

慢性歯周炎患者に対する抗菌光線力学療法の
有効性に関する臨床的研究
— 臨床パラメータおよび細菌検査による評価 —

林 鋼兵

明海大学大学院 歯学研究科

歯学専攻

(指導：申 基喆 教授)

The Clinical Study on the Efficacy of Antimicrobial Photodynamic Therapy
on Patients with Chronic Periodontitis
— Evaluation by Clinical Parameters and Bacteria Test —

Kohei HAYASHI

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor : Prof. Kitetsu SHIN)

要 旨

近年、歯周治療の一手法として抗菌光線力学療法 (Antimicrobial Photodynamic Therapy : a-PDT) の基礎的および臨床的検討が行われているが、その有効性については明らかではない。本研究の目的は、慢性歯周炎患者に対するスケーリング・ルートプレーニング (SRP) と a-PDT 単回使用の併用療法の有効性について、歯周病学的臨床パラメータに加え、歯肉溝滲出液および歯周ポケット内細菌叢への影響を検討することとした。慢性歯周炎患者 14 名 (男性 9 名, 女性 5 名, 平均年齢 56.2 ± 11.9 歳) を対象に、4 ~ 6 mm の歯周ポケットを有する上下顎左右の前歯・小臼歯から無作為に 4 歯を選択し、1) SRP のみ (Cont 群), 2) SRP 後, メチレンブルー (MB) を歯周ポケット内に注入 (MB 群), 3) SRP 後, 歯周ポケット内にレーザー照射 (Laser 群), 4) SRP 後, 歯周ポケット内に MB を注入し, レーザー照射 (a-PDT 群) の計 4 群に分類し、比較を行った。評価は、各処置前, 処置後 4, 8, および 12 週に歯周病学的パラメータの測定および歯肉溝滲出液を用いた検査を実施した。検査は処置者と異なる者が実施した。また、処置前及び処置後 4 週に歯周ポケット内細菌検査を実施した。その結果、歯肉からの出血および歯肉溝滲出液量において、a-PDT 群は、Cont 群と比較し、処置後 8, 12 週で有意な減少を認めた。細菌検査において、対総菌数比率は各群ともに減少したものの各群間に有意な差を認めなかったが、術前後を比較した減少率において、a-PDT 群は Cont 群と比較し有意な減少を認めた。以上の結果から、慢性歯周炎に対する SRP と a-PDT 単回使用の併用療法は、SRP 単独による治療と比

較し，歯肉出血，歯肉溝滲出液量を有意に減少させ，歯周ポケット内の歯周病原細菌比率を減少させたことから，歯周疾患活動性を軽減させ，歯周病原細菌に対し，殺菌効果があることが示唆された。

索引用語：抗菌光線力学療法，慢性歯周炎，歯肉溝滲出液，細菌検査

Abstract

Although, Antimicrobial Photodynamic Therapy (a-PDT) has basically and clinically evaluated the effectiveness as one of the therapeutics in the treatment of periodontitis, but the effectiveness was still unknown. The aim of the present study was to evaluate the effectiveness for a single dose of a-PDT adjunctive SRP in patients with chronic periodontitis, by the clinical parameters, gingival crevicular fluids (GCF) and bacterial flora in the periodontal pockets. Fourteen patients with chronic periodontitis (9 males and 5 females, mean age 56.2 ± 11.9 years), anterior and premolar teeth which had probing pocket depth 4 to 6 mm in at least one site in were selected, then randomly divided into the following four groups : scaling and root planning (SRP) alone (Cont group), methylene blue (MB) after SRP (MB group), laser irradiation after SRP (Laser group), MB in combination with laser irradiation (a-PDT group). The all clinical parameters were evaluated at baseline (BL), periodontal and gingival crevicular fluids examination were evaluated at BL and after 4, 8 and 12 weeks (w) by a periodontist who was blinded to the procedure. Bacteria test were performed at BL and 4 w.

As a result, at 8 w and 12 w, bleeding on probing (BOP) and GCF volume were significantly reduced in a-PDT group compared to Cont group. In bacteria test, although ratio versus number of periodonpathic bacteria were reduced in all groups, and there was no significant differences among treatment groups. But the rate of decrease were significantly reduced in

a-PDT group compared to Cont group. From these results suggested that, a-PDT reduced the activity of the chronic periodontitis, and promoted microbiological benefits compared with SRP alone.

Key words : Antimicrobial Photodynamic Therapy, chronic periodontitis, gingival crevicular fluids, bacteria test

緒 言

歯周炎の発症には、多様性に富んだ細菌叢で構成されている細菌性プラーク¹⁾や歯周病原細菌由来の内毒素といった直接因子の他に、歯列不正、不適合な補綴装置、咬合性外傷といった局所的要因、さらには、糖尿病などの全身因子および、喫煙などの環境因子が関与することが報告されている²⁾。歯周炎患者に対する基本治療では、まず局所因子を改善しながら、直接因子である細菌性プラークを排除することが必要となる。その治療法として、従来からブラッシング、手用スクレーラーや超音波スクレーラーなどを用いるスクレーリング・ルートプレーニング (SRP)³⁻⁹⁾、近年では Er:YAG レーザー¹⁰⁾、Nd:YAG レーザー¹¹⁾、CO₂ レーザー¹²⁾ 等を用いるレーザー照射による根面処理、さらにはグリシンパウダー噴霧¹³⁾、オゾン¹⁴⁾ 等を用いたバイオフィルムの破壊や殺菌が行われつつある。しかし、これら物理的プラークコントロールでは深い歯周ポケットや根分岐部等、全ての部位のプラークを除去することは、器具の到達性からも困難なため^{15,16)}、化学療法が併用されている¹⁷⁻²¹⁾。しかし、抗菌薬の全身投与や殺菌剤を含む薬剤等を用いた化学療法は、反復使用による薬剤耐性菌の出現やアレルギー等が懸念されることから²²⁾、これらのような、副作用がない治療法が望まれる。

一方、近年、歯周治療への、光感受性物質と低出力半導体レーザーを組み合わせた新たな方法として抗菌光線力学療法 [Antimicrobial Photodynamic Therapy (a-PDT)]

a-PDTが検討されつつある。 a-PDTはメチレンブルー (MB) やトルイジンブルーOなどの生体に対し為害性の少ない光感受性物質に、低出力半導体レーザーを照射することで一重項酸素を発生させ、細菌に対し殺菌力を発揮する方法²³⁾で、その利点として、反復使用による薬剤耐性菌が出現しないこと、妊婦や授乳中の女性にも安全性が確認されていることが挙げられる^{24,25)}。 a-PDTは抗菌薬とは異なり、その作用機序から細菌以外にもウィルス、真菌などにも有効であることが明らかとなっている²⁶⁾。また、使用する低出力半導体レーザーは発熱が少ないためCO₂レーザーなどその他のレーザーと比較して、生体組織への侵襲も低いことが知られている²⁷⁾。 PDTに使用する光感受性物質として、本研究で使用したメチレンブルーの他にトルイジンブルーO、マラカイトグリーン、インドシアニングリーン、エリスロシン B、ローズベンガルが用いられている。これらの光感受性物質は、メチレンブルーと比較して、いずれも細胞毒性が高く、また組織浸潤性が遅いことが挙げられ、これらと比較し本研究で使用したメチレンブルーは細胞毒性が低く(最小中毒量は15 mg/kg)、組織浸潤性が早いこと、またグラム陰性菌に、より親和性が高いという優位性が挙げられる²⁷⁾。

また、これら光感受性物質を励起するためのさまざまなレーザー光照射装置が開発されている²⁸⁻³⁰⁾。本研究で使用した Periowave の他にメチレンブルーを光感受性物質として用いる a-PDT レーザー照射装置として、HELBO (HELBO, Grieskirchen, Austria), CNI (CNI, Opto-electronics Tech, Changchun, China) がある。また、光感受性物質にトルイジンブルーO を用いる装置として、Fotosan (Fotosan, CMS Dental A/S

Njalsgade, Copenhagen, Denmark), Flashmax2 (CMS Dental, Copenhagen, Denmark), PACT 300 (Cumdente, Tübingen, Germany), PAD Plus (Dentotex, Daventry, UK), Ga-Al-AS (M.M. S.Carlos, São Paulo, Brazil) がある。さらに、インドシアニングリーンを用いる装置として、Perio green (Elexxion AG, Radolfzell, Germany) がある。本研究で使用した Periowave はコードレスのペンタイプで、さらに、ディスプレイの発光チップには、歯周ポケット用、根分岐部用、根管内用の3種類があり、患部への器具到達性や操作性に優れている。

歯周病に対するa-PDTの有効性については、*in vitro*において、Dobsonら³¹⁾が歯周病原細菌に対するa-PDTの有効性を検討した結果、歯周病原細菌数を有意に減少させたと報告している。また、寺西ら³²⁾は歯周病原細菌で汚染させたインプラント体表面の除染にa-PDTを行った結果、細菌数を有意に減少させたと報告している。慢性歯周炎患者に対するa-PDTの臨床応用ではAndersenら³³⁾が、歯周炎患者にSRP、a-PDT単独、SRPとa-PDTの併用療法を行った結果、SRP単独による治療と比較し、SRPとa-PDTの併用療法は、プロービングポケットデプス (PPD)、クリニカルアタッチメントレベル (CAL) の有意な改善が認められたと報告した。この結果に基づき、その後の研究はa-PDTとSRPの併用療法について検討されるようになった。Braunら³⁴⁾は、慢性歯周炎患者に対し、SRP単独による治療とa-PDTとの併用療法を比較し、併用療法によってCALの有意な改善が認められたと報告している。しかしその一方で、de Oliveiraら³⁵⁾は、a-PDT単独使用とSRP単独による治療を比較し、その結果、臨床パ

ラメータに有意差を認めなかったと報告している。さらに、Chondros ら³⁶⁾はSRP単独による治療とa-PDTとの併用療法を比較した結果、PPD、ブリーディングオンプロービング (BOP) において有意差を認めなかったと報告していることから、慢性歯周炎に対するSRPにa-PDTを併用した際の有効性は、未だ明らかになってはいない。また、慢性歯周炎に対するSRPとa-PDTの併用療法の有効性については、臨床パラメータを指標とした検討がほとんどで、細菌学的、生物学的項目に関して検討した報告はない。そこで、本研究では、SRPとa-PDT単回使用を併用した際の有効性を、慢性歯周炎患者に対し、臨床パラメータに歯肉溝滲出液および細菌学的評価を加え検討した。

材料と方法

1. 被験者および被験歯の選択

本研究は、明海大学歯学部附属明海大学病院歯周病科に来院し、慢性歯周炎と診断された患者14名（男性9名，女性5名，平均年齢 56.2 ± 11.9 歳）を対象に行われた。被験者全員の歯周病検査の結果、4 mm ～ 6 mm の歯周ポケットを有する上下顎左右の前歯、小臼歯計 4 歯を無作為に選択し、被験歯とした。また、以下の条件に該当する者は除外した。

- 1) 糖尿病，細菌性心内膜炎，光線過敏症と診断された者
- 2) 喫煙者および6 か月以内に禁煙した者
- 3) 過去3 か月以内に抗菌薬を服用した者
- 4) 妊娠あるいは授乳中の者

被験者には口頭および文書をもとに本研究の目的，概要，安全性，個人情報保護について説明し，同意を得た。なお，本研究は，明海大学歯学部倫理委員会（承認番号 A 1012）の承認を得て実施した。

