

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592445

研究課題名（和文） 口腔炎症の新しい簡便診断法 —MPOによる新しい唾液検査法—

研究課題名（英文） A novel diagnostic method of oral inflammation using salivary myeloperoxidase

研究代表者

兼平 孝 (KANEHIRA TAKASHI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：90194935

研究成果の概要（和文）：唾液中のMPO（ミエロペルオキシダーゼ）量と歯周病の有病状況（CPI）を分析した結果、MPO量による歯周病のスクリーニングが可能である結果が得られた。また、歯周病の初期治療の効果や口腔内における炎症の消炎の判定にMPOの定量が有効であることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the relationship between salivary myeloperoxidase (MPO) levels and morbidity in periodontal disease. The results revealed that measuring salivary MPO levels was useful for screening for periodontal disease. Our findings further suggested that quantitative analysis of salivary MPO is of value for assessing the efficacy of initial preparation for treatment of periodontal disease and for detecting inflammatory conditions of the oral cavity, including pericoronitis of the wisdom teeth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：唾液、口腔炎症、ミエロペルオキシダーゼ、スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

歯周病や智歯周囲炎など、口腔領域で臨床的に扱われる疾患には炎症性疾患が多い。しかし、口腔領域においてはそうした炎症の程度を数値的に評価、診断する方法がほとんどないのが現状である。

患者から採血して、血中のCRP（C-reactive protein）を調べる方法があるが、重度の炎症でない限り、その値に炎症状態が反映され

にくい。また、血液検査であるため、患者に採血という侵襲を伴うだけでなく、定量には専門のラボに送る必要があり、チェアサイドで簡便に行える検査ではない。

そうしたことから歯科臨床の現場では、非侵襲的で手軽に採取可能な唾液中の炎症性マーカーを用いて、口腔内炎症を評価する方法が求められてきた。

2. 研究の目的

MPO (ミエロペルオキシダーゼ) は、好中球や単球由来の抗酸化酵素の一つであり、生体内に侵入した微生物を殺菌・排除することが知られている。唾液中にも歯肉溝滲出液を通じて分泌されており、炎症の程度を反映する酵素であると考えられている。それゆえ唾液中の MPO を定量することにより、歯周病などの口腔内の炎症の程度を知ることができると考えられた。

本研究では、唾液中の MPO 量により、(i) 歯周病のスクリーニング検査へ応用すること、(ii) 歯周病の初期治療の効果判定や口腔内炎症の程度の判定が可能であるか、評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯周病のスクリーニングに関する研究

①被験者

北海道内で実施した成人口腔健診事業または北海道大学病院歯科診療センター外来および研究協力歯科医療機関の受診者で本研究の趣旨を理解し、協力の得られた 221 名 (男 87 名、女 148 名、年齢 40~79 歳、平均年齢 64.3±9.2 歳)。

②安静時唾液の採取と保存

被験者から安静時唾液 (吐唾法、10 分間) を採取し、遠心後 (10,000 rpm×10 分)、MPO 測定まで、-30℃にて凍結保存した。

③口腔内診査

1 人の診査者により、被験者の歯式と歯周病の有病状況を診査した。なお、歯周病の有病状況は、国際的に最も広く用いられている指標 (地域歯周疾患歯数: CPI) を用いて、Code 0~4 にて群分けした。CPI の各 Code は次のとおりである。

Code0: 正常

Code1: Probing により出血が認められる

Code2: 歯石の存在が触知される

Code3: 4~5mm の歯周ポケットが存在する

Code4: 6mm 以上のポケットが存在する

④MPO の定量

著者らが開発した簡便なサンドイッチ法 (Sakamoto W, Kanehira T *et al.*, Clin Biochem. 41:584-90, 2008) により MPO を定量した。

本法の特色として、(i) 発色基質を含む反応系に唾液腺由来のペルオキシダーゼに対する inhibitor を添加、好中球、単球由来の MPO を極めて高い感度で選択的に定量できること、(ii) 反応の場として、新しく DEAE cellulose 膜を使用した円形のキットを開発、

反応時間が約 30 分と迅速に結果がでるため、チェアサイドや集団健診の場で簡単に定量することが可能であることなどが挙げられる。

実際の術式としては、(i) 採取した安静時唾液 0.1 ml を円形のキット上に滴下、(ii) 発色基質溶液 0.1 ml を滴下して発色、(iii) 30 分後にハンディ型の Optical Analyzer により波長 460 nm における反射度を測定、(iv) 検量線から濃度を計算の流れで定量を行った。

⑤データの解析

各群間 (Code0~4) の MPO 量を一元配置分散分析にて解析し、Bonferroni 法による多重比較を行った ($p < 0.05$)。また、CPI Code 0~2 を歯周病(-)、Code 3~4 を歯周病(+)とし、(i) 様々なカットオフ値 (10~20 μ g/ml) を設定して、MPO 量による歯周病のスクリーニングを行い、それぞれの感度と特異度、(ii) 各 MPO 量における尤度比を求めた。

