

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

乙 第578号	論文提出者 西 永 英 司
論文題目 唾液による総合的な口腔検査法の開発－多項目唾液 検査システム（AL-55）の有用性について－	

I. 緒言

近年歯科医療においては、疾患の早期発見・早期治療だけでなく、治療の一環としての積極的な予防も重要と考えられ、定期検診やメンテナンスを中心とした患者教育・管理型の医療への転換が求められている¹⁾。しかし、このような患者管理型の医療の実践においては、患者の健康情報や疾患リスクを正確に把握しなければならない。

簡便かつ非侵襲的に採取可能な唾液は、近年、様々な疾患の検査試料として注目されており²⁾、³⁾、従来の口腔内検査に唾液検査による客観性を加えることで、患者の診察や健康維持への理解の向上、さらに疾患のリスク予見を含めた診断が可能になることが期待されている。唾液には、口腔内の疾患状況を反映する様々な成分が含まれ、う蝕や歯周病等の発症や進行に伴ってそれらが量的あるいは質的に変化することから、唾液中の様々なバイオマーカーが研究され⁴⁻⁷⁾、それを用いる検査法が開発されてきた⁸⁻¹⁸⁾。しかしながら、これらの検査法は、いずれも単項目の検査であり、また各々の操作が煩雑で、さらに結果を得るまでに長時間を必要とするため、これらを日常的に採用することは難しい。

そこで、著者らは唾液による総合的な口腔検査法のチェアサイドへの応用を目指し、う蝕、歯周病、口腔の清潔程度（以下、口腔清潔度とする）に関与すると考えられる7項目の唾液因子を5分間で測定できる多項目唾液検査システムを開発した。この多項目唾液検査システム（以下、AL-55とする）は、試験紙と測定機器から構成され、7項目の試験片（[う蝕関連] う蝕原性菌、pH、酸緩衝能、[歯周病関連] 潜血、白血球、タンパク質、[口腔清潔度関連] アンモニア）を貼付した1本のストリップ状試験紙に試料を点着し、その色調変化を測定機器により反射率として検出する。

AL-55の7項目の試験片の組成は、以下の通りである。う蝕原性菌は、市販のう蝕検査キットであるRDテスト「昭和」（昭和薬品化工）⁸⁻¹¹⁾と類似した組成であり、残る6項目は、市販の尿検査試験紙であるオーションスティックス¹⁹⁾および血液検査試験紙であるアミチェック（アークレイ）^{20, 21)}と類似した組成である。

AL-55の測定機器は、市販の多項目尿化学分析装置であるポケットケムUA PU-4010（アークレイ）²²⁾と同様の測定機構を装備する。すなわち、試験片の色調を反射光度法にて測定し、反射率を算出する機構である。測定波長は、個別LEDより照射される565、635および760nmの特定波長光である。

このように一般臨床において広く用いられている尿や血液検査の試験紙の反応原理および測定機構を、唾液（洗口吐出液）を試料とする検査に応用することによって多項目唾液検査システムAL-55は開発された。

AL-55の最大の特徴は、7項目の唾液因子について、試験紙の色調変化を反射率として一括して検出する多項目検査という点にあるが、う蝕、歯周病、口腔清潔度に関する臨床検査としては、一般的には、視診、歯周ポケットのプロービングなどの口腔内の検査が用いられている。また、AL-55の7項目の唾液因子においては、従来より培養法²³⁾、電極法²⁴⁾、酵素法^{25, 26)}などの一般的な分析法が確立されている。

今回、従来にない多項目一括短時間検査であるAL-55の臨床応用に際し、以下に示した2つの目的を以て、その有用性の検証を試みた。

〔目的 1〕 う蝕、歯周病、口腔清潔度に関する一般的な口腔内の検査結果と、AL-55による 7

項目の唾液因子の測定結果との相関を解析し、AL-55による検査が、う蝕、歯周病、口腔清潔度などの口腔内状態の把握に有用なものであるかについて検討を行った。

〔目的2〕7項目の唾液因子に関する従来の分析法による個々の測定結果と、多項目検査であるAL-55による測定結果を比較することにより、従来の分析法に対するAL-55の測定値の妥当性および信頼性について検討した。

II. 材料および方法

1. 倫理規定

本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認を得て行った（承認番号：236）。

2. 研究協力者（対象者）

インターネットを用いた集団募集、および愛知学院大学歯学部附属病院の通院中患者を対象とした院内募集を実施した。これらによって本研究の趣意に賛同し、参加を申し出た協力者に対し、本研究の目的、意義などについて十分に説明を行った。その上で、書面による同意を得られた計277名の協力者の中から、除外基準に該当する者（1ヶ月以内に抗菌薬を使用した者、薬剤の服用による唾液分泌阻害の可能性のある者、口内炎等の口腔粘膜の異常が認められる者など）を除いた231名を最終的に本研究の対象者とした。

3. 検査および測定の手順

研究協力者に対し、検査開始2時間以上前から飲食および口腔清掃を行わないように予め要請し、検査直前にはこれらを再度確認し、試料を採取した。その後、口腔内の検査を実施するとともに、得られた試料についてAL-55および従来の分析法による測定を行った。以下に、その詳細な手順を示す。

1) 試料の採取

AL-55および従来の分析法による測定に供した試料は、蒸留水3mlを口に含み、10秒間軽く洗口した後の吐出液（以下、洗口吐出液とする）とした。これらは、視診、歯周ポケットのプロービングなどの口腔内の検査に先立って採取した。

2) AL-55による測定

試験紙に貼付された7項目の試験片に、採取直後の洗口吐出液を10 μ lずつ滴下したのち、AL-55の測定機器の試験紙ホルダーにセットした。1分および5分後に試験紙ホルダーがスライドすることで各試験片の呈色変化を反射率（%）として測定した。う蝕原性菌については、1分後と5分後の反射率の変化量（ Δ 反射率）を、その他の6項目については1分後の反射率を測定結果とした。

