
臨床指導講演

歯肉溝滲出液中のバイオマーカーを用いた歯周病診断

木戸 淳一, 板東 美香, 稲垣 裕司, 生田 貴久, 梶浦由加里,
中島由紀子, 坂本英次郎, 美原 智恵, 二宮 雅美,
西川 泰史, Lew Jung-Hwan, 成石 浩司, 永田 俊彦

キーワード：歯周病診断, バイオマーカー, 歯肉溝滲出液

Diagnosis of Periodontal Diseases using Biomarkers in Gingival Crevicular Fluid

Jun-ichi KIDO, Mika BANDO, Yuji INAGAKI, Takahisa IKUTA, Yukari KAJIURA,
Yukiko NAKAJIMA, Eijiro SAKAMOTO, Chie MIHARA, Masami NINOMIYA,
Yasufumi NISHIKAWA, Jung-Hwan LEW, Koji NARUISHI, Toshihiko NAGATA

Abstract : Periodontal diseases cause an inflammation and degradation of periodontal tissues and missing of teeth. The incidence rate of periodontal diseases is high in middle-aged and elderly people. A reasonable diagnosis of periodontal diseases is very important to keep teeth, however, conventional examinations of periodontal diseases is not necessarily exact and objective. Gingival crevicular fluid (GCF) is an exudate secreted from periodontal tissues and contains many components including proteolytic enzymes, inflammatory cytokines, blood-associated proteins, cellular and bacterial fragments. Because some proteins in GCF are related to inflammation, tissue degradation and bone metabolism, those proteins have been studying as a diagnostic marker of periodontal diseases. GCF is noninvasively collected using a sterile paper strip and biomarkers are determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme activity assay. We identified calprotectin, an inflammation-related protein, in GCF and calprotectin level in GCF from periodontitis sites was significantly higher than that of healthy control. Calprotectin level in GCF was positively correlated to gingival index and other biomarkers and decreased by periodontal treatments. Resistin is an adipocytokine and its level increases in some inflammatory diseases. Resistin level in GCF from periodontitis sites was high compared to the level of healthy control samples. Procollagen type I C-terminal peptide (PICP) is a biomarker for bone metabolism and its level was high in GCF collected from periodontitis sites. These results suggested that calprotectin, resistin and PICP are useful biomarkers for periodontal diseases. On the other hand, we showed that glycated albumin (GA), a marker of diabetes mellitus (DM), was contained in GCF and GA level in GCF from DM patients was significantly higher than that of non-DM individuals. Components in GCF may be biomarkers of systemic diseases as well as periodontal diseases and their determination will be useful diagnostic examination of some diseases. Recently, we have been studying the determining system of GCF calprotectin, including microchip ELISA, surface plasmon resonance assay and immuno-chromatography assay. When GCF biomarkers are determined using the determining systems, we will simply, exactly and objectively diagnose periodontal diseases at our dental offices.

1. はじめに

歯周病は中高齢者において高い罹患率を示す口腔感染性疾患であり、平成23年度歯科疾患実態調査では、65～69歳の高齢者の約50%が4ミリ以上の歯周ポケットを有し、歯周病の所見を示している。また、歯周病の罹患率は、高齢者の増加に伴い上昇すると考えられる。歯周病は、初期の段階ではその症状を自覚し難く、患者が歯肉の腫脹、出血、咬合痛や歯の動揺などの変化に気づいた時点では、病状が中程度以上になっていることが多い。歯周病罹患率が、自覚症状がない段階で歯科医院を受診し、歯周プローブによる歯周ポケット測定やエックス線検査などの専門的な歯周病関連検査を受ける頻度は決して高くない。また、現在行われている臨床的な歯周病検査は精度や客観性の問題が考えられ、さらに歯周疾患活動度の評価でも問題が指摘されている¹⁾。これらの状況から歯周病を正確に、且つ客観的に検査することは歯周病のスクリーニングや診断にとって重要であり、また治療法の選択にも有用である。

歯肉溝滲出液 (Gingival Crevicular Fluid : GCF) は、歯周組織、細胞や血管から歯肉溝や歯周ポケットに滲出している組織液である (図1)。GCFの容量は微量であり、健全な歯肉溝からの滲出液の量は1 µl 以下で、歯周病を伴う歯周ポケット由来でも数 µl 以下である²⁾。また、GCFは血液由来成分や組織・細胞成分を含み、さらに歯周病由来の滲出液では様々な炎症関連因子や組織破壊物質も含まれていることからGCF中の様々な成分を歯周病検査マーカーとして歯周病診断に用いる臨床研究が行われている³⁻⁵⁾。最近、GCFのプロテオーム解析によりGCF中に非常に多くの蛋白成分が同定され^{6,7)}、複数の炎症関連蛋白、蛋白質分解酵素および組織破壊関連蛋白質などが含まれていることが明らかとなり、歯周病診断マーカーとして有効な蛋白質を検索することは、正確で、客観的な歯周病診断に繋がると考えられる。

