The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯周疾患の臨床指標としての歯肉縁下細菌叢の運動量の評価
Author(s)	小島, 美樹
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169597
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

歯周疾患の臨床指標としての歯肉縁下細菌叢の運動量の評価

小島美樹

緒　言

日常的に用いられている歯周疾患の臨床指標には，プロービング時の歯周ポケットの深さ，アタッチメントロス，プロービング時の歯肉出血，X線画像による歯槽骨吸収度および歯肉の色や形状の変化などが挙げられる。これらの臨床指標は，過去または現在の歯周組織の破壊や炎症の状態を示しているが，近い将来の疾患の進行や停止，すなわち歯周疾患活動性についての評価はできないといわれている[1)]。歯周ポケットに関連した種々の指標を測定し，それを歯周疾患活動性として利用する試みは，様々な分野で検討されている。例えば，コンピュータを用いたサブトラクションX線画像解析[2)]，歯肉縁下温度の測定[3)]などがあり，また，歯肉溝滲出液を用いた免疫・生化学検査やデンタルプラークの細菌学的検査などの試みもなされている[4),5)]。しかしながら，これらの利用は主に研究段階に滞っており，臨床的に歯周疾患の疾患活動性を正確に予測できるものは現在のところみられない。

歯周疾患とは，その発症・進行に，プラーク中の細菌が大きく関わる感染性の炎症性疾患である[6),7)]。特に，歯肉縁下プラーク中の細菌が，主に歯周組織の破壊に直接的に影響すると考えられるため，歯周疾患の臨床指標として歯肉縁下細菌叢を対象にした試みが数多く報告されている[8),9)]。例えば，歯肉縁下細菌叢を解析する方法のひとつに，暗視野顕微鏡や位相差顕微鏡を用いて歯周ポケット内細菌を直接観察し，総菌数，菌の形態や運動性に基づき分類した菌の構成比などを指標とする方法がある。これらの方法で検索された結果は，健康な歯肉溝と病的な歯周ポケットでは細菌の菌数やその構成に明らかな相違があり，特に，病的な歯周ポケットでは運動性桿菌やスピロヘータの比率が増加している[10)-15)]。また，治療によって，それらの運動性細菌の比率が減少することが示される[16)]。これらの変化を，病態の把握のみならず，治療やメインテナンスの指標として応用できる可能性が示唆されている。しかしながら，それらの細菌がもつ運動量そのものを測定したり，その運動量を歯周疾患の臨床指標として用いる試みは未だなされていない。

現在，歯周病原性菌の運動性は歯周疾患のビルレンス因子の一つであると考えられている。すなわち，運動性を有する細菌は，歯周組織へ移動する能力をもつと考えられ，歯周疾患患者の歯肉縁下プラークから分離されたスピロヘータが，マウスの腸壁を通過したという報告[17)]や，歯肉組織中にスピロヘータが認められたいう報告[18),19)]がある。これらのことより，歯肉縁下細菌叢の運動量を測定することは，歯周状態を診断するうえで有用であると考えられる。

本研究では，運動性細菌の動画像を画像解析し，その運動量を定量化する方法を開発した。さらに，歯周疾患患者より得た歯肉縁下細菌叢の運動量と従来から用いられている歯周疾患の臨床指標との関連性を明らかにすることにより，歯周疾患の臨床指標としての歯肉縁下細菌叢の運動量を評価することを目的とした。

材料ならびに方法

１．　画像解析システム

運動量の測定には，画像取り込み部と画像処理部から成る画像解析システムを使用した（図１）。画像取り込み部は，位相差顕微鏡（OPTIPHOTO-2，ニコン（株），東京）に，１００倍対物油浸レンズ（NA=1.25）とストロボ光源を装着し，毎秒１００コマ撮影可の高速シャッターカメラ（MHS-200，ナック（株），東京）を接続した。さらに，このカメラに，画像記録部として高速ビデオレコーダ（MHS-200，ナック（株），東京）を接続した。

画像処理部は，画像再生部にビデオ再生デッキ（Video Cassette Recorder，AG-7300（VHS）パナソニック（株），東京)を用い，このデッキと，ビデオキャプチャーボード（Video Vision version 2.0. Radius Co.，Ltd.，CA，USA)を装着したマイクロコンピュータ（Power Macintosh 8100/80/AV Apple Computer Co.，Ltd.，CA，USA)をＳビデオケーブルで接続した。

２．運動性細菌の運動量測定法

本システムを用いて細菌の速度を測定するために，*Pseudomonas aeruginosa* IFO 13275 株を運動性細菌の標準株として選択した。トリプチケースソイブロス培地（BBL Microbiology Systems，Cockeysville，MD，USA)で，37℃，24 時間，大気中で培養し，培養終了後の菌懸濁液を試料として用いた。運動性のない対照菌としては，同菌をホルマリンで処理したものを用いた[5)]。