3) 〔目的1〕口腔内の検査

洗口吐出液の採取後、う蝕、歯周病の病態に関して、DMFT²⁷⁾、プロービングポケットデプス（PPD）²⁸⁾、プロービング時の出血（BOP）²⁹⁾、歯肉炎指数（GI）³⁰⁾、Community periodontal index（CPI）³¹⁾を評価した。PPDについては、1歯につき6点（近心頬側、頬側中央、遠心頬側、近心舌側、舌側中央、遠心舌側）を測定、各歯の最大値を記録し、全歯の平均値を算出した。BOPについては、プロービング時の出血を記録し、全プロービング歯面数に対する割合（%）を算出した。GIについては、代表6歯（#12, #16, #24, #34, #42, #46）において、4点（頬側、舌側、

近心、遠心) のスコアを記録し、その平均値を算出した。CPI については、各 sextant における最大値を代表値とし、その平均値を算出した。これらの検査には、ペリオプローブ WHO (CPITN-C, YMD) を用いた。

口腔内の検査にあたっては、事前に 17 名の歯科医師に対して実施内容を詳細に説明したのち、キャリブレーションを実施し、検査者間の測定誤差が可能な限り生じないようにした。集団募集した対象者の口腔内検査については、2 名の歯科医師が DMFT および GI を評価し、別の 2 名の歯科医師が PPD、BOP、および CPI を各々評価した。また、院内募集した対象者の口腔内検査については、各々の担当医である 17 名の歯科医師が各検査項目を評価した。

口腔清潔度については、洗口吐出液中の総菌数を測定し、これを以て評価した。すなわち、洗口吐出液を蒸留水で 104~105 倍に希釈した試料を血液寒天培地に播種し、37°C 恒温槽中において 7 日間嫌気培養を行った。培養後、培地に形成されたコロニー数から総菌数 (CFU/ml) を算出した。なお、血液寒天培地の組成は以下の通りである。Todd Hewitt broth 30 g/l (Difco, USA)、Hemin (Wako) 5 mg/l、Menadione 1 mg/l (Wako)、Agar 15 g/l (Wako)、ウマ脱線維血液 50 g/l (日本生物材料センター)。

4) [目的 2] 従来の分析法による測定

(1) う蝕原性菌

採取直後の洗口吐出液を蒸留水で 102~104 倍に希釈し、Mitis Salivarius Bacitracin (MSB) 平板培地 (23) に播種した後、37°C 恒温槽中において 3 日間嫌気培養を行った。培養後、培地に形成されたコロニー数からう蝕原性菌数 (CFU/ml) を算出した。なお、MSB 平板培地の組成は以下の通りである。Mitis Salivarius Agar 90g/l (Difco, USA)、Bacitracin (Sigma-Aldrich) 200U/l、Sucrose 50g/l (和光純薬工業)。

(2) pH

採取直後の洗口吐出液 250 μ l を、ハンディ型 pH メータであるチェックバフ (堀場製作所) ²⁴⁾ のセンサ上にのせ、pH 値を測定した。

(3) 酸緩衝能

pH を測定後、チェックバフセンサ上の試料に 0.01N 塩酸 70 μ l を添加し、混合後の pH 値を測定した。

(4) 潜血

採取直後の試料 100 μ l に OC 検体希釈液 (栄研化学) 400 μ l を添加し、-80°C で凍結保存したものを室温にて緩徐融解後、ラテックス免疫凝集比濁法 (LZ テスト '栄研' HbA0, 栄研化学) 32) にて測定した。測定機器は Bio Majesty JCA-BM-6010 (日本電子) を用いた。

(5) 白血球

採取直後の洗口吐出液を -80°C で凍結保存したものを室温にて緩徐融解後、ラテックス免疫凝集比濁法 (イノテック・エラスターゼ, シマ研究所) 33) にて測定した。測定機器は Bio Majesty JCA-BM-6010 (日本電子) を用いた。

(6) タンパク質

採取直後の洗口吐出液を -80°C で凍結保存したものを室温にて緩徐融解後、ピロガロールレッド法 (マイクロ TP-AR, 和光純薬工業) 34) にて測定した。測定機器は Bio Majesty JCA-BM-6010 (日本電子) を用いた。

(7) アンモニア

採取直後の洗口吐出液を -80°C で凍結保存したものを室温にて緩徐融解後、グルタミン酸脱水素酵素を用いた酵素法 (N-テスト L NH₃ ニットーボー, ニットーボーメディカル) 35)にて測定した。測定機器は Bio Majesty JCA-BM-6010 (日本電子) を用いた。

4. 評価方法

以下の評価における統計学的解析には、JMP 5. 0 ソフトウェア (SAS Institute Japan) を用いた。

1) [目的 1] 口腔内の検査結果と AL-55 による測定結果の比較

(1) 口腔内の検査結果と AL-55 による測定結果の相関解析

口腔内の検査結果 (DMFT, PPD, BOP, GI, CPI, 総菌数) と AL-55 による 7 項目の唾液因子の測定結果の相関について、Spearman の相関係数検定を用いて各々検討し、有意水準を $\alpha=0.01$ とした。

(2) 口腔内の検査結果から対象者を 3 段階に層別した際の AL-55 による測定結果の群間比較

口腔内の検査結果から、う蝕、歯周病、口腔清潔度の状態により対象者を軽度・中等度・重度の 3 群に層別した。3 層別の基準は以下の通りに定義した。う蝕については、WHO (世界保健機関) の統計分類 36) に基づき DMFT が 8 本以下を軽度群、9~13 本を中等度群、14 本以上を重度群とした。歯周病については、PPD (全歯の平均値) が 2. 5mm 未満を軽度群、2. 5 mm 以上 3. 5 mm 未満を中等度群、3. 5 mm 以上を重度群とした。口腔清潔度については、総菌数が 107 CFU/ml 未満を軽度群、107 CFU /ml 以上 108 CFU /ml 未満を中等度群、108 CFU /ml 以上を重度群とした。

これら対象者を軽度・中等度・重度に 3 層別した際の、各群における AL-55 による測定結果を、Tukey の多重比較検定を用いて群間比較し、有意水準を $\alpha=0.05$ とした。

2) [目的 2] 従来の分析法と AL-55 による測定結果の比較

(1) 従来の分析法と AL-55 による測定結果の相関解析

7 項目の唾液因子に関する従来の分析法と AL-55 による測定結果との相関について、Pearson の相関係数検定を用いて各々検討し、有意水準を $\alpha=0.01$ とした。