本稿では、現在行われている臨床的な歯周病検査法の問題点を再考し、“歯肉溝滲出液”を紹介するとともに、GCF中バイオマーカーを用いた歯周病診断法および測定システムなどの可能性について考えてみたい。

2. 臨床的歯周病検査法と問題点

歯周病は、主に歯周病原細菌による慢性的な感染により歯周組織が持続的、且つ過剰な免疫刺激を受けることにより炎症反応が引き起され、その結果歯周組織破壊が生じる疾患である。現在の歯周病検査では、“原因の検査”として歯周病原細菌を含む歯垢や歯石の付着程度を視診により判定しスコアとして評価しているが、どのような細菌が、どれだけの量あるいは割合で存在しているかは判定できない (表1)。歯周病の“炎症の程度”は歯肉炎指数⁸⁾やプロービング時出血 (Bleeding on probing : BOP)⁹⁾により評価されているが、歯肉組織の発赤、腫脹や出血などの視診は検査者の評価が異なる場

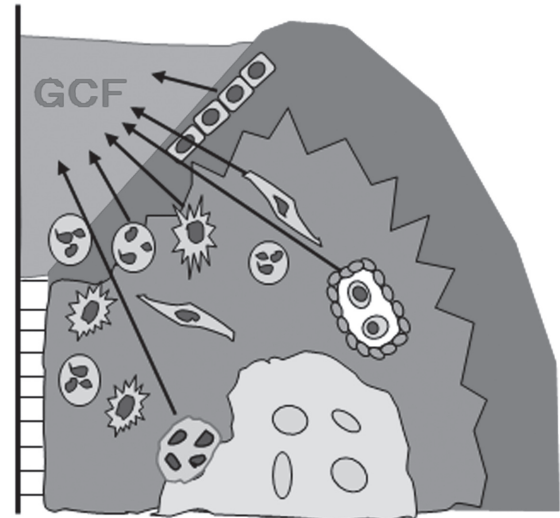


図1 歯周組織・細胞と歯肉溝滲出液 (GCF)

表1 歯周病の臨床的検査法

検査項目	評価内容	診査形式
歯垢・歯石付着	歯周病原因	視診
咬合状態 (早期接触, 咬合性外傷)	歯周病原因	視診
プロービング時出血	炎症	視診
歯肉炎指数	炎症	視診
歯周ポケット深さ (プロービング深さ, アタッチメントレベル)	歯周組織破壊	視診(触診)
付着歯肉幅	歯周組織破壊	視診(触診)
歯槽骨吸収	歯周組織破壊	エックス線診
歯の動揺	歯周組織破壊	視診, 触診

合もあり客観性に問題が残る。また、歯周病検査として一般的に行われる歯周ポケット測定や歯の動揺検査も、検査者により測定値のバラツキがあり客観性に問題がある。比較的客観的な歯槽骨レベルのエックス線検査でも規格撮影用バイトブロックやグリッドスケールを用いないと正確な歯槽骨吸収状態の把握が困難な場合がある。さらに、歯周ポケット測定、歯の動揺検査および歯槽骨エックス線検査などの“歯周組織破壊”検査は、すでに起こってしまった破壊の程度を調べるものであり、歯周組織破壊の開始や進行状態を評価するには継時的な検査が必要となる。これらの臨床的歯周病検査は、現在、主

表2 歯肉溝滲出液成分

<ul style="list-style-type: none"> ・酵素: 蛋白分解酵素類など ・非酵素蛋白: 炎症性メディエーター, サイトカイン, 免疫グロブリン, 血液由来蛋白, 歯周組織由来蛋白など ・細胞成分: 好中球, リンパ球, 単球, マクロファージ, 上皮細胞, 線維芽細胞, 骨関連細胞など ・細菌・細菌由来物質 ・電解質, ・糖類, ・脂質など
--