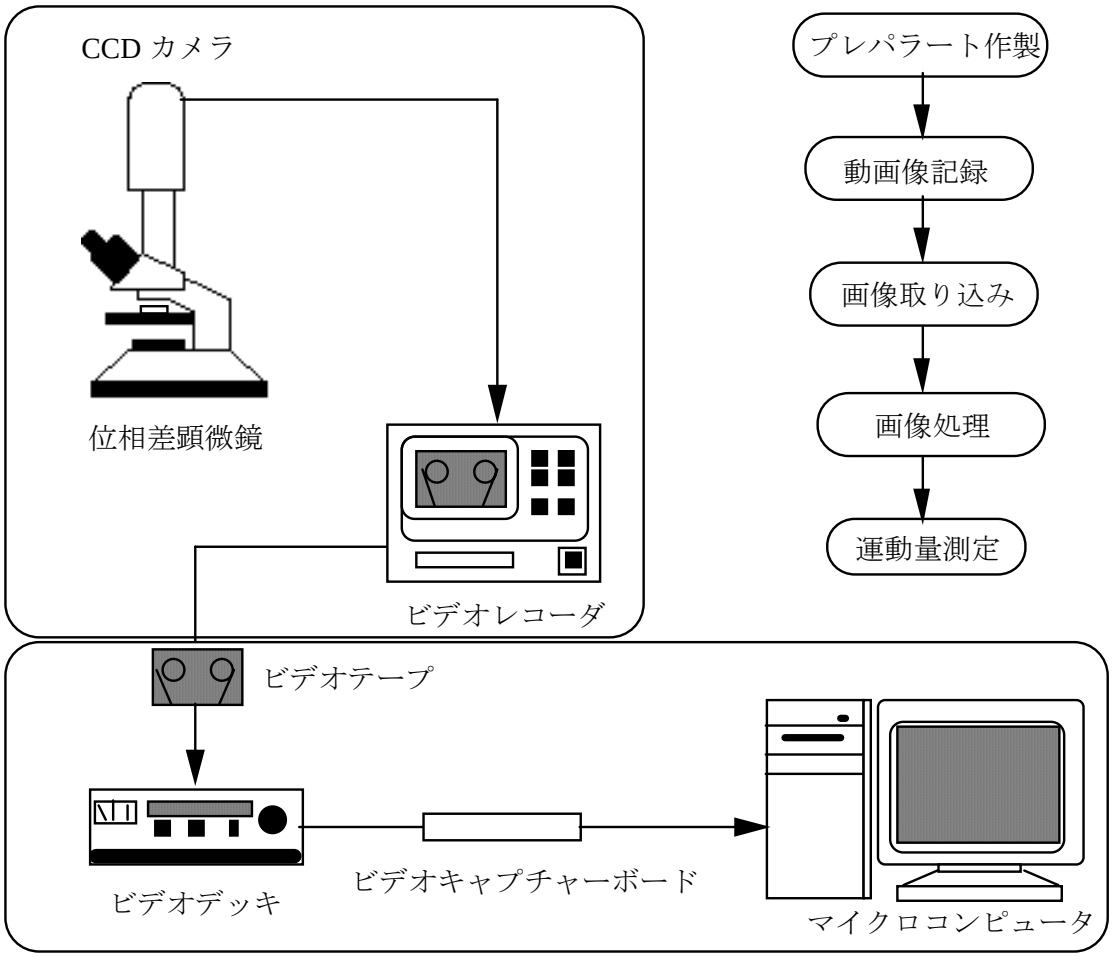

図 1　画像解析システム

試料10μｌをスライドガラス上に滴下し，マニキュアでカバーガラスの辺縁を封鎖した[20]。位相差顕微鏡で検鏡した動画像を，連続的に高速シヤッターカメラで撮影した。１０視野を無作為に選択し，１視野につき３０秒間レコーダーでビデオテープに記録した。１０視野のうち１視野の動画像を，ビデオデッキで１０秒間再生し，ビデオボードを用いて１秒ごとに１１枚の静止画像をマイクロコンピュータに取り込んだ。画像解析ソフトウェアは NIH-Image Ver1.59[21]を用い，画像取り込み用プラグイン（Adobe Co.，Ltd.，CA，USA）を使って行った。画像は，画素数が 320×240 画素（１画素の１辺は 0.12μm）８ビット（２５６階調グレー），ファイル形式はＴＩＦＦ(Tagged Image File Format)とし，外付けハードディスク（ランドコンピュータ（株），大阪）に保存した。

画像処理の各ステップで得られる画像を図２に示した。１０秒間の動画像から，１秒間隔で連続した画像を，計１１枚取り込んだ（図２　ａ１，ａ２）。オリジナルのビデオ画像は，コントラストが不十分であり，また明度が低かったため，取り込み時にビデオ取り込みソフトウェアで調整した。臨床サンプルの画像は，ノイズが多く輝度のばらつきが高かったため，バックグラウンドを差し引いた（図２　ｂ１，ｂ２）。静止物体を除去し運動物体のみを抽出するために，連続する２画面間の減算を行い，絶対輝度差の最大値を求めた。この画像を一定の輝度値(10)で２値化し(図２　ｃ)，５画素以下の物体をノイズとして消去した（図２ｄ)。画面上の全物体の画素数を総計したものを１画面当たりの運動量とした。同様の操作を連続する異なった１０画面に対して行い，全てを合計した画素数を１サンプルあたりの運動量とした。

以上の方法で測定される運動量（画素数）の定量性を確認するために，以下の実験を行った。最初に，画素数で表される運動量の測定に影響する

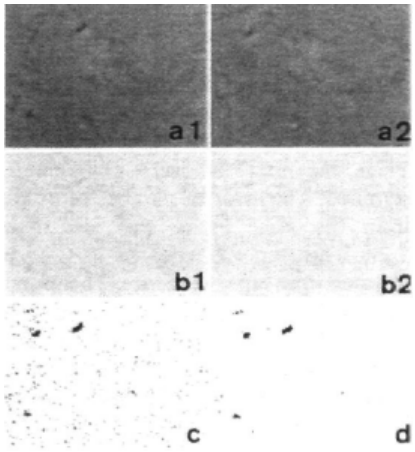

図 2　画像処理

a1, a2：動画像より取り込んだ画像，b1, b2：バックグラウンドを差し引いた画像，c：２値化した画像，d：ノイズを消去した画像

因子について調べた。視野の背景の流れについては，顕微鏡にスライドガラスをセットしてから３０分間，その速度を記録した。ブラウン運動の運動量を測定するために、ホルマリン処理をした *P. aeruginosa* 菌体懸濁液を用いて，その速度と運動量を測定した。画像の輝度ムラは，フィルター処理を検討した。減算後の２値化レベル，ノイズの画素数については，それぞれの最適条件を検討した。次に，運動性細菌，ホルマリン処理細菌それぞれについて，画面上の細菌の数を測定し，その数とサンプルの運動量との関係を調べた。細菌の数を１秒ごとに記録し，その平均値を画面上の細菌の数として使用した。細菌の重心の移動距離を測定し，速度をμｍ／sec で表した。画面上の運動性細菌の速度の和とサンプルの運動量との関係を調べた。

３．被験者および被験部位

大阪大学歯学部附属病院予防歯科に来院した患者の中から，重篤な全身疾患の既往がなく過去３ヶ月以内に歯周治療を受けた経験のない者６４名（男性２８名，女性３６名，平均４７．７歳）を被験者とした。歯肉縁下プラークの採取にあたり，

患者へ本研究について説明し，承諾を得た。歯周ポケットの深さが，4mm 以上の部位が少なくとも１２部位以上ある者（１２名）からは，4mm 以上の２部位，3mm 以下の１部位を選択し，4mm 以上の部位が少なくとも６部位以上ある者（４１名）からは，4mm 以上の１部位，3mm 以下の１部位を選択した。3mm 以下のみもつ者（１１名）からは，3mm 以下の２部位を選択し，総計１４０部位を被験部位とした。

４．歯肉縁下細菌叢の運動量および他の臨床指標の測定

歯肉縁下プラークサンプルは，簡易防湿後，被験歯周囲を滅菌綿球で清掃し，歯肉縁上プラークの除去を行ってから，歯周ポケットより，根分岐部用キュレットを匙状に改造したもので採取した。嫌気的移送培地 100μｌで希釈した後，３０秒間ボルテックスミキサーで撹拌した懸濁液10μｌを試料として用いた。運動量の測定は，本研究で *P. aeruginoza* を用いて開発した方法を，臨床的に応用できるように改良した方法を用いた。すなわち，多数のサンプルを迅速に測定できるようにするため，画像処理を自動的におこなうマクロスクリプトを開発し，測定誤差の減少と測定時間の短縮を図った。