(2) 従来の分析法と AL-55 の測定結果を 3 段階に層別した際の一致率検討

7 項目の唾液因子各々について、従来の分析法による測定結果の分布範囲 (最小値~最大値) を 3 等分し、Low、Middle、High の 3 段階に層別した。また、AL-55 のチェアサイドへの応用における患者の検査結果の理解しやすさを考慮し、本研究では、AL-55 による測定結果 (反射率) についても Low、Middle、High の 3 段階に層別する閾値を設定し、両者の層別結果の一致率を検討した。

III. 結果

1. 対象者の属性

対象者 231 名の属性 (年齢、性別、喫煙の有無) を示す。対象者の年齢は $40. 3 \pm 12. 8$ 歳、性別は男性が 93 名、女性が 138 名であり、喫煙者は 20 名、非喫煙者は 211 名であった。

2. 口腔内の検査結果ならびに従来の分析法およびAL-55による測定結果

口腔内の検査結果ならびに従来の分析法およびAL-55による測定結果を示す。

本研究の対象者231名の口腔内の検査結果は、DMFTが 12.7 ± 6.8 、PPD（全歯の平均）が 2.9 ± 0.6 mm、BOPが 45.7 ± 30.5 %、GIが 1.5 ± 0.4 、CPIが 1.6 ± 0.9 、総菌数が 7.6 ± 0.5 log CFU/mlであった。

従来の分析法による測定結果は、う蝕原性菌が 6.8 ± 0.5 log CFU/ml、pHが 6.68 ± 0.23 、酸緩衝能が 3.98 ± 0.81 、潜血が 0.11 ± 0.47 mg/dl、白血球が 43.4 ± 87.2 U/l、総タンパク質が 18.3 ± 11.1 mg/dl、アンモニアが 2.96 ± 1.80 mg/dlであった。なお、従来の分析法による測定結果のうち、ゼロおよびマイナスの値として検出されたものが、う蝕原性菌で1例、潜血で7例、白血球で3例あったが、これらは、解析対象から除外した。

AL-55による測定結果（反射率）は、う蝕原性菌が 2.5 ± 1.0 %、pHが 33.8 ± 6.8 %、酸緩衝能が 67.7 ± 10.9 %、潜血が 29.8 ± 15.4 %、白血球が 49.2 ± 15.1 %、タンパク質が 74.2 ± 7.7 %、アンモニアが 11.4 ± 6.6 %であった。

3. 口腔内の検査結果とAL-55による測定結果の関連性

1) 口腔内の検査結果とAL-55による測定結果の相関解析

口腔内の検査結果とAL-55による7項目の唾液因子の測定結果の関連性を示す。

う蝕関連の口腔内の検査項目であるDMFTは、AL-55によるう蝕原性菌の測定結果（反射率）との間に相関が認められたが（ $p < 0.01$ ）、pH、酸緩衝能の測定結果との間に相関は認められなかった。歯周病関連の口腔内の検査項目であるPPD、BOP、GI、CPIは、AL-55による潜血、白血球、蛋白質の測定結果との間に相関が認められた（ $p < 0.01$ ）。口腔清潔度に関しては、総菌数とアンモニアの測定結果との間に相関が認められた（ $p < 0.01$ ）。

2) 口腔内の検査結果から対象者を3段階に層別した際のAL-55による測定結果の群間比較

口腔内の検査結果から、う蝕、歯周病、口腔清潔度の状態により対象者を3群に層別し、AL-55による測定結果を比較した結果を示す。

う蝕に関しては、対象者のDMFTを3群に層別し、AL-55による測定結果を比較した結果、う蝕原性菌の測定結果は、軽度群と重度群の間に有意な差を示したが、pH、酸緩衝能の測定結果は、3群間に有意な差はなかった。歯周病に関しては、PPDを基にした軽度群・中等度群・重度群のそれぞれの間において、AL-55による潜血の測定結果が有意な差を示すとともに、白血球、蛋白質は、軽度群と重度群、および中等度群と重度群の間に有意な差を示した。口腔清潔度に関しては、総菌数を基にした3群間において、アンモニアが有意な差を示した。なお、AL-55の測定項目のうち、潜血、白血球、蛋白質、アンモニアは、測定原理上、各成分が多いほど、試験片の反射率が低く検出される。

4. 従来の分析法とAL-55による測定結果の関連性

1) 従来の分析法とAL-55による測定結果の相関解析

従来の分析法とAL-55による7項目の唾液因子のPearsonの相関係数 r および p 値を示す。なお、従来法による測定結果のうち、う蝕原性菌、潜血、白血球、アンモニアと、AL-55の測定結果のうち潜血については、測定データを対数変換し、正規分布に近似させたうえで解析を実施し

た。

Pearson の相関係数 r は、う蝕原性菌が 0.59、pH が -0.74、酸緩衝能が -0.86、潜血が -0.74、白血球が -0.67、タンパク質が -0.75、アンモニアが -0.89 (7 項目いずれも $p < 0.01$) で、両者間には中等度～高い相関が認められた。

2) 従来の分析法と AL-55 による測定結果を 3 段階に層別した際の一致率

従来の分析法と AL-55 による測定結果を 3 段階に層別した際の人数分布および一致率を示す。

従来の分析法および AL-55 による測定値を用いた際の Low、Middle、High の 3 段階層別の一致率は、う蝕原性菌が 70%、pH が 82%、酸緩衝能が 73%、潜血が 71%、白血球が 72%、タンパク質が 84%、アンモニアが 90%であった。

IV. 考察

本研究では、著者らが新たに開発した多項目唾液検査システム (AL-55) の臨床応用にあたって、その有用性を検証することを目的に、う蝕、歯周病、口腔清潔度に関する口腔内の検査結果と、AL-55 による測定結果の相関、および従来の分析法と AL-55 による測定結果の相関を解析し、以下の考察を試みた。

1. 測定試料 (3ml 洗口吐出液) について

通常、唾液検査の試料としては、安静時唾液、あるいはパラフィンガム等を嚙んで得られる刺激唾液などが用いられる場合が多いが、AL-55 による測定に用いた試料は、蒸留水 3ml を口に含み、10 秒間軽く洗口した後の吐出液 (洗口吐出液) を用いた。現在、歯周病のための唾液潜血テストキットとして臨床で用いられているペリオスクリーン「サンスター」(サンスター) は、唾液または洗口吐出液を検体とすることができる¹⁶⁾。本研究においても、簡便に採取可能な洗口吐出液を試料とした結果、試料として十分な量が得られ、さらに口腔内で希釈され粘性が比較的良かったため点着操作も容易であった。また、AL-55 の測定結果においても、幅広い反射率が得られた。これらのことから AL-55 の臨床応用にあたり、測定試料として唾液そのものではなく、唾液の希釈された洗口吐出液が十分応用可能であることが明らかとなった。