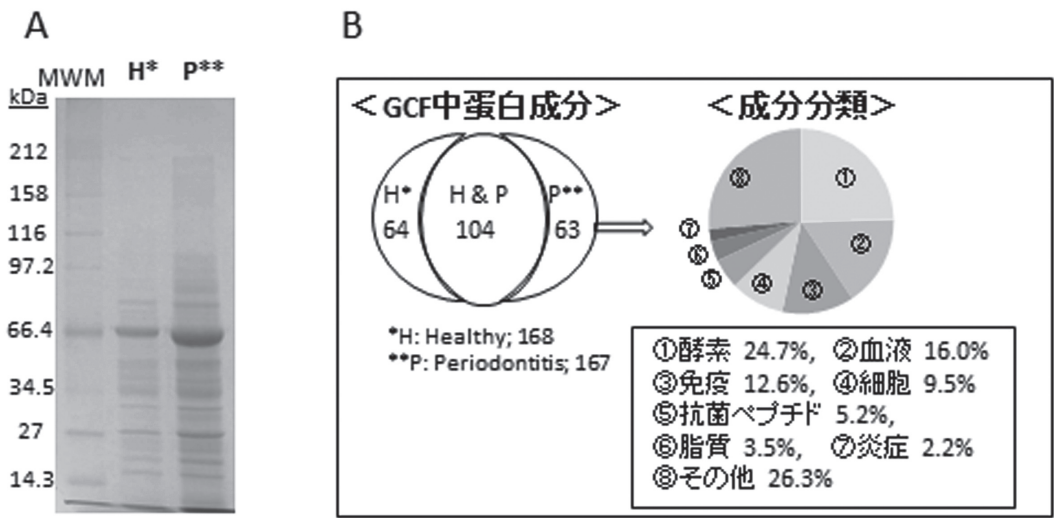


図2 歯肉溝滲出液中の蛋白成分
 A : GCF の SDS-PAGE (CBB 染色), B : GCF 中蛋白質成分 *H : Health, **P : Periodontitis

に行われている機械的・外科的な歯周病治療法には対応しているが、将来、開発が進むと考えられる薬物・化学的療法、生物製剤療法や免疫療法などに対しては検査の精度や客観性の問題から必ずしも適切とは言えない。

3. GCF と蛋白成分

GCF は上皮細胞, 線維芽細胞, 歯根膜線維芽細胞, 骨関連細胞などの細胞を含む歯周組織からの滲出物や血管からの血液成分などを含んでいる^{3,10)}。これらの中には, 蛋白質分解酵素, 炎症性メディエーター, サイトカイン, 免疫グロブリンや血液由来蛋白をはじめ, 歯周組織細胞片, また細菌やそれらの由来因子, 電解質, 糖類および脂質など多様な物質が含まれている¹¹⁻¹³⁾ (表2)。最近, 私たちは GCF のプロテオーム分析により GCF 蛋白質の網羅的解析を行った⁷⁾。歯周病部位と非歯周病(健常)部位からの GCF サンプルでは歯周病由来サンプルでより多量の蛋白質が認められ, プロテオーム分析では 231 個の蛋白質・ペプチドが同定された(図2)。104 個の蛋白質・ペプチドは歯周病部位と健常部位由来の両サンプル中に認められ, 63 個は歯周病部位サンプルに, また 64 個は健常部位サンプル中にみられた。これらの

GCF 蛋白質は, 蛋白質分解酵素を含む酵素, 血液由来蛋白質, 免疫関連蛋白質および細胞骨格関連蛋白質が多く, 抗菌ペプチドや炎症性サイトカインなどの炎症関連蛋白質も含まれていた。

4. GCF 中の歯周病診断バイオマーカーと GCF 採取法

これまでに GCF 中の歯周病診断バイオマーカーとして様々な蛋白質が研究されている^{4,13-16)} (表3)。例えば, 組織破壊に関連するアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), エラスターゼ, 乳酸脱水素酵素 (LDH) やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP, コラゲナーゼ) などの蛋白質分解酵素^{17,21)}, 炎症に関連したカルプロテクチンや C-反応性蛋白質 (CRP) などの蛋白質^{22,23)}, 炎症性サイトカインのインターロイキン (IL) 1-β, IL-6, IL-8 や腫瘍壊死因子-α (TNF-α) などが歯周病診断マーカーとして研究されてきた²⁴⁻²⁶⁾。特に, AST については歯周病の診断キットとして市販されている (PTM キット, 松風)。また, 歯槽骨代謝を診断するマーカーとしてアルカリフォスファターゼ, I 型コラーゲン C 末端テロペプチド (ICTP), I 型プロコラーゲン C 末