歯肉縁下プラークの採取と同時に，同部位において，従来から用いられている臨床指標の測定を行った。歯肉の炎症程度（ＧＩ），プラークの付着状態（ＰｌＩ）は，歯肉縁下プラーク採取前に調べ，プロービング深さ（ＰＰＤ），プロービング時の歯肉出血の有無（ＢＯＰ）および排膿の有無（ＰＵＳ）については，歯肉縁下プラーク採取後に調べた。以下，それぞれＰＰＤ，ＧＩ，ＰｌＩ，ＢＯＰおよびＰＵＳと略す。ＧＩは Löe と Silness のＧＩ[22]を参考にして，「歯肉炎症なし」を 0，「軽度から中等度の歯肉炎症」を 1，「重度の歯肉炎症」を２とした。ＰｌＩは Silness と Löe のＰｌＩ[23]を参考にして，「プラークを認めず」を 0，「1mm 未満のプラークの付着」を 1，「1mm 以上のプラークの付着」を２とした。ＢＯＰは「プロービング時の出血を認めるもの」を 1，「認めないもの」を０とした。ＰＵＳは「排膿を認めるもの」を 1，「認めないもの」を 0 とした。臨床指標と歯肉縁下プラークの採取は，一人の診査者が行った。

５．統計処理

本システムで測定される画素数と，運動性細菌（*P. aeruginosa*）の数および速度の和との相関を Pearson の相関を用いて調べた。被験者６４名から得られた１４０サンプルは，同一患者より２部位を採取したサンプル含むため，4mm 以上の部位が少なくとも１２部位以上ある者（１２名）については，4mm以上の２部位の平均値を，3mm 以下のみもつ者（１１名）については，3mm以下の２部位の平均値を使用し，統計解析に用いたサンプル数を 117 とした。各部位における運動量と各種臨床指標との相関を Spearman の順位相関を用いて調べた。さらに，臨床指標を用いて歯周状態を総合的に評価した４基準における運動量の差を，一元配置分散分析（Kruskal-Wallis 法）を用いて調べた。また，運動量が他の臨床指標とどのような関係にあるのかを調べるために因子分析を行った。統計パッケージは SPSS Ver 4.11（大阪大学大型計算機センター）を用いた。

結　果

１．本システムで測定される運動量の定量性

位相差顕微鏡の視野における背景の流れの速度は，顕微鏡にサンプルをセットして５分から１０分後には 1μm/sec 以下となり，運動量の測定に

ほとんど影響を及ぼさなかった。ホルマリンで処理した *P. aeruginosa* IFO 13275 株の運動量を測定した結果，ブラウン運動と考えられるものの速度は１μm/秒以下であり，その画素数は 150 画素以下であった。背景の輝度ムラはバックグラウンドを差し引く処理によりほぼ均一となった。２値化レベルは輝度値 10，ノイズの画素数は５画素以下とした時に，運動物体を最も正確に抽出することができた。

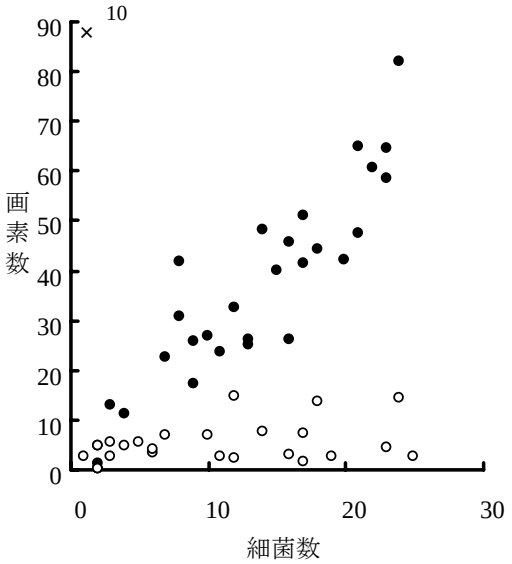

図 3　*P. aeruginoza* IFO 13275 株の菌数と画素数との関係

● 運動性細菌　○ ホルマリン処理細菌

画面上の細菌の数と画素数との関係を図３に示した。運動性細菌の標準株である *P. aeruginosa* 菌体の懸濁液を用いた場合，１視野当たりの菌数が１～約３０の間ではその増加とともに画素数も増加したが (Pearson の相関係数 0.92, P＜0.001)，ホルマリンで処理した細菌ではその傾向はみられなかった。画面上の運動性細菌の速度の和と画素数との関係を図４に示した。画面上の運動性細菌の速度の和と本システムで測定した画素数との間に正の相関がみられた (Pearson の相関係数 0.59, P＜0.001)。

開発した測定法を歯肉縁下プラークサンプルに応用した場合，その運動量がビデオ画像を肉眼で

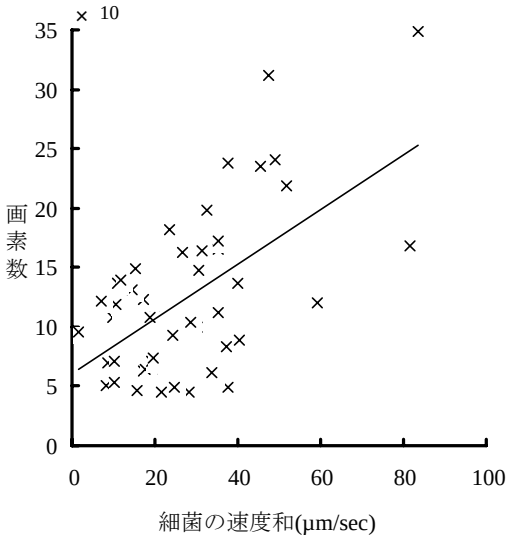

図 4　*P. aeruginoza* 株菌体の速度の和と画素数との関係

判定した運動性とどのような関連性をもつかを調べた。運動性の判定は，１０人の診査者（５人の歯科医師と５人の歯科衛生士）が３０画面のビデオ画像を観察し，３段階（高度，中等度，低度）

