を越えて侵入していくということで、色々な歯周疾患が起こってきます。抗体が出来るということは、その両方を含めて、既往がある、あるいは現在その様な状況にあるということの指標として使っているという事です。最近ですと、液性免疫の評価ばかりでなく、細胞性の免疫に関する評価による細菌の病原性も検討されています。

Q : 血清学という方法は非常におもしろいですねえ。

A : ただ、口腔の細菌と腸管の細菌とでその菌種が同じですと、その抗体産生のメカニズムは同じですから、歯周疾患に関係なく、あるいは相乗して特異抗体が作られていることがあります。歯周ポケットに特異的な、特殊の細菌でないと評価しにくいところがあります。報告したような *Eubacterium* については口腔に比較的多いということから評価ができるという気がしています。