表3 GCF 中の主な歯周病診断マーカー候補

Enzymes	Proteins	Cytokines	Others
アルカリフォスファターゼ	カルプロテクチン	インターロイキン1- α	細胞接着分子-1
アスパラギン酸アミノ トランスフェラーゼ(AST)	I型コラーゲンテロペプチド (ICTP)	インターロイキン1- β	免疫グロブリンA
カテプシン	II型プロコラーゲンペプチド (PICP)	インターロイキン-6	免疫グロブリンG
エラスターゼ		インターロイキン-8	免疫グロブリンM
ジンジパイン	C-反応性蛋白質(CRP)	インターフェロン- α	プロスタグランジンE ₂
β -グルクロニダーゼ	シスタチン	形質転換増殖因子- β (TGF- β)	活性化因子
乳酸脱水素酵素(LDH)	ファイブロネクチン	腫瘍壊死因子- α	サブスタンスP
リゾチーム	ラクトフェリン	(TNF- α)	
マトリックスメタロ プロテアーゼ(MMP: コラゲナーゼ)	オステオカルシン	血管内皮成長因子 (VEGF)	
中性プロテアーゼ	N末端テロペプチド(NTx)		
プラスミノーゲン	プロテオグリカン		
	組織メタロプロテアーゼ 阻害因子(TIMP)		
	トランスフェリン		

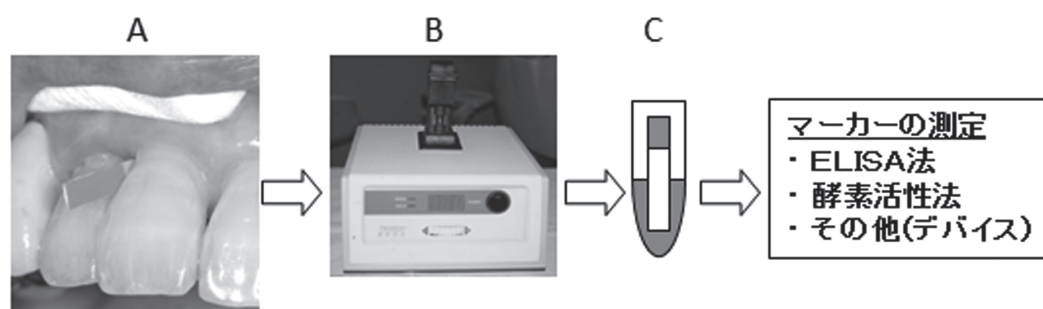


図3 GCFの採取とバイオマーカー測定

A : Periopaper[®]によるGCF採取, B : Periotron 8000によるGCF量測定, C : GCFの緩衝液中への抽出

端ペプチド (PICP) および I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTx), 骨基質蛋白質のオステオカルシンやプロテオグリカンなどの可能性が示唆されている^{27,31}。蛋白質以外にも免疫グロブリンや炎症に関連する生理活性物質のプロスタグランジン E₂も診断マーカーとして報告されており^{32,33}, さらに, これら以外にも様々な GCF 中の物質が歯周病診断マーカーとして研究されている³⁴。

GCF の採取法としては, 口腔内の GCF 採取部位を簡易防湿し, Periopaper[®] (Oraflow Inc., NY, USA) などの滅菌ペーパーストリップスを歯周ポケット中に数十秒間挿入し GCF を吸引採取する方法がよく行われている (図 3)。GCF は非侵襲的に採取できるために疼痛は伴わず患者への負担は少ない。また, ペーパーストリップスを用いた GCF 採取は簡易であるため歯科診療室のチェアサイドで容易に実施できる。私たちの研究室では, GCF 採取後, その液量を Periotron 8000 (Harco

Electronics, MB, Canada) を用いて測定し, その後 GCF 採取したペーパーストリップスを緩衝液中に浸し, GCF 成分を溶出することにより GCF サンプルを調整している^{22,35-37}。GCF 中マーカー蛋白質の測定は, ほとんど研究用の ELISA キットや酵素活性分析キットを用いているが, 今後, 臨床用 GCF バイオマーカー測定システムの開発が望まれる。

5. GCF バイオマーカーを用いた歯周病診断

これまでに私たちの研究室では, GCF 中のカルプロテクチン, PICP, オステオポニンおよびレジスチンなどのいくつかの蛋白質の歯周病診断マーカーとしての可能性について検討を行ってきた^{22,29,35-38}。カルプロテクチンは, 好中球, 単球/マクロファージおよび上皮細胞が発現する炎症関連蛋白質であり, 潰瘍性大腸炎, リウマチ性関節炎および膿毒性線維症などの炎症を伴った疾患でそのレベルが増加することが知られている³⁹。私