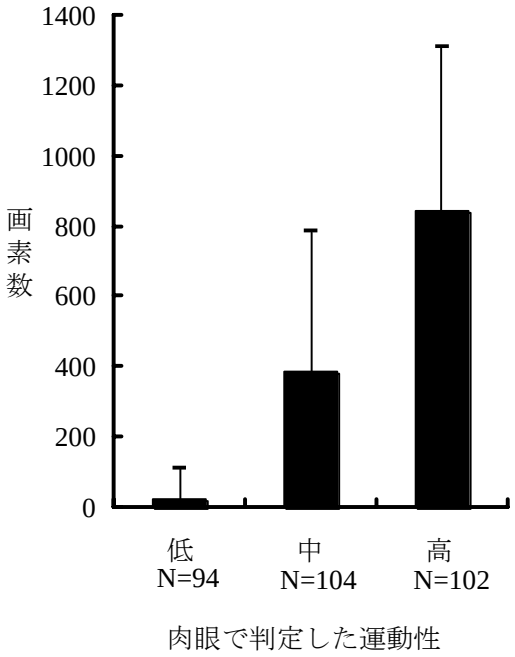

図 5　ヒト歯肉縁下プラークを用いた肉眼で判定した運動性と画素数との関係 (平均値と標準偏差)

で記録した。図５に，肉眼で判定した運動性と本システムで測定した画素数との関係を示した。１０人の診査者が，肉眼で運動性を低いと判定したものは９４画像，中等度と判定したものは１０４画像，高いと判定したものは１０２画像であり，それらの画像の平均運動量はそれぞれ, 24.2 画素,

386.1 画素，842.4 画素であった。本システムで測定した運動量は，肉眼で主観的に判定した運動性ともよく一致していた。

２．ヒト歯肉縁下細菌叢の運動量と歯周状態との関連性

測定した部位における歯肉縁下プラーク１４０サンプルの運動量の分布を図６に示した。運動量は 0～3605 の範囲で分布し，中央値は 7 で，0 が半数以上を占めた。運動量が 0 であるサンプル画像には，非運動性の球菌と長桿菌が多くみられた。上位１０パーセント以内の値は 1339～3605 の間であり，この範囲の運動量を示したサンプル画像には，運動性桿菌やスピロヘータが多くみられた。

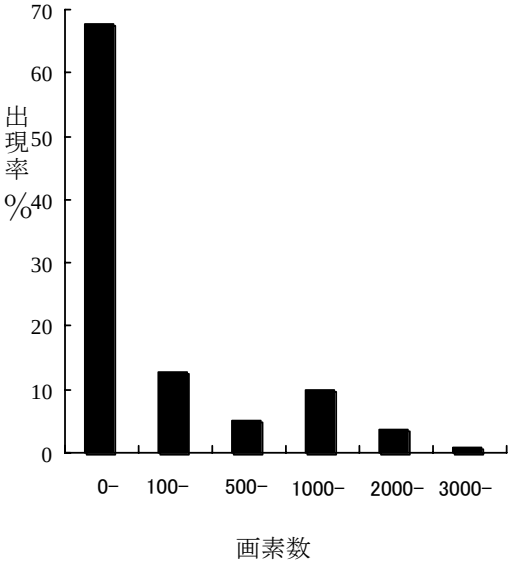

図 6　ヒト歯肉縁下細菌叢運動量の分布 (N=140)

歯周病の各臨床指標と歯肉縁下プラークサンプルの運動量との相関を表１に示した。両者の相関係数は 0.23～0.36 であり，運動量と各臨床指標との間に弱い正の相関関係が認められた。運動量との相関係数が最も高かったのはＰＰＤであった。

表２に運動量と各臨床指標との関連性を示した。臨床指標の各値とその平均運動量を表２に示した。ＰＰＤを 0～3mm，4～6mm，7mm以上の 3 群に分け，運動量を比較すると，7mm以上の群の運動量が最も高い値を示し，３群間に有意の差が認められた。ＧＩについて運動量を比較すると，ＧＩが 1.5，2 の群の運動量が最も高い値を示し，3 群間に有意の差が認められた。ＰＬＩの値で運動量を比較すると，ＰＬＩが 1.5，2 の群の運動量が最も高い値を示し，3 群間に有意の差が認められた。ＢＯＰおよびＰＵＳについても運動量を比較すると，共に 0.5，1 の群の運動量が０の群より有意に高い値を示した。

表 1　ヒト歯肉縁下細菌叢運動量と臨床指標との相関

(Spearmanの順位相関係数 r ; N = 117)

	PPD	GI	PlI	BOP	PUS
GI	r = 0.53 p < 0.0001				
PlI	r = 0.28 p = 0.003	r = 0.43 p < 0.0001			
BOP	r = 0.43 p < 0.0001	r = 0.59 p < 0.0001	r = 0.32 p = 0.0005		
PUS	r = 0.41 p < 0.0001	r = 0.31 p = 0.0007	r = 0.15 p = 0.1145	r = 0.22 p = 0.0181	
運動量	r = 0.36 p = 0.0001	r = 0.34 p = 0.0003	r = 0.23 p = 0.0121	r = 0.34 p = 0.0002	r = 0.32 p = 0.0005

表 2　歯肉縁下細菌叢運動量と臨床指標との関係

臨床指標	部位数　(%)	運動量（画素数）（平均値±標準誤差）	P値
総数	117 (100)	305.0±57.2	
PPD			
0-3mm	64 (54.7)	159.8±57.3	
4-6mm	41 (35.0)	450.5±104.4	0.0004*
≧7mm	12 (10.3)	582.6±278.1	
GI			
0	39 (33.3)	289.9±46.4	
0.5, 1	52 (44.4)	645.5±89.5	0.0005*
1.5, 2	26 (22.2)	827.1±162.2	
PlI			
0	38 (32.5)	149.2±77.3	
0.5, 1	59 (50.4)	353.4±79.6	0.0145*
1.5, 2	20 (17.1)	458.6±183.8	
BOP			
0	47 (40.2)	143.5±63.1	< 0.0001**
0.5, 1	70 (59.8)	413.5±83.6	
PUS			
0	101 (86.3)	221.0±51.9	0.0005**
0.5, 1	16 (13.8)	835.3±224.4	

* Kruskal-Wallis test
** Mann-Whiteny U test

１１７部位を，運動量以外の臨床指標を用いて歯周状態を総合的に評価し，各部位の状態を４つの基準に分類した。基準０はＰＰＤが 3mm以下，ＧＩとＰＩがどちらも 0，ＢＯＰとＰＵＳがどちらも０とした。基準３はＰＰＤが 4mm以上，ＧＩとＰＩのどちらかが 2，ＢＯＰとＰＵＳがどちらも 0.5 あるいは１とした。基準０と３に含まれない部位について，ＰＰＤが 3mm以下を基準 1，ＰＰＤが 4mm以上を基準 2 とに分類した。各基準とその平均運動量を図 7 に示した。平均運動量はそれぞれ基準０が 11.1 画素，基準１は 205.3 画素，基準３が 435.2 画素，基準４が 701.6 画素であり，4 群間に有意の差が認められた（Ｐ＝0.001）。