(2) 歯周病初期治療の効果判定に関する研究

①被験者

北海道大学病院歯科診療センター外来および研究協力歯科医療機関の受診者で本研究の意義、趣旨を理解し、協力の得られた初診患者で次の条件を満たす者 22 名 (男 8 名、女 14 名、年齢 42~72 歳)。

(i) 現在歯が 20 歯以上ある初診患者で CPI の Code が 3 または 4 の者

(ii) 全身疾患の既往歴がない者および過去 6 か月以内に歯周病の治療経験がない者

(iii) 常用薬を服用していない者

(iv) 喫煙歴のない者

②安静時唾液の採取と保存

初診時と 3 回目の受診時 (再評価時) に採取した。採取と保存方法は (1) と同じである。

③口腔内診査

被験者の歯式と EPP (6 点法による歯周ポケット診査、最大値をその歯のポケット値とした)、CPI、BOP (Probing 時の出血の有無) による歯周病の有病状況を診査した。また、歯肉炎の状態 (GI)、清掃状態 (PL-I) について記録した。

④歯周病初期治療

初診時と 2 回目の受診時に (i) 歯口清掃指導と (ii) スケーリングとルートプレーニングを実施し、3 回目の受診時に再評価を行った。

⑤MPO の定量

(1) と同じである。

⑥データの解析

採取した初診時と3回目の受診時における安静時唾液中のMPO量の増減および各被験者におけるMPO量と各インデックス（EPP、BOP、GI、PL-I）との相関関係（Spearmanの相関係数、 $p < 0.05$ ）を調べた。

(3) 口腔炎症の消炎効果に関する研究

①被験者

北海道大学病院歯科診療センター外来の受診者で本研究の意義、趣旨を理解し、協力の得られた者で次の条件を満たす者10名（男3名、女7名、年齢23～44歳）。

- (i) 現在歯が20歯以上ある者
- (ii) 急性の歯性炎症（根尖性歯周炎、歯周病の急性発作、智歯周囲炎など）により、抗生剤による消炎処置を受け、同時に血液検査でCRP（C-reactive protein）を調べた者
- (iii) 現在、歯周病の治療を実施していない者
- (iv) 常用薬を服用していない者
- (v) 喫煙歴のない者

②安静時唾液の採取と保存

初診時と炎症治療の終了時に採取した。

③口腔内診査

被験者の歯式と6点法による歯周ポケット診査（最大値をその歯のポケット値とした）を実施した。

④MPOの定量

(1)と同じである。

⑤データの解析

採取した初診時と炎症治療の終了時における安静時唾液中のMPO量の増減および各被験者におけるMPO量とCRP値の相関関係（Spearmanの相関係数、 $p < 0.05$ ）を調べた。

4. 研究成果

(1) 歯周病のスクリーニングに関する研究

①各CPI Codeにおける平均MPO量

（単位： $\mu\text{g/ml}$ ）

(Code 0, n=20)	6.9±8.3
(Code 1, n=29)	8.7±8.8
(Code 2, n=63)	8.9±6.4
(Code 3, n=77)	14.9±7.5
(Code 4, n=32)	17.9±7.6

多重比較（Bonferroni法）により、統計学的にCode群間で有意な差（ $p < 0.05$ ）が認められたもの（*）は次のとおりである。

Code	0	1	2	3	4
0				*	*
1				*	*
2				*	*
3	*	*	*		
4	*	*	*		

受診者の唾液MPO量は、Code 0～2のいずれの群もCode 3～4群に対してそれぞれ有意に低いことが認められた。しかし、Code 0～2群間およびCode 3～4においては有意な差は認められなかった。

②各MPO量（ $\mu\text{g/ml}$ ）をカットオフ値とした時のスクリーニングの感度と特異度

カットオフ値	感度	特異度
10	0.503	0.469
11	0.712	0.769
12	0.642	0.786
13	0.638	0.882
14	0.607	0.886
15	0.523	0.857
16	0.468	0.866
17	0.440	0.866
18	0.422	0.883
19	0.367	0.893
20	0.324	0.903

特異度はカットオフ値が高くなると共に上がるが、感度はカットオフ値が $11\mu\text{g/ml}$ の時に最高であることから、適正なカットオフ値は $11\mu\text{g/ml}$ であることが示唆された。