2. 前処置

前処置として，歯周基本治療であるブラッシング指導を行い，通法に従い，超音波スケーラー（デントクラフト プチピエゾ，ヨシダ，東京）を用いて，歯肉縁上スケーリングと歯冠研磨を行った。また，早期接触を認める場合は咬合調整を行った。

3. 臨床検査および細菌検査

臨床検査はBL時，実験後4, 8, および12 週の計4 回実施した．また細菌検査は実験開始前，および実験後4 週の2 回実施した．臨床検査および細菌検査用サンプルの採取は，同一歯科医師1 名が行い，細菌検査用サンプル採取は対象歯の歯周ポケット最深部より採取した．

1) 歯周病検査

歯周病検査は，プラーク指数，歯肉炎指数，プロービングポケット深さ，プロービング時の出血，クリニカルアタッチメントレベル，および垂直的歯肉退縮量について実施した．

(1) プラーク指数 (plaque index : PII)

Löe³⁷⁾ の方法に従い，対象被験歯の4 歯面 (頬舌側近遠心) のプラーク付着量をスコア0 : プラーク付着なし，1 : プローブの擦過により検知できる，2 : プラークを視認できる，3 : プラークが多量に付着，の4 段階で測定し，指数は，測定値の合計/被験部位数で表した．

(2) 歯肉炎指数 (gingival index : GI)

Silness & Löe³⁸⁾ の方法に従い，対象被験歯の4 歯面 (頬舌側近遠心) の辺縁歯肉の炎症程度を，スコア0 : 臨床的 normal 歯肉，1 : 軽度の炎症を認めるが，プロービング時の出血なし，2 : 中等度の炎症を認め，プロービング時に出血を認める，3 : 重度の炎症を認め，自然出血を認める，の4 段階で測定し，指数は，測定値の合

計/被験部位数で表した。

(3) プロービングポケット深さ (probing pocket depth : PPD)

歯周プローブ (CP15 UNC , Hu-Friedy, Chicago, Illinois, USA) 挿入時の歯肉辺縁からプローブ先端部までの距離を被験歯の6 部位 (頬舌側近遠心中央) に対し, 歯周プローブを用いて1 mm単位で測定し, 測定値の合計/被験部位数で表した。

(4) クリニカルアタッチメントレベル (clinical attachment level : CAL)

セメント - エナメル境からポケット底部までの距離を被験歯の6 部位 (頬舌側近遠心中央) に対し, 歯周プローブを用いて1 mm単位で測定し, 測定値の合計/被験部位数で表した。

(5) プロービング時の出血 (bleeding on probing : BOP)

PPD測定後, 30 秒経過時点で歯周ポケットからの出血の有無を確認し, 測定値の合計/被験部位数を割合で算出した。

(6) 垂直的歯肉退縮量 (vertical gingival recession : VGR)

辺縁歯肉からセメント - エナメル境までの距離を前述の6 部位について, 歯周プローブを用いて1 mm単位で測定し, 測定値の合計/被験部位数で表した。辺縁歯肉がセメント - エナメル境より歯冠側にある場合は, VGRを0 mmとした。

2) 歯肉溝滲出液検査

(1) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 酵素活性

歯肉の炎症や組織破壊程度を推測するため, アスパラギン酸アミノトランスフェ

ラーゼ酵素活性を通法に従い³⁹⁾、AST測定キット (PTMキット, 松風, 京都) を用いてスコア 1 : 800 μ IU未満, 2 : 800 μ IU以上1200 μ IU未満以下, 3 : 1200 μ IU以上1800 μ IU未満, 4 : 1800 μ IU以上, の4段階に分け評価した.

(2) 歯肉溝滲出液量 (GCF) 量

歯肉溝滲出液量は、歯肉の炎症が進行することに伴い、増加することが知られている⁴⁰⁾. そこで、歯肉溝滲出液量の経時的な変化を測定するため、Garnickら⁴¹⁾の方法に従いペリオトロン値を測定後 (Periotoron 8000, Oraflow, Smithtown, New York, USA), 事前に作製した標準曲線をもとにGCF量 (μ l) を算出した.

3) 細菌検査

歯周ポケット内の細菌検査には、real-time PCR法 (サリバチェック・ラボ, ジーシー, 東京) を用い、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) の5菌種についての対総菌数比率, また、各細菌の減少した割合を求めるために、減少率を測定した⁴²⁻⁴⁵⁾. 測定には、TaqManプローブ法, および*Prevotella nigrescens*関連のプライマーを使用した. 通常、健常者の対総菌数比率は*P. gingivalis*, *P. intermedia*共に0%で検出されないことが報告されている⁴⁶⁾. 細菌の採取方法は、コットンロールを用いた簡易防湿下で、被験部位に付着しているプラークを綿球で除去し、風乾後、2本の滅菌ペーパーポイント (アブソorbentポイント #30, Johnson & Johnson,

東京) を歯周ポケット内に挿入し、10 秒間静置後、取り出し添付された検体チューブに回収した。対総菌数比率は、総菌数 (歯周病原細菌を含めたすべての細菌数) に対する歯周病原細菌数の割合として算出し、減少率は、相対的評価を行うため、術後 4 週の対総菌数比率/術前の対総菌数比率の平均値で算出した。

4. 実験群の設定および処置

本研究の実験群は、① Cont 群：SRPのみ実施。② MB 群：SRP後、MB 0.2 ml を歯周ポケット内に注入。③ Laser 群：SRP後、歯周ポケット内へのレーザー照射。④ a-PDT 群：SRPを行った後、MBを注入、レーザー照射、の4 群に設定し、処置を行った。各処置は、歯周病専門医1 名が行った。また、実験の公平性をきすため、全ての処置は二重盲検法で実施した。

1) Cont 群

1/80,000 アドレナリン含有0.01 %キシロカインで局所麻酔後、手用スケーラー (グレーシーキュレット, Hu-Friedy, Chicago, Illinois, USA) および超音波スケーラーを用いて被験歯の歯根が滑沢になるまでSRP を実施、処置後に滅菌生理食塩水を、洗浄針付シリンジ (トッププラスチックシリンジ, 25 gage, 石川医科, 東京) を用い、1 歯につき1 ml/ minの流速で歯周ポケット内全周を洗浄した。

2) MB 群

SRP後に、MB処理の影響を検討するため、簡易防湿後、光感受性薬剤であるMB (0.01 %, Biogel, Ondine, Biopharma, Vancouver, Canada) 0.2 ml を歯周ポケット内全周

に注入し、60 秒後、1 歯につき1 mlの滅菌生理食塩水で歯周ポケット内全周を洗
浄した。

3) Laser 群

SRP後、a-PDT で使用するレーザー単独の影響を検討するため、低出力半導体レー
ザー (Periowave, Periowave Dental Technologies, Toronto, Canada, Fig 1-A) にレーザー
照射用チップ (Fig 1-B) を装着し、チップを歯根表面に沿わせ歯周ポケット内へ挿
入した状態で、波長：670 nm、出力：220 mWのレーザーを照射し、照射後1 歯に
つき1 mlの滅菌生理食塩水で歯周ポケット内を洗浄した。照射は1 部位に対し、10
秒間照射し、頬舌側近遠心中央6 部位、計60 秒間の照射を1 回実施した。

4) a-PDT 群

SRP後、MB 0.2 mlを歯周ポケット内全周に注入し、60 秒後にレーザーを照射し、
照射後1 歯につき1 mlの滅菌生理食塩水で歯周ポケット内全周を洗浄した。

5. 統計学的分析

臨床パラメータにおいて、各群間内および各種パラメータの術前と術後の比較は、
repeated measures ANOVA, Friedman順位検定を行い、さらにそれぞれ有意差を認めた
場合、Bonferoni不等式変法 Wilcoxon順位和検定を用いて評価を行った。統計学的分
析には、統計ソフト IBM SPSS statistics 20 (日本アイ・ビー・エム, 東京) を使用した。

結 果

1. 臨床パラメータの評価

BL時において、各臨床パラメータ、および細菌学的パラメータ共に各群間に有意差を認めなかった。

1) PII

各群における PII の経時的な変化を Fig 2 に示す。 PII (mean \pm SE) は BL 時, Cont 群で 0.35, MB 群で 0.42 ± 0.13 , Laser 群で 0.35 ± 0.17 , a-PDT 群で 0.35 ± 0.17 であったのに対し, 術後 4 週では Cont 群において, 0.35 ± 0.13 , MB 群で 0.57 ± 0.20 , Laser 群で 0.42 ± 0.14 , a-PDT 群で 0.50 ± 0.14 であった。 術後 8 および 12 週でも BL 時と比較し, 多少の増加傾向を認めるが各群とも有意な変化は認めなかった。 また, 各群間にも有意差は認めなかった。

2) GI

各群における GI の経時的な変化を Fig 3 に示す。 GI (mean \pm SE) は BL 時と術後 4, 8 および 12 週を比較して Cont 群, MB 群において, 全ての期間で有意な減少を認めた ($p < 0.05$)。 また, BL 時と術後 4, 8 週を比較して, Laser 群は, 有意な減少を認めた ($p < 0.05$)。 また, BL 時において, a-PDT 群は, 0.71 ± 0.22 であったのに対し, 術後 4 週で 0.28 ± 0.13 , 12 週で 0.25 ± 0.12 と有意な減少を認めた ($p < 0.05$)。 しかし, 各群間に有意な差は認めなかった。

3) PPD

各群における PPD の経時的な変化を Fig 4 に示す。 BL 時と術後 4, 8 および 12 週を比較し, 全ての群において有意な減少を認めた ($p<0.05$)。 BL 時 PPD (mean \pm SE) は, Cont 群が 5.07 ± 0.44 mm で, 術後 12 週は 3.16 ± 0.56 mm であったのに対し, a-PDT 群は術前が 4.64 ± 0.17 mm, 術後 12 週が 2.41 ± 0.21 mm と, Cont 群と比較して, a-PDT 群がより減少傾向を認めたが, 各群間に有意差は認めなかった。 以上のように, Cont 群と比較し, SRP 単独による治療あるいは SRP と a-PDT によって局所の歯周ポケット深さは減少したが, 併用療法による有意な差は認められなかった。

4) CAL

各群における CAL の経時的な変化を Fig 5 に示す。 BL 時と術後 4, 8, および 12 週を比較し, 全ての群において有意な減少を認めた ($p<0.05$)。 BL 時 CAL (mean \pm SE) は, Cont 群が 5.78 ± 0.53 mm で, 術後 12 週は 3.83 ± 0.59 mm であったのに対し, a-PDT 群は術前が 5.21 ± 0.26 mm, 術後 12 週が 2.91 ± 0.35 mm と, Cont 群と比較して, より減少傾向を認めたが, 群間内に有意差は認めなかった。 以上のように Cont 群と比較し, SRP 単独による治療あるいは SRP と a-PDT によって CAL は改善するものの, 各群間に有意な差は認められなかった。

5) BOP

各群における BOP の経時的な変化を Fig 6 に示す。 BL 時と比較して術後 4, 8 お

よび 12 週で、全ての群において有意な減少を認めた ($p<0.05$). BL 時 BOP (mean \pm SE) は、Cont 群が $47.50 \pm 9.53\%$ 、術後 4 週が $23.15 \pm 8.44\%$ 、8 週が $20.46 \pm 7.28\%$ 、12 週が $22.16 \pm 5.51\%$ 、MB 群が、BL 時 $48.78 \pm 7.70\%$ 、術後 4 週が $23.07 \pm 5.68\%$ 、8 週が $28.15 \pm 6.79\%$ 、12 週が $18.08 \pm 4.44\%$ 、Laser 群が、BL 時 $51.64 \pm 9.33\%$ 、術後 4 週が 15.38 ± 6.52 、8 週が 15.46 ± 4.93 、12 週が $20.83 \pm 5.86\%$ であったのに対し、BL 時の a-PDT 群は $54.64 \pm 6.87\%$ 、術後 4 週が $14.15 \pm 7.66\%$ 、8 週が $11.61 \pm 5.49\%$ 、12 週が $11.25 \pm 2.91\%$ と、術後 4、8 および 12 週において、Cont 群と比較して有意な減少を認めた ($p<0.05$). また、術後 4 および 8 週において MB 群、12 週において Laser 群と比較し、有意な減少を認めた ($p<0.05$). 尚、BOP は各治療群における経時的変化を明示するため、評価期間による BOP の経時的変化をグラフに表記した.