以上の結果より，歯肉縁下細菌叢の運動量は歯周疾患の臨床状態をある程度表わしてはいるが，両者には強い相関性はみられず，他の臨床指標とは異なった要素を測定していることが示唆された。そこで，変数間の構造を解析することができる因子分析を用いて，運動量と他の臨床指標との関係をさらに追究した。表３に，因子分析で抽出された，因子の固有値と変動率を示した。本研究では，固有値と累積変動率より，抽出因子を３因子に決定した。これらの３因子で変数の全変動の約 75%を説明することができた。各因子負荷量で各変数をプロットしたグラフを図８に示した。３つの因子で３次元的に表される図を，２つの２次元の図で表した。上図（a）は因子１と因子２とを座標にした時，下図(b)は因子２と因子３とを座標にした時の図を示した。因子負荷量は各因子と変数との相関を表す。因子１は６変数すべてが 0.5 以上の値で，ＧＩの因子負荷量が最も高い値を示し，運動量が最も低い値を示した。因子２はＰＵＳと運動量がプラス 0.5 以上の値を示し，Ｐｌ Ｉはマイナス 0.5 以上の値を示したが，ＰＰＤ，ＧＩ，ＢＯＰの因子負荷量は低い値であった。因子３はＰ

表 3　歯周疾患の臨床指標の因子分析における固有値と変動率

因子	固有値	変動率	累積変動率
1	2.67	44.6	44.6
2	1.02	17.0	61.6
3	.77	12.8	74.4
4	.67	11.2	85.6
5	.47	7.9	93.5
6	.39	6.5	100.0

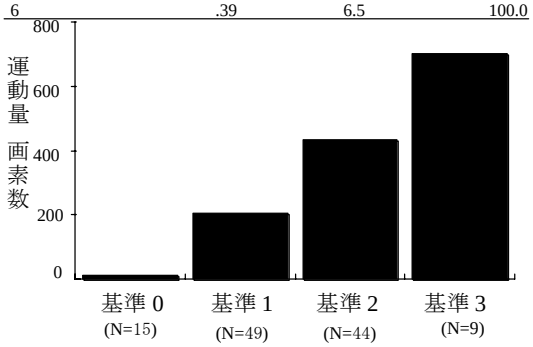

図 7　歯肉縁下細菌叢運動量と歯周状態との関係

基準０：ＰＰＤが 3mm以下，ＧＩとＰＩがどちらも 0，ＢＯＰとＰＵＳがどちらも 0，基準１：基準０と３に含まれない部位について，ＰＰＤが 3mm以下，基準２：基準０と３に含まれない部位について，ＰＰＤが４mm以上，基準３：ＰＰＤが 4mm以上，ＧＩとＰＩのどちらかが 2，ＢＯＰとＰＵＳがどちらも 0.5 あるいは１

ｌＩと運動量がプラス 0.5 以上の値を示し，ＧＩ，ＰＵＳ，ＰＰＤ，ＢＯＰはマイナスの低い値を示した。運動量は因子１，因子２，因子３すべての因子負荷量がプラスの値を示し，他の変数とは独立した位置にプロットされた。

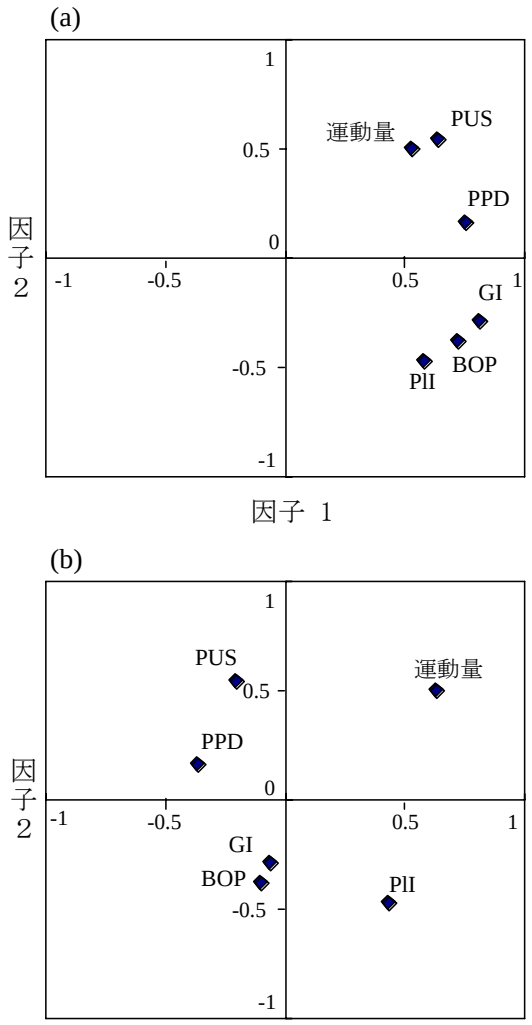

図８　歯周疾患の臨床指標に対する因子分析

３因子の因子負荷量で各因子をプロットした。a)は第１因子と第２因子でプロットした部分を示し，b)は第２因子と第３因子でプロットした部分を示した。歯周ポケットの深さ（ＰＰＤ），歯肉の炎症程度（ＧＩ），プラークの付着状態（Ｐｌ Ｉ），プロービング時の歯肉出血の有無（ＢＯＰ），排膿の有無（ＰＵＳ）

考　察

細菌の運動性を数量化する試みは，現在までほとんど行われていない。数少ない研究[24)-28)]のなかで，Pietrantonio[27)]らは，スピロヘータや運動性桿菌を顕微鏡で観察し，ビデオテープレコーダーなどを利用して，各細菌の単位時間あたりの軌跡を記録することにより，その速度を測定している。その結果，細菌の種類によって，また同種の細菌であっても株によって，速度に差が認められたという。本研究では，歯周ポケット内の細菌叢の動画像を画像解析し，その運動量を画素数で表し，歯周疾患の臨床指標として評価することを目的とした。本研究では，まず，細菌叢の運動量を測定するために，位相差顕微鏡の画像を利用した歯肉縁下細菌叢の半自動画像解析システム開発を試みた。画像解析の主なステップは，連続した２画面間で減算を行い，静止物体を消去し，運動物体のみを抽出するという操作であり，異なる２時点のデジタル X 線画像間で減算処理を行うことにより，歯槽骨の吸収を定量化する原理[2)]を応用した。減算処理後に残った物体の画素の総計を運動量としたが，その処理を行うにあたって，位相差顕微鏡像の背景の輝度レベルと減算処理後のノイズについて考慮しなければならない。これらは運動性細菌の運動量を画素数で表す際に，その精度に影響を与える因子である。輝度レベルについて最初に試みた方法は，画像全体の輝度の平均値を細菌の輝度値から減じる方法である。この方法は，処理を短時間で行うことができ，また複雑な操作を必要としないという利点があった。ところが，この方法は，背景の輝度レベルが一定である運動性細菌の標準株（*P. aeruginoza*）のサンプル画像には有効であったが，背景の輝度レベルにムラがある臨床サンプルの画像では使用できなかった。その理由は，臨床サンプルの画像は，細菌の輝度値と背景の輝度値の差が大きく，減算を行っても運動性細菌の運動を表す物体が残らなかったり，