③各MPO量における尤度比

MPO量 （ $\mu\text{g/ml}$ ）	CPI		尤度比 P(3～4)/P(0～2)
	0～2	3～4	
<5.0	38	9	0.24
	34.2%	8.2%	
5.0～9.9	40	21	0.53
	36.0%	19.1%	
10.0～14.9	17	22	1.31
	15.3%	20.0%	
15.0～19.9	5	22	4.44
	4.5%	20.0%	
20.0～24.9	4	20	5.06
	3.6%	18.2%	
≥ 25.0	7	16	2.27
	6.4%	14.5%	
計	111	110	
	100%	100%	

尤度比はMPO量が $20.0\sim 24.9(\mu\text{g/ml})$ の区間で最高値を示した。

(2) 歯周病初期治療の効果判定に関する研究

①初診時と3回目の受診時における安静時唾

液中の MPO 量の増減について

22 名中、初診時の MPO 量がカットオフ値 ($11 \mu\text{g/ml}$) を越えるのは、13 名であった。また、18 名においては、初診時より 3 回目の受診時の MPO 量は、減少が認められたが、4 名においては逆に増加した。

MPO 量の全体平均値 ($\mu\text{g/ml}$) と変動比は、

	(初診時)	(3 回目の受診時)
(MPO 量)	13.9 ± 7.7	$8.7 \pm 5.2^*$
(同、変動比)	1	$0.7 \pm 0.6^*$

($p < 0.05$)

次にカットオフ値 ($11 \mu\text{g/ml}$) を越えた者の平均値 ($\mu\text{g/ml}$) と変動比は、

	(初診時)	(3 回目の受診時)
(MPO 量)	19.2 ± 5.9	$11.4 \pm 5.3^*$
(同、変動比)	1	$0.6 \pm 0.3^*$

($p < 0.05$)

初期治療による歯周組織の炎症の軽快により、MPO 量が減少することが示された。

②MPO 量と各インデックスとの関連

EPP、BOP、GI、PL-I のいずれも MPO 量と明確な相関関係を示すものは認められなかった。

(3) 口腔炎症の消炎効果に関する研究

①初診時と消炎時における安静時唾液中の MPO 量の増減について

MPO 量の全体平均値 ($\mu\text{g/ml}$) と変動比は、

	(初診時)	(消炎時)
(MPO 量)	25.9 ± 5.0	$6.8 \pm 6.4^*$
(同、変動比)	1	$0.6 \pm 0.3^*$

($p < 0.05$)

治療による炎症の軽快により、MPO 量が減少することが示された。

②MPO 量と CRP 値との相関係数

	(初診時)	(消炎時)
相関係数	0.20	0.74

($p < 0.05$)

消炎時において、MPO 量と CRP 値との間に正の相関関係が認められた。

(4) 結果のまとめと今後の課題

①歯周病のスクリーニングに関する研究

(i) 安静時唾液を採取して、MPO を定量し、適切なカットオフ値を設定することで、高い感度と特異度を有する歯周病のスクリーニングが可能である。

(ii) サンドイッチ法にて MPO を定量することで、チェアサイドや集団歯科健診の場におい

て簡便かつ比較的迅速 (30 分) にスクリーニングが行える。

(iii) 今回、口腔内に歯周病をはじめとする炎症性疾患が認められないにもかかわらず、MPO 量が高く、偽陽性と判定された被検者がいたが、その原因究明は今後の課題である。

②歯周病初期治療の効果判定に関する研究

(i) 歯周病の初期治療により、歯肉の炎症の改善とともに MPO 量が減少することが明らかとなった。

(ii) リコールの際に唾液を採取し、MPO 量を測定することで、歯周病の状況を時系列的に評価することが可能であるかについては、今後継続して調べる必要がある。

③口腔炎症の消炎効果に関する研究

(i) 口腔炎症の治療により、炎症の治癒と共に MPO 量が減少し、治療後の MPO 量と CRP 値との間に正の相関関係が認められたことから、炎症状態の判定に MPO 量を評価することは有用である。

(ii) 今回は症例数 (10 名) が少ないため、更に症例数を集める必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Kanehira T, Yamaguchi T, Takehara J, Kashiwazaki H, Abe T, Morita M, Asano K, Fujii Y, Sakamoto W. A pilot study of a simple screening for dry mouth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108: 389-393, 2009. (査読: 有)

② Sakamoto W, Fujii Y, Kanehira T, Asano K, Izumi H. : A novel assay system for myeloperoxidase activity in whole saliva. *Clin Biochem*. 41:584-90, 2008. (査読: 有)

[学会発表] (計 1 件)

① 兼平 孝: 口腔内科医として必要な唾液検査. 第 3 回日本口腔検査学会総会・学術大会、2010 年 9 月 18 日、札幌市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

○ 兼平 孝 (KANEHIRA TAKASHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 90194935

(2) 研究分担者

○ 竹原 順次 (TAKEHARA JUNJI)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 60216934

○森田 学 (MORITA MANABU)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40157904

(3) 連携研究者
なし