2. 対象者の口腔内の検査結果の分布の妥当性について

今回の研究では、インターネットを用いた集団募集、および愛知学院大学歯学部附属病院の通院中患者を対象とした院内募集を実施した。集団募集では、外部調査会社である株式会社マクロミルの中京地区のモニター登録者約 6 万人に対し、残存歯数、歯のぐらつき、歯肉からの出血などの口腔内の状況に関する自己評価アンケートを送信し、その回答内容から、口腔内の疾患程度、属性 (年齢、性別等) が均等になるように考慮したうえで対象者の第一次選定を実施した。さらに、名古屋市内の会場において説明会を行い、本研究の趣意を十分に理解できるよう目的、方法、意義、人権保護への配慮等に関する情報を提供し、協力に賛同した 232 名を選定した。また、愛知学院大学歯学部附属病院歯科保存科の通院中患者を対象に、主に重度のう蝕あるいは歯周病の病態を有する 45 名を選定した。これら計 277 名の協力者の中から、除外基準に該当する者を除いた 231 名を最終的に本研究の対象者とした。その結果、本研究の対象者 231 名の口腔内の検査結果の分布は、DMFT が 0～28 本、PPD (全歯の平均) が 1.9～5.3 mm、BOP が 0～100%、GI

が 0.4~2.4、CPI が 0~4.0 の範囲であり、軽度から重度のう蝕および歯周病のリスクや病態を有する幅広い対象者を得ることができたといえる。また、口腔清潔度を示す総菌数についても、106.0~108.8 CFU/ml の範囲であり、幅広い口腔清潔度を示す対象者を得ることができた。

3. 口腔内の検査結果と AL-55 による測定結果の相関について

う蝕、歯周病、口腔清潔度に関する口腔内の検査結果と AL-55 による 7 項目の唾液因子の測定結果の相関を解析することにより、AL-55 による測定が、う蝕、歯周病、口腔清潔度などの口腔内状態の把握に有用なものであるかについて考察した。

1) う蝕に関連する AL-55 の測定項目について

AL-55 によるう蝕原性菌の測定結果（反射率，%）は、DMFT との間に相関を認め ($p < 0.01$)、さらに、対象者の DMFT を軽度・中等度・重度の 3 群に層別し、各群における AL-55 による測定結果を群間比較した結果、軽度群と重度群の間に有意な差を認めた ($p < 0.05$)。また、AL-55 による pH、酸緩衝能の測定結果は、DMFT との相関は認められず、対象者を 3 層別し群間比較した結果においても、3 群間に有意差はなかった。本研究で AL-55 によるう蝕原性菌の測定結果と DMFT との間に相関が認められたことについて、これまでに数多くの研究において、う蝕原性菌が、う蝕発生および進行に関与することが示されている³⁷⁻⁴³⁾。今回の研究においても、これら のことを支持する同様の結果が得られ、AL-55 を用いたう蝕原性菌の測定により、う蝕発生リスクのスクリーニングが可能であることが示唆された。今回用いた AL-55 のう蝕原性菌試験片の反応原理は、*S. mutans* や *Lactobacilli* などを含むグラム陽性菌群によるレサズリンの還元能を測定するものである。過去の研究においても、グラム陽性菌群の還元能と *S. mutans* や *Lactobacilli* などのう蝕原性菌数との関連性が示されていることから⁹⁾、今回の研究においても、う蝕発生リスクである DMFT との相関が認められたと考える。また、DMFT と pH、酸緩衝能との相関が低かったことについて、以下の要因が考えられる。すなわち DMFT は、う蝕経験の累積指数であるため、食生活、口腔清掃などの影響を受けた現在のう蝕発生リスクを示すと考えられる pH、酸緩衝能との間に相関が認められなかったと推測される。しかしながら、pH、酸緩衝能などは、う蝕の発生および進行に深く関与していることは既知の事実であり⁴⁴⁾、これらの測定結果を現在および将来のう蝕発生リスクとして保健指導に用いることで、効果的な予防に繋がると考える。

2) 歯周病に関連する AL-55 の測定項目について

AL-55 による潜血、白血球、蛋白質の測定結果は、いずれも、PPD、BOP、GI、CPI との間に相関を認めた ($p < 0.01$)。さらに対象者を PPD により軽度・中等度・重度に 3 層別し、各群における AL-55 による測定結果を群間比較した結果、潜血の測定結果は、PPD を基にした軽度群・中等度群・重度群のそれぞれの間で有意な差を認め ($p < 0.05$)、白血球、蛋白質は、軽度群と重度群間、および中等度群と重度群間に有意な差を認めた ($p < 0.05$)。本研究では、歯周病の病態診断において特に重要なものとされている歯周組織破壊の検査項目である PPD45) を用いて群間比較したが、BOP、GI、CPI についても、PPD と同様の検討を試みたところ、有意水準に差はあるものの同様の傾向が見られた。

これまでに数多くの研究において、唾液中の潜血^{46, 47)}、白血球^{47, 48)}および蛋白質^{47, 49)}の量と歯周病の病態の相関が示されているが、今回の研究においても、これら のことを支持する同様の

結果が得られ、AL-55 を用いた潜血、白血球、蛋白質の測定により、歯周病態のスクリーニングが可能であることが示唆された。したがって、今後、AL-55 の歯周病スクリーニング検査としての機能に加えて、病態と唾液検査結果の経時変化の比較による AL-55 の経時モニタリング機能の拡充・検証が必要と考える。

3) 口腔清潔度に関連する AL-55 の測定項目について

AL-55 によるアンモニアの測定結果は、総菌数との間に相関を認めた ($p < 0.01$)。さらに対象者を総菌数により軽度・中等度・重度に3層別し、各群における AL-55 による測定結果を群間比較した結果、軽度群・中等度群・重度群のそれぞれの間には有意な差を認めた ($p < 0.05$)。これまでに、石川らの報告において、洗口吐出液中のアンモニア濃度と総菌数の相関性が示されており^{50, 51)}、今回の研究においても、AL-55 を用いたアンモニアの測定により口腔清潔度を把握することが可能であることが示された。アンモニアは、口腔細菌および日和見細菌などの口腔内に生息する多くの微生物が有するウレアーゼ、グルタミナーゼやメチオニナーゼなどの酵素活性により産生するものと考えられており⁵¹⁾、AL-55 によるアンモニアの測定は、口腔清潔度の評価および把握に有用な検査指標になり得ると考えられる。