残った物体が実際の運動よりも大きくなったりしたためである。次に，本研究で使用した画像解析ソフトウェアである NIH-Image に付属のフィルターを使ったもので試みた。連続する２画像間で減算を行い，運動物体を抽出した後，その画像にフィルターを作用させノイズを消去した。最初に用いた方法よりも正確に運動物体を抽出することができたが，スピロヘータのように菌体の幅が狭い（約 0.1μm）ものは断片化され，復元処理が困難であった。本研究で使用した方法では，まず，減算前に１秒間隔で取り込んだ２画像より背景を差し引く処理を行い，背景の輝度ムラを除去した。次いで，１秒の間に，画面上に現れる運動性細菌と画面上から消える運動性細菌の両者の運動を抽出するために，ある画像からもう一方の画像を減じる処理を交互に行った。この方法を使用することで，運動物体がより明瞭に抽出することができ，背景の輝度ムラが多く，ノイズが現れやすい臨床サンプルの運動量を測定することができるようになった。しかし，本研究で用いたシステムでは，細菌が３次元的に移動し顕微鏡の焦点からずれてしまった場合は，細菌の輪郭がぼやけたり，消えてしまうため，運動物体として正確に抽出することができない。また，臨床サンプルの中で 0 画素を示した画像のいくつかに認められた小型で高速（約 30μm/sec 以上）の細菌の運動を捕えることができなかった。これらの問題については，主に顕微鏡の性能に依存しており，今後，レーザー顕微鏡やハイビジョン顕微鏡などの使用も検討課題と考えられる。

運動量を歯周疾患の臨床指標として用いるためには，多数の臨床サンプルを速く正確に測定できるようにシステムを改良する必要があった。手動処理による測定は，多大な時間と労力を要し，また，同様の作業を繰り返すため，操作ミスも生じ易い。そこで，画像処理を自動的に行うマクロスクリプトを開発し，画像の補正，画像の演算，運動量の算出という一連の過程を自動化した。これにより，測定誤差は 5.6%から 2.3%に減少し，平均測定時間は 7 分 15 秒から 2 分 30 秒となった。位相差顕微鏡画像をコンピュータに取り込んだ後のステップは自動化することができたが，ビデオ画像から，連続した静止画像を１秒間隔で取り込むステップの自動化は，画像を取り込む速度にコンピュータの処理能力が追いつかず成功しなかった。本研究で使用したハードウェアの限界であった。

歯肉縁下細菌叢の運動量は，歯周ポケット内の運動性細菌の数と速度で決定されると考えられる。そこで，培養菌株を用いて，本システムで測定される運動量と，それらの数または速度との関連性について調べた。予備実験では，*P. aerginosa*, *Campyrobacter rectus* と *Treponema denticola* を用いたが，*P. aerginosa* が *C. rectus* や *T. denticola* よりも幅広い速度を示したことから，*P. aerginosa* を標準株として実験に供した。本システムで算出された画素数と *P. aerginosa* の菌数との関係を調べたところ，運動性細菌の数が増加するにともなって画素数も増加し，高い正の相関性を示した。また，ホルマリン処理した非運動性細菌は数が増加しても，画素数にはほとんど変化がなかった（図３）。一方，画素数と運動性細菌の速度の和との関係を調べたところ，同様に正の相関性を示した（図４）。これらのことより，本システムで算出される画素数は，細菌叢の運動量を定量的に示す指標となると考えられる。

臨床において歯肉縁下プラークをサンプリングし，運動量を測定する際には，以下に述べるごとく，操作条件により様々な影響を受ける。サンプリングの順序として，まず歯肉縁下プラークを採取した後，ＰＰＤ，ＢＯＰ，ＰＵＳの診査を行った。これは，プロービング操作が歯肉縁下細菌叢

に影響を及ぼすことを避けるためである。歯肉縁下プラークを採取する際に出血した部位はサンプルから除いた。また，ＧＩとＰｌＩは探針や圧迫による歯肉縁下細菌叢への影響を避けるために，Löe と Silness のＧＩ[22]と Silness と Löe のＰｌＩ[23]を参考に，視診のみで行うことができるよう基準を変えて用いた。また，本研究では，根分岐部用キュレットを匙状に改造したものを用いた。これは歯肉の損傷を少なくするためと，これを用いて１回で採取できる量を，細菌叢の１サンプルとするためである。なぜなら，運動性細菌の数は，サンプリングの量に依存すると考えられるため，運動量を定量するためには，まず，サンプリング時に一定量の細菌叢を採取しなければならないからである。そこで，粉末試料を用いた予備実験を行い，このキュレットを用いた採取量が一定であることを確認した。一般に，歯肉縁下プラークのサンプリング時によく使用される器具はスケーラー（キュレット）とペーパーポイントである。Kiel ら[29]は，ペーパーポイントを用いた方法では，歯周ポケット内の 7～41％しか採取できないのに対し，キュレットを用いた方法では 61％～91％採取できると報告している。Moore ら[30]の報告によると，キュレットはペーパーポイントに比べて２倍の細菌が採取できるが，ポケットへの侵襲が大きいことが示されている。今回の歯肉縁下プラークサンプルは，培養を行わず，サンプリング後，即座に直接観察するため，鏡検に必要な細菌の十分な量が得られるキュレットを用いた。同一術者が同一の器具を用いて採取し，プラークサンプル量にばらつきが出ないよう配慮した。また，サンプルを攪拌する方法は，Salavador ら[31]が超音波法ではスピロヘータを破壊する恐れがあると報告しているため，本研究ではボルテックスミキサーを選択した。また，顕微鏡視野は，１サンプルあたり無作為に５視野を選択し，５視野の画像の運動量には有意に差がないことを確認してから１画像を選び，画像の選択に偏りが出ないようにした。今後，視野の選択については，オートステージを使用すれば，更に無作為性を高めることができるかもしれない。