表4 GCF中バイオマーカーレベルの比較

マーカー サンプル群	カルプロテクチン ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	レジスチン ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	I型プロコラーゲンペプチド ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
歯周病群	2.15 (0.01-12.43) (n=74)	2.55 ± 2.04 (n=24)	0.91 ± 0.15 (n=40)
非歯周病群 (健常)	0.59 (0.01-3.62) (n=43)	0.78 ± 0.61 (n=21)	0.38 ± 0.04 (n=20)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney U-test)

私たちは、歯周炎を伴った歯周組織、GCFや歯石中にカルプロテクチンが含まれることを見出し、歯周病部位と非歯周病部位（健常部位）から採取したGCFサンプル中のカルプロテクチンレベルを比較したところ、歯周病GCFで健常サンプルと比較して約3.6倍の高値を示した^{22, 35, 36, 40}（表4）。GCF中のカルプロテクチン量は他のバイオマーカーのGCF中の含有量と比較してかなり高く、また、GCFカルプロテクチン濃度は歯周病の臨床的指標である歯肉炎指数や他のマーカーであるAST、コラゲナーゼやPGE₂などのGCF濃度と有意な相関関係を示した^{35, 36}。さらに、GCF中のカルプロテクチンレベルは、歯周基本治療により治療前のレベルの約60%に低下し、歯周外科治療により26%にまで減少した（表5）。これらの結果から、GCF中のカルプロテクチンは有用な歯周病診断マーカーであることが示唆された。

レジスチンは血液、骨髓、胎盤や滑液中に同定されたアディポサイトカインであり、好中球、リンパ球や単球/マクロファージで発現している^{41, 42}。レジスチンの体液中レベルはアテローム性動脈硬化症、炎症性腸疾患やリウマチなどの炎症性疾患で増加することが報告されている^{41, 43}。GCF中のレジスチンレベルを検討したところ、歯周病部位からのGCF中のレジスチン濃度は健常部位の約3.2倍の有意な高値を示した³⁷（表4）。また、歯周病原細菌の*Porphyromonas gingivalis*由来リポポリサッカライドは、好中球からのレジスチン分泌を増加させることが認められた³⁷。これらの結果から、GCF中のレジスチンも歯周病の炎症のマーカーとなる可能性が示唆された。一方、以前からGCF中のバイオマーカーを用いて歯周病による歯槽骨吸収や骨再生などの歯槽骨代謝を診断することが期待されている。PICPは、代表的な骨基質蛋白質であるI型コラーゲンの前駆体であるプロコラーゲンのC末端部が蛋白質分解酵素によって切断されたペプチドである。PICPは高い骨代謝回転を伴う副甲状腺機能亢進症、ページェット病や慢性腎不全などの疾患において高い血中濃度を示す^{44, 45}。GCF中のPICPレベルを検討したところ歯周病部位からのGCFで健常部位の約2.4倍高い値を示した²⁹（表4）。また、

表5 歯周治療によるカルプロテクチンレベルの変化

CPT*レベル 治療過程	カルプロテクチン レベル変化 (%)
初診	100 **
基本治療後	60
歯周外科治療後	26
メインテナンス	20

* CPT: Calprotectin

•初診時のGCF検体(n=8)中カルプロテクチン濃度の
 平均値: 1.59 ± 0.69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ GCF

4 mm以上の歯周ポケット部位からのGCFサンプル中のPICPレベルは、2 mm以下の健常な歯肉溝由来のサンプルのレベルより有意に高い値を示した。さらにGCF中のPICP濃度は他の骨代謝マーカーであるオステオカルシン濃度より明らかに歯周病群で高い値を示した。これらの結果から、カルプロテクチン、レジスチンあるいはPICPなどのGCFマーカーの検査により歯周病の炎症や歯槽骨代謝の状態を正確に評価できると考えられる。

6. GCF中バイオマーカー測定の展望と問題

GCF中の成分から歯周病の炎症、組織破壊および骨代謝を評価する有用なバイオマーカーを探索し、これらを用いて歯周病検査を行うことは歯科診療室において高精度で、客観的な歯周病診断を可能とする。このような診断システムは“ポイント・オブ・ケア検査”としても有用であり、歯科診療室以外での歯周病のスクリーニングにも利用できる。また、滲出液中バイオマーカーによるインプラント粘膜炎や周囲炎の診断にも応用が可能である。さらに、GCFは様々な疾患と関連した蛋白質