6) VGR

各群における VGR の経時的な推移を Fig 7 に示す. VGR (mean \pm SE) は BL 時、Cont 群において 0.64 ± 0.31 mm、MB 群において 0.42 ± 0.17 mm であったのに対し、術後 4 週では、Cont 群において 0.78 ± 0.32 mm、MB 群において 0.64 ± 0.20 mm と増加傾向を認めたが、有意差を認めなかった. 術後 8 および 12 週でも BL 時と比較して、Laser 群、a-PDT 群において多少の増加傾向を認めるが有意な変化は認めなかった. また、各群間にも有意な差は認めなかった.

7) AST 酵素活性

各群における AST 酵素活性 (mean \pm SE) の経時的な推移を Fig 8 に示す. BL 時と術後 4, 8, および 12 週を比較し, Cont 群は有意な減少を認めなかった. 一方, BL 時において MB 群は, 2.07 ± 0.25 , 術後 4 週で 1.42 ± 0.17 , 8 週で 1.30 ± 0.17 , 12 週で 1.33 ± 0.20 と, 有意な減少を認めた. また, BL 時において, a-PDT 群は, 1.92 ± 0.20 , 術後 4 週で 1.21 ± 0.11 , 8 週で 1.00 , 12 週で 1.08 ± 0.07 , と有意な減少を認めた. しかし, 各群間に有意差は認めなかった.

8) GCF 量

各群における GCF 量の経時的な推移を Fig 9 に示す. BL 時と比較して術後 4, 8, および 12 週で, 全ての群において有意な減少を認めた ($p < 0.05$). GCF 量 (mean \pm SE) は, Cont 群が, BL 時 $0.28 \pm 0.06 \mu\text{l}$, 術後 4 週で $0.27 \pm 0.05 \mu\text{l}$, 8 週で $0.29 \pm 0.06 \mu\text{l}$, 12 週で $0.28 \pm 0.05 \mu\text{l}$, MB 群が, BL 時 $0.30 \pm 0.05 \mu\text{l}$, 術後 4 週で $0.26 \pm 0.04 \mu\text{l}$, 8 週で $0.27 \pm 0.06 \mu\text{l}$, 12 週で $0.29 \pm 0.07 \mu\text{l}$, Laser 群が, BL 時 $0.31 \pm 0.06 \mu\text{l}$, 術後 4 週で $0.24 \pm 0.03 \mu\text{l}$, 8 週で $0.22 \pm 0.07 \mu\text{l}$, 12 週で $0.24 \pm 0.05 \mu\text{l}$ であったのに対し, BL 時において, a-PDT 群は $0.33 \pm 0.05 \mu\text{l}$, 術後 4 週が $0.19 \pm 0.03 \mu\text{l}$, 8 週が $0.16 \pm 0.02 \mu\text{l}$, 12 週が $0.16 \pm 0.06 \mu\text{l}$ と, 術後 8 および 12 週において, Cont 群および MB 群と比較して有意な減少を認めたが ($p < 0.05$), Laser 群と比較して, より減少傾向を認めたものの有意な減少は認められなかった. 尚, GCF 量も各治療群における経時的变化を明示するため, 評価期間による GCF 量の経時的变化をグラフに表記

した.

2. 細菌学的パラメータの評価

1) 対総菌数比率

対総菌数比率 (採取された総細菌数における各種細菌の割合) の経時的な変化を Fig 10 に示す. 対総菌数比率 (mean \pm SE) は各菌種ともBL時と術後4 週を比較し, 減少傾向を認めた. *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* においては, BL時と術後4 週を比較し, 全ての群で有意な減少を認めた ($p < 0.05$). *P. gingivalis* においては, Cont 群がBL時 3.50 ± 1.88 %, 術後4 週が 0.42 ± 0.21 %, a-PDT 群がBL時 4.96 ± 1.84 %, 術後4 週が 0.45 ± 0.29 %, *T. forsythia* においては, Cont 群がBL時 0.87 ± 0.26 %, 術後4 週が 0.25 ± 0.14 %, a-PDT 群がBL時 1.42 ± 0.34 %, 術後4 週が 0.16 ± 0.03 %, *T. denticola* においては, Cont 群がBL時 0.77 ± 0.30 %, 術後4 週が 0.17 ± 0.11 %, a-PDT 群がBL時 1.29 ± 0.45 %, 術後4 週が 0.06 ± 0.04 %, と群間に有意差は認めなかったもののCont 群と比較してa-PDT 群は, より減少傾向を認めた.

2) 減少率

今回測定した歯周病原細菌における対総菌数比率の減少率 (術後4 週の対総菌数比率/術前の対総菌数比率のmean \pm SE) を Fig 11 に示す. 減少率は, *T. forsythia* において, Cont 群が 34.17 ± 1.46 %, a-PDT 群が 2.73 ± 1.71 %, また, *T. denticola* においてCont 群が 26.17 ± 0.12 %, a-PDT 群が 4.23 ± 0.32 %と, Cont 群と比較し, a-PDT 群は有意な減少を認めた ($p < 0.05$). 他の2菌種に関しては, Cont 群と比較

し、a-PDT 群は有意な減少は認めなかったものの、より減少傾向を認めた。

考 察

慢性歯周炎患者へのa-PDTの有用性については、すでいくつかの研究報告がある。a-PDTの単独使用については、Yilmazら⁴⁷⁾が臨床的な有用性を見いだせなかったと報告し、さらに、Al-Zahraniら⁴⁸⁾は糖尿病患者の歯周治療にa-PDTを使用した。末梢血中の血糖値も含め臨床パラメータに有意な変化を認めなかったと報告しており、慢性歯周炎患者へのa-PDT単独使用の有効性は限局的である可能性が高い。それに対して、慢性歯周炎患者に対しSRPに併用しa-PDTを用いた場合、de Oliveiraらが臨床パラメータ³⁵⁾および歯肉溝滲出液中のtumor necrosis factor-alpha (TNF- α) やreceptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) の濃度⁴⁹⁾に有意な差を認めなかったと報告した以外、Andersen³³⁾、Braun³⁴⁾、Christodoulides⁵⁰⁾、Chondrosら³⁶⁾は、SRP単独と比較して臨床パラメータに有意な差が認められたことを報告している。しかし、SRPとa-PDTを併用した時の歯周ポケット内細菌叢におよぼす影響については、Polanskyら⁵¹⁾は変化がないとしているのに対し、Chondrosら³⁶⁾は一部の細菌叢に変化が認められたとしており、結論は導き出されていない。

本研究結果から、SRPにa-PDTを併用した場合、それが単回処置であっても、BOPやGCF量に有意な減少を認め、さらには、歯周ポケット内細菌叢中の歯周病原細菌に対しても有意な減少効果を認めたことは、先に報告された併用療法による臨床パラメータの改善だけではなく、歯周ポケット内の歯周病原細菌にも影響し、ポケット内

細菌叢に変化が及んだことを明らかにした。

この中で、まず、臨床パラメータの各項目について、着目すると、本研究では、PPD、CALはa-PDT以外の実験群も経週の減少傾向を示したが、各群間に有意差を認めなかった。この理由として、SRP単独による治療によってPPDやCALの値は改善するものの、a-PDTを併用してもこれらの指標に対しては影響を及ぼさなかったことが示唆される。SRPがPPD、CALに及ぼす影響について、Baderstenら⁵²⁾が5 mm以上の歯周ポケットを有する重度歯周炎患者に対し、SRPを行い、その結果、術後3 か月でPPD、CALが有意に改善したと報告している。Andersenら³³⁾は、中等度～重度慢性歯周炎患者に対し、PPD、CALにおいて、術後6、12 週でSRP単独による治療、a-PDT単独と比較して、SRPとa-PDTの併用療法は有意な改善を認めたと報告している。一方、Lulicら⁵³⁾は、歯周治療後に5 mm 以上の歯周ポケットが残存した慢性歯周炎患者に対し、PPD、CALにおいて、術後3、6か月ではSRP単独による治療と比較して、SRPとa-PDTの併用療法がより減少傾向を示したが、有意な差は認めなかったと報告している。被験者数などの条件は多少異なるものの、本研究はLulicら⁵³⁾の研究と類似した結果を示したと考えられる。

つぎに、本研究でa-PDTのBOPに及ぼす影響について調査した結果、BOPは術後8 および12 週でa-PDT 群はCont 群と比較し、有意な減少を認めた。また、a-PDT 群はMB 群と比較しても術後4、8 週で有意な減少を認めた。Greensteinら⁵⁴⁾は、BOPが認められた部位では炎症性細胞浸潤の割合が増加することから、BOPは歯周ポケット内

の炎症の客観的指標となると報告している。Baderstenら⁵²⁾は5 mm以上の歯周ポケットを有する重度歯周炎患者に対し、SRPを行い、その結果、術後12 か月でBOPが改善したと報告している。本研究結果から、Cont 群、MB 群と比較しa-PDT 群においてBOPが有意に改善した理由として、SRP後にa-PDTを行うことにより、SRP単独処置と比較してa-PDTが炎症性細胞の浸潤を抑制したことが示唆される。さらにLuchesiら⁵⁵⁾がLindhe & Nymanの分類で、2度の根分岐部病変に対しa-PDTを行ったところ、臨床的指標に有意な差は認めなかったが、歯肉溝滲出液中のinterleukin (IL) -1 β , IL-8の分泌量が有意に減少したと報告している。このことから、a-PDTにより局所の炎症性サイトカインが減少した結果、BOPが減少したことも考えられる。

本研究では、臨床パラメータに加え、歯周ポケット内の歯周病原細菌検査と歯肉溝滲出液検査を行った。歯周疾患の進行した深い歯周ポケットでは、通常グラム陰性嫌気性菌が多く検出され、それら細菌が疾患の活動性に大きく関与していると考えられている¹⁾。歯周病に対し、臨床パラメータに加えて細菌検査を行うことは、細菌学的なリスク判定、予後の予測において有用な手段であると考えられる。しかし、a-PDTの歯周ポケット内細菌叢への影響を調べた研究はほとんどなく、red complexに属する歯周病原細菌に関する調査、研究について言及したものは少ない。また、慢性歯周炎における炎症程度の強さや、疾患活動性を知るうえで歯肉溝滲出液を調べることは重要で、炎症の進行に伴い、滲出液量が増加することはよく知られている⁴⁰⁾が、a-PDTによる歯肉溝滲出液量の変化をみた研究はない。そこで、a-PDTのGCF 量に対する影