従来用いられている歯周疾患の臨床指標と，本研究で測定した運動量との関連性を調べたところ，各臨床指標（ＰＰＤ，ＧＩ，ＰｌＩ，ＢＯＰ，ＰＵＳ）と運動量との間には弱い正の相関関係がみられた。また，それらの値が高い群の方が低い群よりも，有意に高い運動量を示した。これらの結果は，ＰＰＤとスピロヘータや運動性細菌の数との間に正の相関性があるという報告[13),14),32)-34)]や，ＢＯＰとスピロヘータや運動性細菌の数との間に正の相関性があるという報告とも一致する[13),35),36)]。さらに，運動量以外の臨床指標を用いて，歯周状態を総合的に評価した各部位で運動量を比較したところ，歯周組織の炎症が進んでいると考えられる部位のほうが進んでいないと考えられる部位よりも，有意に高い運動量を示した（図７）。この結果は，歯周状態が健康な部位よりも歯周の炎症が存在する部位に，運動性細菌である *C. rectus* やスピロヘータが多く検出されるという Riviere らの報告[17]と一致する。

以上の結果より，歯肉縁下細菌叢の運動量が歯周疾患の状態をある程度表していると考えられるが，従来用いられている臨床指標とは，相関係数 0.4 以下であり，強い関連性がみられなかった。

そこで，本研究では因子分析を用いて，運動量が他の臨床指標とは異なった因子を測定しているかどうかを調べた。因子分析とは，多くの変数をいくつかの因子に分類し，その因子に基づき，変数間の構造を解析する方法である。共通した因子をもつと考えられる変数間では，別の因子をもつ変数間よりも高い相関性がある[37]。因子分析の中で計算される固有値は変数の全変動の大きさを示

し，抽出因子の数を決定する根拠となる。本研究では，scree test[38] を用いて，抽出因子数を決定した。scree test は，固有値をプロットし，平坦になる点を因子の打ち切り点とする方法である。本研究では，抽出因子数を３因子とすると，変数の変動の約 75%が説明可能となり，最終的に抽出因子数を３と決定した。

Niederman ら[39] は，歯肉縁下温度を含めた臨床指標（歯周ポケットの深さ，プロ-ビング時の歯肉出血，アタッチメントロス）について因子分析を行い，歯肉縁下温度が独立した変数であることを示した。本研究でも，表１に示したように，臨床指標との相関性は低く，運動量が独立した変数である可能性が示唆されたが，因子分析によっても，このことが確認された。すなわち，因子１ではすべての変数が因子負加量＋0.5 以上の値であることから，因子１は歯周状態を総合的に示す因子と解釈された。また，因子２はＰＵＳと運動量が＋0.5 以上の値であり，ＰｌＩ，ＢＯＰとＧＩがーの値を示していることから，因子２は炎症部位およびプラーク付着部位の深さに関連する因子と解釈された。そして，因子３では運動量とＰｌＩが＋0.5以上の値を示していることから，因子３はプラークに関連する因子と解釈された。そして，これらの３つの因子において，因子負荷量が全てプラスの値を示したのは，本研究で測定した歯周疾患の臨床指標の中では運動量のみであった。以上の結果より，運動量は臨床的な歯周状態に関連しているが，他の臨床指標とは異なった要素を測定していることが示唆された。

歯肉縁下プラークの位相差顕微鏡画像は，患者への動機づけを目的として使用される場合が多いが，画像のもつ運動性を数値化することで，動機づけの効果は，さらに高められることが期待できる。画素数で表わされた運動量は，検査者が肉眼で判定した運動性ともよく一致していた。このことは，検査者の顕微鏡観察の経験の有無や，歯肉縁下細菌叢に関する知識の多少にあまり関係しないと考えられた。このことより，本システムで運動量を測定することにより，経験や知識に左右されない診断決定が可能になると思われる。つまり，本システムで測定した歯肉縁下細菌叢の運動量から得られる情報は，歯周疾患の病態を区別する客観的指標となる可能性があると考えられる。現在のところ，歯周疾患の活動性を正確に予測できるものはない。今後，本システムで測定される運動量が歯周疾患の活動性を示すかどうかは，継続的に測定された運動量と，長期的予後や短期的予後との関連性についてのさらなる研究が必要であろう。

結　論

ヒト歯肉縁下細菌叢の運動量を歯周疾患の臨床指標として応用するために，まず，運動性細菌の標準株を用いて，その位相差顕微鏡動画像を解析し，運動性細菌の運動量を測定する方法を開発した。次いで，本法を用いて歯肉縁下プラークの運動量を測定し，従来から用いられている歯周疾患の臨床指標との関連性を調べ，以下の結論を得た。

１．画面上の運動性細菌の菌数と，本システムで測定した画素数との間には正の相関がみられたが，ホルマリンで処理した菌ではその関連性はみられなかった。画面上の運動性細菌の速度の和と本システムで測定した画素数との間にも正の相関がみられた。

２．本システムで測定した運動量は，肉眼で主観的に３段階（高，中，低）で判定した運動性ともよく一致していた。

３．歯肉縁下プラークサンプルの運動量の分布は運動量は 0～3605 の範囲にあり，中央値は 7 であ

った。

４．　運動量と本研究で用いた各臨床指標との相関係数は 0.23～0.36 であり，両者の間に弱い正の相関関係が認められた。運動量との相関係数が最も高かったのはＰＰＤであった。

５．　PPD，GI，PlI ，BOP，PUS においては，それらの値が高い群の方が低い群よりも，有意に高い運動量を示した。

６．　対象部位を臨床指標によって４基準に分類し，各群の平均運動量を比較した結果，基準 0 が 11.1 画素，基準 1 は 205.3 画素，基準 3 が 435.2 画素，基準 4 が 701.6 画素であり，４基準間での運動量に有意の差が認められた。

７．　本研究で測定した運動量を含む臨床指標について，因子分析を行ったところ，運動量は因子１，因子２，因子３すべての因子負荷量がプラスの値を示し，他の変数とは独立した位置にプロットされた。

以上の結果から，画像解析を用いてヒト歯肉縁下細菌叢の運動量を画素数として定量的に評価できることが明らかにされ，さらに，歯肉縁下細菌叢の運動量は，従来から用いられている歯周疾患の臨床指標と同様に，歯周組織の臨床状態をある程度を表わしてはいるものの，本研究で調べた他の臨床指標とは異なる要素を測定していることが示された。従って，本法で測定される運動量は，他の臨床指標では得られない，新たな歯周状態の情報を提供する可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるに臨み，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった大阪大学歯学部予防歯科学講座雫石　聰教授ならびに大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部玉川裕夫助教授に深甚なる謝意を表します。また実験に御協力いただきました予防歯科学講座の諸先生方に謝意を表します。

文献

1) Persson, G. R. & Page, R.C. (1992) Diagnostic characteristics of crevicular fluid aspartate aminotransferase (AST) levels associated with periodontal disease activity. Journal of Clinical Periodontology　19, 43-48.