を含むため、GCF中のバイオマーカーの検査は歯周病ばかりでなく他の全身疾患の診断への応用が考えられる。近年、高齢者の増加に伴い歯周病と並び糖尿病の罹患率の増加が報告されている。糖尿病患者では歯周炎の罹患率が高く（糖尿病関連歯周炎）、糖尿病関連歯周炎では歯周組織の重度の炎症や組織破壊を生じる場合がある^{46,47}。また、糖尿病と歯周病は相互に疾患の病態に悪影響を及ぼすことも知られている⁴⁸。糖尿病関連歯周炎を早期に、正確に診断することは両疾患の予防や治療にとって非常に重要となる。私たちは、GCF中に糖尿病の診断マーカーであるグリコアルブミン（GA）が含まれることを見出し、そのレベルが糖尿病患者のGCFで非糖尿病患者のものより有意に高値を示すことを報告した⁴⁹。この結果は、将来、GCF中のバイオマーカーの測定により歯周病ばかりでなく全身疾患の診断やスクリーニングができる可能性を示唆するものである。

ところで、GCFを用いた疾患の検査・診断には問題もある。GCFは血液に類似した様々な成分を含んでいるが、GCF量は血液量と比較して数 μ l以下と非常に微量である⁵⁰。GCF中バイオマーカーによる歯周病診断において炎症や組織破壊を評価する複数のマーカーを測定できれば診断の精度が増加すると考えられる。しかしながら、生体サンプル量の問題から血液中のマーカーを測定する方法や機器ではGCF中の同じマーカー物質の測定が困難な場合があり、GCF中のマーカーを測定する専用の方法やデバイスが必要となる。私たちは、これまでにマイクロチップELISA法や表面プラズモン共鳴法などによりGCF中のカルプロテクチン測定を試みてきた^{51,52}。これらのデバイスを用いた測定では、カルプロテクチン以外の他のマーカーも同時に測定する“ハイスループット”な測定の可能性がある一方、測定の時間および機器や測定チップのコストなどの問題が生じる。そこで、現在、より簡易な方法としてGCF中カルプロテクチン測定用のイムノクロマトグラフィーチップを用いた歯周病診断研究を治験として多施設で行っている。今後、GCF中マーカーを用いた歯周病診断を進めるためには、並行して測定デバイスの開発が必要となる。これらの進展によって歯科診療室においても、簡易で客観的な歯周病の診断ができると考えられる。

7. おわりに

現在行われている臨床的な歯周病検査・診断法は、精度や客観性に問題が指摘されている。歯肉溝滲出液中には細胞、組織および血液などに由来する多くの物質が含まれており、炎症や組織破壊に関連した成分は歯周病の診断マーカーとして研究されてきた。GCFやインプラント周囲溝滲出液中のバイオマーカーを用いた検査により高精度、且つ客観的に歯周病やインプラント粘膜炎・周囲炎の診断が可能となる。さらに滲出液中マーカーの測定デバイスの開発が伴えば歯科診療室のチェアサイ

ドでの歯周病やインプラント粘膜炎・周囲炎の診断法をイノベートすることができ、また歯周病やインプラント疾患の新たな治療法の開発にも貢献することが期待される。さらに、GCFを用いた糖尿病などのスクリーニングの可能性も考えられ、GCF中の疾患マーカーの研究は、歯周病ばかりでなくその他の全身疾患の診断にも貢献することが期待される。

謝 辞

GCF中マーカーの測定デバイスの研究は、産業技術総合研究所健康工学研究部門バイオマーカー診断研究グループの片岡正俊グループ長および阿部佳織博士との共同研究として、またGCFレジスチン分析およびプロテオーム分析研究は徳島大学先端酵素学研究所蛋白質発現分野の廣島佑香博士との共同研究として行われた。研究協力を頂いたことに深謝を申し上げます。

文 献

- 1) Haffajee AD, Socransky SS and Goodson JM: Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 10: 257-265 (1983)
- 2) Goodson JM: Gingival crevice fluid flow. *Periodontol* 2000 31, 43-54 (2003)
- 3) Bulkacz J and Carranza FA: Defense mechanisms of the gingiva. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA, eds. *Carranza's Clinical Periodontology*, 11th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2012: 66-68.
- 4) Ozmeric N: Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 343, 1-16 (2004)
- 5) Barros SP, Williams R, Offenbacher S and Morelli T: Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol* 2000 70, 53-64 (2016)
- 6) Ngo LH, Veith PD, Chen Y-Y, Chen D, Darby IB and Reynolds EC: Mass spectrometric analyses of peptides and proteins in human gingival crevicular fluid. *J Proteome Res* 9, 1683-1693 (2010)
- 7) Kido J, Bando M, Hiroshima Y, Iwasaka H, Yamada K, Ohgami N, Nambu T, Kataoka M, Yamamoto T, Shinohara Y, Sagawa I and Nagata T: Analysis of proteins in human gingival crevicular fluid by mass spectrometry. *J Periodont Res* 47, 488-499 (2012)
- 8) L e H and Silness J: Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 21, 533-551 (1963)
- 9) Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA and Siegrist BE: Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 13, 590-596 (1986)
- 10) Delima AJ and Van Dyke TE: Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid.