響について調べたところ、a-PDT 群はCont 群、MB 群と比較して、術後8および12 週で有意な減少を認めた。この理由として、Qadriら⁵⁶⁾は、慢性歯周炎に対し、低出力レーザーを使用した際に、GCF 量が減少したと報告しており、その根拠としてSakuraiら⁵⁷⁾の論文を参考にしている。Sakuraiらはリポ多糖で刺激したヒト歯肉線維芽細胞に低出力レーザーを照射した結果、cyclooxygenase (COX) -2 mRNAレベルを減少させることにより、歯肉線維芽細胞由来の (prostaglandinE₂) PGE₂産生が抑制されることを明らかにした。Offenbacherら⁵⁸⁾は局所に炎症が起こることにより、GCF中のPGE₂が増加すると報告している。このことから、GCF中に含まれる炎症性ケミカルメディエーターのPGE₂を抑制することでGCF 量が減少したと推察される。

つぎに、本研究で歯周ポケット内の細菌検査を行った結果、a-PDTの歯周病原細菌叢におよぼす影響については*P. gingivalis*, *T. denticola*, *P. intermedia* は術前と術後を比較し、対総菌数比率は各種菌において減少したものの各群間では有意差を認めなかった。その一方で、減少率では*T. forsythia*, *T. denticola* においてCont 群と比較して、a-PDT 群は有意に減少した。a-PDTによる歯周ポケット内細菌叢の変化について、Luchesiら⁵⁵⁾が、a-PDTにより*P. gingivalis*, *T. forsythia* が有意に減少したと報告している。また、Petelinら⁵⁹⁾は、4 mm以上の歯周ポケットを有する慢性歯周病患者に対し、SRP単独による治療と比較し、SRPとa-PDTの併用療法では*T. forsythia*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* が有意に減少したと報告していることから、a-PDTをSRPと併用して使用することにより、歯周ポケット内の歯周病原細菌を減少させることが強く

示唆される。

さらに、慢性歯周炎患者においてa-PDTを併用すると、BOPの減少やGCF量の減少など宿主の炎症性細胞に対しても何らかの影響をおよぼす可能性も考えられる。

a-PDTの宿主細胞に及ぼす影響について言及した研究として Séguierら⁶⁰⁾は、a-PDTによって慢性歯周炎患者の歯周組織に存在するCD68陽性細胞数を減少させると報告している。また藤村ら⁶¹⁾は、低出力の半導体レーザーの歯肉上皮細胞に与える影響を検討し、その結果、レーザー照射群は、非照射群と比較して、リポ多糖刺激歯肉上皮細胞のIntercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) 遺伝子発現量が3倍高まったことや、IL-8のmRNA発現を有意に抑制したと報告している。さらに、茂呂ら⁶²⁾が血管新生に対するレーザー照射の影響を検索する目的で、血管内皮細胞由来のvascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) を蛍光抗体法を用いて観察した結果、レーザー非照射群と比較し、レーザー照射群では、血管内皮細胞の増殖、遊走、接着および管腔形成のすべての過程が、早期に認められたと報告している。これらの研究結果からも、a-PDTが宿主由来の各種細胞に対しても影響をおよぼしている可能性が示唆されており、今後の検討が待たれる。

さらに a-PDT の細菌に対する細胞膜破壊に伴う殺菌以外の作用機序について Brahamら⁶³⁾は、a-PDTによる *P. gingivalis* の殺菌効果と *P. gingivalis* 由来タンパク質分解酵素の不活性化に対する作用をそれぞれ検討したところ、殺菌効果と比較しタンパク質分解酵素の不活性化に対し、より強く作用していたと報告している。以上のことから、

a-PDT は本研究の結果および，藤村ら⁶¹⁾，茂呂ら⁶²⁾の報告を含めて考察すると，細菌に対して一重項酸素等による細菌の細胞膜破壊による直接的な殺菌作用だけでなく，歯周組織中の炎症性細胞数の減少，上皮細胞由来の炎症性サイトカインの産生抑制や上皮細胞の接着分子の発現増強，血管内皮細胞の増殖，遊走能，管腔形成の促進，歯肉線維芽細胞による PGE₂ 産生抑制など，宿主由来の細胞に対しても様々な影響を及ぼしている可能性が示唆されていることから，慢性歯周炎に対する a-PDT の作用機序についてはさらに詳細な検討が必要であると思われる。

今後は慢性歯周炎患者への a-PDT の新たな検討課題として，複数回処置，症状安定期における a-PDT の定期的適用等の有用性についても検討し，a-PDT の慢性歯周炎に対する有効性を検討して行きたい。

結 論

慢性歯周炎の治療に対し、SRPとa-PDTの併用療法は、歯肉溝滲出液量および歯肉からの出血を有意に減少させることにより、SRP単独による治療と比較し処置後の疾患活動性をより軽減させることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究にご理解，またご指導を賜りました明海大学大学院歯学研究科歯学専攻再生再建医療系歯周病学 申 基喆教授に深甚なる謝意を表します．

さらに，ご指導，ご校閲を賜りました本学大学院歯学研究科歯学専攻機能系口腔微生物学 大森喜弘教授，ならびに生体材料系歯科材料学 中嶋 裕教授，再生再建医療系補綴学 藤澤政紀教授に深甚なる謝意を表します．また，ご協力いただいた本学歯学部口腔生物再生医工学講座歯周病学分野各位に，心より感謝申し上げます．

引用文献

- 1) Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C and Kent RL Jr : Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol **25**, 134-144, 1998
- 2) Clarke NG and Hirsch RS : Personal risk factors for generalized periodontitis. J Clin Periodontol **22**, 136-145, 1995
- 3) Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L and Bratthall G : Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease : A clinical study. J Clin Periodontol **9**, 115-128, 1982
- 4) Lindhe J, Westfelt E and Nyman S : Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. J Clin Periodontol **11**, 448-458, 1984
- 5) Drisko CH : Nonsurgical periodontal therapy. Periodontol 2000 **25**, 77-88, 2001
- 6) Hinrichs JE, Wolff LF, Pihlstrom BL, Schaffer EM, Liljemark WF and Bandt CL : Effects of scaling and root planing on subgingival microbial proportion standardized in terms of their naturally occurring distribution. J Periodontol **56**, 187-194, 1985
- 7) Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RLJ and Socransky SS : The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. J Clin Periodontol **24**, 324-334, 1997
- 8) Rabbani GM, Ash MM and Caffesse RG : The effectiveness of subgingival scaling and

root planing in calculus removal. J Periodontol **52**, 119-123, 1981

9) Brayer WK, Mellonig JT, Dunlap RM, Marinak KW and Carson RE : Scaling and root planing effectiveness : the effect of root surface access and operator experience. J Periodontol **60**, 67-72, 1989

10) Schwarz F, Sculean A, Georg T and Reich E : Periodontal treatment with an Er;YAG laser compared to scaling and root planing. A controlled clinical study. J Periodontol **72**, 361-367, 2001

11) Cobb CM, McCawley TK and Killoy WJ : A preliminary study on the effects of the Nd ; YAG laser on root surfaces and subgingival microflora in vivo. J Periodontol **63**, 701-707, 1992

12) Mullins SL, MacNeill SR, Rapley JW, Williams KB, Eick JD and Cobb CM : Subgingival microbiologic effects of one-time irradiation by CO₂ laser : a pilot study. J Periodontol **78**, 2331-2337, 2007

13) Moëne R, Décaillet F, Andersen E and Mombelli A : Subgingival plaque removal using a new air-polishing device. J Periodontol **81**, 79-88, 2010

14) Al Habashneh R, Alsalman W and Khader Y : Ozone as an adjunct to conventional nonsurgical therapy in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. J Periodontal Res **1**, 37-43, 2015

- 15) Waerhaug J : The furcation problem. Etiology, pathogenesis, diagnosis, therapy and prognosis. J Clin Periodontol **7**, 73-95, 1980
- 16) Nylund K and Egelberg J : Antimicrobial irrigation of periodontal furcation lesions to supplement oral hygiene instruction and root debridement. J Clin Periodontol **17**, 90-95, 1990
- 17) Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS and Feres M : Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. J Clin Periodontol **31**, 1070-1076, 2004
- 18) Feres M, Soares GM, Mendes JA, Silva MP, Favari M, Teles R, Socransky SS and Figueiredo LC : Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis : a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. J Clin Periodontol **39**, 1149-1158, 2012
- 19) Yilmaz S, Kut B, Gursoy H, Eren-Kuru B, Noyan U and Kadir T : Er ; YAG laser versus systemic metronidazole as an adjunct to non-surgical periodontal therapy : a clinical and microbiological study. Photomed Laser Surg **30**, 325-330, 2012
- 20) Krayer JW, Leite RS and Kirkwood KL : Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. Dent Clin North Am **54**, 13-33, 2010
- 21) 王宝禮 : 歯周病に対する経口抗菌薬は有効なのか. 日歯医師会誌 **62**, 930-941, 2009

- 22) Van Winkelhoff AJ, Rams TE and Slots J : Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000 **22**, 1045-1078, 1996
- 23) Lambrecht B, Mohr H, Knüver-Hopf J and Schmitt H : Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang* **60**, 207-213, 1991
- 24) Wainwright M : Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrobial Chemotherapy* **42**, 13-28, 1998
- 25) 長谷部晃, 柴田健一郎 : 光線力学療法の歯科への応用. *北海道歯誌* **32**, 230-232, 2012
- 26) Konopka K and Goslinski T : Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* **86**, 694-707, 2007
- 27) Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpel A, Holletschke A, Pfister W and Schütze J : Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol* **81**, 975-981, 2010
- 28) Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, Spolidório DM, de Toledo BE and Garcia VG : Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci* **27**, 687-693, 2012

- 29) Esposito M, Grusovin MG, De Angelis N, Camurati A, Campailla M and Felice P : The adjunctive use of light-activated disinfection (LAD) with FotoSan is ineffective in the treatment of peri-implantitis : 1-year results from a multicentre pragmatic randomised controlled trial. Eur J Oral Implantol **6**, 109-119, 2013
- 30) Betsy J, Prasanth CS, Baiju KV, Prasanthila J and Subhash N : Efficacy of photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis : a randomized controlled clinical trial. J Clin Periodontol **41**, 573-581, 2014
- 31) Dobson J and Wilson M : Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low power laser. Arch Oral Biol **37**, 883-887, 1992
- 32) 寺西麻里奈, 谷田部一大, 丸山実樹, 渡辺和志, 石井麻紀子, 大塚秀春, 申 基 喆 : 抗菌光線力学療法を用いたインプラント周囲炎の治療法に関する *in vitro* 研究. 日歯周誌 **55** (春季特別号), 91, 2013
- 33) Andersen R, Loebel N, Hammond D and Wilson M: Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling root planing. J Clin Dent **18**, 34-38, 2007
- 34) Braun A, Dehn C, Krause F and Jepsen S : Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment : a randomized clinical trial. J Clin Periodontol **35**, 877-884, 2008

- 35) de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr and Taba M Jr: Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* **78**, 965-973, 2007
- 36) Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N and Sculean A : Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance : a randomized controlled clinical trial. *Laser Med Sci* **24**, 681-688, 2009
- 37) Löe H: The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* **38** Suppl, 610-616, 1967
- 38) Silness J and Löe H : Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontol Scand* **21**, 533-551, 1963
- 39) Persson GR and Page RC : Diagnostic characteristics of crevicular fluid aspartate aminotransferase (AST) levels associated with periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* **19**, 43-48, 1992
- 40) Hancock EB, Cray RJ and O'Leary TJ : The relationship between gingival crevicular fluid and gingival inflammation. A clinical and histologic study. *J Periodontol* **50**, 13-19, 1979
- 41) Garnick JJ, Pearson R and Harrell D : The evaluation of the periotron. *J Periodontol*, **50**,

424-426, 1979

42) Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Kawada M and Koga T : Development of a 5' Fluorogenic Nuclease-Based Real-Time PCR Assay for Quantitative Detection of

Actinobacillus actinomycetemcomitans and *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Microbiol **41**,

863-866, 2003

43) Yoshida A, Kawada M, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Saito T and Yamashita Y :

TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for the correlation of *Treponema denticola* numbers with the severity of periodontal disease. Oral Microbiol Immunol **19**, 196-200, 2004

44) Suzuki N, Yoshida A, Saito T, Kawada M and Nakano Y : Quantitative

Microbiological Study of Subgingival Plaque by Real-Time PCR Shows Correlation between Levels of *Tannerella forsythensis* and *Fusobacterium*. J Clin Microbiol **42**, 2255-2257, 2004

45) Nagashima S, Yoshida A, Suzuki N, Ansai T and Takehara T : Use of the Genomic Subtractive Hybridization Technique To Develop a Real-Time PCR Assay for Quantitative

Detection of *Prevotella* in Oral Biofilm Samples. J Clin Microbiol **43**, 2948-2951, 2005

46) 伊藤公一 : 抗菌療法に必要な細菌検査および歯周検査. In : 歯周病患者における抗菌療法の指針 日本歯周病学会編, 医歯薬出版, 東京, pp80, 2010

47) Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D and Kadir T : Effect of gallium

arsenide diode laser on human periodontal disease : a microbiological and clinical study.