4. 従来の分析法と AL-55 による測定結果の相関について

1) AL-55 の試験紙の反応原理

AL-55 の試験紙に貼付した試験片の反応系に関与する成分および反応原理は、う蝕に関連する項目のうち、う蝕原性菌はう蝕原性菌数との関連性が認められているグラム陽性菌群によるレサズリンの還元能を、pH は pH 指示薬の呈色変化を、酸緩衝能は一定量の酸存在下の複合 pH 指示薬の呈色変化を検出する。また、歯周病に関連する項目のうち、潜血はヘモグロビンのペルオキシダーゼ活性を、白血球は白血球エステラーゼ活性を、タンパク質は色素結合法による総タンパク質量を検出する。さらに、口腔清潔度に関連する検査項目であるアンモニアは、ブロモクレゾールグリーン (BCG) の発色によりアンモニアを検出する。

2) 従来の分析法と AL-55 による測定結果の相関解析

(1) う蝕原性菌

AL-55 によるう蝕原性菌の測定結果 (∠反射率, %) は、従来より用いられている選択培地を用いた培養法による測定結果との間に中等度の相関を示した ($r = 0.59$, $p < 0.01$)。AL-55 のう蝕原性菌の試験片の反応原理は、う蝕原性菌数との関連性が認められているグラム陽性菌群によるレサズリンの還元能⁹⁾を検出するものであるが、今回の研究において、従来の分析法により測定したう蝕原性菌数との相関を示す結果が得られ、AL-55 によるう蝕原性菌の測定値の妥当性が明らかとなった。

(2) pH

AL-55 による pH の測定結果 (反射率, %) は、従来の分析法である pH 電極を用いた測定結果との間に高い相関を示した ($r = -0.74$, $p < 0.01$)。AL-55 の pH の試験片の反応原理は、pH 指示薬の呈色変化を検出するものであるが、ブロモチモールブルーナトリウムを指示薬として用いることにより、pH 電極法との相関を示す結果が得られ、AL-55 による pH の測定値の妥当性が明らかとなった。

(3) 酸緩衝能

AL-55による酸緩衝能の測定結果（反射率，%）は、従来の分析法であるpH電極を用いた測定結果との間に高い相関を示した（ $r=-0.86$ ， $p<0.01$ ）。AL-55の酸緩衝能の試験片の反応原理は、一定量の酸存在下の複合pH指示薬の呈色変化を検出するものであるが、プロモクレゾールグリーンおよびプロモキシレノールブルーを指示薬として用いることにより、pH電極法との相関を示す結果が得られ、AL-55による酸緩衝能の測定値の妥当性が明らかとなった。

(4) 潜血

AL-55による潜血の測定結果（反射率，%）は、従来の分析法であるラテックス免疫凝集比濁法による測定結果との間に高い相関を示した（ $r=-0.74$ ， $p<0.01$ ）。AL-55の潜血の試験片の反応原理は、ヘモグロビンのペルオキシダーゼ活性を検出するものであるが、尿検査で用いられている試験紙の技術を応用することにより、ラテックス免疫凝集比濁法との相関を示す結果が得られ、AL-55による潜血の測定値の妥当性が明らかとなった。

(5) 白血球

AL-55による白血球の測定結果（反射率，%）は、従来の分析法であるラテックス免疫凝集比濁法による測定結果との間に中等度の相関を示した（ $r=-0.67$ ， $p<0.01$ ）。AL-55の白血球の試験片の反応原理は、白血球エステラーゼ活性を検出するものであるが、尿検査で用いられている試験紙の技術を応用することにより、ラテックス免疫凝集比濁法との相関を示す結果が得られ、AL-55による白血球の測定値の妥当性が明らかとなった。

(6) タンパク質

AL-55によるタンパク質の測定結果（反射率，%）は、従来の分析法であるピロガロールレッド法による測定結果との間に高い相関を示した（ $r=-0.75$ ， $p<0.01$ ）。AL-55のタンパク質の試験片の反応原理は、色素結合法により総タンパク質量を測定するものであるが、尿検査で用いられている試験紙の技術を応用することにより、ピロガロールレッド法との相関を示す結果が得られ、AL-55によるタンパク質の測定値の妥当性が明らかとなった。

(7) アンモニア

AL-55によるアンモニアの測定結果（反射率，%）は、従来の分析法であるグルタミン酸脱水素酵素を用いた酵素法による測定結果との間に高い相関を示した（ $r=-0.89$ ， $p<0.01$ ）。AL-55のアンモニアの試験片の反応原理は、プロモクレゾールグリーン（BCG）の発色によりアンモニアを検出するものであるが、血液検査で用いられている試験紙の技術を応用することにより、グルタミン酸脱水素酵素を用いた酵素法との相関を示す結果が得られ、AL-55によるアンモニアの測定値の妥当性が明らかとなった。

このように、今回の横断的研究において、7項目の唾液因子それぞれの従来の分析法による測定結果と、7項目の試験紙の色調変化を一括して検出する多項目検査システムAL-55の測定結果との間に高い相関が認められたことから、従来の分析法に対するAL-55の測定値の妥当性が明らかとなった。今後、縦断的研究による経時推移の比較などを行い、妥当性についてさらに検討を行う必要があると考える。

3) 従来の分析法とAL-55の測定結果を3段階に層別した際の一致率について

従来の分析法とAL-55の測定結果を3段階に層別した際の一致率は、う蝕原性菌が70%、pHが82%、酸緩衝能が73%、潜血が71%、白血球が72%、タンパク質が84%、アンモニアが90%となり、全ての項目において70%以上の一致率が得られた。AL-55は、試験片の色調変化を反射率と