- Periodontol 2000 31, 55-76 (2003)
- 11) Embery G and Waddington R: Gingival crevicular fluid: Biomarkers of periodontal tissue activity. *Adv Dent Res* 8, 329-336 (1994)
 - 12) Taba Jr M, Kinney J, Kim AS and Giannobile WV: Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 49, 551-571, (2005)
 - 13) Uitto V-J, Overall CM and McCulloch C: Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 31, 77-104 (2003)
 - 14) Eley BM and Cox SW: Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 31, 105-124 (2003)
 - 15) Giannobile WV, Al-Shammari KF and Sarment DP: Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal disease activity. *Periodontol* 2000 31, 125-134 (2003)
 - 16) Armitage GC: Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontol* 2000 34, 109-119 (2004)
 - 17) Persson GR, DeRouen TA and Page RC: Relationship between gingival crevicular fluid levels of aspartate aminotransferase and active tissue destruction in treated chronic periodontitis patients. *J Periodont Res* 25, 81-87 (1990)
 - 18) Eley BM and Cox SW: A 2-year longitudinal study of elastase in human gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol* 23, 681-692 (1996)
 - 19) Atici K, Yamalik N, Eratalay K and Etikan I: Analysis of gingival crevicular fluid intracytoplasmic enzyme activity in patients with adult periodontitis and rapidly progressive periodontitis. A longitudinal study model with periodontal treatment. *J Periodontol* 69, 1155-1163 (1998)
 - 20) Villela B, Cogen RB, Bartolucci AA and Birkedal-Hansen H: Crevicular fluid collagenase activity in healthy, gingivitis, chronic adult periodontitis and localized juvenile periodontitis patients. *J Periodont Res* 22, 209-211 (1987)
 - 21) Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H and Sorsa T: Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 27, 366-369 (2000)
 - 22) Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M and Nagata T: Calprotectin, a leukocyte protein related to inflammation, in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 33, 434-437 (1998)
 - 23) Adonogianaki E, Mooney J and Kinane DF: Detection of stable and active periodontitis aites by clinical assessment and gingival crevicular acute-phase protein levels. *J Periodont Res* 31, 135-143 (1996)
 - 24) Heasman PA, Collins JG and Offenbacher S: Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 β , leukotriene B₄, prostaglandin E₂, thromboxane B₂ and tumor necrosis factor α in experimental gingivitis in humans. *J Periodont Res* 28, 241-247 (1993)
 - 25) Geivelis M, Turner DW, Pederson ED and Lamberts BL: Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol* 64, 980-983 (1993)
 - 26) Ozmeric N, Bal B, Balos K, Berker E and Bulut S: The correlation of gingival crevicular fluid interleukin-8 levels and periodontal status in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 69, 1299-1305 (1998)
 - 27) Chapple IL, Garner I, Saxby MS, Moscrop H and Matthews JB: Prediction and diagnosis of attachment loss by enhanced chemiluminescent assay of crevicular fluid alkaline phosphatase levels. *J Clin Periodontol* 26, 190-198 (1999)
 - 28) Al Shammari KF, Aldredge WA, Iacono VJ, Eber RW, Wang HL, Berwald B and Oringer RJ: Effect of non-surgical periodontal therapy on C-telopeptide pyridinoline cross-links (ICTP) and interleukin-1 levels. *J Periodontol* 72, 1045-1051 (2001)
 - 29) 中村輝夫, スルヨノ, 木戸淳一, 永田俊彦: 歯周炎患者の歯肉溝滲出液中に含まれる I 型プロコラーゲンペプチドおよびオステオカルシンの定量分析. *日歯周誌* 44, 73-81 (2002)
 - 30) Wilson AN, Schmid MJ, Marx DB and Reinhardt RA: Bone turnover markers in serum and periodontal microenvironments. *J Periodont Res* 38, 355-361 (2003)
 - 31) Waddington RJ, Embery G and Smith AJ: Immunochemical detection of proteoglycans decorin and biglycan in human gingival crevicular fluid from sites of advanced periodontitis. *Arch Oral Biol* 43, 287-295 (1998)
 - 32) Grbic JT, Lamster IB, Fine JB, Lam KS, Celenti RS, Herrera-Abreu M and Singer RE: Changes in gingival crevicular fluid levels of immunoglobulin A following therapy: association with attachment loss. *J Periodontol* 70, 1221-1227 (1999)
 - 33) Leibur E, Tuhkanen A, Pintson U and Soder PO: Prostaglandin E₂ levels in blood plasma and in crevicular fluid of advanced periodontitis patients before and after surgical therapy. *Oral Dis* 5, 223-228 (1999)
 - 34) AlRowis R, AlMoharib HS, AlMubarak A, Bhaskardoss