Lasers Surg Med **30**, 60-66, 2002

48) Al-Zahrani MS, Bamshmous SO, Alhassani AA and Al-Sherbini MM : Short-term effects of photodynamic therapy on periodontal status and glycemic control of patients with diabetes. J Periodontol **80**, 1568-1573, 2009

49) de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, Scombatti de Souza SL and Ribeiro FJ : Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis : cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. J Periodontol **80**, 98-105, 2009

50) Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R and Sculean A : Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment : a randomized controlled clinical trial. J Periodontol **79**, 1638-1644, 2008

51) Polansky R, Haas M, Heschl A and Wimmer G : Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. J Clin Periodontol **36**, 575-580, 2009

52) Badersten A, Nilveus R and Egelberg J : Effect of non-surgical periodontal therapy (II). Severly advanced periodontitis. J Clin Periodontol **11**, 63-76, 1984

53) Lulic M, Leiggenger, Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N and Lang NP : One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal

maintenance : a proof-of-principle randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **36**, 661-666, 2009

54) Greenstein G, Caton J and Polson AM : Histologic characteristics associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation. *J Periodontol* **52**, 420-425, 1981

55) Luchesi VH, Pimentel SP, Kolbe MF, Ribeiro FV, Casarin RC, Nociti FH Jr, Sallum EA and Casati MZ : Photodynamic therapy in the treatment of class II furcation : a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **40**, 781-788, 2013

56) Qadri T, Miranda L, Tunér J and Gustafsson A : The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* **32**, 714-719, 2005

57) Sakurai Y, Yamaguchi M and Abiko Y : Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* **108**, 29-34, 2000

58) Offenbacher S, Odle BM and Van Dyke TE : The use of crevicular fluid prostaglandin E₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res* **21**, 101-112, 1986

59) Petelin M, Perkič K, Seme K and Gašpirc B : Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci*, 2014. DOI 10. 1007/S 10103-014-1632-2

- 60) Séguier S, Souza SL, Sverzut AC, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, Corrêa VM, Coulomb B and Tedesco AC : Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J Photochem Photobiol B* **101**, 348-354, 2010
- 61) 藤村岳樹, 福田光男, 三谷章雄, 大澤数洋 : 半導体レーザーと光感受性物質を用いた a-PDT が上皮細胞に与える影響. *日レーザー歯会誌* **23** (抄録集), 16, 2011
- 62) 茂呂祐利子 : 半導体レーザー照射が血管新生におよぼす影響. *日レーザー歯会誌* **17**, 104-117, 2006
- 63) Braham P, Herron C, Street C and Darveau R : Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. *J Periodontol* **80**, 1790-1798, 2009

Figure legends

Fig 1 The diode laser for a-PDT.

The diode laser [Periowave, (A)] , a fiber optic applicator which applied to periodontal pocket (B)

Fig 2 Changes in PII values with time.

At 8, and 12 w, plaque index (mean \pm SE) were increased slightly, but there was no significant differences among treatment groups.

Fig 3 Changes in GI values with time.

At 4, 8, and 12 w, gingival index (mean \pm SE) were significantly reduced in Cont group and MB group. At 4, 12 w, gingival index were significantly reduced in a-PDT group, but there was no significant differences among treatment groups.

Fig 4 Changes in PPD values with time.

PPD (mean \pm SE) were reduced slightly over week, but there was no significant differences among treatment groups.

Fig 5 Changes in BOP values with time.

At 4, 8, and 12 w, BOP (mean \pm SE) were significantly reduced in all groups. At 4, 8 w, BOP were significantly reduced in a-PDT group compared to Cont group.

Fig 6 Changes in CAL values with time.

CAL (mean \pm SE) were reduced slightly over week, but there was no significant differences among treatment groups.

Fig 7 Changes in VGR values with time.

At 8, and 12 w, VGR (mean \pm SE) were increased slightly, but there was no significant differences among treatment groups.

Fig 8 Changes in AST enzymic activity values with time.

AST (mean \pm SE) were reduced slightly over week, but there was no significant differences among treatment groups.

Fig 9 Changes in GCF amounts values with time.

GCF amounts (mean \pm SE) were reduced slightly over week, but, there was no significant differences. While, at 4, 8, and 12 w, GCF amounts were significantly reduced in Cont group. At 4, and 8 w, GCF amounts were significantly reduced in a-PDT group compared to Cont group and MB group.

Fig 10 Changes in periodonpathic bacteria ratio vs total bacteria.

In microbiological parameters, periodonpathic bacteria ratio vs total bacteria (mean \pm SE) were reduced in all groups, but there was no significant differences among treatment groups.

Fig 11 Change in the rate of decrease.

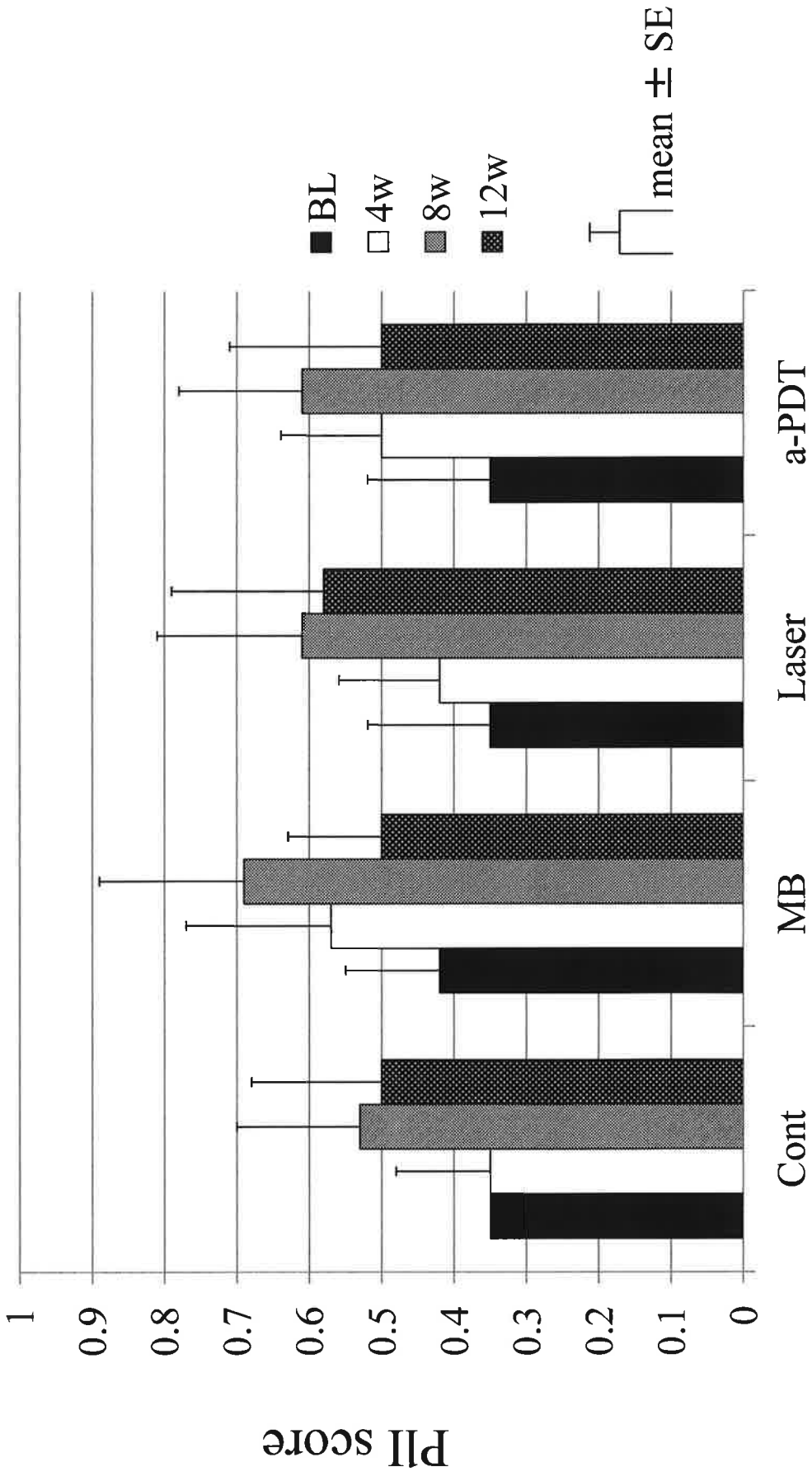
The rate of decrease (mean \pm SE) were significantly different among treatment groups.