して測定するが、チェアサイドでの応用を考慮すると、各測定値を Low、Middle、High といった判定値として示すことにより、患者にとって理解しやすい検査になりうると考える。そこで今回の研究においては、AL-55 の測定値の 3 段階層別に際し、従来の分析法による測定値の分布範囲（最小値～最大値）を 3 等分した層別結果との一致率が最も高くなるように、3 段階に層別する AL-55 の閾値を設定した。

このような検査結果の段階層別は、尿検査でも広く応用され、また、これらの従来の分析法との一致率についても検討がなされており、検査項目によって違いはあるものの概ね 60～100% の一致率が報告されている^{52, 53)}。今回の検討においても、尿検査と同様の 70～90% の一致率が得られる 3 段階層別が可能であったことから、従来の分析法に対する AL-55 の測定値の高い信頼性が示されたといえる。しかしながら、一致率が 90% と最も高かったアンモニアと比較して、他の 6 項目の一致率は 70～84% と低い傾向にあり、これらは、従来の分析法との相関係数の多寡とも一致している。今後、これら試験片の組成の改良を行うことなどにより、従来の分析法との相関性および一致率が高くなることが望まれる。

5. AL-55 の臨床的展開

多項目唾液検査システム AL-55 は、7 項目の唾液因子を 5 分間で測定可能であるが、本研究ではまず、う蝕、歯周病、口腔清潔度に関する一般的な口腔内の検査結果と AL-55 による 7 項目の唾液因子の測定結果の関連性を検討した。その結果、これら 7 項目がう蝕、歯周病、口腔清潔度の検査指標となり得ることが判明した。

さらに、従来の分析法と AL-55 の測定結果の相関を検討するとともに、患者にとってより理解しやすい結果を提供するという観点から、AL-55 による測定結果を 3 段階に層別した際の一致率についての考察も試み、従来の分析法との高い相関と一致率を確認し、AL-55 の測定値の妥当性および信頼性を明らかにした。

AL-55 は、患者の口腔状態を客観的に把握できるだけでなく、得られた測定結果が数値として示されるため、治療やセルフケアに対する患者のモチベーション向上にも有用であると考えられる。また、歯科医療者にとっても、客観的な検査結果の説明および保健指導が容易となり、AL-55 のチェアサイドでのポイントオブケアテストへの応用により、予防やメンテナンスを中心とした患者教育・管理型歯科医療（情報提供型歯科医療）への転換への寄与が期待される⁵⁴⁾。

また、AL-55 は、歯科医院において、治療やセルフケアに対する患者のモチベーション向上に有用であるばかりでなく、多項目一括短時間検査という利点を活かし、学校あるいは企業等での歯科健診におけるスクリーニング検査として用いることも可能であろう。

企業において歯科健診を実施し、口腔のケアを定期的、継続的に強く推進した事業所では、全身の総医療費が低減したという報告もあり⁵⁵⁾、今後ますます歯科健診でのスクリーニング検査の重要性が増してくると思われる。

近年、歯科疾患が全身の健康に及ぼす影響⁵⁶⁻⁵⁸⁾や、口腔のケアによる誤嚥性肺炎の予防効果⁵⁹⁾などが明らかになりつつあり、歯科医療が QOL 向上に果たすべき役割は非常に大きい。このような状況において、簡便な操作で多項目の一括測定が短時間で可能な AL-55 を歯科健診に応用することは、客観値に基づいた歯科受診勧奨による歯科受診率の向上など⁶⁰⁾、国民のオーラルヘルスプロモーションを行う上で有用であると思われる。

また、AL-55 のさらなる応用分野として、介護施設などの入居者に対する口腔のケアや、入院患者の周術期の口腔健康管理にも応用できると考えられ、これらを実践する歯科衛生士、看護師、介護士の施術上の評価に用いることも可能であろう。

今後、AL-55 の多項目短時間検査の特長を活かし、歯科医院におけるチェアサイドでの応用にとどまらず、集団健診、介護分野での応用可能性についても、検討を行う必要があると考える。

V. 総括ならびに結論

本研究では、患者教育・管理型歯科医療のための検査ツールとしての AL-55 の臨床応用にあたって、その有用性を検証した。すなわち、う蝕、歯周病、口腔清潔度に関する一般的な口腔内の検査結果と AL-55 による 7 項目の唾液因子の測定結果の相関を解析し、AL-55 が、う蝕、歯周病、口腔清潔度などの口腔内状態の把握に有用なものであるかについて検討し、以下の知見を得た。

1. AL-55 によるう蝕原性菌の測定結果（反射率）は、口腔内の検査結果である DMFT との間に相関を認め、pH、酸緩衝能の測定結果は、DMFT との間に相関を認めなかった。また、対象者の DMFT を軽度・中等度・重度の 3 群に層別し、各群における AL-55 による測定結果を群間比較した結果、う蝕原性菌が、軽度群と重度群の間に有意な差を認めたが、pH、酸緩衝能は、群間に有意な差はなかった。

2. AL-55 による潜血、白血球、蛋白質の測定結果（反射率）はともに、PPD、BOP、GI、CPI との間に相関を認めた。また、対象者を PPD により軽度・中等度・重度に 3 層別し、各群における AL-55 による測定結果を群間比較した結果、潜血は、軽度群・中等度群・重度群のそれぞれ間に有意な差を認め、白血球、蛋白質は、軽度群と重度群間、および中等度群と重度群間に有意な差を認めた。

3. AL-55 によるアンモニアの測定結果（反射率）は、総菌数との間に相関を認めた。さらに対象者を総菌数により軽度・中等度・重度に 3 層別し、各群における AL-55 によるアンモニアの測定結果を群間比較した結果、軽度群・中等度群・重度群のそれぞれ間に有意な差を認めた。

以上のことから、AL-55 による測定が、う蝕、歯周病、口腔清潔度などの口腔内状態の把握に有用であることが明らかとなった。

また、7 項目の唾液因子に関する従来の分析法による個々の測定結果と、それらの一括測定が短時間で可能な多項目唾液検査システム AL-55 による測定結果を比較することにより、従来の分析法に対する AL-55 の測定値の妥当性および信頼性について検討し、以下の知見を得た。