2) Jeffcoat, M.K. (1992) Radiographic methods for the detection of progressive alveolar bone loss. Journal of Periodontology　63, 367-372.

3) Fedi, P.F., Jr & Killoy, W.J. (1992) Temperature differences at periodontal sites in health and disease. Journal of Periodontology　63, 24-27.

4) Johnson, N.W. (1991) Crevicular fluid-based diagnostic tests. Current Opinion in Dentistry 1, 52-65.

5) Listgarten, M.A (1992) Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. Journal of Periodontology 63, 332-337.

6) Dahlen, G. (1993) Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. Advances Dental Research　7, 163-174.

7) Mombelli, A. (1996) Microbiological monitoring. Jounal of Clinical Periodontology 23, 251-257.

8) Dzink, J.L., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1988) The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions destructive periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology　15, 316-323.

9) Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. Journal of Periodontology　63, 322-331.

10) Löe, H., Theilade, E. & Jensen S.B. (1965) Experimental gingivitis in man. Journal of Periodontology 36, 177-187.

11) Loesche, W. J. (1988) The role of spirochetes in periodontal disease. Advances in Dental Research 2, 275-283.

12) Moore, W. E. C., Moore, L. H., Ranney, R. R., Smibert, R. M., Burmeister, J. A. & Schenkein, H. A. (1991) The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. Journal of Clinical Periodontology 18, 729-739.

13) Omar, A. A., Newman, H. N., Bulman, J. & Osborn, J. (1991) Associations between subgingival plaque bacterial morphotypes and clinical indices. Journal of Clinical Periodontology 18, 555-566.

14) Lembariti, B. S., Mikx, F. H. M. & van Palenstein Helderman, W. H. (1995) Microscopic spirochete counts in untreated subjects with and without periodontal tissue destruction. Journal of Clinical Periodontology 22, 235-239.

15) Listgarten, M.A. & Helldén, L. (1978) Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. Journal of Clinical Periodontology 5, 115-132.

16) Mousquès, T., Listgarten, M.A. & Phillips, R.W. (1980) Effect of scaling and root planing on the composition of the human subgingival microbial flora. Journal of Periodontal Research 15, 144-151.

17) Riviere, G.R., Weisz, K.S., Adams, D.F. & Denee Thomas, D. (1991) Pathogen-related oral spirochetes from dental plaque are invasive. Infection and Immunity 59, 3377-3380.

18) Carranza, F. A., Jr, Saglie, R., Newman, M. G. & Valentin, P.L. (1983) Scanning and transmission electron microscopic study of tissue-invading microorganisms in localized juvenile periodontitis. Journal of Periodontology 54, 598-617.

19) Manor, A., Lebendiger, M., Shiffer, A. & Tovel, H. (1984) Bacterial invasion of periodontal tissues in advanced periodontitis in humans. Journal of Periodontology 55, 567-573.

20) Papapanou, P. N., Sellen, A., Wennstrom, J. L. & Dahlen G. (1993) An analysis of the subgingival microflora in randomly selected subjects. Oral Microbiology and Immunology 8, 24-29.

21) Gatlin, C. L., Schaberg, E. S., Jordan, W. M., Kuyatt, B. L. & Smith, W. C. (1993) Point counting on the Macintosh. Analytical and Quantitative Cytology and Histology 15,345-50.

22) Löe, H. & Silness, J. (1963) Periodontal disease in pregnancy. I Prevalence and severity. Acta Odontlogica Scandinavica 21, 533-551.

23) Silness, J. & Löe, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontlogica Scandinavica 22, 121-135.

24) Vaituziz, A. & Doetsche, R.N. (1969) Motility tracks : techniques for quantitative study of bacterial movement. Applied Microbiology 17, 584-588.

25) Schneider, W.R. & Doetsch, R.N. (1974) Effect of viscosity on bacterial motility. Journal of Bacteriology 117, 696-701.

26) Greenberg, E.P. & Canale-Parola, E. (1977) Relationhip between cell coiling and motility of spirochetes in viscous environments. Journal of Bacteriology 131, 960-969.

27) Pietrantonio, F., Noble, P.B., Amsel, R. & Chan, E.C.S (1988) Locomotory characteristics of Treponema denticola. Canadian Journal of Microbiology 34, 748-752

28) Klitorinos, A., Noble, P., Siboo, R. & Chan, E.C.S. (1993)Viscosity-dependent locomotion of spirochetes. Oral Microbiology and Immunology 8, 242-244.

29) Kiel, R.A. & Robertson P.B. (1983) Effect of subgingibal sampling techniques on periodontal

microbiorogicak culturing. Journal of Dental Research 62, 247 (Abstract).

30） Moore, W.E.C., Holdeman, L.V., Cato, E.P., Smibert, R.M., Burmeister, J.A., Palcanis, K.G. & Ranney, R.R. (1985) Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. Infection and Immunity 48, 507-519.

31）Salavador S.L., Symed, S. A. & Loesche W.J. (1987) Comparison of three dispersion procedures for quantitative recovery of cultivable species of subgingival spirochetes. Journal of Clinical Microbiology 25, 2230-2232.

32）Armitage, G.C., Dickinson, W.R., Jenderseck, R.S., Levine, S.M. & Chambers, D.W. (1982) Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. Journal of Periodontology 53, 550-556.

33) Savitt, E.D. & Socransky, S.S. (1984) Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. Journal of Periodontal Research 19, 111-123.

34) Listgarten, M.A. & Levin, S. (1981) Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration. Journal of Clinical Periodontology 8, 122-138.

35) Baab, D.A. & Opsvig, E.J. (1986) Subgingival microflora in bleeding and nonbleeding pockets. Journal of Clinical Periodontology 13, 795-798.

36）MacPhee, I.T. & Muir, K.F. (1986) Dark ground microscopy in relation to 3 clinical parameters of chronic inflammatory periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology 13, 900-904.

37）Dawson - Saunders, B. & Trapp, R. G. (1994) Basic & Clinical Biostatistics. 2nd edition, 227-228. Norwalk, CT : Appleton & Lange.

38）Cattel, R. B. (1966) The scree test for the number of factors. Multivariate Behavioral Research 1, 245.

39 ） Niederman, R., Naleway, C., Lu, B.-Y., Buyle-Bodin, Y. & Robinson, P. (1995) Subgingival temperature as a gingival inflammatory indicator. Journal of Clinical Periodontology 22, 804-809.