Fig 1



Fig 2

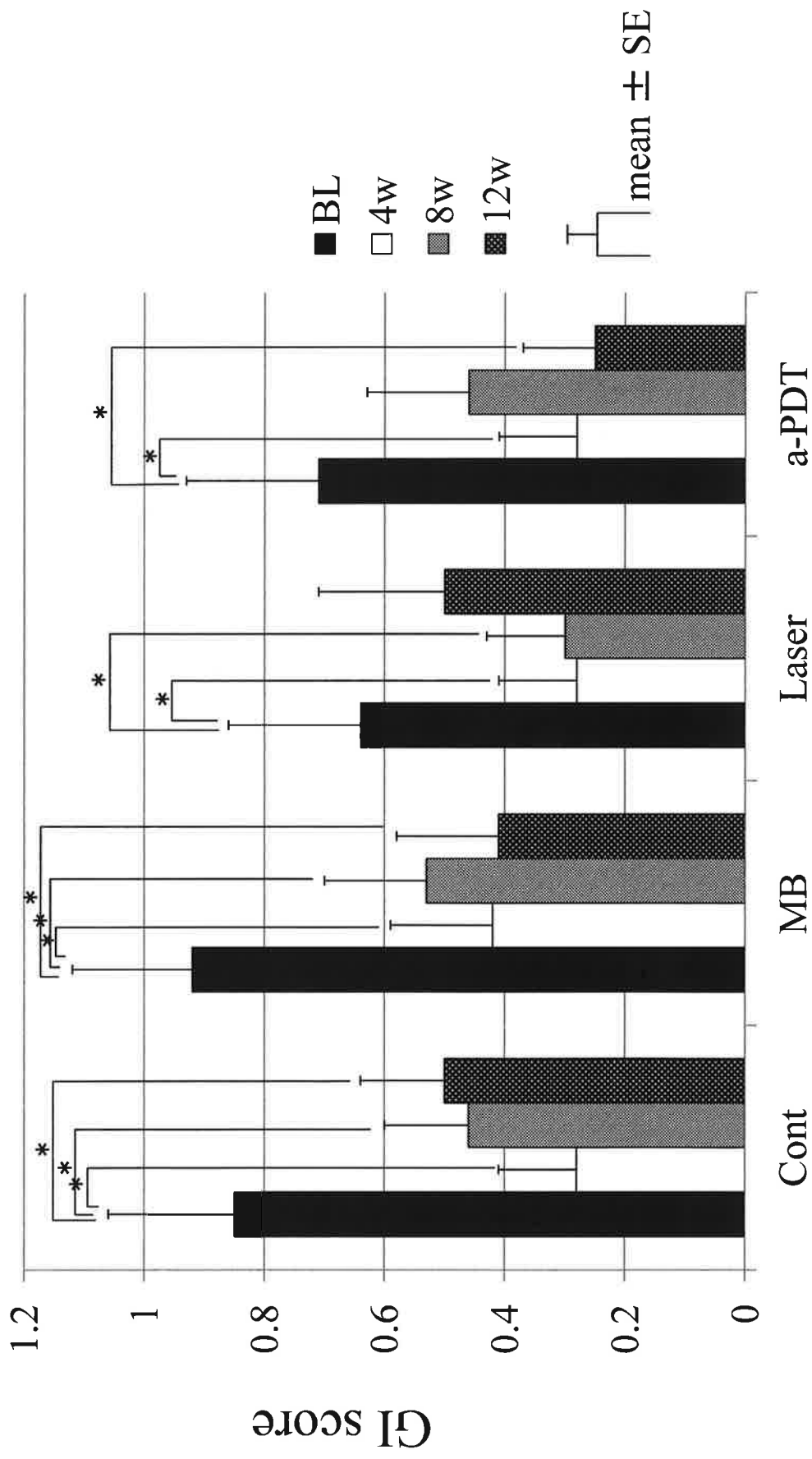
n=14 (male; 9, female; 5)



Differences among treatment groups were not significant
Differences between BL and 4 w, 8 w, 12 w were not significant

Fig 3

n=14 (male; 9, female; 5)

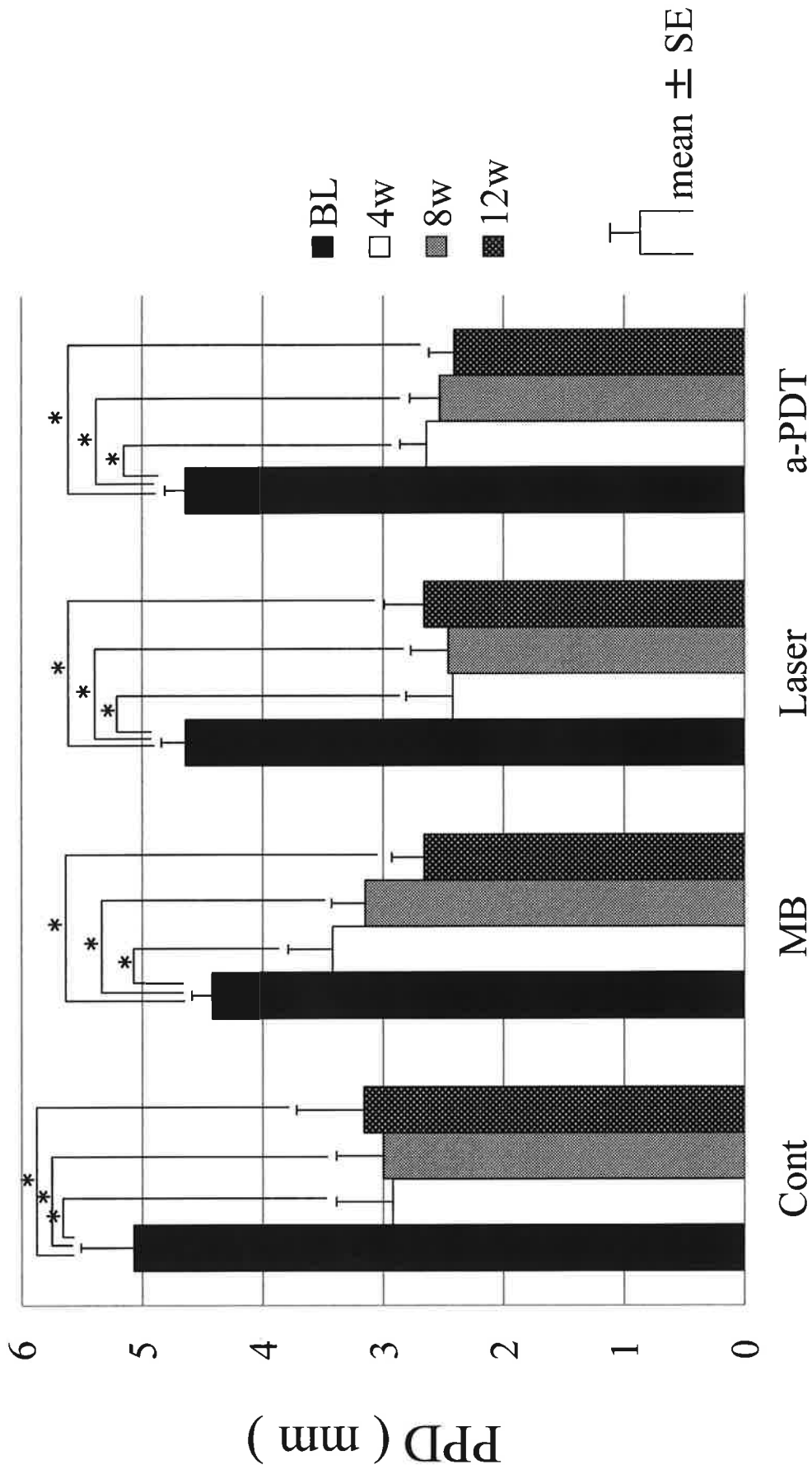


Differences among treatment groups were not significant

Differences between BL and 4 w, 8 w, 12 w were significant at * $p < 0.05$ (repeated measures ANOVA)

Fig 4

n=14 (male; 9, female; 5)

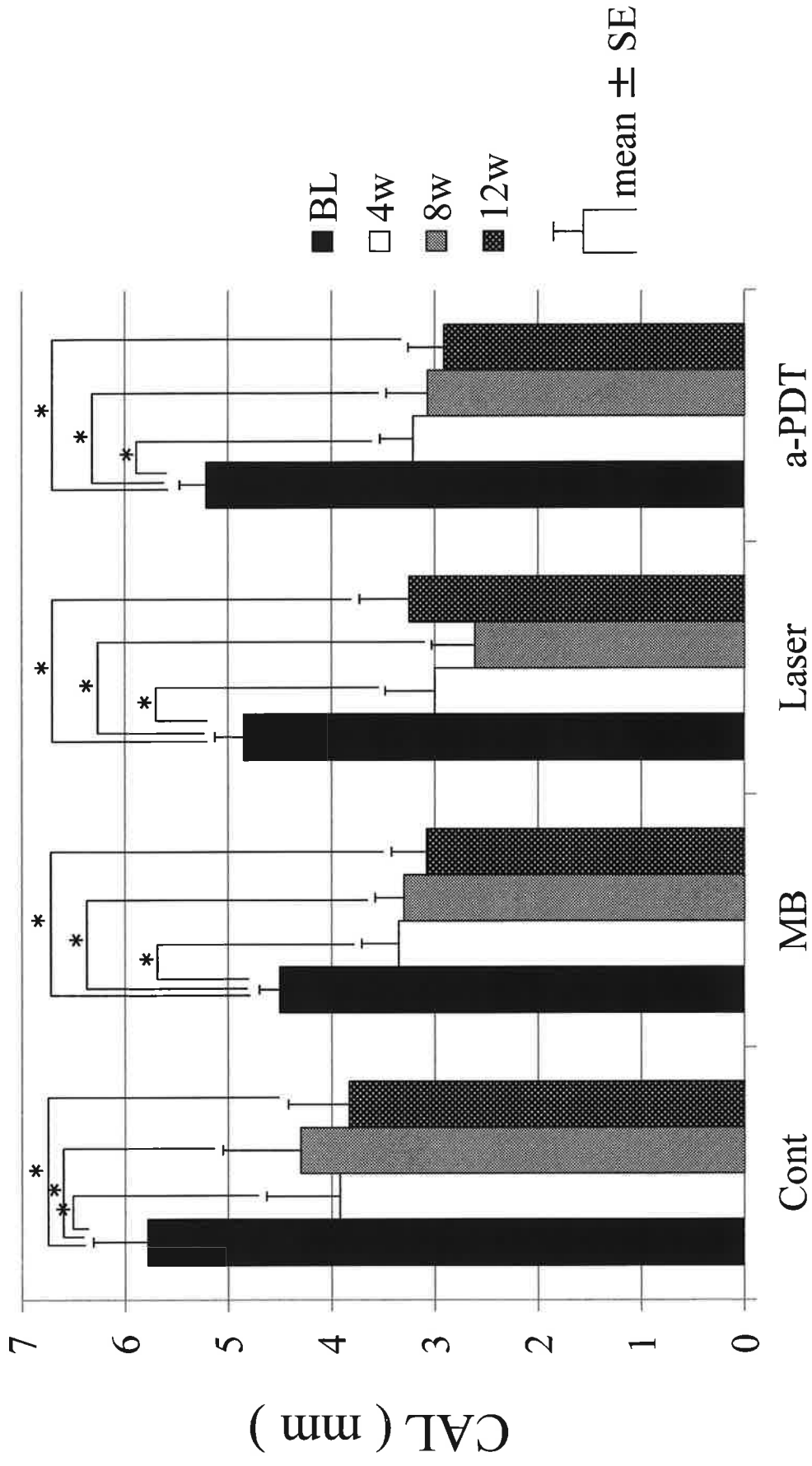


Differences among treatment groups were not significant

Differences between BL and 4 w, 8 w, 12 w were significant at * $p < 0.05$ (repeated measures ANOVA)