1. 従来の分析法と AL-55 による 7 項目の唾液因子の測定結果との間に、中等度～高い相関を確認した（7 項目いずれも $p < 0.01$ ）。

2. 従来の分析法と AL-55 による測定結果を 3 段階に層別した際の一致率は、70～90%であった。

以上のことから、従来の分析法に対する多項目唾液検査システム AL-55 の測定値の妥当性および信頼性が明らかとなった。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました愛知学院大学歯学部保存修復学講座 千田彰教授に深く感謝申し上げます。また、本研究のみならず格別なる御指導と御校閲を賜りました愛知学院大学歯学部保存修復学講座 富士谷盛興特殊診療科教授に深く感謝申し上げます。

ます。さらに本研究の遂行に対し、多大なるご尽力および御指導を賜りました愛知学院大学歯学部保存修復学講座各位に厚く御礼申し上げます。最後に、ご協力とご助言をいただきましたアークレイ株式会社、ライオン株式会社、公益財団法人ライオン歯科衛生研究所各位に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry -a review. FDI Commission Project 1-97. Int Dent J 50: 1-12, 2000.
- 2) Zhang Y, Sun J, Lin CC, Abemayor E, Wang MB, Wong DT. The emerging landscape of salivary diagnostics. Oral Health Dent Manag 13:200-10, 2014
- 3) Giannobile WV, Wong DT. Salivary diagnostics: oral health and beyond! J Dent Res 90: 1153-4, 2011.
- 4) Klock B, Krasse B. A comparison between different methods for prediction of caries activity. Scand J Dent Res 87: 129-39, 1979.
- 5) Vehkalahti M, Nikula-Sarakorpi E, Paunio I. Evaluation of salivary tests and dental status in the prediction of caries increment in caries-susceptible teenagers. Caries Res 30: 22-8, 1996.
- 6) Alaluusua S, Kleemola-Kujala E, Grönroos L, Evälahti M. Salivary caries-related tests as predictors of future caries increment in teenagers. A three-year longitudinal study. Oral Microbiol Immunol 5: 77-81, 1990.
- 7) Brinkmann O, Zhang L, Giannobile WV, Wong DT. Salivary biomarkers for periodontal disease diagnostics. Expert Opin Med Diagn 5: 25-35, 2011.
- 8) 眞木吉信, 山本秀樹, 松久保 隆, 高江洲義矩, 渋谷 睦, 斉藤 斉, 浅見邦明. Resazurin Disc による齶蝕活動性迅速判定法. 口腔衛生会誌 32:403-4, 1982.
- 9) 眞木吉信, 山本秀樹, 松久保 隆, 高江洲義矩, 渋谷 睦, 木下雄一, 斉藤 斉, 田中文夫, 浅見邦明. 唾液による齶蝕活動性迅速判定法としての Resazurin Disc の変色特異性. 口腔衛生会誌 33:169-82, 1983.
- 10) 眞木吉信, 山本秀樹, 松久保 隆, 高江洲義矩, 渋谷 睦. Resazurin Disk 法による齶蝕活動性迅速判定試験と齶蝕発病の予測性. 口腔衛生会誌 34: 208-14, 1984.
- 11) 眞木吉信. Resazurin Disk test - 唾液による齶蝕活動性迅速判定法. 歯科学報 84: 183-5, 1984.
- 12) Jensen B, Bratthall D. A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva. J Dent Res 68: 468-71, 1989.
- 13) Karjalainen S, Söderling E, Pienihäkkinen K. Validation and inter-examiner agreement of mutans streptococci levels in plaque and saliva of 10-year-old children using simple chair-side tests. Acta Odontol Scand 62: 153-7, 2004.
- 14) 大島光宏, 鈴木邦治, 江田昌弘, 佐藤慶伴, 伊藤公一, 村井正大, 大塚吉兵衛. 唾液潜血試験におけるモノクローナル抗体を用いたヘモグロビン検出試験紙の有用性 -ペルオキシダーゼ試験紙法との比較-. 日歯周誌 39: 273-80, 1997.
- 15) 大島光宏, 藤川謙次, 有泉 実, 沈 在明, 鈴木邦治, 吉沼直人, 江田昌弘, 伊藤公一, 村

- 井正大, 大塚吉兵衛. モノクローナル抗体を用いた唾液潜血試験紙の歯周疾患スクリーニングテストにおける有用性 -臨床パラメーターとの関連性について-. 日歯周誌 40: 111-8, 1998.
- 16) 大島光宏, 藤川謙次, 熊谷京一, 出澤政隆, 江澤眞恵, 伊藤公一, 大塚吉兵衛. 新しい唾液潜血試験紙法による歯周疾患のスクリーニングテストの有用性. 日歯周誌 43: 416-23, 2001.
- 17) 「口腔内細菌検査サービス案内書」(ジーシー)
<http://www.gcoc.jp/assets/pdf/serviceguide.pdf> (2015年9月14日アクセス)
- 18) 「歯科検査サービス」(BML)
<http://www.bml.co.jp/dentallabo/imformation/inspects01.html> (2015年9月14日アクセス)
- 19) 「オーシヨンスティックス添付文書」(PMDA)
http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/100639_20800AMZ00108000_A_01_01.pdf
(2015年9月14日アクセス)
- 20) Seligson D, Hirahara K. The measurement of ammonia in whole blood, erythrocytes, and plasma. J Lab Clin Med 49: 962-74, 1957.
- 21) 「アミチェック添付文書」(PMDA)
http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/100639_25A2X00001000007_A_01_02.pdf
(2015年9月14日アクセス)
- 22) 「ポケットケム UA PU-4010」(PMDA)
http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/md/PDF/100639/100639_25B1X00001000025_A_01_01.pdf
(2015年9月14日アクセス)
- 23) Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for Streptococcus mutans. Arch Oral Biol 18: 1357-64, 1973.
- 24) 「唾液緩衝能測定装置チェックバフ」(堀場製作所)
http://www.horiba.com/uploads/media/R29-15-074_01.pdf (2015年9月14日アクセス)
- 25) 金井正光. 臨床検査法提要. 改訂第30版. 金原出版(東京): 522-6, 1993.
- 26) 中村郁夫, 井廻道夫. アンモニア. medicina 36: 254-6, 1999.
- 27) Klein H, Palmer CE, Knustson JW. Studies on dental caries. I. Dental status and dental needs of elementary school children. Pub Health Rep 53: 751-65, 1938.
- 28) Nyman S, Lindhe, J. Examination of patients with periodontal disease. Lindhe J. Textbook of Clinical Periodontology. 2nd ed. Munksgaard (Copenhagen), 310-322, 1989.
- 29) Greenstein G, Caton J, Polson AM. Histologic characteristics associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation. J Periodontol 52:420-5, 1981.
- 30) Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. Acta odontol Scand 21: 533-51, 1963.
- 31) Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J. Development of the World Health Organization (WHO) Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN). Int Dent J 32: 281-91, 1982.
- 32) 「LZ テスト ‘栄研’ HbA0 添付文書」(PMDA)
http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/170005_20400AMZ00930000_A_01_04.pdf
(2015年9月14日アクセス)