- J, Preethanath RS and Anil S: Oral fluid – Based biomarkers in periodontal disease – Part 2. Gingival crevicular fluid. *J Int Oral Health* 6, 126-135 (2014)
- 35) Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M and Nagata T: Calprotectin in gingival crevicular fluid correlates with clinical and biochemical markers of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 26, 653-657 (1999)
- 36) Nakamura T, Kido J, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M and Nagata T: The association of calprotectin level in gingival crevicular fluid with gingival index and the activities of collagenase and aspartate aminotransferase in adult periodontitis patients. *J Periodontol* 71, 361-367 (2000)
- 37) Hiroshima Y, Bando M, Inagaki Y, Mihara C, Kataoka M, Murata H, Shinohara Y, Nagata T and Kido J: Resistin in gingival crevicular fluid and induction of resistin release by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human neutrophils. *J Periodont Res* 47, 554-562 (2012)
- 38) Kido J, Nakamura T, Asahara Y, Sawa T, Kohri K and Nagata T: Osteopontin in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 36, 328-333 (2001)
- 39) Fagerhol MK, Andersson KB, Naess-Andresen C-F, Brandtzaeg P and Dale I: Calprotectin (the L1 leukocyte protein). In: Smith VL, Dedman JR, eds. Stimulus response coupling: the role of intracellular calcium-binding proteins. Boca Raton Ann Arbor Boston. CRC Press, 187-210 (1990)
- 40) Kido J, Nishikawa S, Ishida H, Yamashita K, Kitamura S, Kohri K and Nagata T: Identification of calprotectin, a calcium binding leukocyte protein, in human dental calculus matrix. *J Periodont Res* 32, 355-361 (1997)
- 41) Filková M, Haluzik M, Gay S and Šenolt L: The role of resistin as a regulator of inflammation: implications for various human pathologies. *Clin Immunol* 133, 157-170 (2009)
- 42) Tilg H and Moschen AR: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 772-783 (2006)
- 43) Schäffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarner I, Schölmerich J, Müller-Ladner U and Gay S: Adipocytokines in synovial fluid. *JAMA* 290, 1709-1710 (2003)
- 44) 藤本清一, 清野佳紀: 骨形成の生化学的マーカーによる病態診断. 松本俊夫編集, 分子骨代謝と骨粗鬆症, メディカルレビュー社, 東京, 279-287 (1996)
- 45) Franke S, Lehmann G, Abendroth K, Hein G and Stein G: OICP as bone formation and NTx as bone resorption marker in patients with chronic renal failure. *Eur J Med Res* 3, 81-88 (1998)
- 46) Nishimura F, Kono T, Fujimoto C, Iwamoto Y and Murayama Y: Negative effects of chronic inflammatory periodontal disease on diabetes mellitus. *J Int Acad Periodontol* 2, 49-55 (2000)
- 47) Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A and Batayha WQ: Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications* 20, 59-68 (2006)
- 48) Bascones-Martinez A, Gonzalez-Febles J and Sanz-Esporrin J: Diabetes and periodontal disease. Review of the literature. *Am J Dent* 27, 63-67 (2014)
- 49) Kajiura Y, Bando M, Inagakib Y, Nagata T and Kido J: Glycated albumin and calprotectin levels in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol* 85, 1667-1675 (2014)
- 50) Goodson JM: Gingival crevice fluid flow. *Periodontol* 2000 31, 43-54 (2003)
- 51) Kido J, Abe K, Yatsushiro S, Bando M, Hiroshima Y, Nagata T, Ooie T, Tanaka M and Kataoka M: Determination of calprotectin in gingival crevicular fluid by immunoassay on a microchip. *Clin Biochem* 45, 1239-1244 (2012)
- 52) 山田圭佑, 大上直人, 岩坂博之, 南部敏之, 木戸淳一: 歯周病診断装置の実現を目指したバイオマーカー検出装置の開発. 日本口腔検査学会 第2回学術大会発表, 広島, 平成21年10月4日.