Fig 5

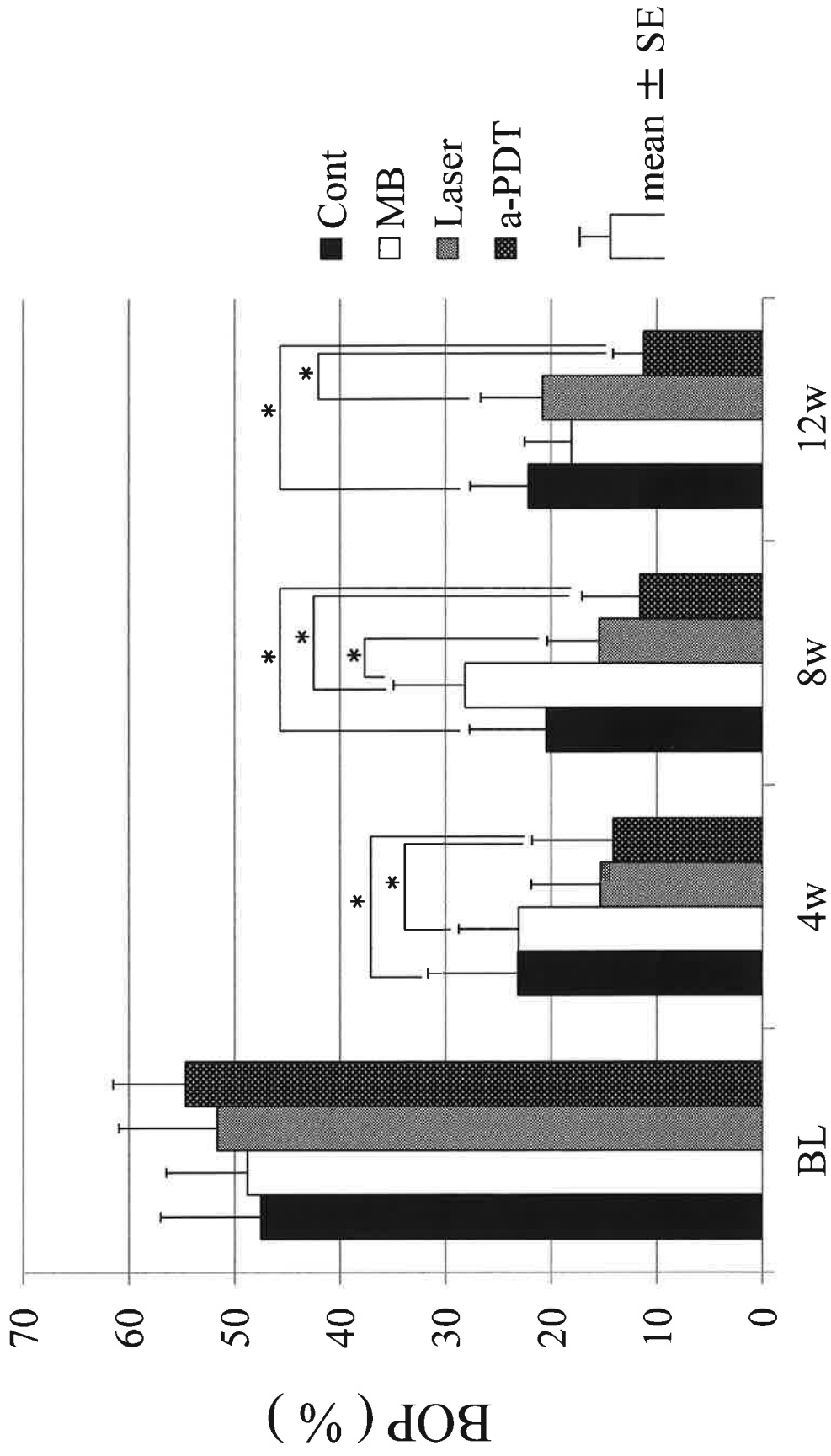
n=14 (male; 9, female; 5)



Differences among treatment groups were not significant
Differences between BL and 4 w, 8 w, 12 w were significant at * $p < 0.05$ (repeated measures ANOVA)

Fig 6

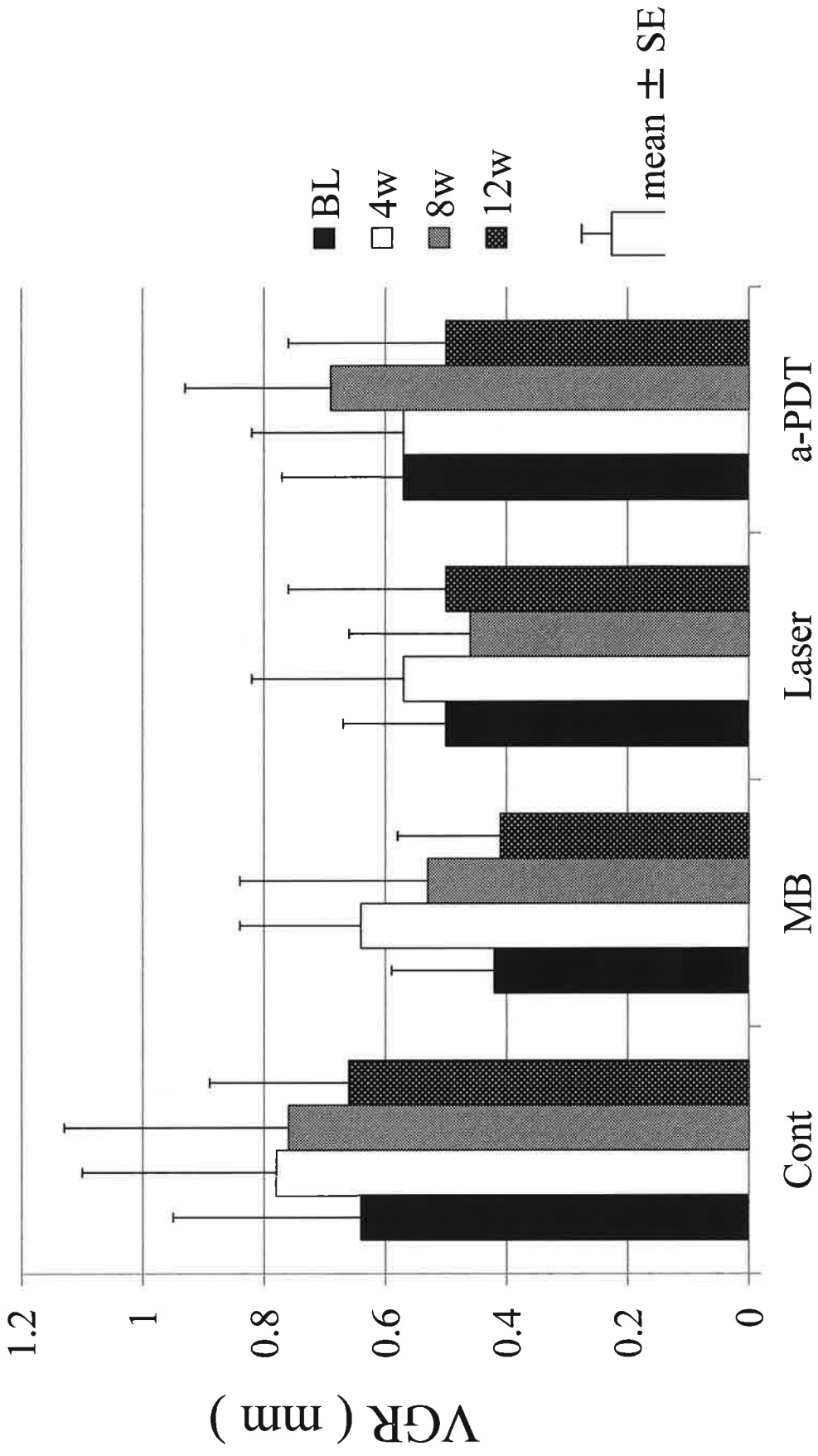
n=14 (male; 9, female; 5)



Differences among treatment groups were significant at $p < 0.05$ (Friedman's X^2 -test Wilcoxon t-test with Bonferroni correction)

Fig 7

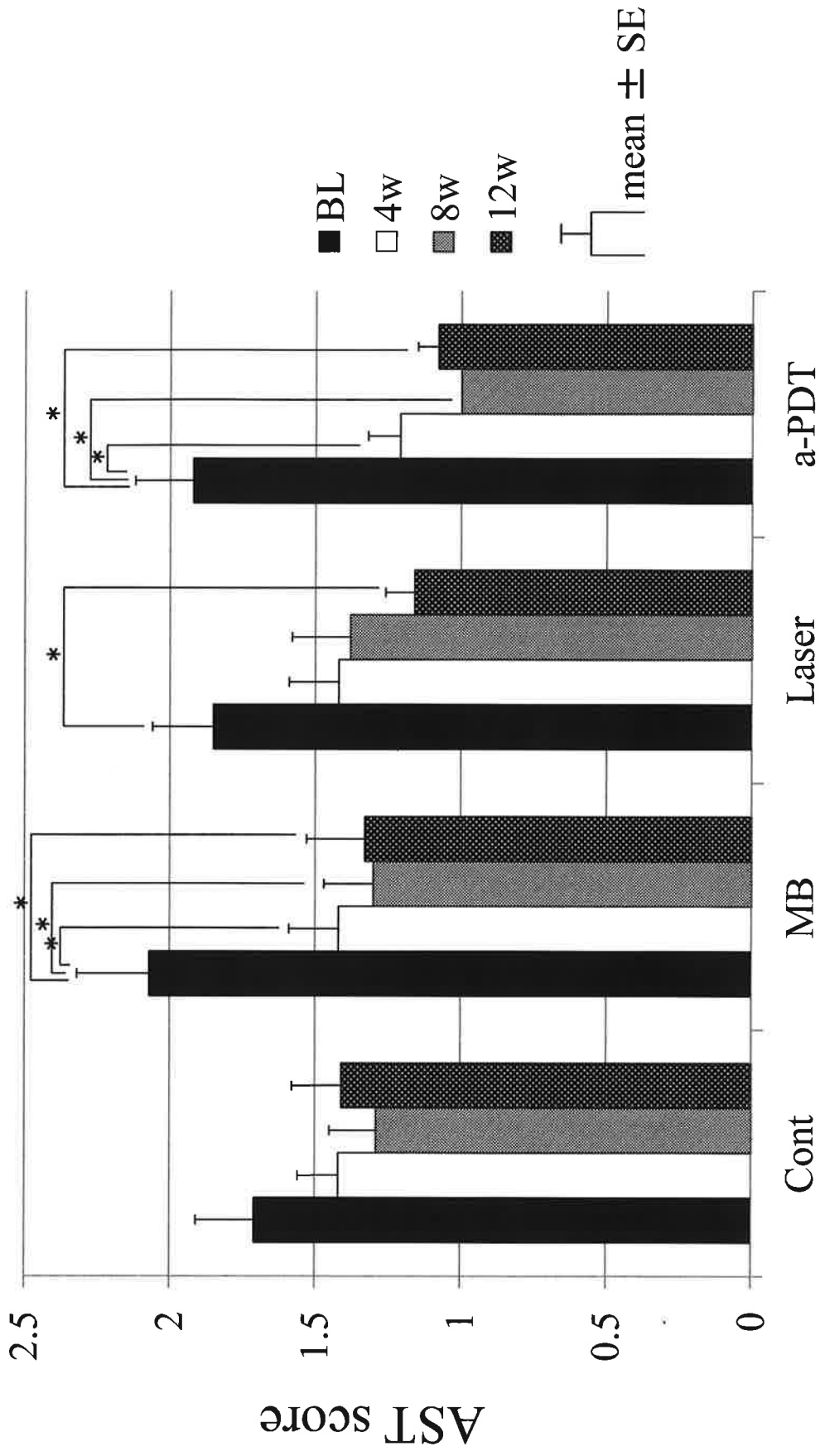
n=14 (male; 9, female; 5)



Differences among treatment groups were not significant
Differences between BL and 4 w, 8 w, 12 w were not significant

Fig 8

n=14 (male; 9, female; 5)