- 33) 「イノテック・エラスターゼ添付文書」(PMDA)
http://www.info.pmda.go.jp/tgo/pack/21000AMZ00608000_A_01_01?view=body (2015年9月14日アクセス)
- 34) 「マイクロ TP-AR 添付文書」(PMDA)
http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/890027_16200AMZ00893000_A_01_03.pdf
(2015年9月14日アクセス)
- 35) 「N-テスト L NH3 ニットーボー添付文書」(PMDA)
http://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/580753_07A2X10001012160_A_01_08.pdf
(2015年9月14日アクセス)
- 36) Petersen PE. The world health report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO global oral health programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 31(Suppl. 1): 3-24, 2003.
- 37) Newbrun E, Matsukubo T, Hoover CI, Graves RC, Brown AT, Disney JA, Bohannon HM. Comparison of two screening tests for *Streptococcus mutans* and evaluation of their suitability for mass screenings and private practice. *Community Dent Oral Epidemiol* 12: 325-31, 1984.
- 38) Kingman A, Little W, Gomez I, Heifetz SB, Driscoll WS, Sheats R, Supan P. Salivary levels of *Streptococcus mutans* and lactobacilli and dental caries experiences in a US adolescent population. *Community Dent Oral Epidemiol* 16: 98-103, 1988.
- 39) Klock B, Emilson CG, Lind SO, Gustavsdotter M, Olhede-Westerlund AM. Prediction of caries activity in children with today's low caries incidence. *Community Dent Oral Epidemiol* 17: 285-8, 1989.
- 40) Wilson RF, Ashley FP. Identification of caries risk in schoolchildren: salivary buffering capacity and bacterial counts, sugar intake and caries experience as predictors of 2-year and 3-year caries increment. *Br Dent J* 166: 99-102, 1989.
- 41) Alaluusua S, Kleemola-Kujala E, Gronroos L, Evalahti M. Salivary caries-related tests as predictors of future caries increment in teenagers. A three-year longitudinal study. *Oral Microbiol Immunol* 5: 77-81, 1990. 42) Russell JI, Macfarlane TW, Aitchison TC, Stephen KW, Burchell CK. Prediction of caries increment in Scottish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol* 19: 74-7, 1991.
- 43) van Houte J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv Dent Res* 7: 87-96, 1993.
- 44) Lihong Guo, Wenyuan Shi. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc* 41: 107-18, 2013.
- 45) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会編. 歯周病の検査・診断・治療計画の指針 2008. 1 版. 医歯薬出版(東京), 1-5, 2008.
- 46) 佐野祥平. 集団検診に唾液潜血反応試験紙を用いた歯肉炎スクリーニングの研究. *口腔衛生会誌* 40: 305-18, 1990.
- 47) 結城健二, 塚崎弘明, 川和忠治, 芝 燁彦, 芝 紀代子. 尿試験紙による唾液 8 成分の同時測定法の構築と残存歯の歯周病の評価. *補綴誌* 52: 340-9, 2008.

- 48) Uitto VJ, Nieminen A, Coil J, Hurttia H, Larjava H. Oral fluid elastase as an indicator of periodontal health. *J Clin Periodontol* 23: 30-7, 1996.
- 49) Sánchez GA, Miozza V, Delgado A, Busch L. Determination of salivary levels of mucin and amylase in chronic periodontitis patients. *J Periodont Res* 46: 221-7, 2011.
- 50) 石川正夫, 山崎洋治, 森田十誉子, 小川洋子, 森嶋清二, 福田 功, 坂本 久, 渋谷耕司, 高田康二, 芝 紀代子. 洗口吐出液中のアンモニア濃度および濁度を指標とした口腔清潔度検査について. *口腔衛生会誌* 59: 93-100, 2009.
- 51) 石川正夫, 山崎洋治, 石川文子, 島田 睦, 田中良子, 森嶋清二, 石井孝典, 高田康二, 渋谷耕司, 坂下玲子, 濱田三作男. 唾液中アンモニアの高齢者における口腔内細菌数評価への応用. *老年歯学* 25: 367-74, 2011.
- 52) 天野真依子, 後藤 剛, 佐藤達郎, 浅沼浩子, 松本真弓, 濱田文香, 黒住泰枝, 石川綾子. 全自動尿分析装置 4 機種による基礎的性能評価. *医療と検査機器・試薬* 37: 85-96, 2014.
- 53) 田中雅美, 宿谷賢一, 毛利真理子, 久末崇司, 影山祐子, 横田浩充, 下澤達雄, 矢富 裕. 尿化学分析装置クリニテックノーバスの基礎的検討. *JJCLA* 39: 55-61, 2014.
- 54) 千田 彰. 管理医療と予防による対応. *歯医学誌* 34: 130-3, 2015.
- 55) 赤塚俊昭. IT 活用による保険者機能の強化 デンソー健保の取り組み. *病院* 73: 458-63, 2014.
- 56) Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95: 559-69, 2003.
- 57) Khader YS, Albashaireh ZS, Alomari MA. : Periodontal diseases and the risk of coronary heart and cerebrovascular diseases: a meta-analysis. *J Periodontol* 75: 1046-53, 2004.
- 58) Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol* 6: 91-8, 2001.
- 59) 米山武義, 吉田光由, 佐々木英忠, 橋本賢二, 三宅洋一郎, 向井美恵, 渡辺 誠, 赤川安正. 要介護高齢者に対する口腔衛生の誤嚥性肺炎予防効果に関する研究. *歯医学誌* 20: 58-68, 2001.
- 60) Macey R, Glenny A, Walsh T, Tickle M, Worthington H, Ashley J, Brocklehurst P. The efficacy of screening for common dental diseases by hygiene-therapists: a diagnostic test accuracy study. *J Dent Res* 94: 70S-8S, 2015.