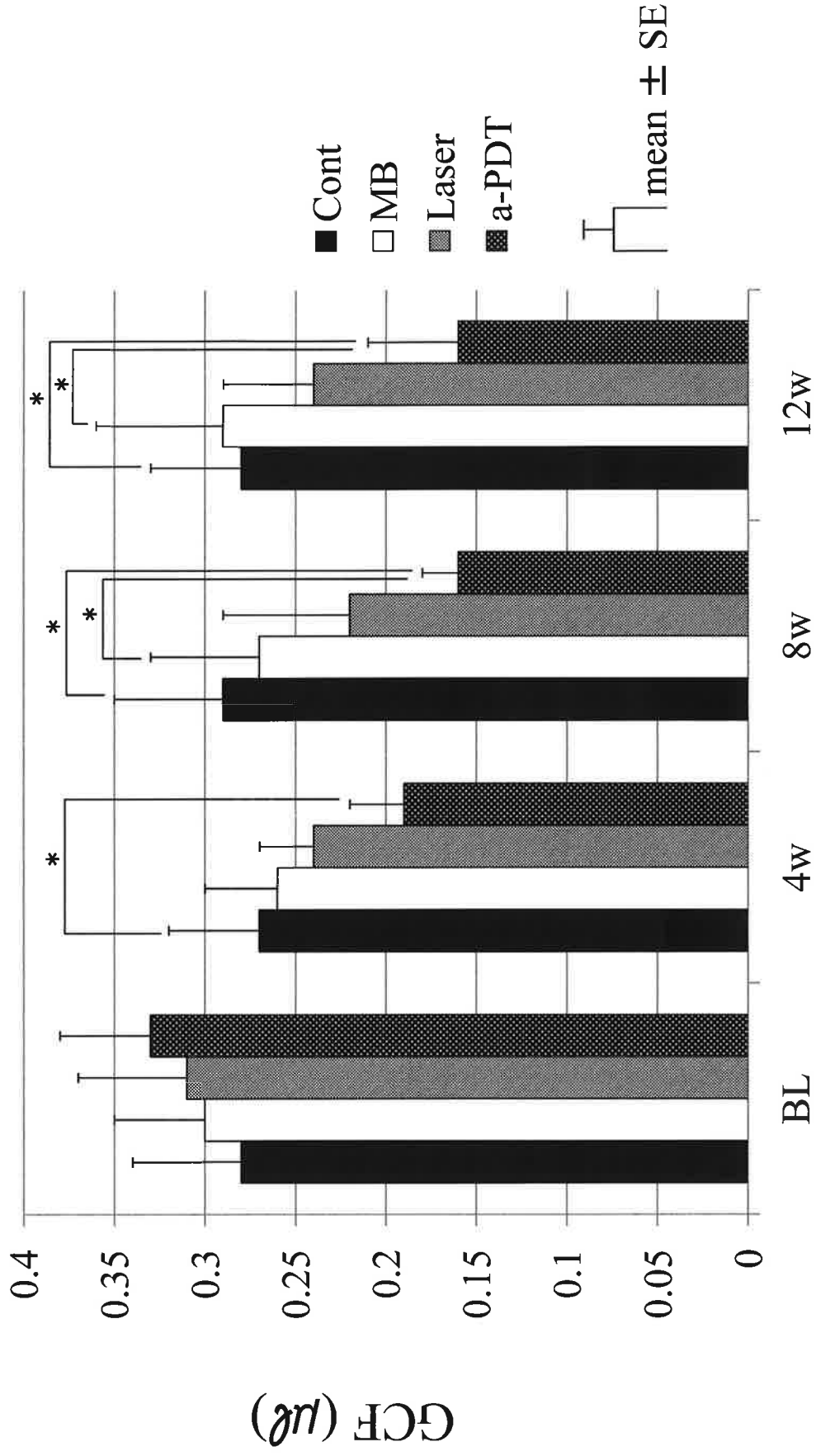


Differences among treatment groups were not significant

Differences between BL and 4 w, 8 w, 12 w were significant at * $p < 0.05$ (repeated measures ANOVA)

Fig 9

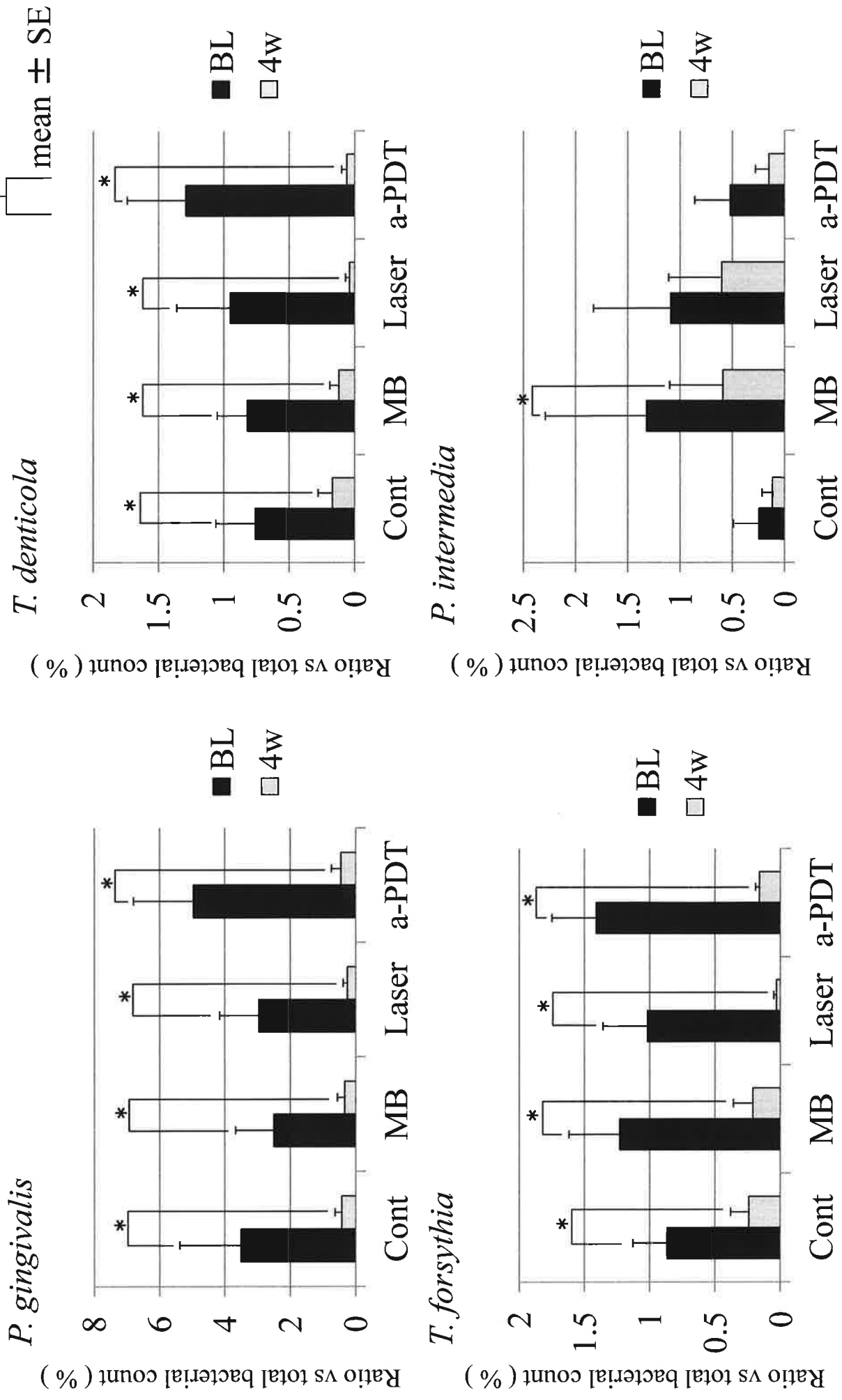
n=14 (male; 9, female; 5)



Differences among treatment groups were significant at $p < 0.05$ (Friedman's X^2 -test Wilcoxon t-test with Bonferroni correction)

Fig 10

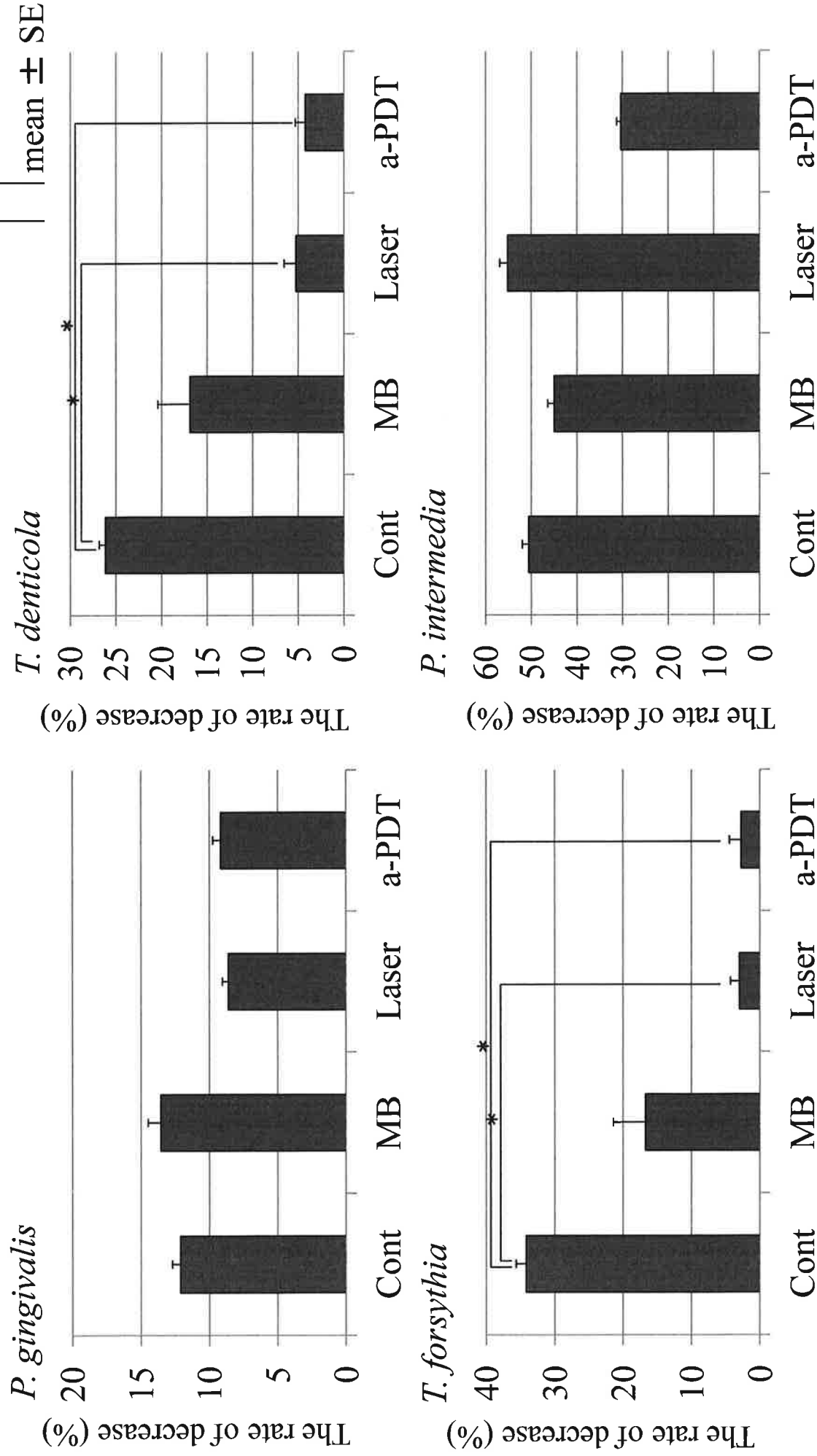
n=14 (male; 9, female; 5)



* $p < 0.05$ (repeated measures ANOVA)

Fig 11

n=14 (male; 9, female; 5)



Differences among treatment groups were significant at $p < 0.05$ (Friedman's X^2 -test Wilcoxon t-test with Boferroni correction)